

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

Die Bedeutung der obstruktiven Schlafapnoe für die atriale CaMKII-Aktivität

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin Pichler

2023

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

Die Bedeutung der obstruktiven Schlafapnoe für die atriale CaMKII-Aktivität

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin Pichler

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Robert Weißert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2023

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungsverzeichnis.....	5
3	Einleitung.....	7
3.1	Klinisches Problem.....	7
3.2	Kardiomyozyt.....	7
3.2.1	Aufbau.....	8
3.2.2	Die elektromechanische Kopplung.....	9
3.2.3	Wichtige Kanäle.....	12
3.2.4	Nachdepolarisationen.....	13
3.3	Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS).....	14
3.3.1	Definition und Epidemiologie.....	14
3.3.2	Pathophysiologische Zusammenhänge.....	17
3.4	Die Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII).....	20
3.4.1	<i>Aufbau</i>	20
3.4.2	Regulationsmechanismen.....	21
3.4.3	Rolle in der Arrhythmogenese und der Herzinsuffizienz.....	24
3.5	Klinische Fragestellung.....	26
4	Material und Methoden.....	27
4.1	CONSIDER-AF.....	27
4.1.1	Studiendesign.....	28
4.1.2	Zulassung.....	29
4.1.3	Ziele von CONSIDER-AF.....	29
4.1.4	Probengewinnung und -lagerung von humanem Atrium.....	29
4.1.5	Diagnostik des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms.....	30
4.2	Die Bedeutung der obstruktiven Schlafapnoe für die atriale CaMKII-Aktivität.....	30
4.2.1	CaMKII-Aktivitätsassay.....	30
4.2.2	Bestimmung der CaMKII-Expression.....	41
4.2.3	Statistik und Datenauswertung:.....	44
5	Ergebnisse.....	45
5.1	Studienpopulation.....	45
5.2	HDAC4-CaMKII-Bindungsassay.....	50
5.3	CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit ihrer Expression.....	57
5.4	Univariate und multivariate Regressionen.....	60

6	Diskussion.....	65
6.1	Ergebnisse	65
6.1.1	Die atriale CaMKII-Aktivität ist bei Patienten mit einem OSAS erhöht.....	65
6.1.2	Der Zusammenhang zwischen der CaMKII-Aktivität und der Herzinsuffizienz.....	67
6.1.3	CONSIDER-AF.....	67
6.2	Klinische Relevanz	68
6.2.1	Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom geht mit einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern einher	68
6.2.2	Die CaMKII wird durch Oxidation bei Patienten mit OSAS aktiviert	71
6.2.3	Die proarrhythmogene Wirkung der gesteigerten CaMKII-Aktivität unter OSAS.....	72
6.3	Limitationen der Arbeit.....	73
6.4	Ausblick: Inhibition der CaMKII	75
7	Zusammenfassung.....	77
8	Anhang	78
8.1	Tabellenverzeichnis.....	78
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	78
8.3	Literaturverzeichnis.....	79
8.4	Danksagung	95
8.5	Lebenslauf	96

2 Abkürzungsverzeichnis

AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
AIP	Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide (CaMKII-Inhibitor)
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
CABG	Koronare Bypass-Operation
[Ca]_i	Zytosolische Kalziumkonzentration
Ca²⁺/CaM	Kalzium-Calmodulin-Komplex
CaM	Calmodulin
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II
CaMKIIδ/ CaMKIIδb/c	Unterformen der CaMKII
CPAP	Kontinuierlicher Atemwegs-Überdruck
DAD	Späte Nachdepolarisationen
EAD	Frühe Nachdepolarisationen
EEG	Elektroenzephalografie
eGFR	Errechnete glomeruläre Filtrationsrate
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyografie
EOG	Elektrookulografie
GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC4	Class Ila histone deacetylase 4
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradiger Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
I_{Ca}	Einwärts gerichteter Kalziumstrom
I_{K1}	Einwärts gerichteter Kalium-Strom

I_{Kr}	Schneller verzögerter auswärts gerichteter Kalium-Strom
I_{Na}	Einwärts gerichteter Natrium-Strom
I_{to}	Auswärts gerichteter Kalium-Strom
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	Brain natriuretic Peptide
NYHA I-IV	New York Heart Association Klassifikation
ODI	Oxygen Desaturation Index
OSAS	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PTFV1	P-wave terminal force in V1
PVI	Pulmonalvenenisolation
PLN	Phospholamban
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR/RyR2	Ryanodinrezeptor (Typ 2)
SBAS	Schlafbezogene Atemstörungen
SERCA2a	Sarkoplasmatische/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase 2a
SGLT2	Sodium-Glukose-Transporter 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
VHF	Vorhofflimmern

Die Bedeutung der obstruktiven Schlafapnoe für die atriale CaMKII-Aktivität

3 Einleitung

3.1 Klinisches Problem

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) ist eine weit verbreitete Erkrankung, die seit den letzten Jahrzehnten in Industrieländern stetig zunimmt (1,2). Es ist bekannt, dass das OSAS mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen einhergehen kann, wie zum Beispiel mit Herzinsuffizienz (HI) oder Vorhofflimmern (VHF) (3–6). Der genaue Pathomechanismus zwischen OSAS und diesen kardialen Erkrankungen ist noch nicht hinreichend bekannt, aber es wurde bereits erforscht, dass das OSAS mit einem gesteigerten transmuralen Druckgradienten im Herzen, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung des Sympathikus einhergehen kann (7–11).

Diese eben beschriebenen Auswirkungen des OSAS sind interessanterweise potenzielle Aktivierungswege für die Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (12–16). Dieses Enzym ist von besonderem klinischem Interesse, da bereits viele Studien darauf hinweisen konnten, dass die CaMKII durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen zu einem VHF sowie zur Herzinsuffizienz beitragen kann (17–20). Aus diesem Grund stellt sich die dringende Frage, ob das OSAS zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII und damit zu der Entstehung eines elektrischen Remodelings führen kann, was neue Therapieoptionen dieser kardialen Erkrankungen ermöglichen könnte.

3.2 Kardiomyozyt

Bevor wir uns dem OSAS und der CaMKII widmen, erfolgt ein Überblick über die Herzmuskelzelle und die Entstehung eines Aktionspotentials, um die pathophysiologischen Zusammenhänge besser verstehen zu können.

3.2.1 Aufbau

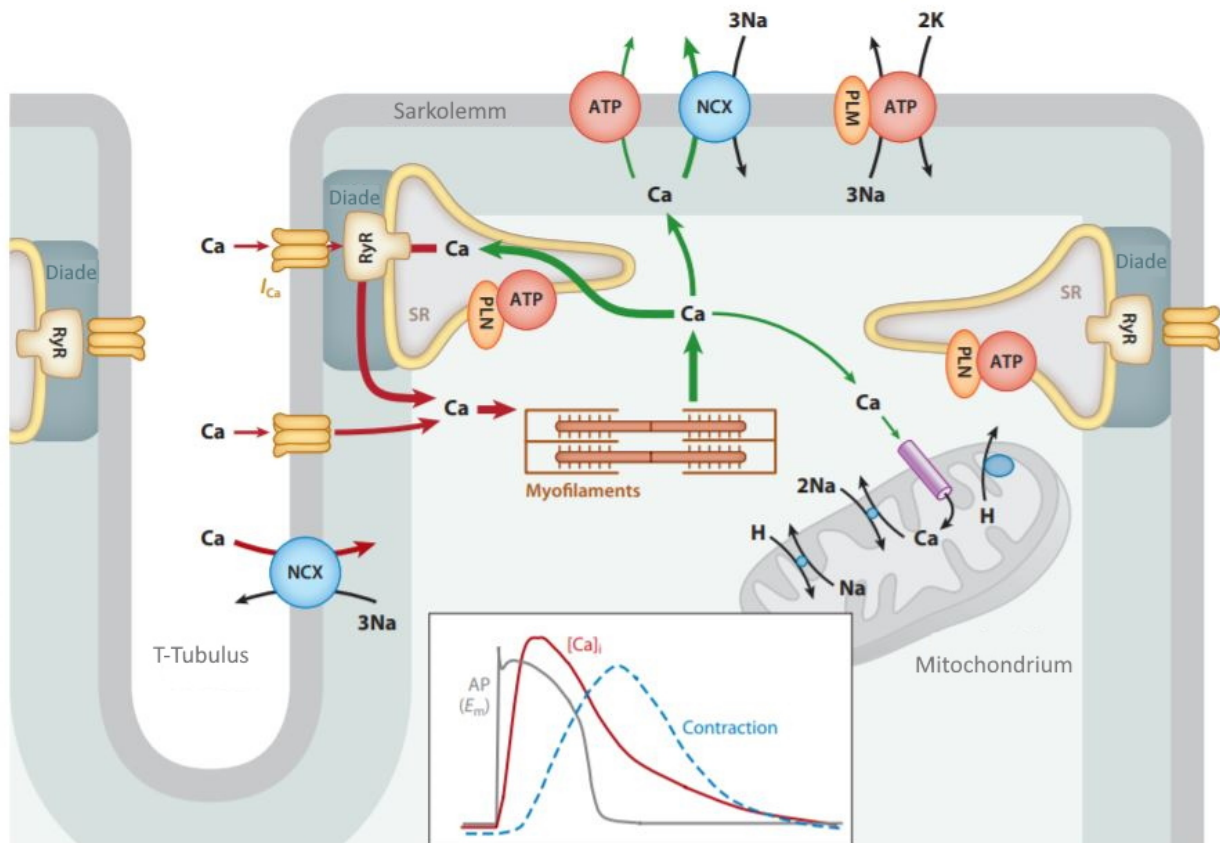


Abbildung 3-1: Schematischer Ausschnitt eines Kardiozyten. Modifiziert nach Bers (21).

Erkennbar ist der T-Tubulus, der durch Einstülpungen des Sarkolemm entsteht. Dieser bildet zusammen mit dem SR die Diaden. Kalzium findet durch Kalziumkanäle von Extrazellulär und durch RyR2 aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in die Zelle, wo es die Kontraktion ermöglicht. In der Diastole wird das Kalzium primär durch die SERCA2a (hier nicht eingezeichnet) und den NCX aus dem Zytosol geschleust. Letzterer tauscht ein Kalzium-Ion gegen drei Natrium-Ione aus. Der Schaubkasten zeigt den zeitlichen Zusammenhang von dem Aktionspotential (AP), der zytosolischen Kalziumkonzentration ($[Ca]_i$) und der Muskelkontraktion (Contraction).
 Abkürzungen: NXC = Natrium-Kalzium-Austauscher; ATP = ATPase; RyR = Ryanodinrezeptor Typ 2; I_{Ca} = inwärts gerichteter Kalziumstrom; SR = Sarkoplasmatisches Retikulum; AP = Aktionspotential; $[Ca]_i$ = zytosolische Kalziumkonzentration.

Das den Kardiomyozyten umschließende Sarkolemm weist mehrere Spezialisierungen auf. An den Glatzstreifen, Verbindungen benachbarter Kardiodyten, finden sich neben der Fascia adhaerens und der Macula adhaerens, die jeweils der Festigung des Zellkontaktes dienen, auch Gap Junctions. Letztere sind Kanäle, die zwei benachbarte Zellen miteinander verbinden und somit ein funktionelles Synzytium ermöglichen (22). Dies ist für eine zeitgleiche und geordnete Kontraktion von großer Bedeutung. Eine weitere Spezialisierung des Sarkolemm ist die

funktionelle Kopplung mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Hierfür bildet es tiefe Einstülpungen in Richtung der terminalen Zisternen des SRs, sogenannte T-Tubuli. Diese bilden zusammen mit den terminalen Zisternen die Diaden (22–24). Das SR ist ein Zellorganell, das primär der Sequestrierung und als Kalziumspeicher dient (22). Die wichtigsten Ca^{2+} -Kanäle des SRs sind der Ryanodin-Rezeptor (RyR) und die sarkoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA), auf die später näher eingegangen wird.

Die Herzmuskelzelle wird der quergestreiften Muskulatur zugeordnet. Diese Querstreifen kommen durch die alternierend überlappende Anordnung der kontraktilen Myofilamente zustande, welche aus Aktin und Myosin bestehen und einen Großteil des Trockengewichts der Kardiomyozyten ausmachen (25). Vereinfacht dargestellt bilden die Köpfe des Myosins Brücken zu Aktin und können $[\text{Ca}]$ -vermittelt abknicken, sich dadurch relativ zum Aktin verschieben und sich unter Hydrolyse von ATP wieder vom Aktin lösen. Ein solcher Zyklus bewirkt eine Translation von etwa 5-10nm (0,25-0,5% der Länge des Sarkomers) (22).

3.2.2 Die elektromechanische Kopplung

Um eine solche Kontraktion auszulösen, bedarf es eines Aktionspotentials, was einer Veränderung des Membranpotentials entspricht. Dieses führt durch Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Kanäle zu einer intrazellulären Elektrolytverschiebung, was schließlich durch die Myofilamente eine mechanische Aktion ermöglicht. Das Aktionspotential eines Kardiomyozyten (ausgenommen Zellen des Sinusknotens) wird in fünf Phasen eingeteilt, welche im Folgenden beschrieben werden (26) (siehe Abbildung 3-2).

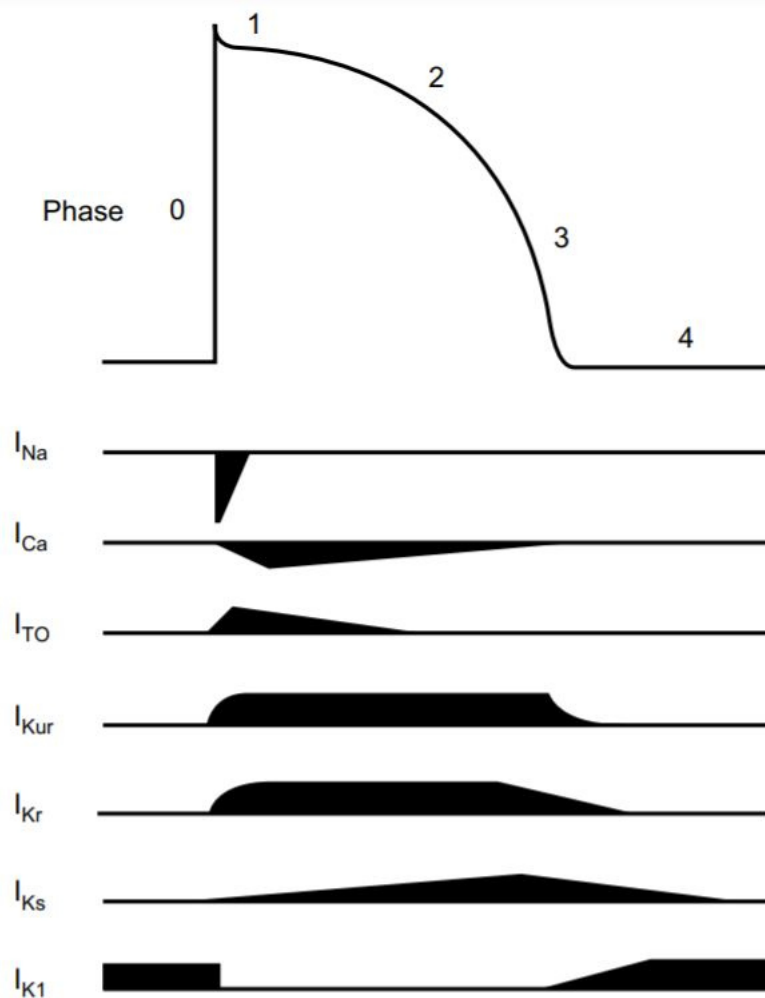


Abbildung 3-2: Aktionspotential des Kardiomyozyten. Nach Delpón (27).

Zu erkennen ist eine schematische Darstellung des Aktionspotentials eines Kardiomyozyten, aufgeteilt in die Phasen 0-4. Zudem werden die Elektrolytströme während des Aktionspotentials dargestellt, ein Ausschlag nach unten bedeutet einen Einstrom in die Zelle, ein Ausschlag nach oben zeigt einen Auswärtsstrom an.

Abkürzungen: I_{Na} : einwärts gerichteter Na⁺-Strom; I_{Ca} : einwärts gerichteter L-Typ Ca²⁺-Strom; I_{to} : auswärts gerichteter K⁺-Strom; I_{Kur} , I_{Kr} und I_{Ks} : ultrarapid, rapid und langsamer verzögerter auswärts gerichteter K⁺-Strom; I_{K1} : einwärts gerichteter K⁺-Strom.

In der Aufstrichphase (Phase 0) erreicht der elektrische Impuls über Nachbarzellen den Kardiomyozyten. Ist diese Spannung groß genug, um ausreichend spannungsabhängige Na⁺-Kanäle zu aktivieren, führt das zu einem sich selbst verstärkenden Mechanismus von sich öffnenden Na⁺-Kanälen. Dies ermöglicht einen depolarisierenden Natriumeinstrom in die Zelle (I_{Na}). Diese schnelle Depolarisation (200 V/s) zeigt sich in einem steilen Anstieg des Aktionspotentials und reicht bis +35-50 mV. Hierbei werden inwärts gerichtete L-Typ Ca²⁺-Kanäle geöffnet, was zu einem

Einstrom von Kalzium in die Zelle führt (I_{Ca}). Dies wird durch eine weitere Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Ryanodinrezeptor Typ 2 Kanäle (RyR2) verstärkt. Der Großteil der Na^+ -Kanäle ist inaktiviert und der Einwärtsstrom wird primär durch Ca^{2+} -Kanäle getragen (22).

Die frühe Repolarisation (Phase 1) wird primär durch einen auswärts gerichteten Kaliumstrom (transient outward current, I_{to}) getragen, welcher das Aktionspotential beendet. Durch die hohe Kalzium-Konzentration in der Zelle wird eine Bindung von Kalzium an Troponin C begünstigt, was die Kontraktion der Myofilamente einleiten kann (22).

Die Plateauphase (Phase 2) kann mehrere hundert Millisekunden andauern und zeichnet sich dadurch aus, dass sich das Membranpotential nicht oder nur geringfügig verändert und bei etwa 0 V liegt (22). Ein- und Auswärtsströme befinden sich hier nahezu im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht ist abhängig von einwärts gerichteten Kalziumströmen und auswärts gerichteten Kaliumströmen und reagiert sensibel auf Veränderungen (28).

Die späte Repolarisation (Phase 3) dient der Beendigung der Kontraktion und ist gekennzeichnet durch eine rasche Repolarisation bis zum diastolischen Gleichgewichtspotential. Treibender Faktor ist hier insbesondere anfangs der auswärts gerichtete Kaliumkanal (hERG, I_{Kr}), wobei sich dieser mit zunehmender Repolarisation deaktiviert. Wesentlich ist auch das Kalzium wieder aus dem Zytoplasma zu entfernen. Dies erfolgt einerseits durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), welche das Kalzium zurück in das SR transportiert. Andererseits wird bei zunehmend negativem Membranpotential verstärkt Kalzium durch einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) aus der Zelle geschleust. Hierbei wird ein Ca^{2+} -Ion gegen 3 Na^+ -Ionen ausgetauscht, was insgesamt zu einem positiven, depolarisierenden Einwärtsstrom führt (22,29,30).

Das Ruhemembranpotential (Phase 4) ist ähnlich dem Gleichgewichtspotential von Kalium und wird entsprechend primär durch einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle bestimmt (inward rectifier potassium channels, I_{K1}). Der nächste Stimulus führt zu einem Verschluss dieser Kanäle, womit das Membranpotential wieder Änderungen zugänglich ist (26).

3.2.3 Wichtige Kanäle

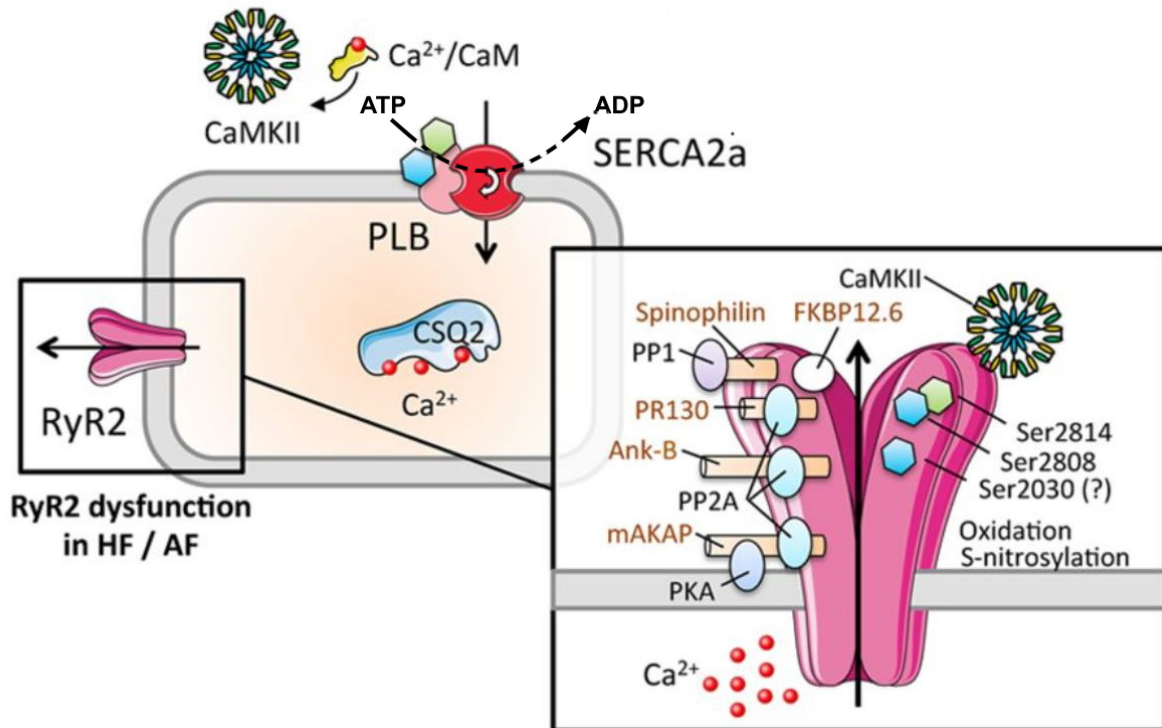


Abbildung 3-3: Der Ryanodin-Rezeptor Typ 2 und die SERCA2a. Modifiziert nach Dobrev (31).

Der makromolekulare Komplex des RyR2 ist ersichtlich. Die durchgezogenen Pfeile symbolisieren den Kalziumstrom. Die SERCA2a pumpt Kalzium unter Spaltung von ATP (Adenosintriphosphat) zu ADP (Adenosindiphosphat) in das SR. Wie in dem vergrößerten Schaukasten des RyR2 ersichtlich ist, verfügt dieses über eine Bindungsstelle für die CaMKII.

Der Ryanodinrezeptor liegt im Kardiomyozyten als Unterform Typ 2 (RyR2) und ist für die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR verantwortlich (siehe Abbildung 3-3). Der RyR2 liegt in einem Komplex mit verschiedenen regulatorischen Proteinen vor (32). Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ist abhängig von der Kalziumkonzentration im Zytoplasma sowie der im SR. Bei steigender Kalziumkonzentration im Zytoplasma sinkt die Offenwahrscheinlichkeit, und vice versa (29). RyR2 kann durch Mutationen zu ventrikulären Arrhythmien führen (33,34). Aber auch nicht-mutierte RyR2 können durch Regulationsmechanismen beeinflusst werden. So bietet die zytosolische Domäne wie eben angesprochen Bindungsstellen für zahlreiche Proteine, unter

anderem für die CaMKII (35). Durch Phosphorylierung an der spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin 2814 kann diese den RyR2 aktivieren (36).

Die SERCA2a fungiert als Gegenspieler des RyR2, indem sie unter Energieaufwand Kalzium aus dem Zytosol in das SR zurückführt (37). Dieser Transporter schafft es so bis zu 70% des zytosolischen Kalziums aufzunehmen (29).

3.2.4 Nachdepolarisationen

Es wird zwischen frühen (early afterdepolarisations, EADs) und späten Nachdepolarisationen (delayed afterdepolarisations, DADs) unterschieden. Den EADs liegt eine verlängerte Dauer des Aktionspotentials zugrunde. Diese ermöglicht es, dass L-Typ Ca^{2+} -Kanäle erneut während des Aktionspotentials aktiviert werden und der Kalziumeinstrom in die Zelle zu einer Depolarisation führt. Erreicht diese Depolarisation das Erregungspotential, wird eine ektope Erregung ausgelöst (38).

Wie bereits oben angesprochen, führt der NCX zu einem Netto-depolarisierenden Einwärtsstrom. Wenn der NCX verstärkt aktiv ist, zum Beispiel durch einen erhöhten diastolischen Kalziumgehalt, kann hierdurch die Depolarisationsschwelle erreicht werden und somit eine DAD entstehen. Dies führt zu einem verfrühten Aktionspotential, was wiederum zu einer ektope Erregung führt (39,40). Des Weiteren können DADs durch einen erhöhten Ca^{2+} -Gehalt und einer Dysregulation von RyR2 begünstigt werden (41,42). So haben Hove-Madsen et al herausgefunden, dass bei Patienten mit VHF RyR2 aktiver ist sowie vermehrt Ca^{2+} -Sparks (spontane Freisetzungen von Ca^{2+} aus dem SR) beobachtet werden konnten (43). Diese Ca^{2+} -Sparks führen zu einem erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt in der Zelle, was wie bereits angesprochen durch NCX DADs ermöglicht (44,45).

3.3 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS)

3.3.1 Definition und Epidemiologie

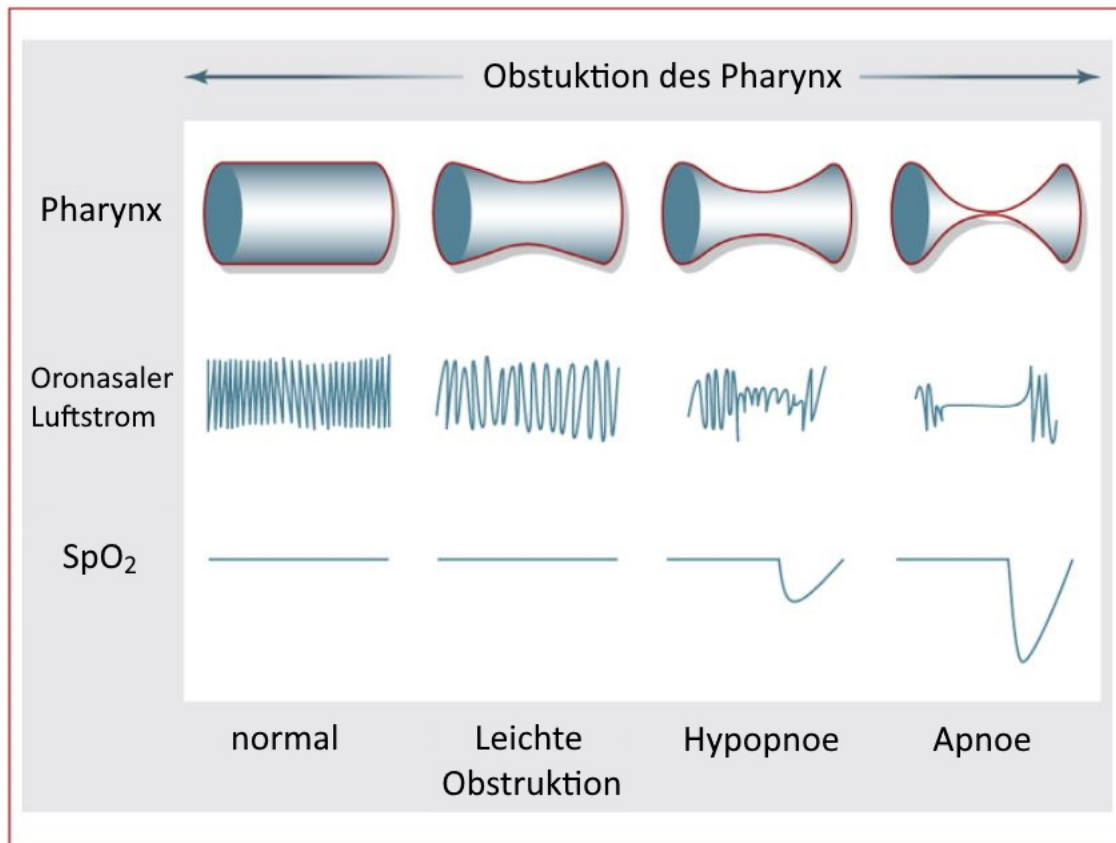


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung verschiedener Schweregrade von Obstruktionen, modifiziert nach Arnaud (46).

Der oronasale Luftstrom wird mit der Obstruktion des Pharynx zunehmend gestört, bei kompletter Obstruktion kommt der Luftstrom zum Stillstand. Dies geht mit leichten (Hypopnoe) bis schwergradigen (Apnoe) Abfällen der Sauerstoffsättigung einher.

Es gibt im Wesentlichen zwei Gruppen der schlafbezogenen Atemstörungen (SBAS), eine mit und eine ohne beteiligte Obstruktion der oberen Atemwege (47,48). Die Letztgenannte ist selten und durch verschiedene, insbesondere zerebrale oder kardiovaskuläre Primärerkrankungen bedingt (wie beispielsweise die Cheyne-Stokes-Atmung).

Die häufigere Gruppe, SBAS mit Obstruktion, können in ihrem Schweregrad von mild (habituelles Schnarchen) bis zum ausgeprägten obstruktiven Schlafapnoesyndrom

(OSAS) reichen. Bei den SBAS mit Obstruktion kommt es während des Schlafs wiederholt zu teilweiser oder vollständiger Verlegung der oberen Atemwege, welche zu einer Verminderung oder Unterbrechung des Atemflusses führt (48). Das OSAS ist die häufigste Form der SBAS und geht mit Apnoen und Hypopnoen einher. Apnoen sind Unterbrechungen der Atmung, also eine über 90%ige Reduktion des Atemflusses für über zehn Sekunden, was zu einem Abfall der Sauerstoffsättigung von über 4% führt. Hypopnoen hingegen stellen eine Verminderung des Luftstroms von 30-90% mit einem Abfall der Sauerstoffsättigung um über 4% dar (49–52) (siehe Abbildung 3-4). Aus diesen beiden Werten lässt sich der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) errechnen, also die durchschnittliche Anzahl der Apnoen und Hypopnoen pro Stunde Schlaf (53–55). Ein AHI von 5-15 entspricht einem milden, 15-30 einem mittelschweren und über 30 einem schweren OSAS (53,56,57). Diese Unterbrechungen des Atemflusses führen neben der beschriebenen Hypoxie zu einer Erhöhung des intrathorakalen Drucks sowie häufig zu einer Aufweckreaktion, was die Schlafqualität einschränkt und folglich zu einer vermehrten Tagesmüdigkeit führt. Diese kann wiederum Ursache von vermehrten Verkehrsunfällen sein (53,58,59).

Während diese Tagesmüdigkeit zusammen mit nächtlichem Schnarchen, morgendlichem Kopfschmerz und Konzentrationsstörungen auf die Erkrankung hinweisen (53,60) und durch Fragebögen sowie klinische Untersuchungen getestet werden können, stellt den Goldstandard zur Diagnosestellung die Polysomnographie dar (61). In dieser Untersuchung werden nachts unter anderem der Atemfluss, die mechanische Atemarbeit und die Blutsauerstoffsättigung gemessen. Die empfohlenen erhobenen Parameter werden in der Tabelle 3-1 aufgelistet.

Funktion	Parameter
Schlaf	EEG, EOG
	EMG
Atmung	Atemfluss
	Atmungsanstrengung
	Sauerstoffsättigung
	Kohlendioxid
	Schnarchen
Kardial	EKG
Bewegung	EMG M. tibialis
	Körperposition
	Video

Tabelle 3-1: Parameter und Funktionen der Polysomnographie, modifiziert nach Winterholler (62)

Während einer Polysomnographie werden der Schlaf, die Atmung, die Herzfunktion und die Körperbewegungen mittels der rechts aufgelisteten Parameter beurteilt.

Abkürzungen: EEG = Elektroenzephalogramm, EOG = Elektrookulographie, EMG = Elektromyographie, EKG = Elektrokardiogramm

Die Schlafapnoe ist eine weit verbreitete Erkrankung, deren Prävalenz in Industrieländern wie Deutschland über die letzten Jahrzehnte kontinuierlich gestiegen ist (1,2). Je nach Studiendesign sind zwischen 4 und 49% der Allgemeinbevölkerung daran erkrankt (53,56,57,63). Im Alter steigt die Prävalenz. Durán et al zeigten in einer groß angelegten Studie, dass OSAS bei Männern zwischen 30-39 Jahren noch bei 9% (AHI \geq 5), bzw 2,7% (AHI \geq 15) vorkommt, allerdings 24% der Männer über 60 Jahre einen AHI \geq 15/h und 52% einen AHI \geq 5/h aufweisen (64). So kommt wohl jede/r klinisch tätige Ärztin/Arzt zwangsläufig mit dieser Erkrankung in Kontakt.

3.3.2 Pathophysiologische Zusammenhänge

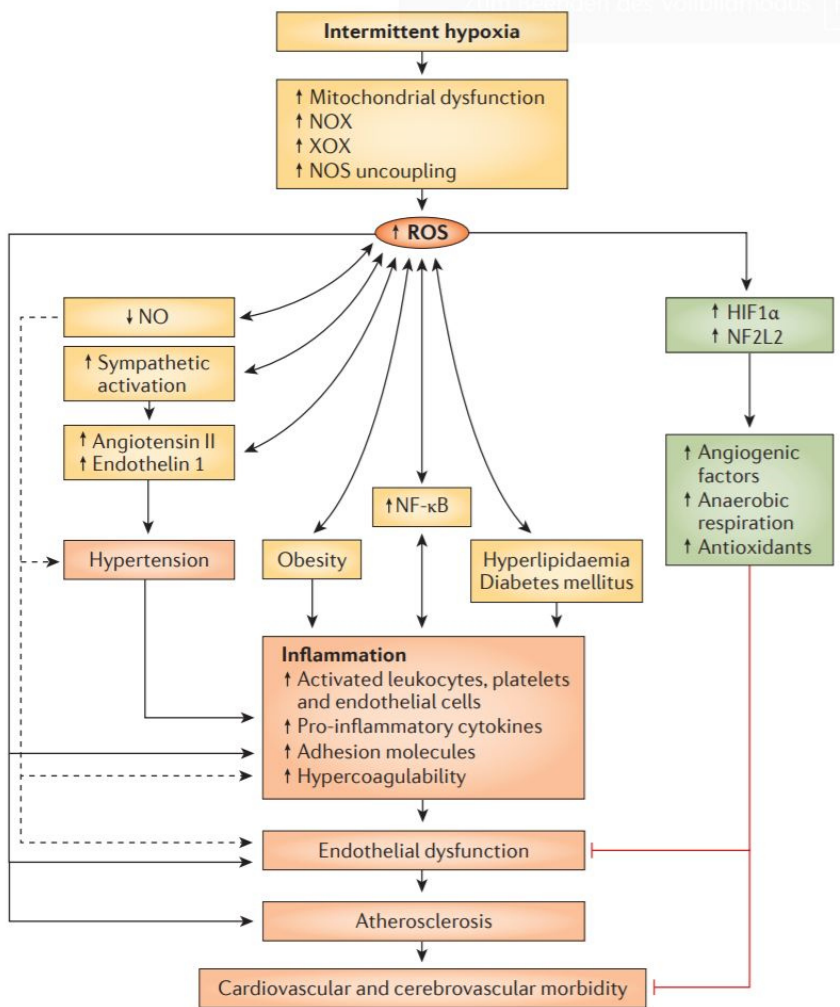


Abbildung 3-5: Folgen des oxidativen Stresses, nach Lévy (65) (adaptiert nach Lavie (66))

Die intermittierenden Hypoxien tragen zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei. ROS führt zu einem Abfall von Stickstoffmonoxid, was eine Hypertonie, Inflammation, Schädigung des Endothels, Arteriosklerose und Blutgerinnungsstörungen begünstigt. Des Weiteren wird hierdurch der Sympathikus aktiviert, was wiederum eine Hypertonie verstärkt. Entzündungen werden ebenfalls durch Hochregulation von NF-κB gefördert. Auch weitere Faktoren, die mit OSAS in Verbindung gebracht werden, wie das metabolische Syndrom, aber auch Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen (hier nicht eingezeichnet) stehen mit ROS in Verbindung.

Dabei fällt auf, dass Patienten mit einer Schlafapnoe ein gesteigertes Risiko aufweisen, Vorhofflimmern zu entwickeln (3–5). Dieses Vorhofflimmern ist dann auch anfälliger, sich nach einer Kardioversion oder Pulmonarvenen-Ablation therapieresistent zu zeigen (5,67,68). Dies hat zur Folge, dass Patienten mit

Schlafapnoe vermehrt an den Folgen des Vorhofflimmerns, wie z.B. an einem Schlaganfall, versterben (69).

In klinischen Studien konnte herausgefunden werden, dass das Schlafapnoe-Syndrom den Behandlungserfolg einer antiarrhythmischen Therapie (sowohl bei kathetergestützten als auch bei pharmakologischen Verfahren) senkt. Im Umkehrschluss konnte dieser negative Effekt durch die Therapie der Schlafapnoe mittels einer kontinuierlichen Überdruckbeatmung (continuous positive airway pressure, CPAP) reduziert werden (70). Umso bedauerlicher ist, dass dieses Therapieverfahren von den Patienten nur schlecht angenommen wird (71). Cowie et al stellten darüber hinaus fest, dass eine Beatmung zwar eine zentrale Schlafapnoe therapiert, jedoch dennoch mit einer erhöhten Mortalität gegenüber der Vergleichsgruppe einhergeht (72).

Eine alternative Therapie wäre also dringend notwendig, die Studienlage zu den Pathomechanismen auf zellulärer Ebene war allerdings zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit sehr limitiert. Mögliche Auswirkungen der Schlafapnoe auf das Vorhofflimmern beinhalten einen erhöhten transmuralen Druckgradienten, der zu einer gesteigerten Belastung des Vorhofs führt (10,11), eine verstärkten Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie eine Vermehrung von ROS (7–9). Der gesteigerte transmurale Druckgradient bedeutet einen erhöhten Druckabfall. Dieser ist auf die versuchte Atemarbeit gegen den Widerstand der verlegten oberen Atemwege zurückzuführen (11). Dies kann zu einer Deformation der Herzventrikel führen, was im Umkehrschluss Repolarisationsstörungen begünstigt (73). Wie schon beschrieben, geht das OSAS definitionsgemäß mit Hypoxien einher, die zu Abfällen der Sauerstoffsättigung um über vier Prozent führen. Diese sich abwechselnden Phasen von Hypoxien und anschließender Reoxygenierung können Ursache von gesteigertem oxidativem Stress sein (52,74,75). Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können die Aktivität von intrakardialen Ionenkanälen beeinflussen und somit Herzrhythmusstörungen begünstigen (76,77) (siehe Abbildung 3-5). Diese Hypoxien werden als Ursache einer gesteigerten Sympathikus-Aktivität diskutiert (78). Ebenso können die intrathorakalen Druckschwankungen, zusammen mit den durch die Apnoe-Phasen hervorgerufenen Aufweckreaktionen, zu einer gesteigerten Sympathikus-Aktivität führen (79,80).

Interessanterweise wurden alle drei Faktoren unabhängig voneinander als Auslöser einer verstärkten Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) beschrieben (12–15). Diese Kinase ist ein wichtiges Enzym für die Regulation der kardialen elektromechanischen Kopplung (81).

Die genannten drei Auswirkungen von dem OSAS können zudem durch Endothelschädigung, sympathische Aktivierung, Störungen des Lipidhaushalts und oxidativen Stress zu Hypertonie führen (82). Die chronisch-intermittierende Hypoxämie kann des Weiteren zusammen mit anderen Faktoren wie oxidativem Stress, Unterbrechungen des Schlafes und Schlafdeprivation (83–85) zu lokalen sowie systemischen Inflammationen führen (86,87). Bisherige Studien lassen darauf schließen, dass diese Entzündungen möglicherweise zu fibrotischer Umstrukturierung der Lunge führen können, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht hinreichend geklärt ist. Interstitielle Lungenerkrankungen, insbesondere die Lungenfibrose, gehen mit einer erhöhten Prävalenz von OSAS einher, und vice versa (88). Zudem konnte ein enger Zusammenhang zwischen OSAS und Diabetes mellitus, beziehungsweise dem metabolischen Syndrom hergestellt werden. So konnten Neumann et al herausfinden, dass ein höherer AHI proportional mit einem metabolischen Syndrom einher geht (89).

3.4 Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII)

Wie die CaMKII aufgebaut ist, ihre Aktivierungswege sowie ihre (patho-)physiologische Funktion, soll im Folgenden beschrieben werden.

3.4.1 Aufbau

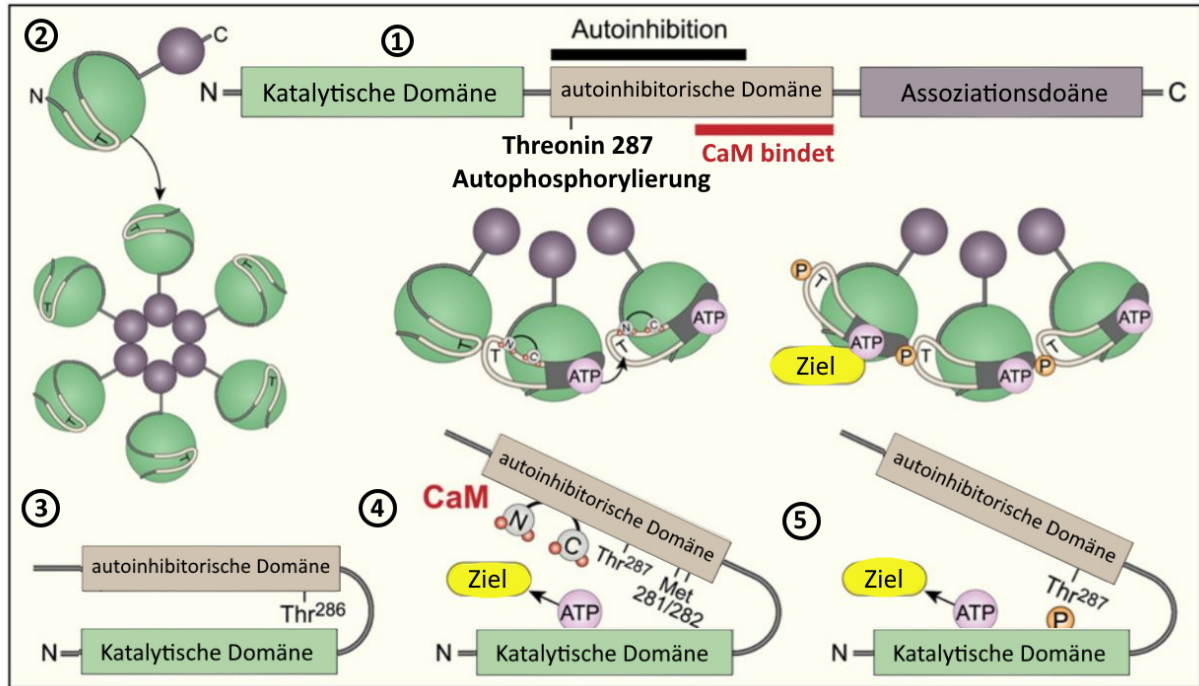


Abbildung 3-6: Aufbau der CaMKII, modifiziert nach Anderson (19)

Die CaMKII besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer mittigen autoinhibitorischen Domäne und einer C-terminalen Assoziationsdomäne, unter ① und ② schematisch dargestellt. Sie besteht aus 6-12 Monomeren, die an der Assoziationsdomäne miteinander verbunden sind ②. Im Ruhezustand ist die katalytische durch die autoinhibitorische Domäne gehemmt ③. Durch CaM wird die katalytische Domäne zugänglich und die Kinase ist aktiviert ④. Durch z.B. Autophosphorylierung kann die CaMKII auch CaM-unabhängig aktiv bleiben ⑤. Ziel = Zielstruktur, welche durch die CaMKII phosphoryliert wird.

Die CaMK ist eine Serin-Threonin-Kinase und kommt ubiquitär in Körperzellen vor, der Typ II (CaMKII) ist die in den Kardiozyten vorherrschende Unterform (90). Das Enzym selbst besteht aus 6-12 Monomeren. Diese haben jeweils eine N-terminale katalytische Domäne, mittig eine autoregulatorische Domäne und am C-Terminus eine Assoziationsdomäne (siehe Abbildung 3-6). Die katalytische Domäne besitzt ATP- und Substratbindungsstellen und die autoregulatorische Domäne eine Bindungsstelle für Calmodulin. An der Assoziationsdomäne sind die Monomere zu dem Holoenzym verbunden (91–93). Von der CaMKII gibt es vier Isoformen, α , β , γ und δ . Die beiden

erstgenannten lassen sich im neuronalen Gewebe finden, γ und δ kommen auch im Herzen vor, wobei CaMKII δ die häufigste kardiale Unterform darstellt (94). Von diesen Isoformen können durch alternatives Splicing weitere Unterformen entstehen, was die Lokalisation des Enzyms innerhalb der Zelle beeinflusst. Die CaMKII δ b befindet sich durch ihre Nucleus-Lokalisations-Sequenz im Zellkern, während die CaMKII δ c sich durch Fehlen dieser Sequenz im Zytosol finden lässt (95). Experimente an transgenen Mäusen mit Überexpression dieser Varianten stellten fest, dass CaMKII δ b zu einer kardialen Hypertrophie und CaMKII δ c zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen kann (96,97).

3.4.2 Regulationsmechanismen

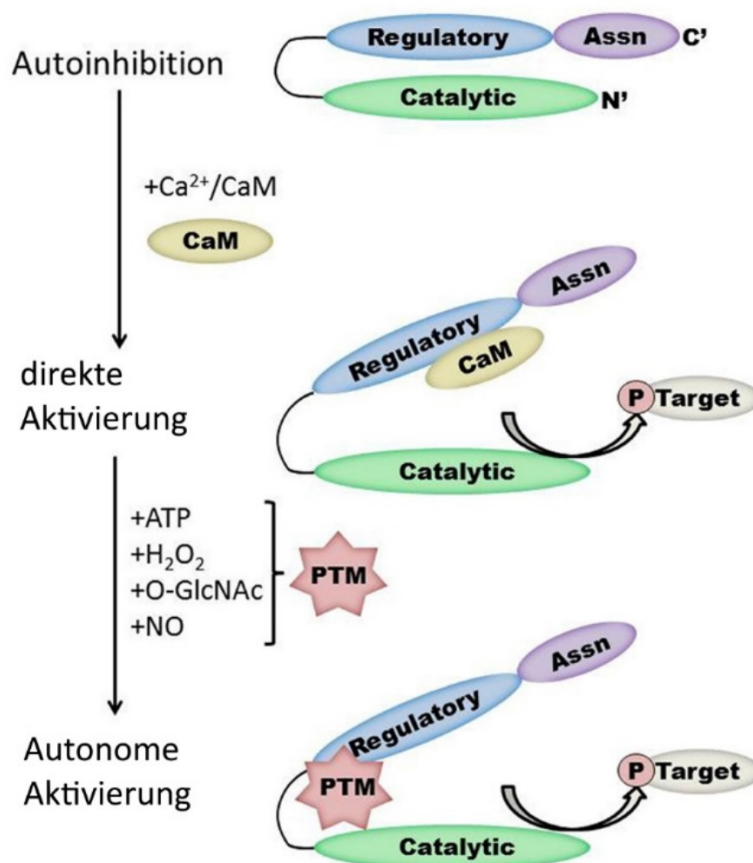


Abbildung 3-7: Aktivierungswege der CaMKII, modifiziert nach Erickson (98)

Im Ruhezustand ist die katalytische Domäne der CaMKII (hier „Catalytic“) durch die autoinhibitorische Domäne („Regulatory“) gehemmt. Die direkte Aktivierung erfolgt durch den Ca^{2+} /CaM-Komplex. Zusätzliche posttranslationale Modifikationen (PTM) führen zu einer autonomen Aktivierung der CaMKII.

Regulatory = autoinhibitorische Domäne; Assn = Assoziationsdomäne; Catalytic = katalytische Domäne; PTM = posttranslationale Modifikationen; Target = Zielprotein

In ihrem Ruhezustand ist die CaMKII durch ihre autoregulatorische Domäne selbstinhibiert (siehe Abbildung 3-7). Diese Domäne blockiert als Pseudosubstrat die N-terminale katalytische Domäne und inaktiviert somit sich selbst (98). Die CaMKII wird durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert. Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex besteht aus Calmodulin (CaM), an dem jeweils vier Ca^{2+} -Ionen gebunden sind (91,99). Wenn dieser Komplex an die regulatorische Domäne der CaMKII bindet, ändert diese ihre Konformation, sodass die katalytische, N-terminale Domäne zugänglich wird. Die Bindung von Ca^{2+} /CaM an ein Monomer erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit der weiteren Monomere des Holoenzym für Ca^{2+} /CaM (100). Somit ist die CaMKII aktiviert und kann Zielproteine oder die eigenen Monomere phosphorylieren. Durch diese Autophosphorylierung an Threonin 287 wird sowohl die Affinität zu Ca^{2+} /CaM um den Faktor 1000 erhöht, als auch die Bindung daran verstärkt und verlängert. Um diese Autophosphorylierung durchzuführen, ist die CaMKII abhängig von Ca^{2+} /CaM und ATP, allerdings befähigt dies die CaMKII dazu, auch Ca^{2+} /CaM-unabhängig aktiviert zu bleiben (101–103). Eine Dephosphorylierung des Threonin 287 kann durch die Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C erfolgen (104). Die durch die Autophosphorylierung gewonnene Autonomie der Kinase ermöglicht eine dauerhafte Aktivierung, was zu den im nächsten Kapitel aufgeführten Pathologien führen kann.

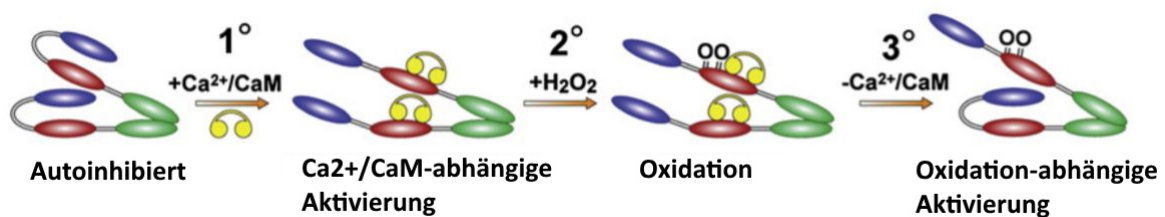


Abbildung 3-8: Aktivierung der CaMKII durch Oxidation, modifiziert nach Erickson (13)

Die CaMKII liegt in einem durch Autoinhibition inaktiven Zustand vor. Initial wird sie durch Ca^{2+} /CaM aktiviert (1°); durch Oxidation an M281/282 (2°) wird die erneute Bindung der autoinhibitorischen Domäne an die katalytische Domäne verhindert und eine dauerhafte Aktivierung ermöglicht (3°).

Es gibt allerdings auch alternative Wege, diese Unabhängigkeit von Kalzium zu erzielen. Erickson et al fanden heraus, dass reaktive Sauerstoffspezies mittels Oxidation an Methionin 281/282 direkt die autoinhibitorische Domäne der CaMKII modifizieren. Diese ist initial von Ca^{2+} /CaM abhängig, ermöglicht jedoch eine

kalziumunabhängige dauerhafte Aktivierung (13). Dies wird modellhaft in Abbildung 3-8 veranschaulicht.

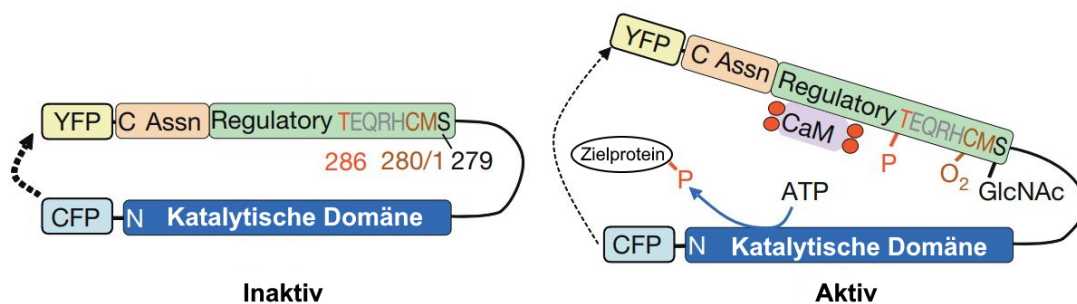


Abbildung 3-9: Aktivierung der CaMKII durch Hyperglykämie, modifiziert nach Erickson (105)

Nach „Öffnung“ der CaMKII durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kann die autoregulatorische Domäne mittels Bindung von GlcNAc an Ser279 verdrängt und die CaMKII damit aktiviert werden. Die Bindungsstellen für die Autophosphorylierung und Oxygenierung sind ebenfalls markiert, die Glykolsylierung ist davon aber unabhängig. Assn = Assziationsdomäne; Regulatory = autoregulatorische Domäne; 286, 280/1, 279 = Nummern der Aminosäuren.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ist, wie in Abbildung 3-9 dargestellt, durch Hyperglykämie gegeben. Diese kann durch O-GlcNAc (O-linked N-acetylglucosamine) zu Modifikationen an Serin 279 der CaMKII führen. Dies aktiviert die Kinase ebenfalls dauerhaft Ca^{2+} -unabhängig. Es konnte so gezeigt werden, dass über diesen Mechanismus bei steigendem Glukosespiegel (240-500mg/dl) kardiale Arrhythmien zunehmen. Die Aktivierung durch Hyperglykämie erfordert, wie die bisher angesprochenen Aktivierungswege ebenso, eine initiale Aktivierung, beziehungsweise Öffnung der CaMKII durch $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (105).

Neben der Autophosphorylierung, der Oxidierung und Aktivierung durch Hyperglykämie kann die CaMKII auch durch Nitrosylierung autonom aktiviert werden. Auch dieser Weg benötigt eine initiale $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Aktivierung. Wenn diese nicht erfolgt, kann Stickstoffmonoxid (NO) interessanterweise einen gegenteiligen Effekt zeigen und eine weitere Aktivierung der Kinase verhindern. Somit kann die Nitrosylierung eine Doppelfunktion in der Regulation der CaMKII einnehmen. Die Aktivierung erfolgt über eine S-Nitrosylierung von Cystein 290, die Inhibition über Cystein 273 (106). Beta-adrenerge Stimulation kann die CaMKII δ über den Second-messenger NO aktivieren (107) und damit durch Modifikation von RyR2 zu einem Kalziumaustritt aus dem SR führen (107–109).

Neue Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Ca^{2+} /CaM-abhängige Serin Proteinkinase (CASK) auch im Kardiomyozyten einen natürlichen Inhibitor darstellt (110).

3.4.3 Rolle in der Arrhythmogenese und der Herzinsuffizienz

Während die CaMKII eine physiologische Rolle in der Adaptation des Kalziumhaushalts bei größerer Belastung der Herzmuskelzellen einnimmt (111,112), kann eine anhaltende Überaktivierung der Kinase zu einer reduzierten Herzfunktion sowie Arrhythmien führen. So wurde festgestellt, dass die CaMKII bei Herzinsuffizienz (17) und Vorhofflimmern (18,113) hochreguliert ist.

Die Funktionen der CaMKII sind vielfältig. Alle Zielproteine und -strukturen zu benennen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, sodass das Augenmerk dieses Kapitels auf den Einfluss auf den Elektrolythaushalt des Kardiomyozyten gelegt werden soll.

Es ist schon seit langem bekannt, dass die CaMKII den Kalziumhaushalt der Herzmuskelzelle moduliert. Dies geschieht insbesondere durch den Einfluss auf den RyR2 an Ser2815, was zu einer verstärkten Aktivierung des Kanals führt (36,114). Dadurch schließt RyR2 nicht vollständig, was zu höherfrequenten, kurzen Kalziumausströmen während der Diastole führen kann, sogenannte Ca^{2+} -sparks. Durch kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung können hierdurch benachbarte RyR2 aktiviert werden, wodurch wiederum die Kalziumreserven des SRs erschöpft werden und damit die Herzkontraktilität abnimmt sowie die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen gefördert wird (97,115,116). Das zytosolische Kalzium wird von dem NCX wieder aus der Zelle geschleust, was, wie bereits ausgeführt wurde, zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom führt. Wenn diese Depolarisation einen Schwellenwert erreicht, kann diese zu einem neuen, verfrühten Aktionspotential und damit zu einer späten Nachdepolarisation (DAD) führen (29). Da NCX bei Herzinsuffizienz und VHF höher exprimiert wird, kann der Effekt bei diesen Erkrankungen verstärkt sein (17,117,118).

Auch die SERCA2a wird indirekt durch die CaMKII desinhibiert, was zu einer verstärkten Kalzium-Wiederaufnahme in das SR führt. Dies erfolgt durch eine Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) an Thr17, was PLN deaktiviert. Da PLN

ein physiologischer Inhibitor der SERCA2a ist, führt dies indirekt zu einer Aktivierung der SERCA2a (119). Des Weiteren kann sich die CaMKII auch auf den Natriumhaushalt der Kardiozyten auswirken. Der schnelle Natriumstrom I_{Na} , der insbesondere durch $Nav_{1.5}$ getragen wird, führt zu einem steilen Anstieg des Aktionspotentials und wird rasch wieder beendet. Diese Spitze des I_{Na} ist für die Übertragung der Erregung von Zelle zu Zelle von Bedeutung. Wenn dieser Spitzenstrom reduziert wird, begünstigt dies Reentry-Arrhythmien (120,121). Wenn die Na-Kanäle verlangsamt schließen oder frühzeitig reaktiviert werden, kann ein langsamer Natriumstrom generiert werden, $I_{Na,late}$. Dieser $I_{Na,late}$ kann das Gleichgewicht der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentration stören und durch EADs und DADs Arrhythmien verursachen (120,122). In vivo konnte an Mausmodellen gezeigt werden, dass die CaMKII durch Modulation der Natriumkanäle zu verlängerten QT- und QRS-Zeiten führen kann. Dies hat eine erhöhte Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien zur Folge (120). Ebenso moduliert die CaMKII die intrazelluläre Kaliumkonzentration durch eine verlangsamte Inaktivierung und beschleunigte Reaktivierung von I_{to} (auswärts gerichteter Kaliumstrom). Zudem wird der einwärts gerichtete Kaliumstrom I_{K1} herunterreguliert (123). Diese Auswirkung auf I_{Ca} (124), $I_{Na,late}$ (14,120), und Kaliumkanäle (123,125) führen zu einer komplex veränderten und verlängerten Dauer des Aktionspotentials, was die Bildung von frühen Nachdepolarisationen (EAD) fördert und zu Arrhythmien führen kann (120,123).

Neben dem Einfluss auf Ionenkanäle kann die CaMKII auch die Gentranskription verändern, indem sie an HDAC4 (Class IIa histone deacetylase 4) bindet und diese phosphoryliert. Nicht phosphoryliertes HDAC4 bindet und inhibiert Genregulatoren wie MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) (126) und fördert eine Kondensation des Chromatins (127). Nach der Phosphorylierung löst sich HDAC4 und wird aus dem Nukleus exportiert, wodurch die Inhibition beendet wird. Hierdurch kann MEF2-vermittelt eine kardiale Hypertrophie und eine daraus resultierende Herzinsuffizienz entstehen (128). Diese Bindung der aktiven CaMKII an HDAC4 wurde in dieser Arbeit genutzt, um durch ein Bindungs-Assay die CaMKII-Aktivität zu bestimmen.

3.5 Klinische Fragestellung

Wie bereits dargestellt wurde, gibt es mehrere Aktivierungswege für die CaMKII, die prinzipiell auch durch ein OSAS ausgelöst werden können. Diese Wege können über eine Sympathikus-Aktivierung, oxidativen Stress, oder thorakale Druckdifferenzen führen. Nun stellt sich die Frage, ob OSAS tatsächlich zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII führen kann und ob somit die CaMKII eine pathophysiologische Verbindung von der Entstehung von VHF und Herzinsuffizienz bei Patienten mit OSAS darstellt.

Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, sollen mit dieser Doktorarbeit folgende Fragen näher untersucht werden:

- a. Ist die Expression der CaMKII bei Patienten mit OSAS im Vorhofmyokard verändert?
- b. Ist die CaMKII bei diesen Patienten im HDAC4-CaMKII-Bindungsassay verstärkt aktiviert?
- c. Gibt es weitere Korrelationen zwischen der CaMKII und klinisch relevanten Parametern?

4 Material und Methoden

4.1 CONSIDER-AF

Diese Arbeit ist Teil der prospektiven Studie „Impact of sleep-disordered breathing on atrial fibrillation and perioperative complications in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery – a prospective observational study“ (CONSIDER-AF) (129). Zwischen Mai 2016 und Juli 2018 sowie im August und Oktober 2019 wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit für diese Studie Teilnehmer gesucht. Hierfür wurden Patienten ausgewählt, die sich an der Universitätsklinik Regensburg einer elektiven koronaren Bypass-Operation (coronary artery bypass graft = CABG) unterzogen. Die Patienten mussten zwischen 18 und 85 Jahre alt sein und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme abgeben. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit einer präoperativen Verwendung von Inotropika oder einer intraaortalen Ballonpumpe, einer schweren obstruktiven Lungenerkrankung sowie Patienten mit einer Sauerstofftherapie, einer nächtlichen positive airway pressure (PAP) Therapie, oder Patienten mit einer mechanischen Beatmung. Auch ein bereits vordiagnostiziertes und behandeltes Schlafapnoe-Syndrom zählte zu den Ausschlusskriterien.

Somit konnten insgesamt 368 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Hiervon haben manche Patienten ihre Einverständniserklärung widerrufen, die Polygraphie war unzureichend, oder die Biopsien waren zu klein für die Nutzung in den Experimenten. Durch deren Ausschluss verblieben noch 113 Patienten in der Studie. Für diese Arbeit wurde an 201 der 368 Patienten die CaMKII-Aktivität und Expression gemessen, wovon bei 36 Patienten die verwendeten Biopsien eine ausreichende Qualität aufwiesen, um auch funktionelle Daten zu gewinnen.

4.1.1 Studiendesign

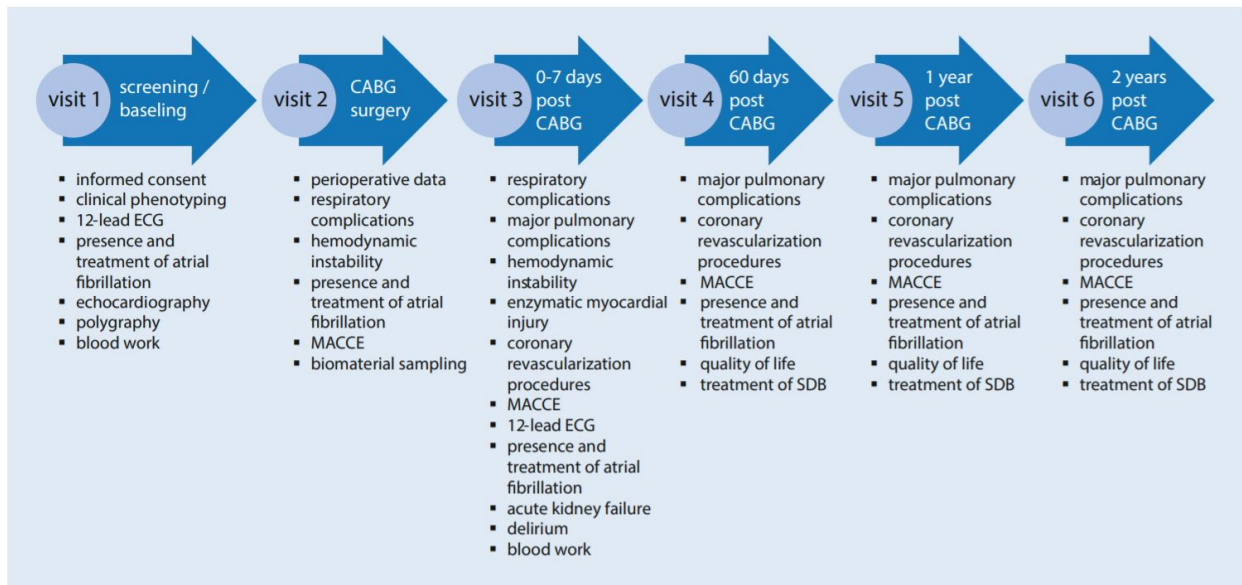


Abbildung 4-1: Studiendesign von CONSIDER-AF, nach Tafelmeier (129)

Hier wird das Studiendesign von CONSIDER-AF dargestellt. Bei den Patienten wurden zu sechs Zeitpunkten Daten erhoben. Präoperativ erfolgte eine Eingangsuntersuchung u.a. mit EKG und Polygraphie, während der Operation wurde u.a. die in dieser Arbeit verwendeten Biopsien entnommen. In vier postoperativen Terminen wurde der weitere Verlauf und Komplikationen ermittelt.

Abkürzungen: CABG = koronare Bypass-Operation; MACCE = schwere kardiale und zerebrovaskuläre Ereignisse; SDB = schlafbezogene Atemstörung; ECG = Elektrokardiogramm

Es wurden an mehreren Punkten der Behandlung Daten von den teilnehmenden Patienten gewonnen (siehe Abbildung 4-1). Während der ersten Untersuchung (visit 1) wurden klinische Daten mittels eines Interviews und anhand der Krankenakte herausgefunden, die einen Einfluss auf das perioperative Risiko haben könnten. Hierzu zählten zum Beispiel demographische Angaben, Medikation, Untersuchungsergebnisse und Komorbiditäten. Zudem wurden eine Herzsonographie sowie ein Screening auf SBAS in der Nacht vor der Operation durchgeführt. In der zweiten Stufe (visit 2) wurden die perioperativen Daten der CABG zusammengetragen und ausgewertet. Zudem wurde das während der Operationen beim Einbau der Herz-Lungen-Maschine anfallende atriale Herzmuskelgewebe asserviert und untersucht. In der dritten Stufe (visit 3) wurden die postoperativen Komplikationen der ersten sieben Tage nach der CABG analysiert, wie zum Beispiel respiratorische und pulmonale Komplikationen sowie schwere kardiovaskuläre Ereignisse. Die Langzeit-Folgen unter

anderem der CPAP-Therapie, der Therapie kardialer Arrhythmien und Herzinfarkte wurden nach 60 Tagen (visit 4), einem Jahr (visit 5) und zwei Jahren (visit 6) ermittelt.

4.1.2 Zulassung

Dieser Studie wurde von dem Ethikkomitee der Universität Regensburg zugestimmt und sie wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki (2013) durchgeführt. Alle Patienten unterschrieben eine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme vor der Gewebeentnahme.

4.1.3 Ziele von CONSIDER-AF

Das primäre Ziel der Studie ist es, den Einfluss von SBAS auf das Auftreten von schwerwiegenden kardialen und zerebrovaskulären Ereignissen, Vorhofflimmern, oder perioperative Komplikationen bei Patienten, die eine CABG durchführen lassen, herauszufinden. Zudem wurde im Zuge der Studie auch an Biopsien aus dem humanen Atrium geforscht, hierzu gehört auch diese Arbeit. Ziele dieses Bereichs sind:

1. Schlüsselereignisse herauszufinden, die sich prädisponierend auf VHF auswirken können
2. Potenzielle Biomarker im Serum oder in Blutzellen (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zu finden, die auf ein Risiko an VHF zu erkranken hinweisen können
3. Neue Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit SBAS zu finden

4.1.4 Probengewinnung und -lagerung von humanem Atrium

Bei Bypass-Operationen wird in der Regel eine Kardioplegie herbeigeführt. Um den Kreislauf dennoch aufrechtzuerhalten, werden Herz-Lungen-Maschinen verwendet. Hierfür wird der rechte Vorhof kanüliert. Nach dem Ausbau der Herz-Lungen-Maschine wird der rechte Vorhof wieder vernäht, hierbei bleibt zumeist ein Stück Herzmuskelgewebe des rechten Herzhohls zurück. Dieses wurde gereinigt und in einer eiskalten Custodiol®-Lösung (Essential Pharmaceuticals, LLC, Durham, NC, USA) zu dem Labor transportiert. Diese Lösung enthielt 2 mmol/L Butanedione Monoxime, um die Kardioplegie für das Gewebe aufrechtzuerhalten. Die Gewebeproben wurden sodann gleich für die Experimente wie zum Beispiel Patch-Clamp Versuche verwendet, oder in kleinen Stücken bei -80°C eingefroren. Ebenso wurden direkt vor der Operation Blutproben entnommen, um mononukleäre Zellen zu isolieren, welche

ebenfalls bei -80°C weggefroren wurden. Das Blutplasma wurde in einer Biobank aufgehoben.

4.1.5 Diagnostik des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms

In der Nacht vor der Operation erhielten die Patienten eine Polygraphie (verwendete Geräte: Alice NightOne device; Philips Respironics, Murrysville, USA). Mittels Nasenbrille mit Drucksensor wurde der Atemfluss gemessen, die Blutsauerstoff-Konzentration wurde mit einem Pulsoxymeter bestimmt. Apnoe und Hypopnoe wurden wie in der Einleitung beschrieben definiert. Von einer Schlafapnoe wurde ab einem AHI von ≥ 15 pro Stunde ausgegangen. Der Oxygen desaturation index (ODI) beschreibt die durchschnittliche Anzahl an Blutsauerstoff-Entsättigungen pro Stunde Schlaf (129,130).

4.2 Die Bedeutung der obstruktiven Schlafapnoe für die atriale CaMKII-Aktivität

4.2.1 CaMKII-Aktivitätsassay

Bei dem CaMKII-Aktivitätsassay handelt es sich um ein HDAC4-CaMKII-Bindungsassay. Das hierbei zugrunde liegende Prinzip ist eine Bindung der aktivierten CaMKII an eine CaMKII-Bindungsstelle von HDAC4. Das HDAC4 ist Teil eines bead-gebundenen Glutathion-S-Transferase-HDAC4-Fusionproteins (GST-HDAC4). Auch inaktive CaMKII kann an GST-HDAC4 binden, allerdings mit einer deutlich geringeren Bindungsenergie. Aus diesem Grund kann die inaktive CaMKII durch Auswaschen verdrängt werden, während die aktive CaMKII weiterhin gebunden bleibt. Die verbleibende Menge an CaMKII-HDAC4-Komplex kann auf die gesamte Menge an HDAC4 des Assays normiert werden, woraus sich die CaMKII-Aktivität errechnen lässt. In einem separaten Western-Blot wird die CaMKII-Expression ermittelt, was ermöglicht, die spezifische Aktivität (also die aktive CaMKII in Bezug auf die gesamte CaMKII) zu errechnen. Das Bindungs-Assay wurde von Backs et al. erstellt (128), nach Tao He modifiziert und von mir weiter angepasst. Es gliedert sich in eine Probenvorbereitung und drei aufeinanderfolgende Versuchstage.

4.2.1.1 *Probenvorbereitung: Erstellung der Gewebelysate*

Zu Beginn wurden die Zellen der tiefgefrorenen Proben mit 200 μl Lysepuffer (Tabelle 4-1) in 2,5 ml Eppendorf-Cups gegeben und mithilfe einer Bohrmaschine mit einem

konischen Bohrkopf aufgebrochen. Hierbei wurden die Proben stets mittels flüssigen Stickstoffs gekühlt gehalten. Anschließend wurden die Proben für dreißig Minuten auf Eis inkubiert, um die Zellen weiter zu lysieren und die intrazellulären Proteine damit zugänglich zu machen. Dies wurde durch regelmäßiges Vortexen alle fünf Minuten mechanisch unterstützt. Es wurde eine Standardkurve mit Proteinstandard vorbereitet und anschließend auf einer 96er-Well-Platte zusammen mit reinem Lysepuffer sowie den Proben (1:10 verdünnt) jeweils in Triplets aufgetragen. Um die Proteine nachweisen und quantifizieren zu können, wurde die Biuret-Methode verwendet. Demzufolge wurde den Wells eine BCA-Lösung (siehe Tabelle 4-2) zugegeben und bei 37°C eine halbe Stunde lang inkubiert. Hierbei geht das zweiwertige Kupfer der BCA-Lösung einen dunkelvioletten Komplex mit vier Peptidbindungen ein (131). Die Absorption dieses farbigen Komplexes wurde bei 540 nm gemessen. Hierfür wurde ein Tecan Magellan infinite M200 Pro Photometer mit Tecan i-control Version 1.10 verwendet. In Excel wurden sodann die Konzentrationen anhand der durch die Proteinstandardverdünnung erstellten Eichkurve berechnet (siehe Abbildung 4-2), woraufhin die Proben mit dem Lysepuffer auf eine Gesamtprotein-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt werden konnten (siehe Abbildung 4-3). Hierfür wurden die Lysate mit PBS (Dublecco's phosphate buffered saline) verdünnt. Diese genormte Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Western-Blots und des Assays. Über Nacht wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

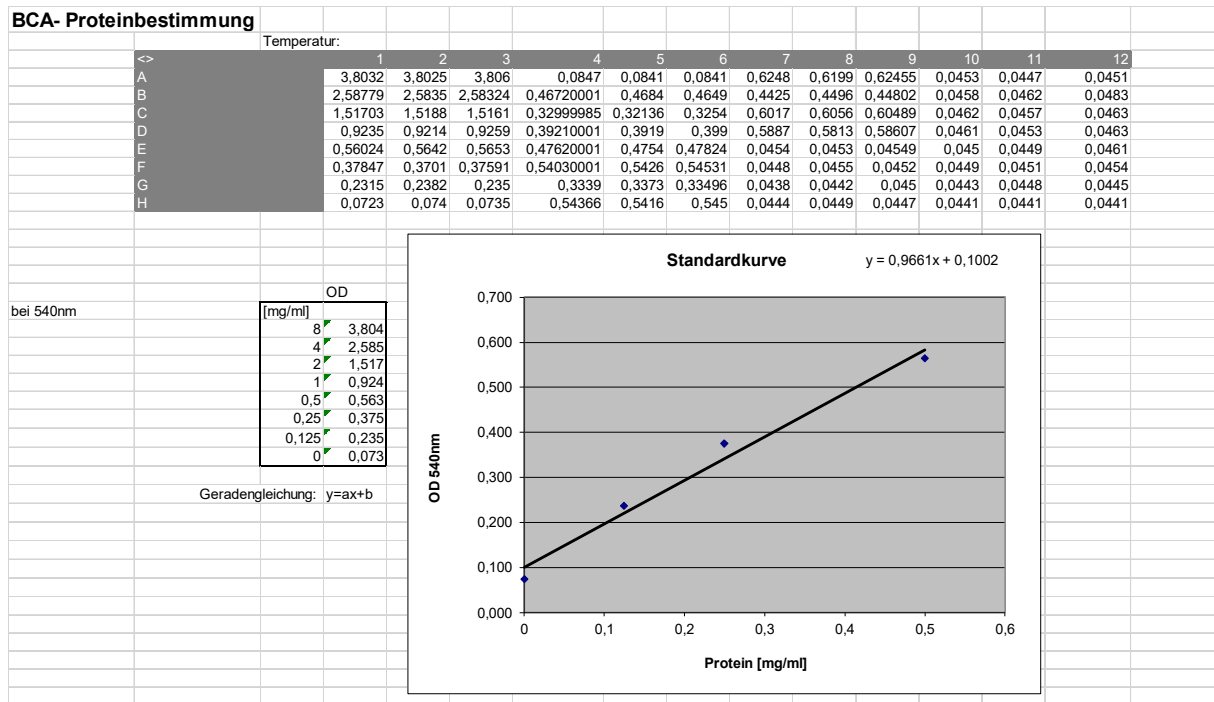


Abbildung 4-2: Erstellte Eichkurve anhand der BCA-Proteinbestimmung

End sample volume (in µl)	End sample conc. (in µg/µl)	Conc. of samples, µg/µl	Data calculated by program			
			Sample, µl	PBS, µl	5x Blue Buffer, µl	
130	0,70	0,73	124,7	5,3	0	
130	1,00	3,82	34,0	96,0	0	
130	1,00	1,67	77,9	52,1	0	
130	1,00	2,09	62,2	67,8	0	
130	1,00	2,49	52,3	77,7	0	
130	0,90	0,97	120,4	9,6	0	
130	1,00	2,18	59,6	70,4	0	
130	1,00	2,57	50,5	79,5	0	
130	1,00	1,11	117,0	13,0	0	
130	1,00	2,96	43,9	86,1	0	
130	1,00	2,48	52,5	77,5	0	
130	1,00	1,14	113,9	16,1	0	
130	1,00	2,48	52,4	77,6	0	
130	0,70	0,74	123,2	6,8	0	
130	1,00	3,43	37,9	92,1	0	
130	1,00	3,83	33,9	96,1	0	
130	1,00	2,51	51,8	78,2	0	
130	1,00	1,95	66,8	63,2	0	
130	1,00	2,69	48,4	81,6	0	
130	1,00	2,27	57,3	72,7	0	
130	1,00	2,48	52,5	77,5	0	

Abbildung 4-3: Anhand der aus Abbildung 4-2 erstellten Daten berechnete Verdünnung, um die Proteinkonzentrationen der Proben zu vereinheitlichen

	Hersteller/ Referenznummer	Konzentration (mmol/L)
Tris-HCl Puffer, pH 7,4, 2M		20
Natriumchlorid (NaCl), 4M		200
Natriumfluorid (NaF), 200mM		20
NP40 (NONIDET P-40)	Sigma Aldrich N-6507	8,9
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) >99% (GC)	Sigma Aldrich P7626- 25G	18,3
Proteaseinhibitor complete Tablets EDTA-free EASYpack	Roche 04 693 132 001	375 µl
Phosphataseinhibitor PhosSTOP EASYpack	Roche 04 906 837 001	375 µl
ddH₂O		

Tabelle 4-1: Lysepuffer

	Referenznummer	Volumen (in µl/Well)
Reagenz A, Bicinchoninic Acid solution (BCA)	B9643-1L Interchim UP95424 A	196
Reagenz B, Copper-II- sulfate solution	C2284-25ML Interchim UP95425 A	4

Tabelle 4-2: BCA-Lösung

4.2.1.2 Erster Versuchstag

Zur CaMKII-Aktivitätsbestimmung wurden zu einem Teil der Proben HDAC4-Beads (Glutathione Sepharose High Performance GE Healthcare 17-5279-01 (Label No 71502758-EG)) und GST-Puffer 750 mM (siehe Tabelle 4-3) in folgendem Verhältnis zugegeben: 50 µl Probe, 2 µl HDAC4-Beads und 300 µl GST-Puffer 750 mM. Diese Beads binden mit GST an die CaMKII. Die aktive CaMKII weist hierbei eine deutlich

höhere Bindungskraft auf als die inaktive, sodass in den folgenden Waschsritten die inaktive CaMKII verdrängt werden kann und somit nur noch die aktive CaMKII gebunden bleibt. Intrazellulär beeinflusst die CaMKII durch diese Bindung physiologischerweise epigenetisch die Transkription. Die HDAC4 deacetyliert Histone, was eine Kondensation des Chromatins begünstigt und damit die Transkription inhibiert (127,132). Durch die spezifische Bindung von CaMKII an die regulatorischen Phosphorylierungsstellen der HDAC4 wird die zytosolische Akkumulation von HDAC4 gefördert (128) und damit eine Derepression der Zielgene bewirkt (133,134).

Zur Inkubation rotierten die Proben zwei Stunden lang in 4°C bei 5 Umdrehungen pro Minute. Anschließend wurden sie in drei Waschsritten mit GST-Puffer 150 mM aufgereinigt. Hierfür wurden die Proben bei 1500 rpm bei 4°C eine Minute lang zentrifugiert, der Überstand verworfen, 400 µl GST-Puffer 150 mM zugegeben und bei 4°C zur beschleunigten Durchmischung mit 750 rpm geschüttelt. Nach dem dritten Waschdurchgang wurden pro Probe 5 µl Leer-HDAC4-Beads (Glutathione Sepharose High Performance) zugegeben, 5 Minuten lang durchmischt (750 rpm, 4°C) und wie in den ersten Waschsritten mit GST-Puffer 750 mM dreimal gewaschen. Die Zugabe der Leer-Beads hilft die eigentliche GST-HDAC4 visuell besser erkennen zu können. Nach dem letzten Durchgang wurden die Proben mit 50 µl Blue Buffer (siehe Tabelle 4-4) bei 95°C für zwei Minuten mit 500 rpm denaturiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Cups gegeben und 2,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich M-7522 (EC No 200-464-6)) pro Probe zugegeben und erneut bei 95°C für 5 Minuten bei 500 rpm gekocht.

	Referenznummer	GST-Puffer 150 mM NaCl	GST-Puffer 750 mM NaCl
Tris, 1M, pH7,4	Sigma T1503-1kg Trizma base	2,423 g	2,423 g
NaCl	Sigma S7653-1kg Sodium Chloride	8,766 g	43,83 g
ddH₂O		Auf 1 l auffüllen	Auf 1 l auffüllen
pH 7,4 einstellen			

Tabelle 4-3: GST-Puffer

Reagenz	Volumen
Bromphenol blue	250 mg
Glycerol (87%ig)	50 ml
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10 g
TRIS-HCl 1M, pH 6,8	30 ml

Tabelle 4-4: 5x Blue Buffer (Laemmli-puffer)

4.2.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Gelelektrophorese wurden wie in Tabelle 4-5 beschrieben die Polyacrylamid-Gele hergestellt. Für die CaMKII-Aktivitätsbestimmung wurden 12,5%-SDS-Polyacrylamid-Gele gewählt. Es wurden Gele in höherer Konzentration als bei der Bestimmung der CaMKII-Expression (s.u.) gewählt, um breitere Banden zu erzeugen. Dies ermöglichte eine genauere Auswertung bei geringen Unterschieden der Proteinkonzentrationen.

Es wurden je nach untersuchtem Protein zwischen 10 µl und 30 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Zur Markierung wurde jeweils in die erste und letzte Tasche 2,5 µl Proteinmarker (Standard V peqGold Protein Marker V; Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen) injiziert. Die Gele wurden sodann an einen Bio-Rad Power-Supply angeschlossen und bei konstanten 90 Volt, 102 mA und 50 W getrennt. Sobald der Marker separierte, wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht. Die Gelelektrophorese wurde nach 2 bis 2,5 Stunden beendet, als der Marker das Ende des Gels erreicht hatte.

Reagenz	Referenznummer	12,5%-Gel (in µl)	Sammelgel (in µl)
Polyacrylamid	Roth Polipherese Gel 30 (37, 5:1) 3029.1	8000	1660
ddH₂O		7200	6720
Tris/SDS-Lösung pH 8,8	Siehe Tabelle 4-6, 1:4 mit ddH ₂ O verdünnt	5000	2500
Ammonium- persulfat (APS) 10%	Sigma-Aldrich, 228,2g/mol, Prod: A-3678 (1:10 mit ddH ₂ O verdünnt)	200	100
Tetramethylethyl endiamin (TEMED)	Roth 2367.3	20	10

Tabelle 4-5: SDS-Polyacrylamidgel 12,5%

Tris Base	45,5 g
SDS	1,0 g
ddH₂O	Auf 250 ml auffüllen
HCl 37%	Einstellung pH 8,8

Tabelle 4-6: 4x Tris/SDS pH 8,8

4.2.1.4 Western-Blot:

Nach der gelaufenen Gelelektrophorese wurden die Banden von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham GE Healthcare Life Sciences 10600002) transferiert. Hierfür wurde das Gel mit Schwämmen, Filterpapier und Nitrozellulosemembran in ein Transfersystem eingebaut. Der Transfer erfolgte mit einem Transferpuffer (siehe Tabelle 4-7) bei 4°C über Nacht bei konstanten 100 Volt und 150 mA.

Reagenz	Verhältnis
10x Pierce Western Blot Transfer Buffer	1
ddH ₂ O	10

Tabelle 4-7: Transferpuffer

4.2.1.5 Zweiter Versuchstag: Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Immunmarkierung

Die Membranen wurden zurechtgeschnitten. Danach wurden die Membranen mit Ponceau-Rot kurz eingewirkt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Hierdurch wurden die Proteinbanden gefärbt, was den erfolgreichen Transfer der Banden auf die Membran bestätigte. Dies ermöglichte auch eine genauere Trennung der Membranen entlang der Lokalisation der jeweils gesuchten Proteine, sodass diese mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden konnten. Sie wurden sodann mit TBS-T (siehe Tabelle 4-8) für 5 Minuten gewaschen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 5%iger Milch (2,5 g Milchpulver (Milchpulver Blotting grade, fettarm, Roth T145.2) in 50 ml TBS-T) mit 10 rpm inkubiert. Dies diente dazu, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Anschließend wurden die Primärantikörper (siehe Tabelle 4-9) in 2,5%iger Milch (1,25 g Milchpulver in 50 ml TBS-T) verdünnt, den jeweiligen Proteinen zugegeben und über Nacht bei 4°C mithilfe eines Schüttlers inkubiert.

Reagenz	Volumen in ml
Tris-buffered saline (TBS)	100
Tween 20	1
ddH ₂ O	900

Tabelle 4-8: TBS-T

Zielprotein	Primärantikörper	Verdünnungsfaktor
CaMKII-HDAC4	Maus Anti-CaMKII, BD Biosciences, Katalognummer 611293	1:1000 in 2,5%iger Milch
HDAC4 total	Kaninchen polyklonales IgG, Santa Cruz Biotechnology HDAC4 (H-92) sc-11418	1:5000 in 2,5%iger Milch

Tabelle 4-9: Primärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Aktivität

4.2.1.6 Dritter Versuchstag: Immunmarkierung

Die Membranen wurden dreimal für 5 Minuten auf einem Schwenkschüttler mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die jeweiligen Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4-10) zugegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur und geringer Agitation inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Zielprotein	Sekundärantikörper	Verdünnung
CaMKII-HDAC4	Anti-Maus-IgG, Abcam, ab98799	1:3000 in 2,5%iger Milch
HDAC4 total	Anti-Kaninchen-IgG, GE Healthcare Amersham NA934-1ml; Anti-Kaninchen-IgG, Abcam, ab97085	1:20000 in 2,5%iger Milch

Tabelle 4-10: Sekundärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Aktivität

4.2.1.7 Detektion

Nach dem letzten Waschdurchgang wurden die Membranen vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet und mit einer Chemolumineszenzlösung (MILLIPORE Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate WBKLS0500; Lösungen A und B im Mischverhältnis 1:1) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen wieder vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet, um die Lösung komplett zu entfernen. Die Membranstücke wurden anschließend in Klarsichtfolie gelegt und in eine Entwicklerkassette geklebt.

Die Banden wurden sodann auf Röntgenfilm (Super XR-N Fuji Medical X-ray film 47410 19284) mithilfe eines Kodak M35 X-OMAT (Serien-No: 37739) in einer Dunkelkammer entwickelt. Die Belichtungszeit erfolgte für wenige Sekunden, bis die Proteinbanden durch eine Schwärzung sichtbar wurden (siehe Abbildung 4-4).

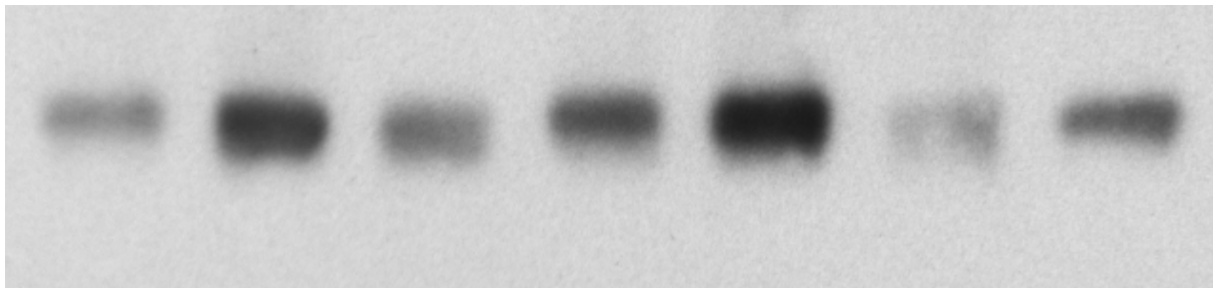


Abbildung 4-4: Beispielhafte Originalabbildung der Banden von an HDAC4-gebundener CaMKII

Zu erkennen sind die Banden der aktiven (an HDAC4 gebundenen) CaMKII der verschiedenen Proben. Eine tiefere Schwärzung deutet auf ein erhöhtes Vorkommen der aktiven Kinase hin.

4.2.1.8 Datengenerierung

Diese Röntgenfilme wurden mithilfe eines BIO-RAD Chemi Doc MP Image Systems eingescannt und durch das Programm ImageLab 5.2 als TIFF-Bilddatei abgespeichert (siehe Abbildung 4-4). Die Dichte der Banden konnte mit dem Programm ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) berechnet werden, wodurch auf die vorhandene Menge des zu untersuchenden Proteins in der eigentlichen Probe geschlossen werden konnte. Um dies zu erleichtern, wurde das ImageJ-Plug-In „Multi Measure“ verwendet. Die gemessenen Dichten der Banden wurden in Excel exportiert. Es wurden die Hintergrundsignale von den Signalen der Banden abgezogen. Anschließend wurde die CaMKII-Expression auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-

phosphat-Dehydrogenase) normalisiert (siehe Abbildung 4-5). Die CaMKII-Aktivität wurde auf die HDAC4-GST Bande der jeweiligen Probe normalisiert.

Technisch bedingt waren die Proteinbanden der verschiedenen Western Blots, bzw. Aktivitäts-Assays nur schlecht miteinander vergleichbar, da es stets zu geringen Konzentrationsunterschieden und unterschiedlichen Belichtungszeiten kommen konnte. Aus diesem Grund liefen bei jedem Versuchsablauf zwei Kontrollproben mit, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Es wurde angenommen, dass innerhalb dieser Proben die Proteinkonzentrationen stets konstant waren. Somit wurden innerhalb einer Versuchsgruppe die Proben auf diese Kontrollproben normalisiert.

	CaMKII Expression					CaMKII Expr Hintergrund			Mean-HG	CaMKII/GAPDH
CaMKII_Expression	0,024	14629,978	8787	21103	0,024	10762,031	7423	13751	3.868	0,437571702
Heidelberg Antikörper	0,024	15338,66	9571	21587	0,024	10812,815	7899	13815	4.526	0,405723515
	0,024	16667,199	9795	24783	0,024	11261,049	8899	13955	5.406	0,558331818
	0,024	18351,537	10627	25567	0,024	11856,608	9055	15831	6.495	0,671951467
	0,024	16919,801	10615	22723	0,024	11923,591	9627	16219	4.996	0,440433867
	0,024	19963,745	11555	29347	0,024	12516,981	9907	21263	7.447	0,638637699
	0,024	18665,959	11543	26551	0,024	12537,887	10019	19743	6.128	0,436856979
	0,024	17858,988	10307	25599	0,024	12522,797	9323	15847	5.336	0,465318448
	0,024	17471,656	10207	25667	0,024	12262,933	9279	15679	5.209	0,539925683
	0,024	15923,058	9195	23083	0,024	11502,126	8235	15727	4.421	0,436076478
	0,024	18123,055	10067	25987	0,024	11738,814	8195	15483	6.384	0,620720168
	0,024	16662,164	10447	23659	0,024	11483,82	7775	14931	5.178	0,413243404
	GAPDH CaMKII Expression					GAPDH CaMKII Expression Hintergru			Mean-HG	
GAPDH CaMKII Expression	0,016	18370,515	8647	28283	0,016	9530,942	6639	12627	8.840	
Heidelberg Antikörper	0,016	20813,846	9139	29775	0,016	9658,848	6099	13459	11.155	
	0,016	19685,201	8723	30375	0,016	10002,518	7419	12967	9.683	
	0,016	20041,691	9603	30275	0,016	10375,92	7679	13591	9.666	
	0,016	22054,539	10551	32327	0,016	10710,702	7891	13843	11.344	
	0,016	22546,755	11339	33203	0,016	10886,366	8075	16235	11.660	
	0,016	25109,563	11055	35351	0,016	11081,924	8367	14675	14.028	
	0,016	22535,453	10943	34215	0,016	11067,627	8331	15651	11.468	
	0,016	20744,309	10879	32043	0,016	11097,198	8151	15687	9.647	
	0,016	21321,566	10667	33815	0,016	11183,592	8263	15179	10.138	
	0,016	21324,026	10791	34655	0,016	11038,81	8711	14699	10.285	
	0,016	23607,789	11255	34651	0,016	11076,811	8343	13567	12.531	

Abbildung 4-5: Exemplarisch dargestellte durch ImageJ generierte Werte der Signaldichte der CaMKII-Expression, der dazugehörigen GAPDH sowie den jeweiligen Hintergründen

Es wurden jeweils die Hintergrundsignale der Banden von den jeweiligen Banden der CaMKII-Expression und GAPDH abgezogen, anschließend wurde die CaMKII-Expression auf das GAPDH normalisiert (CaMKII/GAPDH).

4.2.2 Bestimmung der CaMKII-Expression

Für die Bestimmung der CaMKII-Expression wurden Western-Blots durchgeführt. Diese erfolgte zum Großteil gleich und parallel zu der Bestimmung der CaMKII-Aktivität, weshalb im Folgenden lediglich die Unterschiede hervorgehoben werden.

4.2.2.1 *Probenvorbereitung*

Nach der identischen Probenvorbereitung wurde im Gegensatz zu dem Pulldown-Assay kein HDAC4 hinzugegeben, da im Western-Blot die gesamte CaMKII nachgewiesen werden soll und nicht nur die aktive. Die Proben wurden wie im Assay beschrieben gewaschen, anschließend wurde von den Proben 40 µl entnommen, mit 10 µl Blue Buffer und β-Mercaptoethanol (im Verhältnis 10:1) versetzt und wie auch im Pulldown-Assay bei 95°C für 5 Minuten bei 500 rpm gekocht.

4.2.2.2 *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot*

Die Gelelektrophorese erfolgte zusammen mit dem Aktivitäts-Assay. Für die Expressionsbestimmung wurden wie in Tabelle 4-11 beschrieben 8%-SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Auch hier wurde zur Orientierung der Proteinmarker eingesetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte zusammen mit den Proben der CaMKII-Aktivitätsbestimmung bei konstanten 90 Volt, 102 mA und 50 W.

	Referenznummer	8%-Gel (in µl)	Sammelgel (in µl)
Polyacrylamid	Roth Polipherese Gel 30 (37, 5:1) 3029.1	5800	1660
ddH₂O		9000	6720
Tris/SDS- Lösung pH 8,8	Siehe Tabelle 4-6, 1:4 mit ddH ₂ O verdünnt	5000	2500
Ammoniumsulfat (APS) 10%	Sigma-Aldrich, 228,2 g/mol, Prod: A-3678 (1:10 mit ddH ₂ O verdünnt)	200	100
Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Roth 2367.3	20	10

Tabelle 4-11: SDS-Polyacrylamidgel 8%

Der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte wie in dem CaMKII-Aktivitäts-Assay beschrieben.

4.2.2.3 Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Immunmarkierung

Auch hier erfolgte das Vorgehen wie in dem Aktivitäts-Assay beschrieben. Die für die CaMKII-Expression verwendeten Primärantikörper wurden in 5%iger Milch verdünnt und sind der Tabelle 4-12 zu entnehmen.

Zielprotein	Primärantikörper	Verdünnungsfaktor
CaMKII-Expression	Maus Anti-CaMKII, BD Biosciences, Katalognummer 611293	1:1000 in 5%iger Milch
GAPDH CaMKII-Expression	Maus Anti-GAPDH, Abcam, Katalognummer G8795	1:20000 in 5%iger Milch

Tabelle 4-12: Primärantikörper für die CaMKII-Expression

4.2.2.4 Immunmarkierung

Die Sekundärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Expression wurden ebenfalls in 5%iger Milch verdünnt und wurden wie in Tabelle 4-13 beschrieben vorbereitet.

Zielprotein	Sekundärantikörper	Verdünnung
CaMKII-Expression	Anti-Maus IgG, GE Healthcare, Katalognummer NA931VS	1:3000 in 5%iger Milch
GAPDH CaMKII-Expression	Anti-Maus IgG, GE Healthcare, Katalognummer NA931VS	1:20000 in 5%iger Milch

Tabelle 4-13: Sekundärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Expression

4.2.3 Statistik und Datenauswertung:

Für die statistische Datenauswertung wurden die Programme IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Analytics) und GraphPad Prism 6.01 verwendet. In die Auswertung sind die Proteindaten sowie die im Vorfeld der Operationen (visit 1) erhobenen klinischen Daten eingeflossen.

Um den Zusammenhang zweier Variablen herauszufinden, wurden lineare Regressionsanalysen erstellt. Bei den Baseline-Characteristics wurden bei kategorialen Variablen die absolute Anzahl und der prozentuale Anteil an der gesamten Population angegeben. Bei kontinuierlichen Variablen wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung gewählt. Zum Querschnittsvergleich wurden die Variablen erst auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Variablen wurden parametrisch mit einem ungepaarten students t-test geprüft, nicht-normalverteilte Daten unparametrisch mittels eines Man Whitney U Test. Für kategoriale Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test ausgewählt.

Um den Zusammenhang von klinischen Parametern mit der Aktivität der CaMKII festzustellen, wurden univariate lineare Regressionen durchgeführt. Um Konfounder herauszufinden, wurde eine multivariate lineare Regression erstellt. Bei P-Werten $\leq 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Studienpopulation

Von 2016 bis 2019 wurden 368 Patienten in die Studie eingeschlossen und untersucht. Hiervon mussten 167 Patienten im Verlauf der Studie exkludiert werden, weil sie ihre Einwilligung zurückzogen, oder weil Polygraphie-Daten fehlten, bzw. die Biopsien nicht ausreichten, um Proteindaten erheben zu können. Somit konnten bei insgesamt 201 Patienten Proteindaten gewonnen werden. Hiervon konnten bei 36 Patienten auch funktionelle Daten erhoben werden, wie zum Beispiel Patch Clamp-Daten (siehe Abbildung 5-1). Das Vorhandensein von funktionellen Daten stellte ein Qualitätsmerkmal dar. So konnten diese Experimente nur bei ausreichend großen Gewebestücken mit einem hohen Anteil an Muskelfasern durchgeführt werden. Bei großen Gewebestücken war das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen günstiger als bei kleinen Gewebestücken, weshalb von einer geringeren artifiziellen Oxydation ausgegangen werden kann. Zudem war bei den kleinen Gewebestücken oft der Anteil an Bindegewebe mit nur wenigen Muskelfasern erhöht, was die Ergebnisse verfälschen könnte. Aus diesem Grund wurde die Statistik jeweils anhand der Gesamtkohorte, also allen gemessenen Proteindaten, als auch an dem Anteil der Patienten mit funktionellen Daten durchgeführt.

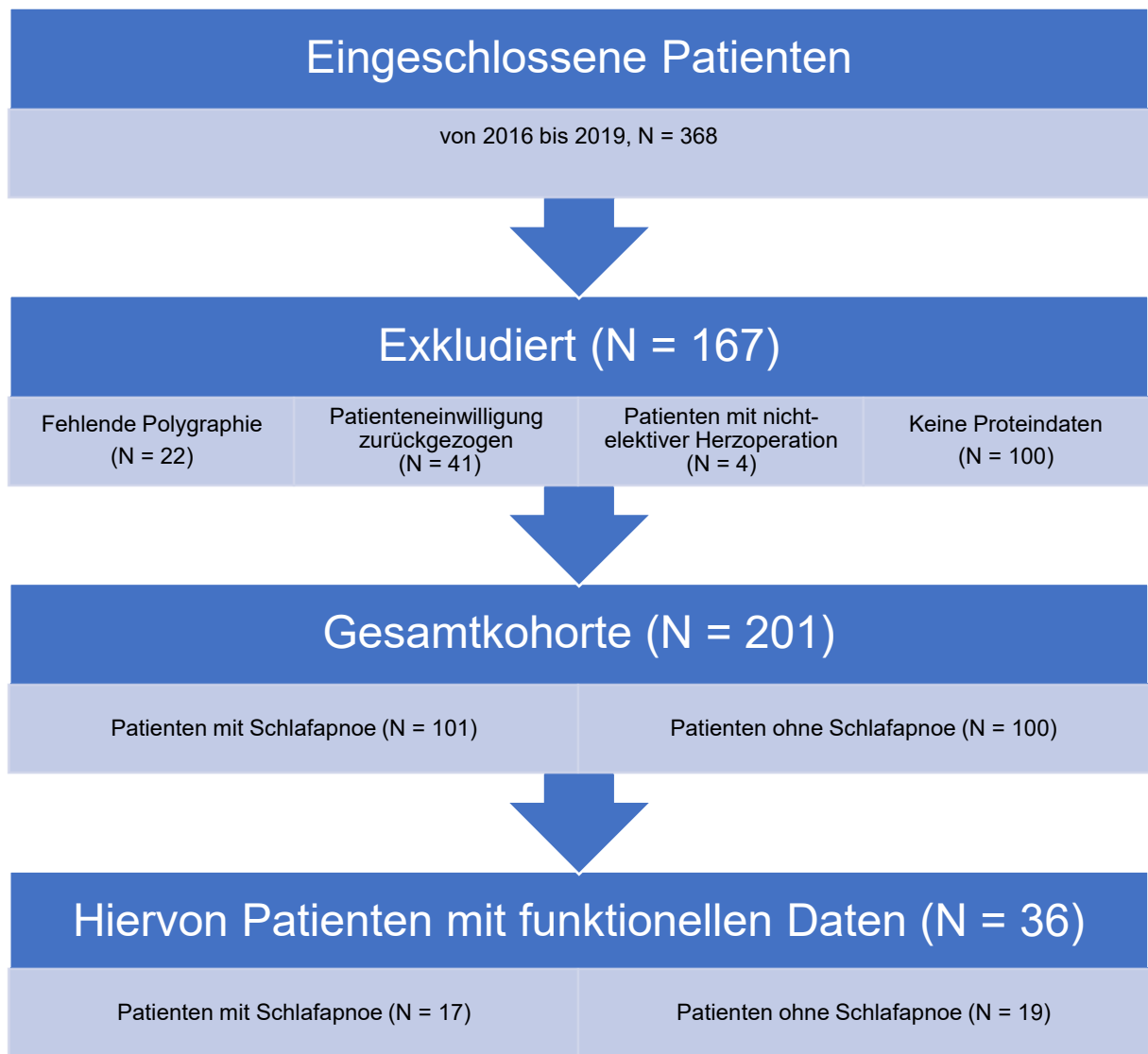


Abbildung 5-1: Studienpopulation

Bei 47,2% (mit funktionellen Daten), beziehungsweise 50,5% (Gesamtkohorte) wurde eine mittelschwere bis schwere Schlafapnoe in der Polygraphie diagnostiziert. Dies deckt sich mit bisherigen Studien bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko (135), beziehungsweise mit Daten von der Normalbevölkerung in Bezug auf Männer im mittleren Alter (50). In der Gruppe der Patienten mit funktionellen Daten waren, wie schon in früheren Studien festgestellt wurde, Patienten mit einer schlafbezogenen Atemstörung tendenziell älter ($P=0,110$), litten an einer Herzinsuffizienz ($P=0,219$) und hatten einen höheren BMI ($P=0,295$). Auch in der Gesamtkohorte konnten bei Patienten mit einer Schlafapnoe diese Tendenzen aufgezeigt werden. Im Vergleich zu der Gruppe mit funktionellen Daten ließ sich hier eine höhere Korrelation bei Herzinsuffizienz ($P=0,011$), LVEF ($P=0,024$), BMI ($P=0,005$), Vorhofflimmern ($P=0,034$) sowie bei der arteriellen Hypertonie ($P=0,116$) feststellen. Interessanterweise kam bei den Patienten mit funktionellen Daten heraus, dass Frauen eine höhere Wahrscheinlichkeit haben an Schlafapnoe zu erkranken ($P=0,081$), was jedoch auf den geringen Anteil an weiblichen Patientendaten zurückzuführen ist ($N=6$). Dies wurde in der Gesamtkohorte bestätigt, bei der kein Unterschied mehr feststellbar war ($P=0,822$). Definitionsgemäß wiesen beide Gruppen bei vorhandener Schlafapnoe einen höheren Oxygen Desaturation Index (ODI) auf ($P=0,000$, siehe Tabelle 5-1).

Baseline Characteristics

Parameter	Gesamtkohorte, N = 201			Patienten mit funktionellen Daten, N = 36		
	Keine SBAS (N=100)	SBAS (N=101)	P-Wert	Keine SBAS (N=19)	SBAS (N=17)	P-Wert
Demographie						
Alter, y, mean±SD	66,34±9,04	68,24±7,83	0,113 ^T	64,94±7,38	69,52±9,35	0,110 ^T
Männliches Geschlecht, N (%)	84 (84%)	86 (85,1%)	0,822 ^{Chi}	18 (94,7%)	12 (70,6%)	0,081 ^{Chi}
Kaukasisch, N (%)	92 (98,9%)	91 (100%)		19 (100%)	17 (100%)	
Kardiovaskuläre Risikofaktoren						
Arterielle Hypertonie, N (%)	80 (80%)	89 (88,1%)	0,116 ^{Chi}	17 (89,5%)	16 (94,1%)	1 ^{Chi}
Diabetes Mellitus, N (%)	25 (25%)	33 (32,7%)	0,230 ^{Chi}	5 (16,3%)	7 (41,2%)	0,345 ^{Chi}
Raucher*in, N (%)	55 (55%)	59 (58,4%)	0,426 ^{Chi}	13 (68,4%)	13 (76,5%)	0,717 ^{Chi}
Hyperlipidämie, N (%)	61 (61%)	64 (63,4%)	0,491 ^{Chi}	16 (84,2%)	13 (76,5%)	0,684 ^{Chi}
Schlaganfall bekannt, N (%)	8 (8%)	13 (12,9%)	0,225 ^{Chi}	2 (10,5%)	3 (17,6%)	0,650 ^{Chi}
BMI, kg/m², mean±SD	27,52±3,61	29,11±4,24	0,005* ^T	29,09±3,86	27,82±3,24	0,295 ^T
Herzfunktion						
LVEF, %, mean±SD	57,89±8,72	55,59±11,3	0,024* ^{MW}	56,32±8,16	53,05±11,32	0,326 ^T
Herzinsuffizienz, N (%)	11 (11%)	25 (24,8%)	0,011* ^{Chi}	2 (10,5%)	5 (29,4%)	0,219 ^{Chi}
Vorhofflimmern, N (%)	15 (15%)	27 (26,7%)	0,034* ^{Chi}	3 (15,8%)	4 (23,5%)	0,684 ^{Chi}
NT-proBNP, pg/mL, mean±SD	902,09± 3720	1663,4± 2666,3	0,000* ^{MW}	502,38±938, 24	719,67±585,15	0,006* ^{MW}

NYHA I, N (%)	23 (25%)	7 (7,7%)	0,002* Chi	8 (42,1%)	2 (11,8%)	0,065 Chi
NYHA II, N (%)	48 (52,2%)	52 (57,1%)	0,500 Chi	7 (36,8%)	12 (70,6%)	0,043* Chi
NYHA III, N (%)	19 (20,7%)	28 (30,8%)	0,117 Chi	4 (21,1%)	2 (11,8%)	0,662 Chi
NYHA IV, N (%)	2 (2,2%)	4 (4,4%)	0,444 Chi	0 (0%)	1 (5,9%)	0,472 Chi
Polygraphie-Daten						
ODI, N/h, mean±SD	6,90±4,34	27,52±14,2 3	0,000* MW	6,70±3,85	22,26±13,95	0,000* T
SaO2 mean, %, mean±SD	92,26±1,78	91,24±2,45	0,002* MW	91,95±2,44	92,29±2,11	0,653 T
Nierenwerte						
eGFR, ml/min, mean±SD	75,78±21,0	70,57±20,8 4	0,059 MW	68,84±27,55	69,35±20,63	0,951 T
Kreatinin, mg/dl, mean±SD,	1,12±1,01	1,18±0,83	0,127 MW	1,65±2,20	1,07±0,36	0,291 T

Tabelle 5-1: Baseline Characteristics für die Gesamtkohorte und für Patienten mit funktionellen Daten

Abkürzungen: T = t-Test für die Mittelwertgleichheit, MW = Mann Whitney U-Test, Chi = Chi²-Test

5.2 HDAC4-CaMKII-Bindungsassay

Für die Erstellung der Graphen und die Datenauswertung wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Um die Korrelation zweier Variablen zu prüfen, wurden lineare Regressionen durchgeführt. Um Unterschiede zweier Gruppen nachzuweisen, wurden diese erst auf eine Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Gruppen wurde anschließend ein T-Test, bzw. ANOVA (bei ≥ 3 Gruppen) durchgeführt, bei nicht normalverteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test, respektive Kruskal-Wallis-Test gewählt. Wie bereits in der Fragestellung formuliert, galt es den potenziellen Zusammenhang zwischen dem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom und der CaMKII-Aktivität näher zu beleuchten. In der Gruppe der Patienten mit funktionellen Daten konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($P=0,03$). In der Gesamtkohorte war diese Assoziation zwar nicht signifikant, aber es zeigte sich ein starker Trend ($P=0,07$, siehe Abbildung 5-3). Dies lässt darauf schließen, dass die CaMKII bei dem Vorliegen eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms stärker aktiv ist. Das ist in Hinblick auf die möglichen Aktivierungswege der CaMKII durch das OSAS, welche in der Einleitung bereits besprochen wurden, plausibel. Dieser Zusammenhang lässt sich auch in der Originalabbildung verdeutlichen. Hier lässt sich sehen, dass die Proben mit einem diagnostizierten OSAS tendenziell dunklere Banden bei CaMKII-HDAC4 aufweisen, was auf eine höhere Konzentration dieses Proteins und damit auf eine erhöhte CaMKII-Aktivität rückschließen lässt (siehe Abbildung 5.2). Die Proben in der Abbildung zeigen zudem einen signifikanten Anstieg der CaMKII-Aktivität mit zunehmendem AHI, dies lässt sich jedoch im gesamten Kollektiv nicht bestätigen.

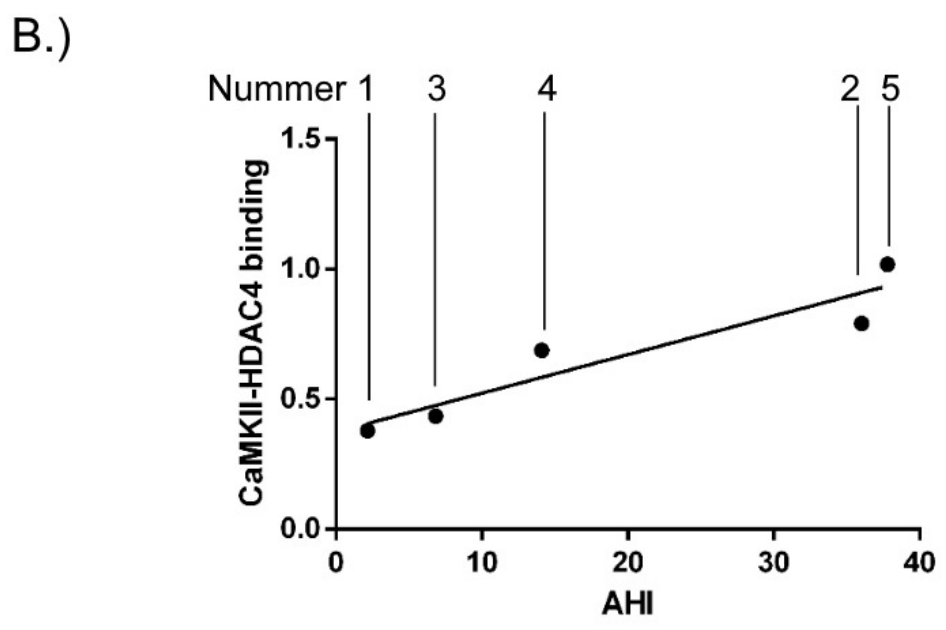
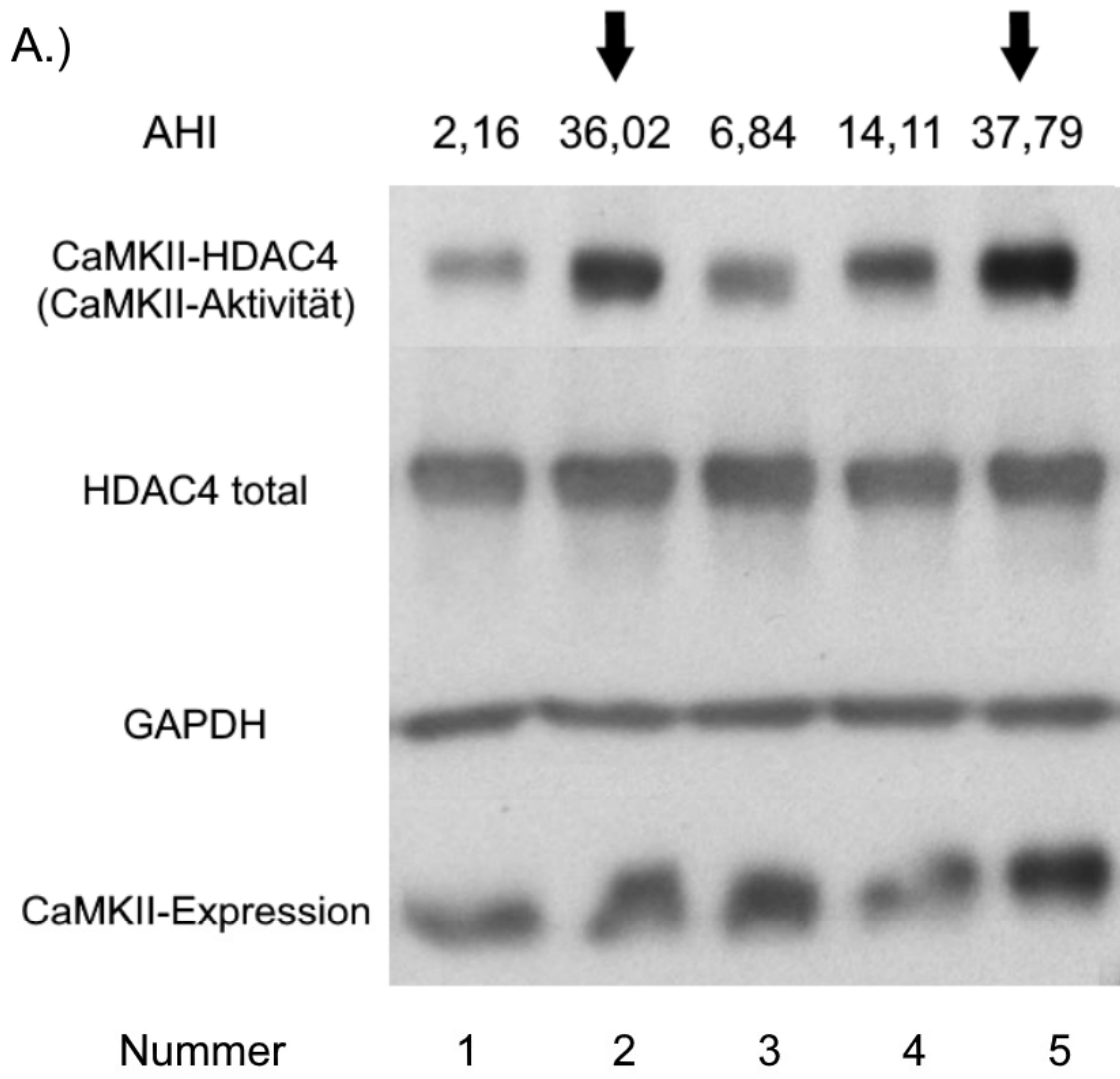


Abbildung 5-2: Originalabbildung der Proteinbanden

- A.) Abgebildet werden die Proteinbanden mit den dazugehörigen AHI-Werten einer ausgewählten Versuchsreihe. Die fortlaufende Nummerierung wurde zur Übersichtlichkeit hinzugefügt und lässt nicht auf die Patienten-ID schließen. Bei den Patienten mit der Nummer 2 und 5 liegt definitionsgemäß ein OSAS vor (mit Pfeilen markiert, $AHI \geq 15/h$). **CaMKII-HDAC4** stellt die aktive CaMKII dar, welche an HDAC4 (Class IIa histone deacetylase 4) bindet. Es ist zu erkennen, dass bei den markierten Patienten mit einem OSAS die Proteinbanden der aktiven CaMKII dunkler sind, was auf eine höhere Konzentration hinweist. Das **HDAC4 total** gibt die hinzugefügte HDAC4-Konzentration wieder, hier zeigt sich wie zu erwarten kein Unterschied zwischen den Proben. Auch das **GAPDH** (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) weist eine ähnlich hohe Konzentration zwischen den Proben auf. Die **CaMKII-Expression**, also die gesamte in der Probe vorhandene CaMKII, scheint ebenfalls bei den Patienten mit OSAS erhöht zu sein, dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht signifikant bestätigt werden (s.u.).
- B.) CaMKII-Aktivität der in der Originalabbildung ausgewählten Proben in Bezug auf den AHI, $p = 0,019$. Wie bereits in der Originalabbildung zu vermuten ist, steigt hier die CaMKII-Aktivität mit einem zunehmenden AHI. Diese Beobachtung lässt sich jedoch in der größeren Datenlage nicht bestätigen (s. Abbildung 5-4).

Verteilung der CaMKII-Aktivität in Bezug auf das Vorhandensein eines OSAS

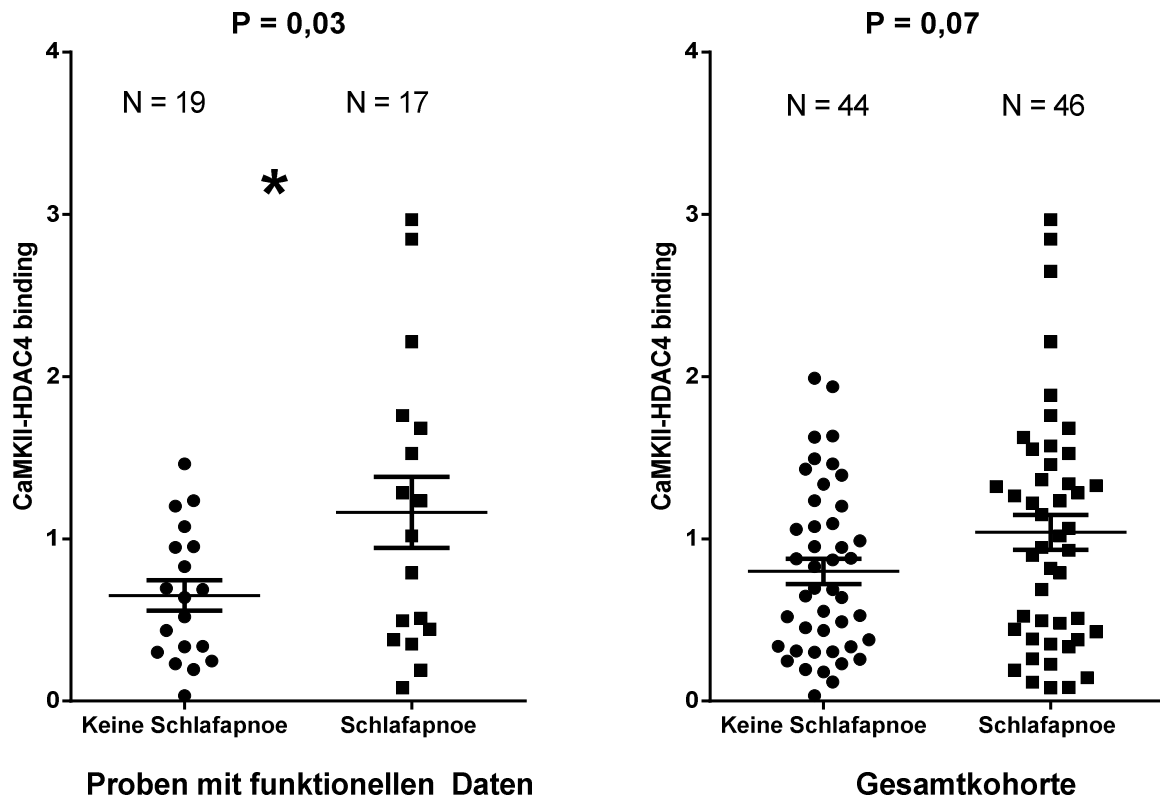


Abbildung 5-3: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität (CaMKII-HDAC4 binding) in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms

Bei der Gruppe mit funktionellen Daten kann eine gesteigerte CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einem Schlafapnoe-Syndrom nachgewiesen werden. In der Gesamtkohorte ist dieser Zusammenhang nicht signifikant, die Ergebnisse legen jedoch einen möglichen Einfluss nahe. Das OSAS wird mit einem AHI $\geq 15/h$ definiert.

Bei der Patientengruppe mit funktionellen Daten stellten sich zudem weitere Trends dar, die mögliche Verbindungen mit dem Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI), dem Oxygen Desaturation Index (ODI), der Herzinsuffizienz sowie der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) nahelegen. Da der AHI zur Diagnosestellung eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms verwendet wird, ist ein möglicher Zusammenhang zwischen der CaMKII-Aktivität und dem AHI naheliegend. Es zeigte sich ein starker Trend (P = 0,18, siehe Abbildung 5-4). Ebenso verhielt es sich mit dem

ODI ($P = 0,08$, siehe Abbildung 5-5), welcher ebenfalls in engem Zusammenhang mit dem OSAS steht und die Anzahl an Sauerstoffabfällen während einer Stunde Schlaf beschreibt.

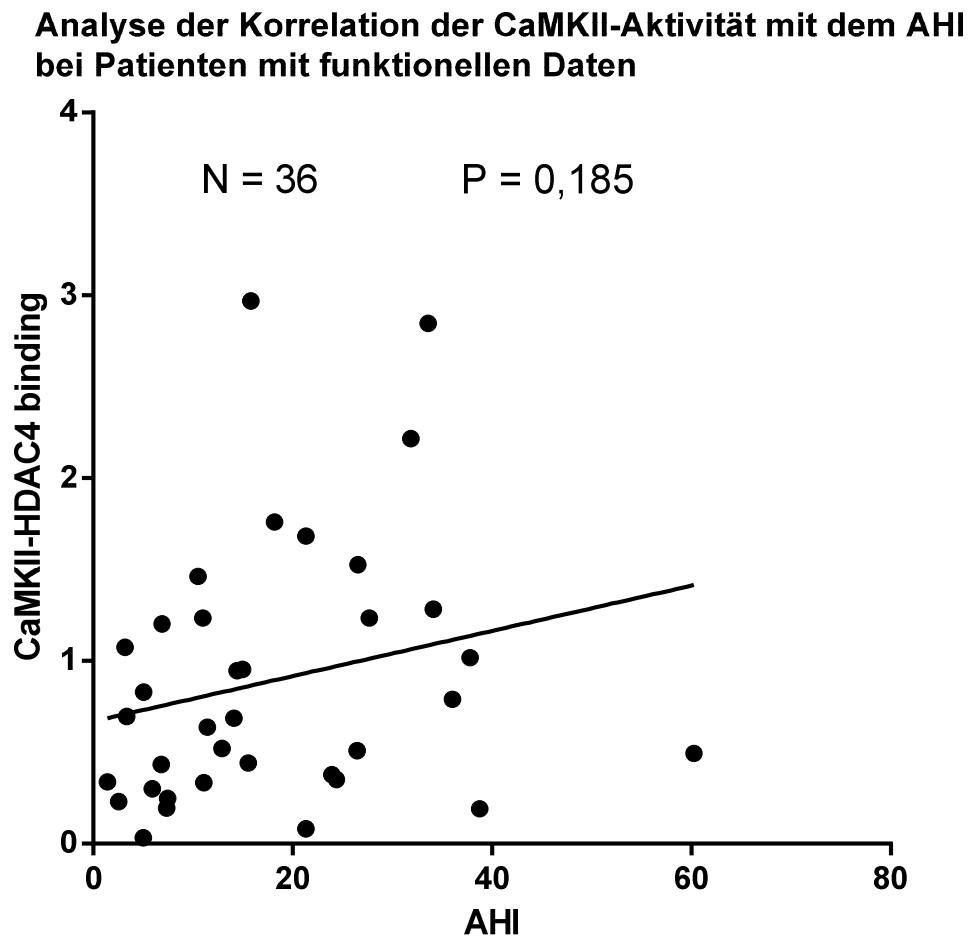


Abbildung 5-4: Analyse der Korrelation des Apnoe-Hypopnoe-Index und der CaMKII-Aktivität bei Patienten mit funktionellen Daten

Analyse der Korrelation der CaMKII-Aktivität mit dem ODI bei Patienten mit funktionellen Daten

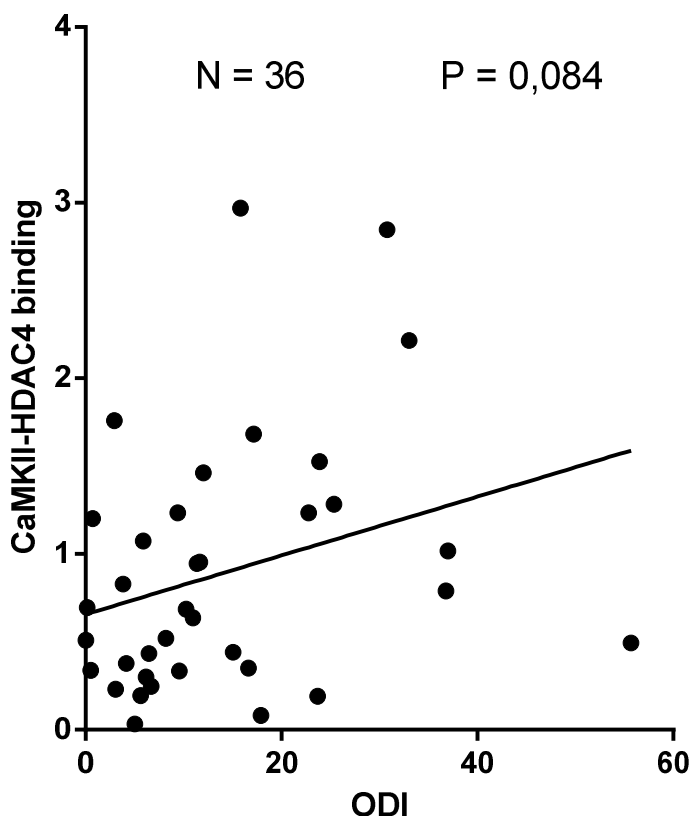


Abbildung 5-5: Analyse der Korrelation des Oxygen Desaturation Index und CaMKII-Aktivität bei Patienten mit funktionellen Daten

Die ESC (European Society of Cardiology) nutzt als Diagnosekriterium und Unterteilung der Herzinsuffizienz u.a. die LVEF, also die Auswurfleistung des linken Ventrikels. Eine LVEF > 50% bei vorhandenen Zeichen einer Herzinsuffizienz wird als Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) gewertet, eine LVEF von 40-49% als Herzinsuffizienz mit mittelgradiger Ejektionsfraktion (HFmrEF) und eine LVEF <40% als Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF). Bei Patienten mit funktionellen Daten konnte auch hier ein Zusammenhang einer gesteigerten CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einer HFmrEF im Vergleich zu Patienten mit einer nicht eingeschränkten Herzfunktion gefunden werden ($P = 0,01$, siehe Abbildung 5-6). Interessanterweise galt dies nicht für Patienten mit einer HFrEF, was möglicherweise im Zusammenhang mit der sehr eingeschränkten Datenlage steht ($N=2$). In der Gesamtkohorte konnte diese mögliche Korrelation nicht bestätigt werden ($P = 0,36$). Es konnte folglich auch ein leichter Trend hergestellt werden, dass die CaMKII bei

Patienten mit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz stärker aktiv ist ($P = 0,18$, siehe Abbildung 5-6). Diese möglichen Zusammenhänge sind denkbar, da bereits in zahlreichen Studien die Auswirkung der CaMKII auf die Herzfunktion herausgearbeitet werden konnte (19,96,136–138).

Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Bezug auf das Vorhandensein einer Herzinsuffizienz (A) und auf die LVEF (B) bei Patienten mit funktionellen Daten

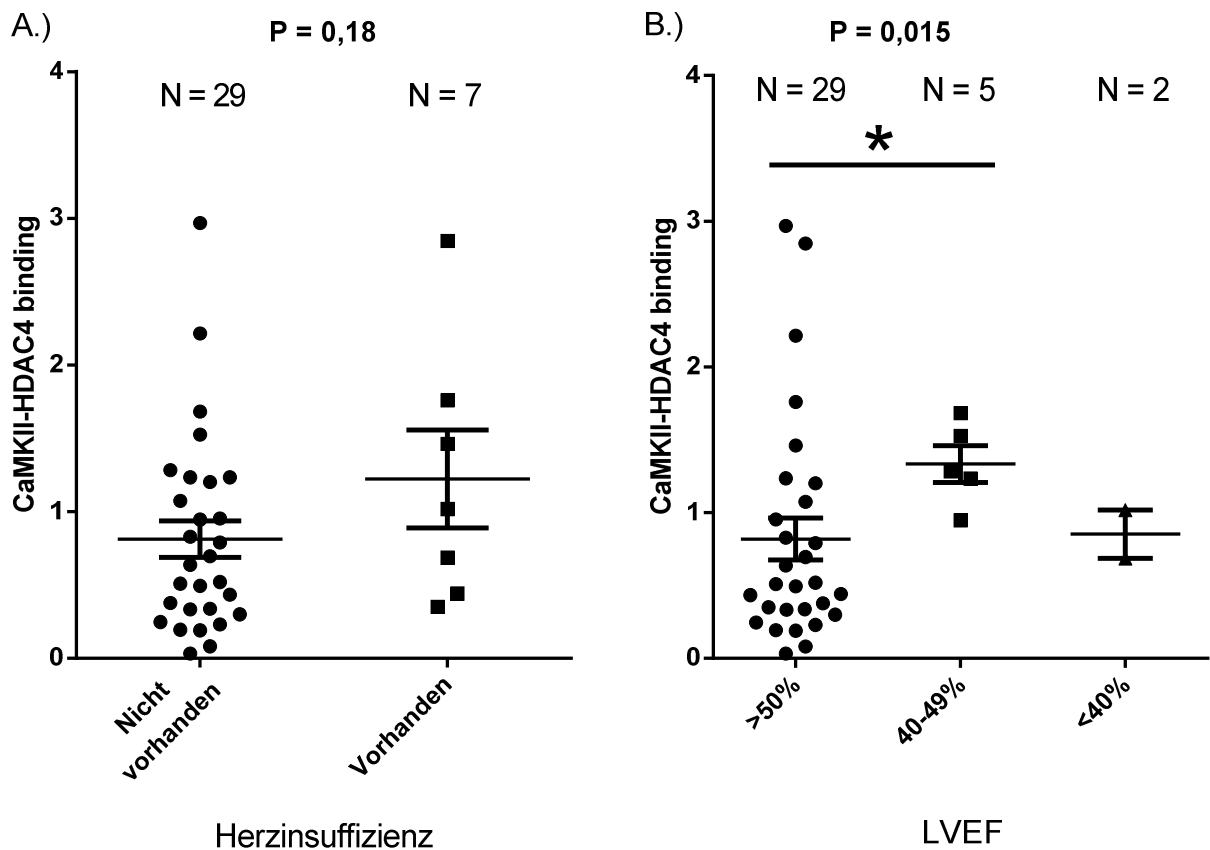


Abbildung 5-6: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) bei Patienten mit funktionellen Daten

- A.) Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz
- B.) Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Bezug auf die LVEF.
Es ist ein Anstieg der CaMKII-Aktivität zwischen Patienten mit einer LVEF > 50% und Patienten mit einer HFmrEF (LVEF 40-49%) erkennbar. Patienten mit einer HFpEF (LVEF <40%) setzen diesen Trend nicht fort, was an der sehr geringen Datenlage liegen kann (N=2).

5.3 CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit ihrer Expression

Während die Aktivität der CaMKII den entscheidenden Faktor für die in dieser Arbeit behandelte Fragestellung darstellt, ist es dennoch von Interesse, die Expression der Kinase und deren Aktivität in Abhängigkeit der Expression, also ihre relative Aktivität, zu beleuchten. Die Expression beschreibt die Gesamtmenge an in den Kardiozyten vorhandener CaMKII, unabhängig des Aktivierungszustands der Kinase. In dieser Arbeit wurde die Expression parallel zu dem Aktivitäts-Assay in einem separaten Western-Blot bestimmt und ausgewertet (siehe „Material und Methoden“). Um herauszufinden, wie viel der insgesamt exprimierten CaMKII aktiv ist, wurde die gemessene Aktivität durch die Expression der jeweiligen Probe geteilt.

Bei der Patientengruppe mit funktionellen Daten konnte ein potenzieller Anstieg der Expression im Zusammenhang mit einem Schlafapnoe-Syndrom ($P = 0,10$) bei einer insgesamt nicht steigenden relativen CaMKII-Aktivität ($P = 0,96$; siehe Abbildung 5-7) gezeigt werden. In der Gesamtkohorte konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 5-8).

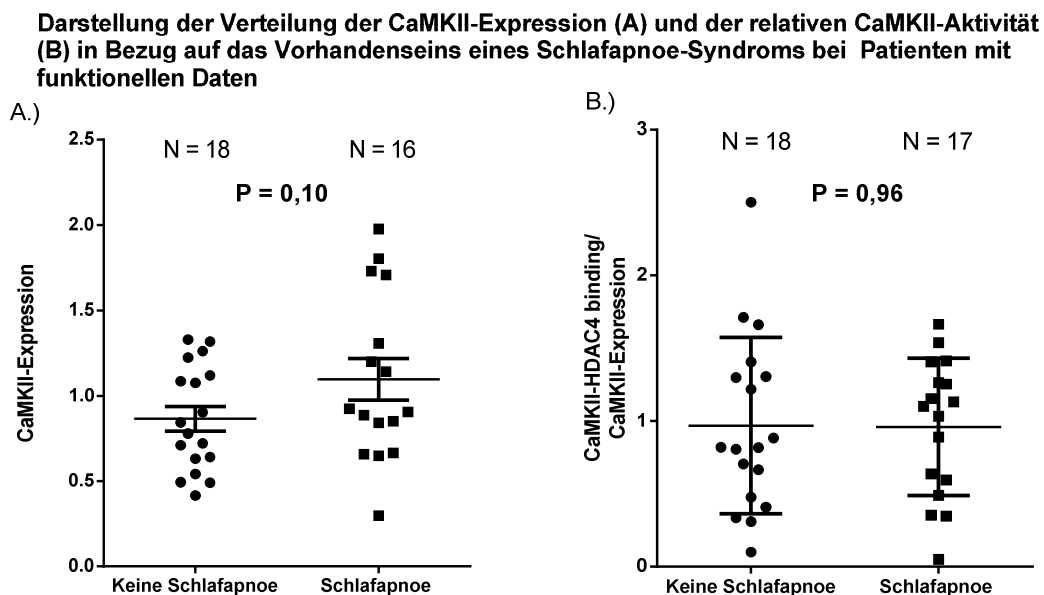


Abbildung 5-7: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression (A) und relativen Aktivität (B) in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms bei Patienten mit funktionellen Daten.

Das Schlafapnoe-Syndrom wurde durch einen AHI $\geq 15/h$ definiert.

- A.) Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms. Es ist ein Trend erkennbar, der eine erhöhte CaMKII-Expression bei Patienten mit einem Schlafapnoe-Syndrom vermuten lässt.
- B.) Darstellung der Verteilung der relativen CaMKII-Aktivität (CaMKII-HDAC4 binding/CaMKII-Expression) in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms. Obwohl die Aktivität der CaMKII insgesamt signifikant bei einer Schlafapnoe ansteigt, erhöht sich die relative Aktivität in Bezug auf die Expression vermutlich nicht.

Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression (A) und der relativen Aktivität (B) in Bezug auf das Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms im Gesamtkollektiv

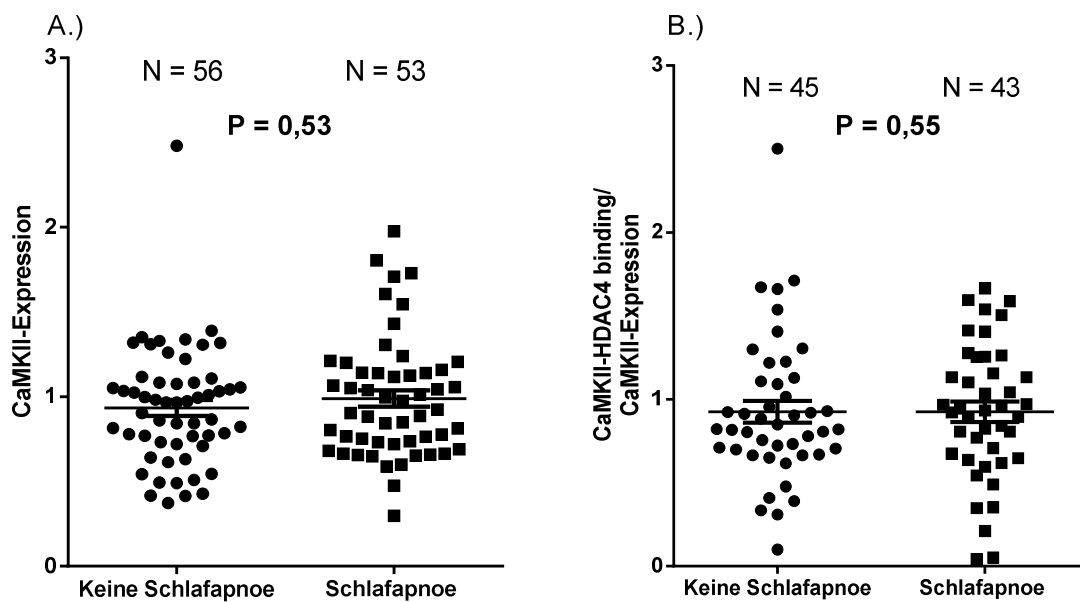


Abbildung 5-8: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression (A), bzw. der relativen CaMKII-Aktivität (B) in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms beim Gesamt-Kollektiv.

Das Schlafapnoe-Syndrom wurde durch einen AHI ≥ 15 /h definiert. In beiden Fällen konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

In den LVEF-Kategorien nach der ESC-Klassifikation konnte bei dem Patientenkollektiv mit funktionellen Daten ein leichter Trend festgestellt werden, dass Patienten mit zunehmender Herzinsuffizienz eine tendenziell aktivere Kinase in Relation zur Expression aufweisen ($P = 0,212$, siehe Abbildung 5-9). Die bei der ESC-Klassifikation verwendeten Cut-off-Werte der LVEF führten in unserem Patientenkollektiv zu deutlich ungleich großen Gruppen (mit jeweils einer dominanten Gruppe mit einer LVEF $> 50\%$). Bei dem Vergleich von Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz konnten sowohl in der Gesamtkohorte als auch bei dem

Patientenkollektiv mit funktionellen Daten keine signifikante Steigerung der Expression ($P = 0,46$, respektive $0,39$) oder relativen Aktivität ($P = 0,51$, resp. $0,76$) herausgefunden werden.

Darstellung der Verteilung der relativen CaMKII-Aktivität in Bezug auf die LVEF bei Patienten mit funktionellen Daten

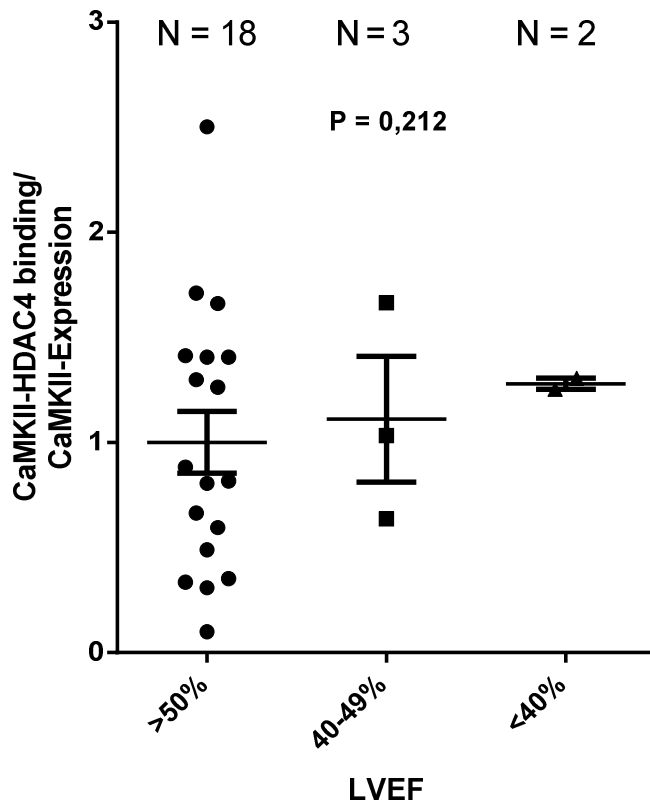


Abbildung 5-9: Darstellung der Verteilung der relativen CaMKII-Aktivität (CaMKII-HDAC4 binding/CaMKII-Expression) und der LVEF (linksventrikuläre Ejektionsfraktion) bei Patienten mit funktionellen Daten

Es ist ein leichter Trend erkennbar, dass die relative CaMKII-Aktivität (die CaMKII-Aktivität in Bezug auf ihre Expression) mit abnehmender LVEF zunimmt.

5.4 Univariate und multivariate Regressionen

Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität mit den unten aufgeführten Parametern bei Patienten mit funktionellen Daten

Parameter	Regressions- koeffizient B	95% Konfidenzintervall	R ²	Signifikanz
Schlafapnoe vorhanden	0,513	0,048 – 0,977	0,129	0,031*
Alter, y	-0,001	-0,030 – 0,029	0,000	0,965
Männliches Geschlecht	-0,394	-1,046 – 0,258	0,042	0,228
BMI, kg/m²	0,022	-0,047 – 0,092	0,012	0,517
Vorhofflimmern vorhanden	0,229	-0,393 – 0,852	0,016	0,459
Herzinsuffizienz vorhanden	0,411	-0,200 – 1,023	0,052	0,180
Diabetes Mellitus vorhanden	0,053	-0,473 – 0,580	0,001	0,838
Kreatinin, mg/dl	-0,009	-0,164 – 0,146	0,000	0,905

Tabelle 5-2: Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität (abhängige Variable) als Funktion der aufgeführten Parameter (unabhängige Variablen) bei Patienten mit funktionellen Daten

Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität mit den unten aufgeführten Parametern bei Patienten mit funktionellen Daten

R²: 0,235			
Parameter	Regressions- koeffizient B	95% Konfidenzintervall	Signifikanz
Schlafapnoe vorhanden	0,570	0,014 – 1,126	0,045*
Alter, y	-0,013	-0,045 – 0,018	0,397
Männliches Geschlecht	-0,261	-1,045 – 0,524	0,501
BMI, kg/m²	0,051	-0,026 – 0,129	0,183
Vorhofflimmern vorhanden	0,051	-0,704 – 0,805	0,891
Herzinsuffizienz vorhanden	0,277	-0,509 – 1,063	0,476
Diabetes vorhanden	-0,088	-0,662 – 0,486	0,755
Kreatinin, mg/dl	0,064	-0,104 – 0,232	0,440

Tabelle 5-3: Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität (abhängige Variable) als Funktion der aufgeführten Parameter (unabhängige Variablen) bei Patienten mit funktionellen Daten

Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität mit den unten aufgeführten Parametern bei der Gesamtkohorte

Parameter	Regressions- koeffizient B	95% Konfidenzintervall	R²	Signifikanz
Schlafapnoe vorhanden	0,240	-0,025 – 0,506	0,035	0,076
Alter, y	0,006	-0,008 – 0,021	0,007	0,388
Männliches Geschlecht	-0,428	-0,784 – -0,072	0,054	0,019*
BMI, kg/m²	0,003	-0,029 – 0,034	0,000	0,867
Vorhofflimmern vorhanden	0,057	-0,294 – 0,408	0,001	0,748
Herzinsuffizienz vorhanden	0,185	-0,138 – 0,507	0,014	0,258
Diabetes Mellitus vorhanden	-0,148	-0,438 – 0,143	0,011	0,316
Kreatinin, mg/dl	0,974	-0,150 – 0,073	0,005	0,489

Tabelle 5-4: Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität (abhängige Variable) als Funktion der aufgeführten Parameter (unabhängige Variablen) bei der Gesamtkohorte

Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität mit den unten aufgeführten Parametern bei der Gesamtkohorte

R²: 0,090			
Parameter	Regressions- koeffizient B	95% Konfidenzintervall	Signifikanz
Schlafapnoe vorhanden	0,204	-0,078 – 0,487	0,154
Alter, y	-0,002	-0,019 – 0,014	0,788
Männliches Geschlecht	-0,333	-0,719 – 0,054	0,090
BMI, kg/m²	0,006	-0,041 – 0,029	0,719
Vorhofflimmern vorhanden	0,110	-0,300 – 0,519	0,595
Herzinsuffizienz vorhanden	0,023	-0,375 – 0,421	0,908
Diabetes vorhanden	-0,125	-0,440 – 0,191	0,434
Kreatinin, mg/dl	-0,040	-0,153 – 0,073	0,483

Tabelle 5-5: Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität (abhängige Variable) als Funktion der aufgeführten Parameter (unabhängige Variablen) bei der Gesamtkohorte

Für die univariaten linearen Regressionen wurden klinische Parameter ausgewählt, bei denen ein Einfluss auf die CaMKII-Aktivität denkbar war, wie biographische Daten, Indikatoren für die Herzfunktion und den Stoffwechsel sowie natürlich das Vorhandensein eines OSAS. Diese Parameter wurden auf die CaMKII-Aktivität, welche im Zuge dieser Arbeit gemessen wurde, berechnet. Hier konnte festgestellt werden, dass der Gruppe mit funktionellen Daten die Patienten mit einem OSAS eine signifikant erhöhte CaMKII-Aktivität aufwiesen ($P = 0,031$, siehe Tabelle 5-2). Auch konnte ein leichter Trend beobachtet werden, dass das Geschlecht und das Vorhandensein einer Herzinsuffizienz sich auf die CaMKII-Aktivität auswirken könnten ($P = 0,228$, respektive $P = 0,180$). In der Gesamtkohorte konnte wie bereits oben beschrieben der Zusammenhang zwischen der CaMKII-Aktivität und dem Vorhandensein eines OSAS nicht bestätigt werden ($P = 0,076$, siehe Tabelle 5-4). Hier war der Zusammenhang mit dem Geschlecht signifikant ($P = 0,019$), der denkbare Zusammenhang zur Herzinsuffizienz war schwächer beobachtbar ($P = 0,258$).

In der multivariaten linearen Regression bei Patienten mit funktionellen Daten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines OSAS und der CaMKII-Aktivität gemessen werden ($P = 0,045$, siehe Tabelle 5-3). Zudem ließ sich ein leichter Trend erkennen, dass Patienten mit einem höheren BMI tendenziell eine aktivere CaMKII aufweisen ($P = 0,183$). Die restlichen Faktoren schienen die Rolle eines Confounders einzunehmen. Wenn man stattdessen die Gesamtkohorte betrachtet, zeichnet sich in der Beziehung zwischen OSAS und CaMKII-Aktivität nur noch ein Trend ab ($P = 0,154$, siehe Tabelle 5-5). Ein stärkerer Trend lässt sich bei der Rolle des Geschlechts erkennen ($P = 0,09$).

6 Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einem OSAS unabhängig von potenziellen Störvariablen erhöht ist, was eine mögliche Erklärung für die Pathogenese von VHF bei OSAS-Patienten bietet.

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Die atriale CaMKII-Aktivität ist bei Patienten mit einem OSAS erhöht

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom geht gehäuft mit Herzerkrankungen wie einer Herzinsuffizienz oder Vorhofflimmern einher (3–5). Durch eine erhöhte Belastung des Vorhofs (52,58), eine gesteigerte Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie eine Vermehrung von Sauerstoffradikalen (7–9) kann das OSAS diese Folgeerkrankungen begünstigen. Diese drei Mechanismen können ebenfalls zu einer verstärkten Aktivität der CaMKII führen (12–15). Wie oben beschrieben kann die CaMKII auf verschiedenen Wegen diese Erkrankungen mit auslösen.

Da das OSAS also durch diese möglichen Wege die CaMKII aktivieren könnte, liegt die Frage nahe, ob Patienten mit einem OSAS eine verstärkt exprimierte oder aktivere CaMKII vorweisen im Vergleich zu Patienten ohne diese Erkrankung. In dieser Arbeit wurde einerseits die atriale CaMKII-Expression mittels eines Westernblots, als auch die CaMKII-Aktivität mittels eines HDAC4-CaMKII-Bindungsassays bei Patienten analysiert, die einer Herzoperation unterzogen wurden. Im Rahmen einer polysomnographischen Untersuchung im Vorfeld der Operation wurden die Patienten auf ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom getestet sowie weitere klinische Parameter erhoben. Wie im Ergebnisteil erklärt, wurde in dieser Arbeit sowohl das gesamte Patientenkollektiv als auch selektiv die Patienten mit qualitativ besseren Gewebeproben, bei denen eine geringere Störanfälligkeit und Fehlerquote zu erwarten ist, ausgewertet. Obwohl die letztgenannte Patientengruppe, also die Patienten, an deren Gewebeproben auch funktionelle Daten erhoben werden konnten, deutlich kleiner ist (N = 36), kann hierbei also von verlässlicheren Ergebnissen ausgegangen werden. Wie zu erkennen ist, führen die beiden Patientenkollektive zu unterschiedlichen Ergebnissen, wobei in beiden Fällen ein ähnlicher Trend zu beobachten ist. Bei den Patienten mit funktionellen Daten war die CaMKII-Aktivität in der univariaten Analyse bei Patienten mit einem OSAS im Vergleich zu Patienten ohne OSAS signifikant erhöht (P = 0,03). Dies konnte im gesamten Patientenkollektiv zwar

nicht in der Signifikanz bestätigt werden, aber auch hier ließ sich ein deutlicher Trend erkennen ($P = 0,07$). Es liegt also die Vermutung nahe, dass ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom mit einer verstärkten Aktivierung der atrialen CaMKII einhergeht. Es fällt auf, dass bei der linearen Regression von der CaMKII-Aktivität auf den AHI kein signifikanter Zusammenhang besteht ($P = 0,18$), obwohl der AHI als Diagnosekriterium der Schlafapnoe dient. Dies ist der künstlichen Grenze bei einem AHI von 15/h geschuldet, welcher ein OSAS definiert. Werte, die sich knapp unter- oder oberhalb dieser Grenze befinden, können das Ergebnis stark beeinflussen. Aus diesem Grund sind die Berechnungen mit dem AHI ehrlicher als jene mit dem Vorhandensein eines OSAS. Bei größeren Stichproben ist davon auszugehen, dass sich die Ergebnisse dieser Berechnungen angleichen.

In der Patientengruppe mit funktionellen Daten lässt sich ebenfalls vermuten, dass die CaMKII bei Vorliegen eines OSAS auch stärker exprimiert wird ($P = 0,10$). Wenn man sich die CaMKII-Aktivität in Relation zu ihrer Expression ansieht, zeigt sich, dass die relative Aktivität nicht zunimmt. Es scheint also, als ob die Zunahme der CaMKII-Aktivität bei Patienten mit OSAS wahrscheinlich durch eine verstärkte Expression und nicht durch eine erhöhte Aktivierung des Enzyms entsteht. Interessanterweise konnte dieser mögliche Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines OSAS und der atrialen CaMKII-Expression in der Gesamtkohorte nicht bestätigt werden ($P = 0,53$).

Wie die verschiedenen Regulationsmechanismen der CaMKII (siehe Kapitel 3.4.2) vermuten lassen, ist die CaMKII-Aktivität von verschiedenen Faktoren abhängig, weshalb die Ergebnisse der univariaten Analysen störanfällig sind. Die gängigen möglichen Störvariablen wie Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, Nierenfunktion, Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz wurden deshalb in einer multivariaten Analyse mit aufgegriffen. Ziel der multivariaten Analyse war, zu ermitteln, ob die erhöhte CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einer Schlafapnoe in der univariaten Analyse durch Störvariablen mit bedingt wird. Hier konnte festgestellt werden, dass bei Patienten mit funktionellen Daten die CaMKII tatsächlich unabhängig von Störvariablen bei Patienten mit OSAS im Vergleich zu Patienten ohne OSAS verstärkt aktiv ist ($P = 0,04$). In der Gesamtkohorte konnte dies nicht bestätigt werden ($P = 0,15$). Auch hier ist zu vermuten, dass die Patientengruppe mit funktionellen Daten qualitativ hochwertigere Ergebnisse erzeugt und damit eine bessere Aussagekraft aufweist als die Gesamtkohorte. Es lässt sich also zeigen, dass das obstruktive Schlafapnoe-

Syndrom zu einer erhöhten Aktivität der CaMKII führen kann. Wie weiter unten ausführlich diskutiert wird, kann dieser Zusammenhang eine Erklärungsmöglichkeit der Pathogenese des Vorhofflimmerns, bzw. der Herzinsuffizienz unter einem OSAS bieten. Dies könnte in Zukunft zu neuen Behandlungsmöglichkeiten dieser Folgeerkrankungen führen.

6.1.2 Der Zusammenhang zwischen der CaMKII-Aktivität und der Herzinsuffizienz

Wie bereits erwähnt, kann eine verstärkte Aktivität der CaMKII zu einer Herzinsuffizienz führen (6,97,139). In dieser Arbeit wurden die Herzinsuffizienz und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) in Relation zur CaMKII-Aktivität näher betrachtet. Die CaMKII war bei einer vorhandenen Herzinsuffizienz nicht signifikant aktiver ($P = 0,18$). Bei der LVEF konnte ein signifikanter Anstieg der Aktivität zwischen Patienten mit einer noch guten Herzfunktion (LVEF $>50\%$) und Patienten mit einer mäßig eingeschränkten Auswurfleistung beobachtet werden (LVEF 40-49%, $P = 0,01$). Bei Patienten mit stark eingeschränkter Herzfunktion (LVEF $<40\%$) war dieser Zusammenhang nicht mehr feststellbar. Dass die CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz, bzw. einem LVEF $<40\%$ nicht signifikant steigt, könnte an der niedrigen Ereignisrate liegen (7 Patienten mit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz, 2 Patienten mit einer LVEF $<40\%$). Aus den Beobachtungen zahlreicher Studien lässt sich vermuten, dass bei einer höheren Fallzahl auch hier ein signifikanter Anstieg der CaMKII-Aktivität feststellbar wäre (17,97,139).

6.1.3 CONSIDER-AF

Diese Dissertation wurde im Zuge und als Teil der prospektiven Studie CONSIDER-AF verfasst. Diese hat sich zum Ziel genommen, den Einfluss von SBAS auf das Auftreten von kardialen und zerebrovaskulären Ereignissen, wie das VHF, bei Patienten, die eine CABG durchführen lassen, herauszufinden. Die Ziele der Studien am Biomaterial, zu denen auch diese Arbeit gehört, waren u.a. die Bestimmung von Schlüsselereignissen, die sich prädisponierend auf ein VHF auswirken können und neue medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit SBAS zu finden. In dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass die CaMKII bei Patienten mit einem OSAS signifikant und unabhängig von Störfaktoren erhöht ist. Zudem konnte

erstmalig beobachtet werden, dass diese erhöhte CaMKII-Aktivität bei Patienten mit einem OSAS in einer proarrhythmogenen I_{Na} -Dysregulation resultiert (140). Die CaMKII phosphoryliert Nav1.5, eine Untereinheit spannungsabhängiger Natriumkanäle, was sowohl zu einem reduzierten I_{Na} , als auch zu einem verstärkten $I_{Na,late}$ führt (14,120,141,142). Dies kann das Gleichgewicht der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentrationen stören und damit durch EADs und DADs Arrhythmien verursachen (120,122). Die EADs, DADs und supraventrikuläre Extrasystolen waren unabhängig von Störfaktoren wie HI und VHF und konnten durch eine Inhibition sowohl von CaMKII als auch von $I_{Na,late}$ beendet werden. Während der genaue Aktivierungsweg der CaMKII nicht nachgewiesen wurde, konnten bei Patienten mit einem OSAS erhöhte ROS-Spiegel in atrialen Kardiomyozyten festgestellt werden, welche durch eine Oxidation die CaMKII aktivieren könnten (13).

6.2 Klinische Relevanz

6.2.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom geht mit einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern einher

Wie bereits in mehreren Studien gezeigt werden konnte, geht das OSAS mit einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern einher (3–5). Auch in dieser Studie konnte dieser Zusammenhang in der Gruppe mit funktionellen Daten bestätigt werden ($P = 0,03$). Wie bereits im Kapitel 3.3.2 verfasst, kann dies durch eine Veränderung des intrathorakalen Drucks (7), einer Aktivierung des Sympathikus (143), oder durch eine intermittierende Hypoxie mit damit einhergehender Bildung von ROS (144,145) erklärt werden. Weitere Faktoren, die hierzu beitragen können, sind strukturelles Remodeling (83) und eine Reduktion der atrialen Reizleitung (83,146,147). Letztere wird durch eine Herabregulation der Connexin-43-Expression bei Patienten mit OSAS ausgelöst, welche mit dem Schweregrad der SBAS korreliert (148). Connexine sind die Grundbausteine von Gap Junctions, welche eine elektrische Reizleitung zwischen den Kardiomyozyten ermöglichen, wodurch diese ein funktionelles Synzytium bilden (22,149,150). Eine geringere Expression dieser Connexine führt folglich zu einer Veränderung der Reizübertragung und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Vorhofflimmern zu entwickeln (151–153).

Das OSAS wirkt sich auch auf das strukturelle Remodeling aus. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem OSAS nach einem Myokardinfarkt größere Narben und ein verstärktes ventrikuläres Remodeling entwickeln (154,155). Durch die dünnere Muskulatur der Atrien reagieren diese empfindlicher auf den erhöhten intrathorakalen Druck bei OSAS (156,157). Eine eingeschränkte Funktion des linken Vorhofs kann unter anderem zu kardiovaskulären Erkrankungen (158) und Vorhofflimmern (159) führen. Wester et al. fanden durch Untersuchungen mittels kardialen MRTs heraus, dass die Funktion des linken Vorhofs bei Patienten mit einem OSAS sowohl chronisch als auch unter akutem kardialen Stress, wie z.B. nach einem Herzinfarkt, eingeschränkt ist (160). Als Indikator für die Vorhoffunktion kann PTFV1 (P-wave terminal force in V1) herangezogen werden. Abnormalitäten in PTFV1 gehen mit einer erhöhten CaMKII-Aktivität einher (161). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl an trabekulären Arrhythmien. Die Rolle der CaMKII hierbei wird dadurch hervorgehoben, dass durch eine selektive CaMKII-Inhibition mit KN93 die Schwere dieser Arrhythmien reduziert wird (161). Ein Auszug aus den möglichen Wegen der Pathogenese der kardialen Folgeerkrankungen unter OSAS wird in Abbildung 6-1 dargestellt.

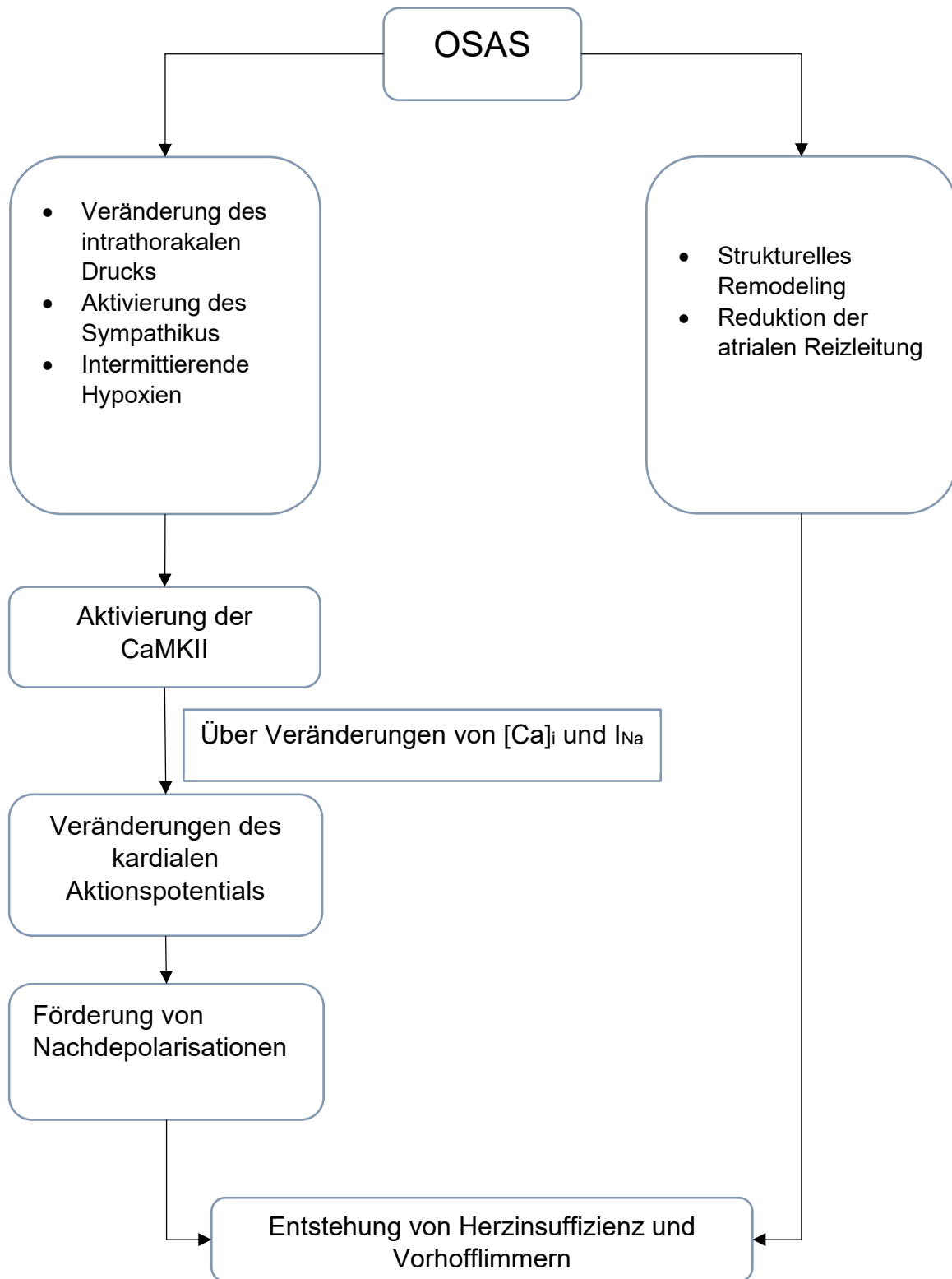


Abbildung 6-1: Pathogenese von kardialen Folgeerkrankungen unter OSAS

Neben hier nicht eingezeichneten, möglichen weiteren Wegen kann das OSAS sowohl direkt (rechter Zweig) als auch indirekt über die CaMKII (linker Zweig) zu VHF und Herzinsuffizienz beitragen.

6.2.2 Die CaMKII wird durch Oxidation bei Patienten mit OSAS aktiviert

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom kann durch die damit einhergehenden intermittierenden Hypoxien zur Bildung von ROS führen (66,162). Die Anzahl dieser intermittierenden Hypoxien wird durch den ODI wiedergegeben. Die Ergebnisse der Stichprobe mit funktionellen Daten konnten auf eine mögliche Korrelation zwischen dem ODI und der CaMKII-Aktivität hinweisen ($P = 0,08$). Im Zuge unserer CONSIDER-AF Studie konnte gezeigt werden, dass sich die ROS auch im Atrium anreichern (140). So konnte herausgefunden werden, dass der Anteil an oxidiertem CaMKII im Vergleich zur gesamten CaMKII-Expression bei Patienten mit einem OSAS erhöht ist. Der Anteil an oxidiertem CaMKII scheint hierbei proportional mit steigendem AHI (und damit mit dem Schweregrad des OSAS) anzusteigen (163). Dieser Zusammenhang konnte im Mausmodell bestätigt werden (164). Wie bereits ausgeführt, können die ROS durch Oxidation der CaMKII diese aktivieren (13). Die oxidierte CaMKII kann in der Folge zu Vorhofflimmern beitragen (165). In dieser Arbeit konnte erstmals festgestellt werden, dass die atriale CaMKII bei Patienten mit einem OSAS verstärkt aktiv ist, was diesen Zusammenhang bestätigt. In einem neuartigen Mausmodell wurde bei gesunden Mäusen mittels des Füllstoffs Polytetrafluoroethylen (PTFE) die Zunge zum Anschwellen gebracht, um spontane nächtliche Apnoen auszulösen. Dies ermöglicht die isolierte Untersuchung von Folgeerkrankungen durch OSAS. Auch hier konnte beobachtet werden, dass mit steigendem AHI sowohl die CaMKII-Expression zunimmt, als auch die Herzfunktion abnimmt (166). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, so konnte ein möglicher Zusammenhang des Vorhandenseins eines OSAS mit der CaMKII-Expression ($P = 0,10$, Kollektiv mit funktionellen Daten) sowie der LVEF ($P = 0,02$, Gesamtkohorte) aufgezeigt werden. Interessanterweise scheint Estrogen eine protektive Funktion auszuüben, indem es die Bildung von ROS in Kardiozyten bei Ratten reduziert (167). Ratten, deren Ovarien entfernt wurden, wiesen eine erhöhte Expression und Aktivität der CaMKII auf, was durch einen Hormonersatz verhindert werden konnte (168). Auch beim Menschen konnte festgestellt werden, dass SBAS und zugehörige Komorbiditäten nach der Menopause sowie bei Frauen mit einem polyzystischen Ovarialsyndrom verstärkt vorkommen (169,170).

6.2.3 Die proarrhythmogene Wirkung der gesteigerten CaMKII-Aktivität unter OSAS

Es konnte also gezeigt werden, dass die CaMKII bei vorhandenem OSAS verstärkt aktiv ist und ein proarrhythmisches Potential birgt. Dieses kann im Wesentlichen auf zwei Systeme zurückgeführt werden, über den kardialen Kalziumhaushalt durch RyR2, sowie über den Natriumhaushalt durch den schnellen und langsamen Natriumstrom $I_{Na}/I_{Na,late}$.

Die CaMKII moduliert den Kalziumhaushalt der Herzmuskelzelle durch eine Phosphorylierung des RyR2, was zu einer verstärkten Aktivierung des Kanals führt (14,36,114). Die hierdurch entstehenden Ca^{2+} -sparks aktivieren durch kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung benachbarte RyR2. Dadurch werden wiederum die Kalziumreserven des SRs erschöpft, was die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen fördert (97,115,116,171). Durch das Ausschleusen des zytosolischen Kalziums aus der Zelle durch den NCX entsteht ein Netto depolarisierender Einwärtsstrom, welcher zu einem verfrühten Aktionspotential und damit zu einer späten Nachdepolarisation (DAD) führen kann (29,113). Die Frequenz der Ca^{2+} -sparks nimmt bei Patienten mit OSAS zu und steigt proportional mit steigendem AHI. Unter einer Behandlung mit dem selektiven CaMKII-Inhibitor AIP sank diese Frequenz, was die Rolle der CaMKII bei der Entstehung der Ca^{2+} -sparks unterstreicht (163).

Des Weiteren kann sich die CaMKII auch auf den Natriumhaushalt der Kardiozyten auswirken. Der schnelle Natriumstrom I_{Na} führt zu dem steilen Anstieg des Aktionspotentials und wird rasch wieder beendet. Der langsame Natriumstrom ($I_{Na,late}$) läuft hingegen kontinuierlich (172). In vivo konnte an Mausmodellen gezeigt werden, dass die CaMKII durch Modulation dieser Kanäle zu verlängerten QT- und QRS-Zeiten führen kann. Dies hat eine erhöhte Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien zur Folge (120). In unserer CONSIDER-AF Studie wurde diese proarrhythmogene I_{Na} -Dysregulation erstmalig in humanen atrialen Muskelzellen bei Patienten mit einer SBAS nachgewiesen. Diese Veränderungen konnten durch eine Inhibition von der CaMKII und von $I_{Na,late}$ beendet werden (140).

6.3 Limitationen der Arbeit

In dieser Studie wurde darauf geachtet, Patienten nach einem hohen Gütemaß nach standardisierten Zulassungskriterien auszuwählen und wichtige klinische Daten systemisch zu erfassen, um Fehlerquellen einer selektiven Patientenkohorte oder fehlende Informationen zu Komorbiditäten und Störvariablen zu vermeiden. Das Studiendesign ließ jedoch nicht zu, die Verteilung in Bezug auf verschiedene Datensätze zu bestimmen. So ist die Anzahl an Patienten mit einem OSAS für die verschiedenen klinischen Variablen nicht konstant. Die in unsere Studie eingeschlossenen Patienten unterliefen einer elektiven koronaren Bypass-Operation und wiesen dementsprechend verschiedene, oft multiple Komorbiditäten auf, wie beispielsweise eine arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes Mellitus, oder eine eingeschränkte Herzfunktion. Um den Einfluss dieser Komorbiditäten auf unsere Ergebnisse herauszufinden und den tatsächlichen Einfluss des OSAS auf die CaMKII-Aktivität zu ermitteln, führten wir multivariate Regressionen durch. In diese zogen wir das Alter, Geschlecht, BMI, das Vorhandensein eines Vorhofflimmerns, einer Herzinsuffizienz oder eines Diabetes Mellitus sowie den Kreatinin-Wert als Parameter der Nierenfunktion mit ein. Auch in Einbezug dieser Variablen konnte bei der Patientengruppe mit funktionellen Daten (welches ein Gütekriterium darstellte) das OSAS als ein signifikanter, unabhängiger Faktor für die Aktivität der CaMKII dienen. Dennoch handelt es sich um eine sehr heterogene Patientengruppe, sodass nicht alle potenziellen Störvariablen sicher ausgeschlossen werden konnten. Ein neues und vielversprechendes Forschungsmodell an Mäusen wurde von Lebek et al. deshalb bereits entwickelt und umgesetzt, welches ermöglicht, diese Confounder zu kontrollieren, indem an klinisch gesunden Mäusen durch eine Schwellung der Zunge nächtliche Apnoen und Hypopnoen ausgelöst werden können (166).

Als Methode für die Ermittlung der CaMKII-Expression wurden Western-Blots gewählt. Diese ist zwar gut etabliert, weist jedoch bekanntermaßen eine eingeschränkte Sensitivität im Vergleich zu anderen Verfahren der Proteinbestimmung, wie ELISA oder PCR-Tests, auf. Diese eingeschränkte Sensitivität ist auch bei der Bestimmung der CaMKII-Aktivität mittels eines HDAC4-CaMKII-Bindungsassays vorhanden. Die Methode des Bindungsassays ist noch nicht so etabliert wie der Western-Blot, konnte aber bisher erfolgreich zur Aktivitätsbestimmung der CaMKII eingesetzt werden. Die beiden Verfahren ähneln sich in ihrem Aufbau und gehen deshalb mit ähnlichen

Limitationen einher. Es liegt in der Natur beider Messverfahren, dass die verwendeten Antikörper nicht-spezifische Bindungen eingehen könnten, was die Ergebnisse leicht verfälschen könnte. Wie in dem Kapitel 4.2.1.8 dargestellt, wurden die Proteinbanden auf einen Röntgenfilm übertragen und mithilfe des Programms ImageLab 5.2 digitalisiert. Um die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Banden zu ermitteln, wurde deren Dichte mittels des Programms ImageJ gemessen. Diese Messung erfolgt durch die Berechnung der durchschnittlichen Intensität der Pixel innerhalb des definierten Bereichs. Diese optische Messung ist fehleranfällig. Es wurde versucht, diese Anfälligkeit möglichst gering zu halten, indem von jeder Bande der Hintergrund abgezogen wurde sowie die Banden innerhalb einer Versuchsreihe auf eine Kontrollbande genormt wurden. Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist, dass mehrere Versuchsreihen durchgeführt wurden. Damit diese Ergebnisse untereinander vergleichbar werden und miteinander ausgewertet werden konnten, wurde dieselbe Kontrollprobe in jeder Messreihe mitbestimmt, mit der Annahme, dass die Proteinkonzentration der Kontrollprobe in jeder Reihe gleich ist. Eine geringe Variation dieser Kontrollprobe innerhalb der Reihen könnte also zu einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse führen. Als weitere mögliche Fehlerquelle sind zuletzt geringe Abweichungen in der Durchführung der Messungen zu nennen. Um diese zu minimieren, wurde das Protokoll (siehe „Material und Methoden“) stets eingehalten, zudem sollte auch hier die Normierung auf die Kontrollprobe diese Abweichungen reduzieren.

Auch die Probengewinnung kann bereits zu einer möglichen Fehlerquelle führen. Da die Biopsien nicht mehr durchblutet werden und an der Oberfläche mit der Luft in Berührung kommen, kann es zu Proteindenaturierung und Reaktionen mit Sauerstoff und Stickstoff kommen. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde darauf geachtet, die Proben rasch zu reinigen und in einer eiskalten Custodiol®-Lösung zu kühlen. Das in dieser Lösung enthaltene Butanedione Monoxime hielt die Kardioplegie für das Gewebe aufrecht, bis sie bei -80°C eingefroren werden konnten.

6.4 Ausblick: Inhibition der CaMKII

Das OSAS geht mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen einher, dennoch sind die aktuellen Therapiemöglichkeiten beschränkt. Die Therapie mittels CPAP wird von Patienten nur schlecht angenommen (71). Während sich hierunter zwar die Anzahl an Apnoen verringern lässt, konnte kürzlich in zwei Studien festgestellt werden, dass CPAP weder zu einer Verbesserung des Vorhofflimmerns bei Patienten ohne eine Pulmonalvenenisolation (PVI) führt (173), noch das Wiederauftreten von Vorhofflimmern nach einer PVI unter CPAP verringert wird (174). Wie in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, spielt die CaMKII eine wichtige Rolle in der Entstehung von Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz bei Patienten mit OSAS. Hiermit könnte eine Inhibition der CaMKII eine mögliche Therapieoption für solche Folgeerkrankungen bieten. Dies konnte beispielsweise von Kreuzer et al demonstriert werden, indem durch Ausschalten der kardiologischen CaMKII das negative Remodeling des Herzmuskels aufgehalten und sogar teilweise reversiert werden konnte (175). Hiermit konnte erstmalig festgestellt werden, dass eine CaMKII-Inhibition auch zu therapeutischen Zwecken genutzt werden könnte. Diese stellt sich aufgrund der Komplexität der Aktivierung, Modulation und Vernetzung der CaMKII als schwierig dar. Aus diesen Gründen gestaltet sich die Entwicklung von CaMKII-Inhibitoren für die Anwendung am Menschen schwierig (176). Der in der Forschung vielfach angewendete CaMKII-Inhibitor KN-93 wurde beispielsweise nicht für die therapeutische Anwendung konzipiert und verfügt deshalb über eine geringe Potenz (177–179) und Selektivität. So inhibiert er ebenfalls die CaMKI und CaMKIV (180,181) sowie Ionenkanäle wie den L-Typ Kalziumkanal (178,182), was zu ungewollten Nebenwirkungen führen kann und KN-93 damit ungeeignet für therapeutische Zwecke macht. Es wurden jedoch mehrere vielversprechende neue und selektive CaMKII-Inhibitoren entwickelt. Der Inhibitor RA608 ist im Gegensatz zu KN-93 ATP-kompetitiv, was ihm ermöglicht, auch aktive CaMKII zu inhibieren. Zudem weist der Inhibitor eine Selektivität für die kardiale CaMKII δ und CaMKII γ sowie eine lange Halbwertszeit und hohe Bioverfügbarkeit auf (183). In humanem kardialem Gewebe und in vivo bei Mäusen konnte Mustroph et al. eine reduzierte Progression von HI und eine reduzierte Anfälligkeit von VHF feststellen (183). Ebenso ist der neue CaMKII-Inhibitor AS105 ATP-kompetitiv und konnte sowohl in humanem Vorhofgewebe als auch in ventrikulärem Gewebe von CaMKII δ c-überexprimierenden Mäusen den ungewollten

Ca²⁺-Austritt aus dem SR deutlich senken, was eine verbesserte systolische Kontraktion ermöglichte (184). Ein weiterer ATP-kompetitiver CaMKII-Inhibitor ist GS-680, welcher ebenfalls das SR- Ca²⁺-Leck reduziert und damit in humanem Vorhofgewebe eine gute antiarrhythmische Wirkung zeigt (185). Dies geht jedoch mit einer reduzierten atrialen Kontraktion einher. Der Inhibitor weist eine gute CaMKII δ -Selektivität auf, dockt jedoch mit deutlich geringerer Potenz auch an CaMKII α und β an (185).

Während selektive CaMKII-Inhibitoren aktuell noch keine therapeutische Anwendung gefunden haben, sind die SGLT2 (Sodium-Glukose-Transporter 2)-Inhibitoren bereits bewährte Medikamente. Sie wirken sich bekanntermaßen positiv auf das kardiale Remodeling aus, reduzieren den Blutdruck und können zu einer Gewichtsreduktion führen. Kürzlich konnte ebenfalls herausgefunden werden, dass der SGLT2-Hemmer Dapagliflozin die Inzidenz von VHF bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 reduziert (186). Möglicherweise kann dies auf eine Hemmung der CaMKII zurückgeführt werden (187). Während gezeigt werden konnte, dass der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin myokardialen oxydativen Stress reduzieren kann (188), ist der genaue Wirkmechanismus der CaMKII-Inhibition durch SGLT2-Hemmer noch unklar (187).

7 Zusammenfassung

Es konnte in zahlreichen Studien bereits herausgefunden werden, dass Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II zur Entstehung von Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz beitragen kann. Ebenso wurde bei Patienten mit einem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom ein statistischer Anstieg dieser Erkrankungen beobachtet. Eine Aktivierung der CaMKII durch das OSAS ist durch verschiedene Aktivierungswege, wie durch die Bildung radikaler Sauerstoffspezies, oder durch Aktivierung des Sympathikus denkbar. In dieser Arbeit wurde nun anhand von humanem atrialen Gewebe mithilfe von Western-Blots die CaMKII-Expression und unter Verwendung von HDAC4-CaMKII-Bindungsassays die CaMKII-Aktivität gemessen. Ich konnte herausfinden, dass die CaMKII-Aktivität in der univariaten linearen Regressionsanalyse signifikant mit dem Vorhandensein einer OSAS assoziiert ist ($P = 0,03$). Ebenso konnte ich einen starken Trend zu einer gesteigerten CaMKII-Expression bei Patienten mit einem OSAS nachweisen ($P = 0,10$). Mittels Anwendung der multivariaten Analyse konnte ich zeigen, dass der Zusammenhang zwischen OSAS und CaMKII-Aktivität unabhängig von zahlreichen klinischen Einflussgrößen wie beispielsweise dem Alter und Geschlecht, BMI, Diabetes sowie kardiale und renale Vorerkrankungen war ($P = 0,04$). Durch Ausschluss der wichtigsten Störvariablen konnte dieser Zusammenhang bestätigt und untermauert werden. Damit lässt sich schlussfolgern, dass die CaMKII infolge einer vorhandenen Schlafapnoe aktiver ist, was einen wichtigen Hinweis auf eine Beteiligung der CaMKII bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns und der Herzinsuffizienz bei Patienten mit einem OSAS bietet. Dies könnte damit neue Wege der Behandlung von Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz unter OSAS ermöglichen. Eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit stellt hierbei eine spezifische CaMKII-Inhibition dar. Hierzu befinden sich bereits CaMKII-Inhibitoren in präklinischer Entwicklung.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Parameter und Funktionen der Polysomnographie.....	16
Tabelle 4-1: Lysepuffer.....	33
Tabelle 4-2: BCA-Lösung.....	33
Tabelle 4-3: GST-Puffer.....	34
Tabelle 4-4: 5x Blue Buffer (Laemmlipuffer).....	35
Tabelle 4-5: SDS-Polyacrylamidgel 12,5%.....	36
Tabelle 4-6: 4x Tris/SDS pH 8,8.....	36
Tabelle 4-7: Transferpuffer.....	37
Tabelle 4-8: TBS-T.....	38
Tabelle 4-9: Primärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Aktivität.....	38
Tabelle 4-10: Sekundärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Aktivität.....	38
Tabelle 4-11: SDS-Polyacrylamidgel 8%.....	42
Tabelle 4-12: Primärantikörper für die CaMKII-Expression.....	43
Tabelle 4-13: Sekundärantikörper für die Bestimmung der CaMKII-Expression.....	43
Tabelle 5-1: Baseline Characteristics für die Gesamtkohorte und für Patienten mit funktionellen Daten.....	49
Tabelle 5-2: Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität als Funktion der aufgeführten Parameter bei Patienten mit funktionellen Daten.....	60
Tabelle 5-3: Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität als Funktion der aufgeführten Parameter bei Patienten mit funktionellen Daten.....	61
Tabelle 5-4: Univariate lineare Regressionen der CaMKII-Aktivität als Funktion der aufgeführten Parameter bei der Gesamtkohorte.....	62
Tabelle 5-5: Multivariate lineare Regression der CaMKII-Aktivität als Funktion der aufgeführten Parameter bei der Gesamtkohorte.....	63

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Schematischer Ausschnitt eines Kardiozyten.....	8
Abbildung 3-2: Aktionspotential des Kardiomyozyten.....	10
Abbildung 3-3: Der Ryanodin-Rezeptor Typ 2 und die SERCA2a.....	12
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung verschiedener Schweregrade von Obstruktionen.....	14
Abbildung 3-5: Folgen des oxidativen Stresses.....	17
Abbildung 3-6: Aufbau der CaMKII.....	20
Abbildung 3-7: Aktivierungswege der CaMKII.....	21
Abbildung 3-8: Aktivierung der CaMKII durch Oxidation.....	22
Abbildung 3-9: Aktivierung der CaMKII durch Hyperglykämie.....	23
Abbildung 4-1: Studiendesign von CONSIDER-AF.....	28
Abbildung 4-2: Erstellte Eichkurve anhand der BCA-Proteinbestimmung.....	32
Abbildung 4-3: Anhand der aus Abbildung 4-2 erstellten Daten berechnete Verdünnung, um die Proteinkonzentrationen der Proben zu vereinheitlichen.....	32

Abbildung 4-4: Beispielhafte Originalabbildung der Banden von an HDAC4-gebundener CaMKII	39
Abbildung 4-5: Exemplarisch dargestellte durch ImageJ generierte Werte der Signaldichte der CaMKII-Expression, der dazugehörigen GAPDH sowie den jeweiligen Hintergründen	40
Abbildung 5-1: Studienpopulation	46
Abbildung 5-2: Originalabbildung der Proteinbanden	52
Abbildung 5-3: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms	53
Abbildung 5-4: Analyse der Korrelation des Apnoe-Hypopnoe-Index und der CaMKII-Aktivität bei Patienten mit funktionellen Daten.....	54
Abbildung 5-5: Analyse der Korrelation des Oxygen Desaturation Index und CaMKII-Aktivität bei Patienten mit funktionellen Daten.....	55
Abbildung 5-6: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz und der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei Patienten mit funktionellen Daten	56
Abbildung 5-7: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression und relativen Aktivität in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms bei Patienten mit funktionellen Daten.	57
Abbildung 5-8: Darstellung der Verteilung der CaMKII-Expression, bzw. der relativen CaMKII-Aktivität in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines Schlafapnoe-Syndroms beim Gesamt-Kollektiv.....	58
Abbildung 5-9: Darstellung der Verteilung der relativen CaMKII-Aktivität und der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei Patienten mit funktionellen Daten	59
Abbildung 6-1: Pathogenese von kardialen Folgeerkrankungen unter OSAS	70

8.3 Literaturverzeichnis

1. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 29. April 1993;328(17):1230–5.
2. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol.* 1. Mai 2013;177(9):1006–14.
3. Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE, u. a. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation.* 27. Juli 2004;110(4):364–7.
4. Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, u. a. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 6. Februar 2007;49(5):565–71.

5. Linz D, McEvoy RD, Cowie MR, Somers VK, Nattel S, Lévy P, u. a. Associations of Obstructive Sleep Apnea With Atrial Fibrillation and Continuous Positive Airway Pressure Treatment: A Review. *JAMA Cardiol.* 1. Juni 2018;3(6):532–40.
6. Chan J, Sanderson J, Chan W, Lai C, Choy D, Ho A, u. a. Prevalence of sleep-disordered breathing in diastolic heart failure. *Chest.* Juni 1997;111(6):1488–93.
7. Linz D, Schotten U, Neuberger HR, Böhm M, Wirth K. Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation. *Heart Rhythm.* September 2011;8(9):1436–43.
8. Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *Eur Respir J.* Juni 2013;41(6):1439–51.
9. Linz D, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Wagner M, Ewen S, u. a. Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Oktober 2013;62(4):767–74.
10. Salejee I, Tarasiuk A, Reder I, Scharf SM. Chronic upper airway obstruction produces right but not left ventricular hypertrophy in rats. *Am Rev Respir Dis.* November 1993;148(5):1346–50.
11. Marrone O, Bellia V, Ferrara G, Milone F, Romano L, Salvaggio A, u. a. Transmural pressure measurements. Importance in the assessment of pulmonary hypertension in obstructive sleep apneas. *Chest.* Februar 1989;95(2):338–42.
12. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, u. a. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation.* 7. September 2010;122(10):993–1003.
13. Erickson JR, Joiner M ling A, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, u. a. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2. Mai 2008;133(3):462–74.
14. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, u. a. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res.* 4. März 2011;108(5):555–65.
15. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, u. a. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late I_{Na}. *Cardiovasc Res.* 1. Juli 2014;103(1):168–77.
16. Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, u. a. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res.* 15. Oktober 2004;95(8):798–806.
17. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* Februar 1998;37(2):279–89.

18. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, u. a. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2. April 2010;106(6):1134–44.
19. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 2011;51(4):468–73.
20. Mesubi OO, Anderson ME. Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovasc Res.* 1. April 2016;109(4):542–57.
21. Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:107–27.
22. Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* 2. Aufl. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001.
23. Hong T, Yang H, Zhang SS, Cho HC, Kalashnikova M, Sun B, u. a. Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nat Med.* Juni 2014;20(6):624–32.
24. Zima AV, Bovo E, Mazurek SR, Rochira JA, Li W, Terentyev D. Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure. *Pflugers Arch.* Juni 2014;466(6):1129–37.
25. Hanson J, Huxley HE. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature.* 19. September 1953;172(4377):530–2.
26. Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J.* 1994;21(1):30–41.
27. Delpón E, Valenzuela C, Tamargo J. Blockade of cardiac potassium and other channels by antihistamines. *Drug Saf.* 1999;21 Suppl 1:11–8; discussion 81-87.
28. Doerr T, Denger R, Doerr A, Trautwein W. Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. *Pflugers Arch.* Mai 1990;416(3):230–7.
29. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 10. Januar 2002;415(6868):198–205.
30. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res.* 25. April 2014;114(9):1483–99.
31. Dobrev D, Wehrens XHT. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ Res.* 11. April 2014;114(8):1311–9; discussion 1319.
32. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol.* August 2004;37(2):417–29.

33. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, u. a. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 16. Januar 2001;103(2):196–200.
34. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, u. a. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2. Juli 2002;106(1):69–74.
35. Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:69–98.
36. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*. 2. April 2004;94(6):e61-70.
37. Erkasap N. SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new? *Anadolu Kardiyol Derg AKD Anatol J Cardiol*. Juli 2007;7 Suppl 1:43–6.
38. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J*. August 2012;33(15):1870–7.
39. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. August 2011;121(8):2955–68.
40. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 10. Januar 2002;415(6868):219–26.
41. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, u. a. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 14. Januar 2014;129(2):145–56.
42. Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res*. 15. Januar 2008;77(2):285–92.
43. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genís A, Roura S, Rodriguez Font E, Arís A, u. a. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation*. 14. September 2004;110(11):1358–63.
44. Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. Januar 1996;270(1 Pt 1):C148-159.
45. Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res*. 27. Oktober 2000;87(9):774–80.

46. Arnaud C, Bochaton T, Pépin JL, Belaidi E. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences: Pathophysiological mechanisms. *Arch Cardiovasc Dis*. Mai 2020;113(5):350–8.
47. Dorow P, Thalhofer S. [Sleep apnea. Pathophysiology, diagnosis, therapy]. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 22. Dezember 1992;86(23–24):1161–6.
48. Iber C. Sleep-related breathing disorders. *Neurol Clin*. November 2005;23(4):1045–57, vi–vii.
49. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, Friedman N, Malhotra A, Patil SP, u. a. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15. Juni 2009;5(3):263–76.
50. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D, Tobback N, u. a. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir Med*. April 2015;3(4):310–8.
51. Abe H, Takahashi M, Yaegashi H, Eda S, Tsunemoto H, Kamikozawa M, u. a. Efficacy of continuous positive airway pressure on arrhythmias in obstructive sleep apnea patients. *Heart Vessels*. Januar 2010;25(1):63–9.
52. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol*. Juni 1978;44(6):931–8.
53. Borak J, Cieśliski JK, Koziej M, Matuszewski A, Zieliński J. Effects of CPAP treatment on psychological status in patients with severe obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res*. Juni 1996;5(2):123–7.
54. Young T, Peppard P, Palta M, Hla KM, Finn L, Morgan B, u. a. Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med*. 11. August 1997;157(15):1746–52.
55. Anstead M, Phillips B. The spectrum of sleep-disordered breathing. *Respir Care Clin N Am*. September 1999;5(3):363–77, viii.
56. Lavie P. Incidence of sleep apnea in a presumably healthy working population: a significant relationship with excessive daytime sleepiness. *Sleep*. 1983;6(4):312–8.
57. Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Hedner J, Cullen S, Schneider H, u. a. Occurrence and correlates of sleep disordered breathing in the Australian town of Busselton: a preliminary analysis. *Sleep*. Dezember 1993;16(8 Suppl):S3-5.
58. Bresnitz EA, Goldberg R, Kosinski RM. Epidemiology of obstructive sleep apnea. *Epidemiol Rev*. 1994;16(2):210–27.
59. Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*. Februar 2006;29(1):109–17.

60. Vgontzas AN, Bixler EO, Chrousos GP. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev.* Juni 2005;9(3):211–24.
61. Stuck BA, Arzt M, Fietze I, Galetke W, Hein H, Heiser C, u. a. Teil-Aktualisierung S3-Leitlinie Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Erwachsenen. *Somnologie.* 1. September 2020;24(3):176–208.
62. Winterholler M. Schlafmedizin in der Neurologie. *Neurophysiol-Labor.* 1. September 2016;38(3):97–109.
63. Ohayon MM, Guilleminault C, Priest RG, Caulet M. Snoring and breathing pauses during sleep: telephone interview survey of a United Kingdom population sample. *BMJ.* 22. März 1997;314(7084):860–3.
64. Durán J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med.* März 2001;163(3 Pt 1):685–9.
65. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, u. a. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primer.* 25. Juni 2015;1:15015.
66. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev.* April 2015;20:27–45.
67. Practice parameters for the treatment of obstructive sleep apnea in adults: the efficacy of surgical modifications of the upper airway. Report of the American Sleep Disorders Association. *Sleep.* Februar 1996;19(2):152–5.
68. Davies RJ, Ali NJ, Stradling JR. Neck circumference and other clinical features in the diagnosis of the obstructive sleep apnoea syndrome. *Thorax.* Februar 1992;47(2):101–5.
69. Fava C, Montagnana M, Favaloro EJ, Guidi GC, Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost.* April 2011;37(3):280–97.
70. Shukla A, Aizer A, Holmes D, Fowler S, Park DS, Bernstein S, u. a. Effect of Obstructive Sleep Apnea Treatment on Atrial Fibrillation Recurrence: A Meta-Analysis. *JACC Clin Electrophysiol.* 2015;1(1–2):41–51.
71. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, u. a. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med.* 8. September 2016;375(10):919–31.
72. Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K, Angermann C, d'Ortho MP, Erdmann E, u. a. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med.* 17. September 2015;373(12):1095–105.
73. May AM, Van Wagoner DR, Mehra R. OSA and Cardiac Arrhythmogenesis: Mechanistic Insights. *Chest.* Januar 2017;151(1):225–41.

74. Cahali MB. Lateral pharyngoplasty: a new treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *The Laryngoscope*. November 2003;113(11):1961–8.
75. Maniaci A, Iannella G, Cocuzza S, Vicini C, Magliulo G, Ferlito S, u. a. Oxidative Stress and Inflammation Biomarker Expression in Obstructive Sleep Apnea Patients. *J Clin Med*. 13. Januar 2021;10(2):277.
76. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 29. September 2017;16(1):120.
77. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*. 4. September 2019;11(9):2090.
78. Ballester E, Badia JR, Hernández L, Carrasco E, de Pablo J, Fornas C, u. a. Evidence of the effectiveness of continuous positive airway pressure in the treatment of sleep apnea/hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. Februar 1999;159(2):495–501.
79. Verse T, Pirsig W, Stuck BA, Hörmann K, Maurer JT. Recent developments in the treatment of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Med Drugs Devices Interv*. 2003;2(2):157–68.
80. Phillips CL, Yang Q, Williams A, Roth M, Yee BJ, Hedner JA, u. a. The effect of short-term withdrawal from continuous positive airway pressure therapy on sympathetic activity and markers of vascular inflammation in subjects with obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res*. Juni 2007;16(2):217–25.
81. Hudmon A, Schulman H. Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:473–510.
82. Zhang W, Si L yi. Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) and hypertension: pathogenic mechanisms and possible therapeutic approaches. *Ups J Med Sci*. November 2012;117(4):370–82.
83. Anter E, Di Biase L, Contreras-Valdes FM, Gianni C, Mohanty S, Tschabrunn CM, u. a. Atrial Substrate and Triggers of Paroxysmal Atrial Fibrillation in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. November 2017;10(11):e005407.
84. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Müller A, Verse T, u. a. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. August 2002;166(4):501–9.
85. Tobaldini E, Costantino G, Solbiati M, Cogliati C, Kara T, Nobili L, u. a. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. *Neurosci Biobehav Rev*. März 2017;74(Pt B):321–9.
86. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest*. Januar 2015;147(1):266–74.

87. Song JQ, Jiang LY, Fu CP, Wu X, Liu ZL, Xie L, u. a. Heterozygous SOD2 deletion deteriorated chronic intermittent hypoxia-induced lung inflammation and vascular remodeling through mtROS-NLRP3 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin.* September 2020;41(9):1197–207.
88. Bosi M, Milioli G, Fanfulla F, Tomassetti S, Ryu JH, Parrino L, u. a. OSA and Prolonged Oxygen Desaturation During Sleep are Strong Predictors of Poor Outcome in IPF. *Lung.* Oktober 2017;195(5):643–51.
89. Neumann K, Arzt M, Heid I, Böger C, Stadler S. Sleep-Disordered Breathing Is Associated with Metabolic Syndrome in Outpatients with Diabetes Mellitus Type 2. *J Diabetes Res.* 2019;2019:8417575.
90. Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol Baltim Md.* Februar 2003;17(2):183–92.
91. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417–45.
92. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* August 2002;34(8):919–39.
93. Rellos P, Pike ACW, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, u. a. Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol.* 27. Juli 2010;8(7):e1000426.
94. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 25. Oktober 1989;264(30):17907–12.
95. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta.* 10. März 1994;1221(1):89–101.
96. Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, u. a. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem.* 11. Januar 2002;277(2):1261–7.
97. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, u. a. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 2. Mai 2003;92(8):912–9.
98. Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol.* 2014;5:59.

99. Schulman H, Greengard P. Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by „calcium-dependent regulator“. *Proc Natl Acad Sci U S A*. November 1978;75(11):5432–6.
100. Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(4):29.
101. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 15. Juni 2002;364(Pt 3):593–611.
102. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dezember 1986;83(24):9497–501.
103. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*. 22. Mai 1992;256(5060):1199–202.
104. Ishida A, Sueyoshi N, Shigeri Y, Kameshita I. Negative regulation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases. *Br J Pharmacol*. Juni 2008;154(4):729–40.
105. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, u. a. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 17. Oktober 2013;502(7471):372–6.
106. Erickson JR, Nichols CB, Uchinoumi H, Stein ML, Bossuyt J, Bers DM. S-Nitrosylation Induces Both Autonomous Activation and Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II δ . *J Biol Chem*. 16. Oktober 2015;290(42):25646–56.
107. Curran J, Tang L, Roof SR, Velmurugan S, Millard A, Shonts S, u. a. Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. *PLoS One*. 2014;9(2):e87495.
108. Gutierrez DA, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2013;100(3):392–401.
109. Jian Z, Han H, Zhang T, Puglisi J, Izu LT, Shaw JA, u. a. Mechanochemotransduction during cardiomyocyte contraction is mediated by localized nitric oxide signaling. *Sci Signal*. 18. März 2014;7(317):ra27.
110. Muströph J, Sag CM, Bähr F, Schmidtman AL, Gupta SN, Dietz A, u. a. Loss of CASK Accelerates Heart Failure Development. *Circ Res*. 16. April 2021;128(8):1139–55.

111. Kushnir A, Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, Marks AR. Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. Juni 2010;107(22):10274–9.
112. Wu Y, Gao Z, Chen B, Koval OM, Singh MV, Guan X, u. a. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. April 2009;106(14):5972–7.
113. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, u. a. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 1. Mai 2012;125(17):2059–70.
114. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*. 15. Juni 1991;266(17):11144–52.
115. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res*. 2. Mai 2003;92(8):904–11.
116. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*. Januar 1977;57(1):71–108.
117. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 9. Juli 1999;85(1):38–46.
118. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, u. a. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 9. Februar 1999;99(5):641–8.
119. Mattiazzi A, Kranias EG. CaMKII regulation of phospholamban and SR Ca²⁺ load. *Heart Rhythm*. Mai 2011;8(5):784–7.
120. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, u. a. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. Dezember 2006;116(12):3127–38.
121. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res*. 5. Juni 2015;116(12):1956–70.
122. Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, u. a. Enhanced late I_{Na} induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol*. November 2014;76:94–105.
123. Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, u. a. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. Juni 2009;2(3):285–94.

124. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca²⁺-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*. November 1994;75(5):854–61.
125. Shugg T, Johnson DE, Shao M, Lai X, Witzmann F, Cummins TR, u. a. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of IKs during sustained β -adrenergic receptor stimulation. *Heart Rhythm*. Juni 2018;15(6):895–904.
126. Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J*. 15. September 1999;18(18):5099–107.
127. Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res*. 6. Januar 2006;98(1):15–24.
128. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. Juli 2006;116(7):1853–64.
129. Tafelmeier M, Knapp M, Lebek S, Floerchinger B, Camboni D, Wittmann S, u. a. Rationale and design of the CONSIDER AF study. *Somnologie*. 1. März 2019;23(1):17–28.
130. Rashid NH, Zaghi S, Scapuccin M, Camacho M, Certal V, Capasso R. The Value of Oxygen Desaturation Index for Diagnosing Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review. *The Laryngoscope*. Februar 2021;131(2):440–7.
131. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. Oktober 1985;150(1):76–85.
132. Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*. Januar 2002;9(1):3–16.
133. McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 2. November 2000;408(6808):106–11.
134. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*. September 2001;21(18):6312–21.
135. Arzt M, Woehrle H, Oldenburg O, Graml A, Suling A, Erdmann E, u. a. Prevalence and Predictors of Sleep-Disordered Breathing in Patients With Stable Chronic Heart Failure: The SchlaHF Registry. *JACC Heart Fail*. Februar 2016;4(2):116–25.
136. Couchonnal LF, Anderson ME. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiol Bethesda Md*. Juni 2008;23:151–9.

137. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, u. a. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17. Februar 2009;106(7):2342–7.
138. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, u. a. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* Mai 2000;105(10):1395–406.
139. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, u. a. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest.* Mai 2009;119(5):1230–40.
140. Lebek S, Pichler K, Reuthner K, Trum M, Tafelmeier M, Muströph J, u. a. Enhanced CaMKII-Dependent Late I_{Na} Induces Atrial Proarrhythmic Activity in Patients With Sleep-Disordered Breathing. *Circ Res.* 28. Februar 2020;126(5):603–15.
141. Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, u. a. Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation.* 18. August 2015;132(7):567–77.
142. Herren AW, Weber DM, Rigor RR, Margulies KB, Phinney BS, Bers DM. CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *J Proteome Res.* 1. Mai 2015;14(5):2298–311.
143. Abboud F, Kumar R. Obstructive sleep apnea and insight into mechanisms of sympathetic overactivity. *J Clin Invest.* April 2014;124(4):1454–7.
144. Iwasaki YK, Kato T, Xiong F, Shi YF, Naud P, Maguy A, u. a. Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model. *J Am Coll Cardiol.* 11. November 2014;64(19):2013–23.
145. Tkacova R, Rankin F, Fitzgerald FS, Floras JS, Bradley TD. Effects of continuous positive airway pressure on obstructive sleep apnea and left ventricular afterload in patients with heart failure. *Circulation.* 24. November 1998;98(21):2269–75.
146. Dimitri H, Ng M, Brooks AG, Kuklik P, Stiles MK, Lau DH, u. a. Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* März 2012;9(3):321–7.
147. Maeno KI, Kasai T, Kasagi S, Kawana F, Ishiwata S, Ohno M, u. a. Relationship between atrial conduction delay and obstructive sleep apnea. *Heart Vessels.* September 2013;28(5):639–45.
148. Hegner P, Lebek S, Tafelmeier M, Camboni D, Schopka S, Schmid C, u. a. Sleep-disordered breathing is independently associated with reduced atrial connexin 43 expression. *Heart Rhythm.* Dezember 2021;18(12):2187–94.

149. Severs NJ, Coppens SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 1. Mai 2004;62(2):368–77.
150. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 1. Oktober 2008;80(1):9–19.
151. Gemel J, Levy AE, Simon AR, Bennett KB, Ai X, Akhter S, u. a. Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* November 2014;76:159–68.
152. Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Inoue N, Matsumoto T, Yamada J, u. a. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am J Cardiol.* 15. März 2003;91(6):678–83.
153. Nattel S, Heijman J, Zhou L, Dobrev D. Molecular Basis of Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: A Translational Perspective. *Circ Res.* 19. Juni 2020;127(1):51–72.
154. Buchner S, Satzler A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, u. a. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* Januar 2014;35(3):192–9.
155. Fisser C, Götz K, Hetzenecker A, Debl K, Zeman F, Hamer OW, u. a. Obstructive sleep apnoea but not central sleep apnoea is associated with left ventricular remodelling after acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* Juli 2021;110(7):971–82.
156. Hohl M, Linz B, Böhm M, Linz D. Obstructive sleep apnea and atrial arrhythmogenesis. *Curr Cardiol Rev.* November 2014;10(4):362–8.
157. Sascău R, Zota IM, Stătescu C, Boișteanu D, Roca M, Maștaleru A, u. a. Review of Echocardiographic Findings in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Can Respir J.* 2018;2018:1206217.
158. Gerds E, Wachtell K, Omvik P, Otterstad JE, Oikarinen L, Boman K, u. a. Left atrial size and risk of major cardiovascular events during antihypertensive treatment: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension trial. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Februar 2007;49(2):311–6.
159. Hoit BD. Left atrial size and function: role in prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 18. Februar 2014;63(6):493–505.
160. Wester M, Pec J, Lebek S, Fisser C, Debl K, Hamer O, u. a. Sleep-Disordered Breathing Is Associated With Reduced Left Atrial Strain Measured by Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients After Acute Myocardial Infarction. *Front Med.* 2022;9:759361.
161. Lebek S, Wester M, Pec J, Poschenrieder F, Tafelmeier M, Fisser C, u. a. Abnormal P-wave terminal force in lead V1 is a marker for atrial electrical

- dysfunction but not structural remodelling. *ESC Heart Fail.* Oktober 2021;8(5):4055–66.
162. Ye L, Qian Y, Li Q, Fang S, Yang Z, Tan Y, u. a. Serum Romo1 is significantly associated with disease severity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath Schlaf Atm.* September 2018;22(3):743–8.
 163. Arzt M, Drzymalski MA, Ripfel S, Meindl S, Biedermann A, Durczok M, u. a. Enhanced Cardiac CaMKII Oxidation and CaMKII-Dependent SR Ca Leak in Patients with Sleep-Disordered Breathing. *Antioxid Basel Switz.* 8. Februar 2022;11(2):331.
 164. Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, u. a. NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 2014;75:206–15.
 165. Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N, u. a. Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation.* 15. Oktober 2013;128(16):1748–57.
 166. Lebek S, Hegner P, Schach C, Reuthner K, Tafelmeier M, Maier LS, u. a. A novel mouse model of obstructive sleep apnea by bulking agent-induced tongue enlargement results in left ventricular contractile dysfunction. *PLoS One.* 2020;15(12):e0243844.
 167. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 11. Juni 2010;106(11):1681–91.
 168. Ma Y, Cheng WT, Wu S, Wong TM. Oestrogen confers cardioprotection by suppressing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Br J Pharmacol.* Juli 2009;157(5):705–15.
 169. Vgontzas AN, Legro RS, Bixler EO, Grayev A, Kales A, Chrousos GP. Polycystic ovary syndrome is associated with obstructive sleep apnea and daytime sleepiness: role of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* Februar 2001;86(2):517–20.
 170. Dancey DR, Hanly PJ, Soong C, Lee B, Hoffstein V. Impact of menopause on the prevalence and severity of sleep apnea. *Chest.* Juli 2001;120(1):151–5.
 171. Erickson JR, Patel R, Ferguson A, Bossuyt J, Bers DM. Fluorescence resonance energy transfer-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation in intact cardiomyocytes. *Circ Res.* 16. September 2011;109(7):729–38.
 172. Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am J Physiol.* April 1979;236(4):H561-567.

173. Traaen GM, Aakerøy L, Hunt TE, Øverland B, Bendz C, Sande LØ, u. a. Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Arrhythmia in Atrial Fibrillation and Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. September 2021;204(5):573–82.
174. Hunt TE, Traaen GM, Aakerøy L, Bendz C, Øverland B, Akre H, u. a. Effect of continuous positive airway pressure therapy on recurrence of atrial fibrillation after pulmonary vein isolation in patients with obstructive sleep apnea: A randomized controlled trial. *Heart Rhythm*. September 2022;19(9):1433–41.
175. Kreusser MM, Lehmann LH, Wolf N, Keranov S, Jungmann A, Gröne HJ, u. a. Inducible cardiomyocyte-specific deletion of CaM kinase II protects from pressure overload-induced heart failure. *Basic Res Cardiol*. November 2016;111(6):65.
176. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol*. 2014;5:21.
177. Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, u. a. The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 31. Dezember 1991;181(3):968–75.
178. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, u. a. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*. Dezember 1998;287(3):996–1006.
179. Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. April 2006;317(1):292–9.
180. Mochizuki H, Ito T, Hidaka H. Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase V from rat cerebrum. *J Biol Chem*. 25. April 1993;268(12):9143–7.
181. Enslin H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR. Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 3. Juni 1994;269(22):15520–7.
182. Li G, Hidaka H, Wollheim CB. Inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels and insulin secretion in HIT cells by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-62: comparison with antagonists of calmodulin and L-type Ca²⁺ channels. *Mol Pharmacol*. September 1992;42(3):489–488.
183. Mustroph J, Drzymalski M, Baier M, Pabel S, Biedermann A, Memmel B, u. a. The oral Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor RA608 improves contractile function and prevents arrhythmias in heart failure. *ESC Heart Fail*. Oktober 2020;7(5):2871–83.

184. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, u. a. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* Februar 2018;115:73–81.
185. Lebek S, Plößl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lücht CM, u. a. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol.* Mai 2018;118:159–68.
186. Zelniker TA, Bonaca MP, Furtado RHM, Mosenzon O, Kuder JF, Murphy SA, u. a. Effect of Dapagliflozin on Atrial Fibrillation in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Insights From the DECLARE-TIMI 58 Trial. *Circulation.* 14. April 2020;141(15):1227–34.
187. Trum M, Wagner S, Maier LS, Mustroph J. CaMKII and GLUT1 in heart failure and the role of gliflozins. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1. Juni 2020;1866(6):165729.
188. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, u. a. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol.* 2. Februar 2019;18(1):15.

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, welche diese Arbeit möglich gemacht haben:

Allen voran bei Prof. Dr. Lars Maier für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Lehrstuhl zu beginnen. Ich bedanke mich auch bei meinem Freund und ehemaligen Kommilitonen Simon Lebek, welcher als leidenschaftlicher Forscher und Kardiologe mich auf das Thema dieser Arbeit aufmerksam gemacht und mir die Stelle vermittelt hat. Auch während der Arbeit stand er stets mit Rat und Tat zur Seite, sei es bei der Durchführung der Versuchsreihen, bei Unklarheiten, oder bei Instruktionen, wie die Statistikprogramme SPSS und PRISM zu verwenden sind.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit, sondern auch für die langen Abende in denen Fragen zum Verfassen der Arbeit geklärt und über die (Patho-)Physiologie des Herzens diskutiert wurde. Seine wissenschaftliche Begeisterung war ansteckend und konnte mich immer wieder motivieren, die Arbeit zu Ende zu schreiben. Auch bei Julian Mustroph möchte ich mich sehr für die Betreuung während des experimentellen Teils bedanken. Er konnte mir den Spaß am wissenschaftlichen Arbeiten vermitteln, die Hintergründe des Versuchsaufbaus erklären und hatte stets für meine zahlreichen Fragen ein offenes Ohr. Ebenfalls geht ein großer Dank an Felicia Radtke und Thomas Sowa, welche stets mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn etwas anders lief als gedacht sowie den Arbeitsalltag im Labor sehr auflockerten.

Auch meinen Freunden möchte ich sehr danken, insbesondere Linda und Felix, welche mir sehr geholfen haben, mich auch noch nach der Arbeit weiter an das Vollenden der Dissertation zu setzen. Zum Schluss bedanke ich mich sehr bei meiner Familie, welche mir diesen Lebensweg ermöglichen und die mich seit jeher unglaublich unterstützen sowie bei meiner Freundin Julia für die ständige Motivation und großartige Unterstützung.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Konstantin Pichler

Geboren am 12.10.1993 in München

Ausbildung

September 2000 bis Juli 2004: Dom-Pedro-Schule in München

September 2004 bis Juli 2012: Rupprecht-Gymnasium in München

Abschluss: allg. Hochschulreife, Note 1,4

Oktober 2013 bis Mai 2020: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

- 1. Staatsexamen September 2015: Note 2,0
- 2. Staatsexamen April 2019: Note 3,0
- 3. Staatsexamen Mai 2020: Note 2,0

Beruf

Seit September 2020: Ausbildung für den Facharzt Psychiatrie und Psychotherapie am Bezirksklinikum Regensburg

Dissertation

Beginn der Dissertation an der Klinik für Innere Medizin II, Labor für Kardiologie bei Prof. Dr. S. Wagner im Mai 2017