

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

Mechanismen der atrialen und ventrikulären Dysfunktion bei obstruktiver
Schlafapnoe - die Bedeutung der CaMKII-abhängigen Kalziumregulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Schaner

2024

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

Mechanismen der atrialen und ventrikulären Dysfunktion bei obstruktiver
Schlafapnoe - die Bedeutung der CaMKII-abhängigen Kalziumregulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Schaner

2024

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Dirk Hellwig |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Simon Lebek |
| 2. Berichterstatter: | PD Dr. Zdenek Provaznik |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 29.05.2024 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung (Einführung in die Problematik und Fragestellung) | 6 |
| 1.1 Einführung in die Problematik und Fragestellung | 6 |
| 1.2 Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSA) | 7 |
| 1.3 Klinische Relevanz kardialer Pathologien bei OSA | 9 |
| 1.3.1 OSA und Vorhofflimmern | 9 |
| 1.3.2 OSA und diastolische und systolische Dysfunktion | 11 |
| 1.4 Aufbau eines Kardiomyozyten | 13 |
| 1.5 Prinzip der Elektromechanischen Kopplung | 15 |
| 1.5.1 Der L-Typ Kalziumkanal | 17 |
| 1.5.2 Das Sarkoplasmatische Retikulum | 18 |
| 1.5.2.1 Der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) | 19 |
| 1.5.2.2 SERCA und Phospholamban | 20 |
| 1.5.2.3 Der Natrium-/ Kalziumaustauscher NCX und später Natriumeinstrom | 21 |
| 1.6 Die Kalzium/ Calmodulin regulierende Proteinkinase II (CaMKII) | 21 |
| 1.6.1 Regulation und Aktivierung der CaMKII | 22 |
| 1.6.2 Aufgabe und Pathophysiologie der CaMKII | 22 |
| 1.6.3 Pathophysiologische Vorgänge bei OSA im Zusammenhang mit der CaMKII | 23 |
| 1.7 Das OSA- Mausmodell | 24 |
| 1.8 Zielsetzung der Arbeit | 27 |
| 2. Material und Methoden..... | 28 |
| 2.1 Versuchstiere des Mausmodells | 28 |
| 2.1.1 Operation der Versuchstiere | 28 |
| 2.1.1.1 Polytetrafluoräthylen | 30 |
| 2.1.1.2 Sonographische Überprüfung des Zungendiameters | 31 |
| 2.1.2 Transthorakale Echokardiographie der Versuchstiere | 32 |
| 2.1.2.1 Auswertung der transthorakalen Echokardiographien | 32 |
| 2.1.3 Ganzkörperplethymographien | 33 |
| 2.1.3.1 Aufbau des Buxco Setups | 33 |
| 2.1.3.2 Durchführung der Ganzkörperplethysmographien | 34 |
| 2.1.3.3 Auswertung der Ganzkörperplethysmographien | 35 |
| 2.2 Isolation ventrikulärer und atrialer Herzmuskelzellen | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Epifluoreszenzmikroskopie | 39 |
| 2.3.1 Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops | 40 |
| 2.3.2 Der Kalziumsensitive Farbstoff FURA-2 AM | 41 |
| 2.3.3 Versuchsdurchführung | 42 |
| 2.4 Datenauswertung und Statistik | 45 |
| 3. Darstellung der eigenen Untersuchungen („Ergebnisse“) | 46 |
| 3.1 Apnoen und inspiratorische Flusslimitierungen | 47 |
| 3.2 Atriale Arrhythmien und atriales Kalziumhandling | 47 |
| 3.2.1 Frequenzunabhängige CaMKII-abhängige atriale pro- arhythmische Ereignisse unter Standardbedingungen | 47 |
| 3.2.2 Provokation atrialer pro- arhythmischer Ereignisse durch das Nordadrenalinderivat Isoprenalin und 2mM Kalzium | 50 |
| 3.2.3 Atriales diastolisches und systolisches Kalziumhandling | 51 |
| 3.3 Ventrikuläre Kontraktilität und ventrikuläres Kalziumhandling | 54 |
| 3.3.1 CaMKII-abhängige ventrikuläre systolische Dysfunktion nach PTFE- Injektion | 54 |
| 3.3.2 Diastolisches Kalziumhandling im Ventrikel | 58 |
| 4. Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur („Diskussion“) | 60 |
| 4.1 Mechanismen kardialer Begleiterkrankungen bei OSA | 60 |
| 4.2 Das OSA Mausmodell durch Vergrößerung des Zungendiameters | 62 |
| 4.3 CaMKII und ihre Rolle der Dysregulation der zellulären Kalziumhomöostase ... | 63 |
| 4.3.1 CaMKII abhängige pro- arhythmische Ereignisse im Vorhof bei OSA Mäusen | 64 |
| 4.3.2 CaMKII abhängige kontraktile Dysfunktion im Ventrikel von OSA Mäusen | 65 |
| 4.3.3 Genetischer Knock- out der CaMKII beschleunigt die Rückbildung des Kalziumtransienten | 66 |
| 4.4 Ausblick: CaMKII- Inhibitoren als potenzielle therapeutische Möglichkeit zur Behandlung kardialer Begleiterkrankungen bei OSA | 67 |
| 4.5 Diskussion der Methoden und der Limitationen der Arbeit | 68 |
| 5. Zusammenfassung | 70 |
| 6. Literaturverzeichnis | 71 |
| 7. Anhang | 91 |
| 7.1 Abkürzungsverzeichnis | 91 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2. Abbildungsverzeichnis | 94 |
| 7.3. Tabellenverzeichnis | 96 |
| 8. Danksagung | |
| 9. Lebenslauf | |
| Eidesstaatliche Erklärung | |

1. Einleitung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen einer Co- Autorenschaft publiziert. So lieferte die vorliegende Promotion einen wesentlichen Beitrag für den Artikel „CaMKII-Dependent Contractile Dysfunction and Pro-Arrhythmic Activity in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea“, welcher 2023 im Antioxidants (Impact Factor 7,0) erschienen ist (11).

1.1 Einführung und Erläuterung der Thematik

Mit einer Prävalenz von bis zu 24% in der Bevölkerung über 65 Jahre (1) ist die obstruktive Schlafapnoe (OSA) von hoher sozioökonomischer Bedeutung, gerade vor dem Hintergrund des demographischen Wandels und den mit OSA assoziierten, teils schwerwiegenden Folgeerkrankungen. Zu diesen zählen u.a. kardiovaskuläre Erkrankungen wie atriale Arrhythmien, sowie die systolische und diastolische Dysfunktion (2). Aufgrund bislang mangelnder pharmakologischer Behandlungsoptionen ist die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Möglichkeiten von großer Relevanz, zumal der genaue Mechanismus der Arrhythmogenese bei OSA nur ansatzweise verstanden ist. Spannenderweise konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl bei Vorhofflimmern (3) und bei Patienten mit Herzversagen (4,5), als auch bei OSA (6,7) die Expression bzw. Aktivität der Ca/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) gesteigert sind (3,6,7). Zudem konnte bei Patienten mit Vorhofflimmern ein gesteigerter diastolischer Kalziumverlust aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) nachgewiesen werden (3). Eine vermehrte Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors Typ 2 (RyR2) durch die CaMKII gilt als ursächlich für dieses Kalziumleck (3), welches gehäuft zu verzögerten Nachdepolarisationen führt, die wiederum als wesentlicher Trigger für atriale Arrhythmien zu sehen sind (8). Interessanterweise kann auch Phospholamban durch die CaMKII phosphoryliert werden, wodurch es indirekt zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA kommt, welche Ca-Ionen aus dem Zytoplasma zurück in das SR pumpt (9). Darüber hinaus kann die CaMKII auch den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanal (LTCC) phosphorylieren, was zu einem erhöhten Einstrom an Ca^{2+} führt. Über das Prinzip der elektromechanischen Kopplung wird so wiederum der RyR2 aktiviert und dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (9). Diese verschiedenen Ca^{2+} -Ströme, sowie der Ca^{2+} -Gehalt des SRs bestimmen im Wesentlichen die

Amplitude und Abfallkinetik des sogenannten Ca-Transienten, welcher Aufschluss über den Zyklus von Kontraktion, Relaxation und diastolischem Ca gibt. Da Patienten allerdings immer auch ein heterogenes Kollektiv darstellen, deren verschiedene Komorbiditäten potenzielle Confounder sein können, entwickelte die Arbeitsgruppe von Prof. Wagner ein völlig neuartiges Mausmodell, bei dem die Tiere keine potenziellen Störfaktoren wie Übergewicht und Diabetes aufweisen, sodass nun die spezifischen Effekte der OSA auf die Arrhythmogenese differenzierter untersucht werden können. Mäusen wird hierfür 100 µl (50% w/v) PTFE Suspension in das pharynxnahe Bindegewebe der Zunge injiziert. Durch die Querschnittszunahme der Zunge entsteht eine intermittierende Verengung der oberen Atemwege, mit vermehrtem Auftreten spontaner Apnoen und inspiratorischer Flusslimitierungen (Messung mittels Ganzkörperplethysmographie). Bei diesen OSA- Tieren konnte bisher nicht nur ein vermehrtes Auftreten von Atempausen, sondern auch 8 Wochen postoperativ eine verminderte systolische und diastolische Herzfunktion, sowie eine gesteigerte CaMKII Expression beobachtet werden (10,11).

1.2 Das Obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSA)

Die obstruktive Schlafapnoe (OSA) gilt als die am meisten verbreitete schlafbezogene Atemstörung und gewinnt nicht nur aufgrund ihrer neurokognitiven und kardiovaskulären Folgeerkrankungen zunehmend an Relevanz (12,13). Ging die WHO im Jahr 2007 noch von weltweit 100 Millionen Erkrankten aus (14), so schätzten Benjafield et al. in einer im Lancet publizierten Studie die Anzahl der Betroffenen aufgrund neuerer Erkenntnisse bereits auf eine knappe Milliarde (15).

Die Erkrankung zeichnet sich durch wiederkehrende Phasen einer Verengung der oberen Atemwege während der Schlafphase aus, herbeigeführt durch einen Zusammenfall pharyngaler Strukturen (12). Je nach Ausmaß der Verengung kommt es so zu einem kompletten (Apnoe) oder partiellen Aussetzen (Hypopnoe) der Atmung (16). Ein erhöhter Zungendiameter, vermehrtes weiches pharyngales Gewebe, sowie die Dicke der lateralen pharyngalen Strukturen wurden dabei von Schwab et al. 2003 als Risikofaktoren für OSA ausgemacht, wobei die Dicke der einzelnen Strukturen direkt mit dem Erkrankungsrisiko zu korrelieren scheint (17).

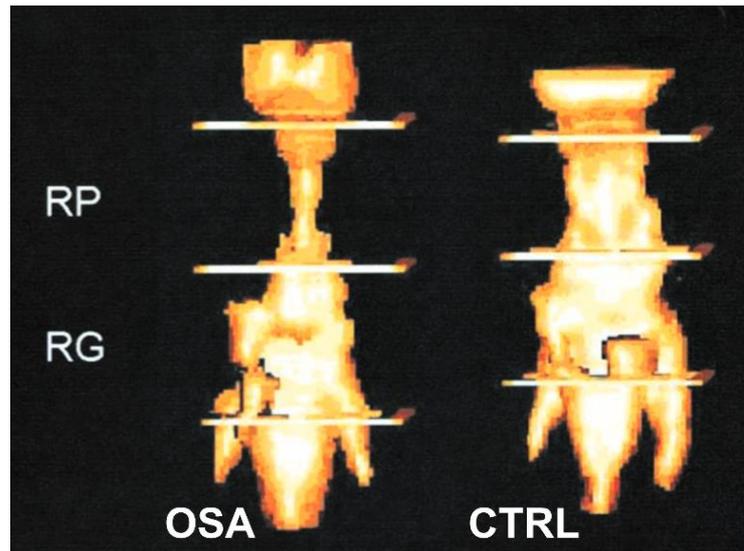


Abbildung 1.1: Dreidimensionale MRT- Darstellung des Luftvolumens der oberen Atemwege eines Patienten mit obstruktiver Schlafapnoe (links, OSA) und eines gesunden Patienten (rechts). Bei dem apnoischen Patienten sind die Atemwege dabei in der RP-Region (retropalatal) deutlich verengt – die RP-Region gilt als eine der am häufigsten kollabierenden Strukturen bei OSA. Retroglossal (RG) verfügen beide Probanden über ein ähnliches Luftvolumen. Abbildung modifiziert nach Schwab et al. 2003 (17)

Während viele Patienten mit OSA sich ihrer Erkrankung oft nicht bewusst sind, berichten andere von unerholsamem Schlaf oder nächtlichen Aufwachreaktionen aufgrund des Gefühls zu ersticken (12). Weiterhin gelten morgendliche Kopfschmerzen und Tagesmüdigkeit als weitere Symptome (1). Die Diagnose der Obstruktiven Schlafapnoe wird mittels nächtlicher Polysomnographie gestellt (16). Die Einteilung der Schlafapnoe wird dabei nach dem Apnoe-Hypopnoe-Index vorgenommen, wobei die Werte dort je nach Definition variieren (16).

Als Risikofaktoren für OSA gelten u.a. Übergewicht und das männliche Geschlecht (16). So lagern Übergewichtige leichter Fettpolster in pharyngalen Strukturen an, was in einer Verengung der oberen Atemwege resultiert (18). Zudem scheinen auch genetische Vorraussetzungen und die ethnische Zugehörigkeit Auswirkungen auf die kraniofaziale Anatomie und somit auf die Entwicklung einer OSA zu spielen (16). Gerade also mit Hinblick auf die weltweite Adipositas-Pandemie wird die Obstruktive Schlafapnoe in den kommenden Jahren zu einer globalen sozioökonomischen Herausforderung werden (15,19,20), zumal die OSA mit einer ganzen Reihe

neurokognitiver, metabolischer und kardiovaskulärer Folgeerkrankungen assoziiert ist (2,21,22).

Hinzu kommt das Problem bislang mangelnder pharmakologischer Behandlungsoptionen. Die derzeitige Behandlungsempfehlung konzentriert sich auf eine Gewichtsreduktion bei übergewichtigen Patienten, sowie eine nächtlichen Positivdrucktherapie (CPAP – Continuos Positive Airway Pressure) (23).

1.3 Klinische Relevanz kardialer Pathologien bei OSA

In etwa die Hälfte aller kardiovaskulärer Patienten ist von OSA betroffen (24–27), welche häufig mit atrialen und ventrikulären Arrhythmien, sowie Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie assoziiert ist (2,2,6,28,29). Zurückzuführen sind diese Pathologien demnach u.a. auf eine vermehrte nächtliche Sympathikusaktivierung, bedingt durch vermehrte Aufwachreaktionen bei OSA, sowie intermittierende hypoxische Phasen aufgrund der Atemaussetzer (30). Weiter führt OSA zu erhöhtem Blutdruck (31) und große intrathorakale Druckschwankungen stellen einen zusätzlichen mechanischen Stressor für das Herz und große Gefäßsystem dar (32). Patienten mit OSA zeigen nach Myokardinfarkt eine verminderte Pumpleistung und Vergrößerung des rechten Herzens (33). Mit Hinblick auf die Vorbeugung kardialer Pathologien bei OSA konnten McEvoy et al. 2016 zeigen, dass die CPAP-Therapie geeignet scheint, das Auftreten von Apnoen zu verringern, nächtliches Schnarchen zu reduzieren, sowie die Tagesmüdigkeit zu verringern und die generelle Lebensqualität zu verbessern (24). Allerdings konnte eine Behandlung der OSA mittels CPAP dem kardiovaskulären Risiko der Patienten bzw. kardiovaskulären Begleiterkrankungen nicht vorbeugen (24). In weiteren Studien zeigte sich die kardiovaskulär bedingte Mortalität bei kardiologischen Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion und einer Zentralen Schlafapnoe durch CPAP-Behandlung sogar signifikant erhöht (34).

1.3.1 OSA und Vorhofflimmern (VHF)

Vorhofflimmern (VHF) entsteht zumeist auf Basis bestimmter Risikofaktoren (z.B. Alter) oder bereits bestehender Vorerkrankungen wie Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonie oder koronarer Herzerkrankungen (35), welche ebenso wie die OSA zu

strukturellen und funktionellen Veränderungen am Herzen führt. Diese begünstigen als sogenanntes vulnerables Gewebe im Zusammenspiel mit triggernden Faktoren die Entstehung von VHF (36). Mögliche Trigger, gerade mit Hinblick auf OSA sind demnach eine Dehnung der Vorhöfe oder sympathische Stimulation, sowie supraventrikuläre Extrasystolen (37). Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von VHF stellen fokale ektope Aktivitäten des Myokards dar, bei welchen frühe und späte Nachdepolarisationen (EAD – early after depolarization und DAD – delayed afterdepolarization) eine wichtige Rolle spielen (8,38). Hierfür sind vor allem Veränderungen der Kalziumströme- und Kanäle entscheidend (8), worauf zu einem späteren Zeitpunkt nochmals genauer eingegangen wird.

Patienten mit OSA scheinen überproportional häufig an VHF zu erkranken (2), während umgekehrt die Diagnose OSA unter VHF Patienten im Vergleich zum Durchschnitt ebenfalls erhöht ist (39,40), was auf eine Assoziation schließen lässt (2,29). Darüber hinaus scheinen Patienten mit OSA und VHF nach elektrischer Kardioversion oder Pulmonalvenenisolation eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit für erneutes VHF zu besitzen (42). Bei nicht mit CPAP behandelten Schlafbezogene Atmungsstörungen (SBAS) schien die Wirksamkeit Katheter bezogener oder pharmakologischer Therapien reduziert (41).

Jedoch sind die detaillierten Mechanismen der Arrhythmogenese bei OSA noch nicht abschließend geklärt. Laut Rossi et al. spielen, wie bereits eingangs beschrieben, einige pathophysiologischen Effekte der OSA, wie oxidativer Stress durch intermittierende Hypoxien und intrathorakale Druckschwankungen, sowie direkte und indirekte Effekte der OSA auf das autonome Nervensystem dabei eine wichtige Rolle (29) (Abbildung 2). Dies könnte zu strukturellem Umbau am Herzen von Patienten mit OSA führen. So konnten Chami et al. 2008 im Rahmen der „Sleep Heart Health Study“ das OSAS mit einer verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) in Verbindung bringen (43). Dimitri et al. konnten bei Patienten mit OSA vergrößerte Vorhöfe und in Folge ein verschlechtertes atriales Reizleitungssystem beobachten (36). In der Folge kommt es durch dieses kardiale Remodelling wie oben beschrieben zu Entwicklung von VHF, was die Wahrscheinlichkeit thromboembolischer Ereignisse erhöht und zu höheren Hospitalisierungs- und Mortalitätsraten führt (44).

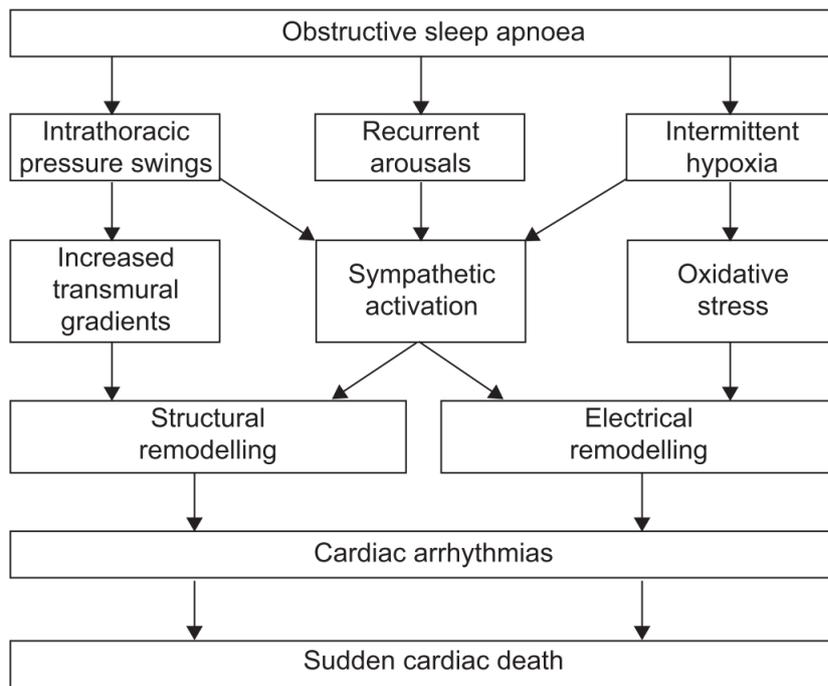


Abbildung 1.2: Mögliche pathophysiologische Mechanismen der Arrhythmogenese bei OSA. Abbildung aus Rossi et al. (29)

1.3.2 OSA und diastolische und systolische Dysfunktion

Die Herzinsuffizienz (HF) ist eine häufige Erkrankung, deren Prävalenz in westlichen Staaten bei circa 1-2 Prozent der erwachsenen Bevölkerung liegt, wobei die Tendenz aufgrund des demographischen Wandels und medizinischen Fortschritts steigt (13). Bui et al. schätzten das Lebenszeitrisiko an HF zu erkranken auf 20 Prozent (45). HF ist gekennzeichnet durch die Unfähigkeit des Herzens den systemischen Blutstrom adäquat aufrechtzuerhalten, wobei sich die Klassifikation in heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) und heart failure with preserved EF (HFpEF) an der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) orientiert. Bei einer LVEF unter 50 Prozent spricht man von einer HFrEF oder einer kontraktiven (systolischen) Dysfunktion. Bei der diastolischen Dysfunktion (HFpEF) verhindert ein erhöhter Widerstand aufgrund struktureller Umbauprozesse eine adäquate Füllung des Ventrikels (46,47). HFrEF und HFpEF machen dabei in etwa den selben Anteil an HF aus, wobei der Anteil des HFpEF in den letzten Jahren steigend war (47,48). Arzt et al. schätzten, dass die ökonomischen und sozialen Herausforderungen in Bezug auf HF in den kommenden Jahren steigen werden, weshalb zunehmend auch die Behandlung von Komorbiditäten und Risikofaktoren in den Fokus rückt (13,49). Zu diesen gehört auch die OSA, welche

unter Patienten mit HF, vor allem mit HFrEF, überproportional häufig vertreten ist (13). So leiden 12-57 Prozent der HFrEF Patienten an OSA, 7,7 Prozent der OSA Patienten zeigen eine LVEF von unter 50 Prozent (47,50). Dabei scheinen HF und OSA nicht nur als Komorbiditäten zu wirken, sondern sich darüber hinaus in der Schwere der Erkrankung noch zu verstärken (47). Abbildung 3 zeigt dabei, dass OSA und HF vor allem mit Hinblick auf einen hohen BMI, zunehmendem Alter, Diabetes männlichem Geschlecht und Vorhofflimmern ein recht ähnliches Risikoprofil aufweisen (47,51).

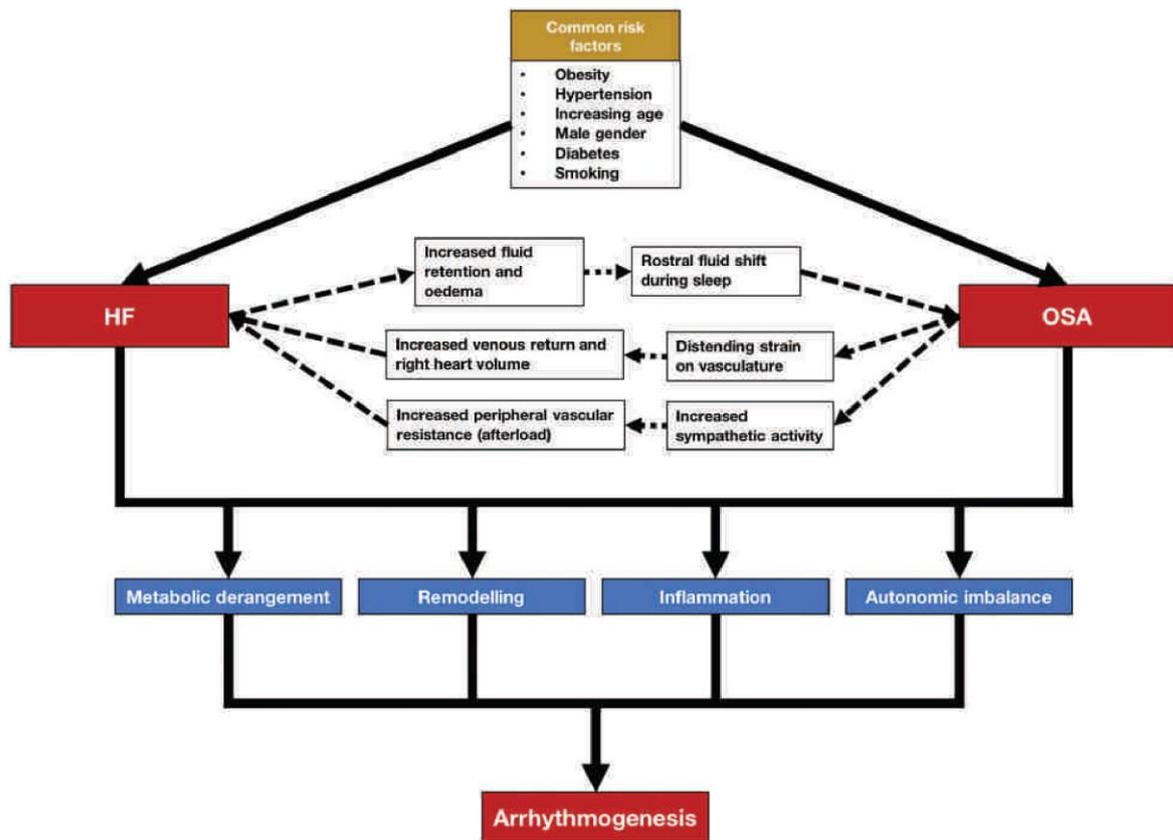


Abbildung 1.3: OSA und HF weisen ein ähnliches Risikoprofil auf und können sich dabei auch gegenseitig bedingen. Beide begünstigen strukturelle und funktionelle Umbauprozesse, welche schließlich zu atrialen und ventrikulären Arrhythmien führen können. Abbildung aus Chadda et al. (47)

Die Verbindung von Arrhythmien und OSA wurde bereits im vorangehenden Abschnitt dargelegt. Aber auch HF wird dabei mit Arrhythmien assoziiert. 40 Prozent der HF Patienten entwickeln VHF und andersherum (52), 40 Prozent der HF Patienten sterben an malignen ventrikulären Arrhythmien, weshalb man eine starke Assoziation zwischen HF und plötzlichem Herztod annehmen muss (9,53).

Die bidirektionale Wirkung von HF und OSA, wie sie in Abbildung 3 dargestellt ist, beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen (47). Die bereits erwähnten intrathorakalen Druckschwankungen bei OSA resultieren in einem erhöhten venösen Rückstrom zum rechten Herzen sowie einer Drucküberlastung (47,54). Während einer Apnoe kommt es weiterhin zu akuten Veränderungen der linksventrikulären transmuralen Wandspannung, was einen weiteren Stressor für das Myokard darstellt und gemeinsam mit der bei OSA erhöhten Sympathikusaktivität zu einer erhöhten Nachlast führt, was letzten Endes zu einer Schädigung des Endothels beiträgt und das kardiale Remodelling beschleunigt (30,47,54).

1.4 Aufbau eines Kardiomyozyten

Die Herzmuskelzelle, welche die funktionelle Grundlage für die Herzarbeit darstellt, besitzt zwar eine große strukturelle Ähnlichkeit zur Skelettmuskelzelle, besitzt anders als diese aber nur einen, in seltenen Fällen 2 Zellkerne. In humanem Gewebe hat ein einzelner Kardiomyozyt in etwa eine Länge von 100µm und misst 15-20µm im Durchmesser (55). Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau einer Herzmuskelzelle, deren kleinste Einheit die Sarkomere bilden. Diese sind 1,5-2,2µm lang und werden zu beiden Seiten von den sog. Z-Streifen begrenzt. Ein Sarkomer besteht zu gleichen Anteilen aus den kontraktilen Myofilamenten Aktin und Myosin, deren bündelweise Anordnung der Herzmuskelzelle ihre Querstreifen verleiht. Lichtmikroskopisch lässt sich ein Sarkomer in eine helle I- und eine dunkle A- Bande unterteilen, wobei sich in der A-Bande die Myosinfilamente befinden, welche von dünneren Aktinfilamenten umgeben werden. Die M-Zone markiert die Verbindung der Myosinfilamente. In der H-Bande sind die Myosinfilamente nicht von Aktinfilamenten umgeben. Die parallel zueinander verlaufenden Aktinfilamente sind am Z-Streifen, der Begrenzung eines Sarkomers, befestigt und finden sich im Bereich der I-Bande wieder. Um die Stoffwechselaktivität der Zelle aufrechtzuerhalten und zu gewährleisten besitzt eine Herzmuskelzelle zudem die dafür essentiellen Zellorganellen wie Mitochondrien, Sarkoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen, Glykogen und das Zytoskelett (55). Erhöhtes intrazelluläres Kalzium führt zu einer Kontraktion, bei welcher es unter ATP-Hydrolyse durch Verschiebung der Aktin- zwischen die Myosinfilamente zu einer Verkürzung des Sarkomers kommt (56).

Die Kardiomyozyten sind von einer Zellmembran, dem Sarkolemm umgeben. Dieses setzt sich aus einer Phospholipiddoppelschicht, Cholesterinmolekülen und einer Vielzahl integraler Proteine, welche u. a. Zwecken der Signalübermittlung oder als spezialisierte Ionenkanäle und-pumpen dienen, zusammen. Der Ionentransport kann dabei entweder passiv entlang dem osmotischen Konzentrationsgradienten, oder aktiv unter Energieverbrauch erfolgen (55). Diese Energie wird vor allem durch anaerobe ATP-Gewinnung der Mitochondrien bereitgestellt (57).

Für eine regelrechte und synchrone Herzarbeit ist dabei eine gezielte Erregungsausbreitung innerhalb des Myokards essenziell. Dazu sind die Herzmuskelzellen über sogenannte Glanzstreifen (Disci intercalares) miteinander zu einem funktionellen Synzytium verbunden. Die Glanzstreifen enthalten Desmosomen, welche in den Intermediärfilamenten benachbarter Zellen fest verankert sind und somit dem Verbund mechanische Stabilität während der Kontraktionsvorgänge geben (58). Die Reizweiterleitung ermöglichen die in den Glanzstreifen enthalten „gap junctions“, welche aus Connexonen, kleinen Kanälen für den Ionentransport, bestehen (59).

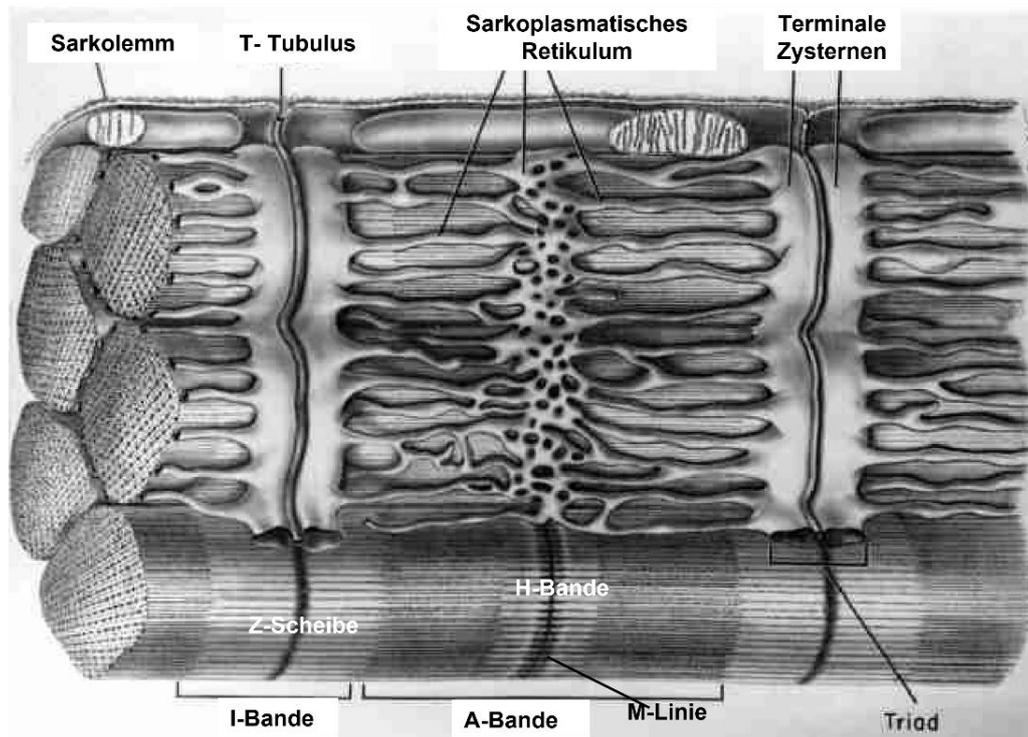


Abbildung 1.4: Schematische Ultrastruktur eines Myozyten. Modifiziert nach Bers (55)

Das Aktionspotential erreicht die Zelle über die transversalen T-Tubuli. Abbildung 4 lässt erkennen, dass das Sarkolemm über diese Einstülpungen tief zwischen die

Herzmuskelzellen vordringt, wodurch dessen Ionenkanäle räumlich in enger Verbindung zum longitudinalen (L-) Tubulus und dem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher SR stehen. Dies spielt eine wichtige Rolle für den Ablauf der elektromechanischen Kopplung (55).

1.5 Prinzip der elektromechanischen Kopplung

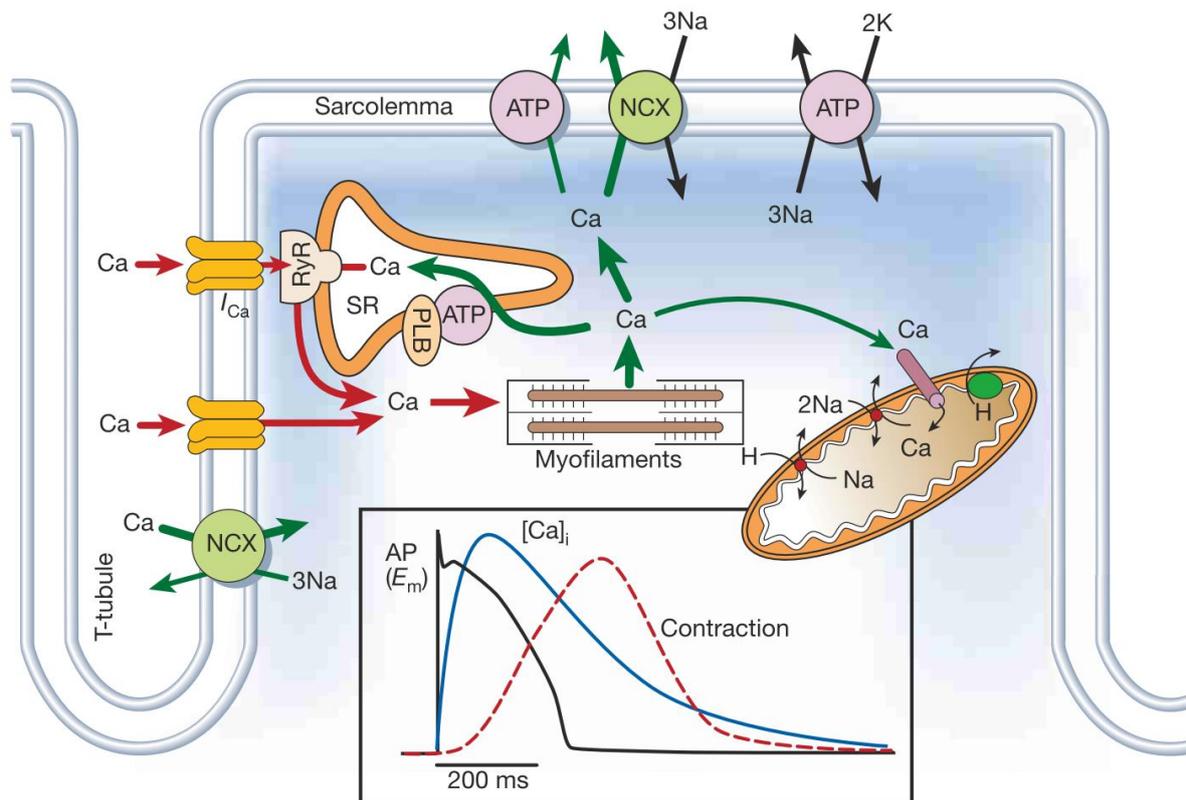


Abbildung 1.5: Nach Eintreffen des elektrischen Reizes beginnt das AP mit dem schnellen Einstrom von Na^+ -Ionen (overshoot), wodurch es zur Depolarisation der Zelle kommt. In der Folge kommt es zu einer Kalzium-induzierten intrazellulären Kalziumfreisetzung aus dem SR durch Kalzium-Stimulation des RyR2 (rote Pfeile). Hierdurch kommt es zur sog. Plateauphase sowie zur Aktivierung der für die Kontraktion wichtigen Myofilamente. Die grünen Pfeile zeigen Wege des Kalzium-Rücktransportes nach Extrazellulär und das SR im Zuge der anschließenden myokardialen Relaxation. Hierbei spielen v.a. die durch Phospholamban regulierte SR- Ca^{2+} -ATPase für den Rücktransport ins SR, sowie der NCX für den Transport nach extrazellulär eine wichtige Rolle. Die untere Abbildung veranschaulicht den

Zusammenhang zwischen AP (schwarz), intrazellulärem Kalzium (blau) und Kontraktion (rot). Genauere Erklärung siehe Text. Abbildung nach Beers, S.198 (60).

Jeder physiologischen Kontraktion des Herzens geht eine elektrische Stimulation des Myokards durch ein Aktionspotenzial voraus. Bei Eintreffen der elektrischen Erregung an der Herzmuskelzelle, welche über die Gap Junctions weitergeleitet wird, kommt es durch einen initialen Natriumeinstrom zum Beginn des Aktionspotenzials. Dieser sog. Na⁺-overshoot führt zu einer Depolarisation (Aufstrich des Aktionspotenzial, siehe Abbildung 5) des Membranpotentials auf +30mV (Ausgangspunkt ist das von Kaliumionen aufrechterhaltende Ruhemembranpotenzial von ca. -85mV). Nach einer kurzen, zwischenzeitlichen partiellen Repolarisation, welche auf auswärts gerichteten spannungsabhängigen K⁺-Kanälen beruht, kommt es zu einem schnellen intrazellulären Anstieg von Ca²⁺-Ionen. Durch Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanälen strömen Ca²⁺-Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle, was zu einer ungewöhnlich langen, aber der für Kardiomyozyten typischen Plateauphase von 200-400ms führt. Durch die somit kurzzeitig erhöhte Konzentration an Ca²⁺-Ionen kommt es zur Aktivierung des Ryanodinrezeptors Typ 2 (RyR2), welcher in enger Nachbarschaft der L-Typ Ca²⁺-Kanäle liegt. Dadurch werden große Mengen an Ca²⁺-Ionen aus dem SR freigesetzt (55,61). Um die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 zu ändern, ist hierbei eine Ca²⁺-Konzentration von 10µmol/l notwendig (55). Die hohe zytosolische Ca²⁺-Konzentration ermöglicht nun eine Aktivierung der Myofilamente. So binden freigesetzte Ca²⁺-Ionen nun an Troponin C, einer regulatorischen Untereinheit von Aktin, wodurch aufgrund einer Konformationsänderung die Bindungsstelle zu den Myosinköpfchen freigegeben wird (Abbildung 6, Systole). Unter Hydrolyse eines an Myosin gebundenen ATP-Moleküls kommt es nun zu einem Umknicken der Myosinköpfchen um 45°, wodurch die Aktinfilamente ineinandergeschoben werden, was zu einer Verkürzung der Sarkomere und somit einer Kontraktion der Myokardzelle führt (55,62,63). Durch häufigeres Wiederholen dieses Prozesses kommt es zu einer stärkeren Kontraktion der Herzmuskelzelle (55).

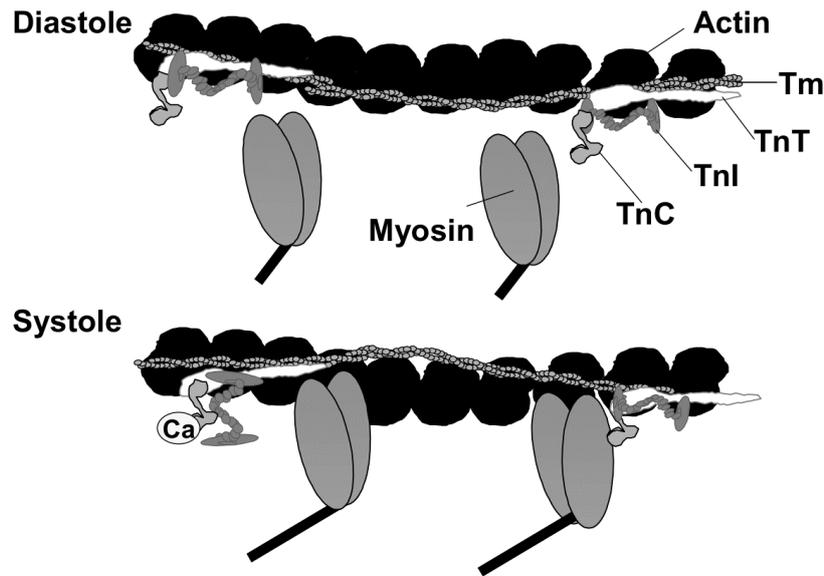


Abbildung 1.6: Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C gibt die Myosinbindungsstelle am Aktinfilament frei, wodurch eine Interaktion der beiden Filamente möglich wird. Unter Hydrolyse von ATP kippt nun das Myosinköpfchen um 45° . Dadurch verschiebt sich das Aktin- gegenüber dem Myosinfilament. Mehrfache Wiederholung dieses Vorganges ermöglicht eine Kontraktion. Abbildung nach Bers, S.25 (55)

Nicht nur für die Kontraktion der Herzmuskelzelle, sondern auch für deren Relaxation spielt das Kalzium eine zentrale Rolle. Für diese pumpt die SR-Kalzium-ATPase (SERCA2) den größten Teil des Kalziums zurück in das SR. Ein membranständiger Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX) befördert weiteres Kalzium nach extrazellulär, wodurch die zytosolische Kalziumkonzentration wieder sinkt (siehe Abbildung 5) (60). Zusätzlich öffnen sich auswärtsgerichtete spannungsabhängige K^+ -Kanäle, wodurch die Zelle repolarisiert und wieder dem Ruhepotenzial von -85mV entgegenstrebt (61).

Da der zelluläre Kalziumhaushalt, bzw. dessen Veränderungen so eine zentrale Rolle für den Prozess der elektromechanischen Kopplung spielen, werden im Folgenden für den zellulären Kalziumhaushalt wichtige Kanäle, sowie deren Pathophysiologien genauer beschrieben.

1.5.1 Der L-Typ Kalziumkanal

Der spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanal (LTCC) öffnet sich bereits zu Beginn eines Aktionspotenzials (APs). LTCCs liegen meist in enger Nachbarschaft zu einer

Ansammlung von RyR2 in den sarkolemmlen T-Tubuli. Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle über den LTCC führt nun zu einer Konformationsänderung am RyR2, wodurch es zu Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR kommt (9,55). Die Phosphorylierung des LTCC, u.a. durch die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an Thr498 der β_{2a} -Unterheit (64), führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und somit zu vermehrtem Kalziumeinstrom in die Zelle (65). Durch eine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer kann es so zu frühen Nachdepolarisationen (EADs) kommen (66). Ebenso kann ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom über eine Ca^{2+} -Überladung der Zelle eine vermehrte elektrogene Aktivität des NCX induzieren und so zu vermehrten späten Nachdepolarisationen (DADs) führen (9).

1.5.2 Das Sarkoplasmatische Retikulum

Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein vollständig intrazellulär gelegenes Zellkompartiment, welches für den kardialen Kalziumhaushalt von herausragender Bedeutung ist. Es erstreckt sich in Form von Tubuli entlang der Myofibrillen, ohne diese jedoch direkt zu berühren (siehe Abbildung 4, 7). Von der Zellmembran aus erstrecken sich die transversalen (T-) Tubuli, welche im Bereich der Z-Scheibe in Kontakt mit den terminalen Zisternen des SR stehen. Diese dienen als Kalziumspeicher und setzen dieses wiederum rasch durch Aktivierung eines Dihydropyridinrezeptors frei, wenn ein Aktionspotenzial die T-Tubuli erreicht, wodurch die Muskelkontraktion ausgelöst wird (67). Neben den longitudinalen Tubuli, welche zwischen den terminalen Zisternen verlaufen und durch eine hohe Dichte an Ionenkanälen für die Kalziumabsorption gekennzeichnet sind, besteht das SR u.a. aus dem kalziumbindenden Protein Calsequestrin. Dieses ist vor allem in den terminalen Zisternen lokalisiert und aufgrund seiner hohen Bindungskapazität maßgeblich für die Funktion des SR als intrazellulärer Kalziumspeicher verantwortlich (55).

Die genannten Prozesse sind für das SR elementar, um seine Hauptaufgaben zu erfüllen: Speicherung, Freisetzung und Wiederaufnahme von Kalziumionen. Dabei spielen vor allem zwei Proteine eine fundamentale Rolle, welche im Weiteren genauer beschrieben werden sollen. Der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) für die Freisetzung sowie die SERCA für die Wiederaufnahme der Kalziumionen in das SR (55).

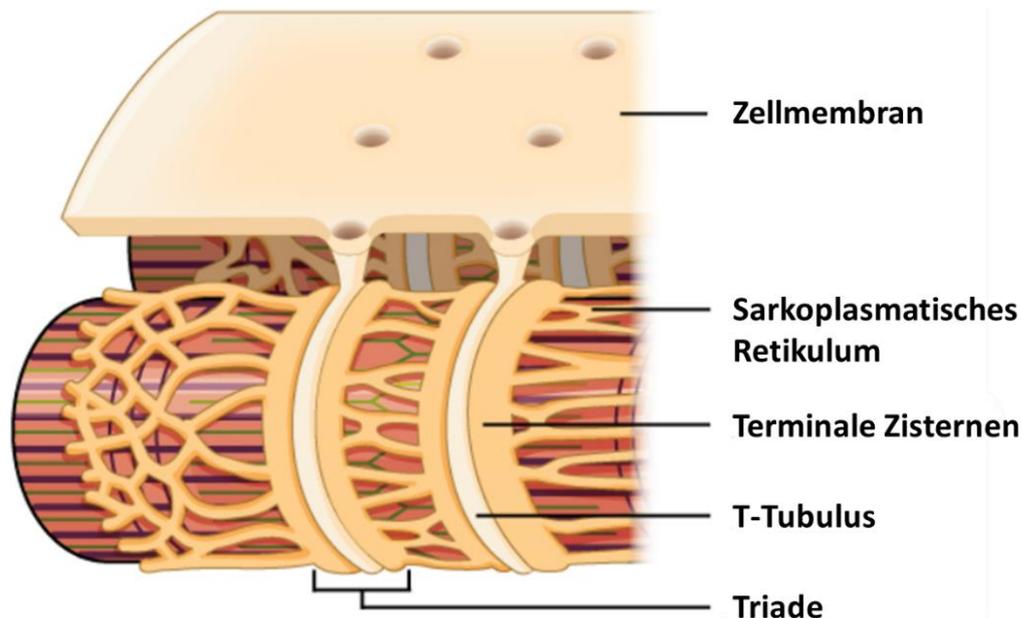


Abbildung 1.7: Das Sarkoplasmatische Retikulum am Beispiel einer Skelettmuskelzell. Abbildung modifiziert nach <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/preface>

1.5.2.1 Der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2)

Der RyR2, der kardiale Subtyp des Ryanodinrezeptors, ist ein bedeutender Kalziumfreisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums und dient der Bereitstellung von Kalziumionen während der systolischen Herzaktion. Zur Aktivierung des RyR2 kommt es durch eine sogenannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (55,68). Hierbei kommt es im Zuge eines Aktionspotentials zur Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Ca^{2+} -Kanälen mit konsekutivem Influx von Ca^{2+} -Ionen. Ist nun eine Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ erreicht, kommt es zu einer Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2. Folge ist die Freisetzung großer Mengen an Kalziumionen aus dem SR (55,61). Diesen Mechanismus ermöglicht u.a. die Lage der RyR2 in unmittelbarer Nähe zu den LTCC an den T-Tubuli (55). Eine wichtige Rolle für die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 spielt das Protein Calsequestrin, welches abhängig vom Ca^{2+} -Bindungszustand (also von der Menge des im SR gespeicherten Ca^{2+}) über akzessorische Bindung an den RyR2, Triadin und Junctin diese maßgeblich mitbestimmt (69,70). Weiterhin hat die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Ca^{2+} -Transienten, welcher den Zyklus von Kontraktion, Relaxation und diastolischem Ca^{2+} aufzeigt, woraus sich somit auf die

Kontraktionskraft der Herzmuskelzelle rückschließen lässt (71). Eine weitere Möglichkeit den RyR2 zu aktivieren stellt die CaMKII dar, welche durch Phosphorylierung an Serin 2814 dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (3,72). Allerdings kann es durch diese CaMKII-abhängige Phosphorylierung zur spontanen Öffnung des RyR2 mit konsekutivem diastolischem Ca^{2+} -Leck kommen (3,73). Aufgrund eines verminderten SR Ca^{2+} -Gehalts und erniedrigter Ca^{2+} -Transienten kann dies zum einen die Kontraktilität der Myozyten vermindern und eine Herzinsuffizienz fördern (73), zum anderen aber auch zu verzögerten Nachdepolarisationen führen, welche zur Entstehung atrialer Arrhythmien beitragen (8).

Interessanterweise kann auch Koffein an den RyR2 binden und erhöht an der Herzmuskelzelle dessen Ca^{2+} -Sensitivität. Dadurch kommt es zu mikroskopischen Kalziumfreisetzungen, sogenannten Ca^{2+} -Sparks, welche u.a. zur herzfrequenzsteigernden Wirkung des Koffeins beitragen sollen (74). Andererseits wird sich der Effekt des Koffeins auf den RyR2 aber auch wissenschaftlich zu Nutze gemacht. So kann in isolierten Herzmuskelzellen bei zügiger Applikation einer effektiven Dosis von 1-10mM Koffein die Höhe der Ca^{2+} -Transienten Amplitude als grober Richtwert für das zu diesem Zeitpunkt im SR zu Verfügung stehende Kalzium herangezogen werden, woraus sich indirekt ein diastolisches SR Ca^{2+} -Leck ableiten lässt (55). Die Applikation des Koffeins muss rasch erfolgen, um einen langsamen und dafür niedrigeren Ca^{2+} -Transienten, sowie eine biphasisch verlaufende Kontraktion der isolierten Herzmuskelzelle zu vermeiden, da Koffein auch die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente erhöht (55).

1.5.2.2 SERCA und Phospholamban

Die Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) ist eine im Bereich der L-Tubuli lokalisierte Kalziumionenkanalpumpe, welche Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol zurück ins SR pumpt und somit wesentlich zur Relaxation des Herzmuskels während der Diastole beiträgt (55). Da dieser Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten verläuft (im SR ist die Kalziumkonzentration höher als im Zytosol), geschieht dies unter Verbrauch von ATP (55,75).

Das Regulatorprotein Phospholamban (PLB) inhibiert in unphosphoryliertem Zustand die SERCA, indem es durch Bindung seine Ca^{2+} -Affinität verringert. Proteine wie die

CaMKII oder die PKA, aktiviert u.a. durch β -adrenerge Stimulation, phosphorylieren und inhibieren wiederum PLB und führen so über eine sogenannte Disinhibition zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA, wodurch die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR beschleunigt wird (9,55,76). Wie oben beschrieben, kann jedoch ein dadurch erhöhter SR Ca^{2+} -Gehalt mit erhöhtem Ca^{2+} -Bindungszustand des Calsequestrin die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 spontan erhöhen (69,70), was zu vermehrten Arrhythmien durch verzögerte Nachdepolarisationen führen kann (3,8).

1.5.2.3 Der Natrium/Kalzium-Austauscher NCX und später Natriumstrom

Neben der SERCA spielt vor allem der Natrium/ Kalzium-Austauscher (NCX) durch den Abtransport der Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle bei der Relaxation der Herzmuskelzelle (8). Gesteigerte intrazelluläre Natriumkonzentrationen führen allerdings zu einer Richtungsumkehr im NCX (reverse mode), wobei Ca^{2+} -Ionen in die Zelle hineingepumpt und dadurch Nachdepolarisationen und Arrhythmien getriggert werden (8,77,78). Ursächlich für diese erhöhten intrazellulären Natriumkonzentrationen kann die CaMKII-abhängige Phosphorylierung spannungsabhängiger Natriumkanäle sein, was zu einem gesteigerten späten Natriumeinstrom führt (79). Ein gesteigerter späten Natriumeinstrom steht auch in Zusammenhang mit einem pro-arrhythmisch wirkendem vergrößerten diastolischen Kalziumleck (80,81), wobei beide als gegenseitige Verstärker fungieren (80).

1.6 Die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II

Die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche abhängig von ihrer Isoform in vielen verschiedenen Geweben, wie Herz-, Nerven-, oder Immungewebe exprimiert wird (82). Im Herzen ist dies vor allem die δ Isoform, wo sie durch Phosphorylierung von Kalziumkanälen und -transportern eine wichtige Rolle beim Ca^{2+} -Handling der Herzmuskelzellen spielt (8,83). Die CaMKII assoziiert zu zwei Komplexen mit je 6 Untereinheiten. Die CaMKII besteht aus einer katalytischen, einer regulatorischen, einer variablen und einer Assoziationsdomäne (84,85). Die Unterscheidung der Isoformen beruht vor allem auf Unterschieden in den letzten beiden Domänen (86). Eine Fehlregulation der CaMKII konnte in der Vergangenheit u.a. mit Morbus Alzheimer, dem Angelman Syndrom,

sowie kardialen Arrhythmien, Herzversagen und OSAS in Verbindung gebracht werden (3–6,87).

1.6.1 Regulation und Aktivierung der CaMKII

Im Ruhezustand bindet die katalytische Domäne der CaMKII an die regulatorische Domäne, wodurch die CaMKII inaktiv ist (sog. Autoinhibition). Um die CaMKII in einen aktiven Zustand zu versetzen, bindet ein Komplex aus Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) nun an die regulatorische Domäne, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und die im Ruhezustand bestehende Bindung der beiden Domänen aufgelöst wird (82,84). Dieser CaM-Komplex entsteht vor allem bei erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen (82). Durch andauernde Bindung des CaM-Komplexes an die CaMKII kommt es nun an benachbarten Untereinheiten zur Autophosphorylierung an Threonin 287. Dies steigert die CaM-Affinität der CaMKII um das 1000-fache (82), was auch nach Lösung der initialen CaM-Bindung zu einer fortlaufenden Aktivierung der CaMKII führt (82,84). Neben längerfristig erhöhten Ca^{2+} -Konzentration können auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch Oxidation von Methionin an Position 281 oder 282 einen solchen Zustand hervorrufen (88,89). Als weitere Mechanismen, welche zu einer vermehrten Aktivierung der CaMKII führen konnten in der Vergangenheit eine vermehrte β -adrenerge Stimulation, sowie eine vermehrte transmurale Wandspannung nachgewiesen werden (90,91).

1.6.2 Aufgabe und Pathophysiologie der CaMKII

Durch ihren regulierenden Einfluss auf Kanäle und Transporter des zellulären Kalziumhaushalts spielt die CaMKII eine entscheidende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung und Kalziumhomostase des Herzens (8,72,79,84).

Laut Anderson et al. scheint die CaMKII dabei vor allem für myokardiale Pathologie eine bedeutende Rolle zu spielen (92). Bei VHF und HF konnte eine gesteigerte Aktivität und Expression der CaMKII gezeigt werden (3–6,8,9,79,80,93).

Vermehrte CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 an Serin 2814 führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals mit diastolischem SR Ca^{2+} -Leck und konsekutiver Aktivierung eines Ca^{2+} -Einwärtsstroms via des NCX, wodurch

es vermehrt zu verzögerten Nachdepolarisationen (DADs) kommt (3,7,80,94), welche Herzrhythmusstörungen triggern (8). Neben der pro-arrhythmogenen Wirkung hat das SR Ca^{2+} -Leck dadurch auch eine ursächliche Wirkung für die kontraktile Dysfunktion (4,93,95).

Über Phosphorylierung des Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$ an Ser571 stimuliert die CaMKII den späten Natriumstrom (late I_{Na}) (81), welcher u.a. zu einer ROS-induzierten Arrhythmogenese beiträgt (89). Wie oben beschrieben kommt es durch die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration zu einer Richtungsumkehr im NCX mit konsekutiver Ca^{2+} -Überladung der Zelle (77). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass late I_{Na} und SR Ca^{2+} -Leck CaMKII-abhängig miteinander in Verbindung stehen und sich gegenseitig verstärken (80). Dabei konnten Sag et al. zeigen, dass auch eine Inhibition des late I_{Na} zu einer Verminderung eines CaMKII-induzierten SR Ca^{2+} -Lecks führte und DADS verringerte (80).

Wie oben bereits beschrieben führt die CaMKII über eine Phosphorylierung des LTCCs an Thr498 zu vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle mit konsekutiver Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und vermehrten pro-arrhythmogenen EADs (64–66).

1.6.3 Pathophysiologische Vorgänge bei Obstruktiver Schlafapnoe im Zusammenhang mit der CaMKII

Bei Obstruktiver Schlafapnoe kommt es immer wieder zu sich abwechselnden nächtlichen Phasen der Hypoxämie und Reoxygenierung, wodurch es zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt (29). Die nächtlichen Atemaussetzer können Aufwachreaktionen begünstigen, wodurch es zu einer Stimulation des β -adrenergen Systems kommt (29). Bei OSA konnten aufgrund der Atemwegs-Obstruktionen intrathorakale Druckschwankungen beobachtet werden, welche zu erhöhter transmuraler Wandspannung aufgrund schwankender Nachlast führen (29,96). Wie oben gezeigt, führen all diese Mechanismen auch zu gesteigerter Aktivierung der CaMKII (88–91). Wie bereits dargelegt konnte diese in der Vergangenheit mit der Pathogenese von VHF und HF in Zusammenhang gebracht werden (3–6,8,9,79,80,93), welche auch allgemein mit dem Obstruktiven Schlafapnoesyndrom assoziiert werden (2,7,13,36,47,50). Kürzlich konnten Lebek et al. nun eine atrial gesteigerte CaMKII Aktivität bei Patienten mit Schlafbezogenen

Atemstörungen nachweisen, welche, vermutlich durch Phosphorylierung des späten Natriumstroms auf zellulärer Ebene zu CaMKII-induzierten EADs und DADs und kontraktile Dysfunktion führte (6).

1.7 Das OSA Mausmodell

Bei der Obstruktiven Schlafapnoe (OSA) handelt es sich wie eingangs beschrieben um eine weltweit verbreitete Erkrankung mit schwerwiegenden Folge- und Begleiterkrankungen und hohen sozioökonomischen Auswirkungen (1,2,12–15). Bisherige Untersuchungen beschränkten sich jedoch auf ein natürlicherweise sehr heterogenes Patientenkollektiv, deren verschiedene Komorbiditäten als potenzielle Confounder die Interpretation der Untersuchungsergebnisse erschweren. Bestehende Mausmodelle waren zudem nicht in der Lage, das Gesamtbild der OSA abzubilden (10). Hier ist als Beispiel vor allem das New Zealand Obese mice Model zu nennen, welches sich u.a. durch vergrößerte Zungendiameter auszeichnet (97–99), was laut Schwab et al. als wichtigste, von Geschlecht und Alter unabhängige Determinante bei der Entstehung einer OSA gilt (17). So wurden bei diesem Mausmodell auch vermehrt Apnoen und Hypopnoe nachgewiesen (97–99), allerdings auch weitere Komorbiditäten (10) wie Bluthochdruck, sowie Glukose- und Fettstoffwechselstörungen, welche die Interpretation der Befunde wieder erschweren (100).

Um nun die genauen Mechanismen der Ätiologie und Pathogenese von Vorhofflimmern und HF bei OSA, sowie die Rolle der CaMKII in der Krankheitsentstehung genauer untersuchen zu können, entwickelte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Wagner ein neuartiges Mausmodell, welches sowohl die Aspekte der OSA abbildete, gleichzeitig aber auch keine potenziellen Störfaktoren wie Diabetes oder Übergewicht aufwies (10). Um eine Vergrößerung des murinen Zungenvolumen zu erreichen, injizierten Lebek et al. 100µl Polytetrafluoräthylen (PTFE) in die murinen Zungen, was in einer signifikanten Zunahme an detektierten Apnoen/h während der Schlafphase der Mäuse resultierte (siehe Abbildung 8) (10). Neben den Apnoen konnten sie auch ein vermehrtes Auftreten von inspiratorischen Flusslimitierungen (IFL, siehe Abbildung 8) messen (10).

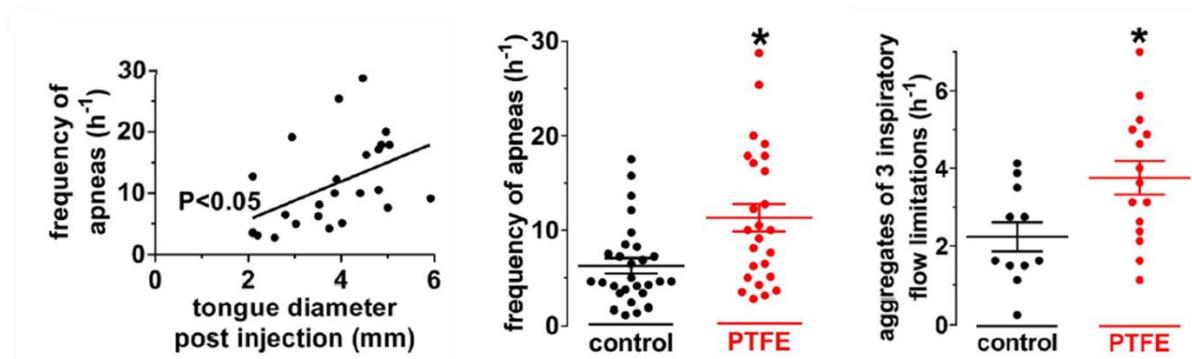


Abbildung 1.8 zeigt den Einfluss der Behandlung der murinen Zungen mit PTFE auf die Lungenfunktion der Mäuse. So konnten Lebek et al. zeigen, dass die Größe des Zungendiameters nach Behandlung nicht nur mit einer Zunahme an Apnoen/h korreliert (linkes Bild), sondern mit PTFE behandelte Mäuse generell mehr Apnoen zeigen (mittleres Bild). Auch die Anzahl gezeigter inspiratorischer Flusslimitierungen war nach Intervention signifikant erhöht (10). Abbildungen aus Lebek et al. (10)

Lebek et al. konnten mit echokardiographischen Messungen auch die mit OSA in zusammenhangstehende systolische und diastolische kontraktile Dysfunktion (13,47,50) in ihrem OSA Mausmodell nachweisen (10). So ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) bei operierten Tieren signifikant verringert im Vergleich zu nichtoperierten Kontroll-Mäusen (10). Der diastolische Marker E/e' korrelierte in den echokardiographischen Messungen von Lebek et al. mit der Frequenz der gezeigten Apnoen (siehe Abbildung 9) (10).

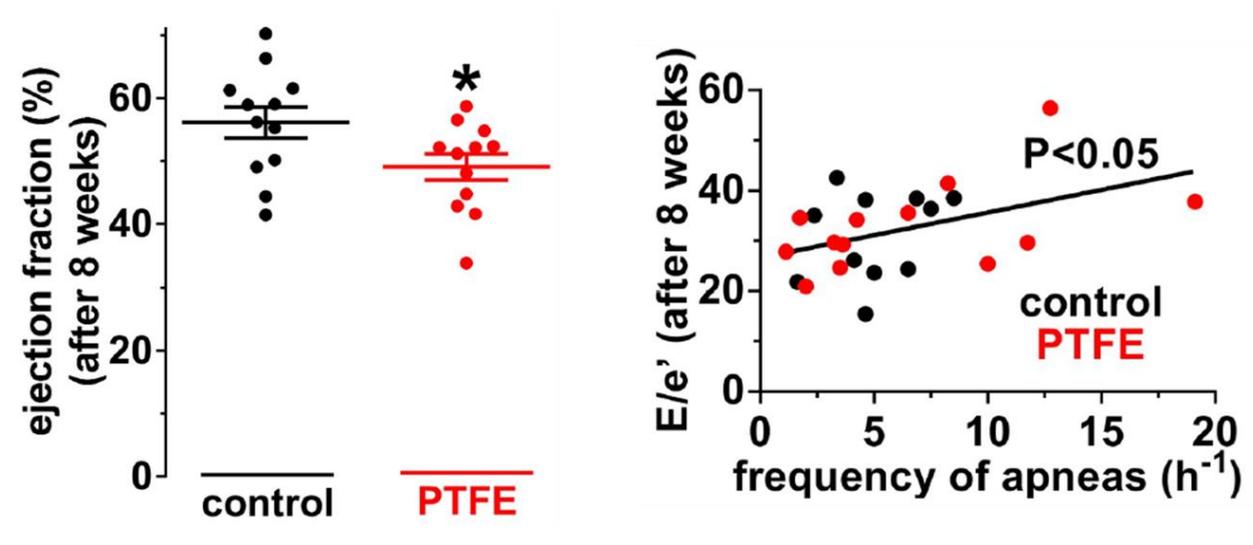


Abbildung 1.9: Mittels echokardiographischer Messungen konnten Lebek et al. zeigen, dass die LVEF bei mit PTFE operierten OSAS Mäusen signifikant reduziert ist,

während die mit den Apnoen ansteigenden Werte von E/e' ein Zeichen der diastolischen Dysfunktion sind. Abbildungen aus Lebek et al. (10)

Bei den im Versuch verwendeten Mäusen konnten Hegner & Lebek et al. mittels echokardiographischer Messungen nun zeigen, dass die LVEF der Tiere nach Intervention in Abhängigkeit des Genotyps erniedrigt war. So gab es vor Operation keine wesentlichen Unterschiede in der LVEF zwischen WT und CaMKII-KO Mäusen. In echokardiographischen Untersuchungen 8 Wochen nach PTFE-Behandlung zeigte sich nun die LVEF in der Gruppe der operierten WT Mäuse signifikant erniedrigt, ebenso im Vergleich mit den Tieren der WT CTRL Gruppe. Die operierten CaMKII-KO Mäuse hingegen zeigten keine signifikante Verschlechterung der LVEF gegenüber dem präoperativen Zustand oder den Kontrollmäusen (Abbildung 10) (11).

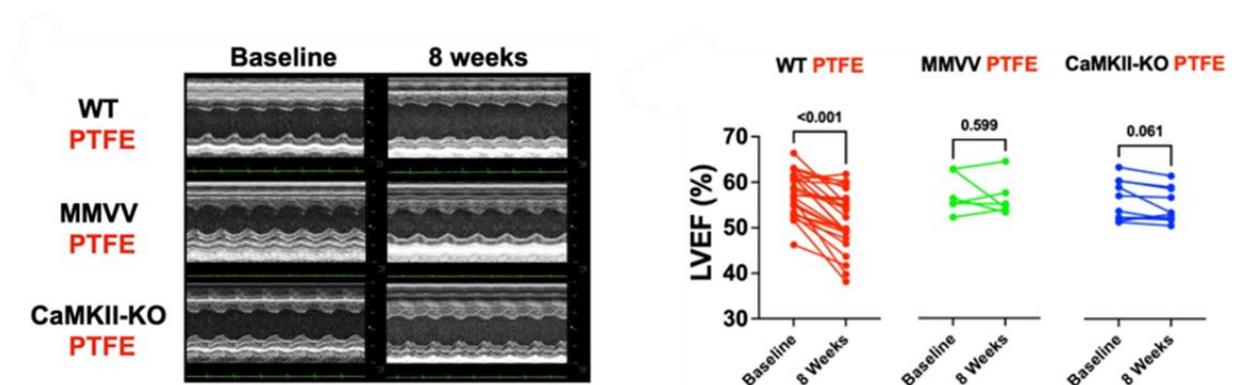


Abbildung 1.10: Echokardiographische Messung der Versuchstiere unmittelbar vor und acht Wochen nach der Operation. Die LVEF zeigte sich dabei nach PTFE-Intervention in der Gruppe der WT-Mäuse signifikant erniedrigt. Tiere mit einem CaMKII-KO hingegen schienen vor diesem Effekt geschützt. Abbildungen aus Hegner, Lebek et al. (11).

Zudem konnten Lebek et al. in ihrem neuen OSA Mausmodell nach PTFE-Injektion einen signifikanten Anstieg des Hypoxie Markers HIF1 α messen (10). Darüber hinaus konnten sie auch einen Anstieg der CaMKII-Expression feststellen, welcher sich sogar im Ausmaß abhängig von der Frequenz der Apnoen zeigte (10). Ein solche vermehrte Expression der CaMKII konnte in der Vergangenheit bereits sowohl bei Patienten mit VHF und HF (3–5), als auch bei an Obstruktiver Schlafapnoe Erkrankten gezeigt werden (3,6,10).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

An diesem Punkt setzt nun mein Forschungsvorhaben an. So soll anhand von Versuchen am Epifluoreszenzmikroskop die Rolle der CaMKII auf den zellulären Kalziumhaushalt und somit ihre kausale und mechanistische Bedeutung für die Arrhythmogenese und kontraktile Dysfunktion bei OSAS besser verstanden werden. Dazu habe ich neben Wildtyp (WT) auch spezielle CaMKII Knock-out (CaMKII-KO) Mäuse verwendet, sowie Ventrikel und Vorhof isoliert voneinander untersucht.

Zunächst sollen alle in den Versuch eingeschlossenen Mäuse, also sowohl operierte als auch Kontrolltiere 2 Wochen postoperativ ein Screening auf Schlafapnoe, sowie prä- und 8 Wochen postoperativ eine echokardiographische Untersuchung erhalten. Wir vermuten eine signifikante Zunahme der Apnoen und IFLs, sowie eine Verschlechterung der systolischen und diastolischen Herzfunktion. Diese Daten sollen später zu Korrelationen mit den Kalziumdaten herangezogen werden, um einen direkten Link zwischen klinischem Bild der Versuchstiere und CaMKII-abhängigem zellulären Kalziumhaushalt herzustellen.

Der erste Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Detektion OSA induzierter und CaMKII-abhängiger atrialer pro-arrhythmogener Ereignisse, welche auf ein gesteigertes diastolisches Kalziumleck zurückzuführen ist. Knock-Out (KO-) Mäuse dagegen, bei welchen die CaMKII nicht exprimiert wird, sollen von diesem Effekt geschützt sein.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit soll auf einer Untersuchung der bereits bei Patienten und auch im Mausmodell gezeigten OSA begleitenden systolischen Dysfunktion liegen (13,47,50). Wir haben die Hypothese, dass diese kontraktile Dysfunktion mit einem CaMKII-abhängig reduziertem SR Kalziumgehalt einhergeht, was anhand von Experimenten mit Koffein überprüft werden soll.

2. Material und Methoden

Wie bereits erwähnt, basiert mein Projekt auf einem neuartigen Mausmodell, welches in der Lage ist, die Aspekte der obstruktiven Schlafapnoe differenziert abzubilden und im Folgenden noch genauer beschrieben werden soll. Acht Wochen nach der Operation wurden die Myokardzellen schließlich isoliert und am Epifluoreszenzmikroskop und dem konfokalen Lasermikroskop hinsichtlich ihres basalen Kalziumhandlings analysiert.

2.1 Versuchstiere des Mausmodells

Alle im Projekt durchgeführten Tierexperimente wurden von der zuständigen Tierschutzbehörde, dem Ethikkomitee der Regierung von Unterfranken, Bayern, Deutschland genehmigt (Protokollnummer: 55.2-2532-2-512) und unter Berücksichtigung der „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des US National Institutes of Health durchgeführt (101). Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in den Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) des Universitätsklinikums Regensburg unter Standardbedingungen bei $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ Raumtemperatur, $55\pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Intervall von 12 Stunden. Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser war ad libitum.

Als Versuchstiere wurden spezielle CaMKII δ -Knockout Mäuse (CKO) verwendet, bei welchen nur die herzspezifische δ -Isoform der CaMKII deletiert ist, sowie deren Wildtyp (WT) Geschwistertiere. Als zusätzliche Wildtypen dienten Zuchtmäuse von Javier Laboratories. Sämtliche Versuchstiere waren männlich und zum Zeitpunkt der Aufnahme in den Versuch 8-12 Wochen alt.

2.1.1 Operation der Tiere

Um die gewünschte Verengung des Querschnitt Lumens der oberen Atemwege zu erreichen, wurde 15 Wildtyp- und 13 CKO-Mäusen 100 μl Polytetrafluoroethylen (PTFE; 35 μm ; Sigma Aldrich) in die Zunge injiziert. 13 Wildtyp- und 13 CKO-Mäuse dienten als Kontrollen. Die Zuteilung der zum Zeitpunkt der Operation 8-12 Wochen alten Versuchstiere in die OP- und nicht-operierte Kontrollgruppe erfolgte unvoreingenommen und auf rein zufälliger Basis. Die Operation der Tiere wurde von

meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Simon Lebek, Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg und dem Post-Doc Dr. med. Philipp Hegner, Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg, durchgeführt.

Vor der Operation wurden alle Versuchstiere, inklusive der der Kontrollgruppe, einmal gewogen. Eine Stunde vor dem Eingriff wurde den Tieren, um eine suffiziente Analgesie sicherzustellen, intraperitoneal Buprenorphin injiziert (0,1mg/kg Körpergewicht). Die Anästhesie erfolgte unter intraperitonealer Injektion von Metomidin (0,5mg/kg KG), Midazolam (5mg/kg KG) und Fentanyl (0,05mg/kg KG). Anschließend wurde die Maus in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert (Abbildung 1). Mittels einer Krokodilklemme wurde die Zunge so weit wie möglich aus der Mundhöhle mobilisiert, um optimalen Zugang zur Zungenbasis zu erzielen. 100µl PTFE wurden nun gleichmäßig auf verschiedene Depots verteilt in die Zunge injiziert (Abbildung 2) (10). So sollte ein ähnliches Ausmaß der Verengung der oberen Atemwege erreicht werden wie beim New Zealand Obese mice Modell, welches dort zu spontanen obstruktiven Apnoen führte (97). Während des gesamten Eingriffs über wurde die Temperatur der Versuchstiere mit einer rektalen Sonde überwacht. Eine zusätzliche Überwachung der Anästhesie erfolgte anhand von Elektrokardiogramm und Monitoring der respiratorischen Aktivität. Am Ende der Operation wurde die Analgesie durch erneute intraperitoneale Injektion von Apitamezol (2,5mg/kg KG), Flumazenil (0,5mg/kg KG) und Buprenorphin (0,1mg/kg KG) durchgeführt (10).

Aus Respekt vor dem Tierwohl und um unnötiges Leiden der Versuchstiere zu vermeiden, wurde in den folgenden Tagen nach der Operation täglich nach dem Wohlbefinden der Tiere gesehen. Dabei wurde vor allem auf eine Interaktion mit den anderen Tieren, normale Bewegung, normales Essverhalten und Fellpflege der Tiere geachtet. Die Beobachtungen wurden im Laborbuch notiert und Auffälligkeiten den Tierpflegern gemeldet. Bei abnormalem Verhalten wurden die Tiere umgehend getötet. Dies war vor allem auf OP-Komplikationen (Einblutungen in die Zunge, Infektionen an den Einstichstellen, etc.) zurückzuführen.



Abbildung 2.11: Narkotisierte Maus auf Heizplatte fixiert; Messung der Körpertemperatur mittels rektaler Sonde



Abbildung 12.2: Injektion von PTFE in die murine Zunge; Fixierung der Zunge mittels Krokodilklemme

2.1.1.1 Polytetrafluorethylen

Das Kunststoffpolymer Polytetrafluoräthylen (PTFE) wird bereits seit längerem als „Bulking Agent“ in der Plastischen Chirurgie und zur Therapie des vesikoureteralen

Refluxes verwendet und zeigte sich dabei als gut gewebeverträglich (102,103). 50mg PTFE (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), mit einer Dichte von 2,1g/ml eine solide Substanz, wurden mit Glycerol (Sigma Aldrich) zu 100µl (50% w/v) verdünnt. Diese Verdünnung enthält in etwa 24µl reines PTFE, was in etwa mit der angestrebten Volumenzunahme der Zunge der Versuchstiere um 20-25µl übereinstimmt (10).

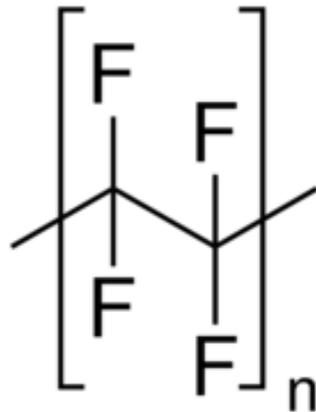


Abbildung 2.13: Strukturformel von Polytetrafluoräthylen; ©Sigma Aldrich

2.1.1.2 Sonographische Überprüfung des Zungendurchmessers

Bereits intraoperativ wurde mittels Ultraschalls (Frequenz des Schallkopfes: 30MHz, Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) stichprobenartig die Zunahme des Zungendiameters gemessen. Die Mäuse befanden sich dabei wie oben beschrieben in Rückenlage auf der Heizplatte, die Zunge wurde mittels Krokodilklemme fixiert. Um den dorso-ventralen Zungendurchmesser in der sagittalen Ebene zu bestimmen, wurde der Schallkopf zentral in der murinen Mundöffnung positioniert und anschließend zur Bestimmung des lateralen Zungenquerschnitts im Uhrzeigersinn um 90° senkrecht zur Hauptachse gedreht. Zur Feststellung des Zungengewebes und zur Unterscheidung von anderen murinen pharyngalen Strukturen, wurde die murine Zunge unter Ultraschall mit Hilfe der Krokodilklemme bewegt. Die Aufnahme der Ultraschallbilder fand unter Verwendung der Voreinstellung von VisualSonics statt (10,00mm x 15,36mm, 56 Aufnahmen/s, Gain 30dB) (10).

2.1.2 Transthorakale Echokardiographie der Versuchstiere

Um die Versuchstiere hinsichtlich diastolischer und systolischer Veränderungen hin zu untersuchen und um mögliche Dysfunktionen zu detektieren, wurden alle in den Versuch aufgenommen Tiere zu den Zeitpunkten kurz vor der Operation und acht Wochen nach der Operation einer transthorakalen echokardiographischen Untersuchung unterzogen. Die Echokardiographien wurden verblindet von einer erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiterin der Forschungsgruppe (Dr. Susanne Klatt) durchgeführt. Als Ultraschallgerät wurde auch hier der Vevo 3100 Visualsonics Fujifilm MX400 (30MHz, Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) genutzt. Die Untersuchung fand unter Narkose statt. Dazu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran (2%, Isofluran Inhalationsgerät, VisualSonics, Toronto, Kanada) narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Untersuchung wurde 1,5%iges Isofluran verwendet. Über den gesamten Zeitraum der Untersuchung hinweg, in welchem die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert wurden, wurden die Vitalparameter mittels EKG und rektaler Sonde zur Überwachung der Körpertemperatur überwacht. Die Aufnahmen (200 Bilder/s) wurden sowohl in der Perspektive für die lange als auch für die kurze Achse im M-Mode gemacht. Da dort ein eindimensionales Bild über die Zeit abgeleitet wird, gibt dieser einen Eindruck über die Dimension des Herzens im systolischen und diastolischen Herzrhythmus (104). Dabei wurde besonders auf die Erfassung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) als Marker der systolischen Funktion, sowie auf die Messung von E/\dot{e} als Marker der diastolischen Dysfunktion geachtet. Frühe (E) und späte (A) diastolische Füllungsgeschwindigkeiten wurden mit Pulsed-Wave Doppler (PW-Doppler), frühe diastolische (\dot{e}) und späte diastolische (\dot{a}) Bewegungen auf Höhe des Mitralklappenrings mittels Gewebsdoppler gemessen.

2.1.2.1 Auswertung der transthorakalen Echokardiographien

Die Auswertung (VevoLab) der Aufnahmen aus der echokardiographischen Untersuchung wurde zunächst von mir und im weiteren Verlauf mit freundlicher Unterstützung von Andrea Ochsenkühn, einer MTA aus der Arbeitsgruppe vorgenommen. Dabei wurde darauf geachtet immer Aufnahmen auszuwerten, bei welchen die murine Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Aufnahme nicht außerhalb von

400-500 Schlägen pro Minute lag. Zudem wurde für die Auswertung ein Bereich gesucht, welcher keine Atmung, dafür aber mindestens drei Herzschläge umfasste.

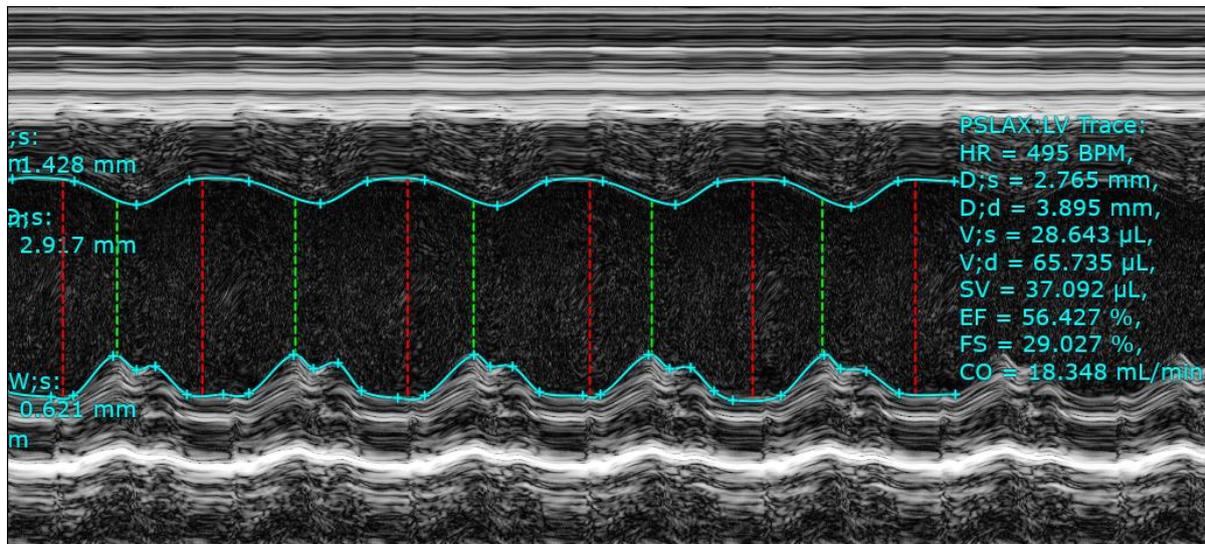


Abbildung 2.14: Aufnahme und Auswertung eines murinen linken Ventrikels im M-Mode

2.1.3 Ganzkörperplethysmographien

Zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der Operation wurden alle in den Versuch aufgenommen Tiere, also auch die Kontrollen, einer Ganzkörperplethysmographie (Buxco Electronics, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA) unterzogen. Dadurch sollten sie hinsichtlich ihres spontanen Atemverhaltens untersucht werden, also gezeigte Apnoen und inspiratorische Flusslimitierungen (IFLs) detektiert werden (FinePoint Software, Version 2.4.6.9414). Zudem wurde alle Tiere vor der Untersuchung erneut gewogen.

2.1.3.1 Aufbau des Buxco Setups

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von acht Stunden in eine Druckmesskammer (9x8cm) gesetzt. Diese bestand aus einem Bodenteil mit Anschluss für eine Luftabsaugevorrichtung (0,2 Liter pro Minute, Buxco bias flow Regulator). Der Deckel beinhaltete einen Anschluss für die Ganzkörperplethysmographie (Buxco) und eine Öffnung für eine Trinkflasche, welche durch einen Hartgummi luftdicht abgedichtet war. Um die Versorgung der Mäuse mit Nahrung während der Messungen

sicherzustellen war zudem in jeder Kammer ausreichend Futter für den Zeitraum der Messung vorhanden. Um eine zu hohe Luftfeuchtigkeit in der Kammer durch z.B. Urinabgang zu verhindern war der Boden der Plethysmographiekammer mit kleinen Holzspänen ausgelegt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte entsprechend den Richtlinien des Herstellers.

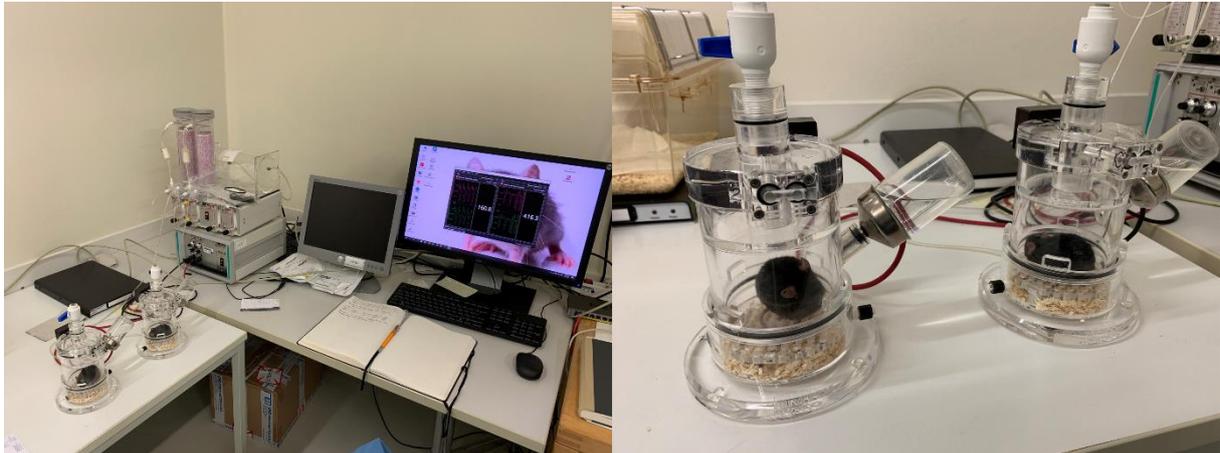


Abbildung 2.15: Überblick über den Aufbau des Plethysmographen (Buxco Setup) mit Druckkammern (rechtes Bild), Luftabsaugevorrichtung und Messinstrumenten während einer Messung

2.1.3.2 Durchführung der Ganzkörperplethysmographie

Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, wurden die Messungen tagsüber ab circa 8-9 Uhr morgens über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt. Laut Crossland et al. 2013 ist in diesem Intervall von circa 9 Uhr morgens bis 17 Uhr nachmittags die Häufigkeit und Dauer der Schlafphase der Tiere am höchsten (105). Um dies nochmals zu überprüfen, führten Lebek et al. Plethysmographien von Schlafapnoemäusen probeweise nachts (während der Wachphase der Tiere) durch und konnten dort eine ähnliche Atemaktivität bei gesunden und kranken Tieren, sowie nur geringe Anzahl an IFLs feststellen (10). Um einen suffizienten Schlaf der Tiere zu gewährleisten, wurde die Messkammer zum Schutz vor visuellen Störfaktoren etwas abgedeckt, jedoch darauf geachtet, dass es nach wie vor hell ist und genügend Tageslicht zu den Mäusen durchdringt. Außerdem wurde darauf geachtet, die Messungen in möglichst ruhigem Umfeld durchzuführen, um auch die Wahrscheinlichkeit akustischer Störfaktoren weitestgehend zu reduzieren.

2.1.3.3 Auswertung der Ganzkörperplethysmographien

Die Analyse und Detektion der inspiratorischen Flusslimitierungen (IFLs) und Apnoen wurde mit der FinePoint Software (Version 2.4.6.9414) durchgeführt.

Für die Berechnung der IFLs wurde für jeden einzelnen Atemzug von FinePoint das Verhältnis von Inspirationszeit und Tidalvolumen berechnet. Ein Atemzug wurde dann als inspiratorisch flusslimitiert definiert, wenn dieses Verhältnis um 2,576 Standardabweichungen im medianen Vergleich der letzten 100 Atemzüge erhöht war. Dies entspricht einem Konfidenzintervall von 99%. Eine Zunahme an IFLs zeigte sich also immer dann, wenn entweder die Inspirationszeit verlängert oder aber das Tidalvolumen erniedrigt war. Um falsch positive Werte zu vermeiden, definierten Lebek et al. einen inspiratorischen Atemstrom nur dann als flusslimitiert, wenn, gemittelt auf die 100 letzten Atemzüge, der Atemstrom in der Spitze um mindestens 2,576 Standardabweichungen verringert war (10). Die Anzahl der gezeigten IFLs ergab sich dann aus der absoluten Frequenz (/h) und der proportionalen Frequenz (%) und wurde wiederum ins Verhältnis mit der gesamten Messdauer (/h) gesetzt.

Die Apnoen wurden mit Hilfe eines automatischen Algorithmus (apnea analysis module von FinePoint) detektiert, wobei eine Apnoe als ein Atemaussetzer von mindestens einer Sekunde definiert wurde (10). Auch hier wurde die Anzahl der gezeigten Apnoen wieder ins Verhältnis zur Messdauer (/h) gesetzt.

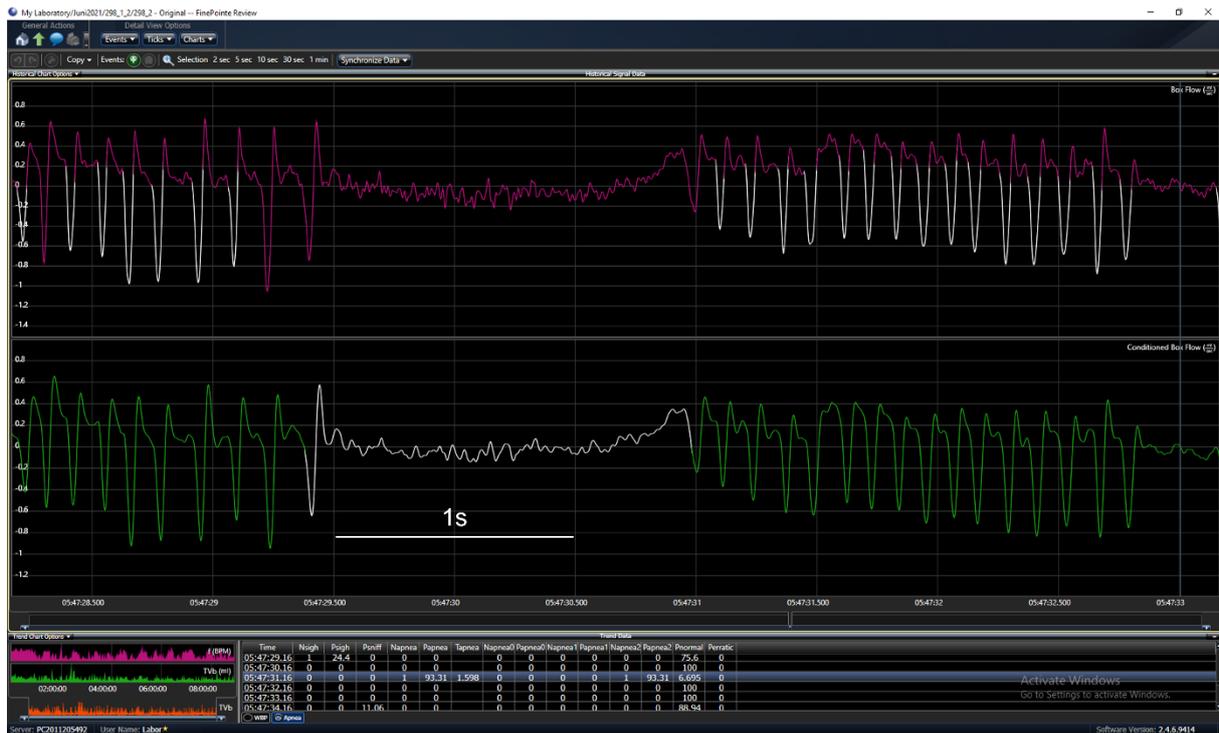


Abbildung 2.16: Modifizierte Detektion einer Apnoe einer operierten Wildtyp Maus aus der FinePointe Software (Version 2.4.6.9414). Eine Apnoe wurde definiert als jeder Atemaussetzer länger als eine Sekunde.

2.2 Isolation atrialer und ventrikulärer Herzmuskelzellen

Acht Wochen nach der Operation wurden die Mäuse erneut gewogen und die Organe entnommen. Während die murinen Lebern, Nieren, Lungen und Gehirne zu späteren Forschungszwecken bei -80°C weggefroren wurden, wurden die Herzmuskelzellen für experimentelle Einzelzellversuche isoliert. Die am Ende des Versuchstages übrig gebliebenen Myokardzellen wurden für spätere Western Blot und qPCR Experimente weggefroren. Vor der Organentnahme wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet. Für den Verdau des Herzens wurde eine Langendorff-Perfusionsanlage (Abbildung 5) verwendet. Für den 7-8 Minuten andauernden Verdau wurden die Koronargefäße des Herzens mit einer Enzymlösung (siehe Tabelle 1), welche die Liberase™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Trypsin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) enthält, durchspült. Dies erfolgte retrograd über die Aorta. Anschließend wurde das Herz von der Langendorff-Perfusionsanlage genommen und zunächst mechanisch mit einer Schere zerteilt, danach durch Auf- und Abpipettieren in der Stopflösung 1 (siehe Tabelle 2) für die Enzyme mit 10% BCS

(bovine calf serum, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) aufgelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde nun mittels einer Nylongaze mit einem Porendurchmesser von 200µm filtriert. Die Zellisolation wurde für Vorhof- und Ventrikelzellen getrennt voneinander durchgeführt.

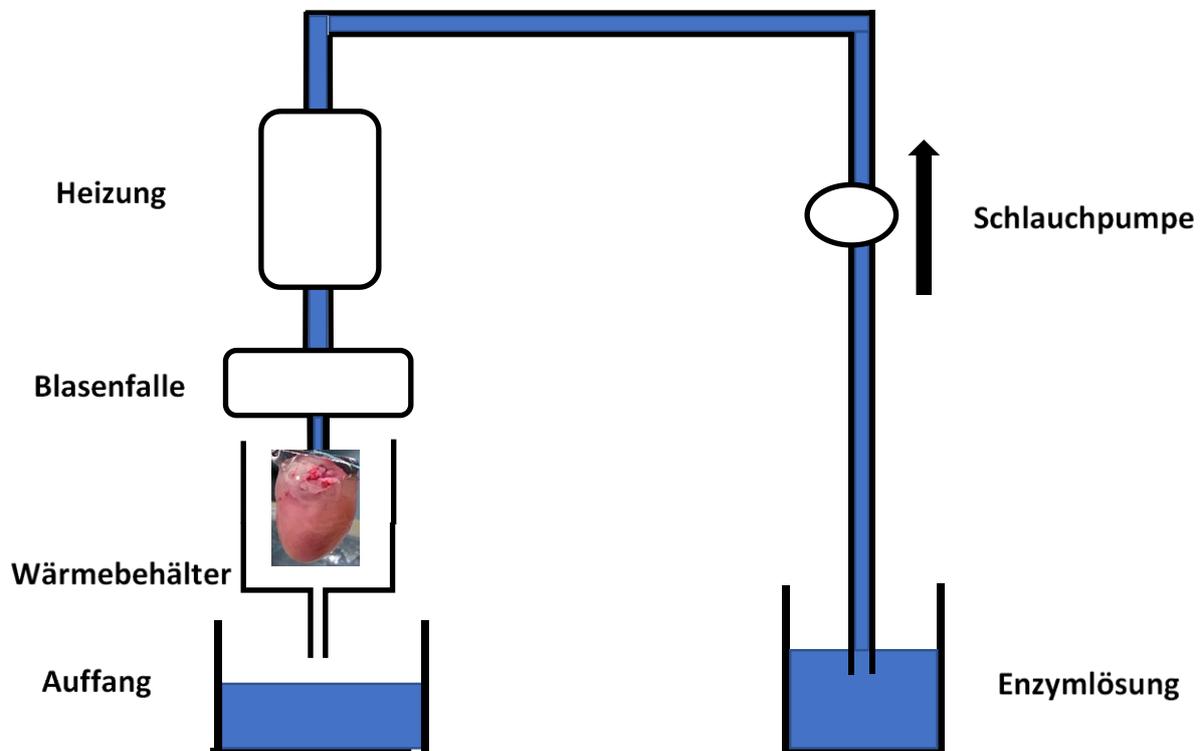


Abbildung 2.17: Schematischer Aufbau des Langendorff-Perfusionsapparates

Da die Zellisolation in einer Ca^{2+} -freien Lösung durchgeführt wurde, mussten die Einzelzellen nun erst wieder an das Ca^{2+} -Niveau der Messtyrode (1, bzw. 2mM Ca^{2+}) gewöhnt werden. Dazu wurden sie einem Kalziumaufbau zugeführt, bei welchem der Ca^{2+} -Gehalt schrittweise von 0,1mM auf 0,8mM, bzw. 1,4mM (für 2mM Ca^{2+} -Lösung) erhöht wurde. Für den Kalziumaufbau wurde die Stopplösung 2 (siehe Tabelle 3), sowie 100mM CaCl_2 verwendet. Um die schnellen absinkenden intakten und gesunden Zellen von den kaputten und sterbenden Zellen zu trennen, wurde zwischen den einzelnen Schritten ([0,1], [0,2], [0,4], [0,8], [1,4]) jeweils 7 Minuten gewartet und anschließend der Überstand abpipettiert. Um eine gute Haftung der Myozyten auf den Messkammern und somit gute Messbedingungen zu gewährleisten, wurden die Kammern vor der Ausplattierung der Zellen (400µl Zellsuspension pro Kammer) mit Laminin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; 3,5µl pro Kammer) beschichtet.

Damit die Zellen gut anheften können, wurde anschließend mindestens 15 Minuten gewartet.

Tabelle 1: Enzymlösung für Zellisolation

| Substanz | M [g/mol] | V | m | C soll [mmol/l] | C soll [nmol/l] | % |
|------------------------|-----------|-----------------------------|---|-----------------|-----------------|------------|
| 1x Tyrode | | 20ml | | | | |
| Liberase TM | | 150µl entspricht 0,75 mg | | | | |
| Trypsin 10-fach, 2,5% | | 100µl | | | | 0,013 9 |
| 10mM CaCl ₂ | 110,98 | 25µl | | 0,0125 | 12,5 | |

Tabelle 2: Stopplösung 1 für Zellisolation

| Substanz | M [g/mol] | V | C soll [mmol/l] | C soll [nmol/l] | W soll [%] |
|-------------------------|-----------|---------|-----------------|-----------------|------------|
| 1x Tyrode | | 2,25ml | | | |
| Bovine calf serum (BCS) | | 0,25ml | | | etwa 10 |
| 10mM CaCl ₂ | 110,98 | 3,125µl | 0,0125 | 12,5 | |

Tabelle 3: Stopplösung 2 für Zellisolation

| Substanz | V [ml] | W soll [%] |
|-----------|--------|------------|
| 1x Tyrode | 23,75 | |
| BCS | 0,75 | etwa 5 |
| V ges | 25 | |

Tabelle 4: Enzymlösung für Kalziumaufbau

| Substanz | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------|------------------------------|
| V Stopplösung 2 [ml] | 5 | 5 | 5 | 10 | 4,75ml + 0,25µl BCS | 9,50ml + 0,50µl BCS |
| V 100mM CaCl ₂ [µl] | 5 | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 |
| C soll [mmol/l] | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 |

2.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff FURA-2, AM ermöglicht eine Analyse hinsichtlich der Veränderung des basalen diastolischen und systolischen Ca²⁺-Gehalts unter elektrischer Stimulation. Des Weiteren gibt sie Aufschluss über Amplitude und Abfallkinetik des Ca²⁺-Transienten

und ermöglicht mittels Koffeinexperimente Rückschlüsse über den Ca^{2+} -Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Zusätzlich kann durch Messung der Sarkomerlängenverkürzung auch die Kontraktionsfähigkeit der Zelle abgebildet werden.

2.3.1 Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops

Das Epifluoreszenzsetup (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA) ist systematisch in Abbildung 8 dargestellt. Um die Zellen in der Kammer auf dem Objektträger zur Fluoreszenz anzuregen, wird das kurzwellige Licht einer UV-Lampe über einen dichroitischen Spiegel, welcher nur für Wellenlängen zwischen 540 und 580nm durchlässig ist, auf das Objekt reflektiert. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht, sowie das Durchlicht der Myozytenkamera dagegen werden von dichroitischen Spiegeln durchgelassen und an den Photomultiplier weitergeleitet. Ermöglicht wird dies durch die kritische Wellenlänge der Spiegel, welche dafür sorgt, dass Licht im Bereich kleinerer Wellenlängen, wie das Anregungslicht, reflektiert werden, wohingegen länger-welliges Licht wie die emittierte Fluoreszenzstrahlung durchgelassen wird. Mit Hilfe des Hyperswitch-Spiegels ist es bei ratiometrischen Farbstoffen wie FURA-2 AM möglich, schnell zwischen zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen zu wechseln. Am Photomultiplier, welchem ein weiterer Filter vorgeschaltet ist, wird das Signal verstärkt und in Spannung umgewandelt, bevor anschließend die Messdaten vom Fluoreszenz System Interface in computerlesbare Daten umgeschrieben werden. Mit Hilfe des Programms Ion Wizard (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA) können nun Sarkomerlängenverkürzungen und Ca^{2+} -Transienten als Maß für intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen aufgezeichnet werden. Der Myopacer ermöglicht eine Stimulation der Myozyten bei verschiedenen Frequenzen und Stromstärken (es wurde bei allen Messungen mit 20V stimuliert), wodurch eine Kraft-Frequenz-Beziehung gemessen werden kann.



Abbildung 2.18: Beispielhafte Darstellung eines Epifluoreszenzsetups von IonOptix mit Mikroskop (1), Hyperswitch (2), Myozyten-Kamera und Photomultiplier (3), Myopacer (4), Fluoreszenz System Interface (5) und Computerprogramm Ion Wizard mit Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerlängerverkürzung (6). Abbildung modifiziert nach <https://www.ionoptix.com/products/systems/>, © IonOptix Stand 18.08.2021

2.3.2 Der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff FURA-2 AM

Für die Messungen der Ca^{2+} -Transienten wurde der ratiometrische Farbstoff FURA-2 AM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ausgewählt. Der Vorteil des ratiometrischen Farbstoffes ist, dass er zum einen eine hohe Affinität für intrazelluläres Kalzium besitzt, zum anderen mit 2 Wellenlängen angeregt wird und somit 2 Emissionswellenmaxima besitzt, von welchen das eine abhängig von der Ca^{2+} -Beladung, das andere von der Ca^{2+} -Bindung ist. So wird Ca^{2+} -gesättigtes FURA-2 AM bei einer Wellenlänge von 340nm (F) angeregt, freies bei 380nm (F0). Über Bestimmung des Verhältnisses F/F0 kann somit eine Aussage über die freigesetzte Kalziummenge getroffen werden. Dies ermöglicht eine gute Messbarkeit der Diastole und der Systole, weshalb der Farbstoff FURA-2 AM ausgewählt wurde.

FURA-2 AM fungiert dabei als Chelatbildner, welcher mit Ca^{2+} -Ionen Komplexe bildet, wodurch die Eigenschaften von Fura-2 AM qualitativ und quantitativ hinsichtlich

Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge und Emissionsintensität verändert werden. Dadurch unterscheiden sich die Fluoreszenzsignale der Chelatkomplexe deutlich von den Fluoreszenzsignalen des freien Farbstoffes, viel wichtiger aber auch von der Eigenfluoreszenz der Zellen, welche deutlich niedriger liegt. FURA-2 ist an den Azetoxymethylester (AM) gekoppelt, dessen lipophile Eigenschaften die Membranpermeabilität des Farbstoffes erhöhen und ein Eindringen in die Zelle durch passive Diffusion ermöglichen. Dort werden die Esterreste von zelleigenen Esterasen abgespalten, wodurch der Farbstoff hydrophil wird und somit in der Zelle verbleibt.

Ratiometrische Farbstoffe führen durch Bindung an die Ca^{2+} -Ionen zu einer Verschiebung des Exzitations- oder Emissionsmaximums, dem sogenannten Spektral-Shift. Im Falle von FURA-2 AM verschiebt sich dabei bei höherer Ca^{2+} -Konzentration das Absorptionsmaximum, während das Emissionsmaximum unverändert bleibt (510nm).

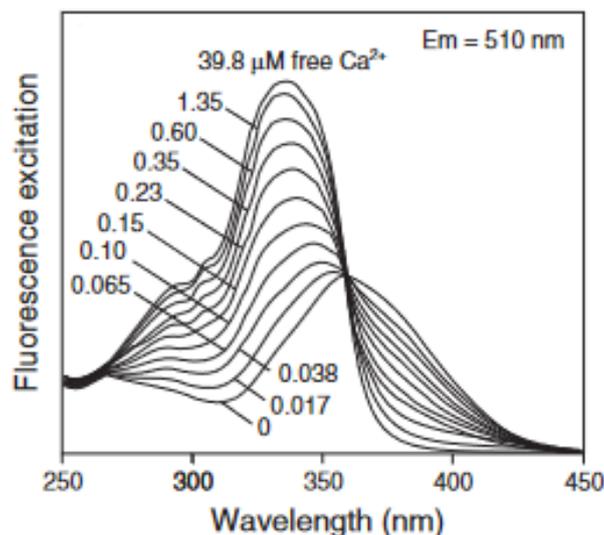


Abbildung 2.19: Fluoreszenzemissionsspektrum von FURA-2, AM; Modifiziert nach ©Thermo Fisher Scientific

2.3.3 Versuchsdurchführung

Die Zellen in den Messkammern wurden zunächst mit 250 μl eines 5 μM FURA-2 AM Farbstoffgemisch für 15 Minuten inkubiert. Für die Herstellung dieses Farbstoffgemisches wurde ein FURA-2, AM Farbstoffcup zunächst mit 44,4 μl DMSO versetzt, wodurch dieses lichtempfindlich wurde. Davon wiederum wurden 2,5 μl mit

500µl Normaltyrode (Tabelle 5) zum Farbstoffgemisch vermischt. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde der Farbstoff abgekippt und die Perfusion mit Normaltyrode bei 37°C gestartet. Die Normaltyrode stellte gleichzeitig das Messmedium dar und hatte je nach Versuchsaufbau eine Ca^{2+} -Konzentration von 1 bzw. 2mM. Nach einer Einschlagzeit von 3 Minuten erfolgte die Messung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerlängen mit Hilfe des Programm Ion Wizard (Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA). Im sogenannten Kontraktilitätsprotokoll, welches unter Bedingungen von 1mM $[\text{Ca}^{2+}]$ durchgeführt wurde, wurden die Zellen zunächst bei 1Hz bis zum Einstellen eines Steady-States stimuliert. Anschließend wurde diese für einen Zeitraum von 30 Sekunden für einen sogenannten Post-Pause-Test pausiert, um so Rückschlüsse auf ein mögliches SR- Ca^{2+} -Leck zu bekommen. Nach der Stimulationspause wurden die murinen Myozyten mit 2Hz und dann mit 4Hz stimuliert, jeweils, bis sich ein Steady-State einstellte. Zuletzt wurden die Zellen wieder mit 1 Hz bis zur erneuten Einstellung eines Steady-State stimuliert. Der SR Ca^{2+} -Gehalt wurde nun durch rasche Applikation von 10µM Koffein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, US) (Tabelle 6), welches zu einer abrupten Öffnung der Ryanodinrezeptoren führt, gemessen.

Im zweiten am Epifluoreszenzmikroskop gemessenen Versuchsprotokoll wurden die Bedingungen nun auf eine Ca^{2+} -Konzentration von 2mM angehoben. Zudem wurden die Zellen für 30 Minuten mit 10µM Isoprenalin inkubiert. Isoprenalin ist ein Sympathomimetikum und Noradrenalin-Derivat. Die hergestellte Stocklösung (Tabelle 7) wurde lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Durch diese veränderten Bedingungen sollten Arrhythmien provoziert und eine vermehrte pro-arrhythmische Aktivität in WT Schlafapnoemäusen detektiert werden. Nach einer 5-minütigen Stimulation unter 1Hz wurde diese für 30 Sekunden pausiert und anschließend für 30 Sekunden fortgesetzt.

Die Versuche wurden an jeder Maus sowohl für Ventrikel-, als auch für Vorhofzellen exakt gleich durchgeführt. Die Auswertung der Arrhythmien erfolgte manuell durch Zählen. Dabei wurde jede Abweichung von der diastolischen Ca^{2+} -Baseline als pro-arrhythmische Aktivität gewertet. Die Auswertung der Ca^{2+} -Transienten und der Sarkomerlängenverkürzungen erfolgte mit Hilfe des Programms Ion Wizard (Version 6.3; Ion Optix Corporation, Westwood, MA, USA).

Tabelle 5: Normaltyrode

| Volumen | Konzentration | Stoff | Molares Gewicht | 10x-Stock | 1x-Stock |
|--|---------------|------------------------------|-----------------|-----------|-----------------|
| Gesamtvolumen 1L pH 7,4 bei 37°C | 140mM | NaCl | 58,44 | 81,816 g | 100ml 10x-Stock |
| | 4mM | KCl | 2,9824 | 2,9824 g | |
| | 1mM | MgCl ₂ | 0,9521 | 0,9521 g | |
| | 5mM | HEPES | 11,9155 | 11,9155 g | |
| | 10mM | Glukose | 180,16 | | 1,8016 g |
| | 1/2mM | CaCl ₂ [mol/l] | 1 | | 1000/2000µl |

Tabelle 6: Koffeintyrode

| Volumen | Konzentration | Stoff | Molares Gewicht | 1x-Stock |
|-----------------------|---------------|---------------------------|-----------------|----------|
| Gesamtvolumen 0,1L | 10x | 10x-Stock | | 10ml |
| | 10mM | Caffeine | 194,2 | 0,1942 |
| pH 7,4 bei 37°C | 10mM | Glukose | 180,16 | 0,18016 |
| | 2mM | CaCl ₂ [mol/l] | 1 | 200 µl |

Tabelle 7: Herstellung der Stocklösung für Isoprenalin

| | | | |
|-------------------------|---|--------------------|-----------------------------|
| Stamm1 10mM | 74,31mg | Isoprenalinchlorid | |
| | → in 30ml | ASC-Tyrode | |
| | ASC-Tyrode pH=7,4 bei 37°C Lichtgeschützt aufbewahren | 250ml | NT 1x, 2mM Ca ²⁺ |
| | | 125mg | Ascorbinsäure |
| | | 1,25µg | HCl (37%) |
| Stamm 2 10 µM | 20µl | Stamm 1 Lösung | |
| | 10ml | ASC-Tyrode | |

2.4 Datenauswertung und Statistik

Durchführung und Auswertung der Versuche geschahen unter verblindeten Bedingungen hinsichtlich Genotyps (CaMKII-KO vs. WT) und Gruppe (CTRL vs. PTFE) der Versuchstiere. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Sämtliche Daten werden dabei als Mittelwert pro Maus ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) gezeigt. Der Standardfehler wird mit folgender Formel berechnet:

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

σ^2 = Varianz, σ = Standardabweichung, n = Stichprobengröße.

Für die statistische Auswertung zweier normalverteilter Gruppen wurde der ungepaarte Student t Test verwendet, für den Vergleich mehrerer Gruppen eine einseitige Varianzanalyse (one-way ANOVA mit Holm-Sidák post-hoc Korrektur). Lineare Korrelationen zwischen zwei Variablen wurden mittels linearer Regressionsanalysen getestet. Als statistische signifikant wurde ein p-Wert <0.05 angenommen.

3. Darstellung der eigenen Untersuchungen („Ergebnisse“)

Einige der im Folgenden dargelegten Ergebnisse konnten bereits im Rahmen einer Co- Autorenschaft publiziert werden. Demnach lieferte die vorliegende Promotion einen wesentlichen Beitrag für den Artikel „CaMKII-Dependent Contractile Dysfunction and Pro-Arrhythmic Activity in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea“, welcher 2023 im Antioxidants (Impact Factor 7,0) veröffentlicht wurde (11).

Um das Krankheitsbild der Obstruktiven Schlafapnoe möglichst spezifisch und isoliert abzubilden, wurde den für diese Arbeit verwendeten Tieren 100µl Polytetrafluorethylen in das pharynxnahe Bindegewebe injiziert. Sonographische Messungen zeigten dabei eine signifikante Zunahme des Zungendiameters von (in mm) $3,7 \pm 0,1$ auf $5,1 \pm 0,1$ nach PTFE-Injektion ($n=23$, $p<0.0001$, Abbildung 3.1). Als Vergleichsgruppe dienten nicht behandelte Mäuse der Kontrollgruppe. Um die Bedeutung der CaMKII für die Arrhythmogenese und kontraktile Dysfunktion, sowie für systolisches und diastolisches kardiales Kalziumhandling generell besser zu beurteilen, wurden für die Versuche C57BL/6 Wildtypmäuse (WT) und CaMKII δ -Knock-out Mäuse (CKO) verwendet, welchen die am Herzen besonders stark exprimierte δ -Isoform fehlt.

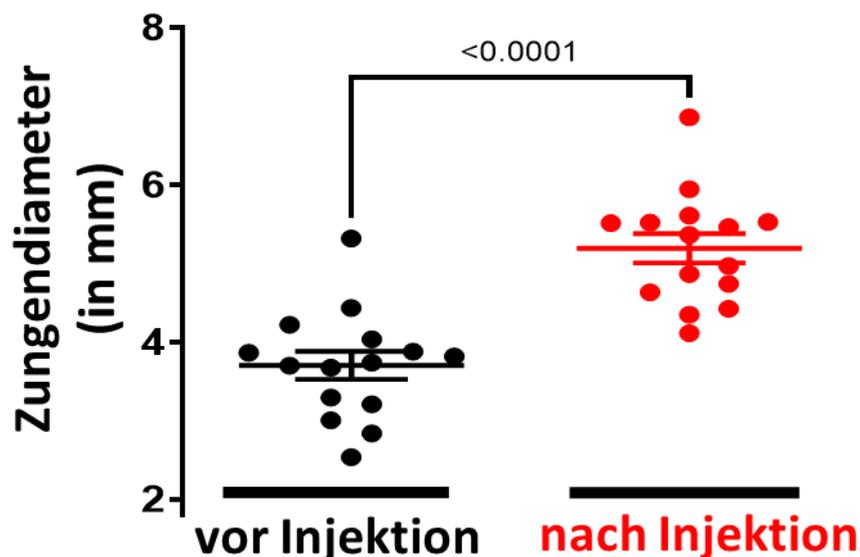


Abbildung 3.1: Nach Behandlung der Versuchstiere mit 100µl Polytetrafluorethylen konnte eine signifikante Zunahme des Zungendiameters beobachtet werden, unabhängig vom Genotyp der Mäuse.

3.1. Apnoen und Inspiratorische Flusslimitierungen

Zunächst wurden 2 Wochen nach PTFE-Behandlung der Tiere die Atemflusskurven der Versuchstiere mit Hilfe der FinePoint Software (Version 2.4.6.9414) auf gezeigte Apnoen und inspiratorische Flusslimitierungen (IFL) hin analysiert und ins Verhältnis zur Messdauer (pro h) gesetzt. In Einklang mit unserer Theorie, dass die PTFE-Injektion in das Pharynx nahe Bindegewebe durch eine Verdickung der Schlundmuskulatur zu vermehrten Atemaussetzern führt, konnten wir eine signifikant positive Korrelation zwischen der Dicke des Zungendiameters und den gezeigten Apnoen/h beobachten ($p=0.046$, $r^2=0.19$, Abbildung 3.2).

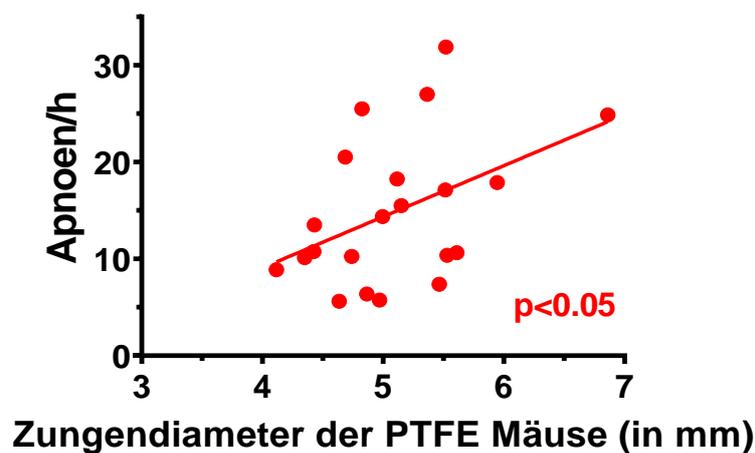


Abbildung 3.2: Die Dicke des Zungendiameters in den mit PTFE behandelten Tieren korrelierte direkt mit den gezeigten Apnoen/h.

3.2 Atriale Arrhythmien und atriales Kalziumhandling

3.2.1 Frequenzunabhängige CaMKII-abhängige atriale pro-arrhythmische Ereignisse unter Standardmessbedingungen

Spannenderweise konnte bereits bei Standardmessbedingungen mit 1mM Kalzium und Stimulation mit 1Hz in der WT-Gruppe eine signifikante Zunahme pro-arrhythmischer Ereignisse von (in s^{-1}) 0.02 ± 0.01 in der Kontrollgruppe auf 0.06 ± 0.04 in der mit PTFE behandelten Gruppe beobachtet werden ($n=12$ vs. 13 , $p=0,004$ mittels ANOVA, Abbildung 3.3 B). Als pro-arrhythmische Event wurde jede Abweichung von der diastolischen Kalziumbaseline zwischen zwei regulären Transienten und jeder

zusätzliche, nicht-stimulierte Transient gewertet (Beispiel siehe Abbildung 3.3 A). Ähnliche Resultate konnten wir auch bei höheren Stimulationsfrequenzen (2 und 4Hz) beobachten (Abbildung 3.3 C, D). Bei einer Stimulationsfrequenz von 2Hz konnten wir eine signifikante Vermehrung der pro-arhythmischen Ereignisse auf (in s^{-1}) $0,1\pm 0,08$ in der WT PTFE Gruppe von $0,05\pm 0,04$ in der Kontrollgruppe beobachten ($n=14$ vs. 9 , $p=0,035$). Unter 4Hz stieg die Anzahl pro-arhythmischer Ereignisse (in s^{-1}) von $0,04\pm 0,03$ in der WT CTRL-Gruppe auf $0,12\pm 0,09$ in der Gruppe der mit PTFE behandelten Wildtypen an ($n=9$ vs. 14 , $p=0,007$). Zudem zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der pro-arhythmischen atrialen Ereignissen mit den gezeigten inspiratorischen Flusslimitierungen pro Stunde ($p=0,03$, $r^2=0,24$; Abbildung 3.3 E). Ein ähnlich starker Trend konnte in der Korrelation der pro-arhythmischen Events mit den Apnoen/h beobachtet werden ($p=0,06$, $r^2=0,18$, Abbildung 3.3 F).

Im Gegensatz zu unter mit Isoprenalin provozierten Bedingungen, welche im folgenden Abschnitt dargestellt werden, wurde unter Standardmessbedingungen in der CKO-Gruppe keine Zunahme an atrialen pro-arhythmischen Ereignissen nach PTFE-Intervention beobachtet und die Anzahl solcher Events war unter allen Stimulationsfrequenzen (1, 2, 4Hz) bei den CKO PTFE-Mäusen signifikant niedriger als in der operierten Wildtypgruppe (z. B. für CKO Mäuse ohne Intervention $0,026\pm 0,027$ vs. $0,026\pm 0,021$ für CKO Mäuse nach PTFE-Injektion, $n= 11$ vs. 10 , $p=0,99$ für 1 Hz, Abbildung 3.3 B-D). Dementsprechend zeigten die CKO Mäuse auch hinsichtlich pro-arhythmischer Events keine Korrelation mit den IFLs ($p=0,36$, $r^2=0,05$, Abbildung 3.3 E) oder Apnoen ($p=0,82$, $r^2=0,004$, Abbildung 3.3 F).

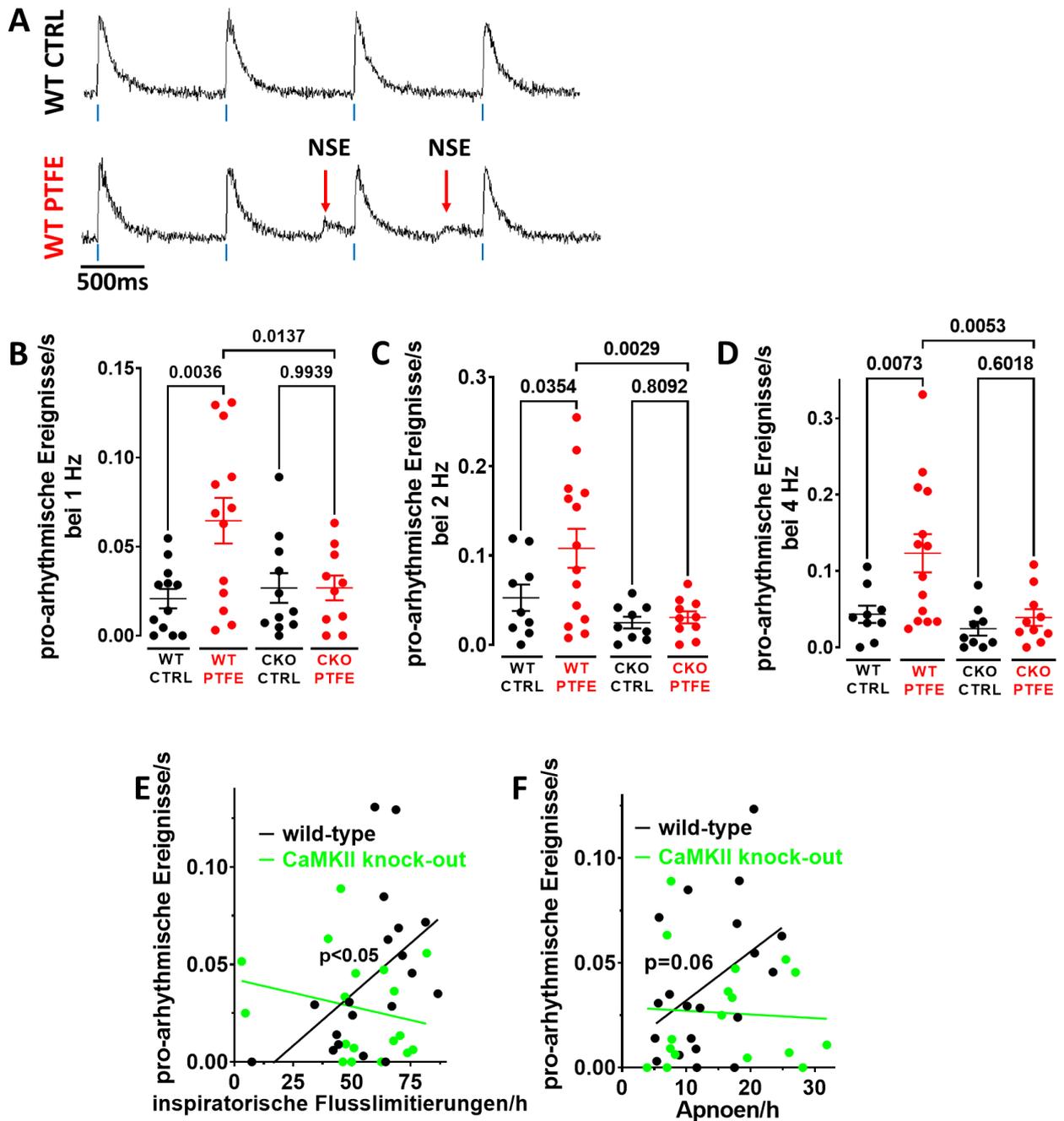


Abbildung 3.3: A) Originalregistrierung zweier Kalziumtransienten, gemessen in mit FURA-2AM beladenen Vorhofzellen. Die Abweichungen von der diastolischen Kalziumbaseline zeigen zwei nicht-stimulierte pro-arhythmische Ereignisse (NSE) in der WT PTFE Gruppe. B) In der WT PTFE Gruppe kommt es bei 1Hz Stimulation in den atrialen murinen Kardiomyozyten zu signifikant mehr pro-arhythmischen Ereignissen als in der WT CTRL oder CKO PTFE Gruppe. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich bei 2 und 4Hz (C und D). E) Signifikant positive Korrelation der pro-

arhythmischen Ereignisse in der WT Gruppe mit den inspiratorischen Flusslimitierungen. Auch bei den Apnoen (F) zeigt sich hier ein starker Trend. Die CKO-Mäuse scheinen vor diesem Effekt geschützt. Die statische Auswertung basiert auf ANOVA-Tests mit Holm Sidaks post-hoc Korrektur und linearen Regressionsanalysen.

3.2.2 Provokation atrialer pro-arhythmischer Ereignisse durch das Nordadrenalinderivat Isoprenalin und 2mM Kalzium

Um vermehrt atriale Arrhythmien zu provozieren und vermehrte atriale pro-arhythmische Aktivität in mit PTFE behandelten Wildtypmäusen zu detektieren, wurden die Messbedingungen in den dafür vorhergesehen Kammern auf 2mM Kalzium angehoben und die Vorhofzellen vor fünfminütiger Stimulation mit 1Hz für 30 Minuten mit dem Noradrenalinderivat Isoprenalin inkubiert. Bei der anschließenden Analyse pro-arhythmischer Events wurde ebenfalls jede Abweichung von der diastolischen Kalziumbaseline zwischen zwei regulären Transienten und jeder zusätzliche, nicht-stimulierte Transient als ein solches gewertet (Beispiel siehe Abbildung 3.3 A). Unter Provokation mit Isoprenalin konnte nun sowohl in der Wildtyp-, als auch in der CKO-Gruppe nach PTFE-Intervention ein signifikanter Anstieg der pro-arhythmischen Ereignisse von (in s^{-1}) $0,03 \pm 0,01$ auf $0,05 \pm 0,02$ bei den Wildtypmäusen, bzw. von $0,017 \pm 0,016$ auf $0,06 \pm 0,02$ in der CKO-Gruppe beobachtet wurden (Abbildung 3.4)

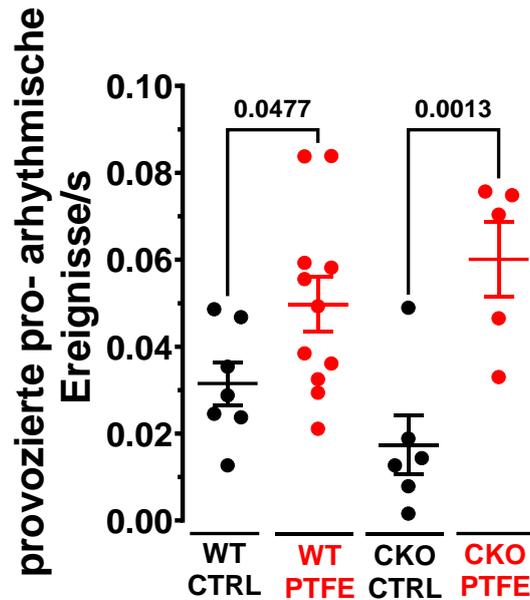


Abbildung 3.4: Nach Isoprenalinexposition kommt es nach PTFE Intervention sowohl bei den Wildtypen (n= 7 vs. 11), als auch bei den CKO-Mäusen (n= 6 vs. 5) zu einer signifikanten Zunahme atrialer pro-arrhythmischer Ereignisse ($p < 0,05$ mittels ANOVA).

3.2.3 Atriales diastolisches und systolisches Kalziumhandling

Ursächlich für die vermehrte pro-arrhythmogene Aktivität könnte ein vermehrtes diastolisches Kalziumleck durch vermehrte Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII sein (3). In Einklang mit dieser Vermutung konnten wir in der Wildtyppopulation in der Gruppe der operierten Tiere ein erhöhtes diastolisches Kalzium von (Fura Ratio 340/380) $1,493 \pm 0,18$ verglichen mit $1,35 \pm 0,05$ in der Kontrollgruppe nachweisen (n= 14 vs. 12, $p = 0,049$), während in der CKO-Population kein wesentlicher Unterschied zu ermitteln war (siehe Abbildung 3.5 A). Allgemein ist jedoch zu bemerken, dass die diastolischen Kalziumlevel in der CKO-Gruppe mit $1,44 \pm 0,18$ jedoch höher als in der Wildtypgruppe lagen, nach PTFE-Intervention allerdings anders als in der WT-Gruppe kein signifikanter Anstieg zu beobachten war (n= 11 vs. 12, $p = n.s.$ mittels ANOVA). Um die Mechanismen besser zu verstehen, führten wir wie oben beschrieben Experimente mit Koffein durch, wodurch es zur Entleerung des SRs kommt. Anhand des sogenannten Koffeintransienten lässt sich nun grob auf den Kalziumgehalt des SRs rückschließen, was indirekt Rückschlüsse auf das diastolische Kalziumleck zulässt (Beispiel siehe Koffeintransienten im Ventrikel, Abbildung 3.9). Entgegen den Ergebnissen des diastolischen Kalziums zeigten sich hier allerdings keine signifikanten

Unterschiede nach PTFE-Intervention oder in Abhängigkeit des Genotyps (siehe Abbildung 3.5 B). Die Mittelwerte lagen für Mäuse der WT CTRL-Gruppe bei $0,74 \pm 0,28$ (FURA Ratio 340/380) und bei $0,60 \pm 0,17$ für WT Mäuse nach PTFE-Intervention ($n=7$ vs. 12 , $p=0,39$). In der CKO-Gruppe wurde in den Vorhofzellen ein mittlerer Koffeintransient von $0,60 \pm 0,22$ gemessen, von $0,71 \pm 0,24$ in der CKO Kontrollgruppe ($n=5$ vs. 7 , $p=0,40$, Abbildung 3.5 B).

In den Vorhofzellen konnten keine weiteren Unterschiede oder Auffälligkeiten in der Höhe des stimulierten Kalziumtransienten als Prädiktor der Kontraktilität des Vorhofs oder der Relaxationsparameter (RT90) festgestellt werden (Abbildung 3.6). Letztere gibt die Zeit in Millisekunden an, in welcher sich 90% des Kalziumtransienten zurückgebildet hat und gilt als wichtiges Messinstrument für Kardiomyozytenrelaxation. Die Mittelwerte für den Relaxationsparameter RT90 betragen (in ms) bei den Wildtypen $0,29 \pm 0,12$ in der Kontrollgruppe und $0,24 \pm 0,08$ nach PTFE-Intervention ($n=12$ vs. 12 , $p=0,27$ mittels ANOVA). In der CKO Kontrollgruppe $0,23 \pm 0,05$ und $0,26 \pm 0,09$ nach PTFE ($n=12$ vs. 12 , $p=0,54$). Die mittlere Amplitude des Kalziumtransienten betrug bei WT CTRL (FURA ratio 340/380) $0,36 \pm 0,16$, $0,39 \pm 0,12$ bei WT PTFE ($n=11$ vs. 14 , $p=0,82$). Der Mittelwert in CKO Gruppe $0,34 \pm 0,14$ in der Vergleichsgruppe und $0,39 \pm 0,13$ bei den operierten CKO Mäusen ($n=12$ vs. 11 , $p=0,75$, Abbildung 3.6 B).

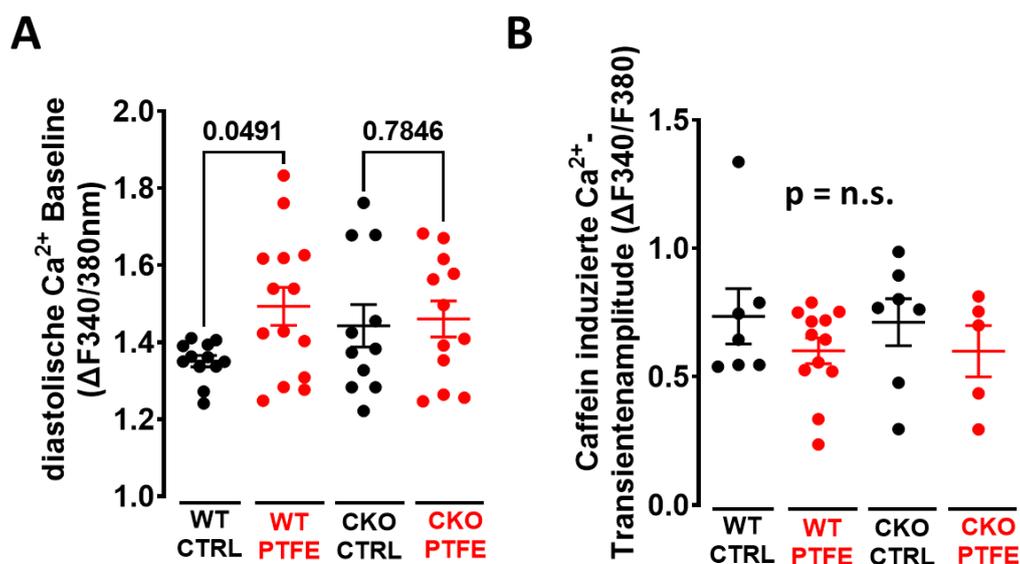


Abbildung 3.5 A) WT PTFE Mäuse zeigen im Vergleich zur nicht-operierten Kontrollgruppe ein erhöhtes diastolisches Kalzium. B) Bei Analyse des sog.

Koffeintransienten zeigten sich keine Unterschiede zwischen WT und CKO und PTFE und CTRL (Statistische Auswertung basierend auf ONE-WAY ANOVA Test).

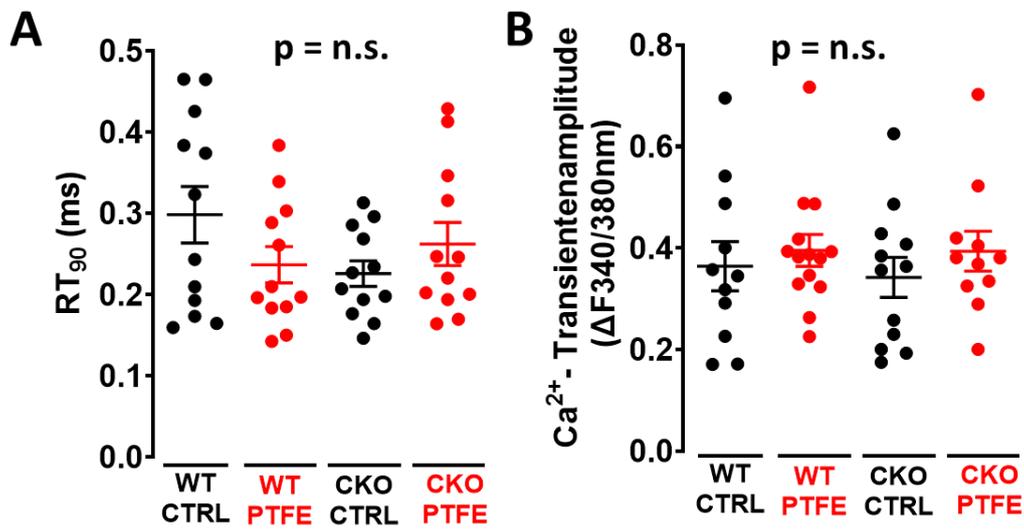


Abbildung 3.6 In Relaxationszeit (RT_{90}) oder der Höhe des systolische Kalziumtransienten zeigten sich im murinen keine Unterschiede. Statistische Auswertung basierend auf one-way ANOVA mit Holm-Sidak's post-hoc Korrektur.

3.3 Ventrikuläre Kontraktilität und ventrikuläres Kalziumhandling

3.3.1 CaMKII-abhängige ventrikuläre systolische Dysfunktion nach PTFE-Injektion

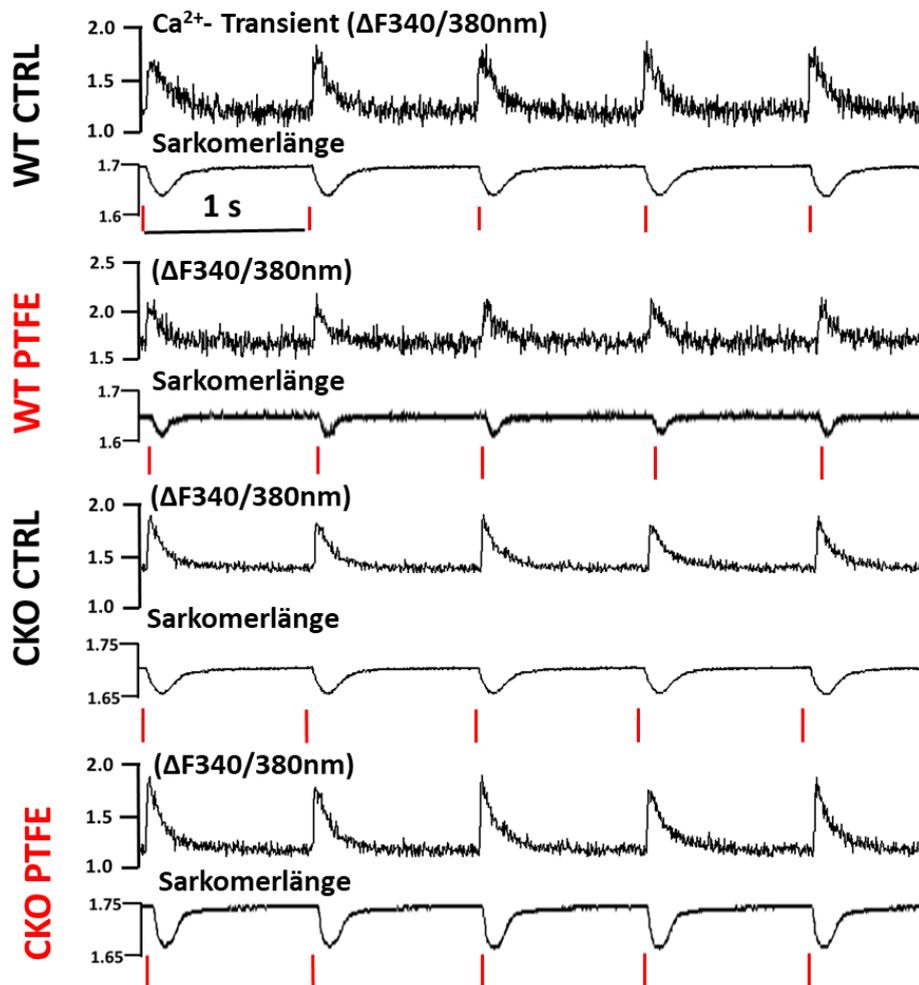


Abbildung 3.7 zeigt eine Originalabbildung von am Epifluoreszenzmikroskop gemessenen Kalziumtransienten von mit FURA-2 beladenen isolierten Ventrikelzellen unter Stimulation mit 1 Hz. Die roten Striche markieren den Zeitpunkt der Stimulation. Die untere Zeile zeigt die Sarkomerlängenverkürzung der Myozyten beim Kalziumtransienten an.

In **Abbildung 3.7** sind repräsentativ Aufzeichnungen von stimulierten Kalziumtransienten (jeweils oben) und Myofilamentverkürzungen (jeweils unten) in Ventrikelzellen von Mäusen der WT CTRL-, WT PTFE-, CKO CTRL- und CKO PTFE-Gruppe dargestellt. Man erkennt bereits hier einen im Vergleich zur Kontroll- und zur

Knockoutgruppe erniedrigten Kalziumtransienten und eine niedrigere Sarkomerlängenverkürzung in der WT PTFE Gruppe (Ergebnisse mit Mittelwerten siehe Abbildung 3.8). Hintergrund der Messungen ist zu überprüfen, ob die bei Patienten mit Obstruktiver Schlafapnoe (13,50) und die im OSAS Mausmodell (10,11) gezeigte kontraktile Dysfunktion auf myozytärer Ebene mit einer CaMKII-abhängigen Verschlechterung der Kalziumhomöostase zusammenhängt. Mit PTFE behandelte Wildtypmäuse zeigten einen mit (FURA Ratio 340/380) $0,30 \pm 0,08$ erniedrigten Kalziumtransienten verglichen mit $0,41 \pm 0,14$ in der unbehandelten Kontrollgruppe ($n=15$ vs. 13 , $p=0,048$ mittels ANOVA, siehe Abbildung 3.8 A). In Übereinstimmung ist die Myofilamentverkürzung in den operierten Wildtypen mit $2,83 \pm 1,56$ (in % baseline/peakh) signifikant geringer als in der WT CTRL-Gruppe mit $4,76 \pm 2,14$ ($n=15$ vs. 13 , $p=0,034$, Abbildung 3.8 B). Ähnlich der pro-arhythmischen Ereignisse im Vorhof zeigen sich auch hier die mit PTFE-behandelten Tiere durch den Knockout der CaMKII vor einem erniedrigten Kalziumtransienten geschützt ($0,41 \pm 0,12$, $n=13$, $p=0,038$ für den Vergleich von CKO PTFE vs. WT PTFE). Innerhalb der CKO-Gruppe bestand kein wesentlicher Unterschied ($0,35 \pm 0,12$ für CKO CTRL, $n=13$, $p=0,38$). Auch bei der Sarkomerlängenverkürzung konnte innerhalb der CKO Gruppe nach PTFE-Intervention mit $4,70 \pm 1,20$ kein Unterschied zur Kontrollgruppe mit $4,53 \pm 2,61$ beobachtet werden ($n=14$ vs. 13 , $p=0,81$). Innerhalb der operierten Gruppe zeigten die CKO Mäuse auch hier eine signifikant bessere Myofilamentverkürzung die Wildtypmäuse ($p=0,034$, Abbildung 3.8 B).

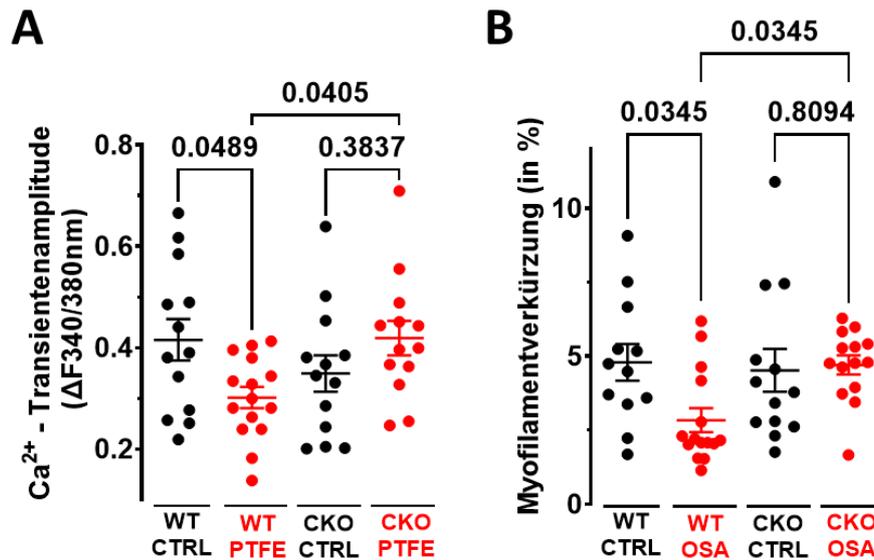


Abbildung 3.8 A) Gemittelte Kalziumtransientenamplitude in stimulierten Ventrikelzellen. B) Myofilamentverkürzung (in %). Konkordant mit der Höhe der Kalziumtransientenamplitude präsentiert sich die Verkürzung der Myofilamente in den WT PTFE Mäusen deutlich erniedrigt.

Mittels Experimenten mit Koffein gelang eine Darstellung des sogenannten Koffeintransienten, mit welchem das SR Kalziumgehalt weiter abgeschätzt und somit indirekt auf das CaMKII-abhängige diastolische Kalziumleck geschlossen werden kann.

Wie Abbildung 3.9 bereits erkennen lässt, zeigt sich dieser in der WT PTFE konkordant mit dem Kalziumtransienten und der Sarkomerlängenverkürzung erniedrigt (Ergebnisse und Mittelwerte siehe Abbildung 3.10).

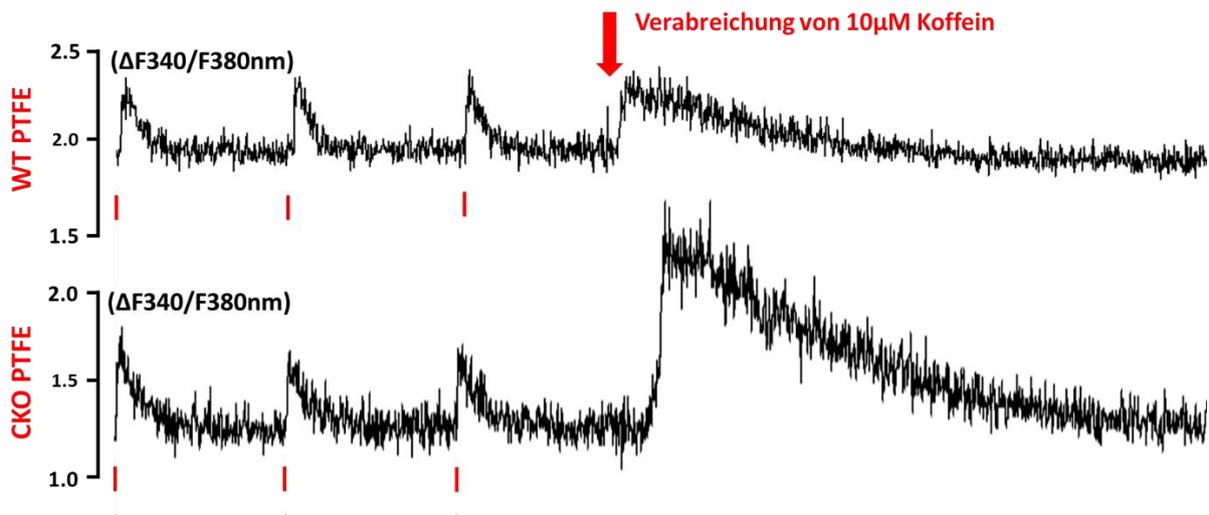


Abbildung 3.9 zeigt repräsentative Koffeintransienten von mit FURA-2 beladenen Ventrikelzellen für Mäuse der WT PTFE- und der CKO PTFE-Gruppe. Nach Stimulation (rote Striche) und Erreichen eines Steady-States wird die Stimulation ausgeschaltet. Zum Zeitpunkt des nächsten regulären Schlages wird nun 10 μ m Koffein appliziert (roter Pfeil), wodurch es zur kompletten Öffnung des RyR2s kommt. Anhand des nun folgenden Kalziumtransienten kann so der SR- Ca^{2+} -Gehalt abgeschätzt werden und Rückschluss auf das diastolische Ca^{2+} -Leck gezogen werden.

So führte eine Behandlung mit PTFE in der Wildtypgruppe auch zu einer signifikant reduzierten Koffein-induzierten Kalziumtransientenamplitude von $0,86 \pm 0,25$ in der Kontrollgruppe und zu $0,55 \pm 0,17$ in der WT PTFE-Gruppe ($n=7$ vs. 7 , $p=0,017$, Abbildung 3.10 A). Dies resultierte zudem in einer signifikant negativen Korrelation zwischen dem Koffein-induzierten Kalziumtransienten und der Frequenz der inspiratorischen Flusslimitierungen ($P=0,0076$, $r^2=0,43$, Abbildung 3.10 B). Spannenderweise zeigten die mit PTFE behandelten CKO Mäuse mit $0,830 \pm 0,14$ eine normale Transientenamplitude nach Koffeinapplikation ($n=8$ vs. 7 WT CTRL mit $0,68 \pm 0,19$, $p=0,19$). Zudem zeigte sich keine Korrelation mit der Häufigkeit der inspiratorischen Flusslimitierungen ($p=0,98$, $r^2 < 0,01$).

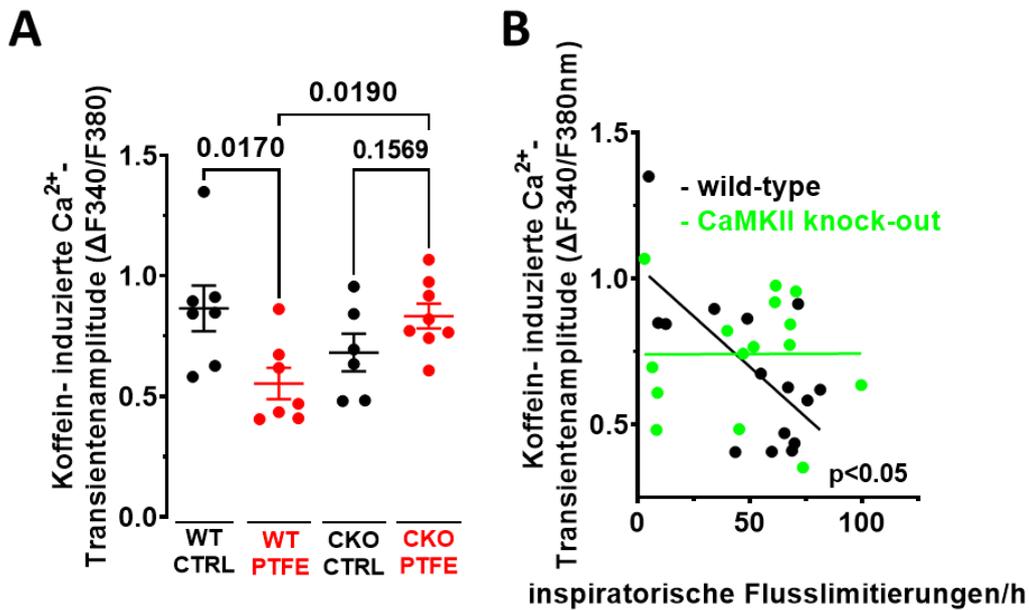


Abbildung 3.10: A) Mittelwerte der Amplitude des Kalziumtransienten nach Koffeinapplikation. Auch hier zeigt sich ein signifikant reduzierter Transient in der WT PTFE-Gruppe. Statistische Vergleiche mittels One-Way ANOVA mit Holm-Sidak's post-hoc Korrektur B) Korrelation zwischen dem Koffeininduzierten Kalziumtransienten und inspiratorischen Flusslimitierungen pro Stunde für die WT und CKO Population mittels linearer Regressionsanalyse.

Zusammenfassend betrachtet bestätigen diese Daten die ursprüngliche Hypothese. Durch Injektion von PTFE und der daraus resultierenden Verengung der oberen Atemwege kommt es in der Wildtypgruppe zu einer signifikanten Verschlechterung der Kontraktilitätsparameter (Höhe der Kalziumtransientenamplitude, Myofilamentverkürzung und Höhe des Koffeintransienten). Durch einen Knock-out der δ -Isoform der CaMKII waren die operierten OSA Mäuse vor einer Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität geschützt.

3.3.2 Diastolisches Kalziumhandling im Ventrikel

In der WT PTFE Gruppe, zeigte sich die Kalzium-Baseline (FURA Ratio 340/380) mit im Mittel $1,42 \pm 0,21$ nach Operation nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle mit $1,47 \pm 0,23$ ($n=15$ vs. 13 , $p=0,57$, Abbildung 3.11 A). Auch zeigte sich kein

Unterschied in der diastolischen Kalzium-Baseline zu den Mäusen der CKO Gruppe mit $1,50 \pm 0,15$ nach Operation, welche sich ebenfalls nicht zur CKO CTRL-Gruppe mit $1,49 \pm 0,26$ unterschied ($n= 14$ vs. 13 , $p=0,57$).

Ebenso zeigten die Mittelwerte für den Relaxationsparameter RT90 (=Zeit, in welcher sich durch Aktivierung der SERCA 90% des Kalziumtransienten zurückbildet) mit (in ms) $0,26 \pm 0,094$ zu $0,31 \pm 0,094$ keinen Unterschied zwischen Kontroll- und operierter Gruppe in der Wildtyppopulation ($n=13$ vs. 14 , $p=0,41$, Abbildung 3.11 B). Auch in der CKO-Gruppe war die Relaxationszeit bei Kontroll- und Versuchsgruppe vergleichbar (CKO CTRL vs. CKO PTFE: $0,21 \pm 0,065$ zu $0,23 \pm 0,073$, $n= 13$ vs. 14 , $p=0,68$, Abbildung 3.11 B). Allerdings verlief die Transientenrückbildung innerhalb der operierten Gruppe bei Tieren mit einem CaMKII Knock-out mit im Mittel $0,23 \pm 0,073$ ms deutlich schneller als bei den mit PTFE-behandelten Wildtypmäusen mit $0,31 \pm 0,094$ ms (n vs. 14 , $p=0,038$). Interessanterweise konnte bei Tieren der CKO-Population unabhängig der Intervention mit (in ms) im Durchschnitt $0,22 \pm 0,068$ eine schnellere Relaxationszeit des Kalziumtransienten beobachtet werden als in der Wildtyppopulation mit $0,29 \pm 0,09$ ($n=27$ vs. 27 , $p<0,01$ mittels Mann-Whitney test, Abbildung 3.11 C).

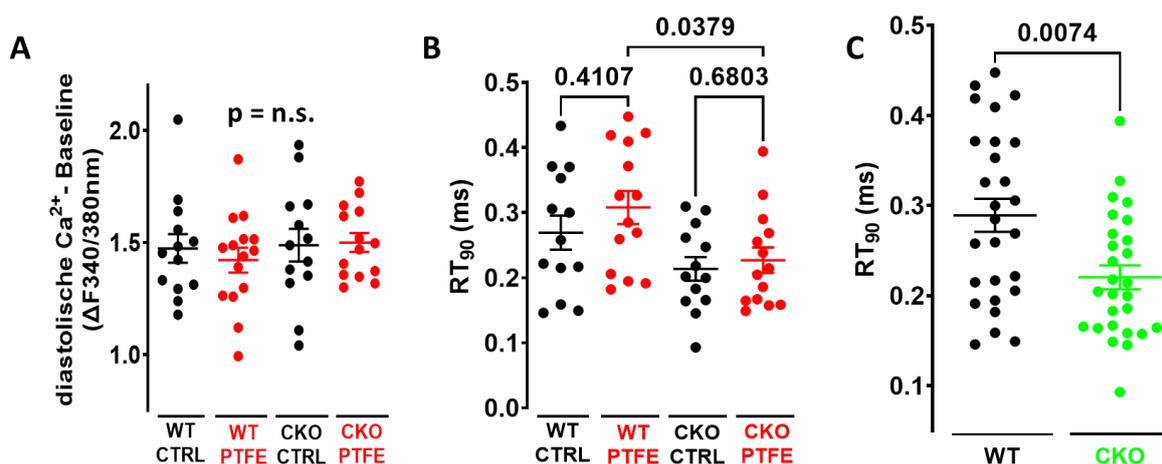


Abbildung 3.11: A) In der Analyse der diastolischen Kalziumbaseline zeigten sich keine Unterschiede abhängig von Intervention oder Genotyp der Mäuse. B und C) Mäuse mit einem Knock-out der CaMKII zeigen verglichen mit Tieren der Wildtyppopulation eine deutlich reduzierte Relaxationszeit.

4. Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur („Diskussion“)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Mausmodells das atriale und ventrikuläre Kalziumhandling bei Obstruktiver Schlafapnoe untersucht. Besonders dabei ist, dass anhand dieses Mausmodells erstmals die Pathomechanismen der atrialen Arrhythmien und ventrikulären Dysfunktion frei von potenziellen Störfaktoren, wie sie beim sehr heterogenen Kollektiv humaner Patienten, aufgezeigt wurden, untersucht werden konnten. Somit konnten die beobachteten pathologischen Veränderungen direkt auf das Obstruktive Schlafapnoe Syndrom zurückgeführt werden. Des Weiteren ließ die Verwendung eines CaMKII δ -Knockout Mausmodells eine differenzierte Schlussfolgerung der Rolle der CaMKII δ beim kardialen Geschehen bei OSA zu. So konnte gezeigt werden, dass es gerade in den Myozyten des Vorhofs zu einer vermehrten pro-arrhythmischen Aktivität kommt. Interessanterweise schützte ein Knockout der CaMKII δ vor dieser OSA-induzierten Pathologie (s. Abbildung 3.5). Davon ausgehend, dass sich bei den mit PTFE-behandelten Tieren (10) und bei Patienten mit Schlafapnoe (13,47) eine reduzierte Ejektionsfraktion fand, konzentrierten sich die Untersuchungen in den isolierten Ventrikelzellen vor allem auf die Höhe des Kalziumtransienten. Konkordant zu diesen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zeigte sich am Epifluoreszenzmikroskop eine Verschlechterung der ventrikulären Kontraktilität im Sinne signifikant erniedrigter stimulierter Kalziumtransienten und schlechterem Myofilamentshortening. Experimente mit abrupter Kaffein-Applikation zeigten zudem einen erniedrigten Ca²⁺-Gehalt des SR. Letzten Endes schützte auch hier ein genetischer Knockout der CaMKII δ vor einer Verschlechterung der Kontraktilitätsparameter (s. Abbildung 3.7, 3.8, 3.9 & 3.10).

4.1 Mechanismen kardialer Begleiterkrankungen bei Obstruktiver Schlafapnoe

Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom gewann in den letzten Jahren aufgrund stark ansteigender Fallzahlen zunehmen an Relevanz, gerade in sozioökonomischer Hinsicht (1,12–15,19,20). Grund dafür sind vor allem die zahlreichen Komorbiditäten, mit welchen OSA in Verbindung gebracht wird (2,12,13,22). Neben Assoziationen der OSA mit Alter, männlichem Geschlecht oder BMI (16,106,107), wird dieses häufig auch mit arterieller Hypertonie, Diabetes, Fettstoffwechselstörungen oder neurokognitiven Erkrankungen in Verbindung gebracht (16,21,22,28,108). Daneben

wurden in der Literatur besonders häufig kardiale Begleiterkrankungen wie Arrhythmien, insbesondere dem Vorhofflimmern und die kontraktile Dysfunktion beschrieben (2,6,28,29), auf welchen das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt. Kardiale Erkrankungen wie Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz bedingen entscheidend Morbidität und Mortalität der Patienten (109,110). Interessanterweise scheint dabei die OSA bei Patienten mit Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz überproportional häufig vertreten zu sein im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung, wobei die Schwere der Herzinsuffizienz mit der Schwere der Obstruktiven Schlafapnoe zu korrelieren scheint und sich beide Erkrankungen gegenseitig negativ beeinflussen (24,27,51,111,112). Wie Rossi et al. beschreiben, spielen dabei einige pathophysiologische Effekte der OSA, wie oxidativer Stress durch intermittierende Hypoxien und intrathorakale Druckschwankungen, sowie direkte und indirekte Effekte der OSA auf das autonome Nervensystem eine wichtige Rolle (29) (Abbildung 1.2). Daraus resultierende strukturelle Umbauten am Herzen können einerseits zu einer verminderten LVEF führen (43). Weiter konnten Dimitri et al. bei OSA Patienten vergrößerte Vorhöfe beobachten, was zu einer Verschlechterung des Reizleitungssystem beitrug (36). Letzten Endes trägt dieses kardiale Remodeling entscheidend zur Entwicklung von Vorhofflimmern (VHF) bei, was wiederum thromboembolische Ereignisse begünstigt und zu höheren Hospitalisierungs- und Mortalitätsraten führt (44). Dabei ist zu erwähnen, dass bei Herzinsuffizienzpatienten neben obstruktiven in der Literatur auch zentrale Apnoen (CSA) beschrieben wurden. Oldenburg et al. beschreiben sogar, dass Patienten mit CSA in ihrer Studie im Schnitt einen höheren NYHA-Grad und eine niedrigere LVEF zeigten als Patienten mit OSA (112). Obwohl also die Verbindung der OSA mit kardiovaskulären Erkrankungen hinlänglich in der Literatur beschrieben wurde, bleiben die detaillierten Pathomechanismen bislang größtenteils unklar (6,7,113,114). Wie Lebek et al. folgerichtig beschreibt, ist dies vor allem der Tatsache geschuldet, dass sich bisherige Untersuchungen auf humane OSA Proben beschränkten, welche jedoch stets mit dem Problem der Heterogenität und Komorbidität versehen sind (10). Dies erforderte die Untersuchung der OSA und ihrer Komorbiditäten in einem geeigneten Tiermodell (10,98).

4.2 Das OSA-Mausmodell durch Vergrößerung des Zungendiameters

Hierfür entwickelte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefan Wagner ein völlig neues Mausmodell der Obstruktiven Schlafapnoe (10). Lebek et al. konnten nicht nur anhand plethysmographischer Messungen zeigen, dass in dem Mausmodell die Anzahl der gemessenen Apnoen und IFLs signifikant erhöht waren im Vergleich zu normalen C57BL/6 Mäusen, sondern, mittels echokardiographischer Untersuchungen, dass diese Mäuse unter anderem auch eine systolische und diastolische Dysfunktion entwickelten (10). Analog zu humanen OSA-, VHF-, und HI-Patienten konnten Lebek et al. auch in ihrem Mausmodell eine erhöhte Expression der CaMKII zeigen (3,4,6,7,10). Erreicht wurden diese OSA spezifischen Effekte durch Injektion von Polytetrafluorethylen (PTFE), wodurch es zu einer signifikanten Zunahme des Zungendiameters kam (siehe Abbildung 3.1 und Lebek et al. (10)). Laut Schwab et al. ist diese Vergrößerung des Zungendiameters die wichtigste, von Alter und Geschlecht unabhängige Determinante bei der Entstehung einer OSA. Dabei scheint das Erkrankungsrisiko mit der Dicke der pharyngalen Strukturen zu steigen (17). Wie Abbildung 3.2B zeigt, korrelierte die Dicke des Zungendiameters der mit PTFE behandelten Versuchstiere direkt mit der Frequenz der gezeigten Apnoen. Wie wichtig die Entwicklung eines neuen Mausmodells war zeigt ein Blick auf die bisherigen Modelle, welche für eine differenzierte Betrachtung der OSA-Effekte starke Limitationen aufweisen (10,98,99,115). Als Beispiel ist hier vor allem am Beispiel des New Zealand Obese Mice Modell mit ebenfalls vergrößerten Zungendiametern anzuführen, (97–99). Laut Schwab et al. sind diese die wichtigste, von Geschlecht, Alter oder parapharyngalem Fettgewebe unabhängige Determinante bei der Entstehung der OSA (17). Zwar wurden bei diesem Mausmodell vermehrt Apnoen und Hypopnoe nachgewiesen (97–99), allerdings auch weitere, für OSA-spezifische Studien potenziell störende Begleit- und Folgeerkrankungen (10) wie Bluthochdruck, sowie Glukose- und Fettstoffwechselstörungen (100). Damit hätte die Verwendung dieses Mausmodells bei der Interpretation und differenzierten Betrachtung der Daten ein ähnliches Problem wie das heterogene Kollektiv der humanen Patienten dargestellt. Auch weitere existierende Tiermodelle verkörpern lediglich einzelne Aspekte der OSA. Wie das häufig verwendete chronic- intermittent hypoxia (CIH)-Mausmodell, bei welchem es zu den schlafapnoetypischen Zyklen von Hypoxie und Reoxygenierung kommt (116). Allerdings kommt es hier nicht zur OSA-typischen Obstruktion der oberen Atemwege und somit auch nicht zu den beschriebenen damit

einhergehenden mechanischen Veränderungen (10,36,43,98,116). Deshalb war es Ziel des vorliegenden Mausmodells, durch eine PTFE-Injektion eine gezielte und isolierte intermittierende Verengung der oberen Atemwege durch Vergrößerung der Zungendiameter herbeizuführen. Wie Lebek et al. also folgerichtig beschrieben, könnte dieses OSA Mausmodell, welches keine störende Komorbiditäten aufweist, erstmals eine differenzierte Untersuchung der Mechanismen und Effekte der Obstruktiven Schlafapnoe ermöglichen (10).

4.3 CaMKII und ihre Rolle bei der Dysregulation der zellulären Kalziumhomöostase

Auf pathophysiologischer Ebene spielt insbesondere die CaMKII eine wichtige Rolle im Herzen. In der Literatur wird sowohl bei Patienten und in Tiermodellen von VHF und HF, nun aber auch bei schlafbezogenen Atemstörungen (SBAS) wie der OSA eine vermehrte Aktivität und Expression der CaMKII beschrieben (3–10,79,80,92,93). Die ständig wechselnden nächtlichen Phasen der Hypoxie und Reoxygenierung bei OSA fördern die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (29). Nächtliche Atemaussetzer begünstigen Aufwachreaktionen, was das β -adrenerge System aktiviert (29). Weiterhin werden bei OSA aufgrund eines Kollaps der Atemwege intrathorakale Druckschwankungen beschrieben, welche zu erhöhter transmuraler Wandspannung führen (29,96). Letzten Endes können all diese Mechanismen die Aktivität der CaMKII steigern (88–91). Erhöhte Kalziumkonzentrationen begünstigen die Bildung eines Komplexes aus Kalzium und Calmodulin (CaM). Bindet dieser an die regulatorische Domäne der CaMKII kommt es zur Aufhebung der Autoinhibition der CaMKII (82,84). Neben längerfristig erhöhten Kalziumkonzentration können auch die bei OSA entstehenden ROS durch die Oxidation von Methionin an Position 281 und 282 die CaMKII in einen aktiven Zustand versetzen (88,89). Die gesteigerte Stimulation des β -adrenergen Systems fördert über NADPH-Oxidase-Aktivierung die Entstehung von ROS und trägt somit zu einer vermehrten CaMKII-Aktivität bei (34,117,118). Auch die durch OSA erhöhte transmurale Wandspannung führt aufgrund des gesteigerten kardialen Sauerstoffbedarfs zu einer ROS-induzierten CaMKII-Aktivierung (34,117,118). Durch die Phosphorylierung wichtiger Ionenkanäle und Regulatorproteine wie dem Natrium-/Kalziumaustauscher NXC, dem Ryanodinrezeptor RyR2, dem L-Typ Kalziumkanal oder Phospholamban kommt der

CaMKII eine entscheidende Rolle in der Regulierung der zellulären Kalziumhomöostase zu (9,60).

4.3.1 CaMKII-abhängige pro-arrhythmische Ereignisse im Vorhof von OSA Mäusen

In der Literatur wurden bereits zahlreiche Risikofaktoren für VHF beschrieben. Neben Alter, Übergewicht, Diabetes Mellitus, arterieller Hypertonie und kardialen Erkrankungen besteht insbesondere eine Assoziation zur OSA (2,35,44,119). Wie Dimitri et al. beschreiben, führen all diese Faktoren zu strukturellen und funktionellen Veränderungen am Herzen. Als vulnerables Gewebe begünstigen sie nun gemeinsam mit triggernden Faktoren die Entstehung von VHF (36). Hier kommen bei OSA einerseits eine Dehnung der Vorhöfe, sympathische Stimulation, sowie supraventrikuläre Extrasystolen infrage (37). Aber auch fokale ektope Aktivitäten des Myokards, bei welchen frühe und späte Nachdepolarisationen (EAD/early after depolarization und DAD/delayed afterdepolarization) eine wichtige Rolle spielen sind entscheidend an der Arrhythmogenese beteiligt (3,8,38,120). Die bei OSA erhöhte Aktivität der CaMKII phosphoryliert den RyR2 an Serin 2814 (3,6,72). Das daraus resultierende Kalziumleck führt zu einem erhöhten zytosolischem Kalziumgehalt (3). Die Aktivität der CaMKII wird weiter verstärkt („Circulus vitiosus“) (121) und es kommt zu konsekutivem Einwärtsstrom des NCX mit vermehrten DADs (3,80,94). Wagner et al. identifizierten diese als einen wesentlichen Trigger von Herzrhythmusstörungen (8). Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, gelang es in diesem Projekt eine vermehrte atriale pro-arrhythmische Aktivität in Form sogenannter non-stimulated events in operierten WT-Mäusen zu zeigen, nicht aber bei CaMKII-Knock-out Tieren. Eine Stärke dieses Projekts ist, dass aufgrund des verwendeten Mausmodells der beobachtete Effekt spezifisch der OSA zuzuschreiben ist, da die Tiere keine anderen Komorbiditäten aufweisen (10). Zu diskutieren ist jedoch, dass es unter Stimulation mit Isoprenalin keine Unterschiede zwischen WT und CKO gab (Abbildung 3.4). Aufgrund der signifikanten Daten unter Standardbedingungen ist dies jedoch sehr wahrscheinlich auf einen zu starken Stimulus durch das Noradrenalinderivat zurückzuführen. Damit übereinstimmend zeigte sich in der Wildtypgruppe bei den Schlafapnoemäusen ein erhöhtes diastolisches Kalzium, während dies bei den CKO Mäusen nicht der Fall war. Ein weiterer pro-arrhythmischer Mechanismus könnte eine durch Dysregulation des

Kalziumhaushalts verursachte Störung der interzellulären Kommunikation sein, für welche größtenteils das Protein Connexin-43 verantwortlich ist (122–125). Wie Hegner et al. kürzlich zeigen konnten, exprimieren SDB-Patienten weniger Connexin-43. Interessanterweise war dies sogar abhängig von der Schwere der schlafbezogenen Atemstörung (126). Als ein weiterer Trigger atrialer Arrhythmien wird ein gesteigerter später Natriumeinstrom diskutiert, wie er auch bei OSA Patienten gemessen werden konnte (6,8,78,114). Die bei OSA gesteigerte Aktivität der CaMKII führt zu einer vermehrten Phosphorylierung des Natriumkanals Nav1.5 an Ser571 mit Stimulation des späten Natriumstrom (late I_{Na}) (81), welcher u.a. zu Arrhythmien beiträgt (89). Die in der Folge des verstärkten Natriumeinstroms eintretende Überladung der Zelle mit Natriumionen führt zu einer Richtungsumkehr im NXC (Natrium/Kalzium-Austauscher) mit konsekutivem Einstrom von Kalzium in die Zelle (77,89). Wagner et al. konnten dies als einen weiteren wichtigen Trigger für Nachdepolarisationen ausmachen (78). Spannenderweise steht ein gesteigerter late I_{Na} auch in Zusammenhang mit einem pro-arrhythmisch wirkenden gesteigerten diastolischen Kalziumleck (80,81), wobei sich beide gegenseitig verstärken (80). Die Bedeutung des late I_{Na} für die Arrhythmogenese konnten Sossalla et al. erstmals zeigen. In ihren Messungen in humanen Vorhofzellen war der late I_{Na} bei Patienten mit Vorhofflimmern deutlich gesteigert (127).

4.3.2 CaMKII-abhängige kontraktile Dysfunktion im Ventrikel von OSA Mäusen

Entsprechend der eingangs geäußerten Hypothese zeigten die für die Arbeit verwendeten Wildtypmäuse nach PTFE-Exposition einen erniedrigten Kalziumtransienten im Ventrikel als Maß für die Kontraktionskraft der linken Herzkammer (siehe Abbildung 3.10 A). Dies ging einher mit einem reduzierten Myofilamentshortening als Maß für die Kontraktilität (siehe Abbildung 3.8 B). Interessanterweise schützte ein genetischer Knock-out der CaMKII in beiden Fällen vor dieser pathologischen Veränderung. Dies erklärt die von Lebek et al. 2020 echokardiographisch ermittelte verminderte LVEF in Wildtypmäusen nach Induktion einer OSA mittels PTFE (10). Gleichzeitig betont es aber auch die Rolle der CaMKII bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz, wie sie in der Literatur mehrmals beschrieben wurde und welche auch bei Patienten mit OSA und im Mausmodell gezeigt werden konnte (4–7,10,92).

Um darüber hinausgehend den Pathomechanismus für die geminderte Kontraktilität der Ventrikelzellen und die geminderte LVEF in Schlafapnoemäusen (10) besser zu verstehen, wurden für die vorliegende Arbeit Experimente mit Koffein durchgeführt, um so einen Rückschluss über den SR Kalziumgehalt zu erhalten (55). Ein solches konnte in der Vergangenheit bereits mit kontraktile Dysfunktion in Verbindung gebracht werden (4,93,120). Und in der Tat war die koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude und somit der geschätzte SR Kalziumgehalt bei den Schlafapnoemäusen der Wildtypgruppe deutlich erniedrigt, während ein CaMKII Knock-out auch hier die Mäuse schützte (siehe Abbildung 3.10 A und B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die ventrikuläre Kontraktilität der Wildtyp Schlafapnoemäuse aufgrund eines reduzierten SR-Kalziumgehalts eingeschränkt ist. Als mögliche Ursache hierfür beschreibt die Literatur eine gesteigerte Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII an Serin 2814, was dessen Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und letztlich zu einem diastolischen Kalziumleck führt (3,9,55). Eine solche CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 mit konsekutivem diastolischen Kalziumverlust aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum konnte bei humanen Herzgewebeproben von Schlafapnoepatienten unter anderem von Lebek et al. beschrieben werden (6,7,114). Anders als in diesen Studien mit einem heterogenen Patientenkollektiv, waren die für diese Arbeit zur Untersuchung der Mechanismen der kontraktile Dysfunktion verwendeten Schlafapnoemäuse jedoch frei von weiteren Komorbiditäten (10,11).

4.3.3 Genetischer Knock-out der CaMKII beschleunigt die Rückbildung des Kalziumtransienten

Der Relaxationsparameter RT90 gibt die Zeit in Millisekunden an, in welcher sich durch Aktivierung der SERCA und des NCX 90% des Kalziumtransienten zurückbilden. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte zeigten dabei bei den Wildtypen deutlich längere RT90-Werte als die Gruppe der CKO Mäuse. Dieser Effekt war interessanterweise unabhängig von der Intervention und somit nicht auf einen OSA-spezifischen Effekt zurückzuführen (siehe Abbildung 3.11 B und C). Diese Ergebnisse verwundern zunächst und stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen in der Literatur. So wurde mehrfach eine CaMKII abhängige Phosphorylierung des Regulatorproteins Phospholamban (PLN) beschrieben (9,128,129). Hierdurch kommt es durch den

Mechanismus der Disinhibition zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA mit schnellerem Kalzium-Reuptake in das SR (55). Kadambi et al. 1996 legen hingegen dar, dass eine überhöhte Expression von PLN die Kalziumaffinität der SERCA wieder herabsetzt und SR Kalziumgehalt und myozytäre Kontraktilität verringert (130). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die schnelleren RT90-Werte nach CaMKII-Inhibition in der vorliegenden Arbeit. Auf der anderen Seite könnte das basale Kalziumleck abgedichtet sein, was die Relaxation beschleunigt.

4.4 Ausblick: CaMKII-Inhibitoren als potenzielle therapeutische Möglichkeit zur Behandlung kardialer Begleiterkrankungen bei Obstruktiver Schlafapnoe

Die derzeitige Behandlungsempfehlung für Patienten mit OSA konzentriert sich vor allem auf die beiden Schwerpunkte Gewichtsreduktion und CPAP-Therapie (Continuous positive airway pressure) (23). Wie McEvoy et al. zeigen konnten, scheint die CPAP-Therapie zwar geeignet, die Häufigkeit an Apnoen und Hypopnoen zu minimieren, das nächtliche Schnarchen zu reduzieren, die Tagesmüdigkeit zu verringern und die Lebensqualität im Allgemeinen zu verbessern (24). Allerdings zeigte ihre Studie auch, dass eine CPAP-Behandlung das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung nicht senkte (24). Zudem scheint die Compliance der Patienten einer CPAP-Therapie gegenüber sehr gering zu sein (24). Hinzu kommt, dass sich in weiteren Studien die Mortalität bei Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion und zentralen Apnoen sogar erhöht zeigte (34).

Die Behandlung für Patienten mit Herzinsuffizienz konzentriert sich derzeit auf Medikamente wie ACE-Hemmer, β -Blocker, Gliflozine, Angiotensinrezeptorantagonisten, etc (137). Für Vorhofflimmern stehen neben der Konzentration auf die Grunderkrankung medikamentös unter anderem β -Blocker, Amiodaron, Digitalis, Kalziumkanalblocker oder orale Antikoagulanzen für die Schlaganfallprophylaxe zur Verfügung. Im Rahmen interventioneller Verfahren stellen die elektrische Kardioversion oder die Pulmonalvenenisolation weitere therapeutische Optionen dar (138). Um jedoch bereits die Entstehung der verschiedenen Komorbiditäten und ihren weitreichenden Folgen zu verhindern, ist es von äußerster Wichtigkeit neue therapeutische Ansätze für Patienten mit schlafbezogenen Atmungsstörungen zu entwickeln.

Dabei kristallisierte sich bislang insbesondere eine äußere Einflussnahme auf den zellulären Kalziumhaushalt als eine hoffnungsvolle Option heraus, wobei hier der CaMKII als möglicher Stellschraube besondere Bedeutung zugesagt wird (71). Zwar befinden sich bereits einige der CaMKII-Inhibitoren in klinischen Studien (120,139,140), laut Grandi et al. entfalten viele von ihnen allerdings nur eine eingeschränkte Wirkung und erwiesen sich für den Gebrauch im klinischen Alltag als nicht suffizient (141). Grund war unter anderem eine ungenügende Spezifität der Substrate für die Isoformen der CaMKII und eine zu geringe Anzahl an Studien, welche den antiarrhythmischen Effekt der CaMKII-Inhibition in vivo untersuchten (141,142).

Dennoch gab es in den letzten Jahren viele widersprechende Versuche, einen geeigneten CaMKII-Inhibitor zu entwickeln. Ein Beispiel hierfür ist der ATP-kompetitive und selektive CaMKII-Inhibitor GS-680. In Versuchen mit humanem Vorhofgewebe konnten Lebek et al. zeigen, dass sich durch diesen das CaMKII-abhängige diastolische SR-Kalziumleck blockieren lässt und somit pro-arrhythmische Ereignisse reduziert werden konnten. Zudem konnte mit Hilfe von GS-680 die Funktion ventrikulärer Zellen bei schwerer Herzinsuffizienz verbessert werden (120). Einen ähnlichen Effekt konnten Neef et al. für den ebenfalls ATP-kompetitiven CaMKII-Inhibitor AS105 nachweisen. Die Gruppe konnte durch Einsatz des Inhibitors eine in vitro Reduktion des SR-Kalziumleck und arrhythmogener Korrelate beobachten, wobei dies keinen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung hatte (140). Eine CaMKII-Inhibition könnte damit ein vielversprechender neuer Therapieansatz für Patienten mit OSAS und kardiovaskulären Begleiterkrankungen sein.

4.5 Diskussion der Methoden und der Limitationen der Arbeit

Zuletzt soll noch auf Einschränkungen und Limitationen dieser Dissertation hingewiesen werden, deren Ziel es war, mit Hilfe eines Mausmodells ohne weitere Störfaktoren die Pathomechanismen für Arrhythmogenese und kontraktile Dysfunktion bei OSA genauer zu untersuchen.

Hierbei ist zum einen zu erwähnen, dass für die Versuche lediglich männliche Mäuse verwendet wurden. Hingegen konnten Lebek et al. und Hegner et al. zeigen, dass es durchaus geschlechtsabhängige Unterschiede bei Patienten mit Schlafapnoe gibt (143,144). So erkrankten Frauen mit SDB zwar an ähnlichen Komorbiditäten wie

Männer, die Pathomechanismen allerdings unterscheiden sich und sind bei Frauen noch nicht ausreichend untersucht (144).

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich die Effekte der CaMKII bei OSA untersucht, was weiterführende Versuche notwendig macht. So wurden bei Patienten mit Obstruktiver Schlafapnoe allerdings auch verminderte Konzentrationen von Connexin-43 (126) beobachtet.

Wie oben gezeigt gibt es mehrere Wege und Mechanismen die CaMKII zu aktivieren (29,88–90). Diese, sowie ihre jeweilige Auswirkung und Bedeutung für die im Mausmodell beobachteten Pathologien, wurden in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, was weitere Nachforschungen nötig macht.

5. Zusammenfassung

Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom gewinnt global zunehmend an sozioökonomischer Relevanz. Grund sind vor allem die zahlreichen assoziierten Folgeerkrankungen. In kardialer Hinsicht sind hier vor allem das Vorhofflimmern und eine kontraktile Dysfunktion im Sinne einer Herzinsuffizienz zu nennen. Interessanterweise konnte in den vergangenen Jahren in myokardialen Proben von all diesen Patientengruppen eine vermehrte Aktivität und Expression der CaMKII nachgewiesen werden. Diese Studien analysierten allerdings sehr heterogene Patientenkollektive mit verschiedenen Komorbiditäten, was die Interpretation der Befunde erschwert. Aufgrund bislang mangelnder pharmakologischer Behandlungsoptionen ist die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Möglichkeiten jedoch von großer Relevanz. Hierfür ist ein genaues Verständnis der Pathomechanismen zwingend notwendig. Dies war das Ziel der vorliegenden Arbeit, wozu ein Mausmodell der OSA verwendet wurde, welches eine detaillierte Untersuchung der Arrhythmogenese und Entstehung der kontraktiven Dysfunktion ohne das Vorliegen potenzieller Störfaktoren erlaubte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der Analyse des atrialen und ventrikulären Kalziumhaushaltes bei OSA und welche Rolle die CaMKII dabei spielt. Hierzu wurden neben Wildtyp- auch CaMKII-Knock-out Mäuse verwendet. Im Mittelpunkt der Versuche stand die Detektion atrialer arrhythmischer Ereignisse und die Analyse des Kalziumtransienten als Maß für die Kontraktilität. Durchgeführt wurden die nötigen Experimente am Epifluoreszenzmikroskop. Hier konnte im Vorhof eine vermehrte CaMKII-abhängige pro-arrhythmische Aktivität in Schlafapnoemäusen beobachtet werden, welche sich in signifikanter Korrelation mit der Anzahl der inspiratorischen Flusslimitierungen (IFLs) pro Stunde verhielt. Ventrikulär zeigten sich in den Schlafapnoemäusen erneut in Abhängigkeit der CaMKII erniedrigte Kontraktionsparameter im Sinne erniedrigter Kalziumtransienten und einer verminderten Sarkomerverkürzung. Als Ursache bewiesen Experimente mit Koffein einen geringeren Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulum, was auf ein CaMKII-abhängiges diastolisches Kalziumleck hindeuten könnte. Somit stellt die CaMKII eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur für Patienten mit OSAS und kardiovaskulären Begleiterkrankungen dar, zumal sich bereits einige CaMKII-Inhibitoren in präklinischer Entwicklung befinden.

6. 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.* 1993;328(17):1230–5. doi:10.1056/NEJM199304293281704 Cited in: PubMed; PMID 8464434.
2. Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, Somers VK. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology.* 2007;49(5):565–71. doi:10.1016/j.jacc.2006.08.060 Cited in: PubMed; PMID 17276180.
3. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2010;106(6):1134–44. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.203836 Cited in: PubMed; PMID 20056922.
4. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res.* 2010;107(9):1150–61. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220418 Cited in: PubMed; PMID 20814023.
5. Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Förster A, Schmitto JD, Gummert J, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation.* 2013;128(9):970–81. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001746 Cited in: PubMed; PMID 23877259.
6. Lebek S, Pichler K, Reuthner K, Trum M, Tafelmeier M, Muströph J, Camboni D, Rupprecht L, Schmid C, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Enhanced CaMKII-Dependent Late I_{Na} Induces Atrial Proarrhythmic Activity in Patients With Sleep-Disordered Breathing. *Circ Res.* 2020;126(5):603–15. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315755 Cited in: PubMed; PMID 31902278.

7. Arzt M, Drzymalski MA, Ripfel S, Meindl S, Biedermann A, Durczok M, Keller K, Mustroph J, Katz S, Tafelmeier M, Lebek S, Flörchinger B, Camboni D, Wittmann S, Backs J, Schmid C, Maier LS, Wagner S. Enhanced Cardiac CaMKII Oxidation and CaMKII-Dependent SR Ca Leak in Patients with Sleep-Disordered Breathing. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2022;11(2). doi:10.3390/antiox11020331 Cited in: PubMed; PMID 35204213.
8. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;116(12):1956–70. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304678 Cited in: PubMed; PMID 26044250.
9. Fischer TH, Neef S, Maier LS. The Ca-calmodulin dependent kinase II: a promising target for future antiarrhythmic therapies? *J Mol Cell Cardiol*. 2013;58:182–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.003 Cited in: PubMed; PMID 23159442.
10. Lebek S, Hegner P, Schach C, Reuthner K, Tafelmeier M, Maier LS, Arzt M, Wagner S. 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. doi:10.1371/journal.pone.0243844 Cited in: PubMed; PMID 33301470.
11. Hegner P, Lebek S, Schaner B, Ofner F, Gugg M, Maier LS, Arzt M, Wagner S. CaMKII-Dependent Contractile Dysfunction and Pro-Arrhythmic Activity in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *Antioxidants*. 2023;12(2):315. doi:10.3390/antiox12020315
12. Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *The Lancet*. 2002;360(9328):237–45. doi:10.1016/S0140-6736(02)09464-3 Cited in: PubMed; PMID 12133673.
13. Arzt M, Oldenburg O, Graml A, Erdmann E, Teschler H, Wegscheider K, Suling A, Woehrle H. Phenotyping of Sleep-Disordered Breathing in Patients With Chronic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction-the SchlaHF Registry. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(12). doi:10.1161/JAHA.116.005899 Cited in: PubMed; PMID 29187390.
14. Bousquet J, editor. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach. Geneva: WHO; 2007. 146 p. eng.

15. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin J-L, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2019;7(8):687–98. doi:10.1016/S2213-2600(19)30198-5
16. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *The Lancet*. 2014;383(9918):736–47. doi:10.1016/S0140-6736(13)60734-5
17. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R, Maislin G, Pack AI. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(5):522–30. doi:10.1164/rccm.200208-866OC Cited in: PubMed; PMID 12746251.
18. Schwartz AR, Patil SP, Squier S, Schneider H, Kirkness JP, Smith PL. Obesity and upper airway control during sleep. *Journal of Applied Physiology*. 2010;108(2):430–5. doi:10.1152/jappphysiol.00919.2009 Cited in: PubMed; PMID 19875707.
19. Farrell PC, Richards G. Recognition and treatment of sleep-disordered breathing: an important component of chronic disease management. *Journal of translational medicine*. 2017;15(1):114. doi:10.1186/s12967-017-1211-y Cited in: PubMed; PMID 28545542.
20. Malhotra A, Morrell MJ, Eastwood PR. Update in respiratory sleep disorders: Epilogue to a modern review series. *Respirology (Carlton, Vic.)*. 2018;23(1):16–7. doi:10.1111/resp.13211 Cited in: PubMed; PMID 29110381.
21. Redline S, Young T. Epidemiology and natural history of obstructive sleep apnea. *Ear, nose, & throat journal [Internet]*. 1993;72(1):20-1, 24-6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8444122/> Cited in: PubMed; PMID 8444122.
22. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, Lavie L, Pépin J-L. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature reviews. Disease primers*. 2015;115015. doi:10.1038/nrdp.2015.15 Cited in: PubMed; PMID 27188535.
23. Qaseem A, Holty J-EC, Owens DK, Dallas P, Starkey M, Shekelle P. Management of obstructive sleep apnea in adults: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2013;159(7):471–83.

doi:10.7326/0003-4819-159-7-201310010-00704 Cited in: PubMed; PMID 24061345.

24. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, Mediano O, Chen R, Drager LF, Liu Z, Chen G, Du B, McArdle N, Mukherjee S, Tripathi M, Billot L, Li Q, Lorenzi-Filho G, Barbe F, Redline S, Wang J, Arima H, Neal B, White DP, Grunstein RR, Zhong N, Anderson CS. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med*. 2016;375(10):919–31. doi:10.1056/NEJMoa1606599 Cited in: PubMed; PMID 27571048.
25. Hung J, Whitford EG, Hillman DR, Parsons RW. Association of sleep apnoea with myocardial infarction in men. *The Lancet*. 1990;336(8710):261–4. doi:10.1016/0140-6736(90)91799-G Cited in: PubMed; PMID 1973968.
26. Lee C-H, Sethi R, Li R, Ho H-H, Hein T, Jim M-H, Loo G, Koo C-Y, Gao X-F, Chandra S, Yang X-X, Furlan SF, Ge Z, Mundhekar A, Zhang W-W, Uchôa CHG, Kharwar RB, Chan P-F, Chen S-L, Chan MY, Richards AM, Tan H-C, Ong T-H, Roldan G, Tai B-C, Drager LF, Zhang J-J. Obstructive Sleep Apnea and Cardiovascular Events After Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation*. 2016;133(21):2008–17. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019392 Cited in: PubMed; PMID 27178625.
27. Johnson KG, Johnson DC. Frequency of sleep apnea in stroke and TIA patients: a meta-analysis. *Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine [Internet]*. 2010;6(2):131–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20411688/> Cited in: PubMed; PMID 20411688.
28. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, Redline S, Resnick HE, Tong EK, Diener-West M, Shahar E. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*. 2010;122(4):352–60. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.901801 Cited in: PubMed; PMID 20625114.
29. Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *Eur Respir J*. 2013;41(6):1439–51. doi:10.1183/09031936.00128412 Cited in: PubMed; PMID 23258782.

30. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(4):1897–904. doi:10.1172/JCI118235 Cited in: PubMed; PMID 7560081.
31. Marin JM, Agusti A, Villar I, Forner M, Nieto D, Carrizo SJ, Barbé F, Vicente E, Wei Y, Nieto FJ, Jelic S. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension. *JAMA*. 2012;307(20):2169–76. doi:10.1001/jama.2012.3418 Cited in: PubMed; PMID 22618924.
32. Gaisl T, Bratton DJ, Kohler M. The impact of obstructive sleep apnoea on the aorta. *Eur Respir J*. 2015;46(2):532–44. doi:10.1183/09031936.00029315 Cited in: PubMed; PMID 26113685.
33. Buchner S, Eglseer M, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, Stroszczyński C, Hamer OW, Fellner C, Zeman F, Pfeifer M, Arzt M. Sleep disordered breathing and enlargement of the right heart after myocardial infarction. *Eur Respir J*. 2015;45(3):680–90. doi:10.1183/09031936.00057014 Cited in: PubMed; PMID 25359347.
34. Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K, Angermann C, d'Ortho M-P, Erdmann E, Levy P, Simonds AK, Somers VK, Zannad F, Teschler H. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1095–105. doi:10.1056/NEJMoa1506459 Cited in: PubMed; PMID 26323938.
35. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103(5):769–77. doi:10.1161/01.CIR.103.5.769 Cited in: PubMed; PMID 11156892.
36. Dimitri H, Ng M, Brooks AG, Kuklik P, Stiles MK, Lau DH, Antic N, Thornton A, Saint DA, McEvoy D, Antic R, Kalman JM, Sanders P. Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2012;9(3):321–7. doi:10.1016/j.hrthm.2011.10.017 Cited in: PubMed; PMID 22016075.
37. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res*.

- 2014;114(9):1483–99. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302226 Cited in: PubMed; PMID 24763466.
38. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(8):2955–68. doi:10.1172/JCI46315 Cited in: PubMed; PMID 21804195.
 39. Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE, Malouf JF, Ammash NM, Friedman PA, Somers VK. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2004;110(4):364–7. doi:10.1161/01.CIR.0000136587.68725.8E Cited in: PubMed; PMID 15249509.
 40. Bitter T, Langer C, Vogt J, Lange M, Horstkotte D, Oldenburg O. Sleep-disordered breathing in patients with atrial fibrillation and normal systolic left ventricular function. *Deutsches Arzteblatt international*. 2009;106(10):164–70. doi:10.3238/arztebl.2009.0164 Cited in: PubMed; PMID 19578392.
 41. Shukla A, Aizer A, Holmes D, Fowler S, Park DS, Bernstein S, Bernstein N, Chinitz L. Effect of Obstructive Sleep Apnea Treatment on Atrial Fibrillation Recurrence: A Meta-Analysis. *JACC. Clinical electrophysiology*. 2015;1(1-2):41–51. doi:10.1016/j.jacep.2015.02.014 Cited in: PubMed; PMID 29759338.
 42. Linz D, McEvoy RD, Cowie MR, Somers VK, Nattel S, Lévy P, Kalman JM, Sanders P. Associations of Obstructive Sleep Apnea With Atrial Fibrillation and Continuous Positive Airway Pressure Treatment: A Review. *JAMA cardiology*. 2018;3(6):532–40. doi:10.1001/jamacardio.2018.0095 Cited in: PubMed; PMID 29541763.
 43. Chami HA, Devereux RB, Gottdiener JS, Mehra R, Roman MJ, Benjamin EJ, Gottlieb DJ. Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation*. 2008;117(20):2599–607. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.717892 Cited in: PubMed; PMID 18458174.
 44. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, Caterina R de, Sutter J de, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey J-Y, Ponikowski P, Rutten FH. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial

- Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2010;31(19):2369–429. doi:10.1093/eurheartj/ehq278 Cited in: PubMed; PMID 20802247.
45. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(1):30–41. doi:10.1038/nrcardio.2010.165 Cited in: PubMed; PMID 21060326.
 46. Chatterjee K, Massie B. Systolic and diastolic heart failure: differences and similarities. *Journal of cardiac failure*. 2007;13(7):569–76. doi:10.1016/j.cardfail.2007.04.006 Cited in: PubMed; PMID 17826648.
 47. Chadda KR, Fazmin IT, Ahmad S, Valli H, Edling CE, Huang CL-H, Jeevaratnam K. Arrhythmogenic mechanisms of obstructive sleep apnea in heart failure patients. *Sleep*. 2018;41(9). doi:10.1093/sleep/zsy136 Cited in: PubMed; PMID 30016501.
 48. Borlaug BA, Redfield MM. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation*. 2011;123(18):2006-13; discussion 2014. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.954388 Cited in: PubMed; PMID 21555723.
 49. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2012;33(14):1787–847. doi:10.1093/eurheartj/ehs104 Cited in: PubMed; PMID 22611136.
 50. Laaban J-P, Pascal-Sebaoun S, Bloch E, Orvoën-Frija E, Oppert J-M, Huchon G. Left ventricular systolic dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2002;122(4):1133–8. doi:10.1378/chest.122.4.1133 Cited in: PubMed; PMID 12377833.
 51. Arzt M, Woehrle H, Oldenburg O, Graml A, Suling A, Erdmann E, Teschler H, Wegscheider K. Prevalence and Predictors of Sleep-Disordered Breathing in

- Patients With Stable Chronic Heart Failure: The SchlaHF Registry. *JACC. Heart failure*. 2016;4(2):116–25. doi:10.1016/j.jchf.2015.09.014 Cited in: PubMed; PMID 26682790.
52. Abraham JM, Connolly SJ. Atrial fibrillation in heart failure: stroke risk stratification and anticoagulation. *Heart failure reviews*. 2014;19(3):305–13. doi:10.1007/s10741-014-9420-4 Cited in: PubMed; PMID 24445936.
 53. Packer M. Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation*. 1985;72(4):681–5. doi:10.1161/01.cir.72.4.681 Cited in: PubMed; PMID 2863012.
 54. Selim BJ, Ramar K. Management of Sleep Apnea Syndromes in Heart Failure. *Sleep medicine clinics*. 2017;12(1):107–21. doi:10.1016/j.jsmc.2016.10.004 Cited in: PubMed; PMID 28159090.
 55. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2nd Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001. 446 p.
 56. Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science (New York, N.Y.)*. 1969;164(3886):1356–65. doi:10.1126/science.164.3886.1356 Cited in: PubMed; PMID 4181952.
 57. Barth E. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24(7):669–81. doi:10.1016/0022-2828(92)93381-s Cited in: PubMed; PMID 1404407.
 58. Marieb EN, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology*: Pearson Benjamin Cummings; 2007.
 59. Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature*. 1980;283(5747):545–9. doi:10.1038/283545a0 Cited in: PubMed; PMID 7354837.
 60. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205. doi:10.1038/415198a Cited in: PubMed; PMID 11805843.
 61. Brandes R, Lang F, Schmidt RF. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
 62. Haselgrove JC, Huxley HE. X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle. *Journal of*

- molecular biology. 1973;77(4):549–68. doi:10.1016/0022-2836(73)90222-2 Cited in: PubMed; PMID 4541885.
63. Huxley HE. Muscular contraction and cell motility. *Nature*. 1973;243(5408):445–9. doi:10.1038/243445a0 Cited in: PubMed; PMID 4275580.
 64. Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner M-L, Gao Z, Chen B, Grumbach IM, Luczak ED, Colbran RJ, Song L-S, Hund TJ, Mohler PJ, Anderson ME. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):4996–5000. doi:10.1073/pnas.0913760107 Cited in: PubMed; PMID 20194790.
 65. Lee T-S, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A. Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25560–7. doi:10.1074/jbc.M508661200 Cited in: PubMed; PMID 16820363.
 66. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Schulman H, Sung RJ. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics [Internet]*. 1998;287(3):996–1006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9864285/> Cited in: PubMed; PMID 9864285.
 67. Feher JJ, editor. *Quantitative human physiology: An introduction*. Amsterdam: Elsevier/AP; 2017. 968 p. (Academic Press series in biomedical engineering).
 68. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1-14. doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1 Cited in: PubMed; PMID 6346892.
 69. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 1997;272(37):23389–97. doi:10.1074/jbc.272.37.23389 Cited in: PubMed; PMID 9287354.
 70. Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophysical Journal*. 2004;86(4):2121–8. doi:10.1016/S0006-3495(04)74271-X

71. Dobrev D, Wehrens XHT. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20(1):30–4. doi:10.1016/j.tcm.2010.03.004 Cited in: PubMed; PMID 20685575.
72. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2004;94(6):e61-70. doi:10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2 Cited in: PubMed; PMID 15016728.
73. Rokita AG, Sag C-M, Maier LS. Herzinsuffizienz. Elektromechanische Kopplung bei Herzinsuffizienz und neue Therapieoptionen [Heart failure. Excitation-contraction coupling and novel therapeutic options]. *Herz.* 2011;36(2):94–101. ger. doi:10.1007/s00059-010-3415-2 Cited in: PubMed; PMID 21286671.
74. Sitsapesan R, Williams AJ. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol.* 1990;423:425–39. doi:10.1113/jphysiol.1990.sp018031 Cited in: PubMed; PMID 2167363.
75. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve.* 2007;35(4):430–42. doi:10.1002/mus.20745 Cited in: PubMed; PMID 17286271.
76. Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(1):H249-55. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.1.H249 Cited in: PubMed; PMID 10644605.
77. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2006;318(1):214–22. doi:10.1124/jpet.106.101832 Cited in: PubMed; PMID 16565163.
78. Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, Möllencamp J, Dybkova N, Islam T, Shah AM, Maier LS. NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2014;75:206–15. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.07.011 Cited in: PubMed; PMID 25073061.

79. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(12):3127–38. doi:10.1172/JCI26620 Cited in: PubMed; PMID 17124532.
80. Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting J, Shah AM, Maier LS, Sossalla S, Unsöld B. Enhanced late I_{Na} induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;7694–105. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.016 Cited in: PubMed; PMID 25173923.
81. Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013;61111–22. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.03.021 Cited in: PubMed; PMID 23570977.
82. Rokita AG, Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation*. 2012;126(17):2125–39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.124990 Cited in: PubMed; PMID 23091085.
83. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;84(6):713–21. doi:10.1161/01.res.84.6.713 Cited in: PubMed; PMID 10189359.
84. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*. 2002;364(Pt 3):593–611. doi:10.1042/BJ20020228 Cited in: PubMed; PMID 11931644.
85. Westenbrink BD, Edwards AG, McCulloch AD, Brown JH. The promise of CaMKII inhibition for heart disease: preventing heart failure and arrhythmias. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(8):889–903. doi:10.1517/14728222.2013.809064 Cited in: PubMed; PMID 23789646.

86. Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science (New York, N.Y.)*. 1998;279(5352):870–3. doi:10.1126/science.279.5352.870 Cited in: PubMed; PMID 9452388.
87. Yamauchi T. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(8):1342–54. doi:10.1248/bpb.28.1342 Cited in: PubMed; PMID 16079472.
88. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham A-JL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2008;133(3):462–74. doi:10.1016/j.cell.2008.02.048 Cited in: PubMed; PMID 18455987.
89. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS. 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*. 2011;108(5):555–65. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.221911 Cited in: PubMed; PMID 21252154.
90. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, Nikolaev VO, Maier LS. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late INa. *Cardiovascular research*. 2014;103(1):168–77. doi:10.1093/cvr/cvu120 Cited in: PubMed; PMID 24812278.
91. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Krüger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schäfer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*. 2010;122(10):993–1003. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943431 Cited in: PubMed; PMID 20733099.
92. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011;51(4):468–73. doi:10.1016/j.jmcc.2011.01.012 Cited in: PubMed; PMID 21276796.

93. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res.* 2003;92(8):904–11. doi:10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1 Cited in: PubMed; PMID 12676813.
94. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res.* 2001;88(11):1159–67. doi:10.1161/hh1101.091193 Cited in: PubMed; PMID 11397782.
95. Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Förster A, Herting J, Kleinwächter A, Ljubojevic S, Schmitto JD, Streckfuß-Bömeke K, Renner A, Gummert J, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S. Ca(2+) /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(12):1292–300. doi:10.1002/ejhf.163 Cited in: PubMed; PMID 25201344.
96. Linz D, Schotten U, Neuberger H-R, Böhm M, Wirth K. Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation. *Heart Rhythm.* 2011;8(9):1436–43. doi:10.1016/j.hrthm.2011.03.053 Cited in: PubMed; PMID 21457790.
97. Brennick MJ, Pack AI, Ko K, Kim E, Pickup S, Maislin G, Schwab RJ. Altered upper airway and soft tissue structures in the New Zealand Obese mouse. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(2):158–69. doi:10.1164/rccm.200809-1435OC Cited in: PubMed; PMID 18996996.
98. Chopra S, Polotsky VY, Jun JC. Sleep Apnea Research in Animals. Past, Present, and Future. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2016;54(3):299–305. doi:10.1165/rcmb.2015-0218TR Cited in: PubMed; PMID 26448201.
99. Baum DM, Morales Rodriguez B, Attali V, Cauhapé M, Arnulf I, Cardot P, Bodineau L, Fiamma M-N. New Zealand Obese Mice as a Translational Model of Obesity-related Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(10):1336–9. doi:10.1164/rccm.201801-0162LE Cited in: PubMed; PMID 30019912.

100. Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P, Joost HG. A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *European journal of clinical investigation*. 2000;30(3):195–202. doi:10.1046/j.1365-2362.2000.00611.x Cited in: PubMed; PMID 10691995.
101. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996. doi:10.17226/5140 Cited in: PubMed; PMID 25121211.
102. Dewan PA, Owen AJ, Byard RW. Long-term histological response to subcutaneously injected Polytef and Bioplastique in a rat model. *British journal of urology*. 1995;76(2):161–4. doi:10.1111/j.1464-410x.1995.tb07665.x Cited in: PubMed; PMID 7663904.
103. Diamond DA, Mattoo TK. Endoscopic treatment of primary vesicoureteral reflux. *N Engl J Med*. 2012;366(13):1218–26. doi:10.1056/NEJMct1108922 Cited in: PubMed; PMID 22455416.
104. Gutberlet M. Bildgebende Diagnostik angeborener Herzfehler: Mit bildgestützter Therapie. Georg-Thieme-Verlag. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. 383 p. ger.
105. Crossland RF, Durgan DJ, Lloyd EE, Phillips SC, Reddy AK, Marrelli SP, Bryan RM. A new rodent model for obstructive sleep apnea: effects on ATP-mediated dilations in cerebral arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(4):R334-42. doi:10.1152/ajpregu.00244.2013 Cited in: PubMed; PMID 23761641.
106. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *American journal of epidemiology*. 2013;177(9):1006–14. doi:10.1093/aje/kws342 Cited in: PubMed; PMID 23589584.
107. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D, Tobback N, Mooser V, Preisig M, Malhotra A, Waeber G, Vollenweider P, Tafti M, Haba-Rubio J. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *The Lancet. Respiratory medicine*. 2015;3(4):310–8. doi:10.1016/S2213-2600(15)00043-0 Cited in: PubMed; PMID 25682233.
108. Bjornsdottir E, Keenan BT, Eysteinsdottir B, Arnardottir ES, Janson C, Gislason T, Sigurdsson JF, Kuna ST, Pack AI, Benediktsdottir B. Quality of life among

- untreated sleep apnea patients compared with the general population and changes after treatment with positive airway pressure. *Journal of sleep research*. 2015;24(3):328–38. doi:10.1111/jsr.12262 Cited in: PubMed; PMID 25431105.
109. Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, Bradley TD. Association of Sleep-disordered Breathing and the Occurrence of Stroke. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(11):1447–51. doi:10.1164/rccm.200505-702OC Cited in: PubMed; PMID 16141444.
110. Mehra R, Chung MK, Olshansky B, Dobrev D, Jackson CL, Kundel V, Linz D, Redeker NS, Redline S, Sanders P, Somers VK. Sleep-Disordered Breathing and Cardiac Arrhythmias in Adults: Mechanistic Insights and Clinical Implications: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;146(9):e119-e136. doi:10.1161/CIR.0000000000001082 Cited in: PubMed; PMID 35912643.
111. Parati G, Lombardi C, Castagna F, Mattaliano P, Filardi PP, Agostoni P. Heart failure and sleep disorders. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(7):389–403. doi:10.1038/nrcardio.2016.71 Cited in: PubMed; PMID 27173772.
112. Oldenburg O, Lamp B, Faber L, Teschler H, Horstkotte D, Töpfer V. Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure: a contemporary study of prevalence in and characteristics of 700 patients. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(3):251–7. doi:10.1016/j.ejheart.2006.08.003 Cited in: PubMed; PMID 17027333.
113. Lebek S, Hegner P, Tafelmeier M, Rupprecht L, Schmid C, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Female Patients With Sleep-Disordered Breathing Display More Frequently Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8675987. doi:10.3389/fmed.2021.675987 Cited in: PubMed; PMID 34124106.
114. Lebek S, Hegner P, Hultsch R, Rohde J, Rupprecht L, Schmid C, Sossalla S, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.8 Dysregulates Na and Ca, Leading to Arrhythmias in Patients with Sleep-Disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;206(11):1428–31. doi:10.1164/rccm.202205-0981LE Cited in: PubMed; PMID 35944144.
115. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribouot C, Stanke-Labesque F, Pépin J-L, Lévy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing:

- contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR journal*. 2009;50(3):262–81. doi:10.1093/ilar.50.3.262 Cited in: PubMed; PMID 19506313.
116. Farré R, Montserrat JM, Gozal D, Almendros I, Navajas D. Intermittent Hypoxia Severity in Animal Models of Sleep Apnea. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1556. doi:10.3389/fphys.2018.01556 Cited in: PubMed; PMID 30459638.
 117. Costanzo MR, Khayat R, Ponikowski P, Augostini R, Stellbrink C, Mianulli M, Abraham WT. Mechanisms and clinical consequences of untreated central sleep apnea in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(1):72–84. doi:10.1016/j.jacc.2014.10.025 Cited in: PubMed; PMID 25572513.
 118. Cowie MR, Linz D, Redline S, Somers VK, Simonds AK. Sleep Disordered Breathing and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2021;78(6):608–24. doi:10.1016/j.jacc.2021.05.048 Cited in: PubMed; PMID 34353537.
 119. Schoonderwoerd BA, Smit MD, Pen L, van Gelder IC. New risk factors for atrial fibrillation: causes of 'not-so-lone atrial fibrillation'. *Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2008;10(6):668–73. doi:10.1093/europace/eun124 Cited in: PubMed; PMID 18480076.
 120. Lebek S, Plöchl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lucht CM, Schopka S, Flörchinger B, Schmid C, Zausig Y, Pagratis N, Marchand B, Koltun DO, Hung WK, Ahmadyar S, Belardinelli L, Maier LS, Wagner S. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;118:159–68. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.03.020 Cited in: PubMed; PMID 29614261.
 121. Guo T, Zhang T, Ginsburg KS, Mishra S, Brown JH, Bers DM. CaMKII δ C slows Ca²⁺ decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks. *Biophysical Journal*. 2012;102(11):2461–70. doi:10.1016/j.bpj.2012.04.015 Cited in: PubMed; PMID 22713561.
 122. Tribulová N, Knežl V, Okruhlicová L, Slezák J. Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias.

Physiological research. 2008;57 Suppl 2S1-S13.
doi:10.33549/physiolres.931546 Cited in: PubMed; PMID 18373398.

123. Andelova K, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Sykora M, Prado NJ, Diez ER, Hlivak P, Tribulova N. Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. *International journal of molecular sciences*. 2020;22(1). doi:10.3390/ijms22010260 Cited in: PubMed; PMID 33383853.
124. Andelova K, Szeiffova Bacova B, Sykora M, Pavelka S, Rauchova H, Tribulova N. Cardiac Cx43 Signaling Is Enhanced and TGF- β 1/SMAD2/3 Suppressed in Response to Cold Acclimation and Modulated by Thyroid Status in Hairless SHR. *Biomedicines*. 2022;10(7). doi:10.3390/biomedicines10071707 Cited in: PubMed; PMID 35885012.
125. Decrock E, Hoorelbeke D, Ramadan R, Delvaeye T, Bock M de, Wang N, Krysko DV, Baatout S, Bultynck G, an Aerts, Vinken M, Leybaert L. Calcium, oxidative stress and connexin channels, a harmonious orchestra directing the response to radiotherapy treatment? *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 2017;1864(6):1099–120. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.02.007 Cited in: PubMed; PMID 28193563.
126. Hegner P, Lebek S, Tafelmeier M, Camboni D, Schopka S, Schmid C, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Sleep-disordered breathing is independently associated with reduced atrial connexin 43 expression. *Heart Rhythm*. 2021;18(12):2187–94. doi:10.1016/j.hrthm.2021.09.009 Cited in: PubMed; PMID 34517118.
127. Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS. Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(21):2330–42. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.055 Cited in: PubMed; PMID 20488304.
128. Mattiazzi A, Kranias EG. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol*. 2014;55. doi:10.3389/fphar.2014.00005 Cited in: PubMed; PMID 24550830.
129. Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions. *Frontiers in bioscience: a journal*

- and virtual library. 2008;135988–6005. doi:10.2741/3131 Cited in: PubMed; PMID 18508637.
130. Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, Walsh RA, Kranias EG. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(2):533–9. doi:10.1172/JCI118446 Cited in: PubMed; PMID 8567978.
 131. Laczay B, Faulx MD. Obstructive Sleep Apnea and Cardiac Arrhythmias: A Contemporary Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(17):3785. doi:10.3390/jcm10173785 Cited in: PubMed; PMID 34501232.
 132. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2005;352(12):1206–14. doi:10.1056/NEJMoa041832 Cited in: PubMed; PMID 15788497.
 133. Marinheiro R, Parreira L, Amador P, Mesquita D, Farinha J, Fonseca M, Duarte T, Lopes C, Fernandes A, Caria R. Ventricular Arrhythmias in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Current cardiology reviews*. 2019;15(1):64–74. doi:10.2174/1573403X14666181012153252 Cited in: PubMed; PMID 30338742.
 134. Guilleminault C, Connolly SJ, Winkle RA. Cardiac arrhythmia and conduction disturbances during sleep in 400 patients with sleep apnea syndrome. *The American journal of cardiology*. 1983;52(5):490–4. doi:10.1016/0002-9149(83)90013-9 Cited in: PubMed; PMID 6193700.
 135. Javaheri S. Effects of continuous positive airway pressure on sleep apnea and ventricular irritability in patients with heart failure. *Circulation*. 2000;101(4):392–7. doi:10.1161/01.cir.101.4.392 Cited in: PubMed; PMID 10653830.
 136. Harbison J, O'Reilly P, McNicholas WT. Cardiac rhythm disturbances in the obstructive sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive airway pressure therapy. *Chest*. 2000;118(3):591–5. doi:10.1378/chest.118.3.591 Cited in: PubMed; PMID 10988177.
 137. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine

- Skibelund A. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2021;42(36):3599–726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368 Cited in: PubMed; PMID 34447992.
138. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, Boriani G, Castella M, Dan G-A, Dilaveris PE, Fauchier L, Filippatos G, Kalman JM, La Meir M, Lane DA, Lebeau J-P, Lettino M, Lip GYH, Pinto FJ, Thomas GN, Valgimigli M, van Gelder IC, van Putte BP, Watkins CL. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;42(5):373–498. doi:10.1093/eurheartj/ehaa612 Cited in: PubMed; PMID 32860505.
139. Neef S, Mann C, Zwenger A, Dybkova N, Maier LS. Reduction of SR Ca²⁺ leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(4):45. doi:10.1007/s00395-017-0637-y Cited in: PubMed; PMID 28612156.
140. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, Schulman H, Maier LS. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;115:73–81. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.12.015 Cited in: PubMed; PMID 29294328.
141. Grandi E, Dobrev D. Non-ion channel therapeutics for heart failure and atrial fibrillation: Are CaMKII inhibitors ready for clinical use? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;121:300–3. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.10.010 Cited in: PubMed; PMID 29079077.
142. Hoeker GS, Hanafy MA, Oster RA, Bers DM, Pogwizd SM. Reduced Arrhythmia Inducibility With Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibition in Heart Failure Rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2016;67(3):260–5. doi:10.1097/FJC.0000000000000343 Cited in: PubMed; PMID 26650851.
143. Lebek S, Hegner P, Tafelmeier M, Rupprecht L, Schmid C, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Female Patients With Sleep-Disordered Breathing Display More Frequently Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Med*

(Lausanne). 2021;8675987. doi:10.3389/fmed.2021.675987 Cited in: PubMed; PMID 34124106.

144. Hegner P, Lebek S, Maier LS, Arzt M, Wagner S. The Effect of Gender and Sex Hormones on Cardiovascular Disease, Heart Failure, Diabetes, and Atrial Fibrillation in Sleep Apnea. *Frontiers in physiology*. 2021;12741896. doi:10.3389/fphys.2021.741896 Cited in: PubMed; PMID 34744785.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| ° | Grad |
| °C | Grad Celsius |
| σ | Standardabweichung |
| σ^2 | Varianz |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| μM | Mikromolar |
| μmol | Mikromol |
| AM | Azetylmethylester |
| AP | Aktionspotenzial |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCS | Bovine Calf Serum |
| BMI | Body Mass Index |
| C | Konzentration |
| Ca^{2+} | Kalzium |
| CaCl_2 | Kalziumchlorid |
| CKO | CaMKII- Knock- out |
| CaMKII | Kalzium- Calmodulin- regulierende Kinase II |
| CPAP | Continous Positive Airway Pressure |
| CTRL | Kontrolle |
| DAD | Verzögerte Nachdepolarisation |
| dB | Dezibel |
| EAD | Verfrühte Nachdepolarisation |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EKG | Elektrokardiographie |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HF | Herzinsuffizienz |
| HFpEF | Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion |

| | |
|-------------------|--|
| HFrEF | Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion |
| IFL | Inspiratorische Flusslimitierung |
| K ⁺ | Kalium |
| KCL | Kaliumchlorid |
| Kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KO | Knock- out |
| LTCC | L- Typ Kalziumkanal |
| LVEF | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion |
| M | Masse |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MhZ | Megahertz |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| mV | Milivolt |
| n | Stichprobengröße |
| n.s. | Nicht signifikant |
| Na ⁺ | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCX | Natrium- Kalziumaustauscher |
| nM | Nanomolar |
| NT | Normaltyrode |
| OP | Operation |
| OSA | Obstruktive Schlafapnoe |
| p | P-Wert |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PKA | Proteinkinase A |
| PLB | Phosplamban |
| PTFE | Polytetrafluoräthylen |
| PW | Pulsed- Wave Doppler |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |

| | |
|--------|--|
| RYR2 | Ryanodinrezeptor 2 |
| RT | Relaxierungszeit |
| s | Sekunde |
| SBAS | Schlafbezogene- Atmungsstörung |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| Ser | Serin |
| SERCA2 | Sarkoplasmatisch/endoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase 2 |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| Thr | Threonin |
| V | Volumen |
| VHF | Vorhofflimmern |
| WHO | World Health Organisation |
| w/v | Weight per volume |
| WT | Wildtyp |
| ZTL | Zentrales Tierlabor |

7.2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: MRT Darstellung der oberen Atemwege | 8 |
| Abbildung 1.2: Pathophysiologische Mechanismen der Arrhythmogenese bei OSA .. | 11 |
| Abbildung 1.3: Wechselwirkung zwischen OSA und HF | 12 |
| Abbildung 1.4: Schematische Ultrastruktur eines Myozyten | 14 |
| Abbildung 1.6: Vorgang der myokardialen Kontraktion | 17 |
| Abbildung 1.8: Einfluss der PTFE- Injektion auf die murine Lungenfunktion | 25 |
| Abbildung 1.9: Einfluss der PTFE- Injektion auf die kardiale Pumpleistung | 25 |
| Abbildung 1.10: Erhaltene LVEF durch CaMKII- KO | 26 |
| Abbildung 2.1: Darstellung der intraoperativen Lagerung | 30 |
| Abbildung 2.2: Injektion von PTFE | 31 |
| Abbildung 2.3: Polytetrafluoräthylen | 31 |
| Abbildung 2.4: Echokardiographische Messung im M- Mode | 33 |
| Abbildung 2.5: Buxco- Setup | 34 |
| Abbildung 2.6: Apnoe in Fine- Point Software | 36 |
| Abbildung 2.7: Langendorff- Perfusionsapparat | 37 |
| Abbildung 2.8: Epifluoreszenzsetup IonOptix | 41 |
| Abbildung 2.9: Fluoreszenzemissionsspektrum von FURA-2, AM | 42 |
| Abbildung 3.1: Zunahme des Zungendiameters | 46 |
| Abbildung 3.2: Korrelation zwischen Zungendiameter und Apnoen | 47 |
| Abbildung 3.3: Pro- arrhythmische Ereignisse in Vorhofzellen | 49 |
| Abbildung 3.4: Provozierte pro- arrhythmische Ereignisse in Vorhofzellen | 51 |
| Abbildung 3.5: Diastolisches Kalzium in Vorhofzellen | 52 |
| Abbildung 3.6: RT90 und Kalziumtransient in Vorhofzellen | 53 |
| Abbildung 3.7: Originalregistrierung von Kalziumtransienten im Ventrikel | 54 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.8: Kalziumtransientenamplitude und Myofilamentverkürzung im Ventrikel | 56 |
| Abbildung 3.9: Originalregistrierung der Koffeintransienten im Ventrikel | 57 |
| Abbildung 3.10: Reduzierte Koffeintransientenamplitude in WT PTFE | 58 |
| Abbildung 3.11: Diastolisches Kalziumhandling in Ventrikelzellen | 59 |

7.3. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Enzymlösung für Zellisolation | 38 |
| Tabelle 2: Stopplösung 1 | 38 |
| Tabelle 3: Stopplösung 2 | 39 |
| Tabelle 4: Enzymlösung für Kalziumaufbau | 39 |
| Tabelle 5: Normaltyrode | 44 |
| Tabelle 6: Kaffeintyrode | 44 |
| Tabelle 7: Stocklösung für Isoprenalin | 45 |

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Simon Lebek, welcher initial als mein Betreuer fungierte und im weiteren Verlauf die Rolle des Doktorvaters übernahm. Über die Jahre meiner Promotionsarbeit hinweg war er stets der zentrale Ansprechpartner und trug mit seinen Ideen, seinem Engagement und Mentoring wesentlich zum Gelingen der Promotionsarbeit bei. An dieser Stelle möchte ich auch Prof. Dr. Stefan Wagner besonders danken, welcher ursprünglich meine Betreuung als Doktorvater übernommen hatte und federführend für das gesamte Projekt verantwortlich war. Unter seiner Regie gelang es mir, Teile meiner Arbeit auf insgesamt drei nationalen und internationalen Kongressen im Rahmen eines Poster Vortrags vorstellen zu können, sowie das Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) zu erlangen. Mein Dank gilt auch Dr. Philipp Hegner, welcher mich als Post- Doc wesentlich im Labor unterstützte, sowie allen Mitarbeitern des Labors der Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Lars Maier.

Danken möchte ich vor allem aber auch meinen Eltern Bernhard und Monika, meiner Schwester Amelie und meiner Freundin Nadine, welche mich motivierend durch das Studium begleiteten und mich immer tatkräftig unterstützten.

9. Lebenslauf

Benedikt Schaner

Mittlerer Weg 15 | 86157 Augsburg
0049 171 8103013

b.schaner@outlook.de | benedikt.schaner@uk-augsburg.de



Persönliche Daten

Geburtsdatum: 30.03.1997

Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung und praktische Erfahrungen

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2023 Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie und klinische Neurophysiologie am Universitätsklinikum Augsburg unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Naumann

Universität

10/2016 - 06/2023 Medizinstudium an der Universität Regensburg

Seit 03/2020 Doktorand in der Abteilung für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg - Forschung zum Thema „Bedeutung der CaMKII für die Arrhythmogenese und kontraktile Dysfunktion in einem Mausmodell der Obstruktiven Schlafapnoe“

02/2021 – 01/2022 Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Praktische Erfahrungen

12/2022 – 03/2023 Praktisches Jahr in der Chirurgie am Klinikum Starnberg

09/2022 – 12/2022 Praktisches Jahr in der Inneren Medizin am Universitätsklinikum Regensburg

05/2022 – 09/2022 Praktisches Jahr im Wahlfach Neurologie am Inselspital, Universitätsspital Bern

08/2020 – 09/2020 Famulatur in der Kardiologie der Universität Regensburg

03/2020 Famulatur in der Infektiologie der Universität Regensburg

08/2019 Famulatur bei Dr. Müller, Hausarztgemeinschaft Westallgäu in Grünenbach

05/2019 – 10/2020 Sitzwache in der Psychiatrie des Bezirkskrankenhauses Regensburg

03/2019 Famulatur in der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Augsburg

09/2017 Pflegepraktikum im Bezirkskrankenhauses Regensburg (Psychiatrie)

06/2016– 07/2016 Pflegepraktikum in der Stadtklinik im Diako in Augsburg (Akutgeriatrie)

Schulbildung

09/2007 – 06/2015 Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß, Abitur (Note 1,5)

Augsburg, den 07.03.2024,



Benedikt Schaner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Anregung zur Durchführung dieser Dissertation erfolgte durch Prof. Dr. Simon Lebek, der auch die Ausarbeitung überwachte.

Augsburg, den 07.03.2024



Benedikt Schaner