

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

Die Bedeutung der oxidativ aktivierten CaMKII δ für die Kardiotoxizität von Doxorubicin
in der isolierten Herzmuskelzelle

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Reithmaier

2024

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

Die Bedeutung der oxidativ aktivierten CaMKII δ für die Kardiotoxizität von Doxorubicin
in der isolierten Herzmuskelzelle

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Reithmaier

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Can Martin Sag

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Zdenek Provaznik

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Anatomie des Herzens.....	7
1.1.1. Makroskopische Anatomie.....	7
1.1.1.1. Topographie.....	7
1.1.1.2. Binnenräume des Herzens, Herzklappen und herznahe Gefäße.....	8
1.1.1.3. Wandaufbau des Herzens.....	9
1.1.1.4. Arterielle und venöse Versorgung des Herzens.....	9
1.1.1.5. Innervation.....	9
1.1.2. Mikroskopische Anatomie.....	10
1.1.2.1. Charakteristika von Kardiomyozyten.....	10
1.1.2.2. Wandaufbau des Herzens.....	11
1.1.2.3. Schrittmacherzellen.....	11
1.2. Physiologie.....	13
1.2.1. Funktion des Herzens.....	13
1.2.2. Complexus stimulans cordis.....	13
1.2.3. Aktionspotential des Arbeitsmyokards.....	15
1.2.4. Elektromechanische Kopplung.....	16
1.2.5. Die Pumpaktion des Herzens.....	18
1.3. Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII).....	18
1.3.1. Varianten und Vorkommen.....	18
1.3.2. Chemische Struktur und Regulationsmöglichkeiten.....	19
1.3.3. Kinaseeigenschaften und Auswirkungen.....	20
1.3.4. Beispiele für CaMKII implizierte physiologische Prozesse.....	21
1.4. Herzinsuffizienz.....	22
1.4.1. Definition und Terminologie.....	22
1.4.2. Klinik.....	22
1.4.3. Pathogenese und Pathophysiologie.....	23
1.4.4. Pathophysiologischer Faktor CaMKII.....	23
1.5. Doxorubicin.....	24
1.5.1. Allgemeine Informationen.....	24
1.5.2. Chemischer Aufbau, Wirkungsweise und Indikationen.....	25
1.5.3. Nebenwirkungen.....	25

1.5.3.1. Übersicht.....	25
1.5.3.2. Kardiale Nebenwirkungen	25
1.5.3.2.1. Statistische Datenlage.....	25
1.5.3.2.2. Mechanismen der Kardiotoxizität.....	26
1.6. Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Doxorubicin und CaMKII	27
1.7. Zielsetzung.....	28
2. Material und Methoden.....	29
2.1. Material.....	29
2.1.1. Überblick der verwendeten Materialien	29
2.1.2. Überblick der verwendeten Substanzen und Lösungen	30
2.1.3. Überblick über die verwendeten Versuchstiere	36
2.1.4. Überblick der verwendeten Geräte.....	37
2.1.5. Überblick der verwendeten Software	38
2.2. Methoden	39
2.2.1. Mausmodell	39
2.2.1.1. Mutationshintergrund der Mäuse	39
2.2.1.2. Haltung der Mäuse.....	39
2.2.1.3. Unterschiede der ventrikulären Herzmuskelzellen der Maus und des Menschen ...	39
2.2.1.4. Doxorubicinkonzentration	40
2.2.2. Isolation und Aufbereitung der Kardiomyozyten.....	40
2.2.3. Farbstoff fura-2, AM.....	44
2.2.4. Epifluoreszenzmikroskopie	45
2.2.4.1. Strahlengang in der Messanlage	45
2.2.4.2. Physikalisches Prinzip der Messmethode	46
2.2.5. Übersicht der Geräte- und Softwareeinstellungen während der Messung.....	47
2.2.6. Messprotokoll	48
2.2.7. Auswertung der Messergebnisse	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1. Auswertung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration.....	52
3.2. Auswertung der Ca²⁺-Transientenamplitude unter dem Einfluss von Doxorubicin	58
3.3. Auswertung der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes	65
3.4. Auswertung der vollständigen Relaxationszeit (τ)	71
3.5. Auswertung der Caffeinmessungen	77
4. Diskussion.....	81

4.1. Zusammenhang von CaMKII und Doxorubicin-bedingter Kardiomyopathie	81
4.1.1. Rolle der CaMKII bei Herzinsuffizienz im Vergleich zu anderen Proteinen.....	81
4.1.2. Akute Veränderungen der CaMKII durch Doxorubicin	81
4.1.3. Funktionelle Bedeutung der oxidativ aktivierten CaMKII bei akuter Doxorubicin-Exposition	81
4.2. Vergleich der unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen	82
4.3. Messergebnisse im Kontext mit anderen Publikationen.....	83
4.3.1. Diastolische Ca²⁺-Konzentration	83
4.3.2. Ca²⁺-Transientenamplitude	83
4.3.3. Calcium Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum.....	84
4.3.4. Caffeinmessungen.....	84
4.3.5. Zusammenfassender Vergleich	85
4.4. Bewertung der unterschiedlichen absoluten Messwerte zum Beginn einer Messung ..	85
4.5. Das Mausmodell als Äquivalent zu humanen Kardiomyozyten	86
4.6. Limitationen der methodischen Durchführung.....	86
4.6.1. In vitro Bedingungen der Myokardzellen	86
4.6.2. Epifluoreszenzmikroskopie	87
5. Zusammenfassung	88
6. Literaturverzeichnis.....	89
7. Danksagung.....	96
8. Lebenslauf	97

1. Einleitung

Das Herz als zentrales Organ des Blutkreislaufes ist nicht nur für das Leben des Individuums unerlässlich, es reagiert auch auf eine Vielzahl von Einflüssen seiner Lebenszeit. So kann die Herzhypertrophie beispielsweise Ausdruck eines sportlichen Menschen sein, aber auch die pathologische Vergrößerung dieses Hohlorgans durch eine arterielle Hypertonie ist möglich. Diese Reaktion des Herzens auf verschiedenste Einwirkungen kann für die Gesamtheit des Körpers von Nutzen sein oder ihm sogar schaden. Medikamente, die einen positiven Effekt auf andere Bereiche des Körpers oder gar auf deren Pathologien haben, können eine Beeinträchtigung der Herzfunktion zur Folge haben.

Doxorubicin als typischer Vertreter der Anthracycline ist zwar effektiv in der Behandlung von speziellen Krebsformen (1), doch wird sein Einsatz durch die Entwicklung einer Kardiomyopathie limitiert (2,3). So wurde in einer retrospektiven Kohortenstudie von überlebenden Erwachsenen, die in ihrer Kindheit mit Anthracyclinen behandelt wurden, ermittelt, dass das Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln je nach Dosis 2,4 – 5,2-fach erhöht ist (4)¹. In den „ESMO² Clinical Practice Guidelines“ wird die Inzidenz von Anthracyclin induzierter Kardiotoxizität mit 4 bis >36 % bei Patienten mit einer kumulativen Dosis von 500-550 mg/m² angegeben (5)³. Bei kumulativen Dosen von 700 mg/m² kann die

¹ „In our cohort, the relative hazard of congestive heart failure associated with anthracycline treatment was 2.4-fold higher at doses of less than 250 mg/m² and 5.2-fold higher at doses of 250 mg/m² or more, compared with individuals who had not been exposed to anthracyclines.” (4)

² Akronym für „European Society for Medical Oncology“

³ „The incidence of anthracycline-induced cardiotoxicity (AIC) varies depending on medication and cumulative dose: for doxorubicin from 4% to >36% in patient receiving 500–550 mg/m²” (5)

Einleitung

Häufigkeit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf bis zu 48 % ansteigen (6)⁴. Diese Dosisabhängigkeit scheint entscheidend bei der Ausbildung von Nebenwirkungen zu sein. Eine Prophylaxe dieser kardiotoxischen Nebenwirkungen zu finden, setzt jedoch ein Verständnis über den zugrundeliegenden Pathomechanismus voraus. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass der CaMKII (7) hierbei eine zentrale Rolle zuzukommen scheint, wobei die spezifischen Aktivierungsmechanismen der CaMKII unter Doxorubicin-Exposition noch nicht differenziert wurden. Entsprechend soll im Rahmen dieser Dissertation die Bedeutung der „oxidativ“ aktivierten CaMKII für die Kardiotoxizität von Doxorubicin in der isolierten Herzmuskelzelle genauer erforscht werden und von der „klassischen“ Aktivierung durch Ca²⁺/Calmodulin differenziert werden. Hierzu werden Messungen isolierter Kardiomyozyten aus sog. „MMVV Mausherzen“ (hierbei wurde eine Knock-in Mutation vorgenommen, die zu einer Oxidations-Resistenz der CaMKII durch Mutation zweier redox-sensitiver Methionine an Position 281/282 zu Valin vorgenommen wurde) (7) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen am Epifluoreszenzmikroskop vorgenommen und in Zusammenschau mit anderen Publikationen zusammenfassend diskutiert.

1.1. Anatomie des Herzens

Zu Beginn dieser Dissertation soll eine kurze Übersicht der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie die Grundlage für das Verständnis der weiteren Abschnitte schaffen. An dieser Stelle lässt sich beispielsweise das Wissen zur Myokarddurchblutung anführen, ohne das es kaum möglich wäre, die Technik des Verdaus des kardialen Bindegewebes durch die enzymatische Lösung zu verstehen.

1.1.1. Makroskopische Anatomie

1.1.1.1. Topographie

Das Herz (Cor) liegt in situ im unteren Mediastinum (Mediastinum inferius) im Brustkorb (Thorax), welches noch in ein vorderes, mittleres und hinteres Mediastinum eingeteilt werden kann. Das im Mittleren befindliche Organ wird von einem Herzbeutel umgeben. Mit seinen

⁴ “Studies that have looked at the cumulative probability of doxorubicin-induced HF have found that it occurs in 3% to 5% with 400 mg/m², 7% to 26% at 550 mg/m², and 18% to 48% at 700 mg/m² (3,5,6).” (6)

Einleitung

durchschnittlichen 300 g, liegt es jedoch nicht exakt auf der Medianebene, sondern ist zu über der Hälfte nach links davon verschoben (8). Begrenzt wird diese Lage nach ventral hauptsächlich vom Thymus, bevor nach vorne das Sternum Teil des knöchernen Brustkorbes bildet. Nach cranial finden sich die großen herznahen Gefäße, nach dorsal liegt der Ösophagus zwischen Herz und Wirbelsäule. Zu beiden Seiten grenzen die Pleurahöhlen an, in welchen sich die Lungen befinden. Kaudal bietet das Zwerchfell (Diaphragma) nicht nur die Begrenzung des Mediastinum inferius, sondern grenzt auch die Thoraxhöhle von der Bauchhöhle ab.

1.1.1.2. Binnenräume des Herzens, Herzklappen und herznahe Gefäße

Unterteilen lässt sich das Herz in zwei Vorhöfe und zwei Kammern. Oberhalb der Ventilebene liegt der linke und rechte Vorhof (Atrium sinistrum et dextrum), unterhalb jeweils eine Kammer (Ventriculus sinister et dexter). Getrennt werden das linke und rechte Herz durch die Herzscheidewand (Septum interventriculare et interatriale). Das linke Herz pumpt sein Blut in den Körperkreislauf, wohingegen das rechte Herz den Lungenkreislauf aufrecht erhält. Zwischen Vorhof und Kammer befinden sich Segelklappen (Atrioventrikularklappen, Valvae atrioventriculares, Valvae cuspidales): links die Mitralklappe (Bikuspidalklappe, Valva atrioventricularis sinistra), rechts die Trikuspidalklappe (Valva atrioventricularis dextra). Diese Segelklappen verfügen über Chordae tendinae, welche an Papillarmuskeln verankert sind und eine Anpassung an verschiedene Kontraktionsstärken ermöglichen. Die obere und untere Hohlvene (Vena cava superior et inferior) als zuführende Gefäße, münden in den rechten Vorhof. Die Pulmonalvenen (Venae pulmonales) enden im linken Vorhof. Von der rechten Kammer führt der zur Lunge führende Truncus pulmonalis ab, zwischen beiden liegt die Pulmonalklappe. Die Aortenklappe liegt zwischen Ventriculus sinister und der Aorta, welche den Rest des Körpers mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Diese beiden Klappen sind Taschenklappen (Valvae semilunares).

1.1.1.3. Wandaufbau des Herzens

Schichtungen, welche auch beispielsweise Blutgefäße aufweisen, finden sich im Herzen wieder:

- Endokard (Endocardium): innerste Schicht, beteiligt bei der Bildung der Herzklappen
- Myokard (Myocardium): muskuläre und somit dickste Schicht, Zweischichtung der Vorhöfe, Dreischichtung der Kammern (9)
- Epikard (Epicardium): Lamina visceralis pericardii serosi als viszerales Blatt des Perikards (9)

1.1.1.4. Arterielle und venöse Versorgung des Herzens

Die Koronararterien (*Aa. coronariae*) versorgen das Herz mit sauerstoff- und nährstoffreichen Blut und entspringen direkt nach der Aortenklappe aus der Hauptschlagader. Die rechte Koronararterie (*A. coronaria dextra*) versorgt in ca. 70 % der Fälle (9) als Normalversorgungstyp den rechten Vorhof, die rechte Kammer und die dorsalen Kammerseptumanteile (10). Auch Teile des Erregungssystems, wie beispielsweise der Sinusknoten, werden von ihr versorgt (8). Die linke Koronararterie (*A. coronaria sinistra*) zweigt sich in einen *Ramus circumflexus (RCX)* und einen *Ramus interventricularis anterior (RIVA, left anterior descending, LAD)* auf und versorgt in seinen Verlauf die restlichen Strukturen des Herzens.

Venös finden sich drei größere Gefäße (*V. cardiaca magna, V. cardiaca media, V. cardiaca parva*), welche circa 75 % des Blutes über den *Sinus coronarius (Sinus-coronarius-System)* in den rechten Vorhof leiten (9). Das verbleibende Blut wird über oberflächliche Venen direkt zum Vorhof geleitet (*transmurales System*) oder von sog. *Thebesius-Venen (11)* direkt in die Binnenräume geleitet (*endomurales System*) (9).

1.1.1.5. Innervation

Um das Herz auf besondere Bedürfnisse schnellstmöglich anzupassen, ist auch hier eine vegetative Innervation sinnvoll. Der Sympathikus innerviert das Herz besonders hinsichtlich seiner Kontraktilität (*positive Inotropie*), Schlagfrequenz (*positive Chronotropie*), Überleitungsgeschwindigkeit am AV-Knoten (*positive Dromotropie*), Erregbarkeit der Muskelzellen (*positive Bathmotropie*) und der Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards (*positive Lusitropie*) (11,12). Diese Innervation erfolgt durch die *Rr. Cardiaci cervicales et thoracici*. Parasympathisch wird *negative Chronotropie, Dromotropie, Bathmotropie*

beschrieben (13). Die negative Inotropie beschränkt sich auf die Vorhöfe (11). Die zugrunde liegenden parasympathischen Fasern stammen aus dem N. vagus (11).

1.1.2. Mikroskopische Anatomie

1.1.2.1. Charakteristika von Kardiomyozyten

Die Herzmuskulatur nimmt als quergestreifte Muskulatur eine Zwischenstellung zwischen der Skelett- und glatten Muskulatur ein. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur unterliegt das Myokard einer Autonomie und kann somit nicht willkürlich angesteuert werden. Der einzelne Zellkern liegt zentral in der verzweigten Herzmuskelzelle, welche eine durchschnittliche Länge von etwa 50-120 μm aufweist (14). Auch hier bilden Aktin- und Myosinfilamente die Grundlage für die Kontraktionsfähigkeit der Zellen. Des Weiteren sind sie das ultrastrukturelle Korrelat für die morphologisch erkennbare Querstreifung unter dem Lichtmikroskop (15). Die Verbindung zweier Zellen findet über sog. Glanzstreifen (Disci intercalares) statt, die aus Fasciae adhaerentes, Desmosomen und Gap junctions (Nexuses) gebildet werden (16). Besonders von Bedeutung sind größere Gap junctions an den longitudinalen Anteilen, ohne die die Funktion des Herzens als funktionelles Synzytium nicht möglich wäre (17). Ein Sarkomer (Struktur zwischen zwei Z-Linien) besitzt jeweils einen T-Tubulus, der durch eine Einziehung der Basalmembran und -lamina gekennzeichnet ist und sich auf Höhe der Z-Linien befindet (14). Das sarkoplasmatische Retikulum organisiert sich als eher schlauchförmige Struktur und bildet zusammen mit einem T-Tubulus eine Dyade aus (14). Diese nahe anatomische Beziehung ist entscheidend in der Ausbildung der Kontraktion und wird im physiologischen Abschnitt dieser Dissertationsschrift näher erläutert.



Abb. 1: Mikroskopische Darstellung einer singulär gelegenen Herzmuskelzelle der Maus während der Messung am Epifluoreszenzmikroskop (eigene Aufnahme am 20.03.2020). Gut zu erkennen ist hier die oben beschriebene Querstreifung.

1.1.2.2. Wandaufbau des Herzens

Das Endokard als auskleidende Schicht der Herzhöhlen baut sich überwiegend aus Endothel und Bindegewebe auf. Diese Schicht ist auch bei der Ausformung der Herzklappen beteiligt und bildet dort durch seine Kollagen- und elastischen Fasern den Baustein für die mechanische Belastbarkeit und gleichzeitige Flexibilität aus (14). Der Überzug aus Endothel setzt sich auch hier fort. Das Myokard besteht aus den Kardiomyozyten, welche durch ihre Anordnung an die Pumpfunktion des Herzens angepasst sind. Die Vorhöfe teilen sich eine oberflächliche Muskelschicht, die tiefe Schicht ist jedoch jeweils auf sich selbst begrenzt (9). Die Kammern besitzen jeweils 3 Muskelschichten, auch wenn die mittlere im rechten Ventrikel fast völlig fehlt (9,13). Die schraubenförmige Anordnung der Muskelschichten unterstützt die Funktion des Herzens in der Austreibungsphase der Herzaktion (13). Die innerste Schicht bildet hierbei auch die Papillarmuskeln (11). Das klinisch bezeichnete Epikard ist streng genommen das viszerale Blatt des Perikards und bietet mit seiner Binde- und Fettgewebsschicht eine gute Einbettung für die Koronararterien (14). Aufliegend findet sich noch eine dünne Epithelschicht (Mesothel) (14).

1.1.2.3. Schrittmacherzellen

Das Erregungsbildungssystem ermöglicht es dem Herzen selbst bei abgeschnittener vegetativer Innervation einen Grundrhythmus von 60-80 Schläge pro Minute aufrecht zu erhalten (18). Bei physiologischen Bedingungen kann dieser jedoch vom vegetativen Nervensystem modifiziert werden. Da die Besonderheit dieser Schrittmacherzellen vor allem in der Physiologie liegt, werden die dazugehörigen Kanäle in dem physiologischen Abschnitt aufgezeigt. Folgend soll eine Übersicht der anatomischen Strukturen dargestellt werden:

- Sinusknoten (sinuatrialer Knoten, Keith-Flack-Knoten): liegt lateral/caudal an der Einmündung der V. cava sup. (13,16), subepikardial (13), ca. 1,5 cm lang und 2-3 mm breit (14)
- AV-Knoten (atrioventrikulärer Knoten, Aschoff-Tawara-Knoten): liegt im Koch-Dreieck (Begrenzungen: Sinus coronarius, Todaro Sehne (Verbindung des oberen Randes der Valvula v. cavae inferioris zum Trigonum fibrosum dextrum), Rand des septalen Trikuspidalsegels) (13), subendokardial (14)
- His-Bündel (atrioventrikuläres Bündel): Durchbricht die Ventilebene als einzige Verbindung bezüglich der Fortleitung der Erregung (14)

Einleitung

- Tawara-Schenkel (Kammerschenkel): verzweigt sich in einen rechten und linken Kammerschenkel (13,14,16), linker teilt sich wiederum in drei Faszikel auf (posteriorer, mittlerer und anteriorer) (13), subendokardial (14)
- Purkinje-Fasern (Purkinje-Myozyten): erregen im letzten Abschnitt die Arbeitsmyokardzellen (14)

Auf Vorhofebene findet sich unter anderem der sog. Bachmann-Bündel wieder, der eine Erregungsweiterleitung von rechten auf linken Vorhof ermöglicht (19). Da die Aufgabe dieser Zellen nicht in der Kontraktion liegt, verfügen diese über wenige Myofibrillen, dafür besitzen sie aber vergleichsweise mehr Glykogen (14,18).

1.2. Physiologie

1.2.1. Funktion des Herzens

Der kontinuierliche Blutstrom im Gefäßsystem des Säugetieres ist abhängig von der Pumpleistung des Herzens. Nur durch dessen Aufrechterhaltung kann gewährleistet werden, dass nicht nur andere Organe oder Gewebe mit Energie versorgt werden können (17), auch die eigene Versorgung des Herzens in der Diastole⁵ durch sauerstoff- und nährstoffreiches Blut ist unerlässlich (18,20). Auch der Abtransport von stoffwechselbedingten End- und Nebenprodukten wird hierdurch ermöglicht (20). In diesem Zusammenhang sollte auch das Herzzeitvolumen (= Schlagvolumen x Herzfrequenz, meist als Herzminutenvolumen in l/min angegeben) genannt werden, das im Körper teilweise die Leistung des Herzens widerspiegelt (17). Doch auch die endokrinologische Funktion des Herzens darf nicht außer Acht gelassen werden. Das atriale natriuretische Peptid (ANP, Atriopeptin) wird vorzugsweise bei erhöhten Volumen und somit Druckerhöhung im Vorhof sezerniert (14,21). Das BNP (brain/B-Typ-natriuretische Peptid⁶) hingegen wird von den ventrikulären Kardiomyozyten gebildet (14,21). Diese Peptide ermöglichen längerfristige Anpassungsreaktionen auf den Blutdruck durch beispielsweise Beeinflussung des Blutvolumens (17,21)⁷.

1.2.2. Complexus stimulans cordis

Die Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens ist nicht zuletzt abhängig von der regelmäßigen Pumpfunktion des Herzens. Diese Kontinuität wird durch spezialisierte Herzmuskelzellen (14), den Schrittmacherzellen, erreicht. Es wird auch eine Abstammung aus dem Neuroektoderm diskutiert, obwohl die Spezialisierung aus Vorläuferkardiomyozyten plausibler erscheint (23). Die Besonderheit dieser Zellen liegt in der Eigenschaft, autonom ein

⁵ Die Koronardurchblutung verringert sich stark in der Systole im linken Ventrikel, da dort vergleichsweise höhere Drücke vorherrschen. Die linksventrikuläre Durchblutung findet auch in der Diastole statt. (18)

⁶ Die Bezeichnung „brain natriuretic peptid“ wurde aufgrund der Erstentdeckung in Gehirngewebe eingeführt (22). Später wurde jedoch gezeigt, dass seine Bildung vor allem im Herzen stattfindet (21).

⁷ Die Verminderung des Blutvolumens wird durch Natriurese und somit verstärkter Diurese erreicht, aber auch der Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System hat die gleichen Wirkung (Verminderte Reninsekretion sowie Aldosteronproduktion). Die Erweiterung der Blutgefäße führt zu einem additiven Effekt der Blutdrucksenkung. (21)

Einleitung

Aktionspotential ausbilden zu können (18). Bei vielen Menschen funktioniert diese rhythmische Ausbildung von Potentialen ein Leben lang (24).

Verantwortlich für die Unerreichbarkeit eines Ruhepotential ist der fehlende einwärts gleichrichtende⁸ Kalium Strom (I_{K1})⁹ (17,25), der das Membranpotential auf circa -90 mV halten würde (27). Das maximal erreichbare Potential ist ca. -60 mV (18). Die Depolarisation wird hier exemplarisch am Sinusknoten durch zwei Mechanismen („membrane-clock“ und „Ca²⁺-clock“) herbeigeführt, die nach aktuellem Wissensstand eine Zusammenarbeit darstellen und als „coupled-clock“ bezeichnet wird (27,28). Beginnend bei der Depolarisation ist der „funny current“ (I_f) der HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel) (27), welcher durch einen Einstrom von vor allem Natriumionen das Membranpotential zu positiveren Werten verschiebt (17). Auch I_{CaT} und I_{CaL} öffnen dann und ermöglichen einen Ca²⁺ Einstrom (27). Während der I_f bei circa -40/-45 mV beginnt (29), öffnen die Ca²⁺ Kanäle bei etwa -55 mV (17). Der Calcium gesteuerte Anstieg ist langsamer als der in der Arbeitsmuskulatur übliche (17). Diese Ströme sind der „membrane-clock“ zugeordnet. Zu dem anderen Mechanismus gehört unter anderem der Calcium Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und der NCX-Kanal (Natrium-Calcium exchanger), welcher im Gegenzug zu einem Calciumion, drei Natriumionen in die Zellen transportiert (17,27,28).

Auch die CaMKII findet sich in den Zellen des Sinusknotens wieder, welche hier sogar in höheren Konzentrationen vorliegt (27). Durch einen Kaliumausstrom I_K wird erreicht, dass sich das Potential wieder ins Negative verschiebt und erlaubt somit eine erneute Ausbildung eines Aktionspotentials (18).

Dem Sinusknoten steht in der Erregungsbildung die Aufgabe zu, den Takt für das ganze Herz vorzugeben. Durch seine raschere spontane diastolische Depolarisation erreicht er einen Eigenfrequenz von etwa 60-80/min und fungiert somit als primärer Schrittmacher (18). Der AV Knoten als sekundärer Schrittmacher (40-50/min) wird somit von der Grundfrequenz des Sinusknoten überdeckt und kann seinen eigenen Rhythmus erst bei einem Ausfall des Sinusknoten auf den Rest des Herzens übertragen (17). Der Tertiärer Schrittmacher (His-

⁸ Die Bezeichnung Einwärts-Gleichrichter bezieht sich auf den Kalium Influx bei Hyperpolarisation (25).

⁹ I_{K1} wird vor allem durch die Kaliumkanäle $K_{ir2.1}$ und $K_{ir2.3}$ erzeugt, die im Sinusknoten vergleichsweise zu Myokardzellen des rechten Atriums vermindert nachgewiesen werden konnten (26).

Einleitung

Bündel und Tawara-Schenkel) erreichen dann nur noch eine mögliche Herzfrequenz von 25-40/min (17).

Da eine schnelle elektrische Ausbreitung und somit eine Kontraktion aller Binnenräume nicht zielführend in der Funktion des Herzens wäre, hat der AV-Knoten die Fähigkeit, die Erregung zu verzögern, sodass sich zuerst die Vorhöfe und dann die beiden Ventrikel kontrahieren können (18). Damit die festgelegte Reihenfolge aufrecht erhalten werden kann, haben die Purkinje-Fasern als Endstation des Erregungsleitungssystems eine verlängerte Refraktärzeit von etwa 400 ms (18) und können so nicht frühzeitig erneut erregt werden. Um die Erregung nicht nur auf die spezialisierten Kardiomyozyten zu beschränken, organisiert sich das Herz mit seinen gap junctions als ein funktionelles Synzytium (18).

1.2.3. Aktionspotential des Arbeitsmyokards

Die auf die Kontraktion ausgelegten Zellen besitzen im Gegensatz zu den Schrittmacherzellen ein Ruhemembranpotential von etwa -85 mV (18). Da die K^+ -Permeabilität der Zellen hoch ist, verschiebt der Einwärtsgleichrichter durch einen K^+ -Ausstrom das Potential zu leicht positiveren Werten und wirkt so der Depolarisation entgegen (17,18). Das Aktionspotential der Arbeitsmyokardzelle wird in vier Abschnitte (Phase 0 bis Phase 3) eingeteilt (17,18).

Zu Beginn der Phase 0 (Initiale Depolarisation) wird durch einen schnellen Natriumeinstrom (I_{Na}) ein Wert von etwa +35-50 mV erreicht (30). Die Natriumkanäle schließen jedoch auch wieder in dieser Phase und so erreichen sie nicht das Natriumgleichgewichtspotential von +70 mV (30). Ein weiterer Grund hierfür ist, dass die K^+ -Permeabilität auch noch entgegenwirkt (30). Dennoch bildet der 1-2 ms lange Natriumeinstrom einen „overshoot“ (17).

Die nächste Phase (Phase 1) zeichnet sich durch eine partielle bzw. frühe Repolarisation aus. Getragen wird diese Potentialveränderung durch den K^+ -Ausstrom und wird als I_{to} („transient outward current“) bezeichnet (18,30).

Die nachfolgende Plateauphase (Phase 2) erreicht durch einen Ca^{2+} -Einstrom (I_{CaL}) und K^+ -Ausstrom (spannungsgesteuerter Kaliumkanal, I_{Kur} , I_{Ks} , I_{Kr}) ein Gleichgewicht um etwa ± 0 mV (18,30).

Bei der Repolarisation (Phase 3) verstärkt sich nun der leichte Plateauabfall, die Calciumkanäle schließen sich (18,30). Die Bedeutung von I_{K1} nimmt zu und auch der NCX schleust Calcium aus der Zelle hinaus (30).

Die Dauer eines Aktionspotentials wird mit ca. 300 ms angegeben (17). Durch diese vergleichsweise lange Dauer wird erreicht, dass das Herz nicht zu früh von neuen Potentialen stimuliert wird (17).

1.2.4. Elektromechanische Kopplung

Wie auch in anderem Muskelgewebe ist der durch den Anstieg von Calciumionen auslösbare Querbrückenzyklus essentiell für die Kontraktilität der Herzmuskelzelle und des Herzens als Ganzes (17). Da die Erregung in Form eines elektrischen Potentials die Herzmuskelzelle auf kleinster Ebene ansteuert und die Kontraktion abhängig von dem Calciumhaushalt ist, muss eine Umwandlung des Signals stattfinden (31). Spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren, LTCC) im T-Tubulus haben die Eigenschaft, auf Potentialänderung zu reagieren und öffnen sich dadurch (17,31). Der Calciumeinstrom in die Zelle führt im Sinne einer Ca^{2+} -induzierten- Ca^{2+} -Freisetzung zu einer Öffnung von Ryanodinrezeptoren (RyR2) am sarkoplasmatischen Retikulum und zu einer verstärkten Calciumfreisetzung (30). Im SR liegt Calcium an Calsequestrin gebunden vor (17,32). Hierbei spielt das Bindungsprotein eine entscheidende Rolle in der Funktion als Calciumreservoir (33). Der Inaktivierung des RyR zugrunde liegende Mechanismus wurde noch nicht endgültig geklärt, auch wenn folgende drei Theorien als potentiell möglich erscheinen: 1. Inaktivierung bzw. Adaption von RyR, 2. Erschöpfung des Ca^{2+} Reservoirs im SR, 3. Stochastischer Ansatz (Verschluss der RyR und L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle gleichzeitig) (30,31,34). Der Abstand zwischen L-typ- Ca^{2+} -Kanal und RyR beträgt gerade einmal um die 15 nm (31). Die Beschriebene 100-1000fache Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts von Bers (30) scheint ein mittleres Maß darzustellen, da sich in Physiologie Fachliteratur Werte von 15fach und 10 000fach finden (17,18). Durch die Bindung an Troponin C wird das Filamentegleiten ermöglicht und das Herz kann sich kontrahieren (17,31). Gegensätzlich zu dieser Aktivierungsphase folgt eine Relaxionsphase, bei der die Ausgangssituation für eine erneute Kontraktion geschaffen wird (18).

Für den zytosolische Abtransport von Calciumionen in den extrazellulären Raum und zurück in das sarkoplasmatische Retikulum existieren vier Möglichkeiten:

1. SERCA (sarcoplasmatic endoplasmatic reticulum calcium-transporting ATPase),
2. NCX (Natrium/Calcium Austausch),
3. PMCA (Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase),
4. Mitochondrialer Uniporter (MCU) (18,30).

Durch das selektive Blockieren von den ersten beiden Systemen wurde herausgefunden, dass die Funktion der letzten beiden vernachlässigbar klein ist (30). Die SERCA pumpt Ca^{2+} zurück in das SR und wird in seiner Funktion durch Phospholamban (PLB) beeinflusst. Dieses hemmt die Funktion von SERCA, jedoch kann durch die PLB Phosphorylierung diese Hemmung verringert werden (17). NCX besitzt einen „forward mode“ (Ca^{2+} Ausstrom) und

Einleitung

einen „reverse mode“ (Ca^{2+} Einstrom) (31). Besonders am Anfang des Aktionspotentials unterstützt der NCX die elektromechanische Kopplung durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration im „reverse mode“ (18,35).

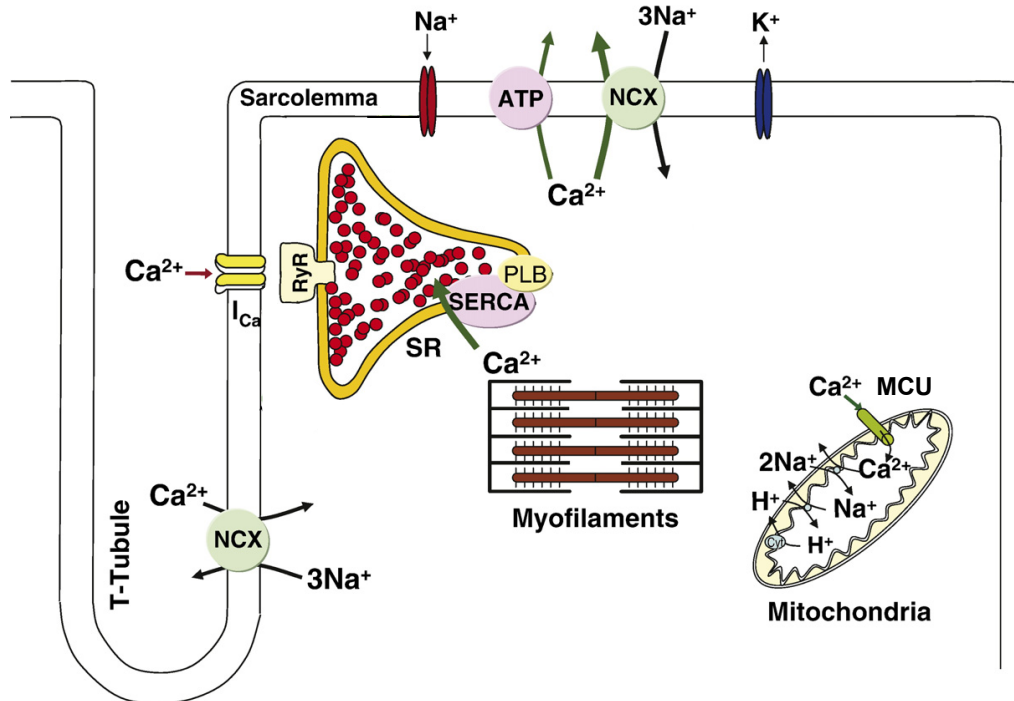


Abb. 2: Schematische Darstellung der im Text oben genannten beteiligten Transportkanäle. Modifiziert nach Maier LS, Bers DM. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. Cardiovasc Res. 2007 Mar 1;73(4):631–40 (36).

1.2.5. Die Pumpaktion des Herzens

Die Ventrikelarbeit kann neben der Einteilung der Systole und Diastole noch weiter unterteilt werden. Zu der Systole gehört die Anspannungs- und Austreibungsphase. Zur Diastole die Entspannungs- und Füllungsphase (18). Ein wichtiger Parameter für die Auswurfleistung, der in diesem Rahmen erwähnt werden muss, ist die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels (37). Berechnet wird diese durch folgende Formel $LVEF=(EDV-ESV)/EDV^{10}$ (38). Die Normwerte, welche oftmals in % angegeben werden, können sich je nach Untersuchungsmethode unterscheiden (39). Jedoch werden Mittelwerte in der 2D-Echokardiographie von 62 (2SD¹¹: 52-72) bei Männern und 64 (2SD: 54-74) bei Frauen angegeben.

1.3. Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

1.3.1. Varianten und Vorkommen

Neben der, hier im weiteren behandelte CaMKII, existieren noch die Klassen I und IV (40). Die CaMKII α - und CaMKII β -Form finden sich im Nervengewebe wieder, wo sie auch als erstes entdeckt wurden (36,40,41). Auch wenn man die Isoformen CaMKII δ und CaMKII γ in anderen Gewebe nachweisen kann, so findet man sie gehäuft im Herzen (CaMKII δ > CaMKII γ) (36,40). Obwohl es elf verschiedene Splicevarianten der CaMKII δ gibt, soll aufgrund der Häufung im Herzen auf nachfolgende genauer eingegangen werden (40):

- CaMKII δ_A : nachgewiesen im T-Tubulus, Membran der Zelle und Zellkern (40)
- CaMKII δ_B : im Zellkern liegend (36,40); Exon 14 verfügt über ein „nuclear localization signal/sequence“ (NLS)¹² (36,40)
- CaMKII δ_C : liegt im Zytosol (36,40)
- CaMKII δ_D : derzeit wenige Erkenntnisse (40)

In der Literatur finden sich aufgrund relativ gleichzeitiger Entdeckung und Nomenklaturerstellung auch die Bezeichnung CaMKII δ_3 und CaMKII δ_2 für die CaMKII δ_B

¹⁰ LVEF (linksventrikuläre Ejektionsfraktion), EDV (enddiastolisches Volumen), ESV (endsystolisches Volumen)

¹¹ SD (standard deviation, Standardabweichung)

¹² Durch eine versuchsbedingte Übertragung von CaMKII δ_B -Teilen konnte die Relevanz der NLS gezeigt werden (41).

und CaMKII δ_C (41). CaMKI und CaMKIV scheinen, die Lokalisation von CaMKII δ_B beeinflussen zu können (42).

1.3.2. Chemische Struktur und Regulationsmöglichkeiten

Die zu der Gruppe der Proteinkinasen gehörige CaMKII (Serin/Threonin-Kinase) verfügt über die Eigenschaft, beispielsweise Calciumkanäle zu phosphorylieren und damit ihre Funktion zu beeinflussen (36,43). Dieses Holoenzym besteht aus etwa sechs-zwölf Monomeren, welche sich zirkulär anordnen (43). Durch die Aminosäuresequenz der Proteine ergeben sich zwei unterschiedliche Enden, die N-Terminus (Amino-Terminus, -NH₂) und C-Terminus (Carboxy-Terminus, -COOH) genannt werden. Während das N-Terminale Ende eine katalytische Domäne darstellt (blau in Abb. 3), ermöglicht der C-Terminus (grün in Abb. 3) eine Oligomerisierung des Monomere (36,43). Des Weiteren verfügt das Enzym über eine zentrale regulatorische Domäne (auch die autoinhibitorische- und Calmodulin-Bindungsstelle befindet sich hier), an welcher durch Modifizierung verschiedene Funktionszustände erreicht werden können (36). Aktiviert wird die CaMKII klassischerweise durch die Bindung von einem Ca²⁺/Calmodulinkomplex (Calmodulin mit vier Ca²⁺ Ionen) (36,43), wie in Abbildung 3 dargestellt. Da sich die Kinase nach Ablösen des Komplexes wieder inaktivieren würde, ist es dem Enzym möglich, durch Autophosphorylierung an Thr²⁸⁷ einen dauerhaft aktiven Zustand zu erreichen (36). Seine Leistung hierbei ist jedoch auf 20-80 % Aktivität vermindert (36,43). Die Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C inaktivieren die CaMKII (36). Ein Alternativer Aktivierungsweg stellt die Oxidation von Met281/282 über reaktive Sauerstoffspezien dar (40,44,45).

Einleitung

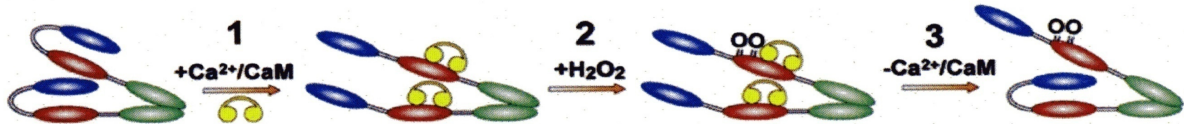


Abb. 3: Die Aktivierung von CaMKII durch Ca²⁺/Calmodulin erfolgt durch dessen Bindung an die regulatorische Domäne (in rot), sodass eine Interaktion mit Zielproteinen an der katalytischen Domäne (in blau) möglich sind (1). Der hier alternativ dargestellte Aktivierungsweg läuft bei oxidativem Stress (z.B. durch H₂O₂) ab. Hier kommt es zur Oxidation von zwei Methionin-Resten in der regulatorischen Domäne (2). Diese bleibt auch nach Abdissoziation von Ca²⁺/CaM weiterhin aktiviert.

Abbildung übernommen von Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2008 May 2;133(3):462–74 (45)

1.3.3. Kinaseeigenschaften und Auswirkungen

Die CaMKII kann den Calciumhaushalt durch den Eingriff in hauptsächlich vier verschiedene Calcium-regulierende Proteine modulieren:

1. LTCC,
2. RyR,
3. PLB und
4. Na⁺-Kanäle/ K⁺-Kanäle (46).

Die durch die CaMKII δ phosphorylierte α_{1C} und β_{2a} Untereinheit des L-Typ-Ca²⁺-Kanals erhöht die Amplitude des I_{Ca} und verlangsamt auch seine Inaktivierung über zwei bis fünf Aktionspotentiale (36,43). Der Ryanodinrezeptor 2 wird vermutlich an Ser2809 und Ser2814¹³ phosphoryliert und so wird vermehrt Calcium aus dem SR ausgeschleust, sowohl während der elektromechanischen Kopplung, d.h. systolisch, als auch in Ruhe, d.h. diastolisch. Es entsteht ein sog. SR Ca²⁺ Leck. (36,40,44). Wird die hemmende Wirkung von PLB durch den Anbau einer Phosphatgruppe an Thr-17 gehemmt (sodass ein Abdissoziation von PLB von der SERCA resultiert), so kommt es im Sinne einer doppelten Hemmung zur Aktivitätssteigerung der SERCA (36). Auf Natriumkanäle scheint die CaMKII eine

¹³ In den aktuelleren Publikationen (2015 und 2018) wird eine phosphorylierung an Ser2814 beschrieben (40,44), wohingegen in einer Publikation von 2007 eine Reaktion an Ser2815 aufgeführt wird (36).

aktivierende Eigenschaft auszuüben (I_{Na}) (36,47–49). Darüber hinaus findet sich auch ein Einfluss auf Kaliumkanäle (I_{to} , I_{K1}) (36,44). Auch weitere modulierende Einflüsse auf den Natrium-Protonen-Austauscher (Na^+ - H^+ -exchanger, NHE-1), NCX (vermehrte Bildung des Kanals), MCU (verstärkte Aktivität) sollten hier kurz Erwähnung finden (44).

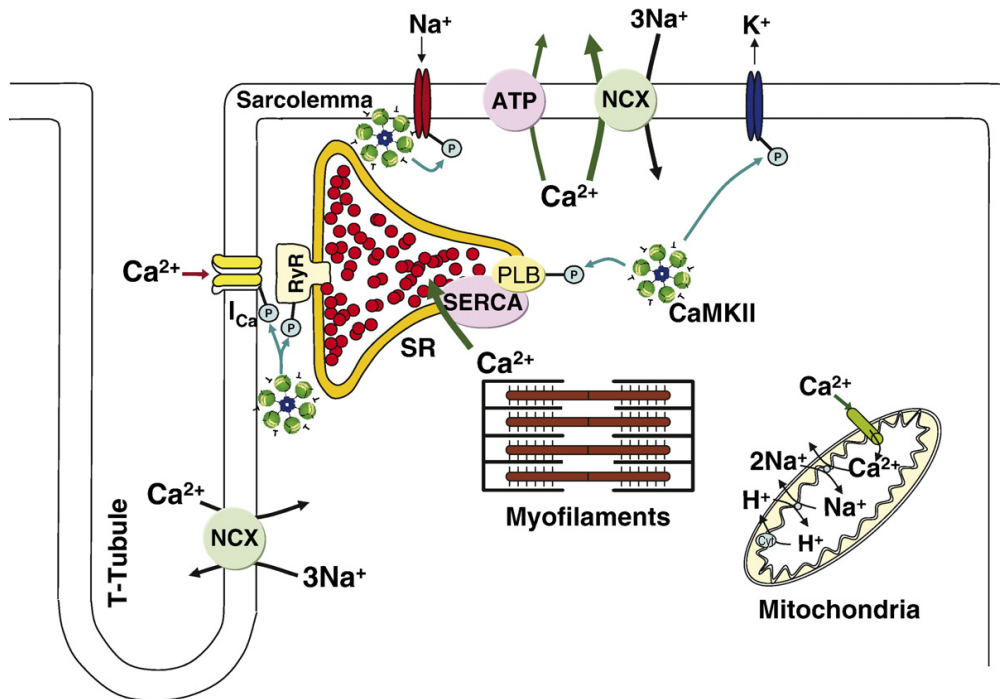


Abb. 4: Darstellung der Kinaseeigenschaften von CaMKII.

Modifiziert nach Maier LS, Bers DM. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):631–40 (36).

1.3.4. Beispiele für CaMKII implizierte physiologische Prozesse

Die oben genannten Einflüsse finden sowohl in der Physiologie, als auch in der Pathophysiologie Anwendung. Maier und Bers beschreiben eine mögliche Funktion der CaMKII bei der „frequency-dependent acceleration of relaxation“ (FDAR) bei beschleunigten Schlagfrequenzen durch die Aktivitätssteigerung der SERCA (36). Dazu passend, scheint CaMKII eine Rolle bei der positiven Chronotropie im Sinusknoten zu haben (40,50). Auch wenn noch andere physiologische kardiale und extrakardiale Wirkungen der CaMKII bekannt sind, so sind diese noch nicht gleichermaßen ausführlich erforscht wie die pathologischen (40).

1.4. Herzinsuffizienz

1.4.1. Definition und Terminologie

Die Herzinsuffizienz (ICD-10-WHO: I50, (51)), als ein sehr bekanntes kardiologisches Krankheitsbild, fordert jährlich circa 35000 Tote in Deutschland (52).

Eingeteilt werden kann sie anhand verschiedener Gesichtspunkte: akute vs. chronische Herzinsuffizienz; Links- vs. Rechts- vs. Globalherzinsuffizienz; low- vs. high-output-failure (nach HZV) und die Einteilung durch Bestimmung der EF (53). Da die EF im Ultraschall bestimmt werden kann und diese beispielsweise aufgrund der hohen Verfügbarkeit eine häufige Einteilungsgrundlage darstellt, soll auf diese Kriterien weiter eingegangen werden (38).

Die HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction, systolische Herzinsuffizienz) mit einer LVEF < 40 % hat eine deutlich reduzierte Auswurfsleistung im Vergleich zur HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction, diastolische Herzinsuffizienz) mit einer LVEF ≥ 50 % (53,54). Bei einer LVEF von 40-49 % spricht man von einer HFmEF (heart failure with mid-range ejection fraction) (54). 2021 wurde die Terminologie der HFmEF zu heart failure with mildly reduced ejection fraction geändert (55).

Während sich die systolische Herzschwäche durch die verminderte Kontraktion und dadurch oben aufgezeigte EF-Einschränkung¹⁴ auszeichnet, basiert die diastolische Funktion auf der gesenkten Kammerfüllung aufgrund pathologischer Muskelrelaxation (56).

Die Entstehung einer Herzinsuffizienz zugrundeliegende Ursache kann beispielsweise ein akutes Ereignis in Form eines Myokardinfarkts sein, doch auch chronische Einflüsse wie eine arterielle Hypertonie (erhöhte Nachlast) können diese Entwicklung triggern (56).

1.4.2. Klinik

Die klinischen Symptome können mittels Kammerbeteiligung kategorisiert werden. Hierbei soll nur ein kurzer Überblick erfolgen. Bei der Rechtsherzinsuffizienz staut sich das Blut zurück in den Körperkreislauf und verursacht neben der oftmals prominenten heraustretenden V. jugularis ext. Ödeme in herztieferen Körperpartien (53). Stauungsbedingt können Niere und Leber vergrößert sein (Stauungsniere, Stauungsleber) und es kann sich eine Stauungsgastritis entwickeln (53). Der gleiche Pathomechanismus im linken Herzen macht Patienten vor allem bei der Atmung Beschwerden (53). Unspezifische Symptome, wie zum

¹⁴ Auf mathematischer Ebene wird die EF-Verminderung durch erhöhte EDV-Werte erreicht ($LVEF = (EDV_{\uparrow} - ESV) / EDV_{\uparrow}$) (56).

Einleitung

Beispiel eine Nykturie könne zusätzlich auftreten (53). Hinsichtlich der Beschwerdeschilderung von Patienten kann nach der NYHA-Klassifikation eingeteilt werden.

1.4.3. Pathogenese und Pathophysiologie

Neben der Reaktion anderer Organsystemen auf die Auswirkungen der Herzinsuffizienz, wie zum Beispiel die RAAS- und Sympathikusaktivierung zum Aufrechterhalten des HZV, zeigt auch das Herz auf seiner zellulären Ebene Effekte (18,56). Wie auch bei der elektromechanischen Kopplung, spielt Calcium hierbei einen entscheidenden Faktor. Der Calciumtransient (in seiner Amplitude) ist nicht nur reduziert, sondern auch der Anstieg dauert länger, wodurch es zu einer schwächeren Ausprägung der Kontraktion kommt (57,58). Die anschließende Relaxation ist verzögert (58). Im SR ist die Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]$ vermindert, was sich auf drei verschiedene Kanäle zurückzuführen lässt: RyR2, NCX und SERCA2a (59). In der diastolischen Phase, zeigt sich ein Calciumleck aus dem SR (experimentell kann man dies als „Ca²⁺-spark“ am Konfokalmikroskop beobachten), das durch eine erhöhte Offenheitswahrscheinlichkeit des RyR2 getragen wird (59,60). Des Weiteren trägt der NCX im „forward mode“ dazu bei, $[Ca^{2+}]$ in der Zelle zu reduzieren (57,60,61). NCX ist dennoch auch in der Lage, einen Calcium Influx („reverse-mode“) zu generieren. Dies geschieht wenn die intrazelluläre Natriumkonzentration durch verzögerte Inaktivierung des I_{Na} ansteigt (18,59,62–64), was zu einer Calciumüberladung führt. Nicht nur die Dichte der SERCA2a nimmt ab, sondern auch die verminderte Hemmung der Hemmung (über PLB) zeigt Einfluss auf die SR $[Ca^{2+}]$ (58), sodass die Calciumaufnahme in das SR sinkt. Ebenso wird durch einen verminderten Kaliumefflux (I_{Ks} , I_{Kr}) ein positiveres Potential länger gehalten und so die Funktion des NCX in „reverse-mode“ verstärkt (59). Beobachtet werden kann auch eine gestörte T-Tubulus Struktur (Bildung von sog. „orphaned RyR2“), weswegen es zu einen desynchronen Calciumanstieg kommen kann (57,58,62). Titin verbindet Myosin an den Z-Scheiben federartig und ist an dem Steiferwerden des Herzens bei der HFpEF beteiligt (56,65). Protein-Phosphatase 5 (PP5) dephosphorylieren Titin und Beeinflusst dadurch ihre Elastizität (56,66).

1.4.4. Pathophysiologischer Faktor CaMKII

Schon Im Jahr 1999 wurde nachgewiesen, dass CaMKII δ_3 bei Herzinsuffizienz 1,5-fach erhöht ist. Verglichen wurden hierbei gesunde Herzen und Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie (67). Maier et al. konnten dann tierexperimentell zeigen, dass eine erhöhte Expression von CaMKII δ_C eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz hat.

Einleitung

So konnte eine SR $[Ca^{2+}]$ Verminderung als Folge eines SR Leck beobachtet werden (68). Mechanistisch ursächlich schien eine Hyperphosphorylierung des RyR zu sein (69). Sossalla et al. konnte daraufhin durch die Blockierung der in der Herzinsuffizienz überexprimierten und aktivierten CaMKII δ zeigen, dass sich die Kontraktilität von insuffizientem Myokard unter CaMKII-Inhibition verbessert (70). Da auch die Proteinkinase A (PKA) RyR2 phosphorylieren kann, wurde auch eine Verbesserung durch PKA-Inhibition untersucht. Dies konnte sich jedoch nicht bestätigen (71,72). Auch eine arrhythmogene Wirkung der CaMKII bei Herzinsuffizienz wurde nachgewiesen (73).

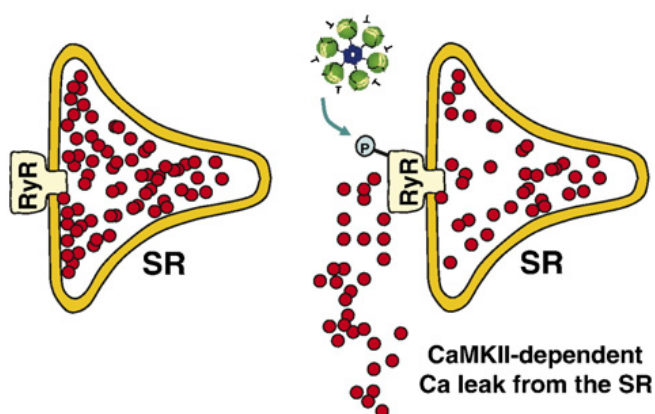


Abb. 5: Schematische Darstellung des Calciumlecks im SR.

In der linken Darstellung zeigen sich die Calciumionen (rot dargestellt) innerhalb des SR. Vergleichsweise findet sich in der rechten Darstellung ein Calciumleck mit Austritt der Calciumionen.

Abbildung übernommen von Maier LS, Bers DM. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):631–40 (36).

1.5. Doxorubicin

1.5.1. Allgemeine Informationen

Doxorubicin (DOXO) fand schon im Jahr 1960 Anwendung in der Medizin als Chemotherapeutikum. Es gehört zu der Klasse der Anthrazykline und wird aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius* (grampositiv, aerob) isoliert (74–76). Epirubicin und Idarubicin stellen neuere Alternativen dar, doch ist aktuell die Studienlage bezüglich der Kardiotoxizität unklar und auch eine Überlegenheit gegenüber dem herkömmlichen DOXO wurde noch nicht bestätigt (74,75).

1.5.2. Chemischer Aufbau, Wirkungsweise und Indikationen

Das Grundgerüst bildet, wie auch bei anderen Anthrazyklinen, ein Anthrachinon Ringsystem, an das der Aminozucker Daunosamin angehängt ist (75). Obwohl mehrere mögliche Wirkungsmechanismen beschrieben werden (74), wird vor allem die Hemmung der Topoisomerase II¹⁵ als einer der Hauptfaktoren beschrieben (75). Doch auch DNA-Interkalation und die Produktion freier Sauerstoffradikale finden sich in der Fachliteratur wieder (3). Verwendet wird Doxorubicin vor allem bei soliden Tumoren in der Kindheit und Brustkrebs, aber auch bei Lymphomen und Leukämie (3,74).

1.5.3. Nebenwirkungen

1.5.3.1. Übersicht

Neben den kardialen Folgen der DOXO-Behandlung, bei denen vor allem die Entwicklung der Herzinsuffizienz im Mittelpunkt dieser Dissertation steht, sind auch andere Nebenwirkungen möglich.

Der Gesamtheit halber soll hier eine kurze Übersicht aufgezeigt werden. Da der oben beschriebene Wirkmechanismus auch auf das Knochenmark wirkt, kann dieses supprimiert werden (3). Übelkeit, Erbrechen und Hautausschläge können wie auch bei anderen Chemotherapien auftreten (3,78). Der in der breiten Population bekannte Haarausfall kann eintreten (3,78). Wie auch bei anderen Behandlungen, ist auch eine allergische Reaktion zu Beginn nicht auszuschließen (3,78). Doch auch Auswirkungen auf das Gehirn (kognitive Einschränkungen), Leber und Nieren lassen sich erkennen (78).

1.5.3.2. Kardiale Nebenwirkungen

1.5.3.2.1. Statistische Datenlage

Schon in der Einleitung wurde die Relevanz der kardialen Nebenwirkung in Form einer Herzinsuffizienz nähergebracht. Diese tritt jedoch bevorzugt chronisch auf und ist von akuten Schädigungen, wie beispielsweise Herzrhythmusstörungen, zu unterscheiden (79). Lipschultz et al. beschrieben in der Untersuchung von Doxorubicin behandelten Kindern (n=115, Grunderkrankung: akute lymphoblastische Leukämie, Dosis: 228-550 mg/m²) eine Einschränkung der Kontraktilität in 23% der Fälle (80). Auch ein Anstieg von NT-proBNP

¹⁵ In Tumorzellen wird v.a. Top2 α exprimiert, welches hierbei den Angriffspunkt des DOXO entspricht (77). In Kardiomyozyten hingegen findet sich die Top2 β Form, durch die die Kardiotoxizität hervorgerufen wird (77).

Einleitung

nach Anthrazyklintherapie konnte nachgewiesen werden (81). Die Wahrscheinlichkeit, in der Remission an kardialen Nebenwirkungen zu erkranken, kann durch die Anwesenheit von anderen Faktoren (zusätzliche Bestrahlung, Alter des Patienten, Vorerkrankungen, etc.) beeinflusst werden (5).

Da mittlerweile die Anwendungshäufigkeit und Überlebenszeit bei Kindern gestiegen ist, stellt die Entwicklung von chronischen kardialen Nebenwirkungen einen zentralen Prognosefaktor dar (79). Im Vergleich zu den Einführungszeiten von Doxo hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate von 30 auf 70 % im Jahr 2005 erhöht (82).

1.5.3.2.2. Mechanismen der Kardiotoxizität

Zu dem zugrundeliegende Pathomechanismus der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bzw. der Kardiotoxizität gibt es mehrere Theorien. In Veröffentlichungen werden mehrere Mechanismen aufgeführt: Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, eingeschränkte ATP Produktion, verminderte Bildung von SERCA, Defekte in der Atmungskette, Einschränkungen von Top2 β (Hauptform in Kardiomyozyten), Bindung an Membranelemente (z.B.: Cardiolipin in der Mitochondrienmembran), verstärkte Histaminfreisetzung (75,77,82). Eine Theorie rückt jedoch bei vielen veröffentlichten Papern in den Mittelpunkt: die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezien (reactive oxygen species, ROS) (75,77,83,84). ROS kann über zwei verschiedene Wege produziert werden: einen enzymatischen und einen nicht-enzymatischen Weg (84,85). Verschieden Enzyme (Cytochrom P450 Reduktase, NADH Dehydrogenase, Xanthinoxidase) können DOXO reduzieren (77,85). Dieser „one-electron reduction mechanism“ führt zur vorübergehenden Bildung eines Semichinonradikals, bevor es dann wieder reoxidiert wird und Superoxidradikale (O_2^-) entstehen (75,77). Auch der Begriff „redox-cycling mechanism“ findet sich hier wieder (77,84). Schon geringste Mengen des Chemotherapeutikums können eine hohe Dosis von O_2^- produzieren (84). Der Produktion von Wasserstoffperoxid H_2O_2 durch die Superoxiddismutase steht der Abbau durch Katalase und Glutathionperoxidase entgegen (84). Durch die Reaktion von H_2O_2 und O_2^- können Hydroxylradikale (OH^\cdot) entstehen, alternativ gibt es auch noch die Bildung von „reactive nitrogen species“ (RNS, Reaktion mit Stickstoffmonoxid NO) (84). DOXO kann im nicht-enzymatischen Weg eine Verbindung mit Eisenionen (Fe^{3+}) eingehen und dadurch O_2 reduzieren (84). Hier wirkt Dexrazoxane als kardioprotektives Medikament während der DOXO-Therapie (86–88).

Einleitung

Sobald die ROS Produktion in der Zelle nicht mehr kompensiert werden kann, entsteht ein „oxidativer Stress“, der z.B. in Apoptose, Beeinträchtigung der Signalwege (z.B.: FAS-Ligand führt zur Apoptose) endet (75,84,85).

Eine Hypothese für die vergleichsweise hohe toxische Wirkung auf Kardiomyozyten vergleichsweise zu anderen Organzellen ist das verminderte Vorhandensein von ROS-Abbauenzymen, wie etwa Katalase, bzw. die an sich ohnehin hohe ROS Produktion in Kardiomyozyten (75,84).

1.6. Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Doxorubicin und CaMKII

Eine Hypothese, warum DOXO in der Langzeitfolge eine Herzinsuffizienz begünstigen kann, beinhaltet eine mögliche Aktivierung der CaMKII, die ein erwiesener Faktor der Herzinsuffizienzentstehung ist.

So konnte eine Aktivitätssteigerung dieses Proteins nach DOXO-Behandlung nachgewiesen werden (40,44,45). Eine Oxidation von Met281/282 über ROS könnte hier eine entscheidende Rolle spielen (40,44,45). Sag et al. konnte die pathophysiologischen Parameter (Calciumleck im SR, verminderte SR $[Ca^{2+}]$, erniedrigter Calciumtransient) bei der DOXO-induzierten kontraktilen Dysfunktion der isolierten Herzmuskelzellen bei Ratten nachweisen, wobei die oxidativ veränderte CaMKII nicht signifikant erhöht war (7). Jedoch zeigten Western Blots erhöht phosphorylierte CaMKII (7).

1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es, die Bedeutung der oxidativ aktivierten CaMKII für die Kardiotoxizität von Doxorubicin in der isolierten Herzmuskelzelle genauer zu erforschen. Durch Messungen am Epifluoreszenzmikroskop soll an wildtyp-Mäusen die negativen Wirkungen auf den Calciumhaushalt charakterisiert werden und mit den Auswirkungen in Zellen aus Oxidation-resistenten CaMKII δ Knock-in Mäusen verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Überblick der verwendeten Materialien

Tabelle 1: Überblick der verwendeten Einmalprodukte

Einmalprodukt	Hersteller
Alu-Laborfolie 0,015 x 300 mm, 10 m Rolle	Universal Aluminiumfolie
D-Flow Infusionsgerät mit Infusionsregler, Doppelskala und Injektionsport	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln (Deutschland)
Eppendorf Cup 500 µl (lichtgeschützt)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Knopfkanüle	
Kosmetiktücher	Wepa Professional GmbH, Arnstberg-Müschede (Deutschland)
Netz	
Parafilm „M“	Bemis, Neenah (USA)
Perfusorspritzen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland) Nerbe plus GmbH, Winsen (Deutschland)
Schlauchsystem für Perfusorspritzen, Perfusionszulauf	
Schraubröhren 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Serologische Pipettenspitze Nerbe plus 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Spritze 20 ml	
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Waagenschälchen	

Tabelle 2: Überblick der verwendeten Mehrwegprodukte

Mehrwegprodukt	Hersteller
Aufbewahrungsbox für Messkammern	
Bechergläser 150 ml, 250 ml	SIMAX, Prag (Tschechien)
Glasflaschen 1000 ml, 100 ml	Duran Group, Wertheim (Deutschland)
Magnetrührstäbchen	
Messkammern	
Messzylinder 100 ml, 250 ml	Vitlab, Grossostheim (Deutschland)
Perfusorspritze	B. Braun
Petrischale	
Reagenzglashalterung	
Reinigungsbürste	
Verschiedene Spatel	

2.1.2. Überblick der verwendeten Substanzen und Lösungen

Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Substanzen

Substanz	Hersteller
10x Trypsin, 2,5 %	Gibco life technologies by Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
2% Isofluran	
BCS (bovine calf serum)	SAFC, St. Louis (USA)
BDM (2,3-Butanedione monoxime)	Alfa Aesar, Haverhill (USA) ThermoFisher Kandel, Karlsruhe (Deutschland)
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Caffeine	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
dd H ₂ O	
DMSO (dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Doxorubicin hydrochloride	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
fura-2, AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
HCl	
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena (Deutschland)

Material und Methoden

KCl	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
KH ₂ PO ₄	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
KHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Laminin	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Liberase™	Roche, Mannheim (Deutschland)
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
NaCl	VWR Chemicals, Leuven (Belgien)
NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Phenol-red	
Pluronic Acid	Life technologies, Eugene (USA)
Seife Manisoft	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein (Deutschland)
Taurine	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Tabelle 4: Messtyrode, 10-fach Stock (Vorratslösung), pH=7,00 bei 37 °C, Gesamtvolumen: 1000 ml (89)

Substanz	Molarität [mM] ¹⁶	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]
KCl	4	74,56	2,982
NaCl	140	58,44	81,816
MgCl ₂	1	95,21	0,952
HEPES	5	238,31	11,916

¹⁶ 1 Molar = 1 mol/l

Material und Methoden

Tabelle 5: Messtyrode, 1-fach Stock, pH=7,40 bei 37 °C, Gesamtvolumen: 1000 ml (89)

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]	Volumen
10-fach Stock				100 ml
dd H ₂ O				900 ml
Glucose			1,982	

Tabelle 6: endgültige Messtyrode (Normaltyrode, NT), pH=7,40 bei 37 °C, Gesamtvolumen: je nach Bedarf, keine Lagerung, Herstellung erst zur Messung

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]	Volumen
1-fach Stock				je nach Bedarf
CaCl ₂	1	238,31		1 µl auf 1 ml Messtyrode

Tabelle 7: Doxorubicinlösung, Gesamtvolumen 1,7 ml, lichtgeschützt lagern (89)

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [mg]	Volumen [ml]
Doxorubicin hydrochloride			10	
DMSO				1,72

Tabelle 8: Doxorubicin Superperfusionslösung, 1 bzw. 10 µM, lichtgeschütztes Gefäß

Substanz	Volumen
endgültige Messtyrode	je nach Bedarf
Doxorubicinlösung*	0,1 µl auf 1 ml endgültige Messtyrode (1 µM Lösung) 1 µl auf 1 ml endgültige Messtyrode (10 µM Lösung) 5 µM auf 1 ml endgültige Messtyrode (50 µM Lösung)

* wurde erst zur Messung dazu gegeben

Material und Methoden

Tabelle 9: Caffeinlösung, Gesamtvolumen: 100 ml (89)

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]	Volumen [ml]
1-fach Stock				100
Caffein	10	194,2	0,1942	

Tabelle 10: Farbstofflösung, lichtgeschützt ansetzen

Substanz	Masse [µg] pro Cup	Volumen [µl] pro Cup
fura-2, AM	50	
DMSO		44,4

Tabelle 11: endgültige Farbstofflösung zur Messung, 1 Cup reicht für 2 Kammern, lichtgeschützte Cups verwenden

Substanz	Volumen [µl] pro Cup
Farbstofflösung	5
endgültige Messtyrode	500
Pluronic Acid	1

Tabelle 12: Isolationstyrode, Stammlösung, 10-fach Stock, Gesamtvolumen: 1000 ml, gelagert bei 4 °C (89)

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]
NaCl	113	58,4	65,992
KCl	4,7	74,6	3,506
KH ₂ PO ₄	0,6	136,1	0,8166
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6	177,99	1,0679
MgSO ₄ x7 H ₂ O	1,2	246,5	2,958
Phenol-red	0,032	376,4	0,1204
NaHCO ₃	12	84	10,080
KHCO ₃	10	101	10,1
HEPES	10	238,31	23,831
Taurine	30	125,1	37,53

Material und Methoden

Tabelle 13: Isolationstyrode, Stammlösung, 1-fach Stock, Gesamtvolumen: 1000 ml, gelagert bei 4 °C (89)

Substanz	Volumen [ml]
Isolationstyrode 10-fach Stock	100
dd H ₂ O	900

Tabelle 14: BDM Stock, Gesamtvolumen: 100 ml, warm aufsetzen (vermeidet Ausfällung), gelagert bei 4 °C (89)

Substanz	Molarität [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]
BDM	500	101	5,050

Tabelle 15: endgültige Isolationstyrode, pH=7,46 bei 37 °C, Gesamtvolumen: 1000 ml, wöchentlich ansetzen, gelagert bei 4 °C (89)

Substanz	Volumen [ml]	Masse [g]
Isolationstyrode 1-fach Stock	980	
BDM Stock	20	
Glucose		0,991

Tabelle 16: Enzymlösung (89)

Substanz	Volumen
Endgültige Isolationstyrode	20 ml
Liberase TM	150 µl (≅ 0,75 mg)
10x Trypsin, 2,5 %	100 µl
CaCl ₂ [10 mM]	25 µl

Tabelle 17: Stopplösung 1 (89)

Substanz	Volumen
Endgültige Isolationstyrode	2,25 ml
BCS	0,25 ml
CaCl ₂ [10 mM]	3,125 µl

Material und Methoden

Tabelle 18: Stopplösung 2, Gesamtvolumen: 25 ml (89)

Substanz	Volumen [ml]
Endgültige Isolationstyrode	23,75
BCS	1,25

Tabelle 19: Ca²⁺ Aufbau (89), bei jeder Molarität wird auf das Sedimentieren der Zellen gewartet

Molarität [mM]	Stopplösung 2	CaCl ₂ [100 mM]	c _{Soll} [mmol/l]
	Volumen [ml]	Volumen [μl]	
0,1	5	5	0,1
0,2	5	10	0,2
0,4	5	20	0,4
0,8	10	40	0,8

2.1.3. Überblick über die verwendeten Versuchstiere

Tabelle 20: Übersicht über die gemessenen Versuchstiere

Spezies	Kennz./ Tattoo	Geburt/ Austrag	Genotyp	gemessen am	Messalter in Wo.	Messkon- zentration (DOXO)
Maus	50611	20.12.19	CaMK II MVV wt	19.03.20	13	1 µM
Maus	50612	20.12.19	CaMK II MVV wt	20.03.20	13	1 µM
Maus	50614	20.12.19	CaMK II MVV wt	23.03.20	13	1 µM
Maus	51574	12.01.20	CaMK II MVV wt	24.03.20	10	1 µM
Maus	51762	17.01.20	CaMK II MVV wt	30.03.20	10	1 µM
Maus	51862	02.02.20	CaMK II MVV wt	25.03.20	7	1 µM
Maus	51872	02.02.20	CaMK II MVV wt	31.03.20	8	1 µM
Maus	53763	01.03.20	CaMK II MVV wt	30.04.20	9	10 µM
Maus	53831	12.03.20	CaMK II MVV wt	13.05.20	9	10 µM
Maus	53832	12.03.20	CaMK II MVV wt	13.05.20	9	10 µM
Maus	53853	03.03.20	CaMK II MVV wt	04.05.20	9	10 µM
Maus	53854	03.03.20	CaMK II MVV wt	05.05.20	9	10 µM
Maus	54852	19.04.20	CaMK II MVV wt	17.07.20	13	50 µM
Maus	59611	30.04.20	CaMK II MVV wt	24.07.20	12	50 µM
Maus	60234	23.05.20	CaMK II MVV wt	02.09.20	15	50 µM
Maus	51571	12.01.20	CaMK II MVV ho	24.03.20	10	1 µM
Maus	51873	02.02.20	CaMK II MVV ho	31.03.20	8	1 µM
Maus	52091	04.02.20	CaMK II MVV ho	06.04.20	9	10 µM
Maus	52092	04.02.20	CaMK II MVV ho	06.04.20	9	10 µM
Maus	52093	04.02.20	CaMK II MVV ho	07.04.20	9	10 µM
Maus	52094	04.02.20	CaMK II MVV ho	07.04.20	9	10 µM
Maus	53761	01.03.20	CaMK II MVV ho	30.04.20	9	10 µM
Maus	53852	03.03.20	CaMK II MVV ho	04.05.20	9	10 µM
Maus	54682	04.04.20	CaMK II MVV ho	26.08.20	21	50 µM
Maus	59631	01.05.20	CaMK II MVV ho	27.08.20	17	50 µM
Maus	59632	01.05.20	CaMK II MVV ho	27.08.20	17	50 µM

2.1.4. Überblick der verwendeten Geräte

Tabelle 21: Überblick über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugung rotarus flow (50 l)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (Deutschland)
Automatic Teperature Conroller	Warner Instruments, Holliston (USA)
Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon Corporation, Tokio (Japan)
Feinwaage analytic	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Fouorescence System Interface	IonOptix, Milton (USA)
Gefrierschrank	
Heizplatte Stuart heat-stir, US152	Cole-Parmer, Staffordshire (UK)
High Intensity Arc Lamp Power Supply	Cairn Research, Faversham (UK)
Hyperswitch Model MCS-100	IonOptix, Milton (USA)
Kühlraum	
Kühlschrank	
Langendorff Perfusionsanlage	
Magnetrührer	
Monitor	HP Inc., Palo Alto (USA)
Myo Cam-S	IonOptix, Milton (USA)
MyoCam-S Power	IonOptix, Milton (USA)
MyoPacer Field Stimulator	IonOptix, Milton (USA)
Nikon Modell TI-PS 100 W/A	Nikon Corporation, Tokio (Japan)
PC	Dell GmbH, Frankfurt am Main (Deutschland)
Perfusor segura FT	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
pH-Temperatur-Messgerät	Sartorius, Göttingen (Deutschland)

Material und Methoden

Pipetten	Eppendorf, Hamburg (Deutschland) Gilson, Middleton (USA) VWR, Radnor (USA)
Elektrische Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann, Eberstadt (Deutschland)
PMT	
Präparationspinzette	Fine Science Tools, Foster City (USA)
Präparationsschere	Fine Science Tools, Foster City (USA)
Timer	TFA Dostmann, Wertheim (Deutschland)
Vibrationsmischer Vortex- Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Zentrifuge	

2.1.5. Überblick der verwendeten Software

Tabelle 22: Überblick über die verwendete Software

Software name	Version	Hersteller/Entwickler
Excel	16.57	Microsoft, Redmond (USA)
IonWizard	6.6	IonOptix, Westwood (USA)
Prism	7	GraphPad Software, San Diego (USA)
Word	16.57	Microsoft, Redmond (USA)
Zotero	6.0-beta	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University (USA)
SigmaPlot	14.5;15	Systat Software GmbH

2.2. Methoden

2.2.1. Mausmodell

2.2.1.1. Mutationshintergrund der Mäuse

Im „Cell“ wurde 2008 erstmals eine Knock-in Maus beschrieben, bei der die CaMKII δ resistent gegen eine Oxidation ist (45). Erreicht wurde diese Eigenschaft durch das Ersetzen von zwei redox-sensitiven Methioninen zu Valinen an Stelle 281/282 (45). Die Bezeichnung „MM-VV“ für diese Knock-in Maus leitet sich von dieser Mutationskonstellation ab. Im Folgenden werden die „MM-VV“ Mäuse als homozygoten (ho) bzw. als CaMKII δ Met281/282Val bezeichnet.

In dieser Forschungsarbeit wurden CaMKII δ Met281/282Val und wildtyp Mäuse verwendet. Erwähnt werden muss an dieser Stelle, dass die als wt genotypisierten Mäuse Geschwistertiere der CaMKII δ Met281/282Val Mäusen sind. Somit konnte zwar sichergestellt werden, dass sich an der Position 281/282 weiterhin Methionin befindet, jedoch wurde nicht auf sonstige Veränderungen upstream oder downstream geachtet. Dies bedeutet, dass nicht die Komplette DNA Sequenz auf Veränderungen hin untersucht wurde.

2.2.1.2. Haltung der Mäuse

Die Labormäuse wurden in den Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg (tierärztliche Leitung: Dr. T. Spruss) gehalten (90). Am Tag der Messung wurde die jeweilige Maus aus dem Tierhaus ausgeschleust und in Transportkäfigen in das Labor gebracht. Das Alter der Mäuse betrug zwischen 7 Wochen und 13 Wochen (vgl. Tabelle 20).

2.2.1.3. Unterschiede der ventrikulären Herzmuskelzellen der Maus und des Menschen

Die Wahl des richtigen Tiermodells steht vor allem bei der Erforschung der physiologischen, aber auch pathophysiologischen Abläufe am Herzen von Beginn an im Vordergrund. Allgemeingültig lässt sich sagen, dass sich zwei Herzen am stärksten gleichen, wenn das Herzgewicht und Körpergewicht der Spezies relativ übereinstimmend sind (91). Grundlegende Vorteile beim Mausmodell sind nicht nur die leichte und platzsparende Haltung, auch die schnelle Fortpflanzung ermöglicht einen rascheren Fortschritt in der Thesenerforschung (91). Transgene Modelle sind bei kleineren Tiermodellen wie Mäusen

leichter zu erzeugen¹⁷ (91). Die Maus unterscheidet sich jedoch nicht nur in seinen Maßen zu den Menschen, auch die Herzfrequenz¹⁸ ist beispielsweise höher (91). Durch den schnellen Puls der Maus ist es notwendig, dass die Repolarisation schneller abläuft und die Plateauphase stark verkürzt ist (s. auch Kapitel 1.2.3. Aktionspotential des Arbeitsmyokards) (91). Während bei der Maus der Abfall der Calciumkonzentration im Zytoplasma zu 90% durch die SERCA getragen wird, wird beim Menschen diese Zahl mit 63-76 % angegeben (30,91). NCX übernimmt nahezu den Rest der Calciumelimination aus dem Zytoplasma und macht etwa 9% bei der Maus und 24-37 % beim Menschen aus (30,91).

2.2.1.4. Doxorubicinkonzentration

Bei der Wahl der Messkonzentration mit Doxorubicin wurde zunächst mit 1 μM begonnen, da vorherige laborinterne Messungen an anderen gentechnisch veränderten Mäusen eine nur kurze Überlebensdauer gezeigt hatten. Nach ersten Messungen und Auswertungen mit der MMVV-Linie zeigte sich jedoch, dass die isolierten Kardiomyozyten die volle Messdauer von neun Minuten überleben. Angelehnt an eine Veröffentlichung von Timolati et al., bei der die Dosis von 10 μM die Auswirkungen einer späten klinischen Komplikationen a.e. zeigte (92), wurde die Messkonzentration dann auf das 10-fache (10 μM) angehoben. Anschließend wurden weitere Messungen mit einer Konzentration von 50 μM angefertigt, um die Auswirkung einer maximalen Schädigung durch Doxorubicin möglichst sichtbar zu machen.

2.2.2. Isolation und Aufbereitung der Kardiomyozyten

Zu Beginn der Isolation des Herzens der Maus steht die Tötung der selbigen durch zervikale Dislokation (s. unten). Dies wurde durch Mitarbeiter im Labor durchgeführt, die einen FELASA-Kurs erfolgreich absolviert haben (u.a. Herr Thomas Sowa, BTA).

Zuerst wird die Maus in einer luftdichten Kammer mit 2 % Isofluran bis zur Reflexlosigkeit betäubt. Die bevorzugte Tötungsmethode bei Mäusen ist die zervikale Dislokation. Bei dieser Art der Tötung wird der Kopf durch eine Schere am Untergrund fixiert und die Maus ruckartig durch Zug an der Schwanzwurzel in die Länge gezogen. Die daraus folgende Durchtrennung des Rückenmarks und der gehirnversorgenden Arterien (Aa. carotides

¹⁷ Bei größeren Tiermodellen ist es notwendig, virale Vektoren über invasive Techniken (z.B.: Katheter) einzubringen, wohingegen bei Mäusen beispielsweise i.v. Injektionen in der Schwanzvene genügen (91).

¹⁸ Herzfrequenz der Maus: 310-840 beats per minute (bpm) (91)

internae, Aa. vertebrales) führt sehr schnell zum Tod der Maus. Nicht zuletzt liegt ein weiterer Vorteil in der Vermeidung von Stress für das Tier, welcher die Herzmuskelzellfunktion ansonsten beeinflussen könnte. Die folgenden Schritte sollten zügig durchgeführt werden, um das Gerinnen des Blutes im Herzen und seinen Koronararterien zu verhindern. Nach Eröffnung des Abdomens und Thorax mithilfe einer Präparationsschere und Pinzette erfolgt die Identifikation des Herzens im Mediastinum. Vorsichtig wird das Herz mit einer Pinzette luxiert und die Gefäße abgetrennt. Durch leichtes hin und her Bewegen auf einem Kosmetiktuch, wurde das Herz von seinem noch in ihm befindlichen Blut befreit. Als nächster Schritt folgte das Einbringen einer Knopfkanüle unter Vergrößerung in die Aorta ascendens und das Ligieren derselben, um das Luxieren der Kanüle zu vermeiden. Um weiteres noch vorhandenes Blut auszuwaschen, wurde mit der endgültigen Isolationstyrode (aufgeheizt auf 37 °C) durchgespült. Durch die retrograde Perfusion schließt sich die Aortenklappe und das Herz wird überwiegend durch seine Herzkranzgefäße perfundiert. Das Anbringen der Knopfkanüle ermöglichte das Anbringen an die Langendorff-Perfusionsanlage (93). Die nächsten sieben bis acht Minuten wurde das Herz durch die Enzymlyse durchgespült. Die Anwendungsdauer oblag dem erfahrenen Laborpersonal, welche den Verdau durch beispielsweise die Farbtintensität des Myokards beurteilten (Farbtintensität nimmt ab). Durch die Aktivität der Enzyme wurde der Abbau der extrazellulären Matrix erreicht (7). Nun wurden auf Höhe der Klappenebene die Ventrikel von den Vorhöfen abgetrennt. Die abgetrennten Herzbestandteile wurden in Anwesenheit der Stopplösung 1 durch eine Schere in einer Petrischale mechanisch zerkleinert. Eine weitere Größenminderung wurde durch auf und ab pipettieren und gleichzeitigem zupfen an Gewebe mit einer feinen Pinzette erreicht. Weiterhin bestehende größere Bestandteile wurden durch ein feines Netz gefiltert. Die vorerst fertige Zellsuspension wurde anschließend in einer Schraubenvorrichtung gegeben. Nach einer Ruhezeit von sieben Minuten konnte der Überstand mit seinen toten und hyperkontraktilen Zellen abpipettiert werden.

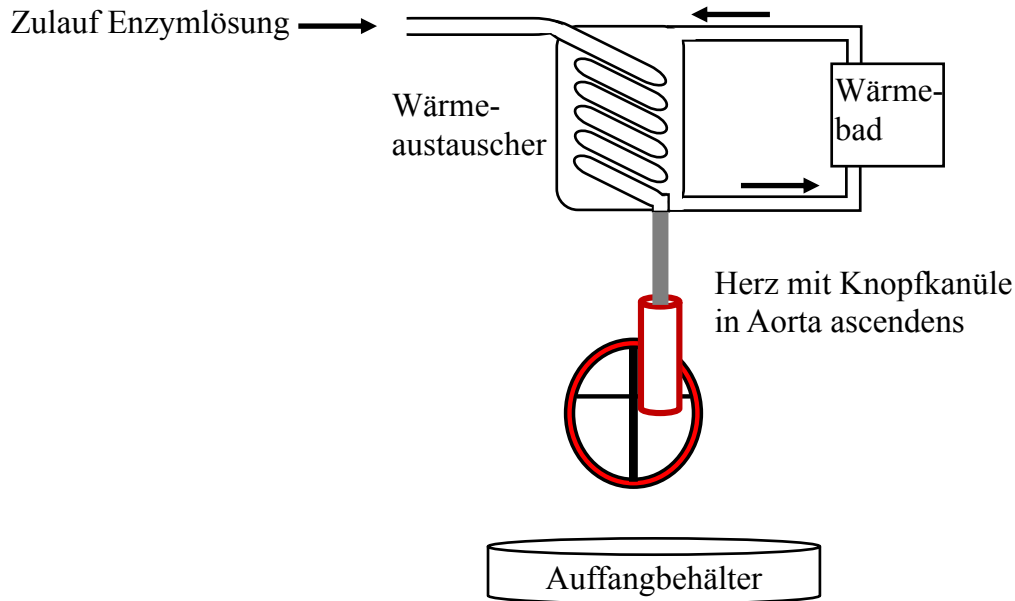


Abb. 6: Schematische Darstellung der Langendorff Perfusionsanlage.

Der nun notwendige schrittweise Aufbau der Calciumkonzentration dient der Vorbeugung des Calcium-Paradox-Phänomens, welches erstmals 1966 beschrieben wurde (94,95). Ein abrupter Calciumanstieg würde zur Calciumüberladung und zur Ausbildung hyperkontraktiler Zellen führen (95–97). Zu dem zugrundeliegenden Mechanismus gibt es mehrere Theorien, wie beispielsweise eine verstärkte Durchlässigkeit des SR (98). Auch in der klinischen Verwendung der Kardioplegielösung in der Herzchirurgie hat dieses Phänomen Einfluss (95,98). Der Calciumaufbau besteht aus schrittweise steigenden Calciumkonzentrationen (0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM). Jede Molarität ruht für sieben Minuten, bevor dann der Überstand verworfen wird (abpipettieren). Die Zielkonzentration beträgt 0,8 mM.

Die zuvor mit Seife und Wasser gereinigten, druckluftgetrockneten Messkammern, werden nun mithilfe der Pipette mit 3,5 µl Laminin benetzt. Laminin (Vertreter der Glykoproteine) findet sich in der Basalmembran und besitzt die Fähigkeit zur Bindung von Zellen (99). Diese Fähigkeit wird sich hier zunutze gemacht, um die Kardiomyozyten besser in der Messkammer zu fixieren. Nach Zugabe von 400 µl Zellsuspension lässt man die Kammern fünfzehn Minuten lange in Ruhe stehen, um eine Zelladhäsion zu gewährleisten.

Im abgedunkelten Messraum kann dann 250 µl des endgültigen Farbstoffes fura-2, AM zugegeben werden, nachdem der flüssige Überstand der Kammer ausgekippt wurde. Nach fünfzehnminütiger Lagerung unter einer mit Aluminiumfolie bedeckten und somit lichtgeschützten Petrischale, kann die Kammer nun in das Mikroskop eingesetzt werden.

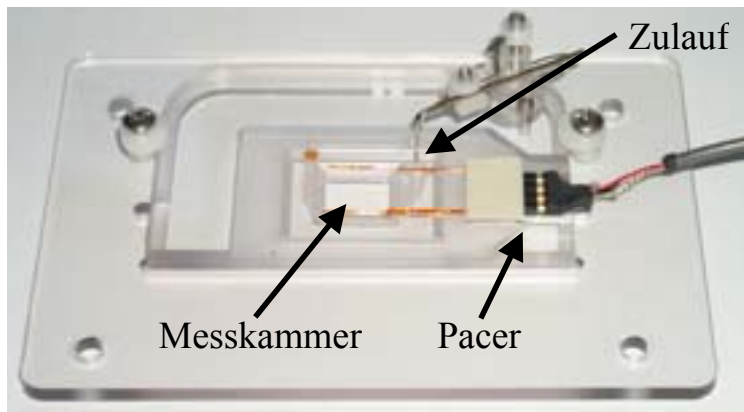


Abb. 7: Beispiel einer Messkammer mit Pacer und Zulauf für die Superfusionslösung. Modifiziert nach IonOptix - Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration) [Internet]. 2020. Modifiziert aus: https://2zlwpi242q7llv0z33wb30jz-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019/10/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf (100)

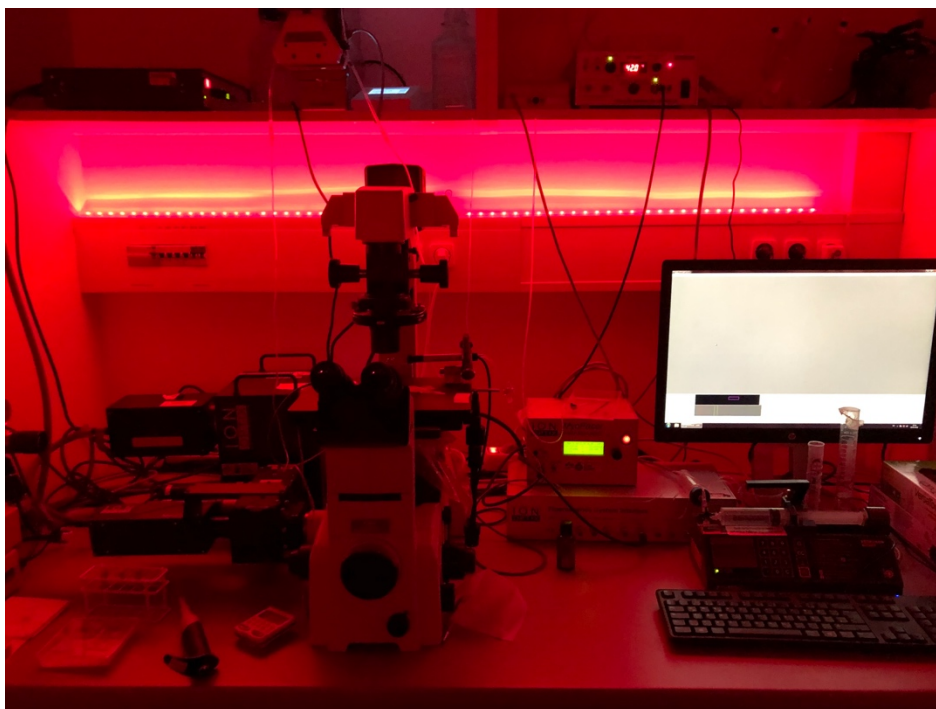


Abb. 8: Bildaufnahme des Arbeitsplatzes am Forschungslabor der Kardiologie am Uniklinikum Regensburg (eigene Aufnahme am 05.03.2020)

2.2.3. Farbstoff fura-2, AM

Die Arbeit von Tsien und seinen Kollegen in der Erforschung und Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht bis heute, Aussagen zur zytosolischen Calciumkonzentration während Kontraktionen von Kardiomyozyten zu treffen (101–103). Der Farbstoff fura-2, AM, der auch in dieser Forschungsarbeit genutzt wurde, wirkt als Indikator. Klassifiziert wird dieser zu den ratiometrischen Farbstoffen, der im Anschluss eine Beurteilung der Calciumkonzentration durch die Bildung von Verhältnissen zwischen zwei Anregungswellenlängen zulässt.

Formel 1: Formel zur Berechnung der Calciumkonzentration (102)

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

$[\text{Ca}^{2+}]$	Calciumkonzentration
K_d	Dissoziationskonstante, 224 nM (102,104)
R	Verhältnis der Fluoreszenzintensität ($\frac{340 \text{ nm}}{380 \text{ nm}}$, jeweils mit und ohne Ca^{2+} Bindung) (103)
R_{\min}	minimale Fluoreszenzintensität, 0,768 (102)
R_{\max}	maximale Fluoreszenzintensität, 35,1 (102)
S_{f2}	Fluoreszenzintensität bei 380 nm im Ca^{2+} freien Zustand (102)
S_{b2}	Fluoreszenzintensität bei 380 nm im Ca^{2+} gebundenen Zustand (102)

Der hier verwendete Farbstoff fura-2, AM zeichnet sich durch seine spezielle chemische Modifikation und dadurch entstehende Vorteile aus. Die Veresterung mit einer Acetoxymethylgruppe steigert die Lipophilie und somit die Eigenschaft, besser in das Zellinnere einzutreten (102,103). Die Verschiebung des pH ins leicht saure Milieu (pH ~ 6,6) ermöglicht eine zusätzliche Erleichterung der Zellpermeabilität (104) und wird hier durch Pluronic acid erreicht. Intrazellulär befindliche Esterasen hydrolysieren das Molekül (103). Dadurch kann nicht nur intrazellulär eine höhere Konzentration erreicht werden, sondern auch der Farbstoff kann nun Calcium binden (103). Untersuchungen der Kinetik haben gezeigt, dass sich fura-2, AM sehr gut eignet, um schnell alternierende Calciumkonzentration zu messen (105,106). Des Weiteren verliert fura-2, AM seine fluoreszierenden Eigenschaften

während der Messperiode von einer Stunde nicht signifikant (103). Jedoch steht diesen zahlreichen Vorteilen auch Nachteile gegenüber, wie beispielsweise die verminderte Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase um 30-80 % (107).

2.2.4. Epifluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1. Strahlengang in der Messanlage

Die HyperSwitch Configuration der Firma IonOptix ermöglicht 250 ratiometrische Calciummessungen pro Sekunde und 1000 Sarkomerlängenmessungen pro Sekunde (100). Das Licht dieser Anlage wird durch eine 75 W xenon-arc bulb erzeugt, die sich geschützt und umgeben von Parabolspiegeln befindet (108). Dieses Licht wird zu einem galvanometrischen Spiegel gelenkt, der dieses schnell wechselnd in zwei unterschiedliche Wege leiten kann (108). Jeder dieser Pfade besitzt einen eigenen Filter, der nur für Licht spezieller Wellenlängen durchlässig ist (108). Diese Strahlen werden dann durch einen dichroitischen Spiegel zum gemeinsamen Ausgang gelenkt (108). Dieser Spiegel zeichnet sich durch seine Eigenschaft aus, nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchzulassen (ansonsten wird das Licht reflektiert) (109). Zusammenfassend wird erreicht, dass sich zwei Wellenlängen im Millisekunden Bereich schnell abwechseln (100). Nach Durchtritt des Graufilters, wird das Licht mittels Flüssiglichtleiter auf das Präparat im Mikroskop gelenkt. Ein Emissionsfilter hindert Anregungslicht, in die Messsensoren zu gelangen (109). Die Zellkontraktionen und somit auch die Sarkomerlängen werden durch eine Kamera erfasst (110). Die Fluoreszenz wird durch eine photomultiplier tube (PMT) gemessen, welcher unter der Kontrolle des Fluorescence System Interface und der dazugehörigen Software IonWizard steht (100,110). Diese Software ermöglicht auch die Erfassung der gemessenen Daten und später auch die Analyse dieser (100).

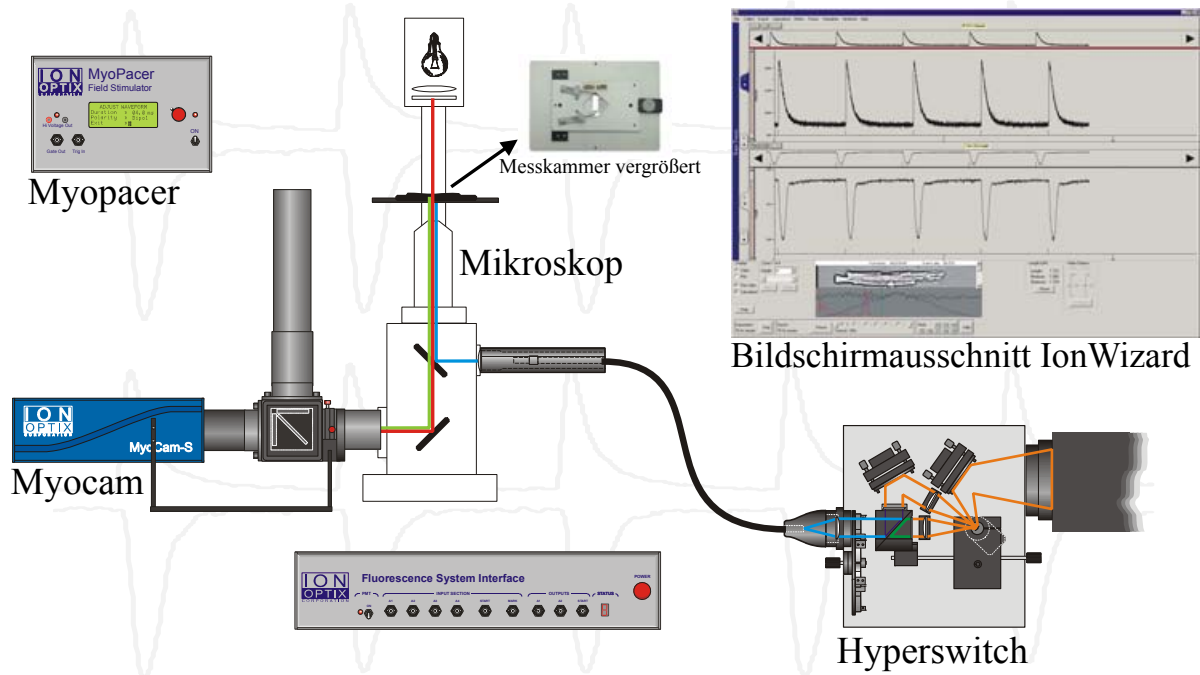


Abb. 9: Aufbau der Messanlage.

Modifiziert nach IonOptix - Myocyte Calcium & Contractility Recording System

(HyperSwitch Configuration) [Internet]. 2020. Modifiziert aus:

https://2zlwpi242q7llv0z33wb30jz-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019/10/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf (100)

2.2.4.2. Physikalisches Prinzip der Messmethode

Das zugrunde liegende physikalische Prinzip der Messmethode ist eine Kombination aus Fluoreszenz (Absorption und Emission) und dem Stokes-Shift. Die in der Schale befindlichen Elektronen des am Calcium gebundenen Farbstoffes fura-2, AM wird durch Anregungslicht in einen energetisch höheren Zustand angehoben (Absorption) (109,111). Dieser Zustand kann jedoch nicht gehalten werden, und so fallen die Elektronen wieder zurück in ihren Ausgangszustand (Emission) (109,111). Dieser Vorgang dauert nur wenige Nanosekunden und ermöglicht in dieser Messung eine hohe zeitliche Auflösung (111). Da die dabei freiwerdende Energie jedoch nicht nur in Form von Photonen freigesetzt wird (Energieverlust), zeigt sich bei der Messung der Wellenlängen größere Werte (ca. 20-50 nm mehr) (109,111). Diese Wellenlängenverschiebung wird nach ihrem Entdecker als Stokes-Shift oder auch als Stokes-Verschiebung beschrieben (109). Filter ermöglichen nun eine alleinige Messung der zurückgeworfenen Wellenlängen (111).

2.2.5. Übersicht der Geräte- und Softwareeinstellungen während der Messung

Tabelle 23: Übersicht der Geräte- und Softwareeinstellung während der Messung

Gerät/Software	Einstellung
Absaugung	020.0 l/min
Automatic Temperature Controller	42 °C
Epifluoreszenzmikroskop NIKON Eclipse TE2000-U	Filter fura-2, 1 Auge, 5 PC, Blende offen (Regler hinten)
Fouorescence System Interface	
Geräteaufbau	Hinten Spiegel, vorne Leer
Hyperswitch	Hyperflow nach vorne zum Benutzer, Graufilter 0,6
IonWizard	Fura PMT 2 bei Task Manager und Experiments
Myo Cam-S	
MyoPacer Field Stimulator	20 V, 1 Hz
Perfusoren	60 ml/h
Tropfsystem für Caffeinmessung	62 ml/h

2.2.6. Messprotokoll

Die nachfolgenden Grafiken zeigen den zeitlichen Verlauf des Messprotokolls auf. Zuvor wird jedoch die Kammer in das Mikroskop eingesetzt und Pacer, Zulauf und Absaugung positioniert. Die Betrachtung der Zellen erfolgte durch ein Immersionsölobjektiv mit 40-facher Vergrößerung. Bei der Wahl der Zelle wurde darauf geachtet, dass diese möglichst einzeln liegt und die Streifung der Sarkomere gut zu erkennen ist.

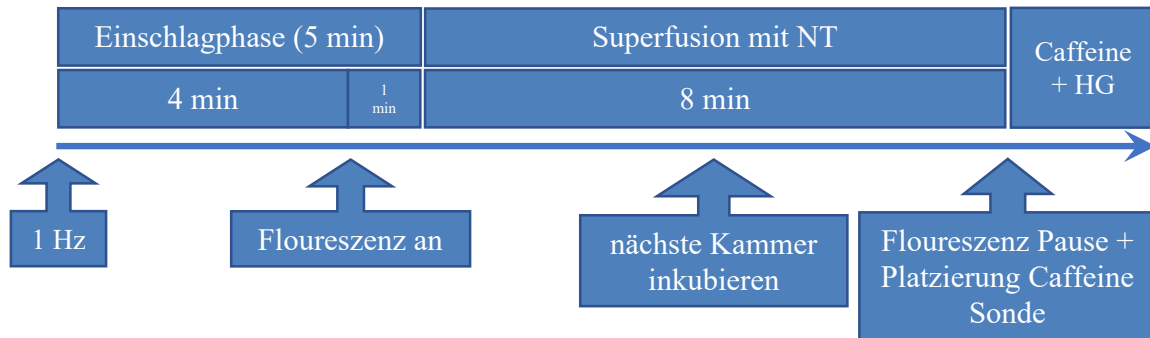


Abb. 10: Messprotokoll der Kontrollmessung mit NT

Bemerkung: Die Kammer wurde lichtgeschützt für 15 Minuten mit dem Farbstoff fura-2, AM inkubiert (103).

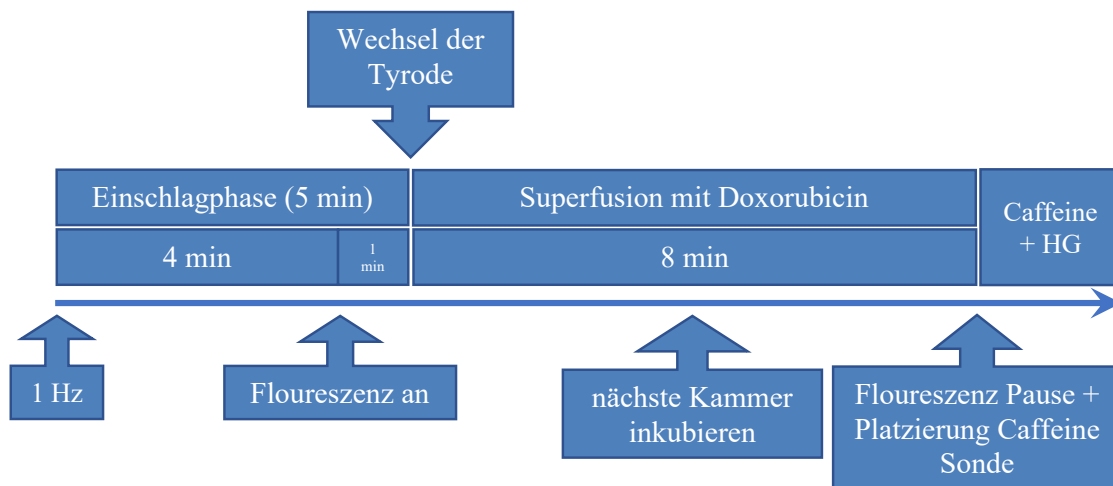


Abb. 11: Messprotokoll der Doxorubicin Superperfusion

Bemerkung: Die Kammer wurde lichtgeschützt für 15 Minuten mit dem Farbstoff fura-2, AM inkubiert (103).

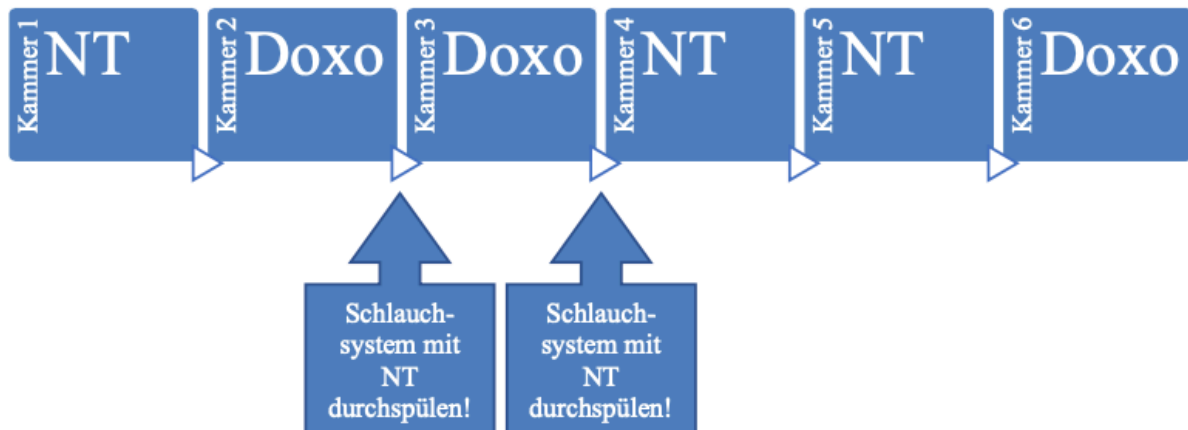


Abb. 12: Reihenfolge der Messungen pro Kammer

Bemerkung: Durch die im Verlauf kontinuierliche Auswertung der Messdaten, wurde die Reihenfolge und die Anzahl der Messungen innerhalb der Kammer im Verlauf verändert. Dies ermöglichte eine annähernd gleiche Stichprobengröße in den einzelnen Gruppen. Jedoch wurde darauf geachtet, dass bei jeder Maus mindestens einmal mit NT und einmal mit DOXO gemessen wurde. Abweichende Reihenfolge wurde beispielhaft wie folgt eingehalten: DOXO-NT-DOXO-DOXO-NT-DOXO, NT-DOXO-DOXO-DOXO-DOXO-DOXO.

Die Caffeineapplikation am Schluss jeder Messung (bei den Messreihen mit 1 μM und 10 μM Doxorubicin durchgeführt) ermöglicht es die Gesamtcalciumkonzentration im SR zu erheben, da diese Lösung eine zeitliche Öffnung aller RyR induziert (30,112). Der Caffeinestoß sollte in der fortgeführten 1 Hz Frequenz bei abgeschalteten Pacer erfolgen, d.h. unter Pausieren der Stimulation (113). Da hierbei auch andere Proteine beeinflusst werden (z.B. Aktivierung der PKA) (30), macht diese Herangehensweise weitere Messungen in der Kammer unmöglich. Ziel ist es, in Zusammenschau mit dem zuvor gemessenen Ca^{2+} Transienten herauszufiltern, wie viel Calcium pro Systole aus dem SR austritt und wie viel aus dem Extrazellularraum stammt (sog. fraktionelle SR Ca^{2+} Freisetzung).

Zuletzt erfolgt die Messung der Hintergrundstrahlung, bei der möglichst nahe neben der gemessenen Zelle ein Ausschnitt ausgesucht werden sollte, in dem sich weder Zellen, noch Zelltrümmer befinden. Dieser Hintergrund wird später bei der Auswertung von der gesamten Messung subtrahiert.

2.2.7. Auswertung der Messergebnisse

Zuerst soll anhand eines exemplarischen Transienten die Messparameter weiter erläutert werden:

- Die „baseline“, also die Fluoreszenzintensität in der Zelle vor Beginn des systolischen Ca^{2+} Transienten erlaubt Rückschlüsse auf den diastolischen Calciumgehalt im Zytosol $[\text{Ca}^{2+}]_i$
- Die „peak h“ repräsentiert die Höhe der Ca^{2+} Transientenamplitude während der Systole, die sich aus der Differenz von systolischer maximaler Fluoreszenzintensität („peak“) und baseline Fluoreszenzintensität ergibt.
- Die „RT 80 %“ beschreibt die Zeit, binnen derer der Ca^{2+} Transient während der Diastole um 80 % wieder auf sein Ausgangsniveau zurückgegangen ist. Da die RT80% also die Geschwindigkeit der Ca^{2+} Elimination während der Diastole repräsentiert, ist sie ein Maß der Relaxation.
- Die „tau“ erlaubt Rückschlüsse auf die vollständige Relaxationszeit, also die Zeit, die benötigt wird, um den diastolischen „baseline“ Calciumgehalt im Zytosol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erreichen
- Durch die Zugabe von Caffeine am Ende der Messperiode konnte der Calciumgehalt des sarkoplasmatischen Retikulum bestimmt werden. Die Bestimmung der Amplitude erfolgte wie auch die des Ca^{2+} Transienten durch Subtraktion der maximalen systolischen Fluoreszenz („peak“) minus der baseline Fluoreszenz.

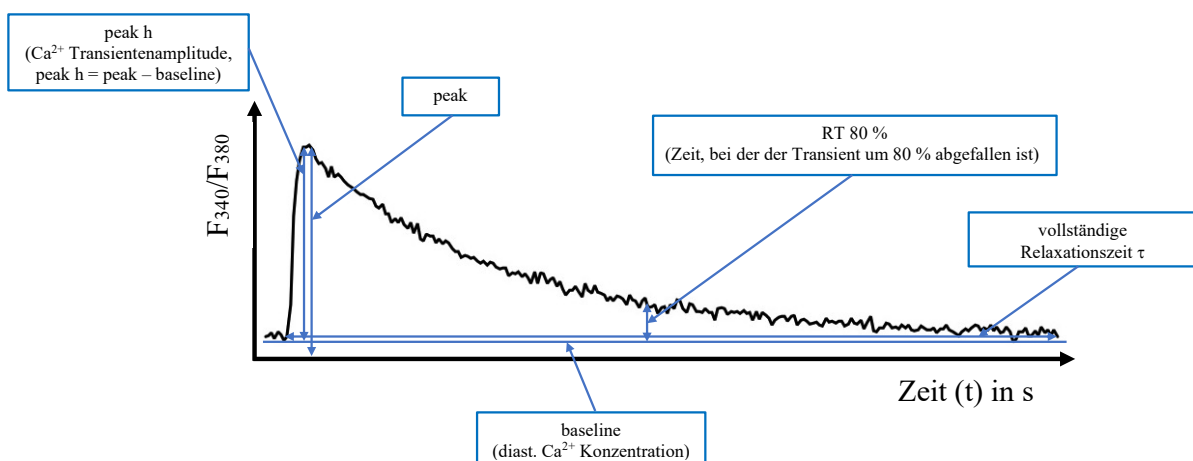


Abb. 13: Exemplarischer Transient mit gekennzeichneten Messparametern

Material und Methoden

Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde mit dem Programm SigmaPlot angefertigt. Bei der graphischen Darstellung wurde auf der x-Achse der Faktor Zeit aufgetragen, auf der y-Achse die gemessene Fluoreszenzintensität. Aus den gemessenen Werten wurde hierbei der Mittelwert (mean) errechnet. Außerdem wurde der Standardfehler mit angegeben, welcher Rückschlüsse auf Messqualität erlaubt (114). Mathematisch lässt sich der Standardfehler (SEM = standard error of the mean) mit nachfolgender Formel ausdrücken:

Formel 2: Berechnung des Standardfehlers (114,115)

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

SEM	Standardfehler
s	Varianz
n	Anzahl der Messungen

Als statistischer Test wurde zum einen der two-way (Zeit und DOXO Superfusion) ANOVA (analysis of variance) mit Messwiederholungen und dem Post-hoc Test Fisher's LSD gewählt, zum anderem der one-way ANOVA für wiederholte Messungen. Die Nullhypothese (Messwerte aus den unterschiedlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant) wird abgelehnt, wenn das festgelegte Signifikanzniveau $p < 0,05$ unterschritten wird.

Die im Text aufgeführten Zahlenwerte sind die absoluten, gemessenen Werte. Diese wurden auf zwei Dezimalen gerundet.

Um die einzelnen Genotypen besser darstellen zu können, wurde bei den Graphen eine pseudonormalisierte Darstellung zum jeweiligen Ausgangswert gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration

Die „baseline“ erlaubt Rückschlüsse auf den diastolischen Calciumgehalt im Zytosol [Ca²⁺]_i. Der Einfluss von Doxorubicin wurde anhand eines Titrationsprotokoll (NT, 1 µM, 10 µM, 50 µM) in den jeweiligen Genotypen (wildtyp vs. CaMKIIδ Met281/282Val) untersucht.

Wie dem Methodenteil zu entnehmen ist, wurden alle Zellen in Minute eins mit Normaltyrode superfundiert. In den folgenden Messreihen wurde bei den absoluten Fluoreszenzwerten allerdings eine Diskrepanz des [Ca²⁺]_i in der Minute eins zwischen den einzelnen Gruppen detektiert, die schon zum Ausgangszeitpunkt bestanden. Um die *qualitativen* Effekte von Doxorubicin in den einzelnen Genotypen besser darzustellen, wurde das diastolische [Ca²⁺]_i daher jeweils auf seinen Ausgangswert normalisiert.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Anzahl der gemessenen Zellen bei der jeweiligen Minute und Konzentration, sowie den Genotypen. Diese bezieht sich auch auf die nachfolgenden Auswertungen.

Tabelle 24: Übersicht der Anzahl der gemessenen Zellen bei der jeweiligen Minute und Konzentration, sowie den Genotyp

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
wildtyp	NT	29		27	29						
	1 µM	11						10	11		
	10 µM	18		16			17	16	17		
	50 µM	7				8	7		8	7	
CaMKIIδ Met281/282Val	NT	27				25		22	23		
	1 µM	5									
	10 µM	19		18							
	50 µM	8						7	6	5	

Wie die Tabelle aufzeigt, unterscheiden sich die Anzahl der gemessenen Zellen. Die Veränderung der Zellzahl entlang einer Messreihe beruhte auf beispielsweise „Absterben“ der Zellen oder an nicht validen Messungen, sodass diese Werte fehlen.

Ergebnisse

Wie den nachfolgenden zwei Grafiken (Abb. 14) zu entnehmen ist, führt die Anwendung von Doxorubicin in seiner maximal verwendeten Konzentration von 50 μ M in wildtyp Zellen, sowie CaMKII δ Met281/282Val Zellen zu einen signifikant schwächeren Anstieg der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu den jeweils mit NT superfundierten Kontrollzellen.

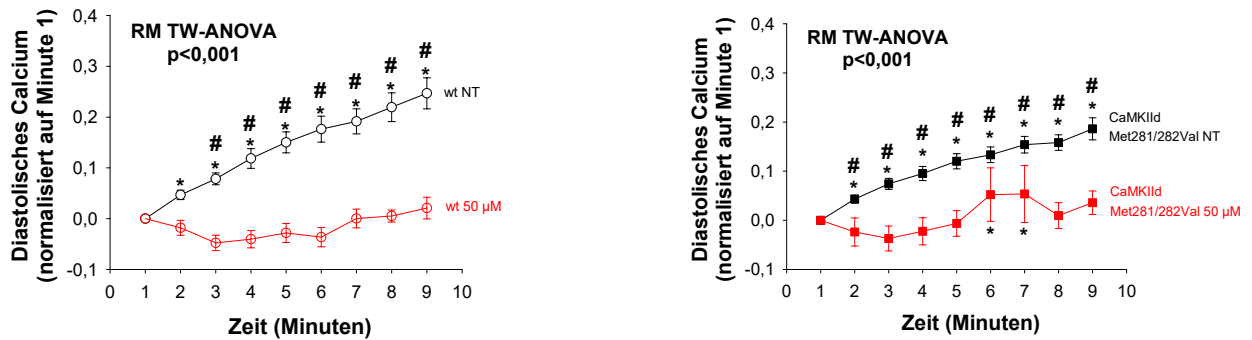


Abb. 14: Vergleich des normalisierten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate) und Doxorubicin mit der Konzentration 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate). (* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

Ergebnisse

In der Abb. 15 ist der diastolische $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb der wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen unter allen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (d.h. NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dargestellt.

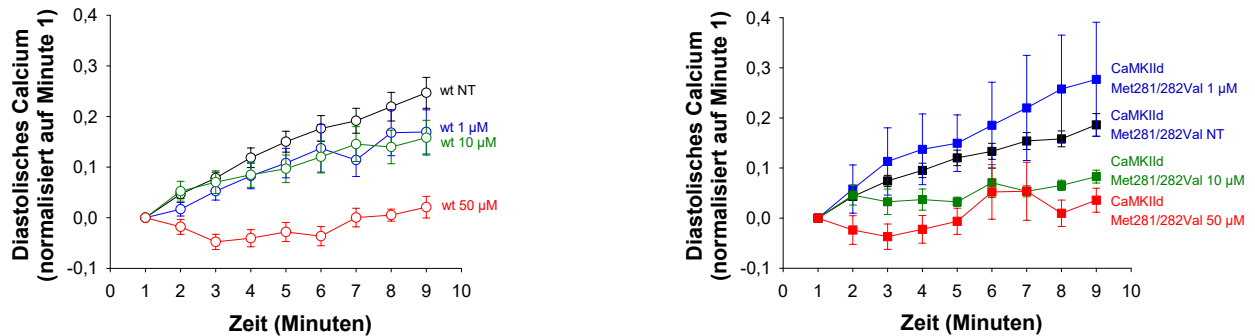


Abb. 15: Vergleich des normalisierten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate).

Die mit NT superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 21,70 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,14 a.u.¹⁹ \pm 0,05 a.u., Minute 9: 1,39 a.u. \pm 0,07 a.u.).

Die mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 13,65 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,24 a.u. \pm 0,05 a.u., Minute 9: 1,41 a.u. \pm 0,04 a.u.).

Die mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 16,54 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,98 a.u. \pm 0,05 a.u., Minute 9: 1,14 a.u. \pm 0,05 a.u.).

Die mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 2,00 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,04 a.u. \pm 0,04 a.u., Minute 9: 1,07 a.u. \pm 0,03 a.u.).

¹⁹ a.u., willkürliche Einheit (engl.: arbitrary units)

Ergebnisse

Die mit NT superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 15,84 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,08 a.u. \pm 0,06 a.u., Minute 9: 1,25 a.u. \pm 0,08 a.u.).

Die mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 19,95 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,39 a.u. \pm 0,08 a.u., Minute 9: 1,67 a.u. \pm 0,11 a.u.).

Die mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 6,68 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 1,21 a.u. \pm 0,04 a.u., Minute 9: 1,29 a.u. \pm 0,04 a.u.).

Die mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Zunahme von + 5,84 % über den zeitlichen Verlauf von sechs Minuten (Minute 1: 0,90 a.u. \pm 0,09 a.u., Minute 6: 0,95 a.u. \pm 0,09 a.u.). Ab Minute sieben findet sich eine Reduktion der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ im gesamten Verlauf von 9 Minuten gegenüber den Anfangswert bei Minute 1 um - 9,18 % (Minute 1: 0,90 a.u. \pm 0,09 a.u., Minute 9: 0,81 a.u. \pm 0,07 a.u.). Zu beachten ist hier, dass durch das Wegfallen von Zellen ab Minute 7 sich die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in den absoluten werden verringert (wie aufgeführt), der Graph hier jedoch durch die Pseudonormalisierung von Minute 1 einen Anstieg aufzeigt.

Ergebnisse

Nachfolgend (Abb. 16) findet sich eine direkte Gegenüberstellung der diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ der Genotypen (wildtyp, CaMKII δ Met281/282Val) bei den jeweiligen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M).

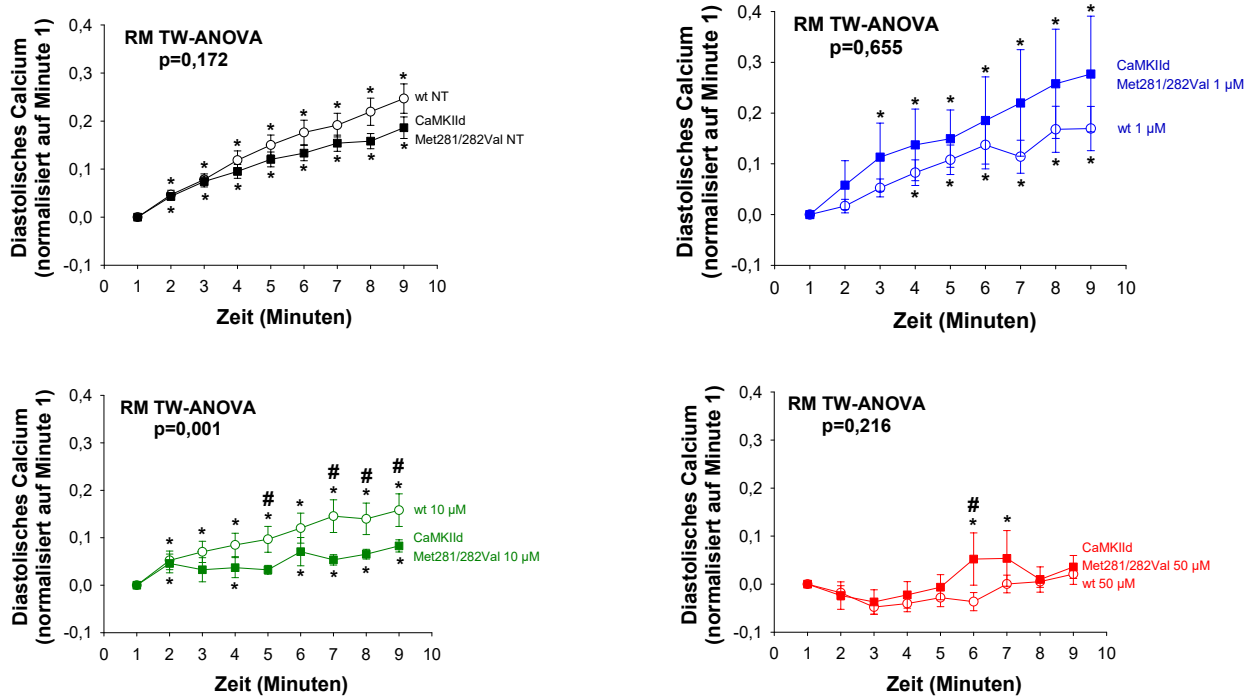


Abb. 16: Vergleich des normalisierten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen wildtyp (Kreise) und CaMKII δ Met281/282Val (Quadrate) Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate). (* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

In der gemeinsamen Darstellung der mit NT superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 16, links oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Anstieg über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikantes Ergebnis als Ausdruck des gleichartigen Verhaltens der diastolischen Ca^{2+} Fluoreszenz in beiden Gruppen ($p=0,172$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp und Ca

Ergebnisse

MKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 16, rechts oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein Anstieg der diastolischen Ca²⁺ Fluoreszenz über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (p=0,655).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 16, links unten) zeigt sich bei dem Kurvenverlauf der wildtyp und MMVV Zellen ein Anstieg. Im Vergleich zu den wildtyp Zellen steigt der Kurvenverlauf der CaMKII δ Met281/282Val Zellen allerdings signifikant weniger stark an. In der two-way ANOVA zeigt sich entsprechend ein signifikantes Ergebnis (p=0,001) als Ausdruck des stärkeren Anstiegs des diastolischen Ca²⁺ in der wildtyp Gruppe.

In der gemeinsamen Darstellung der mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 16, rechts oben) zeigt sich der Kurvenverlauf der wildtyp Zellen unverändert. Bei den CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigt sich der Kurvenverlauf zunächst trendhaft fallend, wobei die Werte der Minute sechs und sieben hier signifikant unterschiedlich im Relation zum Startpunkt sind. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (p=0,216).

3.2. Auswertung der Ca²⁺-Transientenamplitude unter dem Einfluss von Doxorubicin

Die „peak h“ repräsentiert die Ca²⁺ Transientenamplitude während der Systole. Der Einfluss von Doxorubicin wurde wieder anhand eines Titrationsprotokoll (NT, 1 µM, 10 µM, 50 µM) in den jeweiligen Genotypen (wildtyp vs. CaMKIIδ Met281/282Val) untersucht.

Wie dem Methodenteil zu entnehmen ist, wurden alle Zellen in Minute eins mit Normaltyrode superfundiert. In den folgenden Messreihen wurde bei den absoluten Werten diesbezüglich eine Diskrepanz der Ca²⁺ Transientenamplitude in der Minute eins detektiert. Um die qualitativen Effekte von Doxorubicin in den einzelnen Genotypen besser darzustellen, wurde die Ca²⁺ Transientenamplitude daher jeweils auf seinen Ausgangswert normalisiert.

Die Anzahl der gemessenen Zellen ist analog der oben aufgeführten Tabelle 24 unter dem Punkt 3.1. Auswertung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration.

Wie den nachfolgenden zwei Grafiken (Abb. 17) zu entnehmen ist, führt die Anwendung von Doxorubicin in seiner höchsten Konzentration von 50µM in wildtyp Zellen, sowie CaMKIIδ Met281/282Val Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Ca²⁺ Transientenamplitude im Vergleich zu den jeweils mit NT superfundierten Kontrollzellen.

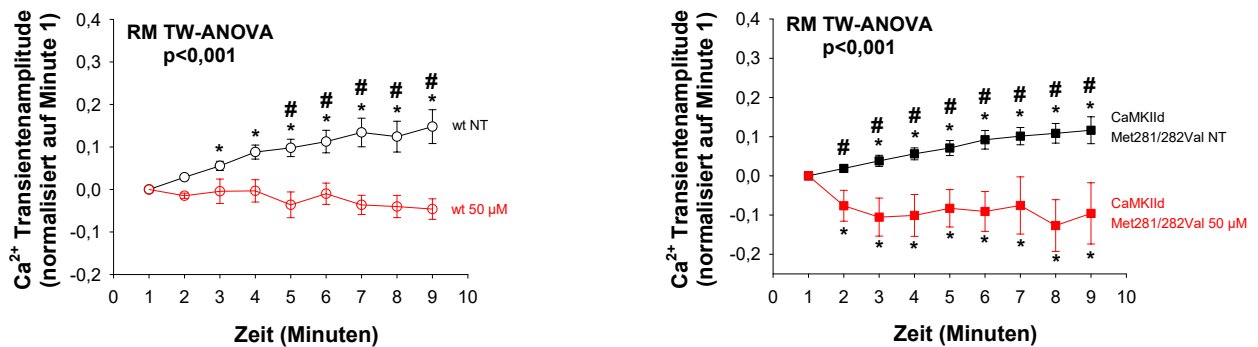


Abb. 17: Vergleich der normalisierten Ca²⁺ Transientenamplitude in wildtyp und CaMKIIδ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate) und Doxorubicin mit der Konzentration 50 µM (rote Kreise bzw. Quadrate).

(* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

Ergebnisse

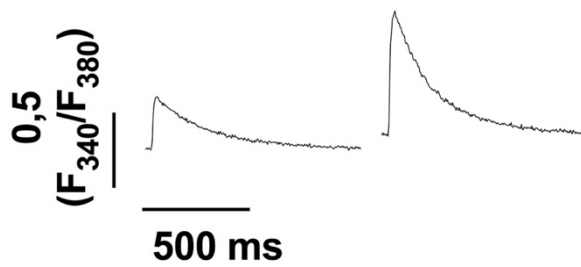


Abb. 18: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von NT.

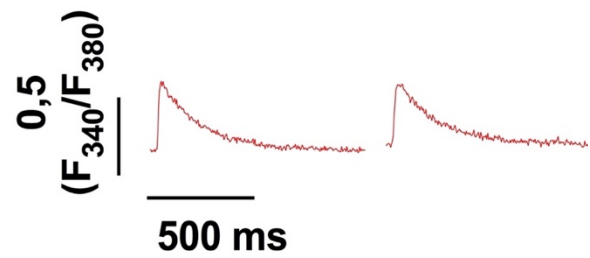


Abb. 19: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration 50 μM .

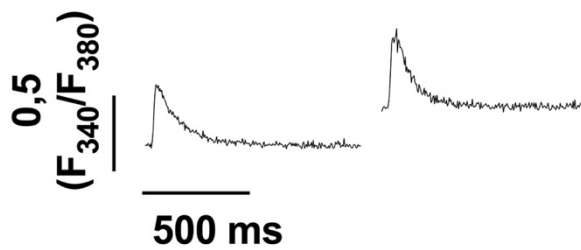


Abb. 20: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT.

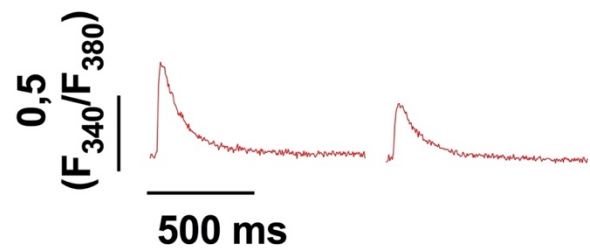


Abb. 21: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration 50 μM .

Ergebnisse

In der Abb. 22 ist die Ca^{2+} Transientenamplitude innerhalb der wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen unter allen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (d.h. NT, 1 μM , 10 μM , 50 μM) verglichen worden.

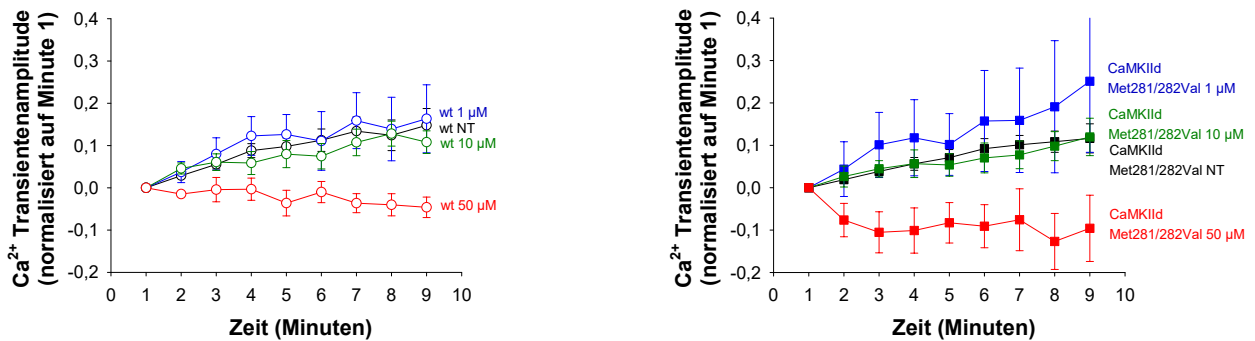


Abb. 22: Vergleich der normalisierten Ca^{2+} Transientenamplitude in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μM (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μM (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μM (rote Kreise bzw. Quadrate).

Die mit NT superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Zunahme der Ca^{2+} Transientenamplitude von + 41,80 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,35 a.u. \pm 0,04 a.u., Minute 9: 0,50 a.u. \pm 0,05 a.u.).

Die mit 1 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Zunahme der Ca^{2+} Transientenamplitude von + 32,89 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,50 a.u. \pm 0,09 a.u., Minute 9: 0,66 a.u. \pm 0,10 a.u.).

Die mit 10 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Zunahme der Ca^{2+} Transientenamplitude von + 48,09 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,23 a.u. \pm 0,03 a.u., Minute 9: 0,34 a.u. \pm 0,04 a.u.).

Die mit 50 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der Ca^{2+} Transientenamplitude von - 11,45 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,40 a.u. \pm 0,05 a.u., Minute 9: 0,36 a.u. \pm 0,04 a.u.).

Ergebnisse

Die mit NT superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Zunahme der Ca²⁺ Transientenamplitude von + 33,20 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,34 a.u. \pm 0,03 a.u., Minute 9: 0,46 a.u. \pm 0,05 a.u.).

Die mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Zunahme der Ca²⁺ Transientenamplitude von + 48,33 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,52 a.u. \pm 0,03 a.u., Minute 9: 0,77 a.u. \pm 0,19 a.u.).

Die mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Zunahme der Ca²⁺ Transientenamplitude von + 31,61 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,40 a.u. \pm 0,03 a.u., Minute 9: 0,53 a.u. \pm 0,05 a.u.).

Die mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der Ca²⁺ Transientenamplitude von – 49,69 % über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: 0,38 a.u. \pm 0,09 a.u., Minute 9: 0,19 a.u. \pm 0,05 a.u.).

Ergebnisse

Nachfolgend (Abb. 23) findet sich eine direkte Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transientenamplitude der Genotypen (wildtyp, CaMKII δ Met281/282Val) bei den jeweiligen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (NT, 1 μM , 10 μM , 50 μM).

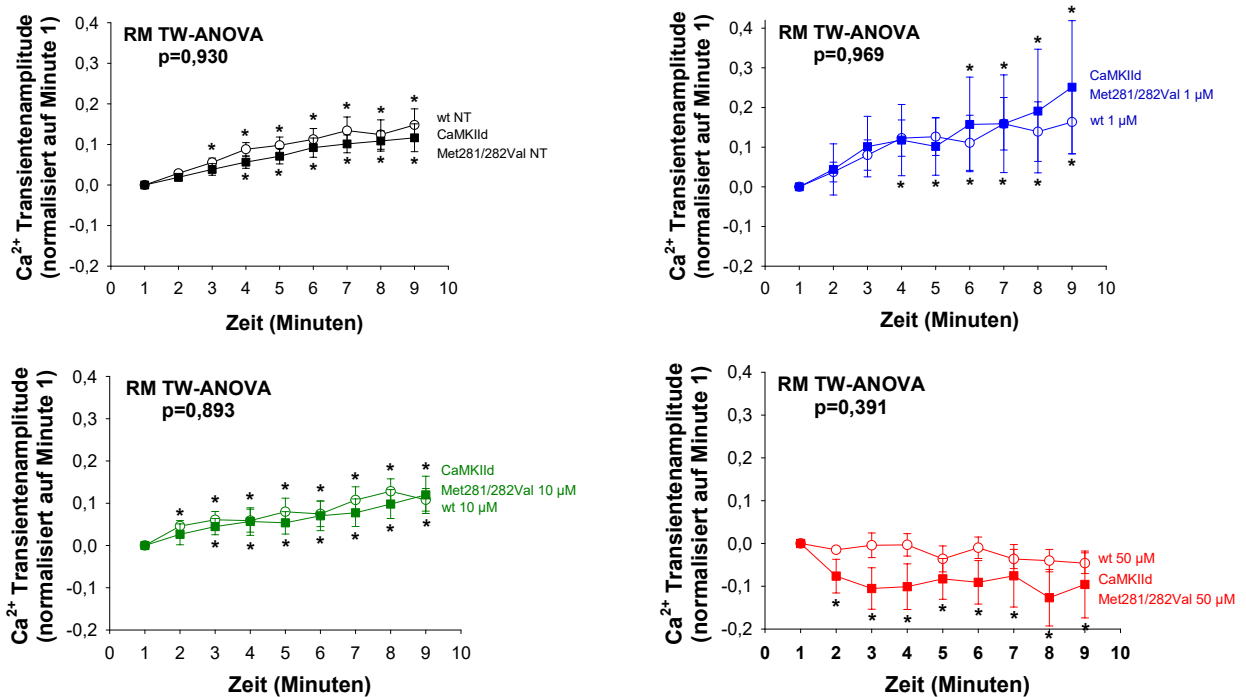


Abb. 23: Vergleich der normalisierten Ca^{2+} Transientenamplitude zwischen wildtyp (Kreise) und CaMKII δ Met281/282Val (Quadrate) Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μM (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μM (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μM (rote Kreise bzw. Quadrate).

(* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

In der gemeinsamen Darstellung der mit NT superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 23, links oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein Anstieg über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (p=0,930).

Ergebnisse

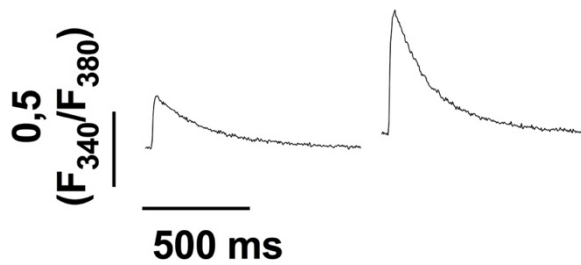


Abb. 24: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von NT.

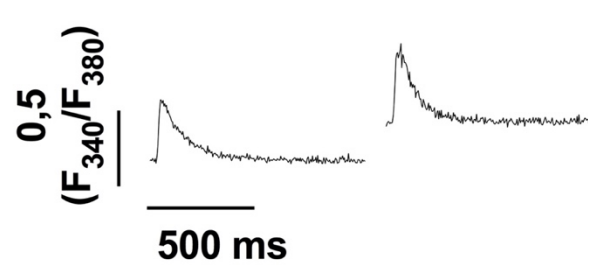


Abb. 25: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT.

In der gemeinsamen Darstellung der mit $1 \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten wildtyp und $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Zellen (Abb. 23, rechts oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Anstieg über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,969$).

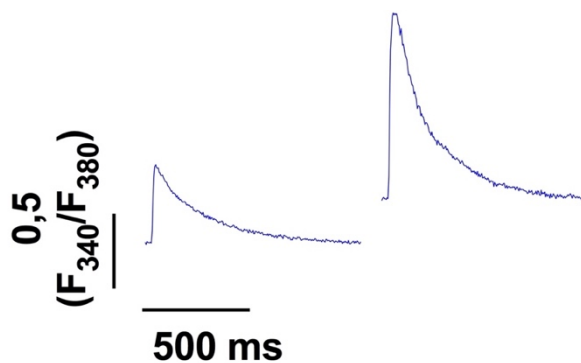


Abb. 26: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $1 \mu\text{M}$.

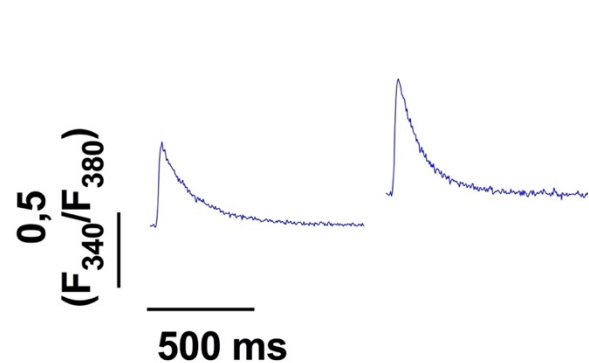


Abb. 27: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $1 \mu\text{M}$.

In der gemeinsamen Darstellung der mit $10 \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten wildtyp und $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Zellen (Abb. 23, links unten) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Anstieg über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,893$).

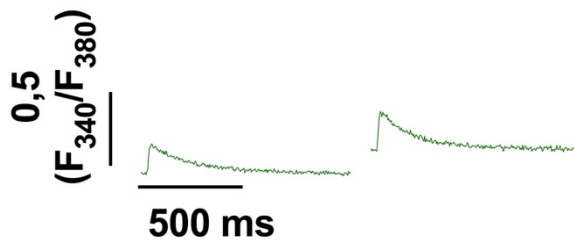


Abb. 28: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $10 \mu\text{M}$.

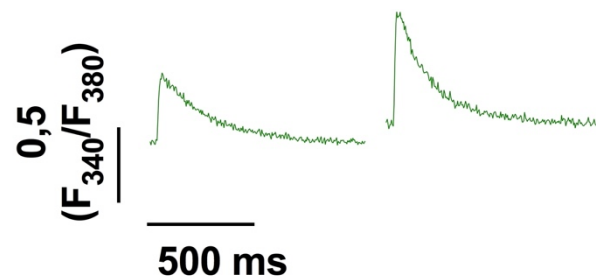


Abb. 29: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $10 \mu\text{M}$.

In der gemeinsamen Darstellung der mit $50 \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten wildtyp und $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Zellen (Abb. 23, rechts unten) zeigt sich der Kurvenverlauf der Zelllinien fallend. Im Gegensatz zu den wildtyp Zellen zeigen die $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Zellen eine signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt. In der two-way ANOVA zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,391$).

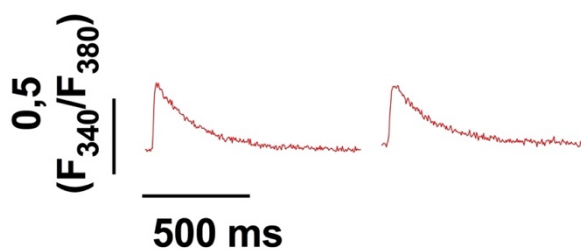


Abb. 30: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $50 \mu\text{M}$.

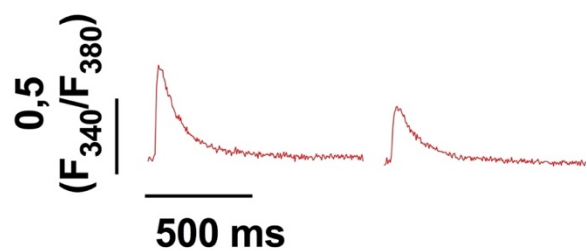


Abb. 31: Gegenüberstellung der Ca^{2+} Transienten bei Minute 1 und 9 bei $\text{CaMKII}\delta$ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von Doxorubicin mit der Konzentration $50 \mu\text{M}$.

3.3. Auswertung der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes

Die „RT80“ erlaubt Rückschlüsse auf die Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes. Der Einfluss von Doxorubicin wurde anhand eines Titrationsprotokoll (NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) in den jeweiligen Genotypen (wildtyp vs. CaMKII δ Met281/282Val) untersucht.

Wie dem Methodenteil zu entnehmen ist, wurden alle Zellen in Minute eins mit Normaltyrode superfundiert. In den folgenden Messreihen wurde bei den absoluten Werten diesbezüglich eine Diskrepanz der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes in der Minute eins detektiert. Um die qualitativen Effekte von Doxorubicin in den einzelnen Genotypen besser darzustellen, wurde die Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes daher jeweils auf seinen Ausgangswert normalisiert.

Die Anzahl der gemessenen Zellen ist analog der oben aufgeführten Tabelle 24 unter dem Punkt 3.1. Auswertung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration.

Ergebnisse

Wie den nachfolgenden zwei Grafiken (Abb. 32) zu entnehmen ist, führt die Anwendung von Doxorubicin in wildtyp Zellen, jedoch nicht bei CaMKII δ Met281/282Val Zellen zu einer signifikanten Änderung der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes im Vergleich zu den jeweils mit NT superfundierten Kontrollzellen, die eine signifikante Beschleunigung der Relaxationsgeschwindigkeit im Verlauf des Versuches zeigen. Diese Beschleunigung unter Kontrollbedingungen ist unter Doxorubicin in wildtyp Zellen entsprechend nicht vorhanden.

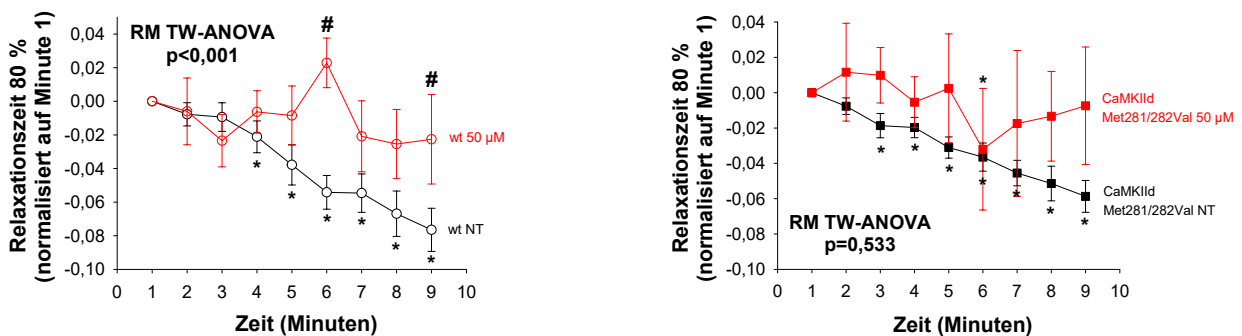


Abb. 32: Vergleich der normalisierten Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate) und Doxorubicin mit der Konzentration 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate).

(* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

Ergebnisse

In der Abb. 33 ist die Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes innerhalb der wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen unter den verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (d.h. NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) verglichen worden.

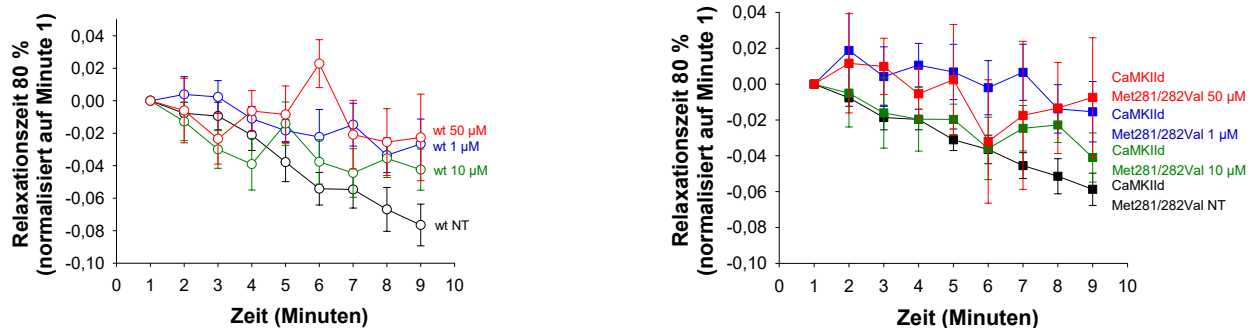


Abb. 33: Vergleich der normalisierten Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate).

Die mit NT superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-25,37\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,30\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,23\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$). Zu erwähnen sei hier, dass die Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes eine Leistungszunahme im Sinne einer schnelleren Calciumelimination aus dem Zytosol bedeutet.

Die mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-8,62\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,31\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$, Minute 9: $0,28\text{ s} \pm 0,04\text{ s}$).

Die mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-16,50\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,29\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,24\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$).

Die mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-7,36\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,31\text{ s} \pm 0,04\text{ s}$, Minute 9: $0,28\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$).

Ergebnisse

Die mit NT superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-11,47\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,30\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$, Minute 9: $0,26\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$).

Die mit $1\ \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-8,51\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,18\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,17\text{ s} \pm 0,01\text{ s}$).

Die mit $10\ \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $-14,68\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,30\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,25\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$).

Die mit $50\ \mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Zunahme der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes von $+17,95\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,32\text{ s} \pm 0,06\text{ s}$, Minute 9: $0,38\text{ s} \pm 0,05\text{ s}$).

Ergebnisse

Nachfolgend (Abb. 34) findet sich eine direkte Gegenüberstellung der Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes der Genotypen (wildtyp vs. CaMKII δ Met281/282Val) bei den jeweiligen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M).

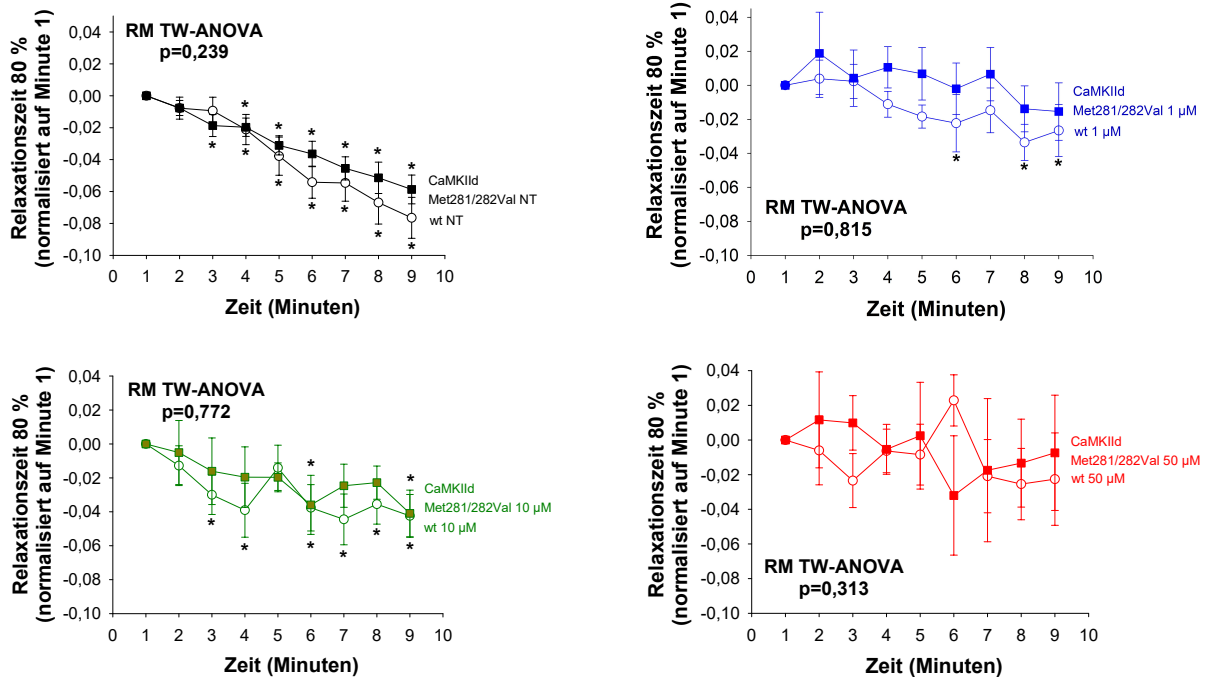


Abb. 34: Vergleich der normalisierten Zeit bis zur Transientenabnahme um 80% des Ausgangswertes in wildtyp (Kreise) und CaMKII δ Met281/282Val (Quadrate) Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate).

(* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

In der gemeinsamen Darstellung der mit NT superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 34, links oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,239$).

Ergebnisse

In der gemeinsamen Darstellung der mit 1 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 34, rechts oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,815$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 10 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 34, links unten) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein kontinuierlicher Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,772$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 50 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 34, rechts unten) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen keine Veränderung über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,313$).

3.4. Auswertung der vollständigen Relaxationszeit (τ)

Die τ erlaubt Rückschlüsse auf die vollständige Relaxationszeit, also die Zeit, die benötigt wird, um den diastolischen Calciumgehalt im Zytosol $[Ca^{2+}]_i$ zu erreichen. Der Einfluss von Doxorubicin wurde anhand eines Titrationsprotokoll (NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) in den jeweiligen Genotypen (wildtyp vs. CaMKII δ Met281/282Val) untersucht.

Wie dem Methodenteil zu entnehmen ist, wurden alle Zellen in Minute eins mit Normaltyrode superfundiert. In den folgenden Messreihen wurde bei den absoluten Werten diesbezüglich eine Diskrepanz der vollständigen Relaxationszeit τ in der Minute eins detektiert. Um die qualitativen Effekte von Doxorubicin in den einzelnen Genotypen besser darzustellen, wurde die Relaxationszeit τ daher jeweils auf seinen Ausgangswert normalisiert.

Die Anzahl der gemessenen Zellen ist analog der oben aufgeführten Tabelle 24 unter dem Punkt 3.1. Auswertung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration.

Ergebnisse

Wie den nachfolgenden zwei Grafiken (Abb. 35) zu entnehmen ist, führt die Anwendung von Doxorubicin in wildtyp Zellen, sowie CaMKII δ Met281/282Val Zellen zu keiner signifikanten Änderung der vollständigen Relaxationszeit τ im Vergleich zu den jeweils mit NT superfundierten Kontrollzellen.

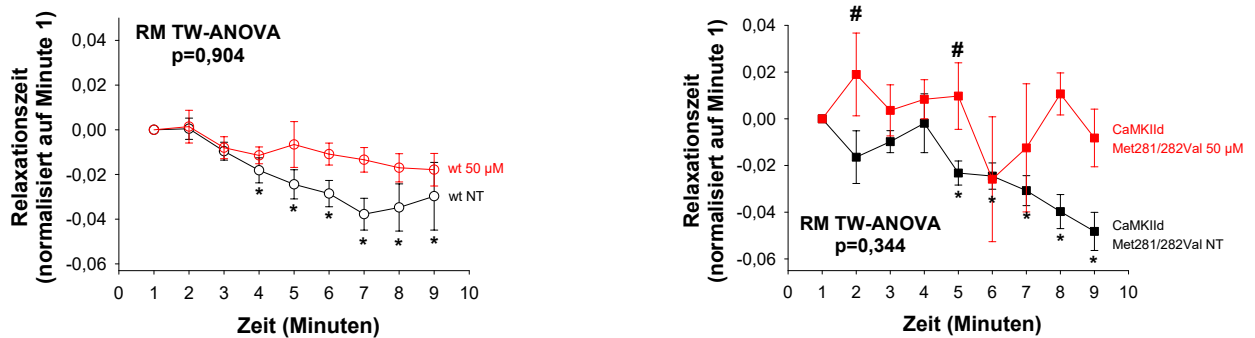


Abb. 35: Vergleich der normalisierten vollständigen Relaxationszeit τ in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate) und Doxorubicin mit der Konzentration 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate). (* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

Ergebnisse

In der Abb. 36 ist die vollständige Relaxationszeit τ der wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen unter allen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (d.h. NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) verglichen worden.

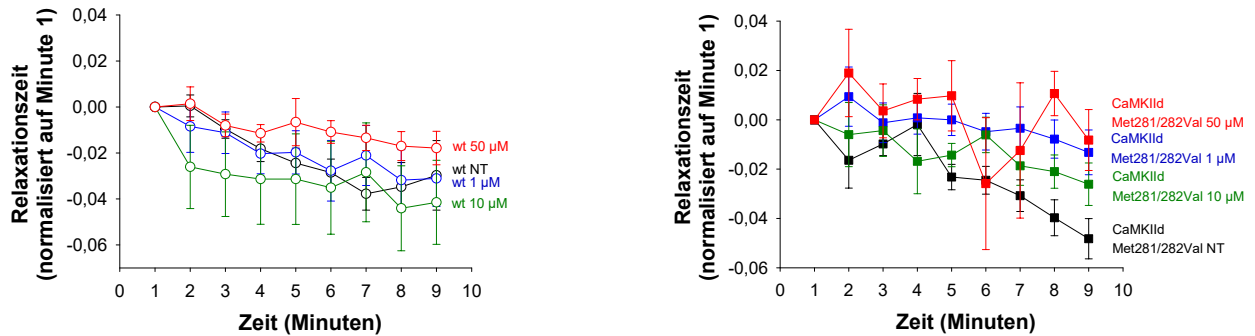


Abb. 36: Vergleich der normalisierten vollständigen Relaxationszeit τ in wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate).

Die mit NT superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-15,47\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,19\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,16\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$). Zu erwähnen sei hier, dass die Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ eine Leistungszunahme im Sinne einer schnelleren Calciumumverteilung bedeutet.

Die mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-15,10\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,21\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$, Minute 9: $0,18\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$).

Die mit 10 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-22,39\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,20\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,15\text{ s} \pm 0,01\text{ s}$).

Die mit 50 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-9,1\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,20\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,18\text{ s} \pm 0,01\text{ s}$).

Ergebnisse

Die mit NT superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-14,99\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,20\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$, Minute 9: $0,17\text{ s} \pm 0,03\text{ s}$).

Die mit $1\text{ }\mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-11,46\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,12\text{ s} \pm 0,01\text{ s}$, Minute 9: $0,10\text{ s} \pm 0,003\text{ s}$).

Die mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Abnahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $-14,92\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,19\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$, Minute 9: $0,16\text{ s} \pm 0,02\text{ s}$).

Die mit $50\text{ }\mu\text{M}$ Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten eine Zunahme der vollständigen Relaxationszeit τ von $+21,60\%$ über den zeitlichen Verlauf von neun Minuten (Minute 1: $0,22\text{ s} \pm 0,05\text{ s}$, Minute 9: $0,27\text{ s} \pm 0,06\text{ s}$). Es zeigt sich ein Tiefpunkt bei Minute 6 ($0,20\text{ s} \pm 0,05\text{ s}$, $-11,58\%$). Auch hier gilt zu beachten, dass durch das Wegfallen von Zellen ab Minute 7 sich die Zunahme der vollständigen Relaxationszeit wie oben beschrieben in der pseudonormalisierten Darstellung nicht korrekt darstellt.

Ergebnisse

Nachfolgend (Abb. 37) findet sich eine direkte Gegenüberstellung der vollständigen Relaxationszeit τ der Genotypen (wildtyp, CaMKII δ Met281/282Val) bei den jeweiligen verwendeten Doxorubicinkonzentrationen (NT, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M).

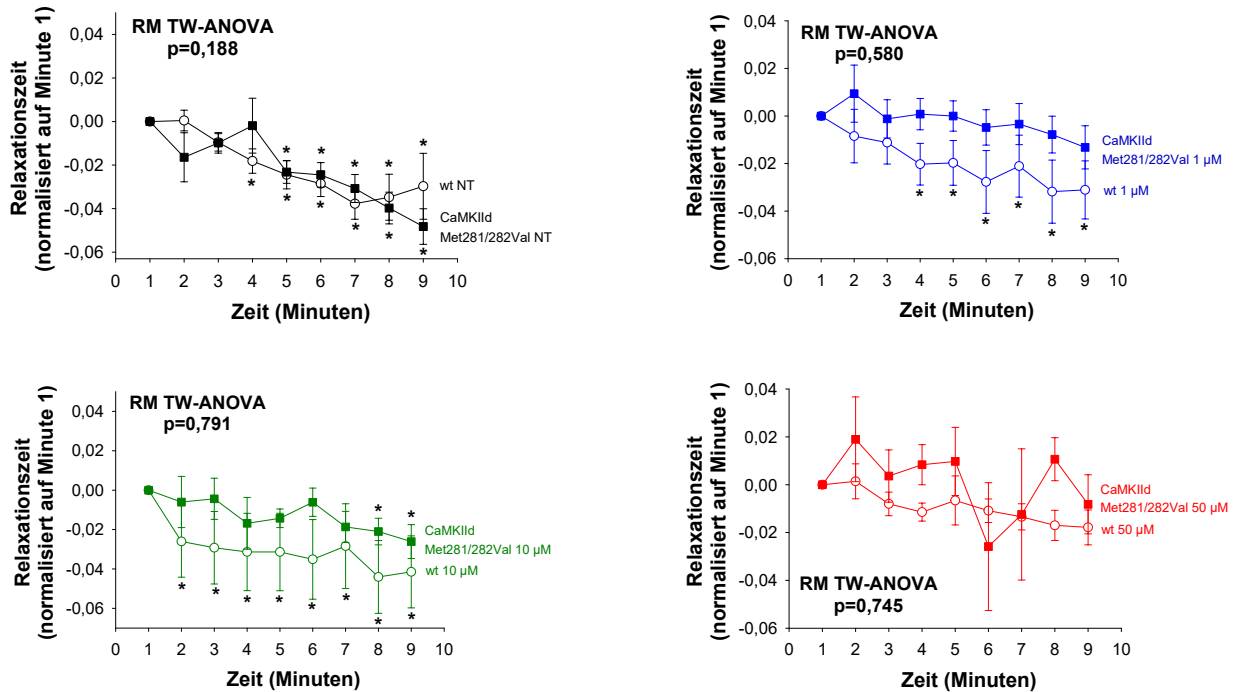


Abb. 37: Vergleich der normalisierten vollständigen Relaxationszeit τ in wildtyp (Kreise) und CaMKII δ Met281/282Val (Quadrate) Kardiomyozyten mit Superfusion von NT (schwarze Kreise bzw. Quadrate), Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M (blaue Kreise bzw. Quadrate), 10 μ M (grüne Kreise bzw. Quadrate) und 50 μ M (rote Kreise bzw. Quadrate). (* entspricht einer signifikanten Änderung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Startpunkt, # entspricht einem signifikanten Unterschied zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den Gruppen, two-way ANOVA mit post-hoc Test Fisher's LSD)

In der gemeinsamen Darstellung der mit NT superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 37, links oben) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,188$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 1 μ M Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 37, rechts oben) zeigt sich bei beiden

Ergebnisse

Kurvenverläufen ein Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,580$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 10 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 37, links unten) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein Abfall über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,791$).

In der gemeinsamen Darstellung der mit 50 μM Doxorubicin superfundierten wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (Abb. 37, rechts unten) zeigt sich bei beiden Kurvenverläufen ein unveränderter Verlauf über die Messperiode von neun Minuten. In der two-way ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p=0,745$).

3.5. Auswertung der Caffeinmessungen

Am Ende der Messperiode (Messreihen NT, 1 μ M, 10 μ M) wurde durch Caffeinzugabe der Calciumgehalt des SR bestimmt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Anzahl der gemessenen Caffeinmessungen pro Genotyp und Dosis.

Tabelle 25: Anzahl der gemessenen Caffeinmessungen pro Genotyp und Dosis.

	NT	1 μ M	10 μ M
wt	19	10	9
CaMKII δ Met281/282Val	15	5	13

Ergebnisse

Bei den Wildtypzellen kam es durch die Dosissteigerung auf 10 μM Doxorubicin zu einer Abnahme des Calciumspeichers. Bei den wildtyp Zellen, welche mit NT superfundiert wurden, zeigte sich ein Mittelwert von $1,08 \text{ a.u.} \pm 0,10 \text{ a.u.}$. Bei der niedrigsten Doxorubicinkonzentration von 1 μM zeigte sich im Vergleich zu den nicht mit Doxorubicin superfundierten Zellen eine Zunahme des Mittelwertes um + 9,37 % auf $1,18 \text{ a.u.} \pm 0,12 \text{ a.u.}$. Die Dosissteigerung auf 10 μM Doxorubicin führte zu einem Absinken der Werte auf $0,8 \text{ a.u.} \pm 0,05 \text{ a.u.}$, was einen Abfall um - 26,3 % entspricht. Der one-way ANOVA für wiederholte Messungen zeigt hier keinen signifikanten Unterschied ($p=0,192$).

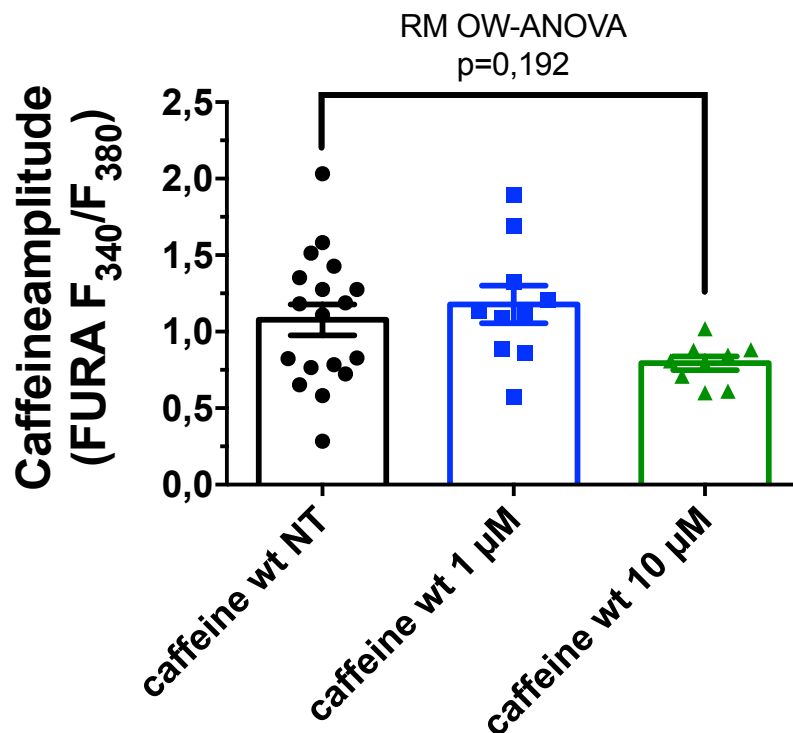


Abb. 38: Vergleich der Caffeinmessung bei wildtyp Kardiomyozyten mit Superfusion von NT, Doxorubicin mit der Konzentration 1 μM und 10 μM .

Ergebnisse

Aus den Messwerten der CaMKII δ Met281/282Val Zellen, welche mit NT superfundiert wurden, lies sich ein Mittelwert von 0,95 a.u. \pm 0,09 a.u. berechnen. Die Messergebnisse der 1 μ M Doxorubicin CaMKII δ Met281/282Val Gruppe, lagen mit 0,10 a.u. \pm 0,11 a.u. um + 5,17 % darüber. Das Maximum repräsentierten in der nachfolgenden Übersicht die 10 μ M Doxorubicin superfundierten CaMKII δ Met281/282Val Zellen, hier entsprach der Zuwachs im Vergleich zur Kontrollgruppe (CaMKII δ Met281/282Val NT) + 14,17 % (1,08 a.u. \pm 0,09 a.u.).

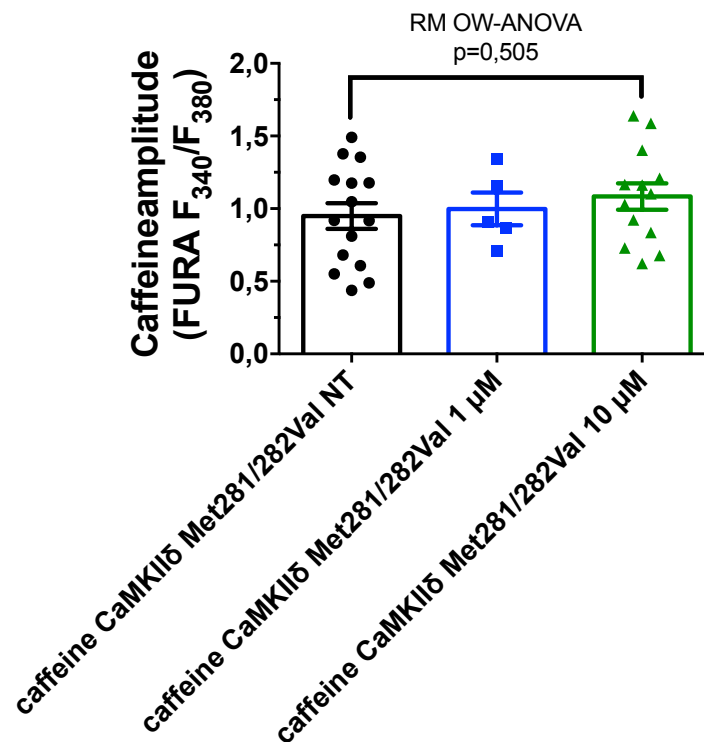


Abb. 39: Vergleich der Caffeinmessung bei CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von NT, Doxorubicin mit der Konzentration 1 μ M und 10 μ M.

Ergebnisse

Vergleicht man den Calciumgehalt im SR zwischen den beiden Genotypen, sowie zwischen Normaltyrode und einer Doxorubicinkonzentration von 10 μM , so lässt sich in den jeweiligen Gruppen kaum ein Unterschied darstellen. Im one-way ANOVA für wiederholte Messungen findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen wildtyp 10 μM Doxorubicin und CaMKII δ Met281/282Val 10 μM Doxorubicin ($p=0,004$).

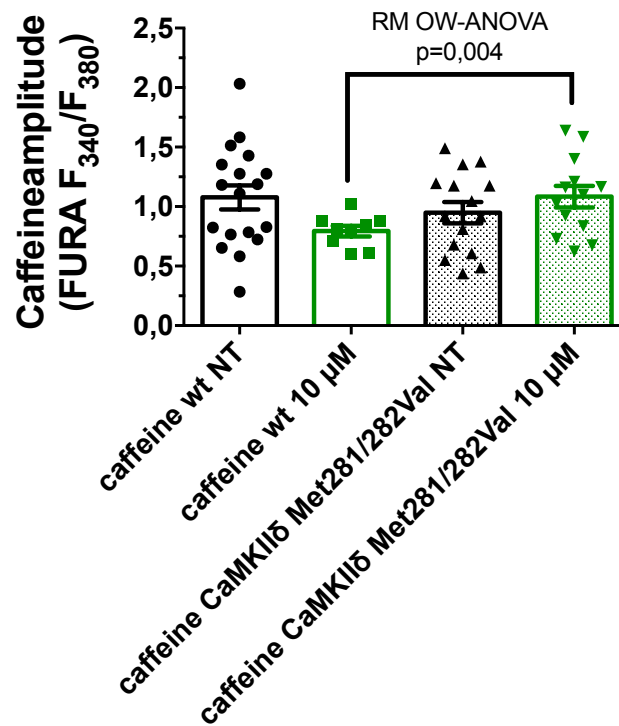


Abb. 40: Gegenüberstellung der Caffeinmessung bei wildtyp und CaMKII δ Met281/282Val Kardiomyozyten mit Superfusion von Normaltyrode bzw. Doxorubicin mit der Konzentration 10 μM .

4. Diskussion

4.1. Zusammenhang von CaMKII und Doxorubicin-bedingter Kardiomyopathie

4.1.1. Rolle der CaMKII bei Herzinsuffizienz im Vergleich zu anderen Proteinen

Seit nun mehr als 20 Jahren rückt die CaMKII in den Mittelpunkt als pathophysiologischer Faktor bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isoformen (CaMKII_{δ3} und CaMKII_{δC}) bei einer Herzinsuffizienz quantitativ erhöht nachzuweisen sind (67,68). Auch die Funktion der aktivierten CaMKII scheint kausal für die Herzinsuffizienzentstehung zu sein, da hierdurch die RyR verstärkt phosphoryliert wird, was zu einem sog. SR Ca²⁺ Leck beitragen kann (69), dass zu einer Entleerung des SR Calciumspeichers führt. Interessanterweise gibt es auch noch eine weitere Stresskinase, die sog. Proteinkinase A (PKA), welche die RyR auf gleiche Weise verändern kann. Durch Inhibitionsexperimente der einzelnen Proteine im insuffizienten Myokard konnte jedoch bewiesen werden, dass der Einfluss der CaMKII für das pathologische SR Ca²⁺ Leck vergleichsweise größer ist (70–72). Des Weiteren fand sich keine verstärkte Aktivität der PKA in herzinsuffizienten, humanen Myokardzellen (116), was die pathophysiologische Bedeutung der CaMKII bei Herzinsuffizienz unterstreicht.

4.1.2. Akute Veränderungen der CaMKII durch Doxorubicin

Die verstärkte Aktivierung der CaMKII durch Oxidation fand sich in der Literatur gehäuft im Kontext von Beckendorf J et al., Mattiazzi A. et al., Erickson JR et al. (40,44,45). Jedoch konnte beispielsweise Sag et al. die oxidative Veränderung des Proteins nach akuter Exposition isolierter Rattenkardiomyozyten mit Doxorubicin nicht als signifikant erhöht nachweisen (7). Dennoch zeigte sich die CaMKII-Aktivität durch Phosphorylierung erhöht, sodass die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ein zentraler Faktor für die Doxorubicin-bedingte kardiozelluläre Dysfunktion darzustellen scheint (mutmaßlich durch ein CaMKII-bedingt erhöhtes SR Ca²⁺ Leck).

4.1.3. Funktionelle Bedeutung der oxidativ aktivierten CaMKII bei akuter Doxorubicin-Exposition

Einer der zentralen Befunde meiner Dissertation ist, dass sich unter 10 µM Doxorubicin ein im Vergleich zu wildtyp Zellen höherer SR Ca²⁺ Gehalt in den CaMKII_δ Met281/282Val Zellen zeigte (vgl. Abb 40). Zudem fand sich eine numerische, jedoch nicht signifikante Abnahme des SR Ca²⁺ Gehalt unter 10 µM Doxorubicin in wt Zellen. Dies legt nahe, dass die

oxidativ aktivierte CaMKII an der Doxorubicin-bedingten Reduktion des SR Ca^{2+} Speichers, wie von Köhler et al. gezeigt, beteiligt sein könnte.

Prinzipiell kann es zu einer Reduktion des SR Ca^{2+} -Gehaltes durch einen verstärkten diastolischen Calciumverlust aus dem SR (d.h. durch das sog. SR Ca^{2+} Leck) oder durch eine eingeschränkte diastolische Ca^{2+} Wiederaufnahme in das SR kommen. Auch diesbezüglich geben die funktionellen Befunde meiner Dissertationsschrift erste Hinweise. So zeigt sich zum einen, dass es unter 10 μM Doxorubicin in wildtyp Zellen zu einer signifikanten diastolischen Ca^{2+} Überladung im Vergleich zu CaMKII δ Met281/282Val Zellen kommt, was gut mit dem entleerten SR Ca^{2+} Gehalt in wildtyp Zellen korreliert. Zum anderen fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Relaxationsparameter RT80 und tau, die in der Maus als Maß der SR Ca^{2+} Wiederaufnahme betrachtet werden können. Dies wiederum weist darauf hin, dass ein erhöhter diastolischer Ca^{2+} Verlust aus dem SR, das sog. Ca^{2+} Leck wahrscheinlich ursächlich für die Entleerung des SR sein sollte.

Eine Messung des SR Ca^{2+} Leck unter Doxorubicin (d.h. mittels konfokaler Lasermikroskopie) wurde gleichzeitig in der Dissertationsschrift von Frau Anna-Lena Feder durchgeführt und zeigt in noch unveröffentlichten Vorbefunden ein abgeschwächtes SR Ca^{2+} Leck in CaMKII δ Met281/282Val Zellen unter akuter Doxorubicin-Exposition, was die funktionellen Befunde meiner Arbeit stützt.

4.2. Vergleich der unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen

Zunächst wurde beabsichtigt, eine pathophysiologisch repräsentative Doxorubicinkonzentration zu finden. Obwohl Timolati et al. zeigen konnte, dass späte klinische Komplikationen im Sinne einer Herzinsuffizienz am ehesten durch eine Messkonzentration von 10 μM repräsentiert werden, wurde dennoch zunächst mit einer Doxorubicindosis von 1 μM begonnen (92). Für diese schrittweise Herangehensweise sprachen im Wesentlichen zwei Gründe. Zum einen wurden bei Sag et al. (7) neben Mäusen auch Ratten als Tiermodell benutzt, die erfahrungsgemäß im Vergleich widerstandsfähiger sind. Zum anderen zeigten laborinterne Messungen, dass Mäuse mit anderem genetischem Hintergrund nicht die komplette Superfusionszeit mit Doxorubicin überstanden haben. Diese Bedenken behaupteten sich jedoch nicht. Nach zeitnaher Auswertung der Messungen wurde dann auf die a.e. klinisch relevante Konzentration nach Timolati et al. von 10 μM erhöht. Um auch maximale pathophysiologische Vorgänge zu zeigen, wurde im letzten Schritt auf 50 μM Doxorubicin erhöht, worunter sich dann im zeitlichen Verlauf abfallende Calcium Transientenamplituden zeigten (s. Abb. 22).

4.3. Messergebnisse im Kontext mit anderen Publikationen

4.3.1. Diastolische Ca^{2+} -Konzentration

Recherchiert man Messergebnisse anderer Publikationen wie beispielsweise von Sag et al., so würde man nach Doxorubicin-Exposition eine Calciumüberladung im Zytosol und somit auch in der Diastole erwarten (7). Diese ist zum einen durch die Verminderung des SR [Ca^{2+}] Gehalts aufgrund des Calciumlecks im Sarkoplasmatischen Retikulum bedingt (7,68), zum anderen wird in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienzentstehung auch eine Abnahme der SERCA2a-Expression beschrieben, welche als Folge die verminderte Ca^{2+} Aufnahme ins SR hat (58). Diese Prozesse sollten durch die oxidativ aktivierte CaMKII, die eine Aktivitätssteigerung der RyR bedingt, getriggert bzw. verstärkt sein (40,44,45). Auch wurde von einer phosphorylierten (und somit phospho-aktivierten) Form der CaMKII δ berichtet, welche jedoch die gleichen funktionellen Auswirkungen auf die Proteinfunktion hätte (7). Die in dieser Forschungsarbeit aufgezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der oxidativ aktivierten CaMKII δ eine relevante Rolle für die diastolische Calciumüberladung zukommen könnte, da sich bei einer Konzentration von 10 μM Doxorubicin ein über den Zeitraum von 9 Minuten schwächerer Anstieg des diastolischen Calciums im Zytosol zeigte, was im two-way ANOVA für wiederholte Messungen statistische Signifikanz erreichte. Korrelierend hierzu fand sich unter 10 μM Doxorubicin ein erniedrigter SR Calciumgehalt auch nur in den wt Zellen, während CaMKII δ Met281/282Val Zellen von einer signifikanten Abnahme des SR Ca^{2+} Gehalts unter 10 μM Doxorubicin geschützt waren (und somit einen signifikant höheren SR Ca^{2+} Gehalt als die mit Doxorubicin behandelten wt Zellen aufwiesen).

4.3.2. Ca^{2+} -Transientenamplitude

In Rattenmyokardzellen wurde durch Sag et al. eine Abnahme der Ca^{2+} -Transientenamplitude beschrieben (7), was durch das Doxorubicin-bedingte und CaMKII-abhängig verstärkte SR Calciumleck bedingt war. Aus physiologischer Sicht zeigt sich interessanterweise aber auch eine CaMKII-abhängige Erhöhung des I_{Ca} (36,43), was wiederum zu einer Verstärkung des systolischen Calciumtransienten führen könnte. Interessanterweise wurde sowohl bei den wildtyp, als auch bei den CaMKII δ Met281/282Val Zellen ausschließlich bei einer Doxorubicindosis von 50 μM eine Abnahme der Ca^{2+} -Transientenamplitude (also der peak h) beobachtet, wie man sie gemäß der Vorpublikationen erwarten würde. Letztlich war diese im Vergleich zu wildtyp Zellen bei CaMKII δ Met281/282Val Zellen numerisch stärker ausgeprägt (- 11,45 % vs. - 49,69 %), wobei im two-way ANOVA für wiederholte

Messungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden konnte.

In den Messreihen mit geringerer Doxorubicin-Konzentration fand ich keine Reduktion der Calciumtransientenamplitude, sondern eine ggf. CaMKII-abhängige und I_{Ca} -vermittelte erhöhte Amplitude. Da Messungen des I_{Ca} nicht Teil der Dissertation waren, muss diese Hypothese hier unbeantwortet werden. Zudem kommt hierbei die Frage auf, ob die Dosen von 1 μ M und 10 μ M zu gering gewählt sind um pathologische Ergebnisse zu erzielen. Nachdem bereits Timolati et al. eine 10 μ M Doxorubicindosis als repräsentativ für die klinischen Komplikationen fest machen konnten, scheint eher die Messdauer von 9 Minuten zu kurz zu sein, um eine Reduktion der Calciumtransientenamplitude fassen zu können. Durch die Erhöhung der Dosis auf 50 μ M konnte hier der beschriebene Schädigungsmechanismus nachgewiesen werden, womöglich bei gleichzeitiger Einsparung der Messdauer. Durch weitere Messungen mit 10 μ M Doxorubicin bei einer verlängerten Messdauer, könnte die Annahme von Timotali et al. bestätigt werden. Dies war aber nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

4.3.3. Calcium Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum

Die erhobenen Befunde zur Relaxationszeit (also zur RT 80% wie auch zu τ) zeigten ebenfalls nur im Falle einer hohen Doxorubicinkonzentration von 50 μ M eine signifikante Abnahme der RT 80% in wt Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. In CaMKII δ Met281/282Val Zellen war diese Abnahme numerisch vorhanden, erreichte im two-way ANOVA für wiederholte Messungen im Vergleich zu unbehandelten CaMKII δ Met281/282Val Zellen jedoch keine Signifikanz. Im Vergleich beider Genotypen fand sich kein Unterschied zwischen wt und CaMKII δ Met281/282Val Zellen (weder für RT 80% noch für τ) was darauf hindeutet, dass die oxidativ aktivierte CaMKII δ für die diastolische Dysfunktion, wie sie unter Doxorubicin-Exposition auftritt, irrelevant ist.

4.3.4. Caffeinmessungen

Mittels Caffeinmessungen sollte überprüft werden, ob sich wie bereits publiziert, ein Doxorubicin-abhängiges SR Leck findet (7,36,68). Bei der Messung mit 10 μ M Doxorubicin in wildtyp Zellen zeigte sich kein signifikant verminderter Calciumgehalt gegenüber unbehandelten wt Kontrollzellen. Auch in den CaMKII δ Met281/282Val Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Doxorubicin behandelten Zellen (10 μ M

Doxorubicin) und unbehandelten CaMKII δ Met281/282Val Kontrollzellen. Die mit Doxorubicin-behandelten CaMKII δ Met281/282Val Zellen zeigten einen größeren SR Calciumgehalt als die mit Doxorubicin-behandelten wt Zellen, was darauf hindeutet, dass der oxidativ aktivierten CaMKII δ eine relevante Rolle für das SR Calciumleck zukommen muss, da die Relaxationsparameter als Ausdruck der SR Calciumaufnahme ja unverändert waren.

4.3.5. Zusammenfassender Vergleich

Betrachtet man die Messvariablen im Gesamtkontext, so lässt sich erkennen, dass sich bei den niedrigen Dosen (1 μ M und 10 μ M Doxorubicin) die bereits publizierten negativen Auswirkungen auf die Calciumhomöostase nicht nachweisen ließen. Timolati et al. erkannten in ihrer Vorarbeit aus dem Jahre 2006, in dem sie Zellen mit 1 μ M Doxorubicin inkubierten, dass diese niedrige Doxorubicin-Konzentration eine vermeintlich paradoxe positive Inotropie hervorgerufen hatte (92). Da die klinisch kardiotoxischen Wirkungen von Doxorubicin jedoch außer Frage gestellt werden können, könnte dieser überraschende experimentelle Befund a.e. auf die kurze Messdauer bzw. eine zu niedrige Doxorubicin-Konzentration zurückzuführen sein, da Doxorubicin im Falle kurzer und niedriger Exposition (und entsprechend niedriger ROS-Konzentrationen) eher zu einer Aktivierung des Calciumstoffwechsels führen kann, wie das auch im Falle ionisierender Strahlung beobachtet wurde (117). Meinen Daten zufolge eignen sich also eher höhere Doxorubicinkonzentrationen (wie z.B. 50 μ M), um die pathophysiologischen Wirkungen von Doxorubicin in der Herzmuskelzelle der Maus zu erforschen.

4.4. Bewertung der unterschiedlichen absoluten Messwerte zum Beginn einer Messung

Die sich in den Graphen darstellenden unterschiedlichen Messwerte zu Beginn einer Messung (d.h. bei der ersten Minute (baseline, peak h, RT80, tau)) lassen sich zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend erklären. Erwartungsgemäß sollte sich hier ein fast identischer Messwert für o.g. Parameter zum Beginn einer Messung finden, da gemäß den Messprotokoll die Kardiomyozyten in der ersten Minute immer mit NT superfundiert wurden.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Superfusion in der ersten Minute durch noch vorhandene Reste von Doxorubicin zu einem anderen Messergebnis führt. Jedoch wurde darauf geachtet, dass nach jeder Messung das Schlauchsystem ausreichend mit NT durchgespült wurde.

Betrachtet man auch die Unterschiedliche Anzahl der gemessenen Zellen, so könnte auch denkbar sein, dass sich die Startpunkte zu einem gemeinsamen Wert mitteln, sobald die Stichprobengröße ein vielfaches ist.

4.5. Das Mausmodell als Äquivalent zu humanen Kardiomyozyten

Die Wahl des richtigen Tiermodells ist ein grundlegender erster Schritt in der Erforschung von pathologischen Prozessen, welche im Menschen stattfinden. Es empfiehlt sich, eine Spezies zu benutzen, die nicht nur eine gleiche Genetik aufweist, sondern in der auch physiologische Prozesse zu einem hohen Maß vergleichbar ablaufen (118). Besonders in der kardiologischen Forschung werden Tiere gesucht, welche in Relation gesehen, ein in etwa gleiches Körper- und Herzgewicht aufweisen (91). Die Maus bietet nicht nur wirtschaftliche und strukturelle Vorteile (wie beispielsweise Beschaffungspreis, Haltung, Pflege, Züchtbarkeit), sondern auch in ihrer Genetik und Physiologie (91,119). Der genetische Unterschied zwischen Mensch und Maus ist minimal (119). In dieser Dissertation wurde auch der Vorteil der kleinen Tieren genutzt und homozygot veränderte Knock-in Mutanten benutzt (91).

Dennoch sollte sich hier auch vor Augen geführt werden, dass sich die Calciumelimination aus dem Zytoplasma bei Menschen und Mäusen unterscheidet. Wie schon erwähnt, ist die anteilige Aufnahme von Ca^{2+} in das SR während der Diastole bei der Maus höher (30,91).

4.6. Limitationen der methodischen Durchführung

4.6.1. In vitro Bedingungen der Myokardzellen

In vitro Bedingungen können sowohl einen positiven als auch negativen Effekt auf die Kardiomyozyten auswirken. So fehlen beispielsweise schützende Einflüsse der pH Regulierung, aber auch ein ausgewogener Zu- und Abtransport von Nährstoffen ist nicht gegeben. Letztendlich repräsentieren isolierte Kardiomyozyten aber nur teilweise die Prozesse, die in der Gesamtheit des Körpers ablaufen. Alleine bei der Zellisolation entsteht ein oxidativer Stress (120). Dieser kann beispielsweise durch die Verwendung von vollständig mit Sauerstoff gesättigten Wasser bei der Isolation und weiteren Bearbeitungen vermindert werden (121). Auch Cystein vermag durch den Zwischenschritt mit der Glutathionperoxidase einen positiven Effekt auf den oxidativen Stress zu haben (122).

4.6.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Weitere Limitationen dieser Methodik liegt an der technischen Ausstattung bzw. an der Messmethode selbst. So werden in der Kammer Nummer sechs befindliche Zellen zeitlich später gemessen als in der ersten Kammer und ruhen somit länger im letzten Schritt des Calciumaufbaus. Auch der Zu- und Ablauf zur Kammer ist nicht bei jeder Messreihe gleich. So wird zwar ein kontinuierlicher Fluss durch einen Perfusor und einer automatischen Absaugung erreicht, jedoch kann durch die Positionierung der Absaugöffnung die kontinuierliche, nicht periodische verstärkte Absaugung, nicht komplett verhindert werden. Hier erfolgt eine rein visuelle Kontrolle des Flüssigkeitsstandes in der Messkammer. Maßnahmen, die getroffen wurde, damit der Farbstoff besser in das Zellinnere eintritt und an Calcium bindet (vgl. Kapitel 2.2.3. Farbstoff fura-2, AM), könnten hierbei aber auch die Vergleichbarkeit zur humanen Pathophysiologie erschweren. Eine pH Änderung würde physiologisch ausgeglichen werden. Auch die intrazellulären Esterasen könnten in ihrer Funktion eingeschränkt werden, umso länger die Kammer nicht gemessen wird. Für die Inkubation der Zellen mit fura-2, AM wurde ein Zeitraum von 15-60 min (4 °C – 37 °C) angegeben (103), welcher in diesem Experiment auf 15 Minuten festgelegt wurde. Leichte Temperaturschwankungen zwischen den Messtagen sind unvermeidbar. Ein weiterer Nachteil von u.a. fura-2, AM, ist die 2018 von Smith et al. nachgewiesene Aktivitätseinschränkung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch diesen Farbstoff (107). Da der benutzte Farbstoff außerdem lichtsensibel ist (123), wurde im Messraum selbst nur mit langwelligem rotem Licht gearbeitet. Jedoch gab es auch bei jeder Messung Einfluss durch anderes elektromagnetisches Spektrum durch z.B. den PC-Monitor. Da die Zellen unterschiedlich superfundiert wurden, zeigt sich hier auch ein möglicher Schwachpunkt in der Messung. Doxorubicin selbst besitzt eine Fluoreszierende Eigenschaft (124) welche jedoch durch die Subtraktion des Hintergrundes für die Gesamtaussage des Experimentes keine Rolle spielt. Zusätzlich sollte hier erwähnt werden, dass die emittierte Fluoreszenz von Doxorubicin bei 560 nm liegt (125) und sich somit deutlich oberhalb des Grenzwertes des dichroitischen Spiegels befindet, der das von der Zelle emittierte Licht passieren lässt. Folglich sollte die emittierte Fluoreszenz von Doxorubicin nicht gemessen werden.

Zusätzlich muss festgestellt werden, dass Fehlerquellen, die durch die Methodik bzw. technische Ausstattung verursacht werden, auf alle Gruppen bzw. Messungen gleich einwirken. Zumindest qualitativ und im Vergleich zwischen einander sollten die Befunde vergleichbar sein.

5. Zusammenfassung

Aus der vorliegenden Dissertationsschrift lassen sich zwei Hauptbefunde ableiten.

Erstens, dass es in dem gewählten Modell der *in vitro* Inkubation isolierter Mauskardiomyozyten mit Doxorubicin erst ab einer Dosis von 50 μM Doxorubicin zu einem messbar negativ inotropen Effekt im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt. Der Ausmaß der Inotropieeinschränkung zwischen wt Zellen und CaMKII δ Met281/282Val Zellen unterscheidet jedoch nicht.

Hingegen fand sich zweitens, dass die fehlende oxidative Aktivierbarkeit der CaMKII δ mit einer geringeren diastolischen Calciumüberladung und einem erhaltenen SR Calciumgehalt bei einer Doxorubicinkonzentration von 10 μM einhergeht, was in Zusammenschau mit der unveränderten Relaxationskinetik hinweisgebend auf ein SR Calciumleck ist, welches durch eine oxidativ aktivierte CaMKII δ unterhalten wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Katzung BG, Kruidering-Hall M, Trevor AJ. Katzung & Trevor's pharmacology: examination & board review. In: Katzung & Trevor's pharmacology: examination & board review. Twelfth edition. New York: McGraw Hill Education; 2019. p. 450–62. (A Lange medical book).
2. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016 Sep 21;37(36):2768–801.
3. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R, Scheele J. Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. In: Engelhardt M, Henß H, editors. Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. 4., überarb. und erw. Aufl. Heidelberg Hamburg: Ecomed Medizin; 2010. p. 141. (ecomед Medizin).
4. Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, Mertens AC, Mitby P, Stovall M, et al. Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ*. 2009 Dec 8;339:b4606.
5. Bovelli D, Plataniotis G, Roila F. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*. 2010 May;21:v277–82.
6. Yeh ETH, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 16;53(24):2231–47.
7. Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS. CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Nov;51(5):749–59.
8. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, et al. Anatomie. In: Bob A, Bob K, editors. Anatomie. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. p. 533-540;578-617. (Duale Reihe).
9. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Innere Organe. In: Innere Organe. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2018. p. 77-79;94-135. (Prometheus).
10. Fritsch H, Kühnel W, Leonhardt H, editors. Taschenatlas Anatomie - 2 Innere Organe. 11., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2013. 472 p. (Taschenatlas Anatomie).
11. Drenckhahn D, Benninghoff A, editors. Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. In: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2004. p. 41–70. (Anatomie; vol. Band 2, Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut).
12. Coote JH, Chauhan RA. The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. *Autonomic Neuroscience*. 2016 Aug;199:17–23.
13. Drenckhahn D, Waschke J, Benninghoff A. Taschenbuch Anatomie. In: Taschenbuch Anatomie. 3. Auflage. Elsevier Urban-&-Fischer-Verlag; 2020. p. 323–39.
14. Welsch U, Kummer W, Deller T. Lehrbuch Histologie. In: Lehrbuch Histologie. 4. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014. p. 140-158;255-259.
15. Welsch U, Sobotta J, editors. Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. In: Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 7., neu bearb. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2005. p. 80–95.

16. Shimada T, Kawazato H, Yasuda A, Ono N, Sueda K. Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. *Anat Rec.* 2004 Oct;280A(2):940–51.
17. Brenner B, Burckhardt G, Draguhn A, Ehmke H, Eysel U, Fandrey J, et al. *Physiologie. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.* Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Klinke R, Gay R, Rothenburger A, editors. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2014. 1024 p.
18. Daut J, Klöcker N, Piper HM, Rohrbach S, Deussen A, Piper HM. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN: mit pathophysiologie.* SPRINGER; 2018. p. 163–219.
19. James TN. The connecting pathways between the sinus node and A-V node and between the right and the left atrium in the human heart. *American Heart Journal.* 1963 Oct;66(4):498–508.
20. Burger W, Zeiher A. Pathophysiologie Pathobiochemie. In: Pfreundschuh M, Schölmerich J, editors. *Pathophysiologie Pathobiochemie.* 1. Aufl. München: Urban & Fischer; 2000. p. 135–44.
21. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovascular Research.* 2006 Feb 1;69(2):318–28.
22. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides.* 2019 Jan;111:18–25.
23. Filipoiu FM. *Atlas of heart anatomy and development.* New York: Springer; 2013.
24. Rosen MR, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB. Cardiac Pacing: From Biological to Electronic ... to Biological? *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008 Apr;1(1):54–61.
25. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. *Physiologie.* Bob A, Bob K, editors. Stuttgart: Thieme; 2010. 830 p. (Duale Reihe).
26. Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, et al. Molecular Architecture of the Human Sinus Node: Insights Into the Function of the Cardiac Pacemaker. *Circulation.* 2009 Mar 31;119(12):1562–75.
27. MacDonald EA, Rose RA, Quinn TA. Neurohumoral Control of Sinoatrial Node Activity and Heart Rate: Insight From Experimental Models and Findings From Humans. *Front Physiol.* 2020 Mar 3;11:Article 170, 1-26.
28. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. *Circulation Research.* 2010 Mar 5;106(4):659–73.
29. DiFrancesco D. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circulation Research.* 2010 Feb 19;106(3):434–46.
30. Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* Second Edition. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001. 427 p. (Developments in Cardiovascular Medicine; vol. 237).
31. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 2017 Jul 7;121(2):181–95.
32. Slupsky JR, Ohnishi M, Carpenter MR, Reithmeier RAF. Characterization of cardiac calsequestrin. *Biochemistry.* 1987 Oct;26(20):6539–44.
33. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Györke I, Volpe P, Williams SC, Györke S. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003 Sep 30;100(20):11759–64.
34. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415:198–205.
35. Weber CR, Piacentino III V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na⁺-Ca²⁺ Exchange Current and Submembrane [Ca²⁺] During the Cardiac Action Potential. *Circulation Research.*

2002 Feb 8;90(2):182–9.

36. Maier LS, Bers DM. Role of Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):631–40.
37. Larsen CM, Vanden Bussche CL, Mankad S. Echocardiography. In: Nihoyannopoulos P, Kisslo J, editors. *Echocardiography* [Internet]. Second Edition. Springer International Publishing; 2018 [cited 2020 Apr 17]. p. 116–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-71617-6>
38. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015 Mar;16(3):233–71.
39. Wood PW, Choy JB, Nanda NC, Becher H. Left Ventricular Ejection Fraction and Volumes: It Depends on the Imaging Method. *Echocardiography.* 2014 Jan;31(1):87–100.
40. Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Res Cardiol.* 2018 Jun;113(4):29.
41. Gray CBB, Heller Brown J. CaMKII δ subtypes: localization and function. *Front Pharmacol.* 2014;5:1–8.
42. Heist EK, Srinivasan M, Schulman H. Phosphorylation at the Nuclear Localization Signal of Ca²⁺ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Blocks Its Nuclear Targeting. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19763–71.
43. Maier LS, Bers DM. Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2002 Aug;34(8):919–39.
44. Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila Petroff M, et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2015 May 15;308(10):H1177–91.
45. Erickson JR, Joiner M ling A, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2008 May 2;133(3):462–74.
46. Köhler AC. Die Bedeutung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II für den gestörten Kalziumstoffwechsel der isolierten Rattenherzmuskelzelle unter Doxorubicinbehandlung. Universität Göttingen; 2012.
47. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest.* 2006 Dec 1;116(12):3127–38.
48. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart — Remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2013 Aug;61:2–10.
49. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, et al. 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 Mar 4;108(5):555–65.
50. Wu Y, Gao Z, Chen B, Koval OM, Singh MV, Guan X, et al. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009 Apr 7;106(14):5972–7.
51. DIMDI [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 21]. Available from: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-who/kode-suche/htmlamtl2019/block-i30-i52.htm>
52. Christ M, Störk S, Dörr M, Heppner HJ, Müller C, Wachter R, et al. Heart failure epidemiology 2000–2013: insights from the German Federal Health Monitoring System: Heart failure in Germany (2000–2013). *Eur J Heart Fail.* 2016 Aug;18(8):1009–18.
53. Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin.* In: *Innere Medizin.* 2020. p. 209–22.

54. Dahlström U, Heineke J, Kempf T, Bauersachs J, Frantz S, Hilfiker-Kleiner D, et al. Heart Failure. In: Feldman DS, Mohacsi P, editors. Heart Failure [Internet]. Springer; 2019 [cited 2020 Apr 21]. p. 1–101. (Cardiovascular Medicine). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-98184-0>
55. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2021 Sep 21;42(36):3599–726.
56. Silbernagl S, Lang F. Taschenatlas Pathophysiologie. In: Taschenatlas Pathophysiologie. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2020. p. 250–5.
57. Cho GW, Altamirano F, Hill JA. Chronic heart failure: Ca²⁺, catabolism, and catastrophic cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016 Apr;1862(4):763–77.
58. Peana D, Domeier TL. Cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Current Opinion in Pharmacology*. 2017 Apr;33:17–26.
59. Bers DM. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology*. 2006 Dec;21(6):380–7.
60. Bers DM. Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak: Basis and Roles in Cardiac Dysfunction. *Annu Rev Physiol*. 2014 Feb 10;76(1):107–27.
61. Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM. Elevated Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Intact Ventricular Myocytes From Rabbits in Heart Failure. *Circulation Research*. 2003 Oct 3;93(7):592–4.
62. Roe A, Frisk M, Louch W. Targeting Cardiomyocyte Ca²⁺ Homeostasis in Heart Failure. *CPD*. 2015;21(4):431–48.
63. Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular Na⁺ Concentration Is Elevated in Heart Failure But Na/K Pump Function Is Unchanged. *Circulation*. 2002 May 28;105(21):2543–8.
64. Pieske B, Maier LS, Piacentino III V, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate Dependence of [Na⁺]_i and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation*. 2002 Jul 23;106(4):447–53.
65. Campbell KS, Sorrell VL. Cell- and molecular-level mechanisms contributing to diastolic dysfunction in HFpEF. *Journal of Applied Physiology*. 2015 Nov 15;119(10):1228–32.
66. Krysiak J, Unger A, Beckendorf L, Hamdani N, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, et al. Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat Commun*. 2018 Dec;9(1):262.
67. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and Expression of δ -Isoforms of the Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circulation Research*. 1999 Apr 2;84(6):713–21.
68. 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 May 2;92(8):904–11.
69. Maier LS. CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Sep;38(9):1293–302.
70. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, et al. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1150–61.
71. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and

- Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Heart Failure. *Circulation Research*. 2005 Dec 9;97(12):1314–22.
72. Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res*. 2003 Sep 19;93(6):487–90.
73. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009 Nov;2(6):664–75.
74. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun;56(2):185–229.
75. Kruger A, Wojnowski L. Kardiotoxizität von Anthrazyklinen - ein ungelöstes Problem. *Dtsch Arztebl*. 2006 Sep 15;103(37):2393–7.
76. Hof H, Dörries R, Geginat G. Medizinische Mikrobiologie. In: Bob A, Bob K, editors. *Medizinische Mikrobiologie: 4., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2009. p. 338. (Duale Reihe).
77. Kalyanaraman B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biology*. 2020 Jan;29:101394.
78. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013 Feb;65(2):157–70.
79. Schlitt A, Jordan K, Vordermark D, Schwamborn J, Langer T, Thomssen C. Cardiotoxicity and oncological treatments. *Dtsch Arztebl Int*. 2014 Mar 7;111(10):161–8.
80. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991 Mar 21;324(12):808–15.
81. Horacek JM, Pudil R, Jebavy L, Tichy M, Zak P, Maly J. Assessment of anthracycline-induced cardiotoxicity with biochemical markers. *Exp Oncol*. 2007 Dec;29(4):309–13.
82. Wouters KA, Kremer LCM, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005 Dec;131(5):561–78.
83. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009 Dec;57(6):435–45.
84. Mele D, Tocchetti CG, Pagliaro P, Madonna R, Novo G, Pepe A, et al. Pathophysiology of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Cardiovascular Medicine*. 2016 May;17:e3–11.
85. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006 Sep;41(3):389–405.
86. Bures J, Jirkovska A, Sestak V, Jansova H, Karabanovich G, Roh J, et al. Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology*. 2017 Dec;392:1–10.
87. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, et al. Topoisomerase IIβ-Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research*. 2007 Sep 15;67(18):8839–46.
88. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart*. 2018;104(12):971–7.
89. Tabellen mit Bestandteilen der Lösungen der translationalen Kardiologie der Inneren Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg. 2020.
90. ZTL der Universität Regensburg [Internet]. 2020. Available from: <https://www.uni->

- regensburg.de/forschung/zentrale-tierlaboratorien/tierhausleitung/index.html
91. Milani-Nejad N, Janssen PML. Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014 Mar;141(3):235–49.
 92. Timolati F, Ott D, Pentassuglia L, Giraud MN, Perriard JC, Suter TM, et al. Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Nov;41(5):845–54.
 93. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch*. 1895 Aug;61(6):291–332.
 94. Zimmerman ANE, Hülsmann WC. Paradoxical Influence of Calcium Ions on the Permeability of the Cell Membranes of the Isolated Rat Heart. *Nature*. 1966 Aug;211(5049):646–7.
 95. Hülsmann WC. Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovascular Research*. 2000;45(1):122.
 96. Piper HM. The calcium paradox revisited An artefact of great heuristic value. *Cardiovascular Research*. 2000 Jan 1;45(1):123–7.
 97. Hülsmann WC. On the mechanism of the calcium paradox: the release of hydrolytic enzymes. *European Heart Journal*. 1983;4(suppl H):57–61.
 98. Barboza de Oliveira MA, Brandi AC, Alberto dos Santos C, Husseni Botelho PH, Lasso Cortez JL, Goissis G, et al. The calcium paradox - What should we have to fear? *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2014;29(2):249–54.
 99. Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB j*. 1990 Feb;4(2):148–60.
 100. IonOptix - Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration) [Internet]. 2020. Available from: https://2zlwpi242q7llv0z33wb30jz-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019/10/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf
 101. Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*. 1980 May;19(11):2396–404.
 102. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440–50.
 103. Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators [Internet]. 2011 [cited 2020 Jun 12]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01200.pdf>
 104. Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochemical Journal*. 1987 Dec 1;248(2):313–28.
 105. Kao JP, Tsien RY. Ca²⁺ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophysical Journal*. 1988 Apr;53(4):635–9.
 106. Jackson AP, Timmerman MP, Bagshaw CR, Ashley CC. The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Letters*. 1987 May 25;216(1):35–9.
 107. Smith NA, Kress BT, Lu Y, Chandler-Militello D, Benraiss A, Nedergaard M. Fluorescent Ca²⁺ indicators directly inhibit the Na,K-ATPase and disrupt cellular functions. *Sci Signal*. 2018 Jan 30;11(515):eaal2039.
 108. IonOptix - HyperSwitch Light Source [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ionoptix.com/products/components/light-sources/hyperswitch-light-source/>
 109. Georg-August-Universität Göttingen - Fluoreszenzmikroskopie [Internet]. 2020. Available from: <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>
 110. IonOptix - Myocyte Calcium and Contractility Systems [Internet]. 2020. Available from: <https://www.ionoptix.com/products/systems/calcium-and-contractility-system/>

111. Uni Marburg - Fluoreszenzmikroskopie [Internet]. 2020. Available from: <https://www.uni-marburg.de/fb20/cyto/lehre/praktikumsunterlagen/vl/fluoreszenz>
112. Pessah IN, Stambuk RA, Casida JE. Ca²⁺-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg²⁺, caffeine, and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol*. 1987 Mar;31(3):232–8.
113. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993 Aug 1;265(2):C533–40.
114. Koschack J. Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied. *Z Allg Med*. 2008 Jun;84(6):258–60.
115. Weiß C. Basiswissen Medizinische Statistik [Internet]. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 [cited 2021 Feb 19]. (Springer-Lehrbuch). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56588-9>
116. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res*. 1999 Apr;42(1):254–61.
117. Sag CM, Wolff HA, Neumann K, Opiela MK, Zhang J, Steuer F, et al. Ionizing radiation regulates cardiac Ca handling via increased ROS and activated CaMKII. *Basic Res Cardiol*. 2013 Nov;108(6):385.
118. Justice MJ, Dhillon P. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis Model Mech*. 2016 Feb 1;9(2):101–3.
119. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):993–9.
120. Remião F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. The study of oxidative stress in freshly isolated Ca(2+)-tolerant cardiomyocytes from the adult rat. *Toxicol In Vitro*. 2001 Oct;15(4–5):283–7.
121. Timerman AP, Altschuld RA, Hohl CM, Brierley GP, Merola AJ. Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *J Mol Cell Cardiol*. 1990 May;22(5):565–75.
122. King N, Lin H, Suleiman MS. Cysteine protects freshly isolated cardiomyocytes against oxidative stress by stimulating glutathione peroxidase. *Mol Cell Biochem*. 2010 Oct;343(1–2):125–32.
123. Becker PL, Fay FS. Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1987 Oct 1;253(4):C613–8.
124. Shah S, Chandra A, Kaur A, Sabnis N, Lacko A, Gryczynski Z, et al. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017 May;170:65–9.
125. Kauffman M, Kauffman M, Zhu H, Jia Z, Li Y. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. ROS [Internet]. 2016 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <http://www.rosj.org/index.php/ros/article/view/65>

Danksagung

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Can Martin Sag, der mich von Beginn an bei jeder Phase dieser Dissertationsschrift umfassend und mit voller Leidenschaft für die Thematik unterstützt hat. Ohne seinen Beitrag und hervorragende Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Zudem möchte ich Herrn Dr. med. Daniel Tarnowski für die Einarbeitung im Labor und somit dessen unermüdlichen Einsatz danken. Auch gilt allen Mitarbeitern des Forschungslabors, insbesondere Herrn Thomas Sowa für das Mitwirken ein großer Dank.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, meiner Ehefrau sowie meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und Motivation nicht nur während der Forschungsarbeit, sondern auch während meines Studiums zu danken.

8. Lebenslauf

In der digitalen Version meiner Dissertationsschrift wird auf die Veröffentlichung meines Lebenslaufes aus datenschutzrechtlichen Gründen verzichtet.