

Die Bedeutung der redox- vs. phospho-aktivierten CaMKII δ für die Pathogenese der Doxorubicin- induzierten toxischen Kardiomyopathie



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Anna-Lena, Feder
aus
Auerbach i.d.OPf.
im Jahr
2024

Die Bedeutung der redox- vs. phospho-aktivierten CaMKII δ für die Pathogenese der Doxorubicin- induzierten toxischen Kardiomyopathie



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Anna-Lena, Feder
aus
Auerbach i.d.OPf.
im Jahr
2024

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01.07.2024

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Lars Maier

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Anthrazyklin Doxorubicin	1
1.1.1	Die klinische Verwendung von Doxorubicin als Chemotherapeutikum	2
1.1.2	Doxorubicin als kardiotoxisches Anthrazyklin	4
1.2	Das kardiale Ca^{2+}-Handling	5
1.2.1	Die elektrische und mechanische Verknüpfung der Kardiomyozyten	6
1.2.2	Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle	7
1.2.3	Die elektromechanische Kopplung	8
1.2.3.1	Das Sarkoplasmatische Retikulum	11
1.2.3.2	Die Regulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Aufnahme über die SR- Ca^{2+} -ATPase	11
1.2.3.3	Das diastolische SR Ca^{2+} -Leck über den Ryanodin-Rezeptor	13
1.3	Die Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	15
1.3.1	Struktur und Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II	15
1.3.2	Die physiologische und pathophysiologische Rolle der CaMKII δ für den kardialen Ca^{2+} -Stoffwechsel	18
1.3.3	Pathophysiologische Rolle der CaMKII δ in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie	19
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies	20
1.4.1	Die Subgruppen reaktiver Sauerstoffspezies und deren Produktion	21
1.4.2	Der Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und der elektromechanischen Kopplung	23
1.5	Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Versuchstiere	25
2.2	Versuchsprotokoll zur Untersuchung der akuten und chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität	26
2.3	Echokardiographie	27
2.4	Isolation muriner Kardiomyozyten	28
2.5	Messung von intrazellulären Ca^{2+}-Transienten muriner Kardiomyozyten	30
2.5.1	Die Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten mittels Fura2-AM	31
2.5.2	Versuchsdurchführung zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten	32
2.5.3	Auswertung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten	34
2.5.4	Aufbau und Prinzip des Epifluoreszenzmikroskops	35

2.6	Messung des SR Ca²⁺-Lecks	36
2.6.1	Die Detektion von Ca ²⁺ -Sparks mittels Fluo4-AM	36
2.6.2	Versuchsdurchführung zur Messung des SR Ca ²⁺ -Lecks	38
2.6.3	Aufbau und Prinzip des Konfokalmikroskops	39
2.6.4	Auswertung des SR Ca ²⁺ -Lecks	40
2.7	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	41
2.7.1	Detektion zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange	41
2.7.2	Versuchsdurchführung zur Messung zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange	41
2.7.3	Auswertung der Messung zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange	42
2.8	(Immun)-Histologische Untersuchungen der Herzen	43
2.8.1	Ermittlung der kardialen Fibrose	43
2.8.2	Bestimmung der Zellgröße	45
2.8.3	Auswertung der Zellgrößen	47
2.8.4	Ermittlung der Kapillardichte	48
2.8.5	Auswertung der Kapillardichte	49
2.9	Western Blot zur Quantifizierung der relativen Proteinexpression und zum Nachweis posttranslationaler Proteinmodifikationen	49
2.9.1	Gewinnung der Proben	50
2.9.2	Herstellung der Lysate und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	50
2.9.3	Western Blot	52
2.9.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	52
2.9.3.2	Transfer	53
2.9.3.3	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Primärantikörperinkubation	54
2.9.3.4	Waschschritte und Sekundärantikörperinkubation	55
2.9.3.5	Auswertung der Western Blot Daten	56
2.10	Schematische Darstellungen	56
2.11	Statistik	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Die Dysregulation des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes unter akuter DOX Exposition basiert auf einem CaMKIIδ-induzierten diastolischen SR Ca²⁺-Leck	58
3.2	Kennzeichnung des DICM-Phänotyps durch DOX-induzierte prozentuale Körpergewichtsreduktion und reduziertes Gesamtüberleben	64
3.3	Teilweiser Erhalt der linksventrikulären Funktion trotz DOX-Exposition unter genetischer CaMKIIδ-Inhibition	68

3.4	Verhinderung DOX-induzierter struktureller Remodelingprozesse durch Verhinderung der oxidativen CaMKII δ -Aktivierung und unter genetischer CaMKII δ -Deletion	73
3.5	Die DOX-abhängige Induktion CaMKII δ -abhängiger Ca ²⁺ -Dysregulationen erfolgt unabhängig von der oxidativen-Aktivierung der CaMKII δ	77
3.6	Gesteigerte zytoplasmatische ROS-Formation unter chronischer DOX-Behandlung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen	84
3.7	Der partielle Erhalt der LV-Funktion unter Losartan-Vorbehandlung ist mit einer Verminderung des CaMKII δ -induzierten diastolischen SR Ca ²⁺ -Lecks trotz DOX-Exposition assoziiert	86
4	Diskussion	94
4.1	Die DOX-induzierte Dysregulation des intrazellulären Ca ²⁺ -Haushaltes basiert auf dem CaMKII δ -induziertem diastolischen SR Ca ²⁺ -Leck	94
4.2	Die genetische Deletion der CaMKII δ führt zu einer abgeschwächten Abnahme der LV-Funktion unter chronischer DOX-Behandlung	97
4.3	Verhinderung DOX-induzierter struktureller Remodelingprozesse unter genetischer CaMKII δ -Deletion	98
4.4	Abschwächung der DOX-induzierten LV-Dysfunktion unter Losartan basiert auf der Verhinderung des DOX-bedingten SR Ca ²⁺ -Lecks	99
5	Zusammenfassung und Conclusion	101
5.1	Zusammenfassung	101
5.2	Conclusion	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Abkürzungsverzeichnis	115
8	Abbildungsverzeichnis	118
9	Tabellenverzeichnis	120
10	Publikationsverzeichnis	121
11	Danksagung	122

1 Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen stellen mit einem prozentualen Anteil von 21% die zweithäufigste Todesursache weltweit dar, wohingegen kardiovaskuläre Erkrankungen mit einem Anteil von 48% die führende Todesursache repräsentieren (Llach et al. 2019; Siegel et al. 2023). Trotz der stetigen Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, sowie des tumorfreien Langzeitüberlebens von Krebspatienten wird die Langzeitprognose nach kurativer Therapie durch kardiovaskuläre Komplikationen der anti-tumorösen Therapie beeinträchtigt. Kardiovaskuläre Komplikationen sind für 30% der Todesfälle unter Krebspatienten nach kurativer Therapie verantwortlich, was die Tragweite der Langzeitnebenwirkungen anti-tumoröser Therapien verdeutlicht (Bohdan et al. 2021; Henning und Harbison 2017). Insbesondere die anti-tumoröse Behandlung mit Anthrazyklinen ist mit therapielimitierenden Nebenwirkungen vergesellschaftet (Henning und Harbison 2017).

1.1 Das Anthrazyklin Doxorubicin

1962 wurde mit der Isolation von Daunorubicin aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius* ein Durchbruch in der onkologischen Therapie geschaffen (Aubel-Sadron und Londos-Gagliardi 1984; Arcamone et al. 1969). Die Entdeckung von Daunorubicin, dem ersten Anthrazyklin, ermöglichte insbesondere die verbesserte Therapie akuter Leukämien (Rawat et al. 2021). In adulten, nicht-lymphatischen Leukämien wurde infolge einer Daunorubicin-Behandlung eine Tumorremission von 40-50% erzielt (Saleem und Kasi 2023). Basierend auf der Struktur von Daunorubicin wurde 1969 das Anthrazyklin Doxorubicin entwickelt. Doxorubicin stellt das Hydroxyderivat seines Vorläufers Daunorubicin dar. Tetrazyklische, planar angeordnete Anthrachinonringe bilden den hydrophoben Abschnitt von Doxorubicin (Micallef I 2020). Die hydrophobe Ankerregion, bestehend aus einer Methoxy-substituierten kurzen Kette und einer Hydroxylgruppe, sind hingegen gewinkelt angeordnet zu den Anthraquinonringen (Micallef I 2020). Über eine glykosidische Bindung erfolgt die Bindung von Daunosamin an einen der tetrazyklischen Anthraquinonringe (Micallef I 2020)(siehe **Abb.1**). Doxorubicin beinhaltet somit eine Reihe funktioneller Gruppen, wie Ketonreste, Amine und Hydroxylgruppen, welche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Doxorubicin und dessen Zielmolekülen ermöglichen, und somit dessen klinische Verwendung als Chemotherapeutikum ermöglicht wird (Micallef I 2020).

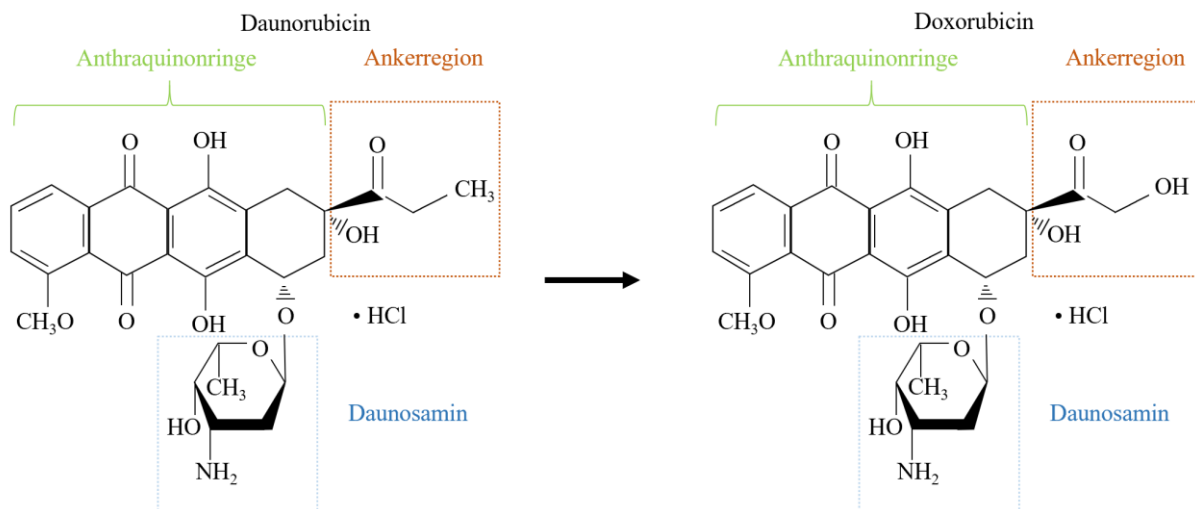


Abbildung 1 Die Struktur von Doxorubicin

Doxorubicin wird durch Hydroxylierung von Daunorubicin gewonnen. Charakteristisch ist der Aufbau aus Anthraquinonringen (grün), einer Ankerregion, (braun) sowie Daunosamin (blau) (eigene Darstellung).

1.1.1 Die klinische Verwendung von Doxorubicin als Chemotherapeutikum

Das Chemotherapeutikum Doxorubicin stellt eines der am häufigsten verwendeten Anthrazykline dar und wird zur Behandlung solider Tumoren, wie zur Therapie von Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, sowie zur Behandlung von Leukämien eingesetzt (Novotney et al. 1992; Hallman et al. 2019; Mattioli et al. 2023). Die anti-tumoröse Wirkung von Doxorubicin beruht hierbei im Wesentlichen auf der Inhibition der Topoisomerase II sowie der Formation reaktiver Sauerstoffspezies (McGowan et al. 2017; Rawat et al. 2021; Zhang et al. 2012).

Doxorubicin passiert die Zellmembran über passive Diffusion und bildet einen Komplex mit der 20S Untereinheit des Proteasoms, woraus die nukleäre Translokation von Doxorubicin resultiert (Mattioli et al. 2023). Durch den aglykonischen Doxorubicin-Anteil (bestehend aus den Anthraquinonringen, sowie der Ankerregion) wird die Interaktion von Doxorubicin mit den DNA-Basenpaaren über Wasserstoffbrückenbindungen möglich (Micallef I 2020; Zhang et al. 2022). Des Weiteren wird durch die Aminogruppe (NH₂-Gruppe) des Daunosamins eine kovalente Bindung mit der Base Guanin gebildet (Micallef I 2020). Die vielseitigen Wechselwirkungen von Doxorubicin mit den DNA-Basenpaaren resultieren in der Interkalation von Doxorubicin in die DNA. Es wird angenommen, dass diese Doxorubicin-Interkalation in einer Separierung der DNA-Doppelstränge resultiert, wodurch es zur anti-tumorösen Wirkung von Doxorubicin durch Induktion von Apoptose kommt. Der genaue Mechanismus der Doxorubicin-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche ist dabei nicht gänzlich verstanden, jedoch ist bekannt, dass Doxorubicin an die Topoisomerase II (Top2) bindet. Top2α weist dabei eine hohe Expression im Tumorgewebe auf, wobei Top2α als Marker einer erhöhten Proliferation fungiert (Zhang et al. 2012; Romero et al. 2012). In Folge dessen kommt es zur Formation eines Top2α-Doxorubicin-DNA-Komplexes, was in der Inhibition der Top2α, einer Auflockerung

der DNA-Doppelhelix und Blockade der DNA-Replikation resultiert. Die Folge dieser Enzyminhibition stellen DNA-Doppelstrangbrüche, sowie die Apoptoseinduktion der Tumorzelle dar. (Micallef I 2020; Kong et al. 2022; Zhang et al. 2012)

Des Weiteren wird die anti-tumoröse Wirkung von Doxorubicin durch die Formation reaktiver Sauerstoffspezies erlangt. Die tetrazyklischen Anthraquinonringe des Doxorubicins werden durch mitochondriale NAD(P)H-Oxidoreduktasen (Komplex 1 der Atmungskette), sowie NADPH-Oxidasen (NOX) oxidiert, was in der Formation eines instabilen Doxorubicin-Semiquinons resultiert (Berlin und Haseltine 1981). Dieses instabile Doxorubicin-Semiquinon wird durch Abgabe des instabilen Elektrons erneut oxidiert, wobei es durch Reaktion des freien Elektrons mit Wasser zur Bildung von Superoxidanionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kommt (Micallef I 2020) (siehe **Abb.2**). Die exzessive Formation von reaktiven Sauerstoffspezies führt zur toxischen redox-abhängigen Modifikation von Proteinen, Lipiden, sowie Nukleinsäuren im tumorösen Gewebe und wirkt folglich ebenso Apoptose-induzierend und anti-tumorös. Somit entfaltet das Doxorubicin-Semiquinon einen anti-neoplastischen Effekt. Die Formation des Doxorubicin-Metaboliten (Doxorubicin-Semiquinon) liegt hierbei bereits nach 5 Minuten mit einem Anteil von 20% im Plasma vor. Vier Stunden nach erfolgter Doxorubicin-Administration liegt der Doxorubicin-Metabolit hingegen bereits mit einem Anteil von 75% vor, während 24 Stunden nach erfolgter Doxorubicin-Verabreichung ein Anteil von 90% erreicht wird. (Rawat et al. 2021)

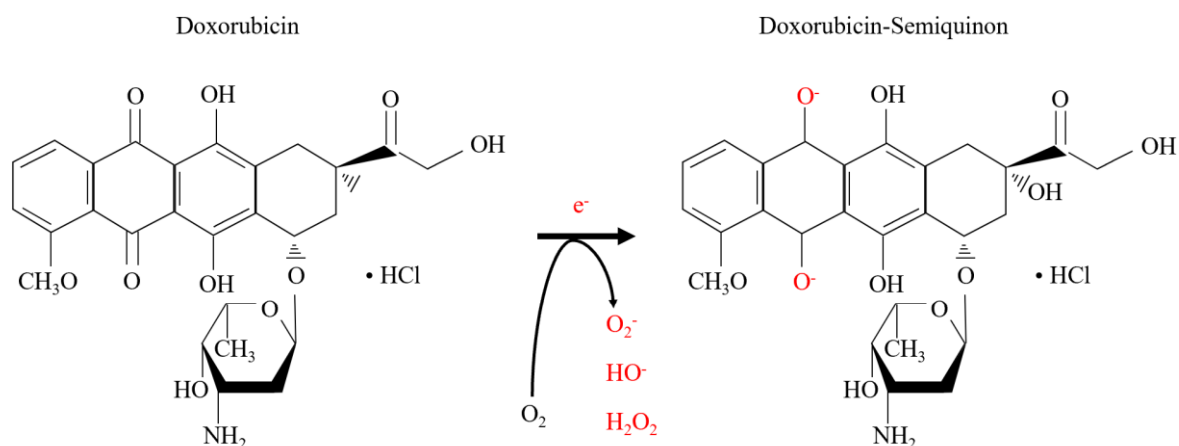


Abbildung 2 Die Reduktion von Doxorubicin zum instabilen Doxorubicin-Semiquinon

Durch Reduktion von Doxorubicin kommt es zur Formation des instabilen Doxorubicin-Semiquinons. Die Oxidation des Doxorubicin-Semiquinons in die ursprüngliche Quinon-Struktur resultiert in der Reduktion von Sauerstoff, wodurch es zur Superoxidformation kommt. Des Weiteren kommt es zur Bildung von Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen. Infolge der Doxorubicin-induzierten ROS-Produktion wird die anti-tumoröse Wirkung des Anthrazyklins vermittelt (eigene Darstellung).

Die anti-tumoröse Wirkung von Doxorubicin beschränkt sich jedoch nicht nur auf das neoplastische Gewebe, in welchem die Doxorubicin-induzierten Modifikationen erwünscht sind, sondern auch auf gesundes kardiales Gewebe (siehe **Abb.3**).

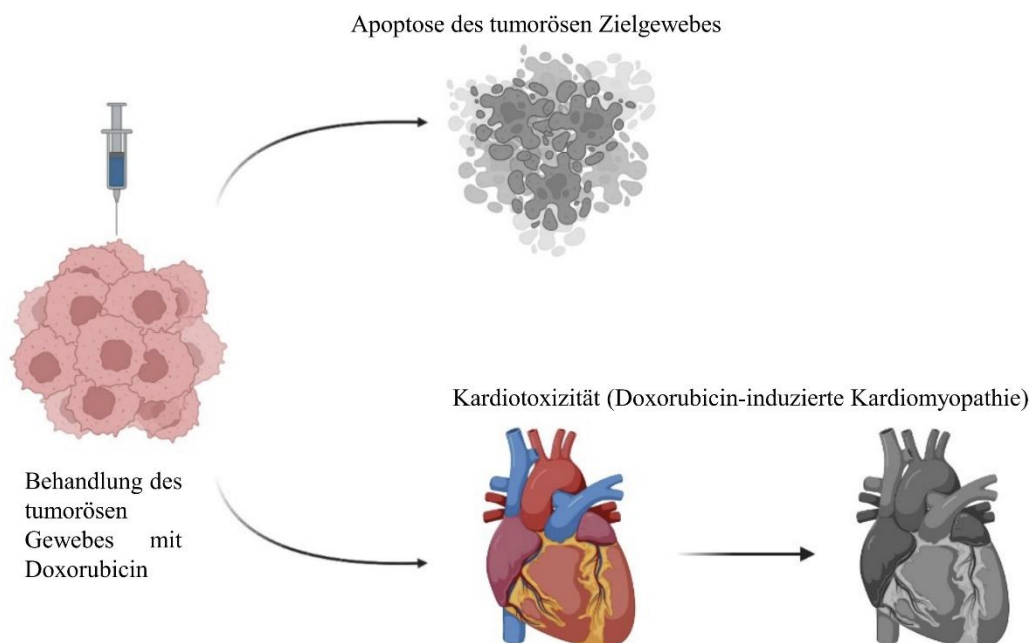


Abbildung 3 Die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität

Die pro-apoptotische Wirkung des Anthrazyklins Doxorubicin wird im tumorösen Zielgewebe zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen genutzt. Neben einer erwünschten pro-apoptotischen Wirkung im tumorösen Zielgewebe kommt es jedoch zu einer kardiotoxischen Beteiligung (Entwicklung der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie). Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

1.1.2 Doxorubicin als kardiotoxisches Anthrazyklin

Trotz des anti-tumorösen Effektes von Doxorubicin, welche die Therapie maligner Tumorerkrankungen verbessert, ist die Anthrazyklintherapie mit einem dramatischen Nebenwirkungsspektrum vergesellschaftet, was die Langzeitprognose der behandelten Patienten limitiert. So wird die Lebensqualität Doxorubicin behandelter Patienten durch die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie (DICM) beeinträchtigt. Es wurde bereits durch einige Studien gezeigt, dass es unter Anthrazyklin-Therapie (wie unter Doxorubicin) zu einer dosisabhängigen Kardiotoxizität kommt, welche durch einen irreversiblen kardialen Schaden charakterisiert wird (Volkova und Russell 2011). Die Patienten weisen an sich ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf, wodurch Anthrazyklin-behandelte Patienten in das Stadium A der Herzinsuffizienzklassifikation der American Heart Association eingruppiert werden. In Abhängigkeit der zeitlichen Manifestation der ersten kardialen Symptome werden die *akute* und *chronisch-progressive* Form der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität voneinander differenziert (Giantris et al. 1998; Grenier und Lipshultz 1998; Lipshultz et al. 2008; Yeh und Bickford 2009). Die *akute* Kardiotoxizität infolge einer Anthrazyklin-Therapie manifestiert sich unmittelbar nach Applikation des Chemotherapeutikums (Chatterjee et al. 2010). Klinisch zeigen betroffene Patienten meist ein Symptomspektrum von Sinus-Tachykardie, paroxysmaler supraventrikulärer Tachykardie, atrialen und ventrikulären Extrasystolen sowie EKG-Veränderungen wie ST-T Veränderungen oder reduzierten QRS-Amplituden (Chatterjee et al. 2010; Hoff et al. 1979). Auf zellulärer Ebene zeigt sich zudem neben der zytoplasmatischen Vakuolisierung, die Zerstörung der

Myofibrillen, sowie funktionelle Veränderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel (Kong et al. 2022; Hoff et al. 1979; Takemura und Fujiwara 2007; Sag et al. 2011). Die *chronisch-progressive* Anthrazyklin-induzierte Kardiotoxizität tritt in der Regel innerhalb eines Zeitfensters von 30 Tagen nach Verabreichung der letzten Doxorubicin-Dosis auf, kann jedoch auch Monate oder Jahre nach erfolgter Therapie noch klinisch apparent werden (Chatterjee et al. 2010). Die *chronisch-progressive* Kardiotoxizität wird in zwei Subgruppen differenziert, der frühen, sowie späten *chronisch-progressiven* Kardiotoxizität. Beide Subgruppen unterscheiden sich hierbei erneut durch den Manifestationszeitpunkt erster kardialer Symptome. Die *frühe chronisch-progressive* Kardiotoxizität wird klinisch innerhalb des ersten Jahres nach initialer Anthrazyklin-Therapie apparent, während die *späte chronisch-progressive* Form Jahre nach der erfolgten Therapie auftreten kann (Cardinale et al. 2015). Betroffene Patienten beider Subgruppen zeigen klinisch das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie mit systolischer und diastolischer Dysfunktion (Chatterjee et al. 2010). Trotz dieser breiten Subgruppierung der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität konnte durch eine Kohortenstudie von Cardinale et al. bereits aufgezeigt werden, dass 9% Anthrazyklin-behandelter Patienten innerhalb eines Zeitfensters von 5.2 Jahren eine Kardiotoxizität entwickeln, wovon jedoch 98% innerhalb des ersten Jahres nach erfolgter Anthrazyklin-Therapie eine Kardiotoxizität entwickeln (Cardinale et al. 2015).

Ein besonderer Risikofaktor zur Manifestation der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie repräsentiert die klinisch eingesetzte kumulative Dosis. Es wurde bereits durch einige Studien der exponentielle Zusammenhang zwischen der kumulativen Dosis, sowie der Entwicklung einer Kardiotoxizität nachgewiesen (Hoff et al. 1979; Speyer et al. 1992; Swain et al. 2003). Gemäß Hoff et al. liegt die Inzidenz einer DICM bei einer verwendeten Doxorubicin-Dosierung von 400 mg/kg bei 3%, wohingegen bei einer Dosierung von 700 mg/kg bereits ein Anstieg auf 18% zu verzeichnen ist (Hoff et al. 1979). Durch das exponentiell steigende Risiko zur Entwicklung einer Doxorubicin-induzierten Herzinsuffizienz in Abhängigkeit der verwendeten Doxorubicin-Dosierung wurde die klinisch eingesetzte kumulative Dosis daher auf 400 mg/kg limitiert (Renu et al. 2018).

Neben der eingesetzten Doxorubicin-Dosierung stellen jedoch auch bereits existierende Herz-Kreislaufkrankungen, wie eine arterielle Hypertonie, oder die Koronare Herzkrankheit einen weiteren Risikofaktor dar. Ebenso werden das weibliche Geschlecht, steigendes Lebensalter, Diabetes Mellitus, sowie die kombinierte onkologische Therapie (z.B. mittels Strahlentherapie oder Chemotherapeutika wie Trastuzumab oder Cyclophosphamid) als Risikofaktoren eingruppiert (Hallman et al. 2019; Krischer et al. 1997; Hoff et al. 1979; Lyon et al. 2022).

1.2 Das kardiale Ca^{2+} -Handling

Wie bereits erwähnt, unterliegt die Manifestation der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie überaus komplexen Mechanismen, welche noch nicht gänzlich verstanden sind. Um die komplexen Pathomechanismen von Doxorubicin am Herzen verstehen zu können, ist es unerlässlich sich die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle sowie den physiologischen Ca^{2+} -Haushalt bewusst zu machen, welche für die normale kardiale Funktion unabdingbar sind.

1.2.1 Die elektrische und mechanische Verknüpfung der Kardiomyozyten

Die Grundlage des Myokards stellen Kardiomyozyten dar. Kardiomyozyten weisen eine Anordnung in Muskelfasern auf, wobei die einzelnen Kardiomyozyten einer parallelen Anordnung folgen. Kardiomyozyten bilden ebenso wie Skelettmuskelzellen Synzytien aus und weisen folglich mehrere Nuclei auf. Die einzelnen Kardiomyozyten werden durch die sog. „Glanzstreifen“ (sog. *Disci intercalares*) verknüpft, welche sowohl transversal als auch longitudinal angeordnet sind (Manring et al. 2018). Diese *Disci intercalares* setzen sich aus mehreren Verbindungskomplexen zusammensetzen: desmosomalen Kontakten, Gap junctions, sowie der *Fascia adhärens* (siehe **Abb.4**) (Manring et al. 2018). Desmosomen dienen ebenso wie die *Fascia adhärens* der mechanischen Verknüpfung der Kardiomyozyten. Dabei bilden Desmosomen Kontakte zwischen dem Sarkolemm eines Kardiomyozyten und den Intermediärfilamenten (Desmin Filamenten) des angrenzenden Kardiomyozyten (Bennett 2018). Dieser Zellkontakt ist besonders in Gewebe mit besonderer physikalischer Belastung von Bedeutung, und ist folglich auch im kardialen Gewebe essentiell, um die kontraktile Belastungen während des Herzzyklus zu gewährleisten. Die weitere mechanische Verankerung der Kardiomyozyten wird über die *Fascia adhärens* gewährleistet, welche das Sarkolemm eines Kardiomyozyten mit dem Aktin-Zytoskelett des benachbarten Kardiomyozyten vernetzt und somit die Kraftübertragung zwischen den Kardiomyozyten ermöglicht (Sheikh et al. 2009; Manring et al. 2018). Die Verknüpfung der einzelnen Kardiomyozyten mittels Gap junctions gewährleistet hingegen die Vernetzung zu einem funktionellen Synzytium, und damit die synchrone Erregungsausbreitung bzw. elektrische Kopplung zwischen den einzelnen Kardiomyozyten. Diese funktionelle Verknüpfung stellt somit die Grundlage für die synchronisierte Kontraktion und strukturelle Integrität des Myokards dar.

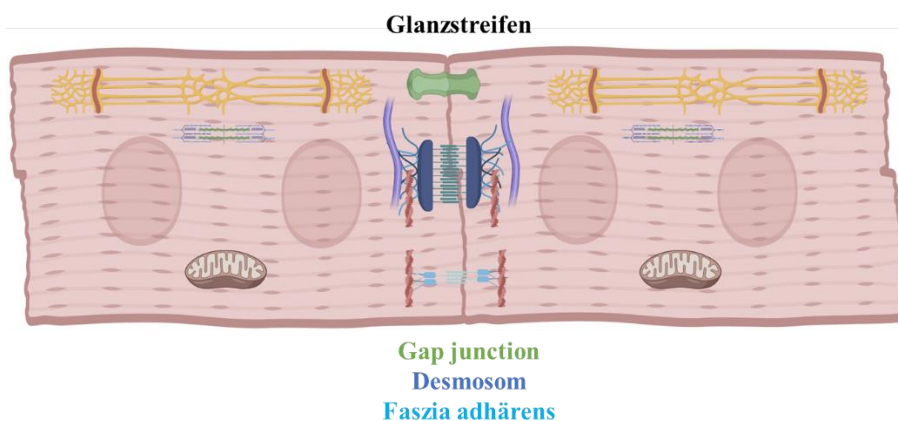


Abbildung 4 Die Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten

Die Interaktion der einzelnen Kardiomyozyten erfolgt über sog. Glanzstreifen, welche sich aus Gap junctions (grün), Desmosomen (dunkel blau), sowie der *Fascia adhärens* (hell blau) zusammensetzen. Gap junctions fungieren als Überträger elektrischer Signale, während Desmosomen und die *Fascia adhärens* der mechanischen Interaktion dienen. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

1.2.2 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

Grundlage einer unbeeinträchtigten kardialen Funktion stellen neben der elektrischen und mechanischen kardiomyozytären Verknüpfung die Ultrastruktur der Kardiomyozyten dar. Die beherrschenden Strukturen des Myokards bzw. dessen kleinster funktioneller Einheit, den Kardiomyozyten sind Myofibrillen (aufgebaut aus Myofilamenten), sowie T-Tubuli. Das T-Tubulus-System (transversale System) stellt dabei ein Hohlraumsystem dar, welches durch tubuläre Einstülpungen der Zellmembran zwischen den einzelnen Kardiomyozyten entsteht (Brette und Orchard 2003). Diese Membraneinstülpungen resultieren in der Oberflächenvergrößerung der Membran, was die schnelle Aktionspotentialausbreitung gewährleistet. Das T-Tubulus-System bildet zudem mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum eine Dyade aus, auf welcher die kardiomyozytäre Kontraktion basiert (Brette und Orchard 2003).

Des Weiteren erscheint die Anordnung der Myofibrillen lichtmikroskopisch als Querstreifung, welche auf der Anordnung der Myofibrillen in hintereinanderliegenden Sarkomeren basiert. Diese Querstreifung ergibt sich aus der Struktur der Sarkomere, welche der regelmäßigen, sowie wechselnden Anordnung von Aktin-, und Myosinfilamenten in A-Banden und I-Banden unterliegt. So weist jedes Sarkomer eine A-Bande, sowie zwei I-Banden auf. Die A-Bande weist dabei Myosinfilamente auf, während der Aufbau der I-Banden hingegen auf parallel verlaufende Aktinfilamenten basiert (G. Mall 1993; Sweeney und Hammers 2018; Huxley 1969). Diese Aktinfilamente überlappen mit den Myosinfilamenten der A-Bande bis zum Beginn der H-Zone (sog. Hensenscher Streifen), welche lediglich Myosinfilamente aufweist und lichtmikroskopisch insbesondere bei der starken Dehnung der Sarkomere erkennbar ist. Im Bereich der H-Zone werden Myosinfilamente benachbarter Sarkomere an der M-Linie (sog. Mittelstreifen) miteinander verknüpft, wobei Titin-abhängig die Stabilisierung der Myofilamente erfolgt. Aktinfilamente benachbarter Sarkomere werden hingegen im Bereich der Z-Scheiben (sog. Zwischenscheibe) miteinander verknüpft (siehe **Abb.5**) (Huxley und Niedergerke 1954; Sweeney und Hammers 2018). Folglich wird die Länge eines Sarkomers durch den Abstand der benachbarten Z-Scheiben definiert und beträgt 1.5-2 μm . Der kardiomyozytären Kontraktion liegen die komplexen Mechanismen der elektromechanischen Kopplung zugrunde.

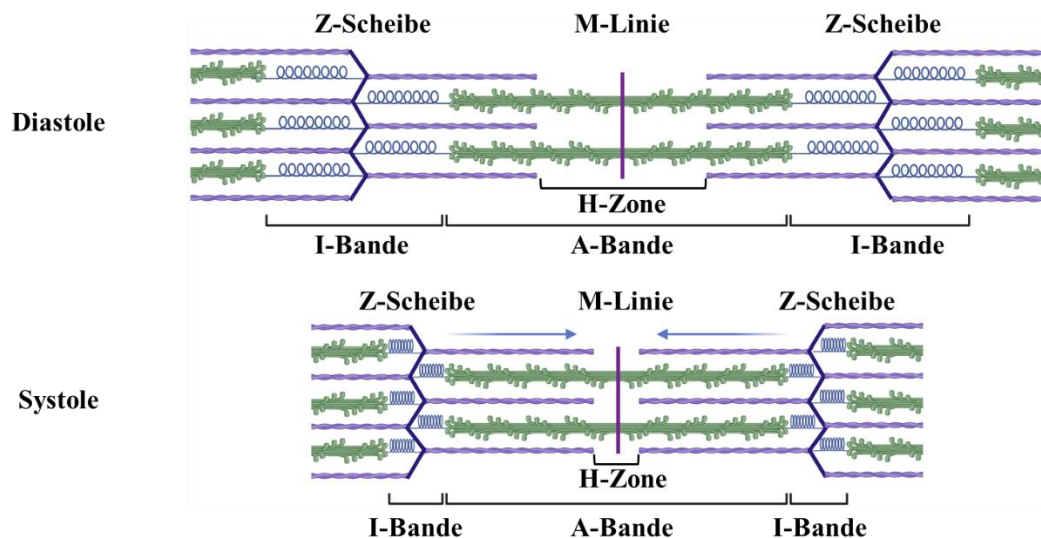


Abbildung 5 Der schematische Aufbau des Sarkomers

Charakteristischerweise untergliedert sich der Aufbau der Sarkomere in I-, sowie A-Banden. Während die Struktur der I-Banden auf Aktinfilamenten basiert, weisen die A-Banden Myosinfilamente auf. Die Myosinfilamente benachbarter Sarkomere werden an der M-Linie verknüpft. Im Bereich der Z-Scheibe werden hingegen benachbarte Aktinfilamente verknüpft. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

1.2.3 Die elektromechanische Kopplung

Durch die Entstehung eines Aktionspotentials kommt es zur elektromechanischen Stimulation des Myokards (siehe **Abb.6**). In Folge des Natrium (Na^+)-Einstroms (I_{Na}) über spannungsabhängige Natriumkanäle in das Zytoplasma kommt es zur Depolarisation des Membranpotentials, was als sog. Aufstrichphase des Aktionspotentials bezeichnet wird (Brown et al. 1981; Bers 2002; Gellens et al. 1992). Die Repolarisationsphase wird durch einen transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}) generiert (Birkeland et al. 2005). Die in Folge der I_{Na} -induzierte Depolarisation resultiert zudem in der Öffnung spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC oder Dihydropyridin-Rezeptoren genannt) der transversen Tubuli (T-Tubuli), sodass es zu einem transienten Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) entlang des elektromechanischen Gradienten in das Zytoplasma kommt (Bers 2002; Birkeland et al. 2005). Dieser einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Strom repräsentiert die sog. Plateauphase des Aktionspotentials (mit einer Dauer von bis zu 400 ms), bei welcher ein Gleichgewicht zwischen dem depolarisierenden LTCC-Strom und dem repolarisierenden K^+ -Auswärtsstrom besteht (Bers 2002; Birkeland et al. 2005; Kockskämper 2016). In Folge dieses Ca^{2+} -Einstroms, kommt es zum lokalen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, was die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), dem Ca^{2+} -Speicher der Kardiomyozyten, bewirkt (Fabiato 1983). Diese Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird durch die enge räumliche Distanz zwischen den LTCC und dem Ryanodin-Rezeptor (RyR2) induziert. Ryanodin-Rezeptoren repräsentieren die Ca^{2+} -Freisetzungskanäle des SR, deren Öffnungswahrscheinlichkeit durch die lokal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration gesteigert wird. Die Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren resultiert darauf in einem weiteren globalen Anstieg der

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von etwa 100 nmol -1 μmol auf 100 μmol (Bers 1993; Kocks-kämpfer 2016).

Das freigesetzte Ca^{2+} ist im Weiteren verantwortlich für die Induktion der kardiomyozytären Kontraktion. Die Kontraktion wird hierbei über die Bindung der freigesetzten Ca^{2+} -Ionen an die regulatorischen Untereinheiten der Aktinfilamente (Troponin und Tropomyosin) reguliert. Troponin setzt sich hierbei aus drei Untereinheiten zusammen, dem inhibitorischen Troponin I (TnI), dem Tropomyosin-bindenden TroponinT (TnT), sowie dem Ca^{2+} -bindenden Troponin C (TnC), welche eine funktionelle Einheit bilden (Gomes et al. 2002). Die Interaktion von Tropomyosin und Troponin (über TnT) ist dabei essentiell zur Bindung an Aktinfilamente, was die Interaktion von Myosin und Aktin inhibiert und folglich ebenso Kontraktionen verhindert. Kommt es hingegen zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, interagiert das freigesetzte Ca^{2+} mit TnC, was wiederum in einer Konformationsänderung von Troponin C resultiert und zur Interaktion mit TnI und TnT führt. Diese Interaktion der Troponin Untereinheiten bewirkt die Translokation des Troponin-Tropomyosin-Komplexes von den Aktinfilamenten, wodurch die Interaktion von Myosin und Aktin ermöglicht wird. Zur Induktion einer Kontraktion ist jedoch die Bewegung der Myosinfilamente entlang der Aktinfilamente nötig, wofür ATP benötigt wird. Der für die Kontraktion notwendige ATP-Verbrauch wird durch die ATPase-Domäne der Myosinfilamente gewährleistet, durch welche ATP unter Abspaltung eines Phosphatrestes in ADP hydrolysiert wird. Durch die Formation dieses Myosin-ADP-Komplexes und der Abspaltung des Phosphatrestes erfolgt die Interaktion von Myosin mit den Aktinfilamenten. Unter weiterer Abspaltung von ADP wird darauf eine weitere Konformationsänderung erzielt, sodass das Myosinköpfchen seine Neigung gegenüber Aktin von 90° auf 45° verändert, was die Verschiebung des Myosinfilamentes entlang des Aktinfilamentes bewirkt. Durch erneute Bindung von ATP an das Myosinköpfchen löst sich die zuvor entstandene Aktin-Myosin-Querbrücke bzw. Interaktion, sodass der Prozess der sog. „Gleitfilament-Theorie“ wiederholt werden kann (Herzog und Schappacher-Tilp 2023; Huxley 1969). Ca^{2+} stellt somit einen essentiellen Faktor zur Regulation der kardialen Kontraktion dar.

Für die diastolische Relaxation der Kardiomyozyten ist die Verminderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration essentiell, um die Dissoziation des Ca^{2+} von Troponin C zu bewirken. Diese Verminderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird durch den Transport des Ca^{2+} in das SR, sowie den Extrazellularraum und Mitochondrien erzielt, was v.a. durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), eine Ca^{2+} -Pumpe in der Membran des SR, den sarkolemmlen und mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1), sowie den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter gewährleistet wird (Aronsen et al. 2013; Bers 2002). Hierbei wird durch die SERCA2a Ca^{2+} unter ATP Hydrolyse in das Lumen des SR gepumpt und somit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration gesenkt. Durch den sarkolemmal lokalisierten NCX1 wird hingegen Ca^{2+} in den Extrazellularraum transportiert, während Natrium in das Zytoplasma befördert wird (sog. „Vorwärtsmodus“). Neben der sarkolemmlen Lokalisation des NCX1 wird durch die mitochondriale Lokalisation ebenso der Ca^{2+} -Transport in die mitochondriale Matrix bewirkt. Neben dem mitochondrial lokalisierten NCX1 wird Ca^{2+} zudem durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter in die mitochondriale Matrix transportiert, was mit ca. 1% jedoch nur einen geringen Anteil der diastolischen Ca^{2+} -Reduktion darstellt (Bers 2002). Einen ebenso geringen Anteil an der Ca^{2+} -Extrusion stellt die sarkolemmal lokalisierte Ca^{2+} -ATPase dar, welche Ca^{2+} unter ATP-Hydrolyse in den Extrazellularraum transportiert (Bers 2002). Durch diese Mechanismen wird die Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erzielt, sodass eine

diastolische Ca^{2+} -Konzentration von ca. 100 nmol erreicht wird und Troponin-gebundenes Ca^{2+} dissoziiert. Als Folge der Ca^{2+} -Dissoziation kommt es zur kardiomyozytären Relaxation.

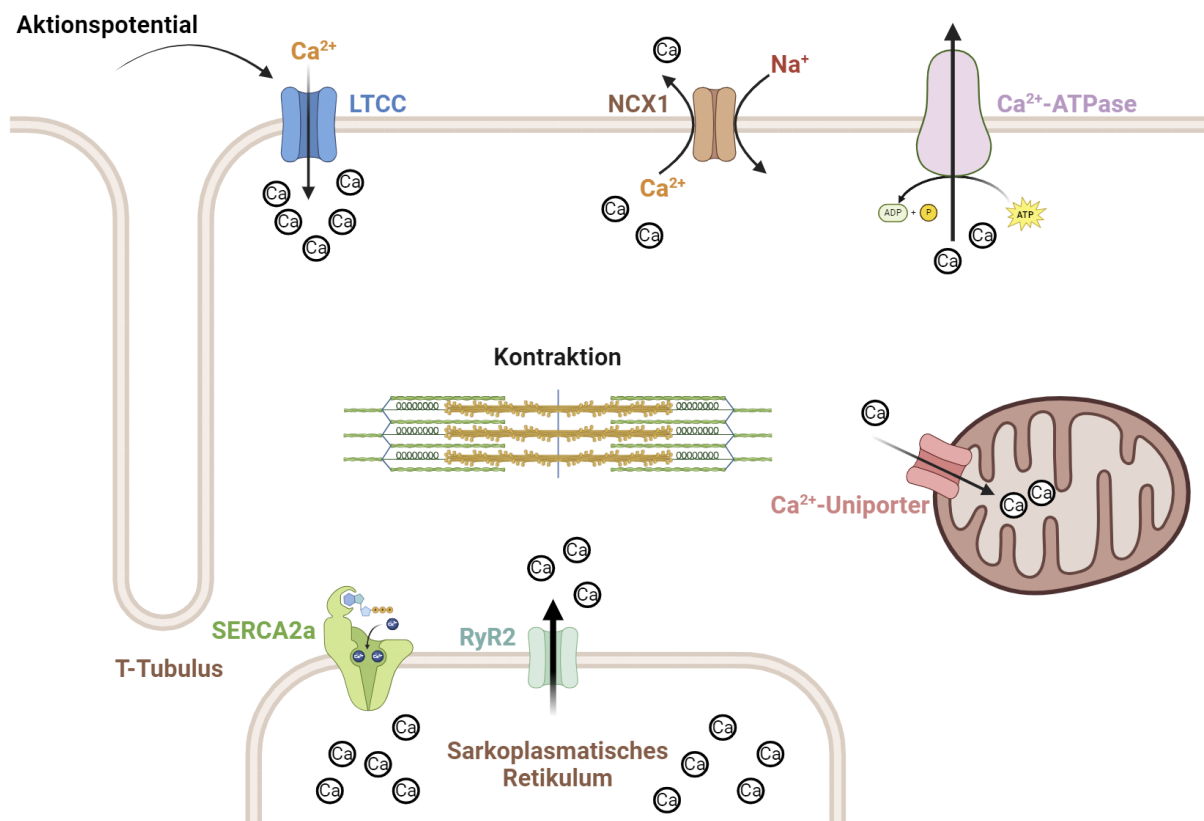


Abbildung 6 Die elektromechanische Kopplung

Der Aktionspotential-induzierte transienten Ca^{2+} -Einstrom über den LTCC resultiert in der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung über die sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptoren. Diese Ca^{2+} -Freisetzung resultiert in der Aktivierung der Myofilamente und folglich einer kardialen Kontraktion. Die kardiale Relaxation wird durch Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erzielt. Dabei wird Ca^{2+} über die SERCA2a in das SR, sowie über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in den Extrazellulärraum befördert. Eine geringfügige Ca^{2+} -Reduktion wird durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter, sowie die membranständige Ca^{2+} -ATPasen erzielt. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

Dysregulationen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes wurden bereits mit einer Vielzahl kardialer Erkrankungen in Verbindung gebracht, und ebenso bei der *akuten*, als auch *chronischen* Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie beschrieben. Durch Sag et al. wurde bereits an isolierten Wildtyp-Rattenkardiomyozyten, insbesondere die Doxorubicin-abhängige Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks als kardiotoxischer Pathomechanismus beschrieben, weshalb im Folgenden genauer auf das SR und die Regulation des SR Ca^{2+} -Gehaltes eingegangen werden soll (Sag et al. 2011).

1.2.3.1 Das Sarkoplasmatische Retikulum

Das Sarkoplasmatische Retikulum stellt einen essentiellen Regulator des kardialen Ca^{2+} -Stoffwechsels dar. Die Hauptfunktion dieses Zellkompartiments ist dabei die Sequestrierung und Freisetzung von Ca^{2+} . Der SR Ca^{2+} -Gehalt wird dabei maßgeblich durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA; bzw. kardiale Isoform SERCA2a), sowie den Ryanodin-Rezeptor reguliert. Durch Regulation des SR Ca^{2+} -Gehaltes wird ebenso die kardiale Kontraktionskraft reguliert, so besteht ein Zusammenhang zwischen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der kardialen Kontraktionskraft. Die Abnahme des SR Ca^{2+} -Gehaltes (z.B. in Folge einer reduzierten SR Ca^{2+} -Aufnahme durch die SERCA2a, oder durch ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck) resultiert folglich in einer Verminderung der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung, was in einer Beeinträchtigung der Kontraktilität resultiert. Entsprechend fungiert der SR Ca^{2+} -Gehalt und dessen Regulation über die SERCA2a und die Ryanodin-Rezeptoren als essentielles Element der kardialen Funktion.

1.2.3.2 Die Regulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Aufnahme über die SR- Ca^{2+} -ATPase

Die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) weist eine membranständige Lokalisation im SR auf und fungiert als Ca^{2+} -Transporter zur Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Folge der physiologischen Herzaktion. SERCA2a stellt dabei die kardial exprimierte Isoform dieser SR- Ca^{2+} -ATPase dar, wird jedoch auch im Skelettmuskel exprimiert. Die SR Ca^{2+} -Aufnahmefunktion der SERCA2a beruht im Wesentlichen auf einer Konformationsänderung der SERCA2a zwischen der E1 und E2-Struktur (siehe **Abb.7**). Im Rahmen der ATP-abhängigen Phosphorylierung der E1-Struktur kommt es zur Bindung von Ca^{2+} an die E1-Struktur der SERCA2a. Dies induziert die Konformationsänderung der SERCA2a-Struktur von E1 zu E2. In Folge dieser Konformationsänderung wird die Ca^{2+} -Freisetzung in das SR durch die niedrige Ca^{2+} -Affinität der E2-Struktur gewährleistet. Nach Dissoziation des Ca^{2+} erfolgt darauf eine wiederholte Konformationsänderung, sodass erneut die E1-Struktur der SERCA2a vorliegt, was einen erneuten Ablauf dieses SR Ca^{2+} -Aufnahme-Zyklus ermöglicht (Zhihao et al. 2020; Wuytack et al. 2002; Toyoshima und Nomura 2002). In Folge dieses wiederholten Zyklus kommt es folglich zur SERCA2a-vermittelten SR Ca^{2+} -Aufnahme, was in der Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und einer kardiomyozytären Relaxation resultiert.

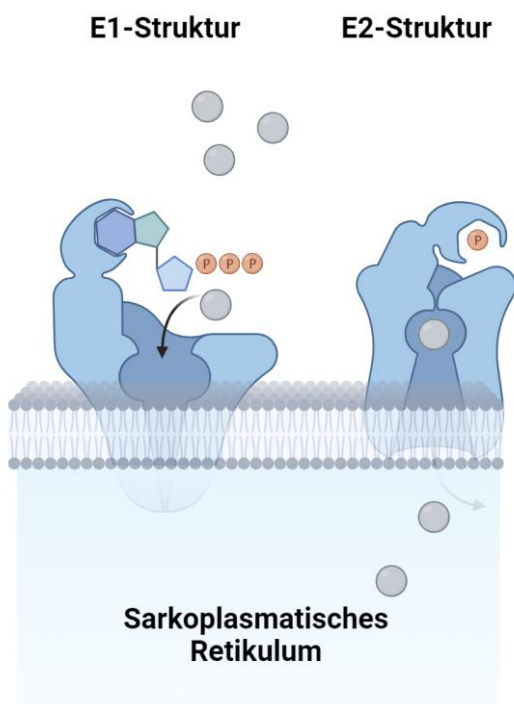


Abbildung 7 Die SERCA2a -abhängige SR Ca^{2+} -Aufnahme

Die SR Ca^{2+} -Aufnahme wird im Wesentlichen durch die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) reguliert. Der SERCA2a vermittelte Ca^{2+} -Transport in das SR-Lumen beruht dabei auf der Konformationsänderung zwischen der E1 und E2-Struktur. Die Phosphorylierung der E1-Struktur resultiert in einer Konformationsänderung des Transporters, was die Bindung von Ca^{2+} bewirkt. Durch ATP-Hydrolyse kommt es zur Konformationsänderung der E1-Struktur zur E2-Struktur, welche eine geringere Ca^{2+} -Affinität aufweist. Die Konformationsänderung der SERCA2a resultiert folglich in der Ca^{2+} -Freisetzung in das SR. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

Die Funktion der SERCA2a wird neben der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ebenso durch das sarkomemmale Membranprotein Phospholamban (PLB) reguliert. Dieses 52 Aminosäuren umfassende Transmembranprotein kann als 25 kDa großes Pentamer, sowie durch Dissoziation der Pentamerstruktur als 5 kDa großes Monomer vorliegen (Simmerman et al. 1986). Das PLB-Monomer reguliert dabei die SERCA2a -Funktion als endogener Inhibitor durch Komplexbildung mit SERCA2a mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Kim et al. 2009). Die Phosphorylierung des PLB-Monomers durch intrazelluläre Stresskinasen, wie der PKA $\text{RI}\alpha$ (an der Aminosäureposition Serin-16) oder die $\text{CaMKII}\delta$ (an der Aminosäureposition Threonin-17), sowie der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration resultiert hingegen in der Dissoziation des PLB-Monomers, was konsekutiv den inhibitorischen PLB-Effekt aufhebt (Kim et al. 2009; Colyer 1993; Simmerman und Jones 1998). Entsprechend wird durch die Phosphorylierung des PLB eine gesteigerte SERCA2a -Aktivität erlangt (siehe **Abb.8**) (Kim et al. 2009).

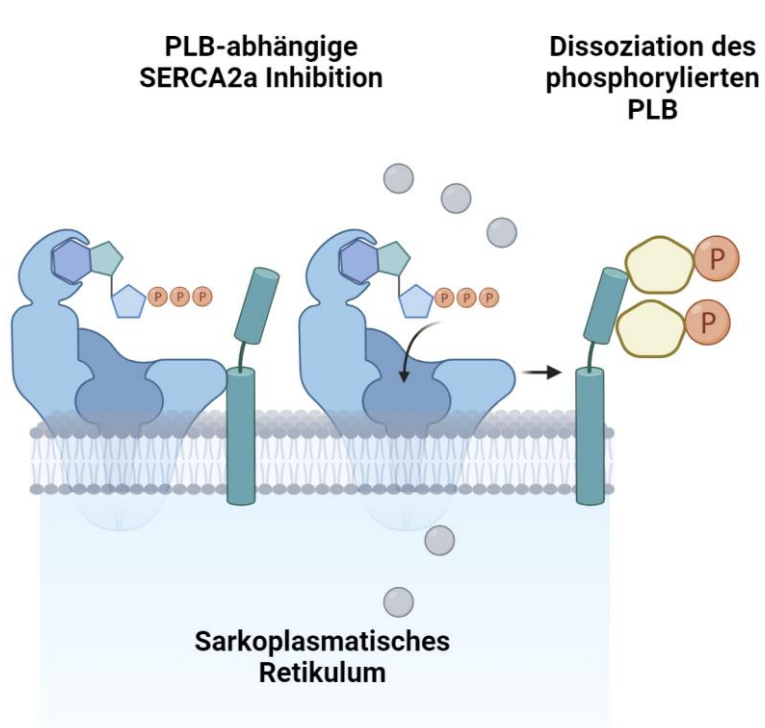


Abbildung 8 Die Phospholamban-abhängige Regulation der SERCA2a-Aktivität

Die SERCA2a-vermittelte SR Ca^{2+} -Aufnahme wird durch den endogenen SERCA2a-Inhibitor Phospholamban (PLB) reguliert. Die Komplexbildung zwischen dem PLB-Monomer und der SERCA2a bewirkt die Inhibition der SERCA2a-vermittelten SR Ca^{2+} -Aufnahme. Durch Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, sowie der PKA $\text{RI}\alpha$ -, und $\text{CaMKII}\delta$ -induzierten PLB-Phosphorylierung kommt es zur Dissoziation des PLB. Die Dissoziation des PLB-SERCA2a Komplexes resultiert folglich in der Aufhebung der inhibitorischen PLB-Wirkung und somit einer gesteigerten SR Ca^{2+} -Aufnahme. Eigene Darstellung, erstellt mittels Biorender.

1.2.3.3 Das diastolische SR Ca^{2+} -Leck über den Ryanodin-Rezeptor

Einen weiteren Regulator des SR Ca^{2+} -Gehaltes stellen die Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) des SR dar. Die Ryanodin-Rezeptoren fungieren als Ca^{2+} -Freisetzungskanäle in der Plasmamembran des SR und sind für die physiologische Herzaktion unerlässlich. Mit einem Molekulargewicht von ~ 565 kDa pro Untereinheit stellt der Ryanodin-Rezeptor den derzeit größte bekannte Ionenkanal dar und weist eine homotetramere, symmetrische Struktur auf, wobei 90% der Untereinheiten zytosolisch und lediglich 10% membranständig lokalisiert sind (Kushnir et al. 2018; Zahradník et al. 2005). Nach aktuellem Forschungsstand werden drei Ryanodin-Rezeptor Isoformen voneinander differenziert (RyR1-3), wobei RyR2 die kardial exprimierte Isoform darstellt (Kushnir et al. 2018; Bauerová-Hlinková et al. 2020).

Die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors erfolgt dabei durch verschiedene Stimuli, neben akzessorischen Bindeproteinen wie dem FK506-bindenden Protein (FKBP12.6), Calsequestrin, Triadin, Junctin, kann auch eine steigende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (z.B. durch den transienten Ca^{2+} -Einstrom über den spannungsabhängigen LTCC) in der Kanalöffnung resultieren (Altschafli et al. 2011; Marty 2015; Prestle et al. 2003). Die räumliche Nähe zwischen den T-Tubuli lokalisierten LTCC und den Ryanodin-Rezeptoren ist dabei essentiell zur Induktion der „ Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung“ durch die Ryanodin-Rezeptoren. Ebenso

kann über posttranslationale Modifikationen z.B. durch Oxidation der cysteinreichen RyR2-Untereinheiten die Kanalöffnung induziert werden. Nach aktuellem Forschungsstand wurden so bereits 100 Cysteinreste pro Untereinheit der Ryanodin-Rezeptoren nachgewiesen, wovon etwa 20 redox-abhängig modifiziert werden können (Lanner 2012; Zable et al. 1997; Xu et al. 1998). Weitere posttranslationale Modifikationen der Ryanodin-Rezeptoren werden durch Phosphorylierungen durch intrazelluläre Stresskinasen induziert, wobei die Proteinkinase A (PKA) oder die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII δ) hierbei besondere Beachtung erlangt haben. In Folge konsekutiver Phosphorylierungen (v.a. durch die CaMKII δ an der Aminosäureposition Serin-2814, sowie Serin-2808/2809 des RyR2 oder durch die PKA (bzw. PKA RI α) an der Aminosäureposition Serin-2808/2809), kann somit das sogenannte SR Ca^{2+} -Leck induziert werden, was einen bekannten Pathomechanismus der Herzinsuffizienz repräsentiert (Ai et al. 2005; Antos et al. 2001; Schlüter 2016) (siehe **Abb.9**). Die Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks resultiert in der Ca^{2+} -Depletion des SR und folglich einer verminderten systolischen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, was eine beeinträchtigte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Myofilamente bewirkt, und folglich mit einer verminderten Kontraktilität vergesellschaftet ist. Die Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks wurde nach aktuellem Forschungsstand auch bereits in der *akuten* Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie durch Sag et al. beschrieben (Sag et al. 2011). In dieser Publikation wurde erstmals beschrieben, dass es in ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp-Ratten unter *akuter* Doxorubicin-Exposition zu einer gesteigerten Autophosphorylierung der CaMKII kommt, was für eine gesteigerte CaMKII-Aktivierung spricht. Das konsekutiv entstandene CaMKII-induzierte SR Ca^{2+} -Leck resultierte in einer diastolischen Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyten, sowie der Reduktion der systolischen Ca^{2+} -Transientenamplitude und einer kontraktilen Dysfunktion (Sag et al. 2011). Ergänzend wurde in einer weiteren Studie von Hanna et al. die *akute* Doxorubicin-induzierte Oxidation der RyR2-Thiolgruppen nachgewiesen, was den direkten Doxorubicin/ROS-Effekt auf die RyR2-Funktion und die Induktion eines diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unabhängig von zentralen Stresskinasen hervorhebt (Hanna et al. 2014). Ebenso wurde bereits die Rolle der Hyperphosphorylierung des RyR2 bei der *chronischen* DICM durch Llach et al. gezeigt (Llach et al. 2019). In Folge der *chronischen* Doxorubicin-Exposition mit einer kumulativen Dosis von 10 mg/kg konnte durch Llach et. al neben einer gesteigerten CaMKII δ -, sowie PKA-abhängigen Hyperphosphorylierung des RyR2 (an Serin-2814 bzw. Serin-2808/2809) ein konsekutiv gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck und eine damit verbundene Beeinträchtigung der systolischen Ca^{2+} -Transientenamplitude nachgewiesen werden (Llach et al. 2019). Im Rahmen dieser Studien konnte somit die Bedeutung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks, sowohl bei der *akuten*, als auch *chronischen* DICM als Pathomechanismus bereits beschrieben und die Relevanz der posttranslationalen Modifikation des RyR2 durch intrazelluläre Stresskinasen bzw. oxidativen Stress hervorgehoben werden.

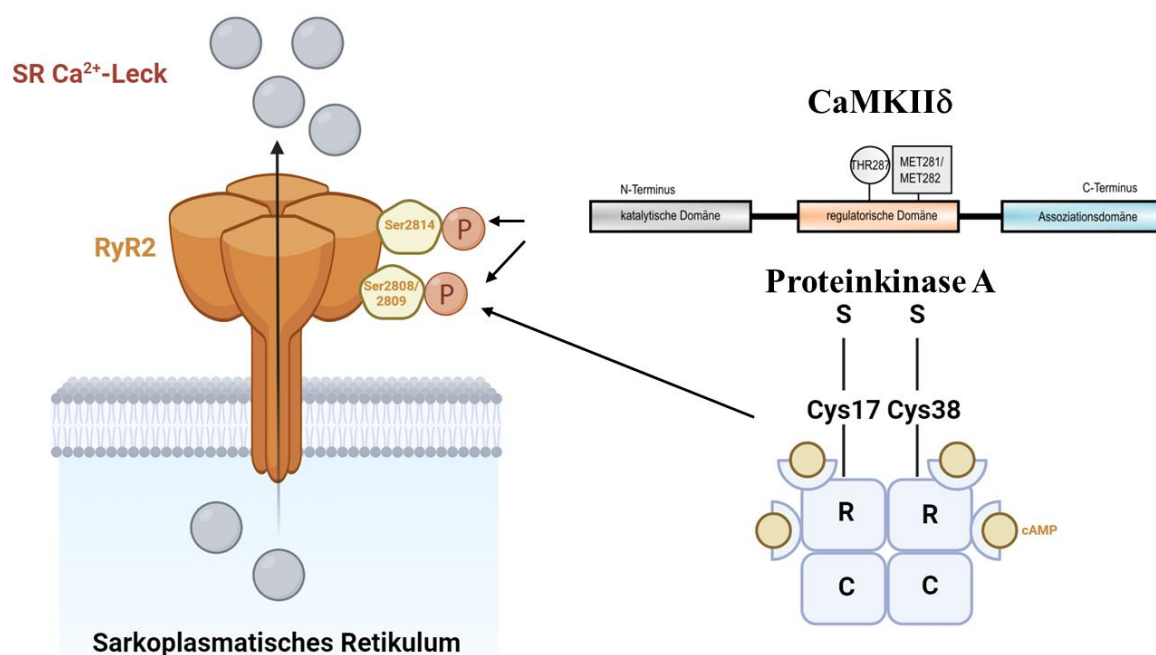


Abbildung 9 Struktur des Ryanodin-Rezeptors und Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks

Der Ryanodin-Rezeptor weist eine homotetramere, symmetrische Struktur auf, wobei dieser sarkoplasmatische SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanal in der Plasmamembran des SR exprimiert wird. Neben der Induktion der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Freisetzung durch lokale Erhöhung der zyttoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration im Rahmen des transienten Ca^{2+} -Einwärtsstroms über die LTCCs, wird eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 ebenso durch zentrale kardiale Kinasen induziert. Die Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2808/2809, sowie die CaMKIIδ-abhängige Phosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2808/2809, sowie Serin-2814 resultieren somit ebenso in einem gesteigerten SR Ca^{2+} -Leck. Neben der genannten Modifikation der RyR2-Aktivität durch Phosphorylierung, wird das SR Ca^{2+} -Leck jedoch auch durch Oxidation der redox-sensitiven Cysteinreste induziert. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

1.3 Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die elektromechanische Kopplung des Myokards wird durch verschiedene Kinasen und Phosphatasen reguliert. Besondere Beachtung hat im kardialen Gewebe jedoch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase erlangt, welche eine Reihe intrazellulärer Proteine phosphoryliert und damit einen essentiellen Regulator des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes darstellt.

1.3.1 Struktur und Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Die CaMKII stellt eine multifunktionelle Serin/Threonin-Proteinkinase dar, wobei vier CaMKII-Gene voneinander differenziert werden: CaMKIIα, CaMKIIβ, CaMKIIγ, und

CaMKII δ (Braun und Schulman 1995; Maier und Bers 2002, 2007). Die kardial vorherrschende Isoform repräsentiert die δ -Isoform, wobei auch die γ -Isoform kardial exprimiert wird, jedoch mit einem Verhältnis von 1:2.5 deutlich vermindert vorliegt im Vergleich zur dominierenden CaMKII δ -Isoform (Beckendorf et al. 2018). Hierbei werden zwei Splicevarianten der CaMKII δ -Isoform voneinander differenziert: die CaMKII δ_B und CaMKII δ_C -Splicevariante. Während die δ_B -Splicevariante der CaMKII δ -Isoform lediglich im Nukleus exprimiert wird, weist die CaMKII δ_C -Isoform eine zytosolische Expression auf (Maier und Bers 2002).

Das CaMKII-Holoenzym besteht aus 6-12 ringförmig angeordneten Untereinheiten, den sogenannten CaMKII-Monomeren. Die einzelnen CaMKII-Monomere setzen sich dabei aus 478 Aminosäuren zusammen und untergliedern sich in eine amino-terminale katalytische Domäne, eine zentrale regulatorische Domäne, welche eine autoinhibitorische Region, als auch die Ca²⁺/Calmodulin-Bindestelle beinhaltet, und eine carboxy-terminale Assoziationsdomäne. Die für die Oligomerisation verantwortlichen Assoziationsdomänen sind dabei in das Zentrum des Holoenzymen gerichtet, während die katalytischen Domänen nach außen orientiert sind. Über die katalytischen Domänen erfolgt die Interaktion der CaMKII mit verschiedensten Zielproteinen durch Phosphorylierung von Serin und Threonin-Resten (Beckendorf et al. 2018; Hunter und Schulman 2005; Erickson et al. 2008) (siehe **Abb.10**).

Im inaktiven Zustand wird die katalytische Domäne der CaMKII in ihrer Kinaseaktivität durch die regulatorische Domäne sterisch behindert, in Folge dessen die CaMKII-Zielproteine nicht phosphoryliert werden können. Die Aktivierung der CaMKII erfolgt im Rahmen einer zytosolischen Ca²⁺-Erhöhung (z.B. im Rahmen des transienten Ca²⁺-Einstroms über die LTCCs), wobei der Ca²⁺/Calmodulin-Komplex durch Bindung von vier Ca²⁺-Ionen an Calmodulin gebildet wird. Dieser Ca²⁺/Calmodulin-Komplex interagiert mit der zentral-regulatorischen Domäne, wodurch es zu einer Konformationsänderung der autoinhibitorischen Domäne kommt und die CaMKII primär aktiviert wird. Die katalytische Domäne erhält durch diese Konformationsänderung zudem Zugang zu den CaMKII-Zielproteinen, u.a. dem Threonin-287 im Bereich der regulatorischen Domäne. Im Rahmen dieser Autophosphorylierung benachbarter CaMKII-Monomere (an der Aminosäureposition Threonin-287) wird die Aufrechterhaltung des aktivierten Zustandes der CaMKII unabhängig von der Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes bewirkt. Neben der Autophosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-287 kann durch die Phosphorylierung von Threonin-306/307 eine partielle Aktivität der CaMKII selbst nach Dissoziation des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes und Abfall der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration gewährleistet werden (Bhattacharyya et al. 2020). Neben diesen Phosphorylierungs-sensitiven Threonin-Resten befinden sich in der zentral-regulatorischen Domäne ein weiteres Aminosäurepaar (Methionin-281/282), welches durch posttranslationale Modifikationen ebenso in einer anhaltenden CaMKII-Aktivierung unabhängig von der Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes resultiert. Im Rahmen von oxidativem Stress kann es somit zur Oxidation des redox-sensitiven Methioninpaares kommen, was die dauerhaften CaMKII-Aktivierung bewirkt (Wang et al. 2021). Darüber hinaus kann die autonome Aktivierung der CaMKII durch O-Glykosylierung (O-Glc-NAc)-Modifikation an der Aminosäureposition Serin-280 innerhalb der regulatorischen Domäne entstehen. Diese O-Glc-NAc-abhängige autonome CaMKII-Aktivierung hat insbesondere bei der Pathogenese der Diabetes Mellitus durch erhöhte Glukoselevel Bedeutung erlangt (Erickson et al. 2013).

Die Inaktivierung der CaMKII erfolgt durch Dephosphorylierung mittels der Proteinphosphatasen PP1, PP2, sowie PP2C. (Erickson et al. 2008; Strack et al. 1997; Maier und Bers 2007).

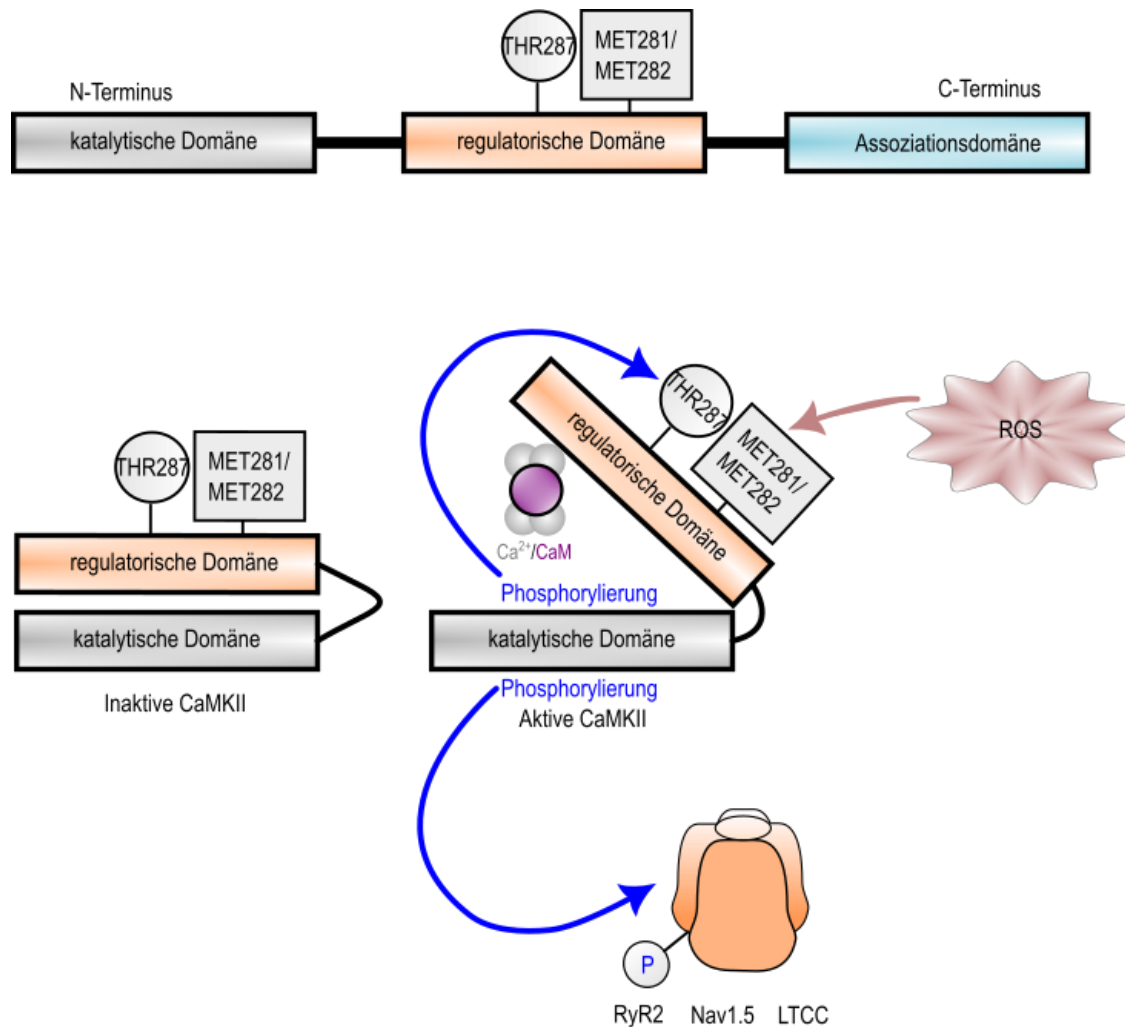


Abbildung 10 Aufbau und Aktivierung der CaMKII

Die CaMKII wird in ihrem Aufbau in drei Domänen untergliedert, die N-terminale katalytische Domäne, die C-terminale Assoziationsdomäne, sowie die zentral-regulatorische Domäne. Im Zuge der Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an die regulatorische Untereinheit kommt es zur Konformationsänderung der regulatorischen Untereinheit, wodurch die Kinaseaktivität der katalytischen Domäne Zugang zu ihren Zielproteinen erhält. Potentielle CaMKII-Zielproteine stellen neben der Aminosäure Threonin-287 benachbarter CaMKII-Monomere zentrale Ca^{2+} -regulierende Elemente, wie der LTCC oder der RyR2 dar. Eigene Darstellung, erstellt mittels Inkscape.

1.3.2 Die physiologische und pathophysiologische Rolle der CaMKII δ für den kardialen Ca²⁺-Stoffwechsel

Die Aktivierung der CaMKII δ resultiert in der Phosphorylierung einiger zentraler Regulatoren der elektromechanischen Kopplung, und moduliert somit deren Funktion.

Im Rahmen einer physiologischen, positiv-inotropen Herzaktion (z.B. durch β -adrenerge Stimulation, „fight or flight“) kommt es durch erhöhte Katecholaminlevel zu einer gesteigerten Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren, was in einem Anstieg der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration resultiert (Lohse et al. 2003; Grimm und Brown 2010). Diese zytoplasmatische cAMP-Erhöhung resultiert im Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Level, wodurch die CaMKII δ aktiviert wird (Dewenter et al. 2017). Zudem kommt es durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Zuge der gesteigerten Angiotensin-II Produktion (AngII) zur Stimulation membranständiger AngII-Rezeptoren (AT₁R, Angiotensin II – Typ 1 Rezeptoren). Die Aktivierung dieser AngII-Rezeptoren resultiert in der Aktivierung der NADPH-Oxidasen (NOX2 und NOX4), wodurch es zur gesteigerten Superoxid-Produktion (via NOX2) und Hydrogenperoxidproduktion (via NOX4) und einer konsekutiv oxidativen Aktivierung der CaMKII δ durch Oxidation des redox-sensitiven Methioninpaars (Methionin-281/282) kommt (Wagner et al. 2014; Nguyen Dinh Cat et al. 2013). Im Zuge der CaMKII δ -Aktivierung wird durch die CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung des sarkolemmalen LTCC (an der Aminosäureposition Threonin-498), sowie Regulation des SR Ca²⁺-Gehaltes durch Phosphorylierung des RyR2 (an den Aminosäurepositionen Serin-2808/09 bzw. Serin-2814) und des SERCA2a-Regulators PLB (an der Aminosäureposition Threonin-17) der kardiale Ca²⁺-Haushalt reguliert (Sag et al. 2013). Dabei bewirkt die physiologische, gleichermaßen ausgeprägte Phosphorylierung des RyR2 und des SERCA2a-Regulators PLB ein Gleichgewicht der RyR2-induzierten SR Ca²⁺-Freisetzung und der PLB/SERCA2a vermittelten SR Ca²⁺-Aufnahme. Im Zuge dieser Sympathikus-induzierten Stimulation kommt es zu einem Anstieg des kardialen Auswurfvolumens, sowie einer steigenden Kontraktionskraft. Dysregulationen dieses Gleichgewichtes zwischen RyR2-induzierter SR Ca²⁺-Freisetzung und PLB/SERCA2a-induzierter SR Ca²⁺-Aufnahme wurden als molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz durch Studien beschrieben. So kommt es im Zuge einer CaMKII δ -abhängigen Hyperphosphorylierung des RyR2, in Folge der erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2, zur Induktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks. Diese gesteigerten spontanen diastolischen Ca²⁺-Freisetzungen haben nicht nur die Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes zur Folge, was in einer kontraktile Dysfunktion resultiert, sondern sind ebenso mit einer diastolischen Ca²⁺-Überladung der Zelle vergesellschaftet. Die diastolische Ca²⁺-Überladung der Zelle kann als Resultat der Sensibilisierung des RyR2 zusätzlich das SR Ca²⁺-Leck steigern.

CaMKII δ -abhängig wird zudem die Funktion des membranständigen LTCC reguliert. Durch Phosphorylierung (an der Aminosäureposition Threonin-498) kommt es durch Erhöhung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit zu einem steigenden transienten Ca²⁺-Einwärtsstrom (I_{Ca}), sowie einer verlangsamten Inaktivierung dieses I_{Ca}, was in einer verlängerten Plateauphase des Aktionspotentials resultiert (Grueter et al. 2006; Koval et al. 2010). Darüber hinaus wird die Induktion früher Nachdepolarisationen (EADs) gefördert (Koval et al. 2010). Erhöhungen der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration sind zudem mit einer Steigerung des NCX-

Vorwärtsmodus assoziiert, was wiederum in einer Na^+ -Überladung der Zelle resultieren kann. Aber auch die CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung des Nav1.5 resultiert in einer steigenden zyttoplasmatischen Na^+ -Konzentration (Takla et al. 2020; Hund et al. 2010). Diese Na^+ -Überladung bewirkt die Aktivierung des NCX-Rückwärtsmodus, was in einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle resultiert, und erneut pro-arrhythmogen wirkt.

Die pathophysiologische Rolle der CaMKII δ wurde bereits bei einigen Krankheitsbildern nachgewiesen. So zeigte sich zum Beispiel in einem Mausmodell, in welchem durch TAC die Manifestation einer kardialen Hypertrophie erzielt wurde, eine erhöhte CaMKII δ -Aktivität, wobei es zur Induktion CaMKII δ -abhängiger Arrhythmien kam (Colomer et al. 2003). Des Weiteren konnte die pathophysiologische Relevanz der CaMKII bereits bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns nachgewiesen werden. Eine Studie von Neef et al. zeigte, dass Vorhofflimmern mit einer erhöhten CaMKII-Expression sowie Hyperaktivierung der CaMKII (gekennzeichnet durch eine gesteigerte Autophosphorylierung der CaMKII) verbunden ist (Neef et al. 2010). Die pathophysiologische Bedeutung der CaMKII wurde ebenso bei der Pathogenese des Myokardinfarktes hervorgehoben. Hund et al. wies in diesem Kontext die gesteigerte Autophosphorylierung (und folglich Aktivität) der CaMKII in der Randzone des Myokardinfarktes nach, was mit Dysregulationen des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts assoziiert wurde (Hund et al. 2008). Des Weiteren zeigten transgene Mausmodelle, welche eine CaMKII δ -Überexpression aufweisen, eine erhöhte Arrhythmogenität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren, wobei diese Arrhythmien durch Behandlung mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93 verhindert werden konnten (Wu et al. 2002; Sag et al. 2009). Im Zuge aktueller Studien zur DICM wurde die Rolle der CaMKII δ für die Pathogenese der Kardiotoxizität bereits ebenso belichtet.

1.3.3 Pathophysiologische Rolle der CaMKII δ in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie

Beeinträchtigungen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes, sowie die Rolle der CaMKII δ für die Pathogenese der DICM wurde bislang nur in wenigen Studien untersucht. So konnte durch Sag et al. in *in-vitro* Experimenten zur *akuten* DICM, in welchen isolierte Rattenkardiomyozyten mit Doxorubicin behandelt wurden, gezeigt werden, dass die *akute* DOX-Exposition in einer gesteigerten Autophosphorylierung und folglich einer gesteigerten CaMKII δ -Aktivität resultiert. Diese gesteigerte CaMKII δ -Aktivierung ist vergesellschaftet mit einer CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung (an der Aminosäureposition Serin-2814) und einem konsekutiv gesteigerten SR Ca^{2+} -Leck. Die Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehalts resultierte dabei in einer systolischen Dysfunktion. Ebenso wurde in Folge des gesteigerten SR Ca^{2+} -Lecks eine diastolische Ca^{2+} -Überladung nachgewiesen. Die KN-93-abhängige Inhibition der CaMKII verhinderte diese DOX-induzierten Dysregulationen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes, was die Involvierung der CaMKII δ bei den *akuten* DOX-induzierten Ca^{2+} -Dysregulationen hervorhebt.

Aber auch der Einfluss der *chronischen* DOX-Behandlung wurde bereits belichtet. Durch Azam et al. konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass es durch die *chronische* DOX-

Behandlung (mit einer kumulativen Dosis von 10 mg/kg) bereits nach zwei Wochen zur Reduktion der fraktionellen Myokardverkürzung kommt. Ebenso wurde eine Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion nachgewiesen. Diese beeinträchtigte kardiale Funktion war mit einer verlangsamten Relaxation sowie einer erhöhten Alternanz der induzierten Ca^{2+} -Transienten assoziiert (Azam et al. 2021). Durch Lach et al. wurde in einem weiteren *in-vivo* Modell ebenso die Ca^{2+} -Dysregulation infolge der *chronischen* DICM und die Rolle der CaMKII δ näher beleuchtet. So zeigte sich nach kumulativer Gabe von 10 mg/kg DOX, die CaMKII δ -abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 mit konsekutiv gesteigertem diastolischem SR Ca^{2+} -Leck und Ca^{2+} -Waves (Llach et al. 2019). Ebenso wurde in Folge der *chronischen* DOX-Behandlung eine verminderte SERCA2a-Expression nachgewiesen, was in einer verlangsamten Relaxation der Kardiomyozyten resultierte (Llach et al. 2019).

Durch diese Studien konnte somit gezeigt werden, dass es im Zuge der *akuten*, als auch der *chronischen* DICM zu Dysregulationen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes kommt, wobei die CaMKII δ -abhängige Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks einen zentralen Pathomechanismus einzunehmen scheint. Die spezifischen Aktivierungsmechanismen der CaMKII δ (Aktivierung durch Autophosphorylierung vs. redox-bedingte Aktivierung) bei der Pathogenese der *akuten*, als auch *chronischen* DICM wurden jedoch bislang noch nicht differenziert.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies stellen O_2 -Derivate mit erhöhter Reaktivität dar (Schieber und Chandel 2014). Unter aeroben Konditionen kommt es durch verschiedenste Stoffwechselvorgänge zu einer konstanten, endogenen ROS-Produktion (Köhler et al. 2014). So werden ROS beispielsweise durch die mitochondriale Elektronentransportkette, sowie verschiedene enzymatische Systeme (z.B. NADPH-Oxidasen, NO-Synthetasen) produziert. Antioxidative Systeme (wie die Superoxid-Dismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase) fungieren hingegen als zelluläre ROS-Reduktoren, sodass ein physiologisches Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Reduktion vorliegt. In niedrigen Konzentrationen fungieren ROS als essentielle Second-Messenger (Valko et al. 2007). Ein moderater ROS-Anstieg wurde bereits als adaptiver Mechanismus bei kardialer Hypoxie beobachtet, während die exzessive ROS-Produktion durch erhöhte endogene ROS-Produktion, oder exogene ROS-Produktion (z.B. durch Doxorubicin) in einem erhöhten oxidativen Stress resultiert, welcher durch antioxidative Systeme nicht mehr reduziert werden kann (Köhler et al. 2014). Pathologisch erhöhte ROS-Level resultieren folglich in der redox-abhängigen Modifikation von Proteinen und Lipiden, sowie der Induktion von Apoptose. Darüber hinaus unterliegen zentrale kardiale Stresskinasen, wie die PKA RI α oder die CaMKII δ einer alternativen oxidativen Aktivierung, wodurch veränderte ROS-Level PKA RI α /CaMKII δ -abhängige Signalwege (z.B. den kardialen Ca^{2+} -Haushalt) modifizieren können.

1.4.1 Die Subgruppen reaktiver Sauerstoffspezies und deren Produktion

Die Einteilung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt dabei in zwei Gruppen: Verbindungen, welche freie Sauerstoffradikale aufweisen, sowie nicht-radikalische Sauerstoffderivate (Phaniendra et al. 2015; Halliwell 2005). Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Alkylradikale ($RO\cdot$), sowie Peroxylradikale ($ROO\cdot$) stellen freie Sauerstoffradikale dar und weisen durch die ungerade Anzahl an Elektronen einen instabilen, hochreaktiven Charakter auf (Phaniendra et al. 2015; Halliwell 2005). Hypochlorsäure ($HOCl$), und Hydrogenperoxid (H_2O_2) stellen hingegen Vertreter der nicht-radikalen Sauerstoffderivate dar, welche jedoch in Radikale transferiert werden können oder als Oxidationsmittel fungieren können (Kohen und Nyska 2002; Halliwell 2005; Phaniendra et al. 2015).

Zellulär finden sich verschiedenste ROS-produzierende Enzyme. ER-lokalisiert fungieren beispielsweise Cytochrom P450, oder Diaminoxidasen als ROS-Produzenten. Peroxisomal werden hingegen die Acyl-CoA-Oxidase, die D-Aminosäure-Oxidase, oder die Xanthinoxidase exprimiert (Duve und Baudhuin 1966). Den größten Anteil an der zellulären ROS-Produktion haben jedoch die NADPH-Oxidasen (NOX), sowie die mitochondriale Elektronentransportkette (ETC) (Gambardella et al. 2017; Burgoyne et al. 2012).

Es werden sieben NOX-Isoformen voneinander differenziert, wobei NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 kardial exprimiert werden (Nazari et al. 2023; Sag et al. 2013; Burgoyne et al. 2012; Lassègue et al. 2012). NOX2 und NOX4 stellen jedoch die am stärksten kardial exprimierten Isoformen dar (Gray et al. 2019; Lassègue et al. 2012; Sag et al. 2013). Das membranständig lokalisierte NOX2 wird durch hypertrophe Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, oder mechanischen Stress aktiviert. NOX2-abhängig kommt es dabei zur Reduktion von O_2 , was in der O_2^- -Produktion resultiert (Sag et al. 2013). Im Rahmen einer Studie von Ma et al. konnte bereits die Rolle von NOX2 bei der akuten DICM nachgewiesen werden (Ma et al. 2020). So zeigte sich in Folge der akuten DOX-Behandlung die Phosphorylierung der p47phox-Untereinheit von NOX2, was in der Aktivierung der Oxidase resultiert und mit einem ROS-Anstieg einhergeht (Ma et al. 2020). NOX4 wird ebenfalls durch hypertrophe Stimuli aktiviert und resultiert ebenso in der O_2^- -Produktion durch Reduktion von O_2 (Sag et al. 2013). Das formierte O_2^- resultiert durch Reaktion mit Wasser anschließend in der Bildung von H_2O_2 . Die NOX4-induzierte ROS-Produktion konnte durch Zheng et al. bereits auch bei der Pathogenese der DICM nachgewiesen werden. Sowohl *in-vivo*, als auch *in-vitro* konnte die DOX-induzierte NOX4-Aktivierung und die damit assoziierte ROS-Generation dargelegt werden (Zheng et al. 2022).

Neben der Gruppe der NOX fungieren Stickstoffmonoxidsynthetasen (NOS) als weitere ROS-Produzenten. Durch die NOS-induzierte Reaktion von Arginin zu Citrullin kommt es zur Formation des Stickstoffmonoxidradikals ($NO\cdot$), welches mit O_2^- reagiert und in der Formation hochreaktiver Peroxynitritanionen ($ONOO^-$) resultiert (Dröge 2002; Palmer et al. 1988; Stamler et al. 1992). So wurde bereits auch die NOS-induzierte ROS-Formation unter DOX-Behandlung nachgewiesen (Kong et al. 2022).

Darüber hinaus erfolgt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der mitochondrialen Elektronentransportkette. Zur Gewährleistung einer konstanten Verfügbarkeit von ATP ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen Citratzyklus und Elektronentransportkette

(Atmungskette) essentiell. Im Rahmen des Citratzyklus kommt es zur Produktion von NADH und FADH₂, welche Elektronen an Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) der Atmungskette abgeben. In Folge dessen kommt es zur Reduktion zu NAD⁺ und FAD. Durch weitere Reaktionen entlang der Atmungskette kommt es zur Translokation von Protonen über die innere mitochondriale Membran, was im Aufbau eines Protonengradienten, sowie eines elektrischen Gradienten resultiert. Diese Gradienten werden folglich genutzt, um die ATP-Produktion mittels der F₁F₀-ATP-Synthase zu gewährleisten. Eine kardiale Kontraktion benötigt 2% des intrazellulären ATPs, was verdeutlicht, wie essentiell dieser Mechanismus für die kardiale Funktion ist. 0.2 - 2% der transferierten Elektronen folgen jedoch nicht diesen Signalwegen, sodass diese direkt mit O₂ reagieren, was in der Formation von O₂⁻ und H₂O₂ resultiert und die Bedeutung der Elektronentransportkette als weiteren ROS-Produzent hervorhebt.

Neben diesen ROS-produzierenden zellulären Elementen, existieren zudem antioxidative Systeme, um eine übermäßige ROS-Generation zu verhindern. Als zentrale antioxidative Systeme fungieren dabei neben der Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPx), sowie Katalase und Glutathion (GSH) (Dröge 2002). Superoxid-Dismutase-abhängig wird die Oxidation von O₂⁻ zu O₂ katalysiert (Dröge 2002). Katalase-abhängig wird hingegen der Abbau von H₂O₂ in H₂O und O₂ erzielt (Dröge 2002). Ebenso enzymatisch wird der Abbau von ONOO⁻ durch GPx katalysiert. Neben diesen enzymatisch basierten antioxidativen Mechanismen, fungiert Glutathion (GSH) als weitere essentielle antioxidative Komponente. Dabei erfolgt die Oxidation von GSH, was in der Glutathiondisulfidbildung (GSSG) resultiert, sowie die ROS-Reduktion induziert (Flohé 2013). Einen weiteren Regulator antioxidativer Systeme stellt Nrf2 (nuclear factor erythroid-related factor 2) dar (Lee et al. 2021). Dieser Transkriptionsfaktor unterliegt einer Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)-abhängigen Regulation. Kommt es zur Formation des Keap1-Nrf2 Komplexes, wird der Ubiquitin-Proteasom induzierte Nrf2-Abbau ausgelöst, durch oxidativen Stress kommt es hingegen zur Dissoziation des Keap1-Nrf2 Komplexes. Diese Nrf2-Dissoziation resultiert in einer nukleären Translokation, wodurch die Expression antioxidativer Systeme gesteigert wird (Lee et al. 2021). Somit fungiert Nrf2 und dessen Regulator Keap1 als bedeutendes antioxidatives System. Durch den Nachweis des ROS-induzierenden Doxorubicin-Mechanismus wurde durch einige Studien bereits auch die Rolle antioxidativer Systeme bei der Pathogenese der DICM untersucht. Im Zuge der *chronischen* DICM wurde so bereits die veränderte Expression antioxidativer Mechanismen nachgewiesen. So konnte bereits nach 24-stündiger DOX-Behandlung die signifikante SOD-, und GPx-Reduktion nachgewiesen werden (Zerikotis et al. 2019). In transgenen Mausmodellen, welche eine Überexpression verschiedener antioxidativer Systeme (GPx1, SOD, Katalase) aufwiesen konnte zudem die DOX-induzierte ROS-Generation vermindert werden (Xiong et al. 2006; Yen et al. 1999; Yen et al. 1996; Kang et al. 1996; Doroshov et al. 2020). Im Rahmen dieser Studien konnte somit aufgezeigt werden, dass es sowohl unter *akuter*, als auch *chronischer* DOX-Exposition zu einer DOX-induzierten gesteigerten ROS-Formation kommt, welche als Second-Messenger verschiedener Signalwege der DICM fungieren können.

1.4.2 Der Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und der elektromechanischen Kopplung

ROS stellen zudem Regulatoren des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes dar. So unterliegen Stresskinasen (wie die PKA $\text{RI}\alpha$ oder $\text{CaMKII}\delta$), aber auch verschiedenste Transporter einer ROS-abhängigen Regulation. Darüber hinaus unterliegen beispielsweise die sarkoplasmatischen Proteine RyR2 und SERCA2a einer redox-abhängigen Regulation. Studien zeigten bereits, dass Oxidantien wie z.B. H_2O_2 durch Oxidation der cysteinreichen RyR2-Untereinheiten zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 führen (Hanna et al. 2014; Köhler et al. 2014). Dieses oxidativ-induzierte diastolische SR Ca^{2+} -Leck konnte hingegen unter reduzierenden Bedingungen (z.B. unter DTT) reduziert werden (Köhler et al. 2014). Das konsekutiv erhöhte diastolische SR Ca^{2+} -Leck infolge der gesteigerten RyR2-Oxidation resultiert in einer Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes und wird mit einer Abnahme systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden und damit einer beeinträchtigten Kontraktilität assoziiert. Der SR Ca^{2+} -Gehalt wird zudem durch die SERCA2a-abhängige Ca^{2+} -Aufnahme reguliert, welche ebenfalls einer redox-abhängigen Regulation unterliegt. Durch etwa 25 Cysteinreste unterliegt die SERCA2a ebenso einer ROS-induzierten Oxidation, welche die Inhibition der SERCA2a bewirkt (Murphy 1976; Köhler et al. 2014). Diese ROS-induzierte Beeinträchtigung der SERCA2a führt somit zu einer verlangsamten kardialen Relaxation, sowie einer Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes. Einer redox-abhängigen Regulation unterliegt zudem der sarkolemmale LTCC. Die $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit dieses Ca^{2+} -Transporters kann ROS abhängig oxidiert werden, was in einer Reduktion des transienten I_{Ca} resultiert (Gill et al. 1995; Köhler et al. 2014).

Des Weiteren werden zentrale kardiale Stresskinasen, wie die Proteinkinase A (PKA $\text{RI}\alpha$), aber auch die $\text{CaMKII}\delta$ redox-abhängig aktiviert. Die Aktivierung dieser Kinasen resultiert ebenso in der Regulation der elektromechanischen Kopplung.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die Bedeutung der $\text{CaMKII}\delta$ für die Pathogenese der DICM zu untersuchen. Dabei ist es von besonderem Interesse die Rolle der oxidativen-Aktivierung der $\text{CaMKII}\delta$ von der $\text{CaMKII}\delta$ -Aktivierung durch Phosphorylierung bei der *akuten*, als auch der *chronischen* DICM zu differenzieren (siehe **Abb.11**). Folgende Fragestellungen ergeben sich dabei im Einzelnen:

- 1) Unterliegt die *akute* DICM $\text{CaMKII}\delta$ -abhängigen Dysregulationen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes und stellt die Aktivierung der $\text{CaMKII}\delta$ durch Autophosphorylierung oder die oxidative-Aktivierung der $\text{CaMKII}\delta$ hierbei den prädominanten Mechanismus dar?
 - a) Kommt es bei der *akuten* DICM durch $\text{CaMKII}\delta/\text{oxCaMKII}\delta$ -induzierte RyR2-Hyperphosphorylierung (an der Aminosäureposition Serin-2814) zur Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks?

- b) Kann ein Doxorubicin-induziertes CaMKII δ -abhängiges SR Ca²⁺-Leck durch pharmakologische CaMKII-Inhibition mittels AIP bzw. genetischer oxCaMKII δ -Elimination/genetischer CaMKII δ -Elimination abgeschwächt werden?
- 2) Wird das Voranschreiten der *chronischen* DICM durch genetische CaMKII δ -Inhibition oder Verhinderung der redox-bedingten CaMKII δ -Aktivierung abgeschwächt?
 - a) Ist die *chronische* Doxorubicin-Behandlung mit einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion (z.B. in Form einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion oder abweichenden Dimensionen) assoziiert und werden mögliche funktionelle Beeinträchtigungen CaMKII δ -abhängig induziert?
 - b) Werden Doxorubicin-induzierte strukturelle Remodelingprozesse (Fibrose, Atrophie) unter genetischer CaMKII δ -Inhibition oder Elimination der oxidativ-aktivierten CaMKII δ verhindert?
 - c) Ist die *chronische* DICM mit einem CaMKII δ -abhängig veränderten intrazellulären Ca²⁺-Haushalt mit entsprechenden CaMKII δ -induzierten posttranslationalen Veränderungen des RyR2 (Hyperphosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2814) verbunden? Weist die oxidative Aktivierung oder die CaMKII-Autophosphorylierung eine führende Rolle bei der *chronischen* DICM auf?
- 3) Kann das Voranschreiten der *chronischen* DICM durch den Einsatz der standardmäßigen Herzinsuffizienztherapie mittels Losartan moduliert werden?

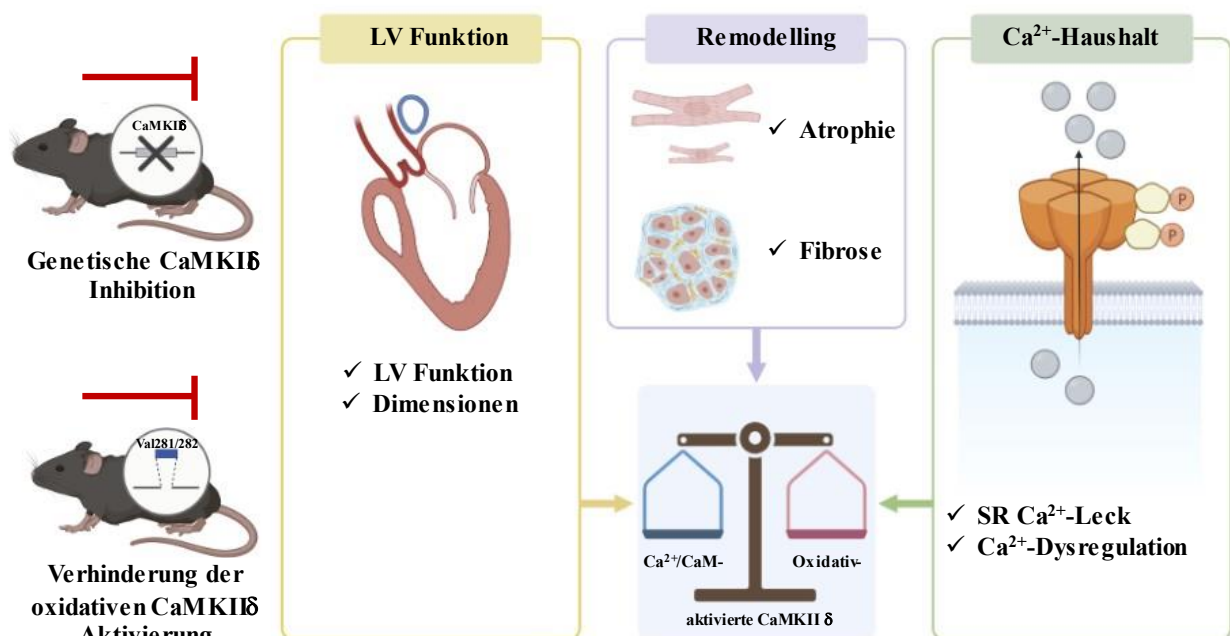


Abbildung 11 Zielsetzungen der vorliegenden Promotionsarbeit

Zielsetzung der Promotionsarbeit stellt die Untersuchung der *akuten* und *chronischen* DICM dar. Hierbei soll sowohl im Modell der *akuten* DICM, als auch der *chronischen* DICM, untersucht werden, ob die Aktivierung der CaMKII δ durch Oxidation oder CaMKII-Autophosphorylierung führend bei der Entwicklung der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität ist. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen ein transgenes Knock-in Mausmodell verwendet, in welchem die oxidative-Aktivierung des redox-sensitiven Methioninpaars 281/282 der CaMKII δ durch den Ersatz mit Valin unterbunden wird (CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Modell). Zum anderen wurden CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse verwendet. Diesem transgenen Knockout Modell liegt ein globaler Knockout der CaMKII δ zugrunde. Als Hintergrundstamm beider verwendeter Mausmodelle (CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$) dienen C57BL/6j Mäuse (siehe **Abb.12**). Vergleichend wurden stets Herzmuskelzellen der entsprechenden Wildtyp-Geschwister Tiere untersucht (CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$).



Abbildung 12 Verwendete Mausmodelle

Neben Wildtypen (CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$), welche die Expression der CaMKII δ aufweisen, wurden weitere transgene Mausmodelle (CaMKII $\delta^{-/-}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Modell) verwendet. Dabei liegt ein genetischer CaMKII δ -Knockout im CaMKII $\delta^{-/-}$ Modell vor, während im CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Modell die Transition des redox-sensitiven Methioninpaars 281/282 zu Valin vorliegt, folglich wurde dieses Modell als „redox-totes“ Mausmodell bezeichnet. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die zuständige Tierschutzkommission (Regierung von Unterfranken) im Rahmen des Tierversuchsantrags „Die Bedeutung der CaMKII für die Pathogenese der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie“ (AZ 55.2 2532-2-1212-11) genehmigt und unter Berücksichtigung der Guide for the care and use of Laboratory Animals durchgeführt (National Academies Press (US) 2011). Die Haltung der verwendeten Versuchstiere erfolgte in den Zentralen Tierlaboratorien des Universitätsklinikums Regensburg unter Standardkonditionen (Temperatur: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Hell/Dunkel-Zyklus 12 Stunden). Die Haltung der Tiere erfolgte ausschließlich in Käfigen des Typus Typ II long, mit einer maximalen Tieranzahl von 5 Tieren.

Für *in-vitro* Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere im Alter von 12-14 Wochen verwendet, während für *in-vivo* Versuche ausschließlich männliche Tiere verwendet wurden.

2.2 Versuchsprotokoll zur Untersuchung der akuten und chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität

Grundlegend sollte die *akute* Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität von der *chronischen* Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität differenziert werden.

Zur Induktion einer *akuten* DICM wurden isolierte murine Kardiomyozyten für 15 Minuten mit einer 10 $\mu\text{mol/L}$ Doxorubicin (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 44583) Lösung inkubiert und im Anschluss hinsichtlich des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes (mittels Epifluoreszenz-, und konfokaler Mikroskopie) untersucht, sowie bezüglich der Proteinexpression (Western Blot) zentraler Ca^{2+} -regulierender Elemente untersucht (siehe **Abb.13**).

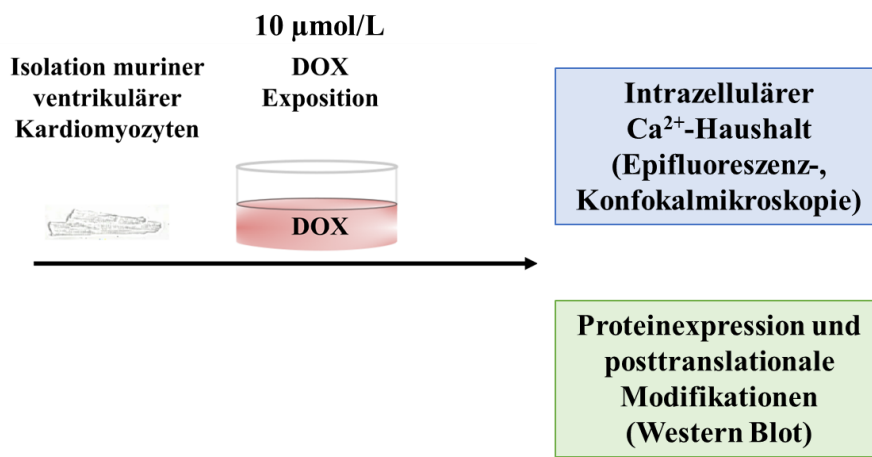


Abbildung 13 Versuchsmodell zur Untersuchung der akuten DICM

Die *akute* DICM wurde durch die Inkubation mit Doxorubicin (10 $\mu\text{mol/L}$) induziert. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung ventrikulärer Kardiomyozyten auf Doxorubicin-induzierte Alterationen des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes, sowie Regulierung der Proteinexpression Ca^{2+} -regulierender Elemente und deren posttranslationale Modifikation. Eigene Darstellung, erstellt mittels Inkscape.

Zur Induktion der *chronischen* DICM wurde den Versuchstieren ($\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$, sowie den entsprechenden Wildtyp-Geschwistertieren) entsprechend eines international gebräuchlichen Standardprotokolls (Zhao et al. 2010) zu drei Zeitpunkten (Tag 0, Tag 7 und Tag 14) eine Doxorubicin-Dosis von 4 mg/kg intraperitoneal injiziert. Die kumulative Gesamtdosis von Doxorubicin betrug somit 12 mg/kg. Als Kontrolltiere dienten entsprechende Geschwistertiere, welchen anstelle von Doxorubicin, Natriumchlorid (NaCl) im gleichen Volumenumfang injiziert wurde. Zur Analyse des Phänotyps der Versuchstiere erfolgte die wöchentliche Dokumentation des Körpergewichtes, sowie die Ermittlung des Gesamtüberlebens der einzelnen Behandlungsgruppen (Kaplan-Maier-Überlebenskurven). Als verstorben wurden dabei sowohl Versuchstiere gewertet, welche spontan verstorben sind, sowie Versuchstiere, welche aufgrund des vorliegenden Score-Wertes vorzeitig aus dem Versuch genommen wurden. Die kardiale Funktion wurde durch kleintierechokardiographische Untersuchungen zu Beginn und nach 12 Wochen untersucht. Ebenfalls wurde das strukturelle Remodeling des Myokards durch histologische Analysen erfasst und der kardiale Ca^{2+} -Haushalt mittels Epifluoreszenz-, sowie konfokaler Mikroskopie untersucht. Außerdem wurde die

Proteinexpression zentraler Ca^{2+} -regulierender Elemente erfasst, sowie deren posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierungsprozesse (Western Blot). Zum Nachweis der Formation reaktiver Sauerstoffspezies infolge der Doxorubicin-Behandlung erfolgte zudem die relative Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies mittels konfokaler Lasermikroskopie (siehe **Abb.14**). Zudem wurde das Herzgewicht nach Versuchsabbruch ermittelt, um Rückschlüsse auf das jeweilige Herz/Körpergewichtverhältnis zu schließen. Im Zuge einiger Experimente erfolgte zudem die vorhergehende Behandlung der Versuchstiere mit dem Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonisten Losartan, welches mit einer Dosierung von 10 mg/kg über das Trinkwasser über ein Zeitfenster von einer Woche vor Versuchsbeginn verabreicht wurde. Losartan-vorbehandelte Versuchstiere wurden dem selbigen Versuchsprotokoll wie bereits beschrieben unterzogen.

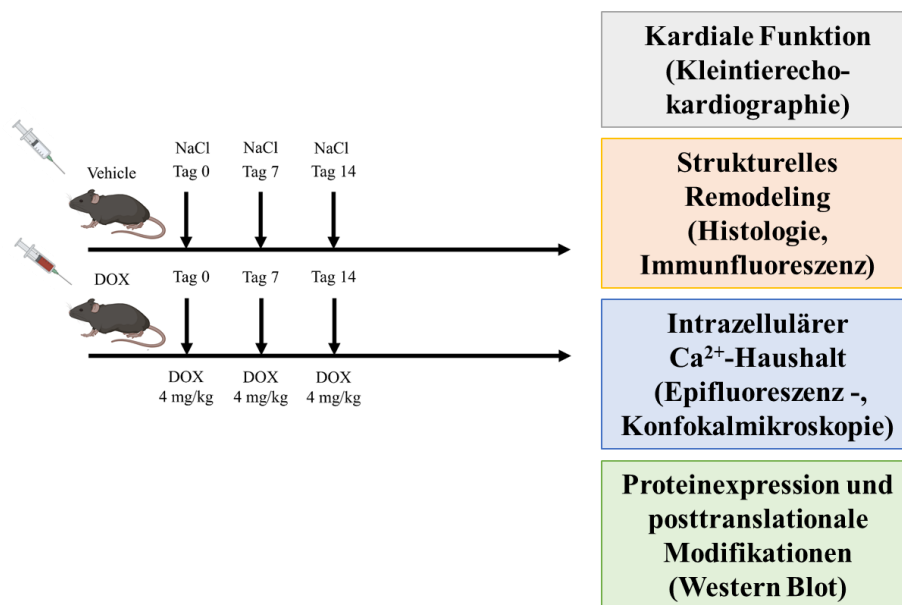


Abbildung 14 Das Versuchsmodell zur Untersuchung der chronischen DICM

Die *chronische* DICM wurde durch die kumulative intraperitoneale Injektion von 12 mg/kg Doxorubicin induziert. Nach einem Zeitraum von 12 Wochen erfolgte die Beurteilung der kardialen Funktion und Dimensionen anhand kleintierechographischer Untersuchungen. Ebenso wurde das strukturelle Remodeling mittels Histologie/Immunfluoreszenz beurteilt und der kardiale Ca^{2+} -Haushalt analog zum Modell der *akuten* DICM epifluoreszenz-, und konfokalmikroskopisch untersucht. Durch Western Blots wurde die Proteinexpression, sowie posttranslationale Modifikation Ca^{2+} -regulierender Elemente bestimmt. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2.3 Echokardiographie

Nach Narkotisierung der Versuchstiere mittels 1.5-2.5% Isofluran (Piramal Critical Care, Art.-Nr. 30372.00.000) über eine Inhalationskammer erfolgte die Positionierung des narkotisierten Versuchstieres auf einer temperaturkontrollierten Wärmeplatte. Im Anschluss wurde nach sternaler Enthaarung des Versuchstieres die echokardiographische Untersuchung mit Hilfe des Kleintierechokardiographs Vevo 3100 Visualsonics Fujifilm MX400 (Fujifilm VisualSonics) durchgeführt (siehe **Abb.15**). Hierzu wurde das Versuchstier narkotisiert bis eine Herzfrequenz von 450 ± 20 Schlägen erreicht wurde. Es erfolgte die Aufnahme des Herzmuskels im M-Mode (Motion-Mode), in welchem ein eindimensionales Bild über die Zeit abgebildet wird. Hierdurch

können sowohl Systole, als auch Diastole (des Herzzyklus) detektiert werden. Durch Bewegung des positionierten Ultraschallkopfes von der Herzbasis Richtung Apex, erfolgte die Einstellung der parasternalen kurzen Achse (SAX), bis die Papillarmuskeln abgrenzbar sind. Die Durchführung der kleintierechokardiographischen Untersuchung erfolgte gemeinsam mit Dr. med. Daniel Tarnowski.

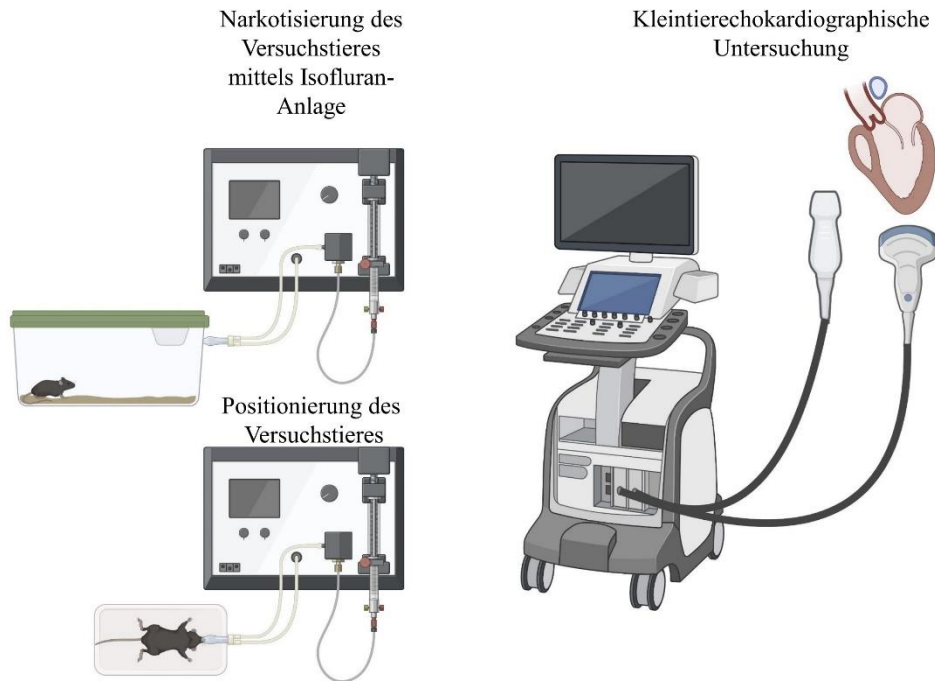


Abbildung 15 Kleintierechokardiographie

Mittels einer Isofluran-Anlage erfolgte die Narkotisierung der Versuchstiere in einer Inhalationskammer. Das narkotisierte Tier wurde im Anschluss auf einer Wärmeplatte positioniert und sternal enthaart. Darauf wurde die kleintierechokardiographische Untersuchung durchgeführt. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2.4 Isolation muriner Kardiomyozyten

Zur Isolation einzelner ventrikulärer Kardiomyozyten wurde eine Langendorff-Perfusionsanlage verwendet (siehe **Abb.16**). Durch aortale Kanülierung erfolgte die retrograde Perfusion der Koronararterien mit einer Trypsin-, und Liberase-haltigen Isolationslösung (siehe **Tab.1**), was das Herauslösen der Kardiomyozyten aus einem bestehenden Zellverbund bewirkt. Anschließend erfolgte die Separierung der Ventrikel vom atrialen Myokard und die mechanische Zerkleinerung des ventrikulären Myokards. Die Filtrierung größerer Myokard-Stücke wurde durch die Verwendung einer Nylon-Gaze gewährleistet und nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein schrittweiser Ca^{2+} -Aufbau (0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L) zur Adaptierung an physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen und zur schrittweisen Adaptierung an die verwendete Messlösung (Ca^{2+} -Konzentration: 1 mmol/L). Zur Qualitätsüberprüfung der isolierten Kardiomyozyten erfolgte stets eine Inaugenscheinnahme mit dem Lichtmikroskop Leica DM IL. Die Isolation muriner Kardiomyozyten mittels der Langendorff-Perfusstechnik erfolgte durch Herrn Thomas Sowa und Herrn Sebastian Benkhoff.

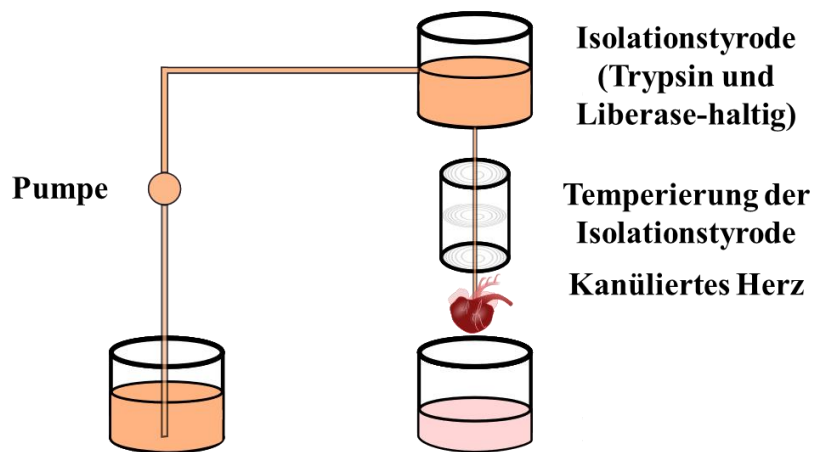


Abbildung 16 Retrograde Perfusion des isolierten Herzens

Durch eine Trypsin-, sowie Liberase-haltige Isolationstyrode konnte ein aortal kanüliertes Herz retrograd perfundiert werden. Durch ein Wasserbad erfolgte die Temperierung der Isolationstyrode auf 37°C. Nach mechanischer Zerkleinerung des perfundierten Myokards konnten Einzelzellen für weitere Versuche gewonnen werden. Eigene Darstellung, erstellt mittels Inkscape.

Tabelle 1 Isolationslösung

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Isolationslösung	BDM	Sigma-Aldrich B0753	10 mmol/L	Die Lösung der Substanzen erfolgte in Aqua dest. Der pH-Wert wurde auf 7.4 bei RT eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.
	CaCl ₂	Sigma-Aldrich 21115	0.0125 mmol/L	
	Glukose	Carl Roth X997.2	5.5 mmol/L	
	HEPES	Carl Roth 9105.3	10 mmol/L	
	KCl	Carl Roth 6781.1	4.7 mmol/L	
	KHCO ₃	Carl Roth X887.2	10 mmol/L	
	KH ₂ PO ₄	Carl Roth P018.5	0.6 mmol/L	
	Liberase	Roche 05401127001	35 µg/mL	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Carl Roth T888.1	1.2 mmol/L	
	NaCl	VWR Chemicals 27810.295	113 mmol/L	
	NaHCO ₃	Carl Roth 8551.1	12 mmol/L	
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Carl Roth T878.1	0.6 mmol/L	
	Taurin	Carl Roth 4721.2	30 mmol/L	
	Trypsin	Gibco 15090-046	2.5 %	

2.5 Messung von intrazellulären Ca²⁺-Transienten muriner Kardiomyozyten

Die Analyse intrazellulärer Ca²⁺-Transienten (Ca²⁺-Transienten) erfolgte mittels eines invertierten Epifluoreszenzmikroskopes und unter Verwendung des Ca²⁺-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-AM. Zytosolische Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration als zeitabhängige Funktion repräsentieren kardiale Ca²⁺-Transienten.

2.5.1 Die Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten mittels Fura2-AM

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten erfolgte mittels des ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-AM (Invitrogen, Art.-Nr. F1221). Die Veresterung von Fura2-AM mittels einer Azetoxymethylgruppe ermöglicht das Diffundieren des Fluoreszenzfarbstoffes durch das lipophile Sarkolemm der zu untersuchenden Zelle. Intrazelluläre Esterasen ermöglichen die Abspaltung der Azetoxymethylgruppe, sodass es zur Bildung des polaren (und folglich Membran-impermeablen) Fluoreszenzfarbstoffes kommt (siehe **Abb.17**).

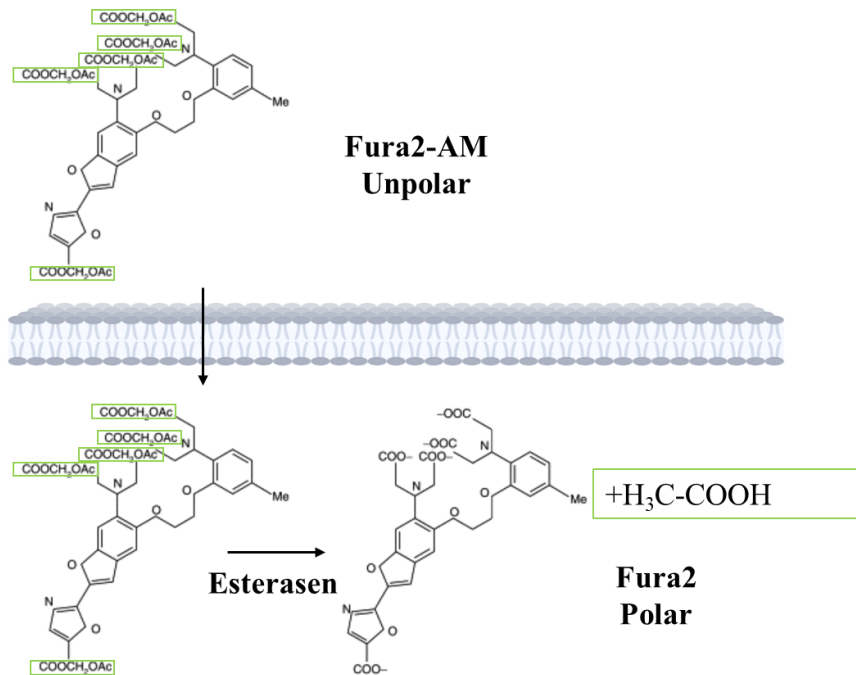


Abbildung 17 Detektion des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes mittels des ratiometrischen Farbstoffes Fura2-AM

Durch Veresterung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura2 mit Azetoxymethylgruppen (grün) kann der veresterte Farbstoff (Fura2-AM) durch das Sarkolemm diffundieren. Intrazelluläre Esterasen ermöglichen die Abspaltung der Azetoxymethylgruppen, wodurch Fura2 in einer polaren Struktur vorliegt und intrazellulär akkumuliert. Modifiziert nach Molecular Probes, Inc. from the Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th Edition.

Die Detektion des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes und damit der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten mittels Fura2 beruht auf der Chelatkomplexbildung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Ca^{2+} . Die Ca^{2+} -Bindung des Farbstoffes erfolgt dabei durch die negativ geladenen Carboxylatgruppen (COO^-), was in einer Ca^{2+} -abhängigen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm zu 340 nm bei gleichbleibendem Emissionsmaximum (bei 510 nm) resultiert (siehe **Abb.18**). Folglich weist Ca^{2+} -ungebundenen Fura2 ein Absorptionsmaximum bei 380 nm auf, während Ca^{2+} -gebundenes Fura2 ein Absorptionsmaximum von 340 nm aufweist. Der Quotient der emittierten Fluoreszenz beider Wellenlängen (Ratio F_{340}/F_{380} nm) korreliert folglich mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt. Die Verwendung von ratiometrischen Farbstoffen (wie Fura2-AM) ermöglicht somit eine

Ermittlung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, unabhängig von abweichenden Zelldicken, der absoluten Farbstoffbeladung einer Zelle, der Konzentration des verwendeten Farbstoffs, sowie Photobleaching (Ausbleichen des Farbstoffs), da beide Fluoreszenzintensitäten (F_{340}/F_{380} nm) gleichermaßen von diesen Vorgängen beeinflusst werden.

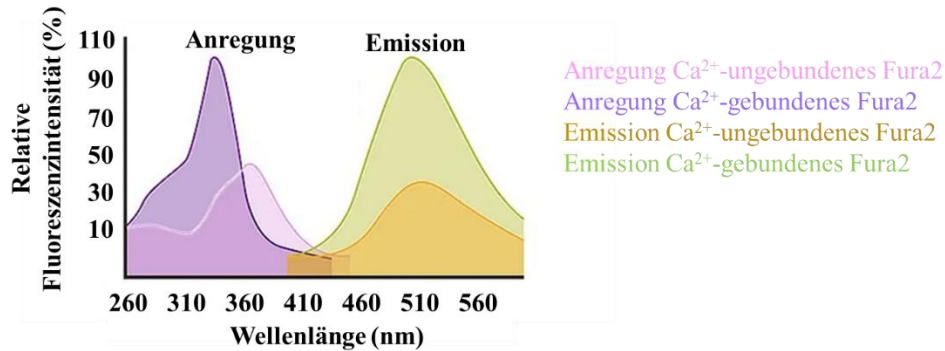


Abbildung 18 Fluoreszenzspektrum von Fura2

Durch die Chelatkomplexbildung von Ca^{2+} mit Fura2 kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm auf 340 nm. Das Emissionsmaximum liegt sowohl für Ca^{2+} -gebundenes Fura2, als auch Ca^{2+} -ungebundenen Fura2 bei 510 nm. Modifiziert nach <https://www.moleculardevices.com/products/assay-kits/gpcrs/fura-2-qbt-calcium-kit#Technology>

2.5.2 Versuchsdurchführung zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten

Für die durchgeführten Messungen wurde Fura2-AM in einer 10 $\mu\text{mol/L}$ Endkonzentration eingesetzt und entsprechend **Tab.2** hergestellt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Fura2-AM erfolgte eine 15-minütige Deesterifizierung in Messtyrode (siehe **Tab.3**) (beide Inkubationen erfolgten dabei lichtgeschützt). Im Anschluss wurden die Zellen nach einer 5-minütigen initialen Stimulation (mit einer Frequenz von 0.5 Hz) bei einer Frequenz von 0.5 Hz gemessen. Hierbei wurde stets von jeder gemessenen Zelle ebenso der Hintergrund bestimmt. Die letzte Zelle der vermessenen Kammer wurde durch rapide Zugabe von 10 mmol/L Caffein hinsichtlich des SR Ca^{2+} -Gehalts untersucht.

Tabelle 2 Fura2-AM Farbstofflösung

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Fura2-AM Vorratslösung (1 mmol/L)	Fura2-AM	Invitrogen F1221		50 µg Fura2-AM wurden in 50 µL DMSO gelöst, bei einer Lagerung bei -20°C.
	DMSO	Carl Roth A994.1		
Fura2-AM Farbstofflösung (10 µmol/L)	Fura2-AM Vorratslösung	Invitrogen F1221	1 mmol/L	10 µL der Fura2-AM Vorratslösung wurden in 1 µL Pluronic Acid und 989 µL Messtyrode gelöst.
	Pluronic Acid	Life Technologies F-127	200 mg/mL	
	Messtyrode (mit 1 mmol/L CaCl ₂)			

Tabelle 3 Messtyrode

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Messtyrode Vorratslösung	NaCl	VWR Chemicals 27810.295	140 mmol/L	Zur Herstellung der Messtyrode Vorratslösung wurden alle Substanzen in Aqua dest. gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
	HEPES	Carl Roth 9105.3	5 mmol/L	
	KCl	Carl Roth 6781.1	4 mmol/L	
	MgCl ₂	Carl Roth KK36.1	1 mmol/L	
Messtyrode	CaCl ₂	Sigma-Aldrich 21115	1 mmol/L	50 mL der Messtyrode Vorratslösung wurden in 440 mL Aqua dest. gelöst. 901 mg Glukose, und 500 µL CaCl ₂ (Vorratslösung 1 mol/L) wurden zugegeben. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 bei 37°C erfolgte das Auffüllen der Messtyrode auf 500 mL.
	Glukose	Carl Roth X997.2	10 mmol/L	

2.5.3 Auswertung der intrazellulären Ca²⁺-Transienten

Die Auswertung der erhobenen Datensätze erfolgte mittels der Software Ion Wizard. Zur Ermittlung der einzelnen Parameter der Ca²⁺-Transienten erfolgte nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz die Berechnung der Ratio der emittierten Fluoreszenzsignale der beiden Fura2-Anregungswellenlängen (340 und 380 nm).

$$\text{Ratio} = \frac{F_{340 \text{ nm}} - \text{FHG}_{340 \text{ nm}}}{F_{380 \text{ nm}} - \text{FHG}_{380 \text{ nm}}}$$

F: Fluoreszenz

FHG: Hintergrundfluoreszenz

Als Parameter wurden das diastolische Ca²⁺ (Baseline), die Amplitude der Ca²⁺-Transienten, sowie die Relaxation der Ca²⁺-Transienten berechnet. Die Amplitude (Ca²⁺-Transienten-

amplitude) berechnet sich hierbei als Differenz des Peaks der Ca^{2+} -Transienten und der Baseline. Als Abfall der Ca^{2+} -Transienten wurde die Dauer des Abfalls des Ca^{2+} -Transienten um 80% der Amplitude verwendet (siehe **Abb.19**).

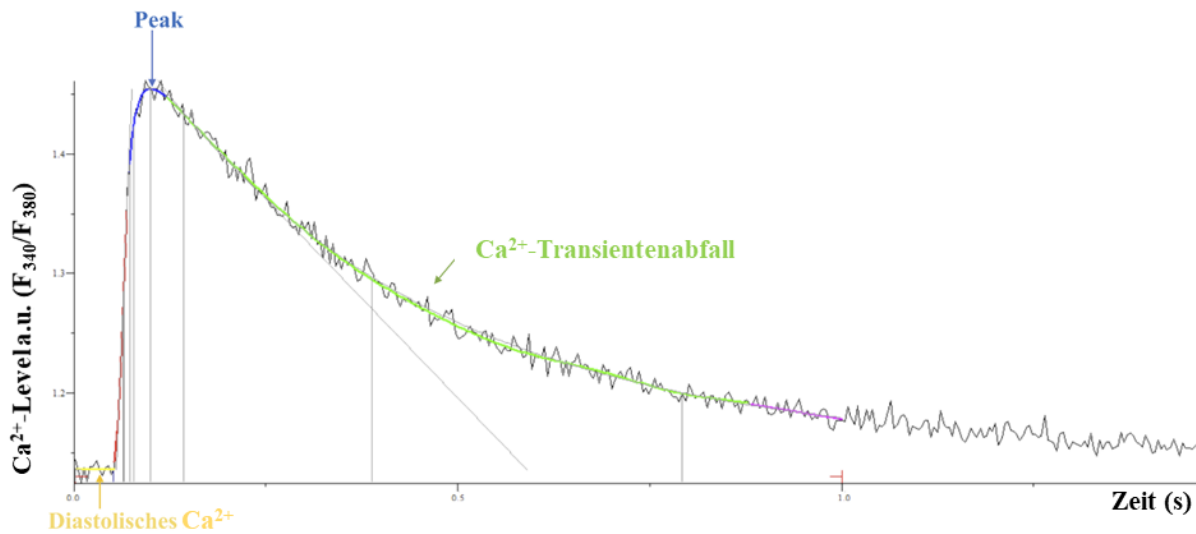


Abbildung 19 Auswertung der Ca^{2+} -Transienten

Die Darstellung der Ca^{2+} -Transienten erfolgt als Funktion der gemessenen Fura2-Fluoreszenzratio (F_{340}/F_{380} nm, y-Achse) gegenüber der Zeit (x-Achse). Die Ca^{2+} -Transientenamplitude (rote Linie) errechnet sich aus der Differenz zwischen Peak (blau) und diastolischem Ca^{2+} (gelb). Die Time to Baseline repräsentiert die Abfallskinetik des Ca^{2+} -Transienten (grün). Eigene Darstellung.

2.5.4 Aufbau und Prinzip des Epifluoreszenzmikroskops

Zur Anregung von Fura2-beladenen murinen Kardiomyozyten diente eine Xenon-Bogenlampe (Ushio) als Lichtquelle. Durch den nachgeschalteten HyperSwitch kann zwischen den beiden Anregungswellenlängen (im Falle von Fura2: 340 nm und 380 nm) kontinuierlich alterniert werden und das Anregungslicht auf einen dichroitischen Spiegel gelenkt werden. Kurzwelliges, energiereiches Anregungslicht, wird durch den dichroitischen Spiegel (alternativ auch als dichromatischer Spiegel bezeichnet) auf das zu untersuchende Präparat gelenkt. Die vom Präparat emittierte Fluoreszenz (langwellig, energiearm) kann hingegen den dichroitischen Spiegel passieren. Im Falle des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-AM wurde der dichroitische Spiegel entsprechend gewählt, dass dessen kritische Wellenlänge zwischen den Anregungswellenlängen (340 und 380 nm) und der Emissionswellenlänge (510 nm) von Fura2 liegt. Folglich wird das kurzwellige Anregungslicht auf das Präparat gelenkt, während das emittierte Licht den dichroitischen Spiegel passieren kann und zum Photomultiplier weitergeleitet wird. Durch den Photomultiplier (IonOptix) wird das erhaltene emittierte Fluoreszenzsignal verstärkt und durch ein Fluorescence System Interface (Ion Optix) in Software kompatible Datensätze konvertiert. Die Software Ion Wizard ermöglicht dann die Darstellung der Datensätze (vgl. **Abb. 20**).

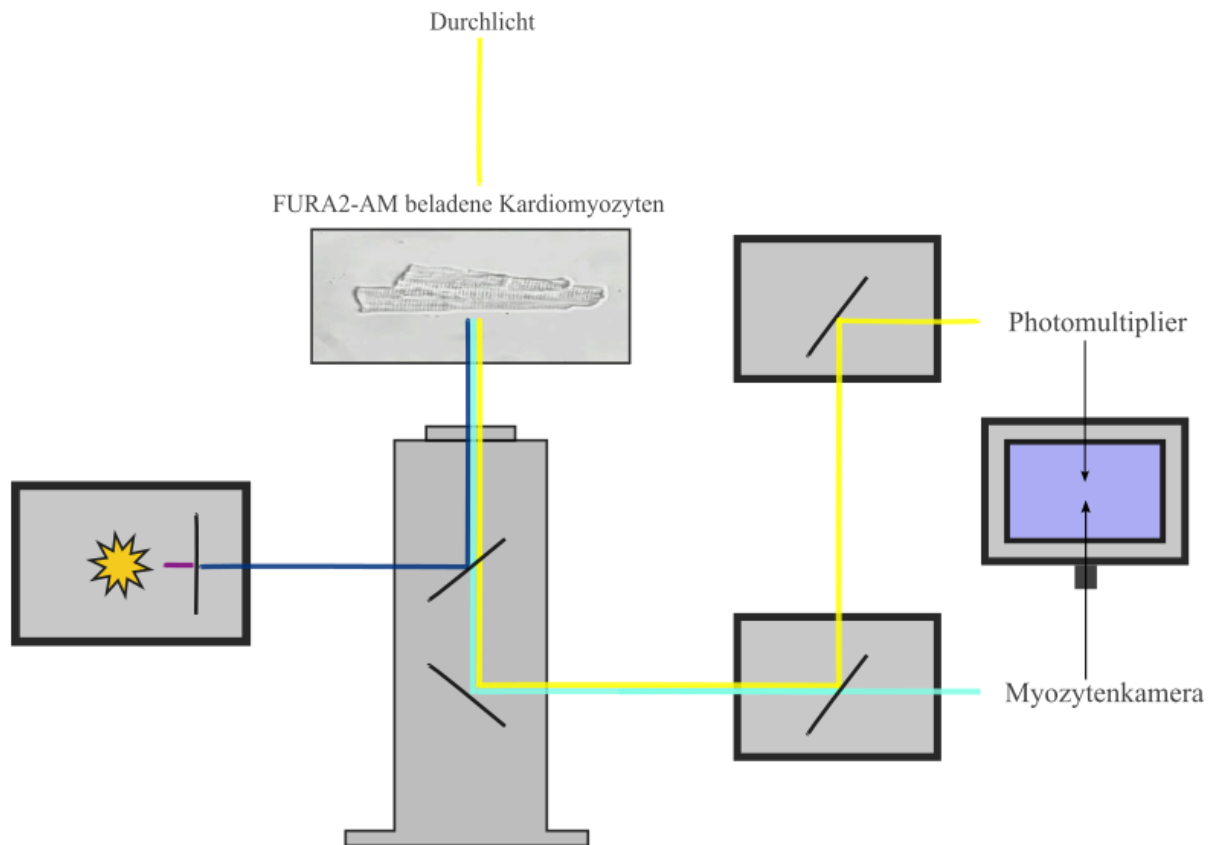


Abbildung 20 Vereinfachte Darstellung des Epifluoreszenzmikroskops zur Untersuchung des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes

Das Licht einer Xenon-Bogenlampe (violett) passiert einen Anregungsfilter, welcher Licht der benötigten Wellenlänge filtert (im Falle von Fura2-AM 340 und 380 nm, blau). Mittels eines dichroitischen Spiegels wird das Anregungslicht auf das Präparat reflektiert, das emittierte Licht (510 nm, grün), sowie das Durchlicht (gelb) passieren hingegen den dichroitischen Spiegel. Durch weitere nachgeschaltete dichroitische Spiegel, als auch einfache Spiegel, wird das emittierte Licht und das Durchlicht zum Photomultiplier und zur Myozytenkamera geleitet. Durch den Photomultiplier erfolgt die Signalverstärkung des emittierten Fluoreszenzsignals. Die Visualisierung beider Datensätze wird mittels der Software Ion Wizard ermöglicht. Eigene Darstellung, erstellt mittels Inkscape.

2.6 Messung des SR Ca^{2+} -Lecks

Die Messung des spontanen diastolischen SR Ca^{2+} -Verlustes (SR Ca^{2+} -Leck) erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4-AM. Der diastolische SR Ca^{2+} -Verlust konnte durch lokale Ca^{2+} -Sparks, resultierend aus einer spontanen kurzen Öffnung einzelner Ryanodin-Rezeptoren, ermittelt werden.

2.6.1 Die Detektion von Ca^{2+} -Sparks mittels Fluo4-AM

Die Detektion der Ca^{2+} -Sparks erfolgte mittels des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4-AM (Invitrogen, Art.-Nr. F14201). Der nicht-ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Fluo4-AM weist ein Absorptionsmaximum von 488 nm auf, während das Emissionsmaximum bei 510

nm liegt (siehe **Abb.21**). Die Beladung der zu untersuchenden Zelle mit Fluo4-AM unterscheidet sich nicht wesentlich von der vorab genannten Beladung mit dem ratiometrischen Farbstoff Fura2-AM. Ebenso wie bei der Beladung der Zelle mit Fura2-AM, ermöglicht die Kopplung eines Hydroxymethylesters an den Farbstoff Fluo4 die passive Diffusion durch das Sarkolemm. Intrazellulär erfolgt die Spaltung des Farbstoffes in seine aktive Form durch Esterasen, wobei der polare Farbstoff (Fluo4) die Membran nicht erneut passieren kann (siehe **Abb.22**). Durch Abspaltung der Hydroxymethylestergruppen weist Fluo4 fünf freie Carboxylatgruppen auf (COO^-), die die Bindung von Ca^{2+} ermöglichen. Kommt es zur Bindung von Ca^{2+} an Fluo4 wird die emittierte Fluoreszenzintensität um das 100-fache gesteigert, was die Darstellung von Ca^{2+} -Sparks gewährleistet.

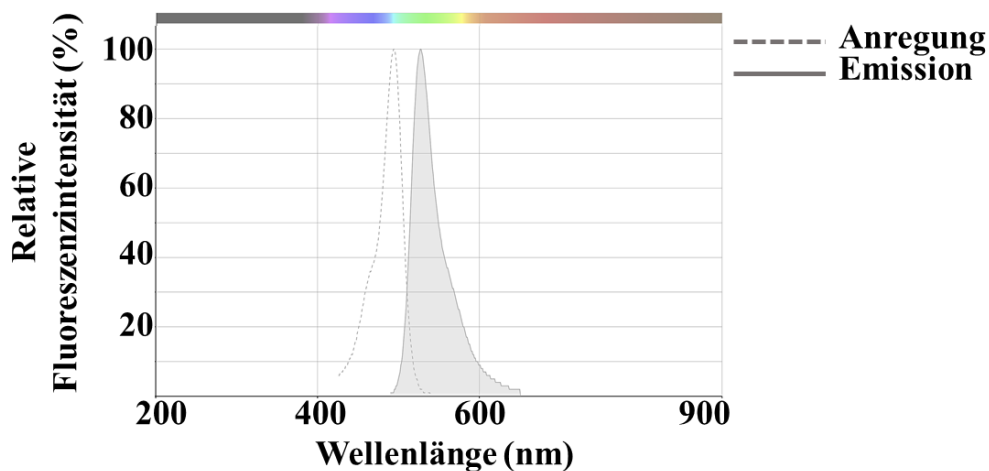


Abbildung 21 Fluoreszenzspektrum von Fluo4-AM

In Abb.21 wird das Fluoreszenzspektrum von Fluo4 dargestellt. Auf der X-Achse ist die Wellenlänge (in nm) dargestellt, auf der Y-Achse wird die relative Fluoreszenzintensität abgebildet. Die Anregung von Fluo4 erfolgt bei 488 nm, während die maximale Emission bei 510 nm liegt (modifiziert nach <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer>).

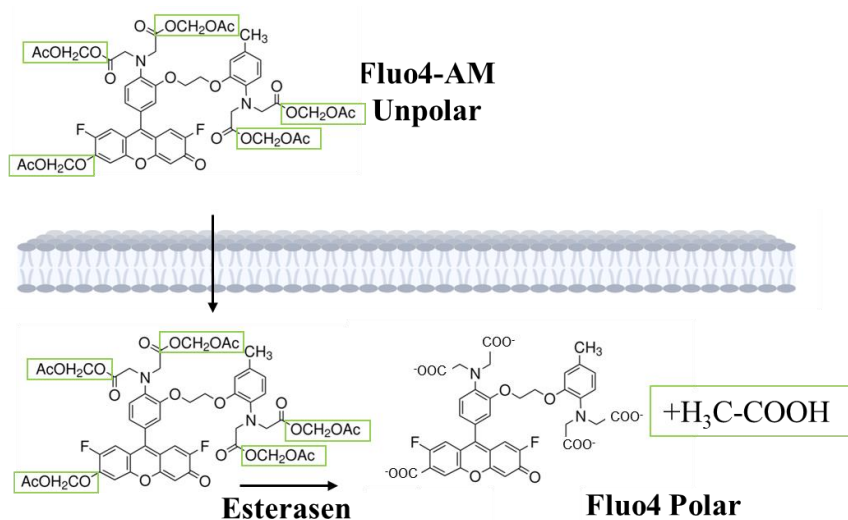


Abbildung 22 Die Ermittlung spontaner diastolischer Ca^{2+} -Freisetzungen mittels Fluo4-AM

Fluo4-AM beinhaltet fünf Hydroxymethylestergruppen (grün), welche dem Fluoreszenzfarbstoff einen unpolaren Charakter verleihen und die passive Diffusion durch das Sarkolemm ermöglichen. Durch intrazelluläre Esterasen erfolgt die Abspaltung der Hydroxymethylester, wodurch Fluo4 polare Eigenschaften aufweist und intrazellulär akkumuliert. Modifiziert nach <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/93596>.

2.6.2 Versuchsdurchführung zur Messung des SR Ca^{2+} -Lecks

Zur Ermittlung des SR Ca^{2+} -Lecks wurde Fluo4-AM in einer 10 $\mu\text{mol/L}$ Endkonzentration eingesetzt und entsprechend **Tab.4** hergestellt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Fluo4-AM erfolgte eine 15-minütige Deesterifizierung in Messtyrode (beide Inkubationen erfolgten lichtgeschützt). Im Anschluss wurden die Zellen nach einer 5-minütigen initialen Stimulation (mit einer Frequenz von 0.5 Hz) gemessen. Hierbei wurde von jeder Zelle eine stimulierte Aufnahme (mit einer Frequenz von 0.5 Hz) durchgeführt, um etwaige Arrhythmien (als Qualitätsmaß der Zelle) zu erkennen. Im Anschluss erfolgte eine Messung im unstimulierten Zustand, wodurch das diastolische SR Ca^{2+} -Leck erfasst werden sollte.

Tabelle 4 Fluo4-AM Farbstofflösung

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Fluo4-AM Vorratslösung (1 mmol/L)	Fluo4-AM	Invitrogen F14201		50 µg Fluo4-AM wurden in 44.5 µL DMSO gelöst, die Lagerung erfolgte bei -20°C.
	DMSO	Carl Roth A994.1		
Fluo4-AM Farbstofflösung (10 µmol/L)	Fluo4-AM Vorratslösung	Invitrogen F1221	1 mmol/L	10 µL der Fluo4-AM Vorratslösung
	Pluronic Acid	Life Technologies F-127	200 mg/mL	wurden in 1 µL Pluronic Acid und 989 µL
	Messtyrode (mit 1 mmol/L CaCl ₂)			Messtyrode gelöst. Die Fluo4-AM Farbstofflösung wurde bei 4°C gelagert.

2.6.3 Aufbau und Prinzip des Konfokalmikroskops

Für die durchgeführten Messungen zur Ermittlung des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks mittels Fluo4-AM wurde ein konfokales Lasermikroskop (LSM700, Carl Zeiss AG) verwendet. Als Lichtquelle diente ein Argonlaser, dessen Laserstrahl durch eine Anregungs-Lochblende (Pinhole) gebündelt wird und über einen dichroitischen (dichromatischen Spiegel) auf den fokussierten Punkt des zu untersuchenden Präparates reflektiert wird. Im Falle des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4-AM entsprach die Wellenlänge des Lasers hierbei 488 nm. Das vom Präparat emittierte Fluoreszenzlicht (im Falle von Fluo4-AM 510 nm) kann anschließend den dichroitischen Spiegel passieren, sodass die Erfassung über einen Detektor (Photomultiplier) erfolgen kann. Dabei wird eine hohe Tiefenschärfe des Konfokalmikroskops durch die Lochblende des Detektors erzielt. Durch die Verwendung der Lochblende des Detektors erfolgt die Selektierung des emittierten Fluoreszenzlichtes von angeregten Arealen ober-, sowie unterhalb der Fokusebene, was Streufluoreszenz minimiert. Folglich wird lediglich die Fokusebene dargestellt, während Licht außerhalb der Fokusebene herausgefiltert wird (siehe **Abb.23**).

Im Rahmen der durchgeführten Ca²⁺-Sparks Messungen wurden Line-Scans mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde eine im Präparat definierte Linie vom fokussierten Laserstrahl abgerastert, wobei die Anzahl der Abrasterungsvorgänge auf 10.000 definiert wurde. Durch die Software ZEN black (Carl Zeiss AG) erfolgte die Darstellung der einzelnen Bildpunkte (Pixel) im zeitlichen Zusammenhang.

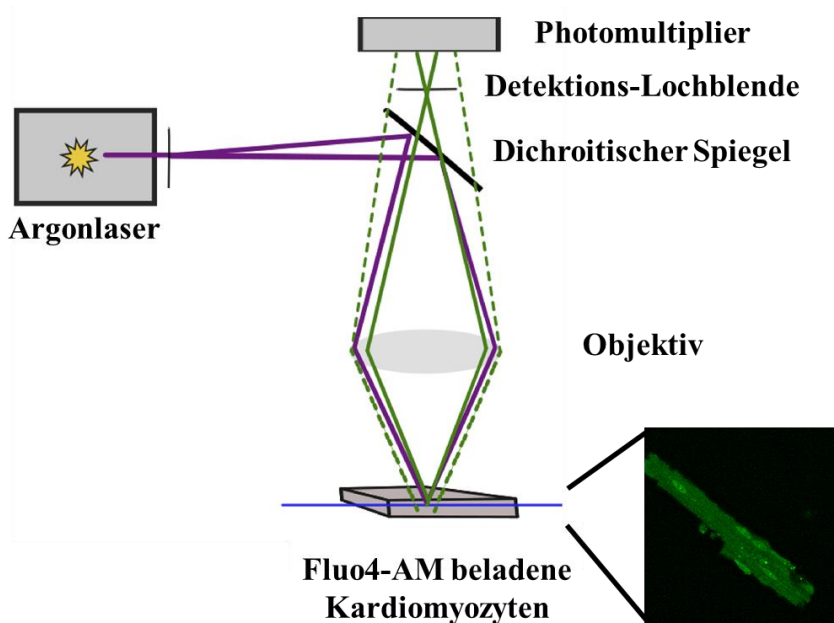


Abbildung 23 Schematische Darstellung des konfokalen Lasermikroskops

Über einen dichroitischen Spiegel erfolgt die Reflektion des Anregungslichtes (violett) auf die Fokusebene (blau) des Präparates. Das emittierte Fluoreszenzlicht (grün) passiert den dichroitischen Spiegel, sodass die Detektion über den Photomultiplier erfolgen kann. Durch die Detektions-Lochblende wird die Minimierung von Streulicht (grün-gestrichelte Linie) erzielt, sodass emittierte Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokusebene selektiert werden. Eigene Darstellung, erstellt mittels Inkscape.

2.6.4 Auswertung des SR Ca^{2+} -Lecks

Zur Auswertung der Line-Scans wurde das Programm ImageJ mit dem Plug-In Sparkmaster verwendet. Detektierte Ca^{2+} -Sparks wurden nach visueller Bestätigung in ImageJ durch den Sparkmaster anhand der Abweichung von der basalen Fluoreszenz neben der Spark-Amplitude, ebenso die Breite (FWHM) und Dauer (FDHM) des Ca^{2+} -Sparks bestimmt. Neben der Charakterisierung der detektierten Ca^{2+} -Sparks wurden Waves und nicht-induzierte spontane Ca^{2+} -Transienten als Arrhythmiemaß ausgezählt (siehe **Abb.24**).

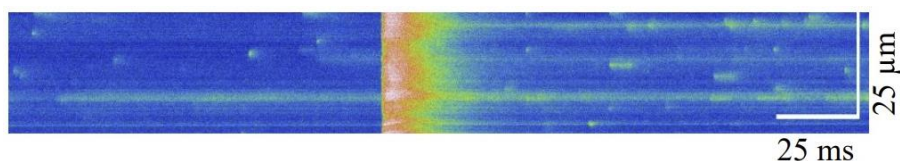


Abbildung 24 Beispielmessung eines Line-Scans eines Fluo4-AM beladenen Kardiomyozyten

Durch Line-Scans erfolgte die konfokalmikroskopische Messung des SR Ca^{2+} -Lecks. Ausgewertet wurden Ca^{2+} -Sparks (grün fluoreszierende Punkte), sowie nicht-induzierte spontane Ca^{2+} -Freisetzungen (wie spontane diastolische Ca^{2+} -Transienten, hier rot dargestellt). Eigene Darstellung.

2.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Zum Nachweis zytoplasmatischer ROS wurde der Fluoreszenzfarbstoff CellRox Orange verwendet. Dabei erfolgte die Messung reaktiver Sauerstoffspezies lediglich im *chronischen* Versuchsmodell, da Doxorubicin ein Emissionsmaximum von 560 nm aufweist, welche mit dem Emissionsmaximum der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe überlappt.

2.7.1 Detektion zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange

Der Nachweis zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange basiert auf der Fluoreszenz des Farbstoffes im oxidierten Zustand. Im reduzierten Zustand verhält sich CellRox Orange hingegen nicht-fluoreszierend, durch ROS wird der Farbstoff hingegen oxidiert, wodurch die erhaltene CellRox Orange Fluoreszenzintensität proportional zum vorliegenden ROS-Level ist. CellRox Orange weist ein Absorptionsmaximum von 545 nm auf, während das Emissionsmaximum bei 565 nm liegt (siehe **Abb.25**).

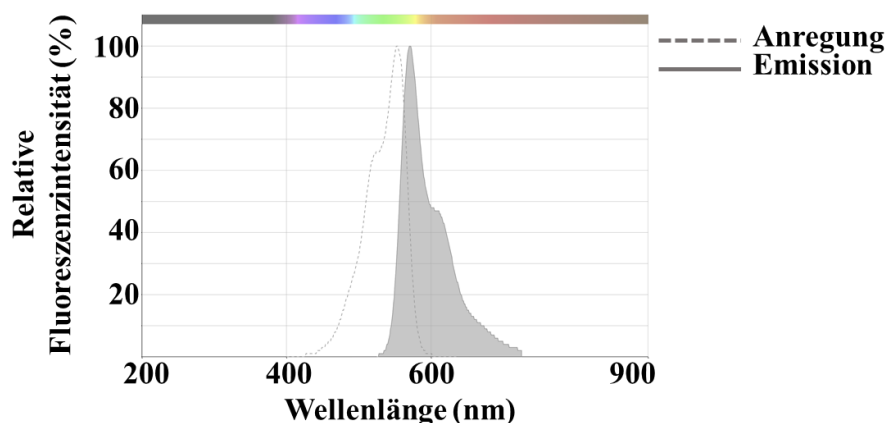


Abbildung 25 Fluoreszenzspektrum von CellRox Orange

CellRox Orange wird durch eine Wellenlänge von 545 nm im oxidierten Zustand angeregt, während das Emissionsmaximum bei 565 nm liegt. CellRox Orange verhält sich lediglich im oxidierten, nicht jedoch im reduzierten Zustand fluoreszierend und fungiert somit als ROS-Detektor (modifiziert nach <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer>).

2.7.2 Versuchsdurchführung zur Messung zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange

Zum Nachweis zytoplasmatischer ROS wurden die Kardiomyozyten nach erfolgter Isolation mit 5 µmol/L CellRox Orange (Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr.C10443, siehe **Tab.5**) für 30 Minuten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit Messtyrode, worauf die Detektion zytoplasmatischer ROS mittels konfokaler Lasermikroskopie (LSM 700, Carl Zeiss AG) unter kontinuierlicher Stimulation mit einer

Frequenz von 0.5 Hz und Perfusion mittels Messtyrode (bei 37°C) durchgeführt wurde. Die Anregung der CellRox Orange-beladenen Kardiomyozyten erfolgte gemäß Datenblatt bei 545 nm, die Emission wurde bei 565 nm erfasst. Es erfolgte die Aufnahme der Kardiomyozyten im Frame-Modus über eine Zeitspanne von 15 Minuten, wobei minütlich eine Aufnahme durchgeführt wurde und die CellRox Orange-Emission erfasst wurde.

Tabelle 5 CellRox Orange Farbstofflösung

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
CellRox Orange Vorratslösung (2.5 mmol/L)	CellRox Orange	Thermo Fisher Scientific C10443		CellRox Orange wurde als gebrauchsfertige Vorratslösung verwendet und bei -20°C gelagert.
CellRox Orange Farbstofflösung (5 µmol/L)	CellRox Orange Vorratslösung	Thermo Fisher Scientific C10443	2.5 mmol/L	2 µL der CellRox Orange Vorratslösung wurden in 1 µL Pluronic Acid und 997 µL Messtyrode gelöst.
	Pluronic Acid	Life Technologies F-127	200 mg/mL	
	Messtyrode (mit 1 mmol/L CaCl ₂)			

2.7.3 Auswertung der Messung zytoplasmatischer ROS mittels CellRox Orange

Die erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der CellRox Orange-beladenen Kardiomyozyten wurden auf die basale Fluoreszenz (d.h. auf die mittlere Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung) normiert. Zur besseren Visualisierung kardiomyozytärer Areale mit gesteigerter ROS-Produktion erfolgte eine Bearbeitung der aufgenommenen CellRox Orange Bilder mittels Fiji. Hierzu wurde der Filter „16 Colors“ verwendet, durch welchen Unterschiede der gemessenen Fluoreszenzintensität des abgebildeten Kardiomyozyten durch Farbunterschiede visualisiert werden (siehe **Abb.26**).

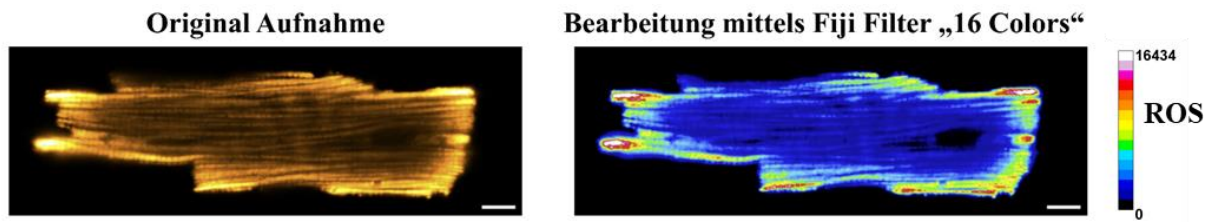


Abbildung 26 Bearbeitung der CellRox Orange Aufnahmen

Zur verbesserten Visualisierung zytoplasmatischer ROS erfolgte eine Bearbeitung mittels des Fiji Filters „16 Colors“. Areale mit gesteigerter zytoplasmatischer ROS-Produktion werden durch Farbunterschiede dargestellt (Scale Bar=25 μ m). Eigene Darstellung.

2.8 (Immun)-Histologische Untersuchungen der Herzen

Entnommene Herzen wurden für ein Zeitfenster von 24-48 Stunden in 4% Paraformaldehyd (Waldeck GmbH & Co. KG, Art.-Nr. F25) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Herzen wurden zur weiteren (immun)-histologischen Verarbeitung in 5 μ m dicke Schnitte verarbeitet und in 100% Xylol (Roth, Art.-Nr. 9713.3) entparaffiniert (2x10 min). Im Anschluss erfolgte die Rehydrierung der Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (2x100% Ethanol, 2x96% Ethanol, 2x70% Ethanol je 5 min) (99% Ethanol, Walter CMP GmbH, Art.-Nr. WAL642 5000). Nach einem weiteren Waschschriff in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in weiteren Aufarbeitungsschritten hinsichtlich kardialer Fibrose (Trichrom-Färbung), Zellgröße (WGA-Färbung), sowie Kapillardichte (Isolektin B4-Färbung) untersucht.

2.8.1 Ermittlung der kardialen Fibrose

Zur Bestimmung und Quantifizierung fibrotischer Areale wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte mittels der Masson-Trichrom-Färbung weiterverarbeitet. Nach Inkubation mit Bouin's Lösung (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. HT10132) über Nacht wurden die Schnitte 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Darstellung der Nuclei erfolgte im Anschluss eine 6-minütige Färbung mittels der Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. HT1079) durch Bindung der Lösung an negativ geladene Phosphatgruppen. Das in der Weigert's-Eisen-Hämatoxylin-Lösung enthaltene Eisen-3-Chlorid 25 % Salzsäure gewährleistet dabei, dass die Färbung der Nuclei in den weiteren Färbeschritten erhalten bleibt. Nach Inkubation mittels der Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung erfolgte erneut ein Waschschriff unter fließendem Leitungswasser. Im Folgenden erfolgte die Färbung des azidophilen Zytoplasmas, der Myofibrillen, des Kollagens, sowie weiterer bindegewebiger Strukturen mittels einer 4-minütigen Inkubation mit der Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung (Sigma Aldrich, Art.-Nr. HT151). Erneut wurde nach erfolgter Inkubation in destilliertem Wasser gespült und die Schnitte unter kontinuierlichem Schütteln für 5 Minuten in Phosphorwolframsäure (Sigma Aldrich, Art.-Nr. HT152) / Phosphormolybdänsäure (Sigma Aldrich Art.-Nr. HT153) inkubiert. Die Inkubation mit Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäure gewährleistet hierbei, dass an Kollagen gebundenes Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin entfernt wird, sodass Kollagenfasern im

weiteren Verlauf mit Hilfe von Anilinblau (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. HT154) unter 12-minütiger Inkubation dargestellt werden können (blaue Färbung von Kollagenfasern). Nach Inkubation in 1% Essigsäure für 2 Sekunden wurden die Schnitte erneut in destilliertem Wasser gespült und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2x70% Ethanol, 2x96% Ethanol, 2x100% Ethanol je 5 min) dehydriert. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation in Xylol (2x) wurden die gefärbten Schnitte mittels DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Art.-Nr. 18243.01) eingedeckt (siehe **Abb.27**). Eingedeckte Schnitte wurden mittels des Fluoreszenzmikroskopes Zeiss Axiostar plus (Zeiss) unter Verwendung der Software Axio Vision (Zeiss) aufgenommen. Bei den Aufnahmen wurde stets die gesamte Herzfläche aufgenommen in separaten Bildausschnitten und im Anschluss mit Hilfe der Software Fiji hinsichtlich der prozentualen kardialen Fibrose pro Gewebeareal beurteilt.

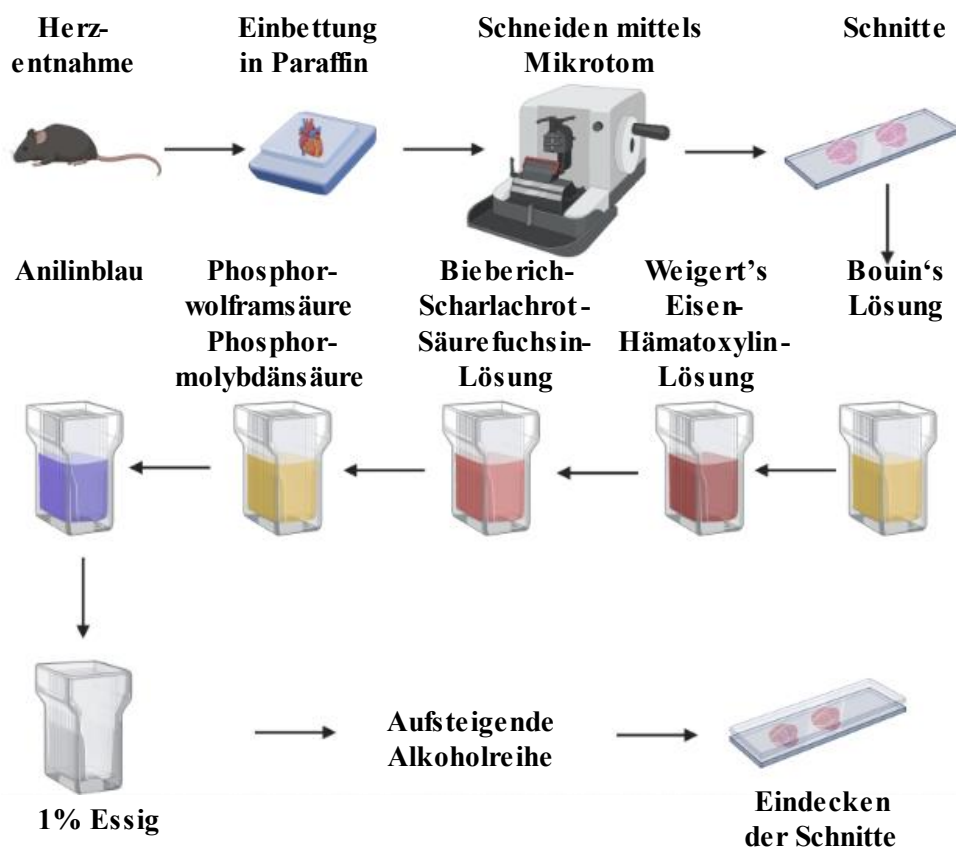


Abbildung 27 Durchführung der Masson-Trichrom-Färbung zur Ermittlung der kardialen Fibrose

Nach erfolgter Herzentnahme und anschließender Paraffineinbettung werden die eingebetteten Herzen mittels eines Mikrotoms in 5 µm dicke Schnitte verarbeitet. Durch eine Reihe histologischer Färbelösungen (Bouin's Lösung, Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung, Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung, Phosphorwolframsäure/ Phosphormolybdänsäure, Anilinblau) und anschließende Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgt die bläuliche Färbung von Kollagenfasern (fibrotischer Areale). Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2.8.2 Bestimmung der Zellgröße

Zur Ermittlung der Zellgröße wurden entparaffinierte und rehydrierte Schnitte unter Inkubation mit einer Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories, Art.-Nr. H3300250) unter 30-minütigem Kochen bei 95°C inkubiert (1:100 in destilliertem Wasser). Durch die Inkubation mittels der Antigen Unmasking Solution gekoppelt mit einer Hochtemperaturbehandlung wird die Freilegung der Zielepitope gewährleistet. Nach Waschen mittels PBS (2x5 min) erfolgte die Zugabe des Avidin-Block-Reagenz (Vector Laboratories, Art.-Nr. PK-4002) für 15 Minuten, sowie des Biotin-Block-Reagenz (Vector Laboratories, Art.-Nr. PK-4002) für weitere 15 Minuten. Durch die Avidin-Biotin-Block-Reagenzien sollten somit falsch-positive, unspezifische Signale minimiert werden. Ebenso wurden durch die nachfolgende 30-minütige Inkubation mit SuperBlock-Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. 37515) weitere unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindestellen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper WGA-Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Art.-Nr. W11262) (1:300 in PBS) über Nacht bei 4°C (siehe **Abb.28**). Der anti-WGA Primärantikörper bindet dabei an N-Acetylglucosamin-, sowie N-Acetylneuraminsäure-Reste, welche vorwiegend im Sarkolemm lokalisiert sind und eignet sich damit zur immunhistologischen Darstellung der Zellmembran. Zur entsprechenden Negativ-Kontrolle erfolgte eine Behandlung der Schnitte mit PBS anstelle des Primärantikörpers. Am Folgetag wurden die Nuclei nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Hoechst 33342 (Molecular Probes, Art.-Nr. H-1399) (1:50.000 in PBS) für 2 Minuten angefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift mittels PBS erfolgte abschließend das Eindecken der gefärbten Schnitte mit Roti-Mount FluorCare (Carl Roth, Art.-Nr. HP20.1). Die gefärbten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Observer.Z1 (Zeiss) mit der Software Axio Vision (Zeiss) visualisiert. Die Anregung der mittels Alexa Fluor 594 markierten Zellmembranen (WGA Färbung) erfolgt bei 591 nm, während die emittierte Fluoreszenz bei 614 nm detektiert wird. Zeitgleich erfolgt die Visualisierung der Nuclei mittels Hoechst. Die Hoechst-basierte Nuclei Darstellung folgt einer Anregung bei 352 nm, während die emittierte Fluoreszenz bei 454 nm erfasst wird (siehe **Abb.29**). Hierbei wurden pro Schnitt 10 Aufnahmen linksventrikulärer Areale durchgeführt.

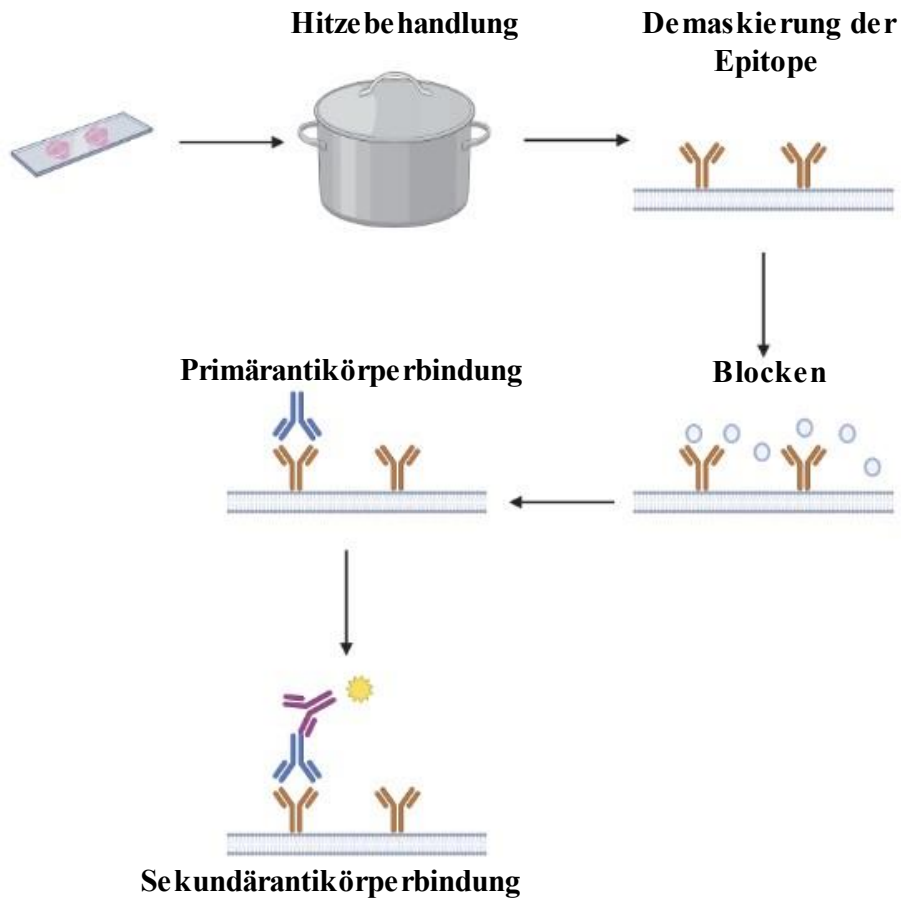


Abbildung 28 Durchführung der WGA-Färbung

Die Zielepitope entparaffinierter und rehydrierter Schnitte werden durch eine Hitzebehandlung demaskiert. Nach erfolgter Blockierung unspezifischer Bindestellen mittels des Avidin-Biotin-Block-Reagenzes erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-WGA Antikörper). Alexa Fluor 594 wurde als Sekundärantikörper verwendet, dessen Bindung nach Kopplung an den entsprechenden Primärantikörper (anti-WGA Antikörper) fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden kann. Die Darstellung der Nuclei erfolgte Hoechst 33342 basiert. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

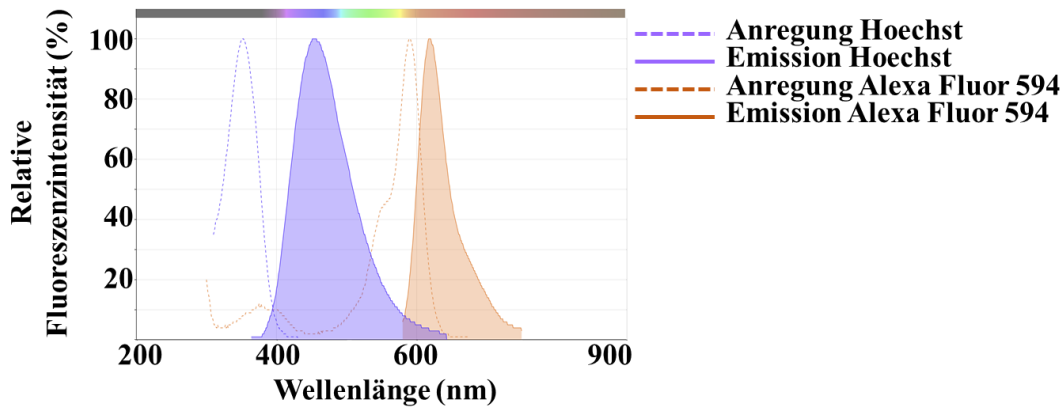


Abbildung 29 Fluoreszenzspektren von Hoechst und Alexa Fluor 594

Zur Beurteilung der Zellgröße erfolgte die immunfluoreszenzbasierte Färbung des Wheat-germ-agglutinins mittels Alexa Fluor 594, wobei das Anregungsmaximum bei 591 nm liegt, während die maximale Emission bei 614 nm detektiert werden kann. Die Visualisierung der Nuclei erfolgte mittels Hoechst 33342. Hoechst 33342 weist ein Anregungsmaximum bei 352 nm auf, während die maximale emittierte Fluoreszenz bei 454 nm erfasst werden kann (modifiziert nach <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer>).

2.8.3 Auswertung der Zellgrößen

Die Auswertung der Zellgröße erfolgte mit Hilfe der Software Fiji. Hierzu wurde folgendes Macro installiert (siehe **Abb.30**).

Durch Festlegung eines einheitlichen Schwellenwertes (sog. Threshold) wurde die Separierung der einzelnen Pixel in weiße und schwarze Pixel erzielt. Diese Separierung ermöglicht die Darstellung der Zellmembranen als weiße Pixel, während der detektierte Hintergrund schwarz dargestellt wird. In einem weiteren Schritt wurden darauf die weiß detektierten Zellmembranen umrandet und einzelnen Areale bzw. deren eingeschlossene Fläche mittels des Analyze Particles Tools automatisiert gezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen und deren Zellvolumina (ausgegeben als Area) konnte der Ergebnis Ausgabe entnommen werden.

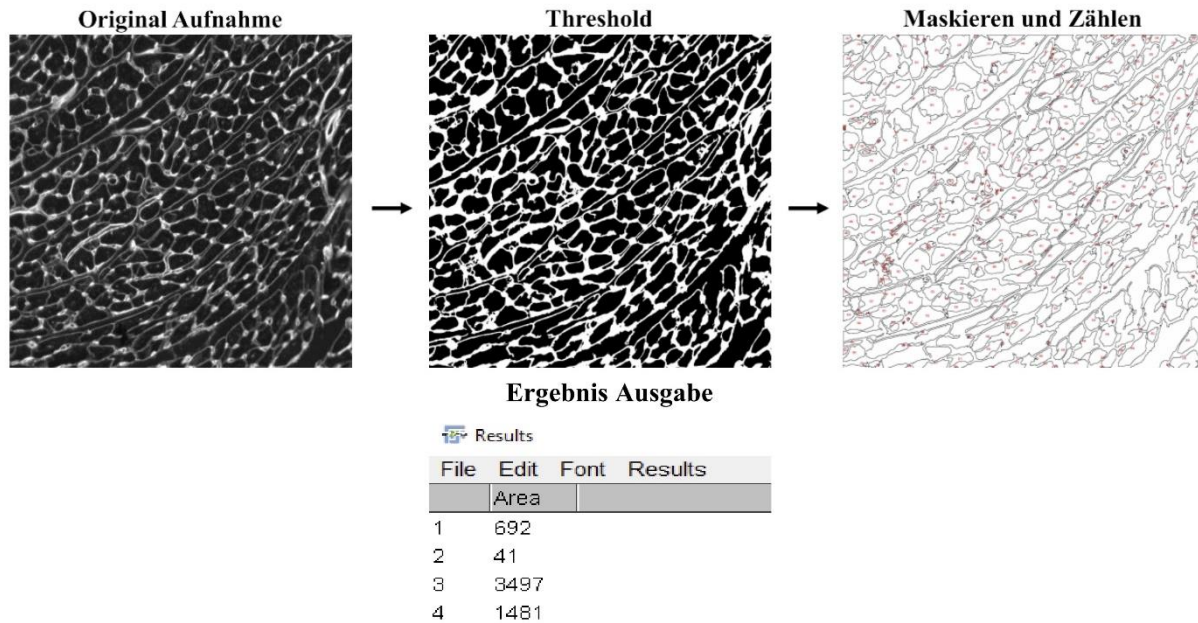


Abbildung 30 Schrittweises Prozessieren der WGA-gefärbten Gewebeschnitte mittels eines Makros

Die automatisierte Auswertung erfolgte durch die schrittweise Prozessierung der Originalaufnahmen über Definition eines Schwellenwertes zur Separierung der WGA-gefärbten Zellmembranen vom Hintergrund und anschließendes Zählen der detektierten Zellen und deren Zellvolumina. Eigene Darstellung.

2.8.4 Ermittlung der Kapillardichte

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurde die immunhistologische Färbung mit Isolektin B4 durchgeführt. Isolektin B4 bindet spezifisch an Glykokonjugate des Endothels mit α -Galactosyl-Resten, wodurch Isolektin B4-basiert die Endothelien dargestellt werden. Zur initialen Demaskierung und Freilegung der Zielepitope der Schnitte erfolgte eine Hochtemperaturbehandlung bei 95°C für 30 Minuten in Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories, Art.-Nr. H3300250). Im Anschluss wurde eine 15-minütige Inkubation mit Avidin (Vector Laboratories, Art.-Nr. PK-4002), gefolgt von einem 5-minütigen Waschschriff in PBS, durchgeführt. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation mit Biotin (Vector Laboratories, Art.-Nr. PK-4002) erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mittels des SuperBlock-Blocking Buffers (Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. 37515) für 1 Stunde bei RT. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Antikörperinkubation mit Isolektin B4 (Vector Laboratories, Art.-Nr. B1205) über Nacht bei 4°C (1:200 in PBS). Als Negativ-Kontrolle diente dabei ein Schnitt, welcher anstelle von Isolektin B4 mit PBS behandelt wurde. Nach der Antikörperinkubation und zweimaligem Waschen der Schnitte mit PBS (für 5 min) wurden die Schnitte mittels des VECTASTAIN ABC Kits (Vector Laboratories, Art.-Nr. SP-8400) inkubiert. In einem letzten Schritt wurden die Zellkerne mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Hoechst 33342 (Molecular Probes, Art.-Nr. H-1399) (1:50.000 in PBS) für 2 Minuten gefärbt. Nach einem erneuten Waschschriff mittels PBS erfolgte abschließend das Eindecken der gefärbten Schnitte mit Roti-Mount FluorCare (Carl Roth, Art.-Nr. HP20.1). Die Visualisierung der gefärbten Schnitte wurde analog zur Färbung mittels WGA (Zellmembranfärbung) am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Observer.Z1 (Zeiss) mit der Software

Axio Vision (Zeiss) durchgeführt. Hierbei wurden pro Schnitt 10 Aufnahmen linksventrikulärer Areale erfasst.

2.8.5 Auswertung der Kapillardichte

Die Auswertung der Kapillardichte erfolgte mit Hilfe der Software Fiji. Hierzu wurde folgendes Macro installiert (siehe **Abb.31**).

In einem initialen Schritt wurde ein Schwellenwert (Threshold) festgelegt, bei welchem die einzelnen Pixel in weiße oder schwarze Pixel separiert wurden. Diese Methodik ermöglichte folglich eine Separierung der gefärbten Kapillaren vom detektierten Hintergrund. Grün gefärbte Pixel wurden folglich in weiße Pixel konvertiert, während der Hintergrund schwarz dargestellt wurde. In einem weiteren Schritt wurden dann die weiß dargestellten Kapillaren umrandet und die die einzelnen Areale mittels des Analyze Particles Tools automatisiert gezählt. Die Anzahl der gezählten Kapillaren konnte der Ergebnis Ausgabe entnommen werden (in diesem Bild wurden beispielsweise 31 Kapillaren ermittelt).

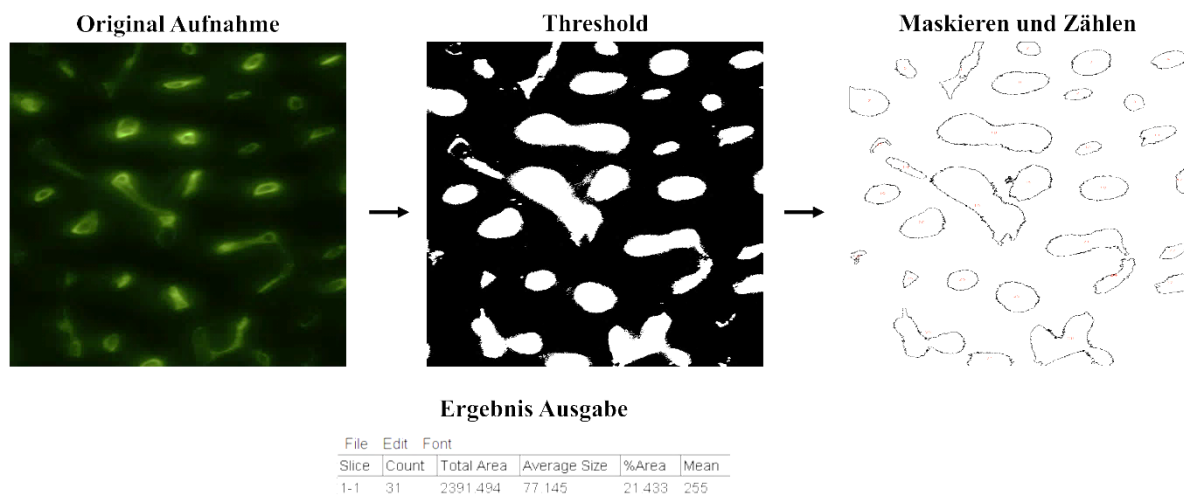


Abbildung 31 Schrittweises Prozessieren der Isolektin B4-gefärbten Gewebeschnitte mittels eines Makros

Durch die schrittweise Prozessierung der Originalaufnahmen über Definition eines Schwellenwertes zur Separierung der Kapillaren vom Hintergrund und anschließendes Zählen der Kapillaren erfolgte die automatisierte Auswertung. Eigene Darstellung.

2.9 Western Blot zur Quantifizierung der relativen Proteinexpression und zum Nachweis posttranslationaler Proteinmodifikationen

Zur Ermittlung der Proteinexpression relevanter Proteine und deren posttranslationalen Modifikation (durch Phosphorylierung) des kardialen Ca^{2+} -Haushaltes wurden Western Blots aus isolierten Kardiomyozyten, sowie aus Myokardgewebe durchgeführt. Grundsätzlich wurden zur Untersuchung der *akuten* DICM Kardiomyozyten isoliert (*akutes* Modell), während zur Beurteilung der *chronischen* DICM der linke Ventrikel isoliert wurde (*chronisches* Modell).

2.9.1 Gewinnung der Proben

Isolierte Kardiomyozyten wurden hierfür 30 Minuten mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Doxorubicin bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, anschließend geerntet und bei -80°C gelagert (*akutes* Modell). Zudem wurde der linke Ventrikel der Versuchstiere entnommen und ebenfalls bei -80°C gelagert (*chronisches* Modell).

2.9.2 Herstellung der Lysate und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Kardiomyozytenpellets/das Myokardgewebe mit 100 μL Lysepuffer (siehe **Tab.6**) versetzt und mechanisch zerkleinert. Die Proben wurden dabei 30 Minuten mit dem Lysepuffer inkubiert und die Zelllyse durch regelmäßiges Vortexen der Proben (nach 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten) gefördert. Die Gewinnung der Lysate erfolgte nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm, 4°C, 10 min. Hierbei stellte der Überstand das Lysat dar, welches für die nachfolgende Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines BCA-Assays (Thermo Fisher Scientific, Art.Nr.:23225) verwendet wurde. Unter spektroskopischer Messung der Absorption bei 540 nm am Photometer infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd.) konnte somit die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde stets in Triplikaten durchgeführt, wobei die mittlere Proteinkonzentration jeder Probe verwendet wurde.

Zur Gewährleistung einer konstanten Proteinkonzentration der Proben von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ erfolgte die Verdünnung mit PBS und Ladepuffer. Bei Verwendung des Ladepuffers wurde hierbei zwischen reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen differenziert. Durch den Beisatz von 10% $\beta\text{-ME}$ (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. M-7522) zum Ladepuffer wird die Denaturierung der Disulfidbrücken der Proteine erzielt. Um die Reduktion vorhandener Disulfidbrücken oxidierter Proteine (z.B. $\text{oxCaMKII}\delta$) zu verhindern, wurde der Ladepuffer jedoch ohne Zusatz von 10% $\beta\text{-ME}$ verwendet (nicht-reduzierende Bedingung). Im Anschluss wurden zytoplasmatische Proteine für 5 min bei 95°C und membranständige Proteine für 30 min bei 37°C denaturiert. Darauf erfolgte der Proteinnachweis mittels Western Blot.

Tabelle 6 Lysepuffer

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Lysepuffer	Tris-HCl	Sigma-Aldrich T1503	20 mmol/L	Tris-HCl wurde mit einem pH-Wert von 7.4 verwendet.
	NaCl	VWR Chemicals 27810.295	200 mmol/L	
	NaF	Roth 28.18.1	20 mmol/L	
	Triton X-100	Sigma-Aldrich T9284	0.01%	
	Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich S6508	1 mmol/L	Die Zugabe von Na ₃ VO ₄ , DTT, sowie der Protease-, und Phosphataseinhibitoren erfolgte auf Eis.
	DTT	Roth 6908.3	1 mmol/L	
	Protease-Inhibitoren	Roche Diagnostics, Art.-Nr. 4693159001	0.1%	
	Phosphatase-Inhibitoren	Roche Diagnostics, Art.-Nr. 4906837001	0.1%	

Herzentnahme

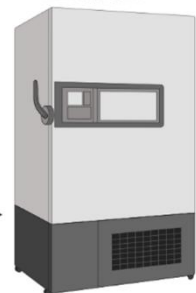
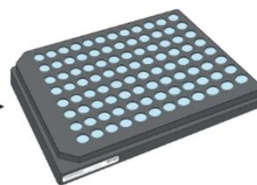
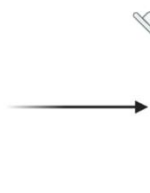
Herstellung
von LysatenBestimmung der
ProteinkonzentrationLagerung der
Proben

Abbildung 32 Vorbereitung der Proben für den Western Blot

Nach Gewinn muriner ventrikulärer Kardiomyozyten/des linken Ventrikels erfolgte die Herstellung von Lysaten, deren Proteinkonzentration mittels eines BCA-Assays ermittelt wurde. Die Lagerung der Proben bis zur Durchführung des Western Blots erfolgte bei -80°C. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2.9.3 Western Blot

Zum Nachweis der Proteinexpression zentraler Ca^{2+} -regulierender Elemente und deren posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylierung wurden Western Blots durchgeführt. Dabei gliederte sich das Versuchsprotokoll in mehrere Teilschritte nach erfolgter Probenaufbereitung. Zur Separierung der Proteine wurde initial eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Im Anschluss wurden die separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen konnte durch Inkubation mit variablen Primärantikörpern (und entsprechenden Sekundärantikörpern) chemilumineszenzbasiert die Detektion der Zielproteine erfolgen (siehe Abb.33).

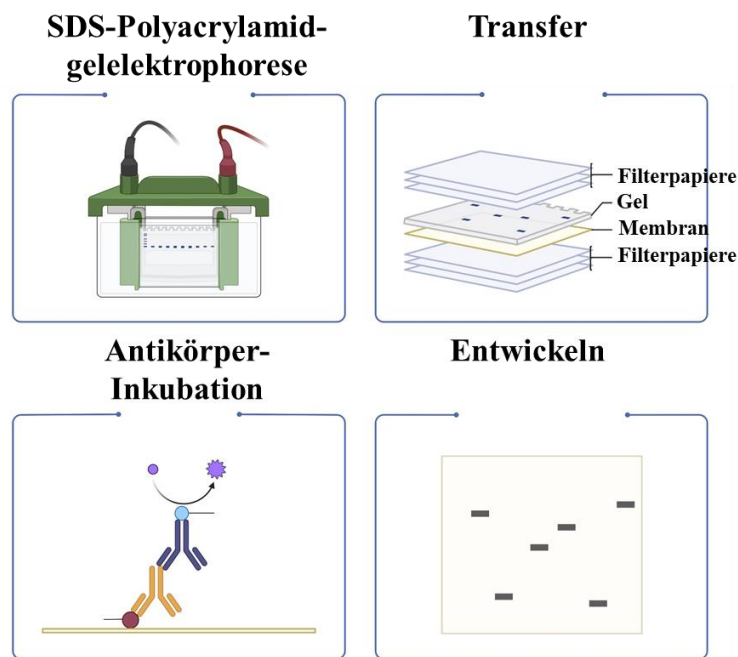


Abbildung 33 Ablauf des Western Blots

Nach vertikaler Auftrennung der Zielproteine mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese erfolgt der horizontale Transfer der Proteine auf eine Membran (Nitrocellulosemembran). Durch Inkubation mit variablen Primärantikörpern und deren speziesspezifischen Sekundärantikörpern wird die chemilumineszenzbasierte Detektion der Zielproteine ermöglicht. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

2.9.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde eine vertikale Separierung der Proteine in Abhängigkeit ihrer Proteingröße gewährleistet. Durch den Polyacrylamidanteil der verwendeten SDS-Gele konnten somit Proteine getrennt werden, d.h. bei einem hohen Polyacrylamidanteil wurden kleinere Proteine leichter separiert, während bei einem geringen Polyacrylamidanteil größere Proteine besser separiert werden konnten. Zur Separierung der

Proteine wurden zudem in Abhängigkeit der vorliegenden Proteingröße unterschiedliche Polyacrylamidanteile der Trenngele verwendet (5% Trenngel: RyR2, pS2814/RyR2; 8% Trenngel: LTCC, SERCA2a, CaMKII δ , α CaMKII, pT287/CaMKII δ , GAPDH; 11% Trenngel: PLB, pT17/PLB). Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde bei 60 mA (konstant), 150 V, 50 W für ca. 2 Stunden in einem Laufpuffer (siehe **Tab.7**) durchgeführt, bis eine vollständige Auftrennung der Proteine erzielt wurde.

Tabelle 7 Laufpuffer

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Laufpuffer für die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Tris Base	Sigma-Aldrich T1503	100 mmol/L	Der pH- Wert wurde auf 8.3 bei RT eingestellt.
	Glycin	Carl Roth 0079.4	767 mmol/L	
	SDS	Carl Roth 2326.1	13.8 mmol/L	

2.9.3.2 Transfer

Der Transfer der mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese separierten Proteine erfolgte nach dem Wet-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran. Die Immobilisierung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgt dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Nitratgruppen der Nitrocellulosemembran, sowie den Peptidbindungen der Proteine. Für diesen Proteintransfer wurden sogenannte „Sandwiches“ mit folgendem Aufbau erstellt: Schwamm, 2x Filterpapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel, 2x Filterpapier, Schwamm. Der Transfer wurde bei 400 mA (konstant), 150 V, 50 W für 2 h in Transferpuffer (siehe **Tab.8**) und auf Eis durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte eine Färbung der Nitrocellulosemembran mittels Ponceau S (siehe **Tab.9**), welches unspezifisch an die transferierten Proteine bindet, wodurch diese in Form einzelner Banden visualisiert werden können. Die Bindung von Ponceau S an Proteine beruht hierbei auf dessen molekularer Struktur. Durch die Sulfatgruppen weist Ponceau S eine negative Ladung auf, wodurch die Bindung an positiv geladene Aminogruppen der Proteine erzielt wird. Durch die Färbung mit Ponceau S konnte somit eine Kontrolle auf einen erfolgreichen Proteintransfer durchgeführt werden, zum anderen wurde das Schneiden der Nitrocellulosemembran für die Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern erleichtert. Nach Schneiden der Nitrocellulosemembran wurde Ponceau S durch einen Waschschrift mit TBS-T (siehe **Tab.10**) entfernt.

Tabelle 8 Transferpuffer

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Transferpuffer	Tris Base	Sigma-Aldrich T1503	130 mmol/L	Der pH-Wert wurde auf 8.3 bei RT eingestellt.
	Glycin	Carl Roth 0079.4	767 mmol/L	
	SDS	Carl Roth 2326.1	0.01 %	
	Methanol	Carl Roth 8388.6	20 %	

Tabelle 9 Ponceau S

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
Ponceau S	Ponceau S	Thermo Fisher Scientific A40000279	0.5 %	Der pH-Wert wurde auf 8.3 bei RT eingestellt.
	Essigsäure	Roth 6755.5	1 %	

Tabelle 10 Waschpuffer TBS-T

Lösung	Substanz	Firma/ Artikelnummer	Konzentration	Bemerkung
TBS-T	Tris Base	Sigma-Aldrich T1503	20 mmol/L	Der pH-Wert wurde auf 7.5 bei RT eingestellt.
	NaCl	VWR Chemicals 27810.295	130 mmol/L	
	Tween 20	Carl Roth 9127.1	0.1 %	

2.9.3.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Primärantikörperinkubation

Um die unspezifische Bindung der Primärantikörper zu minimieren erfolgte in einem nächsten Schritt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 5% Milch für 1 Stunde bei RT. Im Anschluss wurde die Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern (siehe **Tab.11**) durchgeführt, welche in 5% Milch verdünnt wurden. Die Primärantikörperinkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Tabelle 11 Primärantikörper

Protein/ Primär- Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma/ Artikelnummer	Funktion
CaMKII δ	Kanninchen	1:10.000	AG Bers	Modifikation Ca ²⁺ -regulierender Proteine
pT287/ CaMKII δ	Maus	1:1.000	Thermo Fisher Scientific	Nachweis der Phosphorylierungsabhängigen CaMKII δ Aktivierung
oxCaMKII	Kanninchen	1:1.000	GeneTex GTX36254	Nachweis der oxidativ-aktivierten CaMKII
SERCA2a	Maus	1:10.000	ABR Affinity Bioreagents MA3-919	SR Ca ²⁺ -Aufnahme
LTCC	Kanninchen	1:500	Almone Labs ACC-003	Sarkolemmaler Ca ²⁺ -Einstrom
PLB	Maus	1:10.000	Badrilla A010-14	Regulation von SERCA2a
pT17/ PLB	Kanninchen	1:5.000	Badrilla A010-13	CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung von PLB, dadurch Regulation von SERCA2a
RyR2	Kanninchen	1:10.000	Sigma Aldrich HPA020028	Modifikation des SR Ca ²⁺ -Gehaltes durch Regulation des SR Ca ²⁺ -Lecks
pS2814/ RyR2	Kanninchen	1:10.000	Badrilla A010-31	CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung des RyR2

2.9.3.4 Waschschritte und Sekundärantikörperinkubation

Nach erfolgter Primärantikörperinkubation wurden durch dreimalige Waschschritte mit TBS-T für jeweils 10 min unspezifisch gebundene Primärantikörper entfernt, und folglich das unspezifische Hintergrundsignal minimiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (siehe **Tab.12**), welche mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiert sind für 1 Stunde bei RT.

Tabelle 12 Sekundärantikörper

Protein	Donor des Primär-antikörpers	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma und Artikelnummer
CaMKII δ	Kanninchen	α -Rabbit	1:15.000	GE Healthcare, NA934
pThr287/ CaMKII δ	Kanninchen	α -Rabbit	1:5.000	GE Healthcare, NA934
oxCaMKII	Kanninchen	α -Rabbit	1:10.000	GE Healthcare, NA934
SERCA2a	Maus	α -Mouse	1:10.000	GE Healthcare, NA931
LTCC	Kanninchen	α -Rabbit	1:5.000	GE Healthcare, NA934
PLB	Maus	α -Mouse	1:5.000	GE Healthcare, NA931
pT17/ PLB	Kanninchen	α -Rabbit	1:5.000	GE Healthcare, NA934
RyR2	Kanninchen	α -Rabbit	1:10.000	GE Healthcare, NA934
pS2814/ RyR2	Kanninchen	α -Rabbit	1:10.000	GE Healthcare, NA934

Nach Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte die Detektion der Proteine mittels des WesternBrigh ECL Chemilumineszenz Substrates (Biozym Scientific, Art.-Nr. 541005) und unter Verwendung eines Röntgengeräts (Eastman Kodak Company). Hierbei wird die Detektion von Proteinen chemilumineszenzbasiert ermöglicht. Die Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper reagieren mit zugefügten Substraten (Peroxidlösung und Luminol) unter Emission bei 425 nm. Dieses Signal verhält sich proportional zur entsprechenden Proteinmenge und kann durch Verwendung von Röntgenfilmen visualisiert werden.

2.9.3.5 Auswertung der Western Blot Daten

Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte mittels der Software Fiji. Hierzu wurde in einem ersten Schritt der Hintergrund jeder Proteinbande bestimmt und von den jeweiligen Banden subtrahiert. Die erhaltenen Daten wurden stets auf die jeweiligen Wildtyp-Kontrollen normiert.

2.10 Schematische Darstellungen

Die Schaubilder wurden mittels der Softwares Inkscape und BioRender erstellt.

2.11 Statistik

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (MW $\pm$ SEM). Die vergleichende statistische Analyse zweier unabhängiger Gruppen erfolgte mittels eines ungepaarten t-Tests, um mehrere Gruppen zu vergleichen wurden hingegen One-Way-Anovas durchgeführt. Zur Analyse wiederholter Messungen (z.B. Faktor A = Zeitlicher Verlauf, Faktor B = Behandlung) wurden Two-Way-RM Anovas durchgeführt. Die statistische Auswertung, sowie die graphische Darstellung der Daten wurde mittels Graph Pad Prism 9.0 und Sigma Plot 12.5 durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0.05 bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Dysregulation des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes unter akuter DOX Exposition basiert auf einem CaMKII δ -induzierten diastolischem SR Ca^{2+} -Leck

Wie **Abb. 34** zu entnehmen ist, resultiert die *akute* DOX-Exposition in einer signifikanten Reduktion der systolischen Ca^{2+} -Transientenamplitude DOX-exponierter CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, sowie CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten (jeweils $p < 0.0001$). Diese DOX-induzierte Verminderung der systolischen Ca^{2+} -Transientenamplitude war mit einer signifikanten Verlangsamung der Relaxation (sog. Ca^{2+} -Transientenabfall) vergesellschaftet, was auf eine Beeinträchtigung der diastolischen Ca^{2+} -Reduktion unter *akuter* DOX-Exposition hindeutet ($p < 0.0001$ für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$; $p = 0.011$ für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$). Interessanterweise konnte sowohl unter genetischer Deletion der CaMKII δ (mittels des CaMKII $\delta^{-/-}$ Models), als auch unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP diese DOX-induzierte Beeinträchtigung der systolischen Ca^{2+} -Transientenamplitude, sowie der Relaxationskinetik verhindert werden.

Für die beobachteten Ca^{2+} -Dysregulationen unter *akuter* DOX-Behandlung kann ursächlich eine DOX-induzierte Ca^{2+} -Depletion des SR als Folge eines gesteigerten diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks in Erwägung gezogen werden, was weiterführend untersucht wurde. Entsprechend der reduzierten systolischen Ca^{2+} -Transientenamplituden wiesen DOX-exponierte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, als auch CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten einen reduzierten SR Ca^{2+} -Gehalt auf (jeweils $p < 0.0001$). Durch genetische Deletion der CaMKII δ (CaMKII $\delta^{-/-}$), sowie durch die AIP-basierte pharmakologische CaMKII-Inhibition konnte die DOX-induzierte Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes verhindert werden ($p = 0.002$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX; $p = 0.002$ für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX+AIP; $p = 0.004$ für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX+AIP) (siehe **Abb.35**).

Ursächlich für die DOX-induzierte Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes kann dabei neben einer verminderten SERCA2a-vermittelten SR Ca^{2+} -Aufnahme ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck über den sarkoplasmatischen RyR2 sein, weswegen in einem nächsten Schritt das diastolische SR Ca^{2+} -Leck untersucht wurde. Entsprechend **Abb.36** konnte nachgewiesen werden, dass die DOX-induzierte Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten zu einer Erhöhung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks führt (jeweils $p < 0.0001$), wobei dieses sowohl durch genetische CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$), als auch unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP verhindert wurde.

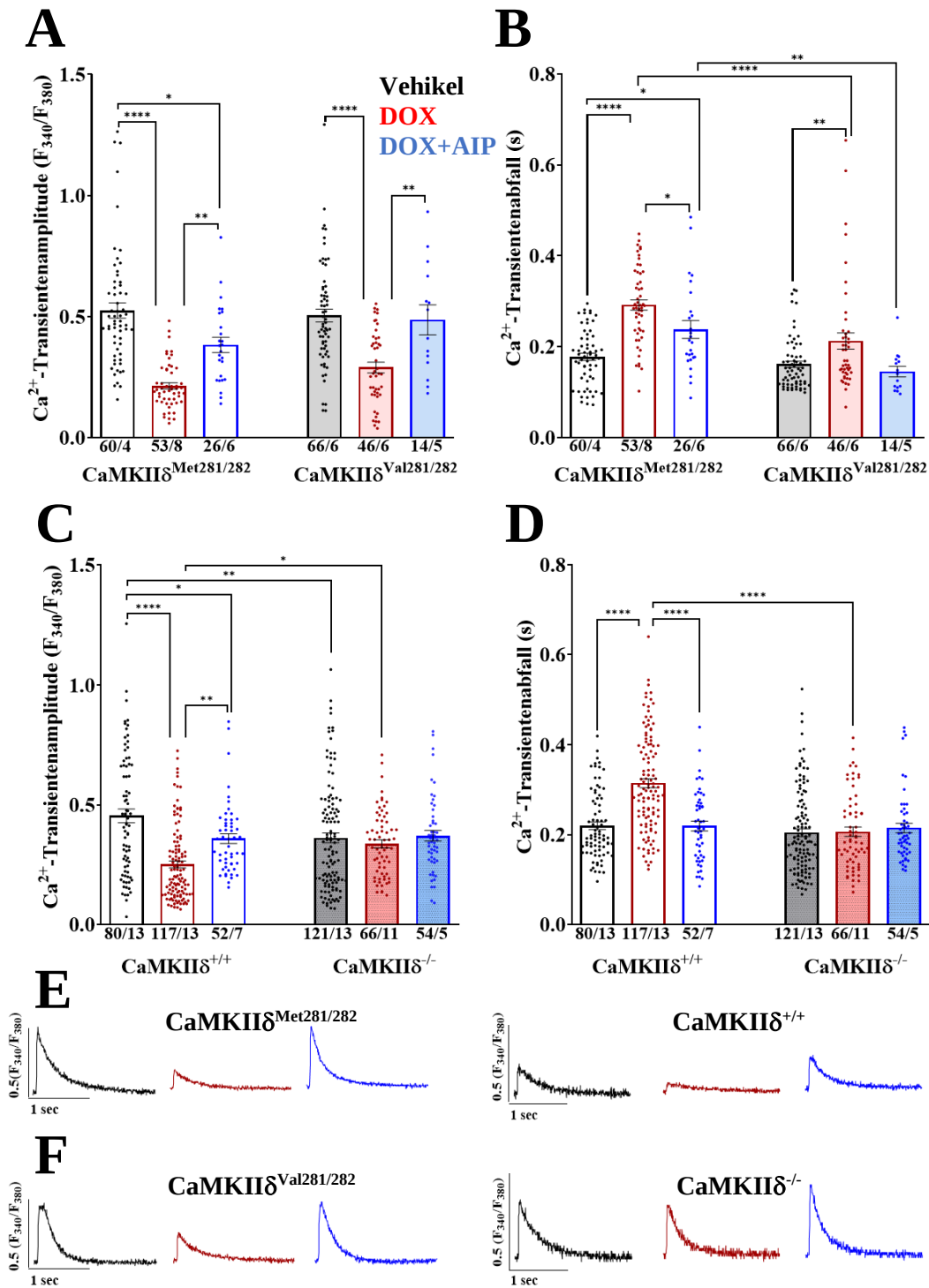


Abbildung 34 $\text{CaMKII}\delta$ -abhängige Ca^{2+} -Dysregulationen unter akuter DOX-Exposition

Unter *akuter* DOX-Exposition kommt es zur Abnahme systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden von $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten (**A**), was mit einem verlangsamtem Ca^{2+} -Transientenabfall einhergeht (**B**). Während es in $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Kardiomyozyten zur Reduktion systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden (**C**), sowie zur verlangsamten Relaxation (**D**) kommt, resultiert die pharmakologische CaMKII -Inhibition (AIP) und die genetische $\text{CaMKII}\delta$ -Inhibition ($\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Model) in der Verhinderung DOX-induzierter Ca^{2+} -Dysregulationen. Repräsentative Originalaufnahmen Fura2-AM beladener $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten (**E**), sowie von $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (**F**). Die Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt (n =Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

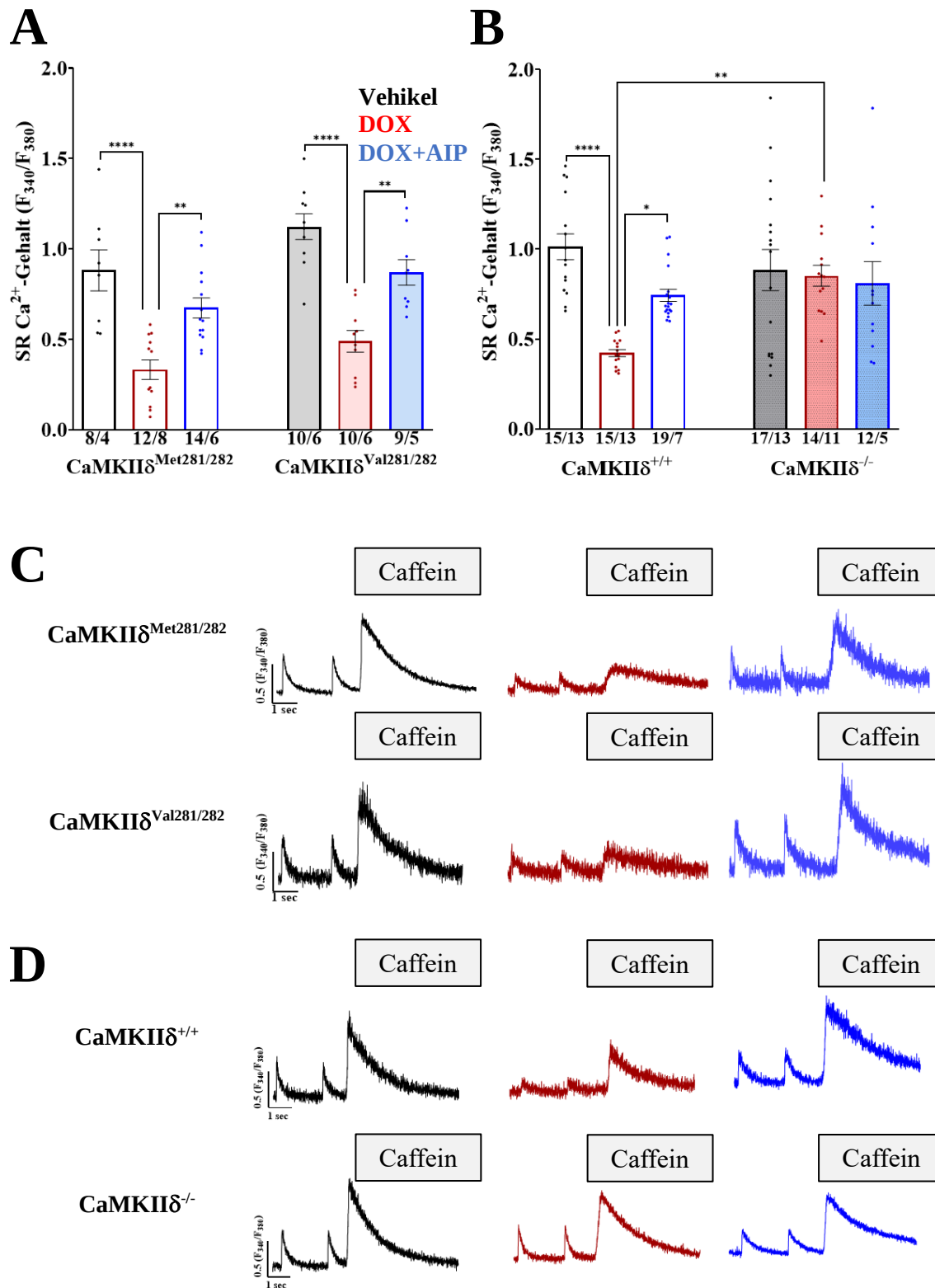


Abbildung 35 CaMKII δ -abhängige SR Ca^{2+} -Depletion

Sowohl CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, als auch CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten weisen unter *akuter* DOX-Exposition eine Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes auf (**A**). Gleichermäßen kommt es zur SR Ca^{2+} -Depletion in DOX-exponierten CaMKII $\delta^{+/+}$ Kardiomyozyten (**B**), wobei mittels pharmakologischer CaMKII-Inhibition (AIP) und genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$) die DOX-induzierte SR Ca^{2+} -Depletion verhindert wird. Original Aufnahmen der Caffein-induzierten SR Ca^{2+} -Freisetzung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (**C**), sowie in CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (**D**). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

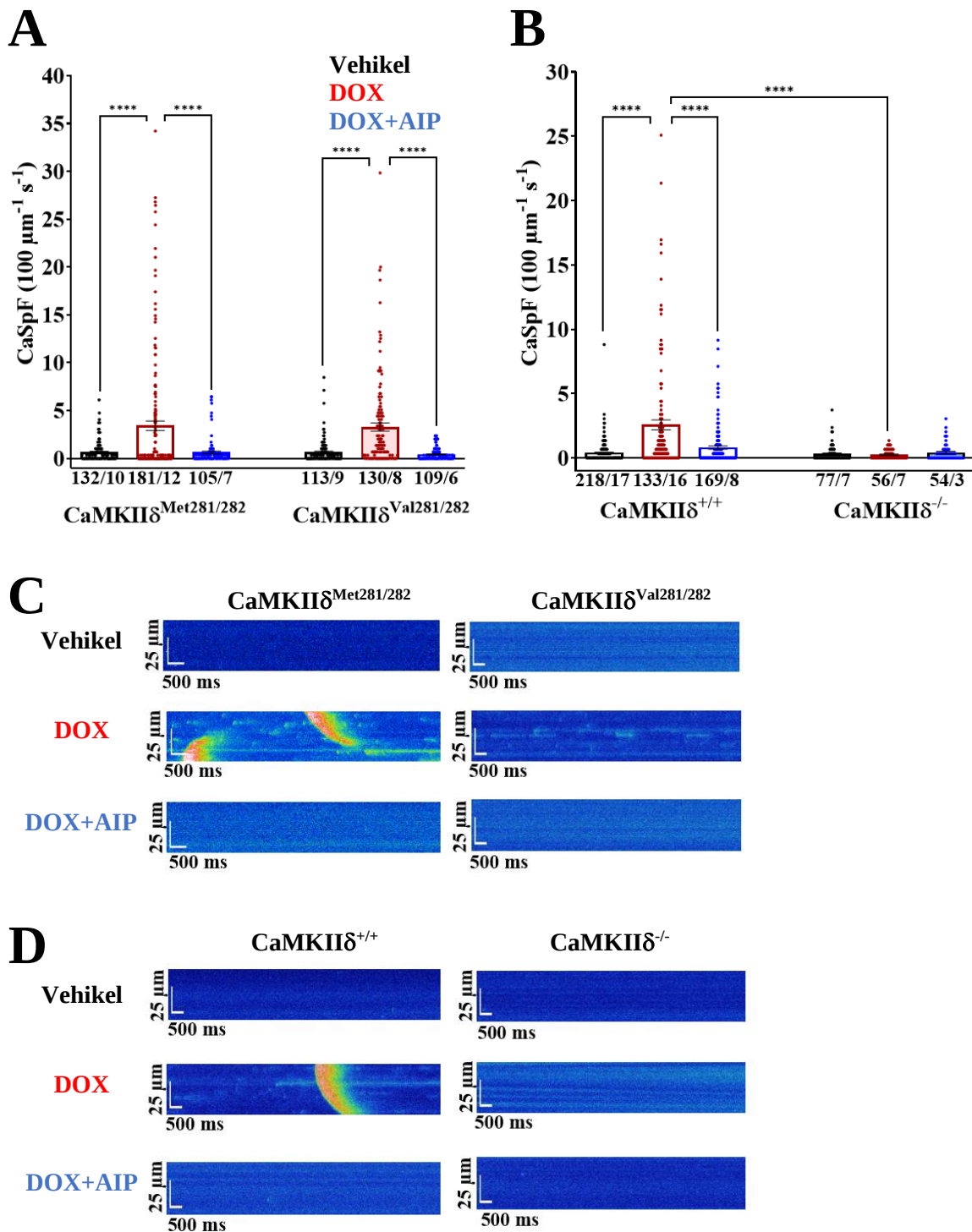


Abbildung 36 CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unter akuter DOX-Exposition

DOX-exponierte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, sowie CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten weisen ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck auf, welches durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Sparkfrequenz gekennzeichnet wird (A). Ein gleichermaßen erhöhtes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck konnte in DOX-exponierten CaMKII $\delta^{+/+}$ Kardiomyozyten nachgewiesen werden (B), während unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP, sowie genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$) die DOX-induzierte Erhöhung des SR Ca^{2+} -Lecks verhindert wurde. (C) Repräsentative Line-Scans Fluo4-AM-beladener CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, sowie CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (D). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

Basierend auf diesem Datensatz, lässt sich annehmen, dass es unter *akuter* DOX-Exposition zu einer CaMKII δ -vermittelten Induktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks kommt, wofür die oxidativ-bedingte Aktivierung der CaMKII δ nicht erforderlich ist. Die CaMKII δ -abhängige Hyperphosphorylierung des sarkoplasmatischen RyR2 geht mit einem gesteigerten diastolischen SR Ca²⁺-Leck einher, weshalb die CaMKII δ -induzierte Phosphorylierung des RyR2 (an der Aminosäureposition Serin-2814) in einem folgenden Schritt untersucht wurde. Die gesteigerte RyR2-Hyperphosphorylierung ist dabei Folge einer CaMKII δ -Hyperaktivierung. Zur weiteren Belichtung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der DOX/CaMKII δ -vermittelten Induktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks wurde daher die Autophosphorylierung der CaMKII als Maß einer gesteigerten CaMKII δ -Aktivität, sowie die CaMKII δ -abhängige RyR2-Phosphorylierung (an Serin-2814) untersucht. Wie den Originalaufnahmen der Western-Blot Analysen in **Abb.37** zu entnehmen ist, konnte in DOX-exponierten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten eine gesteigerte CaMKII-Autophosphorylierung (an der Aminosäureposition Threonin-287) im Verhältnis zur Gesamtexpression der CaMKII δ nachgewiesen werden, was mit einer gesteigerten CaMKII δ -Aktivität verbunden ist. In Folge der DOX-induzierten CaMKII δ -Hyperaktivierung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten konnte ebenso eine RyR2-Hyperphosphorylierung an der CaMKII δ -spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin-2814 nachgewiesen werden.

Entsprechend der fehlenden CaMKII δ -Expression in CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten wurde die CaMKII δ -induzierte RyR2-Hyperphosphorylierung verhindert, was die CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung als Mediator des DOX-gesteigten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks nahelegt. Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass die *akute* DOX-Exposition die Oxidation der CaMKII nicht signifikant beeinflusst, was erneut die Relevanz der Ca/CaM-aktivierten CaMKII δ gegenüber der oxidativ-aktivierten CaMKII δ bei der Pathogenese der *akuten* DICM und der Induktion des CaMKII δ -vermittelten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks hervorhebt.

Die DOX-induzierte Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes kann neben einer gesteigerten CaMKII δ -vermittelten RyR2-Hyperphosphorylierung und konsekutiv gesteigertem diastolischen SR Ca²⁺-Leck auch durch eine verminderte SR Ca²⁺-Aufnahme bedingt werden. Die SR Ca²⁺-Aufnahme wird wesentlich durch SERCA2a und dessen Regulator PLB vermittelt, weswegen die Proteinexpression dieser Proteine in einem weiteren Schritt untersucht wurde. Dabei konnte weder in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, noch in CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten eine DOX-induzierten Veränderung der SERCA2a/PLB Proteinlevel, sowie der CaMKII δ -abhängigen PLB-Phosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-17 nachgewiesen werden. Ebenso ist anzuführen, dass keine DOX-abhängige Regulation der LTCC-Proteinexpression als weiteres zentrales Protein der kardialen elektromechanischen Kopplung aufgezeigt werden konnte (siehe **Tab.13**).

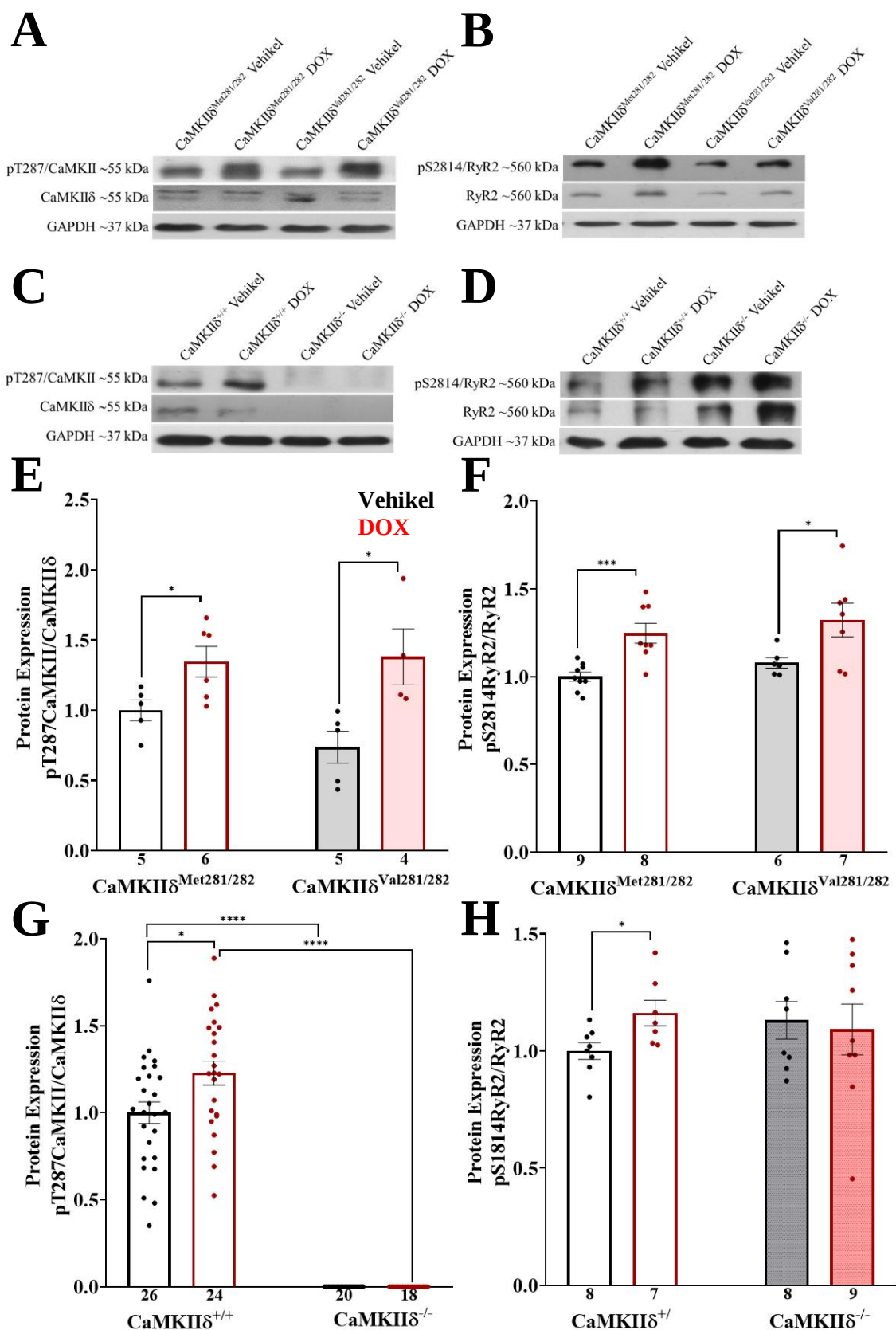


Abbildung 37 CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung unter akuter DOX-Exposition

Die *akute* DOX-Exposition resultiert in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten in einer gesteigerten CaMKII-Autophosphorylierung (Threonin-287), was mit einer gesteigerten CaMKII δ -Aktivität verbunden wird (A).

Die CaMKII δ -Hyperaktivierung ist mit der CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung (Serin-2814) vergesellschaftet (**B**). Die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung in CaMKII $\delta^{+/+}$ Kardiomyozyten ist nicht nachweisbar unter genetischer CaMKII δ -Deletion (**C**), was mit einer fehlenden RyR2-Hyperphosphorylierung verbunden ist (**D**). Die Mittelwerte verdeutlichen die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten (**E**) und die konsekutive RyR2-Hyperphosphorylierung (**F**). Die fehlende CaMKII δ -Expression in CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (**G**) ist mit einer fehlenden DOX-induzierten RyR2-Hyperphosphorylierung vergesellschaftet (**H**). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

Tabelle 13 Normierte Proteinexpression in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten

* Signifikanz vs. Vehikel

Signifikanz vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ bzw. CaMKII $\delta^{+/+}$ (WT-Geschwistertier)

Tabelle 13								
Protein	CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$				CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$			
	Vehikel	n	DOX	n	Vehikel	n	DOX	n
CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.084	5	1.265 $\pm$ 0.115	6	0.717 $\pm$ 0.078 [#]	5	1.071$\pm$0.061*	4
pT287/CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.074	5	1.346$\pm$0.108*	6	0.737 $\pm$ 0.113	5	1.380$\pm$0.199*	4
oxCaMKII	1.000 $\pm$ 0.171	5	1.040 $\pm$ 0.170	5	1.255 $\pm$ 0.004	3	1.295 $\pm$ 0.021	3
LTCC	1.000 $\pm$ 0.120	13	1.015 $\pm$ 0.113	14	1.016 $\pm$ 0.121	10	0.957 $\pm$ 0.117	10
PLB	1.000 $\pm$ 0.124	10	0.984 $\pm$ 0.104	10	0.934 $\pm$ 0.111	8	1.307 $\pm$ 0.495	8
pT17/PLB	1.000 $\pm$ 0.129	10	1.012 $\pm$ 0.136	10	1.057 $\pm$ 0.174	8	1.023 $\pm$ 0.144	8
RyR2	1.000 $\pm$ 0.062	9	0.964 $\pm$ 0.026	8	0.994 $\pm$ 0.090	6	0.798 $\pm$ 0.087	7
pS2814/RyR2	1.000 $\pm$ 0.025	9	1.248$\pm$0.057***	8	1.079 $\pm$ 0.030	6	1.323$\pm$0.096*	7
SERCA2a	1.000 $\pm$ 0.142	13	1.078 $\pm$ 0.092	14	1.054 $\pm$ 0.067	10	1.079 $\pm$ 0.060	10
Protein	CaMKII $\delta^{+/+}$				CaMKII $\delta^{-/-}$			
	Vehikel	n	DOX	n	Vehikel	n	DOX	n
CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.069	26	1.079 $\pm$ 0.089	24	n.d.	20	n.d.	18
pT287/CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.062	26	1.228$\pm$0.069*	24	n.d.	20	n.d.	18
oxCaMKII	1.000 $\pm$ 0.289	8	0.938 $\pm$ 0.128	8	n.d.	3	n.d.	3
LTCC	1.000 $\pm$ 0.081	18	1.010 $\pm$ 0.080	18	0.954 $\pm$ 0.057	15	0.955 $\pm$ 0.069	17
PLB	1.000 $\pm$ 0.127	6	1.024 $\pm$ 0.129	6	1.136 $\pm$ 0.030	6	1.128 $\pm$ 0.093	6
pT17/PLB	1.000 $\pm$ 0.107	6	0.998 $\pm$ 0.108	6	0.582 $\pm$ 0.059 [#]	6	0.811 $\pm$ 0.140	6
RyR2	1.000 $\pm$ 0.119	8	1.165 $\pm$ 0.132	7	1.018 $\pm$ 0.181	8	1.123 $\pm$ 0.172	9
pS2814/RyR2	1.000 $\pm$ 0.036	8	1.162$\pm$0.055*	7	1.131 $\pm$ 0.080	8	1.092 $\pm$ 0.108	9
SERCA2a	1.000 $\pm$ 0.142	17	1.060 $\pm$ 0.138	17	1.191 $\pm$ 0.140	13	1.146 $\pm$ 0.129	15

3.2 Kennzeichnung des DICM-Phänotyps durch DOX-induzierte prozentuale Körpergewichtsreduktion und reduziertes Gesamtüberleben

Neben der Untersuchung der Rolle der oxidativ-aktivierten CaMKII δ , sowie der Ca²⁺/Calmodulin-aktivierten CaMKII δ bei der *akuten* DICM, wurde ebenso deren Einfluss bei der Pathogenese der *chronischen* DICM näher untersucht.

In einem ersten Schritt erfolgte die Analyse des Phänotyps der verwendeten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, sowie CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse im Verlauf der *chronischen* DOX-Behandlung. Zur Charakterisierung des Phänotyps erfolgte die Bestimmung des Körpergewichtes, des Herzgewichtes, sowie des Gesamtüberlebens. Während Vehikel-

behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse eine prozentuale Zunahme des mittleren Körpergewichtes aufwiesen, wiesen DOX-behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p < 0.0001$), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p < 0.0001$), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p = 0.014$) und CaMKII $\delta^{-/-}$ ($p = 0.0002$) Mäuse hingegen eine fehlende Zunahme des Körpergewichtes auf, während das Herz/Körpergewichtverhältnis unbeeinflusst blieb (siehe **Abb.38**). Des Weiteren zeigten DOX-behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse eine Verminderung des Gesamtüberlebens gegenüber Vehikel-behandelten Kontrolltieren (siehe **Abb.39**). Ein kumuliertes Versterben DOX-behandelter Mäuse wurde dabei insbesondere 6-10 Wochen nach erfolgter DOX-Injektion beobachtet. Der Phänotyp der DCIM in allen verwendeten Genotypen kennzeichnete sich somit durch die DOX-induzierte fehlende Gewichtszunahme, welche mit einer Reduktion des Gesamtüberlebens vergesellschaftet war. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ wiesen dabei ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben im Vergleich zu Vehikel-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Kontrolltieren auf ($p = 0.046$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX). Die *chronische* DOX-Behandlung resultierte zudem in CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen in der trendhaften Verminderung des Gesamtüberlebens im Vergleich zu Vehikel-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Kontrolltieren, wobei kein Signifikanzniveau erreicht wurde ($p = 0.061$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX). Demzufolge wurde in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen eine vergleichbare Verminderung des Gesamtüberlebens beobachtet ($p = 0.788$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX). CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse ($p = 0.173$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), sowie CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse ($p = 0.168$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) wiesen unter *chronischer* DOX-Behandlung lediglich einen nicht-signifikanten Trend zu einem verminderten Gesamtüberleben auf, wobei kein Unterschied im Gesamtüberleben DOX-behandelter CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse beobachtet wurde ($p = 0.987$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

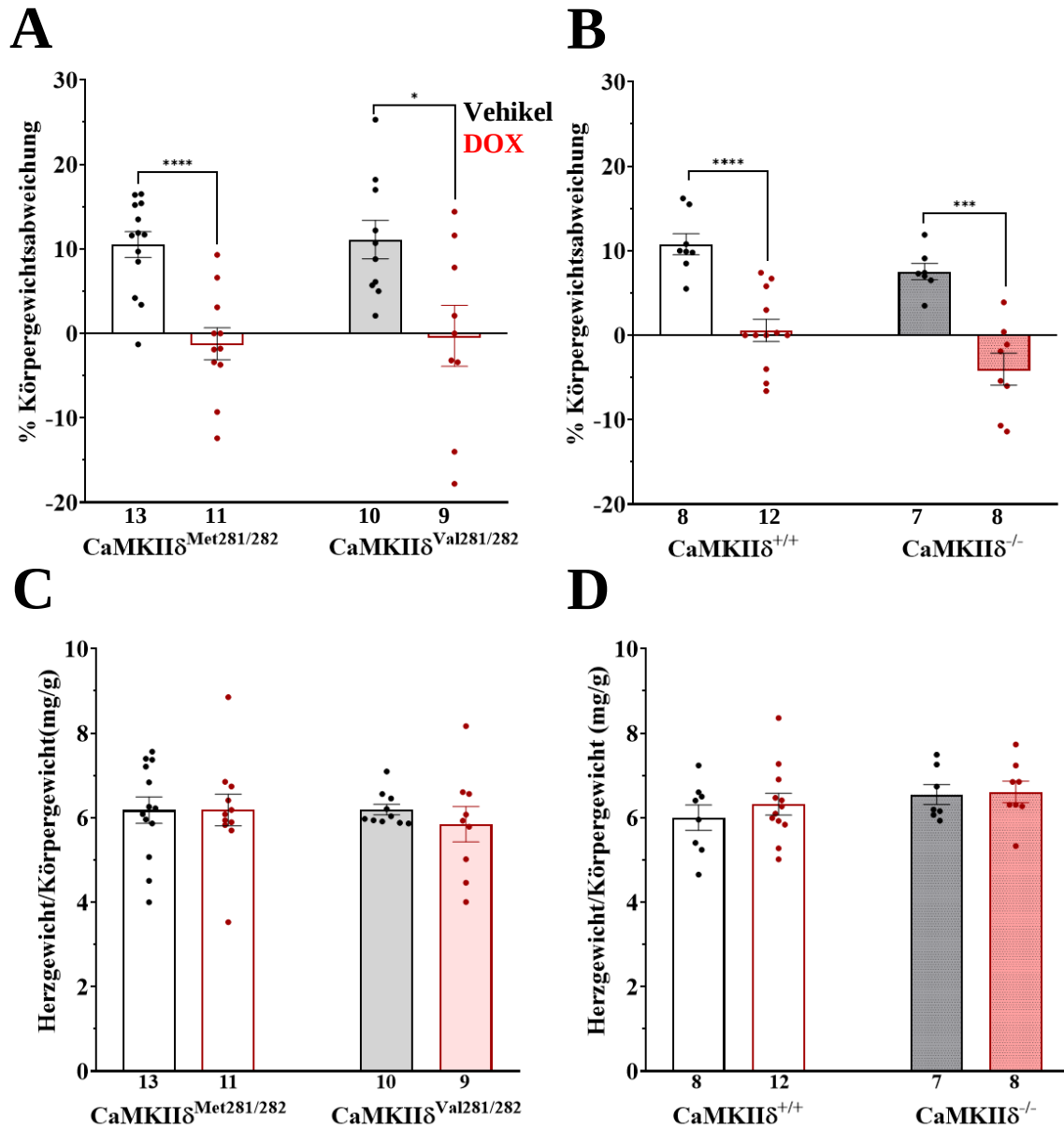


Abbildung 38 Kennzeichnung des DOX-induzierten Phänotyps durch fehlende Körpergewichtszunahme

DOX-behandelte CaMKII $\delta^{Met281/282}$, CaMKII $\delta^{Val281/282}$ (A), CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse (B) weisen eine fehlende Gewichtszunahme gegenüber Vehikel-behandelten Kontrolltieren auf. Weder CaMKII $\delta^{Met281/282}$, CaMKII $\delta^{Val281/282}$ (C), CaMKII $\delta^{+/+}$, noch CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse (D) weisen eine DOX-abhängige Beeinflussung des Herzgewichtes auf. Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

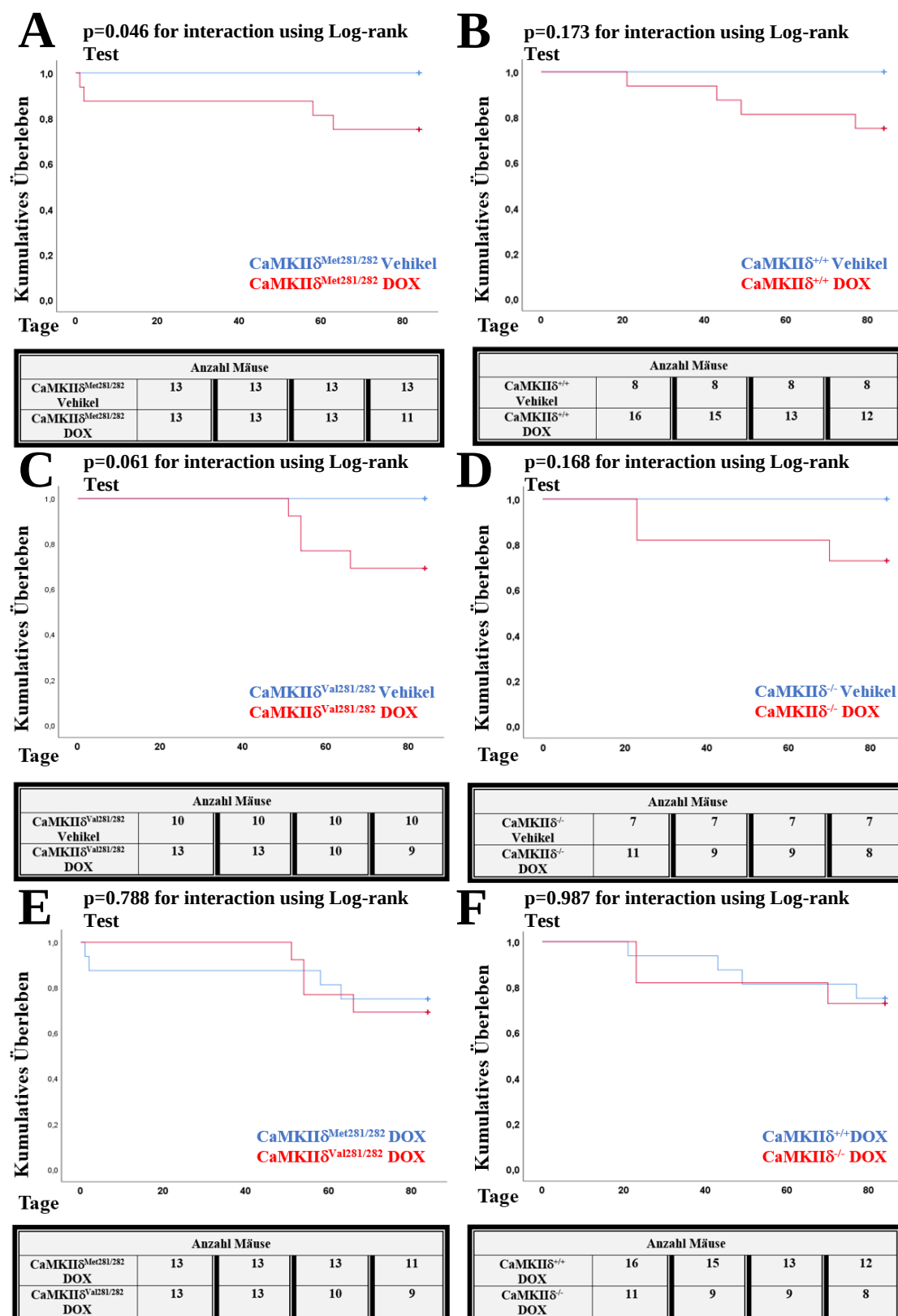


Abbildung 39 Reduktion des kumulativen Gesamtüberlebens als Charakteristikum des DICM-Phänotyps

DOX-behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ (A) und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse (B) weisen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen ein reduziertes kumulatives Überleben auf. Das kumulative Überleben DOX-behandelter CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (C) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse (D) ist gleichermaßen reduziert und vergleichbar mit dem

Gesamtüberleben der entsprechenden WT-Geschwistertiere (E, F). Die Statistik wurde mittels eines Log-rank Tests durchgeführt.

3.3 Teilweiser Erhalt der linksventrikulären Funktion trotz DOX-Exposition unter genetischer CaMKII δ -Inhibition

Zur Beurteilung der linksventrikulären (LV) Funktion in Folge der *chronischen* DOX-Behandlung erfolgte kleintierechokardiographisch die Ermittlung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), der fraktionellen Verkürzung (FS), des Herzminutenvolumens (CO), des Schlagvolumens (SV), des end-diastolischen und end-systolischen Volumens (LVEDV bzw. LVESV) bzw. Durchmessers (LVEDD bzw. LVESD), sowie des end-diastolischen und end-systolischen Wanddurchmessers der linksventrikulären posterioren Wand (PWThd bzw. PWThs), des interventrikulären Septums (IVSd bzw. IVSs), sowie der Herzfrequenz (HR).

Wie in **Tab.14A** und **Tab.14B** sowie anhand der Originalaufnahmen in **Abb.40** ersichtlich, konnte eine signifikant reduzierte LVEF in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen nach 12 Wochen nachgewiesen werden. Dabei konnte eine ~12-16 % Abnahme der LVEF in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.002$ für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.019$ für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.007$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) verzeichnet werden. Hervorzuheben ist hierbei, dass unter genetischer Deletion der CaMKII δ (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) zwar ebenfalls eine signifikante Abnahme der LVEF von ~10 % nachgewiesen werden konnte, diese aber im Vergleich zu CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen signifikant schwächer ausfiel ($p < 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.048$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

Die DOX-induzierte LVEF-Abnahme war verbunden mit einer signifikanten Reduktion der FS in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.005$ für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.024$ für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.007$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p < 0.001$ für CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.045$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX). Analog zum teilweisen Erhalt der LVEF in CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen zeigte sich auch die DOX-induzierte Abnahme der FS unter genetischer CaMKII δ -Deletion signifikant vermindert ($p = 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.048$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

Die DOX-induzierte Beeinträchtigung der LVEF war zudem mit einer signifikanten Reduktion des CO DOX-behandelter CaMKII $\delta^{Met281/282}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.015$ für CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.002$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.011$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) und CaMKII $\delta^{Val281/282}$ ($p = 0.008$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.003$ für CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.003$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX) Mäuse vergesellschaftet. Interessanterweise konnte dabei unter genetischer CaMKII δ -Deletion trotz der verminderten LVEF unter *chronischer* DOX-Behandlung nur ein numerisch reduziertes CO nachgewiesen werden ($p = 0.088$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

Ebenso konnte die DOX-induzierte signifikante Reduktion des SV in CaMKII $\delta^{Met281/282}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.019$ für CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.002$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.010$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) und CaMKII $\delta^{Val281/282}$ ($p = 0.010$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.010$ für CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.004$ für Interaktion CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX) nachgewiesen werden. Unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse) zeigte sich eine numerische Reduktion des SV ($p = 0.075$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

Der LVESD DOX-behandelter CaMKII $\delta^{Met281/282}$ ($p = 0.177$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX) und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse ($p = 0.125$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) zeigte sich trendhaft, jedoch nicht signifikant erhöht, während DOX-behandelte CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Mäuse ($p = 0.732$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse ($p = 0.883$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) diesen Trend nicht aufwiesen.

Die DOX-induzierte trendhafte Zunahme des LVESD war in CaMKII $\delta^{Met281/282}$ mit einer trendhaften Zunahme des LVESV verbunden ($p = 0.163$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Met281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Met281/282}$ DOX). DOX-behandelte CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse zeigten ebenso einen trendhaften Anstieg des LVESV ($p = 0.220$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX). Hervorzuheben ist hierbei, dass weder unter Verhinderung der oxidativen Aktivierbarkeit im CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Model ($p = 0.732$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{Val281/282}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{Val281/282}$ DOX), noch unter genetischer CaMKII δ -Deletion dieser Trend zu einer DOX-induzierten Zunahme des linksventrikulären Volumens verzeichnet werden konnte. Konkret konnte der DOX-induzierte trendhafte Anstieg des LVESD ($p < 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX nach 12 Wochen; $p = 0.045$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) und des LVESV ($p < 0.001$ für CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX; $p = 0.043$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) unter genetischer CaMKII δ -Inhibition nicht detektiert werden.

Eine DOX-induzierte Beeinflussung des PWThd konnte weder in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.224$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), noch in CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p=0.767$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p=0.762$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) oder CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ($p=0.297$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) nachgewiesen werden. Gleichmaßen konnte keine DOX-bedingte Veränderung der PWThs in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.140$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p=0.786$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p=0.558$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ($p=0.245$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) nachgewiesen werden.

Ebenso konnte keine Beeinflussung des IVSd in Folge der *chronischen* DOX-Behandlung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.559$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p=0.736$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p=0.684$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ($p=0.727$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) nachgewiesen werden. Gleichmaßen wurde in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.715$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p=0.138$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen ($p=0.391$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) keine Veränderung des IVSs gezeigt. CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse zeigten hingegen eine DOX-induzierte IVSs-Ausdünnung ($p=0.018$ für CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX nach 12 Wochen; $p=0.034$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

Des Weiteren wurden keine Unterschiede der detektierten HR in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.229$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ ($p=0.494$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX), CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ ($p=0.055$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$) und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ($p=0.939$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) gefunden.

Zusammenfassend wurde somit nachgewiesen, dass die *chronische* DOX-Behandlung in einer Beeinträchtigung der LV-Funktion resultiert, welche sich als systolische Dysfunktion in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen zeigt. Dabei ist hervorzuheben, dass unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) eine signifikante Abschwächung der DOX-induzierten Verschlechterung der LV-Funktion erzielt wurde, wobei eine verminderte Beeinträchtigung der LVEF und der FS gezeigt wurden, die mit einem fehlenden Trend zu einer end-systolischen LV-Dilatation vergesellschaftet war.

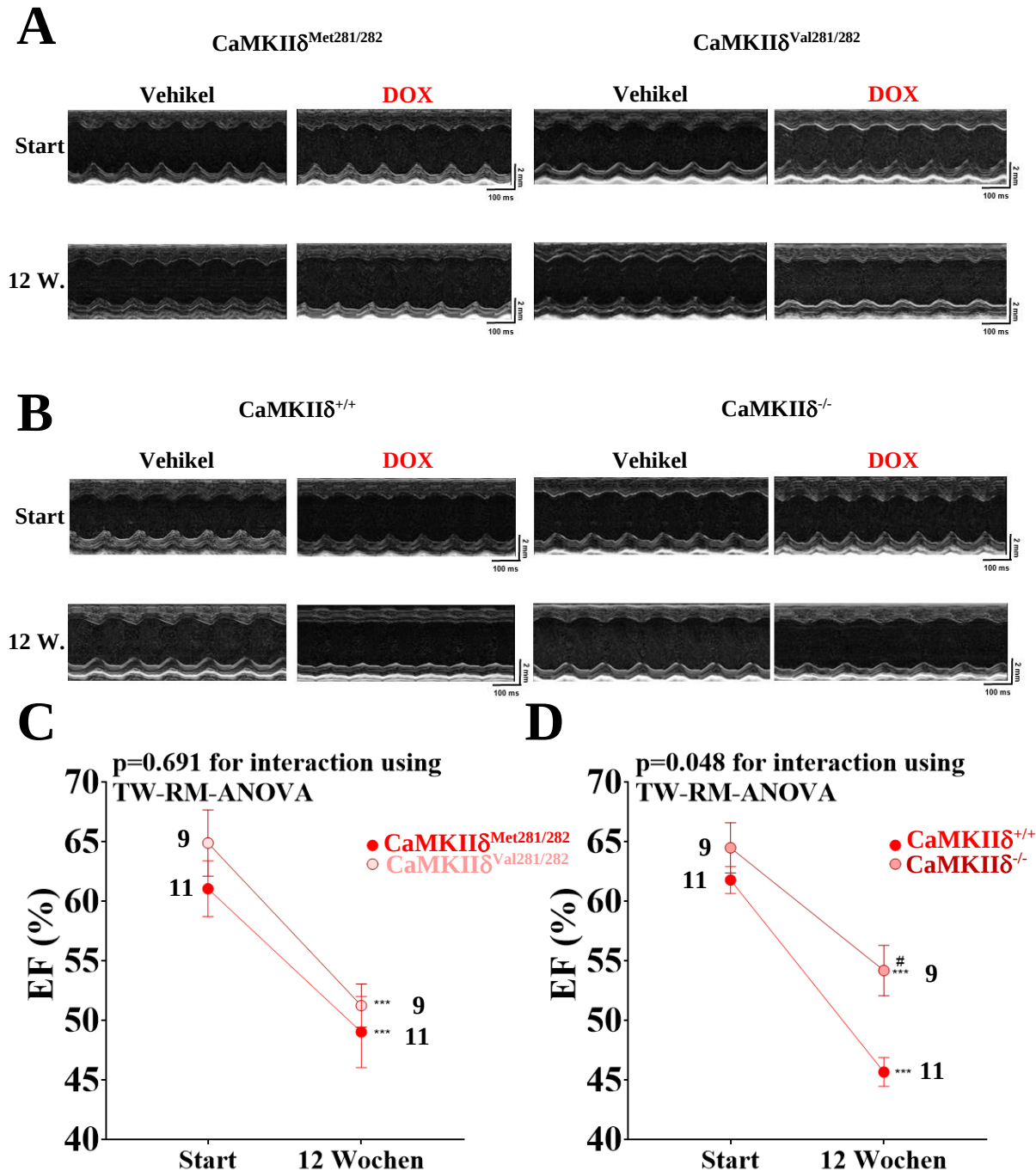


Abbildung 40 Verminderung der DOX-induzierten Beeinträchtigung der LV-Funktion in CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen

CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäuse zeigen unter DOX-Behandlung nach einem Zeitfenster von 12 Wochen eine Beeinträchtigung der LV-Funktion (A). Gleichermäßen resultiert die DOX-Behandlung in CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen nach 12 Wochen in einer Verminderung der LV-Funktion. Unter genetischer CaMKII δ -Inhibition kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der LVEF, wobei diese im Vergleich zu CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen signifikant schwächer ausfiel (B). Die Mittelwerte der LVEF verdeutlichen die DOX-induzierte LVEF-Abnahme in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen (C), welche im Vergleich zu CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen unter genetischer CaMKII δ -Deletion abgeschwächt wird (D). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Two-Way-RM-Anovas durchgeführt.

Tabelle 14 Erhobene echokardiographische Parameter zur Beurteilung der LV-Funktion

* Signifikanz vs. Start

§ Signifikanz vs. Vehikel

Signifikanz vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ (WT-Geschwistertier)

Tabelle 14A					Interaktion	
CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$					Vehikel vs. DOX	
	Vehikel Start (n=13)	Vehikel 12 W. (n=13)	DOX Start (n=11)	DOX 12 W. (n=11)		
EF (%)	60.1±1.2	58.3±1.2	61.0±2.3	49.0±3.0 ^{***,§§}	<0.001	
FS (%)	31.6±0.9	30.3±0.8	32.5±1.6	24.6±1.9 ^{***,§§}	<0.001	
CO (mL/min)	17.2±0.7	17.4±1.1	19.0±1.3	13.8±0.8 ^{***,§}	=0.002	
SV (µL)	38.4±1.6	38.6±2.4	41.8±2.8	31.0±1.7 ^{***,§}	=0.002	
LVEDD (mm)	3.85±0.07	3.89±0.10	3.95±0.10	3.85±0.11	=0.345	
LVEDV (µL)	64.3±3.1	66.2±4.2	68.7±4.4	64.7±4.2	=0.670	
LVESD (mm)	2.64±0.07	2.71±0.0	2.67±0.10	2.91±0.13 [*]	=0.177	
LVESV (µL)	25.8±1.8	27.6±2.1	26.9±2.6	33.7±3.6 [*]	=0.163	
PWThd (mm)	0.84±0.05	0.84±0.07	0.83±0.03	0.73±0.02	=0.224	
PWThs (mm)	1.08±0.06	1.04±0.06	1.08±0.03	0.91±0.05 [*]	=0.140	
IVSd (mm)	1.17±0.16	1.05±0.06	1.02±0.04	0.99±0.06	=0.559	
IVSs (mm)	1.44±0.23	1.23±0.05	1.22±0.06	1.11±0.08	=0.715	
HR (bpm)	448±5	452±5	454±5	445±6	=0.229	
CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$					Interaktion Vehikel vs. DOX	Interaktion vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX
	Vehikel Start (n=10)	Vehikel 12 W. (n=10)	DOX Start (n=9)	DOX 12 W. (n=9)		
EF (%)	62.4±2.4	59.7±2.4	64.9±2.8	51.2±1.8 ^{***,§}	=0.007	=0.691
FS (%)	33.2±1.7	31.4±1.7	35.2±2.1	25.7±1.1 ^{***,§}	=0.007	=0.550
CO (mL/min)	15.0±0.7	17.5±0.852	17.4±0.7	13.1±1.5 ^{***,§§}	=0.003	=0.642
SV (µL)	32.3±1.4	37.7±1.7	38.1±1.5	30.1±3.0 ^{*,§}	=0.159	=0.490
LVEDD (mm)	3.58±0.09 [#]	3.84±0.09	3.73±0.10	3.68±0.17	=0.132	=0.814
LVEDV (µL)	54.0±3.1	63.9±3.4	59.7±3.7	58.8±5.6	=0.145	=0.940
LVESD (mm)	2.40±0.11	2.64±0.11	2.43±0.13	2.73±0.13 [*]	=0.732	=0.763
LVESV (µL)	20.8±2.2	26.2±2.5	21.6±2.8	28.6±3.0 [*]	=0.688	=0.957
PWThd (mm)	0.81±0.04	0.84±0.04	0.80±0.04	0.81±0.07	=0.762	=0.200
PWThs (mm)	1.07±0.07	1.01±0.06	1.10±0.04	0.98±0.06	=0.558	=0.565
IVSd (mm)	0.97±0.04	1.01±0.05	1.02±0.04	1.02±0.05	=0.684	=0.792
IVSs (mm)	1.23±0.10	1.18±0.06	1.27±0.07	1.12±0.05	=0.391	=0.740
HR (bpm)	451±3	463±7	457±7	442±7	=0.055	=0.626

Tabelle 14B					Interaktion Vehikel vs. DOX
CaMKIIδ ^{+/+}					
	Vehikel Start (n=8)	Vehikel 12 W. (n=8)	DOX Start (n=11)	DOX 12 W. (n=11)	
EF (%)	57.8±1.5	52.8±1.5*	61.7±1.3 ^S	45.8±1.3 ^{***,SS}	<0.001
FS (%)	28.3±0.9	26.9±1.0*	32.9±0.9 ^S	22.0±0.9 ^{***,SS}	<0.001
CO (mL/min)	15.7±0.9	17.2±0.9	18.2±0.8	13.7±0.8 ^{***,S}	<0.001
SV (μL)	34.7±2.4	38.1±2.1*	41.6±1.8 ^S	32.5±1.4 ^{***,S}	<0.001
LVEDD (mm)	3.75±0.11	4.05±0.11**	3.90±0.09	3.99±0.10	=0.084
LVEDV (μL)	60.6±4.5	72.6±4.5**	66.4±3.8	70.2±3.8	=0.100
LVESD (mm)	2.64±0.11	2.96±0.11**	2.64±0.09	3.09±0.09***	=0.125
LVESV (μL)	25.9±2.8	34.5±2.8**	25.4±2.4	38.5±2.4***	=0.220
PWThd (mm)	0.85±0.04	0.79±0.04	0.77±0.03	0.74±0.03	=0.767
PWThs (mm)	1.08±0.04	0.95±0.04*	1.04±0.03	0.89±0.03**	=0.786
IVSd (mm)	1.05±0.04	0.97±0.04	0.97±0.04	0.92±0.04	=0.736
IVSs (mm)	1.27±0.05	1.12±0.06*	1.10±0.05 ^S	1.08±0.05	=0.138
HR (bpm)	453±8	453±8	449±7	438±7	=0.494

CaMKIIδ ^{-/-}					Interaktion Vehikel vs. DOX	Interaktion vs. CaMKIIδ ^{+/+} DOX
	Vehikel Start (n=7)	Vehikel 12 W. (n=7)	DOX Start (n=9)	DOX 12 W. (n=9)		
EF (%)	68.6±1.0 ^{###}	64.1±0.5 ^{*,###}	64.5±2.1	54.2±2.1 ^{***,SSS;#}	=0.035	=0.048
FS (%)	37.4±0.7 ^{###}	34.0±0.3 ^{*,###}	34.6±1.5	27.4±1.4 ^{***,SSS;#}	=0.045	=0.048
CO (mL/min)	14.9±1.3	14.7±1.4	15.5±0.6 [#]	11.7±0.8	=0.088	=0.528
SV (μL)	31.7±2.7	33.1±2.7	33.8±1.5	27.0±1.7	=0.075	=0.327
LVEDD (mm)	3.35±0.13 [#]	3.51±0.14 [#]	3.55±0.09 [#]	3.47±0.11 ^{###}	=0.298	=0.249
LVEDV (μL)	46.3±4.0 [#]	51.9±4.5 [#]	53.0±3.3 [#]	50.2±3.5 ^{###}	=0.276	=0.247
LVESD (mm)	2.10±0.09 ^{##}	2.32±0.10 ^{###}	2.33±0.11 [#]	2.52±0.10 ^{###}	=0.883	=0.045
LVESV (μL)	14.6±1.4 ^{##}	18.8±1.8 ^{###}	19.1±2.2	23.3±2.2 ^{###}	=0.990	=0.043
PWThd (mm)	0.84±0.04	0.85±0.06	0.84±0.05	0.76±0.03	=0.297	=0.485
PWThs (mm)	1.03±0.04	1.04±0.06	1.11±0.09	0.96±0.06	=0.245	=0.869
IVSd (mm)	1.08±0.08	1.02±0.05	1.05±0.06	1.03±0.04 [#]	=0.727	=0.667
IVSs (mm)	1.37±0.07	1.11±0.05 ^{**}	1.17±0.05 ^S	1.14±0.05	=0.034	=0.922
HR (bpm)	470±7	444±12	460±9	436±8	=0.939	=0.755

Mögliche Erklärungsansätze für die DOX-induzierte Beeinträchtigung der LV-Funktion, bzw. die Verminderung der DOX-induzierten Beeinträchtigung der LV-Funktion unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$) stellen dabei neben strukturellen Remodelingprozessen (z.B. im Rahmen einer gesteigerten myokardialen Fibrosierung) Dysregulationen des kardialen Ca²⁺-Haushaltes dar, was im weiteren Verlauf untersucht wurde.

3.4 Verhinderung DOX-induzierter struktureller Remodelingprozesse durch Verhinderung der oxidativen CaMKII-Aktivierung und unter genetischer CaMKII δ -Deletion

Der DOX-induzierten Beeinträchtigung der LV-Funktion können strukturelle Remodelingprozesse, wie eine gesteigerte Myokardfibrosierung unterliegen. Im Rahmen der *chronischen* DOX-Behandlung konnte in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ (p=0.0014 für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX) und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen (p<0.0001 für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) eine signifikant gesteigerte Myokardfibrosierung nachgewiesen werden. Diese DOX-induzierte Myokardfibrosierung wurde sowohl durch CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (p=0.044 für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), als auch unter genetischer

CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Modell) ($p=0.0013$ für CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) signifikant reduziert (siehe **Abb.41**).

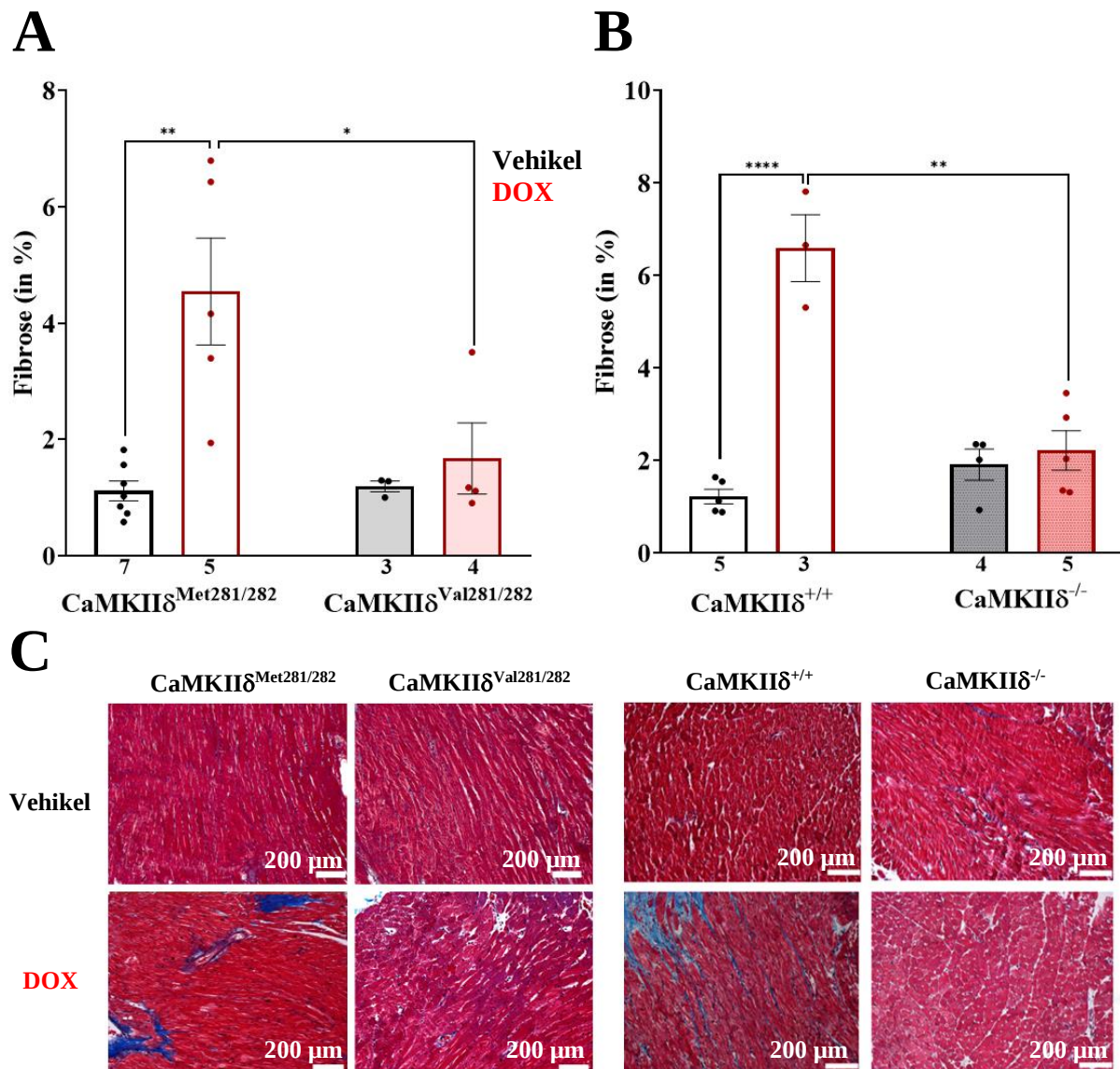


Abbildung 41 Verhinderung der DOX-induzierten Fibrose in CaMKII $\delta^{Met281/282}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen

Die *chronische* DOX-Behandlung ist mit einer signifikant erhöhten Fibrosierung in CaMKII $\delta^{Met281/282}$ (A) und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen vergesellschaftet (B). Sowohl unter Verhinderung der oxidativen CaMKII-Aktivierbarkeit (CaMKII $\delta^{Val281/282}$), als auch unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$) wird die DOX-induzierte Myokardfibrose verhindert. Originalaufnahmen der mittels Trichrom-gefärbten Myokardschnitte zeigen die DOX-induzierte Myokardfibrosierung in CaMKII $\delta^{Met281/282}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen, welche durch CaMKII $\delta^{Val281/282}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen verhindert wird (C). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

Strukturelle Remodelingprozesse, welche mit Beeinträchtigungen der LV-Funktion assoziiert werden können, sind häufig mit weiteren strukturellen Remodelingprozessen, wie der Entwicklung einer zellulären Atrophie, sowie der Reduktion der Kapillardichte vergesellschaftet. Einige Studien wiesen in diesem Zusammenhang bereits die DOX-induzierte Entwicklung einer zellulären Atrophie nach, was im Folgenden untersucht wurde.

Sowohl DOX-behandelte $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ ($p=0.0032$ für $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), als auch $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Mäuse ($p=0.003$ für $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Vehikel vs. $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ DOX) wiesen signifikant reduzierte Zellgrößen bei unveränderter Kapillardichte auf. Interessanterweise wurde die DOX-induzierte zelluläre Atrophie hingegen in DOX-behandelten $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen ($p=0.028$ für $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX vs. $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), sowie unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion ($\text{CaMKII}\delta^{-/-}$) ($p=0.024$ für $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ DOX vs. $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ DOX) nicht nachgewiesen, wobei die Kapillardichte ebenso unbeeinflusst bleibt (siehe Abb.42 und Abb.43).

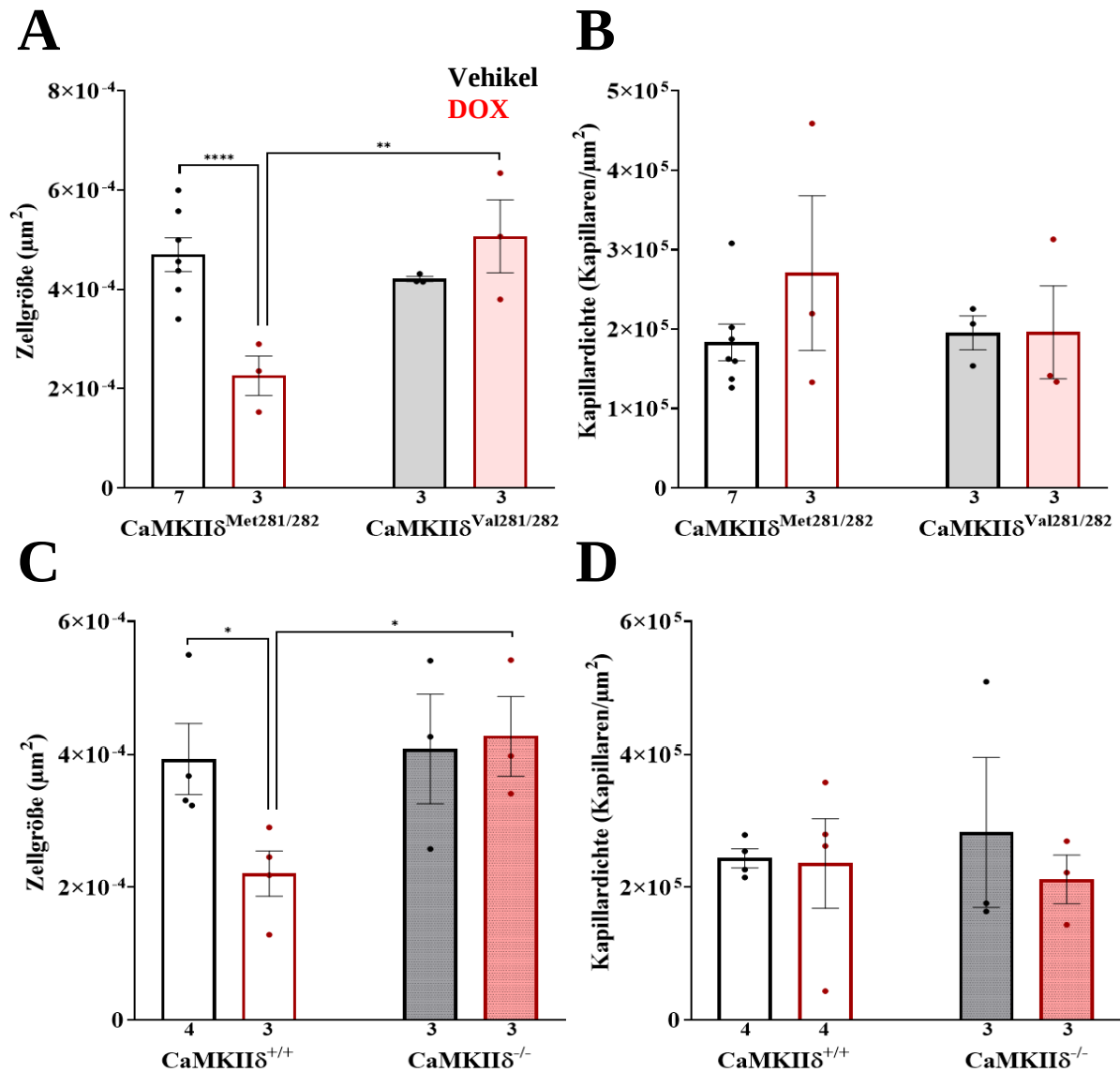


Abbildung 42 Verhinderung der DOX-induzierten zellulären Atrophie in $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen

DOX-behandelte $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ weisen reduzierte Kardiomyozytengrößen als Charakteristikum einer zellulären Atrophie auf, welche in $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen nicht nachweisbar ist (**A**). Die Kapillardichte DOX-behandelter $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen unterliegt dabei keiner Regulation (**B**). DOX-behandelte $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Mäuse weisen eine gleichermaßen verminderte Zellgröße (**C**) bei unveränderter Kapillardichte auf (**D**), wobei die DOX-induzierte zelluläre Atrophie unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion verhindert wird. Die Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt (n =Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

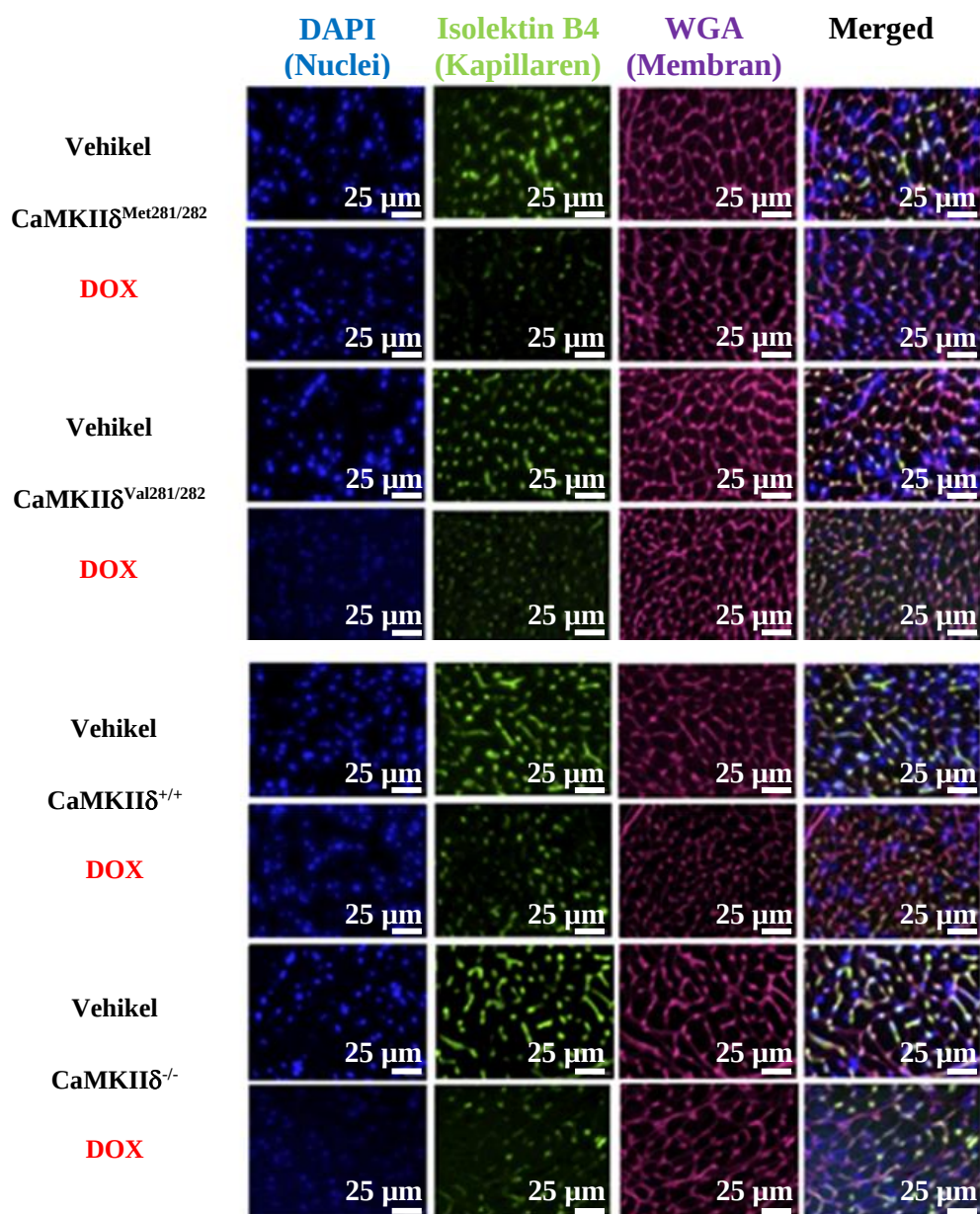


Abbildung 43 Originalaufnahmen der DAPI-, WGA-, Isolektin B4-gefärbten Myokardschnitte

Originalaufnahmen WGA (pink)-gefärbter Myokardschnitte verdeutlichen die DOX-induzierte Verminderung der Kardiomyozytengrößen in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen. Mittels Isolektin B4 (grün) erfolgt dabei die Visualisierung der Kapillaren, während DAPI-basiert Nuclei visualisiert werden (blau). Die DOX-induzierte zelluläre Atrophie wird durch CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, sowie CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse verhindert. Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Test durchgeführt.

3.5 Die DOX-abhängige Induktion CaMKII δ -abhängiger Ca²⁺-Dysregulationen erfolgt unabhängig von der oxidativen-Aktivierung der CaMKII δ

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die DOX-induzierte Beeinträchtigung der LV-Funktion auf Dysregulationen des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes basiert.

In Übereinstimmung mit der DOX-induzierten Reduktion der LVEF konnte die signifikante Verminderung der systolischen Ca²⁺-Transientenamplituden in CaMKII δ ^{Met281/282}, CaMKII δ ^{Val281/282} und CaMKII δ ^{+/+} Mäuse nachgewiesen werden (jeweils $p < 0.0001$ vs. Vehikel). Die Verminderung systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden war dabei mit einer verlangsamten diastolischen Ca²⁺-Elimination vergesellschaftet, welche durch eine Verlangsamung des Ca²⁺-Transientenabfalls gekennzeichnet wurde. Interessanterweise konnte sowohl durch genetische CaMKII δ -Deletion (CaMKII δ ^{-/-}) ($p = 0.043$ für CaMKII δ ^{+/+} DOX vs. CaMKII δ ^{-/-} DOX), als auch durch pharmakologische CaMKII-Inhibition mittels AIP, diese DOX-induzierten Dysregulationen des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes in CaMKII δ ^{Met281/282} ($p = 0.002$ für CaMKII δ ^{Met281/282} DOX vs. CaMKII δ ^{Met281/282} DOX+AIP) und CaMKII δ ^{+/+} Mäusen ($p < 0.0001$ für CaMKII δ ^{+/+} DOX vs. CaMKII δ ^{+/+} DOX+AIP), sowie CaMKII δ ^{Val281/282} ($p = 0.007$ für CaMKII δ ^{Val281/282} DOX vs. CaMKII δ ^{Val281/282} DOX+AIP) verhindert werden (siehe **Abb.44**).

Ursächlich für die DOX-induzierte Reduktion systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden konnte die DOX-bedingte Ca²⁺-Depletion des SR in CaMKII δ ^{Met281/282} ($p = 0.025$ für CaMKII δ ^{Met281/282} Vehikel vs. CaMKII δ ^{Met281/282} DOX), CaMKII δ ^{+/+} ($p < 0.0001$ für CaMKII δ ^{+/+} Vehikel vs. CaMKII δ ^{+/+} DOX) und CaMKII δ ^{Val281/282} Mäusen ($p = 0.036$ für CaMKII δ ^{Val281/282} Vehikel vs. CaMKII δ ^{Val281/282} DOX) nachgewiesen werden (siehe **Abb.45**). Dabei konnte unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII δ ^{-/-}) ($p = 0.0003$ für CaMKII δ ^{+/+} DOX vs. CaMKII δ ^{-/-} DOX) sowie unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP ($p = 0.033$ für CaMKII δ ^{Met281/282} DOX vs. CaMKII δ ^{Met281/282} DOX+AIP; $p = 0.012$ für CaMKII δ ^{+/+} DOX vs. CaMKII δ ^{+/+} DOX+AIP; $p < 0.0001$ für CaMKII δ ^{Val281/282} DOX vs. CaMKII δ ^{Val281/282} DOX+AIP) ein Erhalt des SR Ca²⁺-Gehalts nachgewiesen werden, mutmaßlich als Resultat eines reduzierten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks (siehe **Abb.46**).

Demzufolge, weist dieser Datensatz darauf hin, dass die globale CaMKII δ -Aktivität, jedoch unabhängig von der oxidativen Aktivierbarkeit der CaMKII δ , für die DOX-induzierten Ca²⁺-Dysregulationen von Bedeutung ist. In Übereinstimmung mit diesem Befund, konnte eine erhöhte CaMKII δ -Aktivität, welche gekennzeichnet ist durch die gesteigerte CaMKII-Autophosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-287, in CaMKII δ ^{Met281/282} ($p = 0.039$ für CaMKII δ ^{Met281/282} Vehikel vs. CaMKII δ ^{Met281/282} DOX), CaMKII δ ^{+/+} ($p = 0.026$ für CaMKII δ ^{+/+} Vehikel vs. CaMKII δ ^{+/+} DOX) und CaMKII δ ^{Val281/282} Mäusen ($p = 0.008$ für CaMKII δ ^{Val281/282} Vehikel vs. CaMKII δ ^{Val281/282} DOX) als Folge der *chronischen* DOX-Behandlung nachgewiesen werden (siehe **Abb.47**). Die oxidative-Aktivierung der CaMKII unterlag hingegen keiner DOX-abhängigen Regulation. Diese DOX-induzierte Hyperaktivierung der CaMKII δ war mit der Induktion einer CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung (an der CaMKII δ -spezifischen RyR2-Phosphorylierungsstelle Serin-

2814) in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ (p=0.010 für CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX), CaMKII $\delta^{+/+}$ (p=0.016 für CaMKII $\delta^{+/+}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX) und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen (p=0.025 für CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX) vergesellschaftet. Hervorzuheben ist dabei, dass sowohl die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung als auch die konsekutive CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung durch genetische CaMKII δ -Deletion (p=0.930 für CaMKII $\delta^{-/-}$ Vehikel vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX) verhindert wurde.

PLB und SERCA2a fungieren als bekannte Regulatoren des SR Ca²⁺-Gehaltes durch Regulation der diastolischen SR Ca²⁺-Aufnahme und folglich des Ca²⁺-Transientenabfalls, weswegen im weiteren Verlauf die Proteinexpression beider Proteine mit Hinsicht auf der posttranslationalen PLB-Modifikation durch CaMKII δ -abhängige Phosphorylierung (an der Aminosäureposition Threonin-17) untersucht wurde. Dabei konnte weder eine DOX-induzierte Regulation der SERCA2a, noch der PLB-Proteinexpression in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen nachgewiesen werden (siehe **Tab.15**).

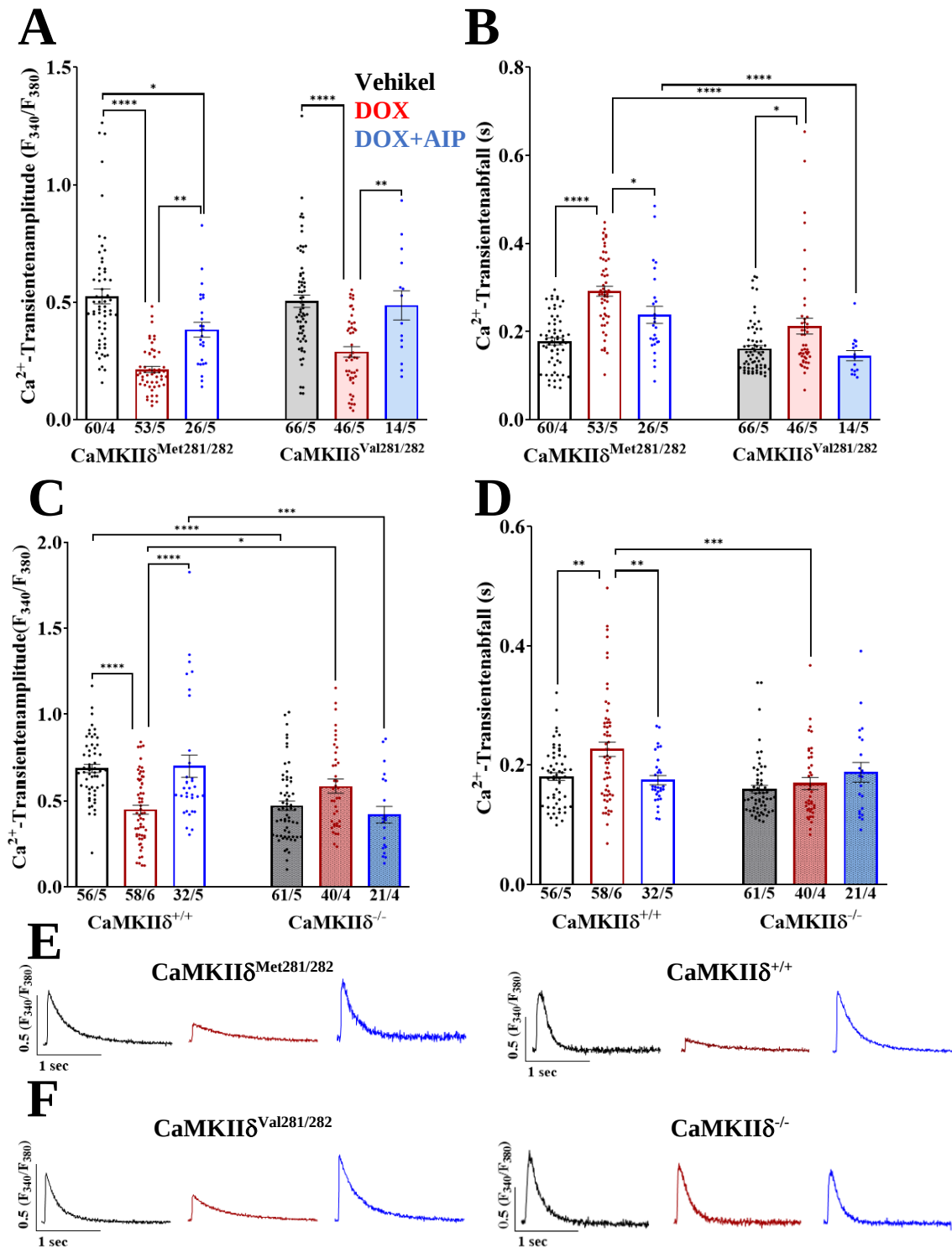


Abbildung 44 *CaMKII δ -abhängige Verminderung systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden und Relaxationsverlangsamung unter chronischer DOX-Behandlung*

DOX-behandelte $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$, $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ (A, B) und $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Mäuse (C, D) weisen reduzierte systolische Ca^{2+} -Transientenamplituden und eine Verlangsamung des Ca^{2+} -Transientenabfalls auf. Die pharmakologische CaMKII-Inhibition (AIP) und die genetische CaMKII δ -Inhibition ($\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Model) resultieren in der Verhinderung DOX-induzierter Ca^{2+} -Dysregulationen. (E) Repräsentative Originalaufnahmen Fura2-AM beladener $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Kardiomyozyten, sowie $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (F). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

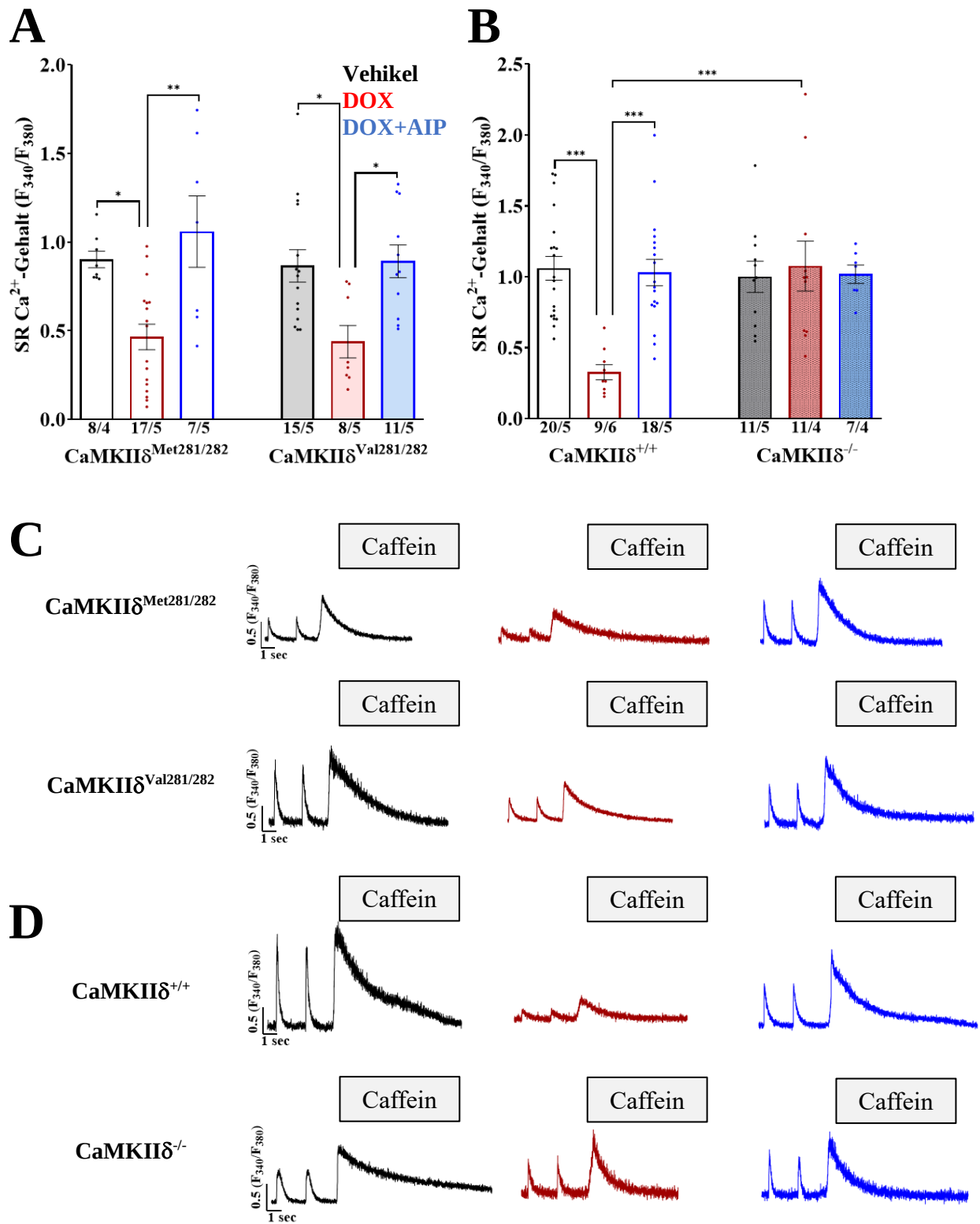


Abbildung 45 *CaMKII δ -abhängige Induktion der DOX-bedingten SR Ca^{2+} -Depletion*

DOX-behandelte $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$, $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ (A) und $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ Mäuse (B) weisen eine Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes auf. Mittels pharmakologischer CaMKII -Inhibition (AIP) und genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion ($\text{CaMKII}\delta^{-/-}$) wird dabei die DOX-induzierte SR Ca^{2+} -Depletion verhindert. Original Aufnahmen der Caffein-induzierten SR Ca^{2+} -Freisetzung in $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ (C), sowie $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (D). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

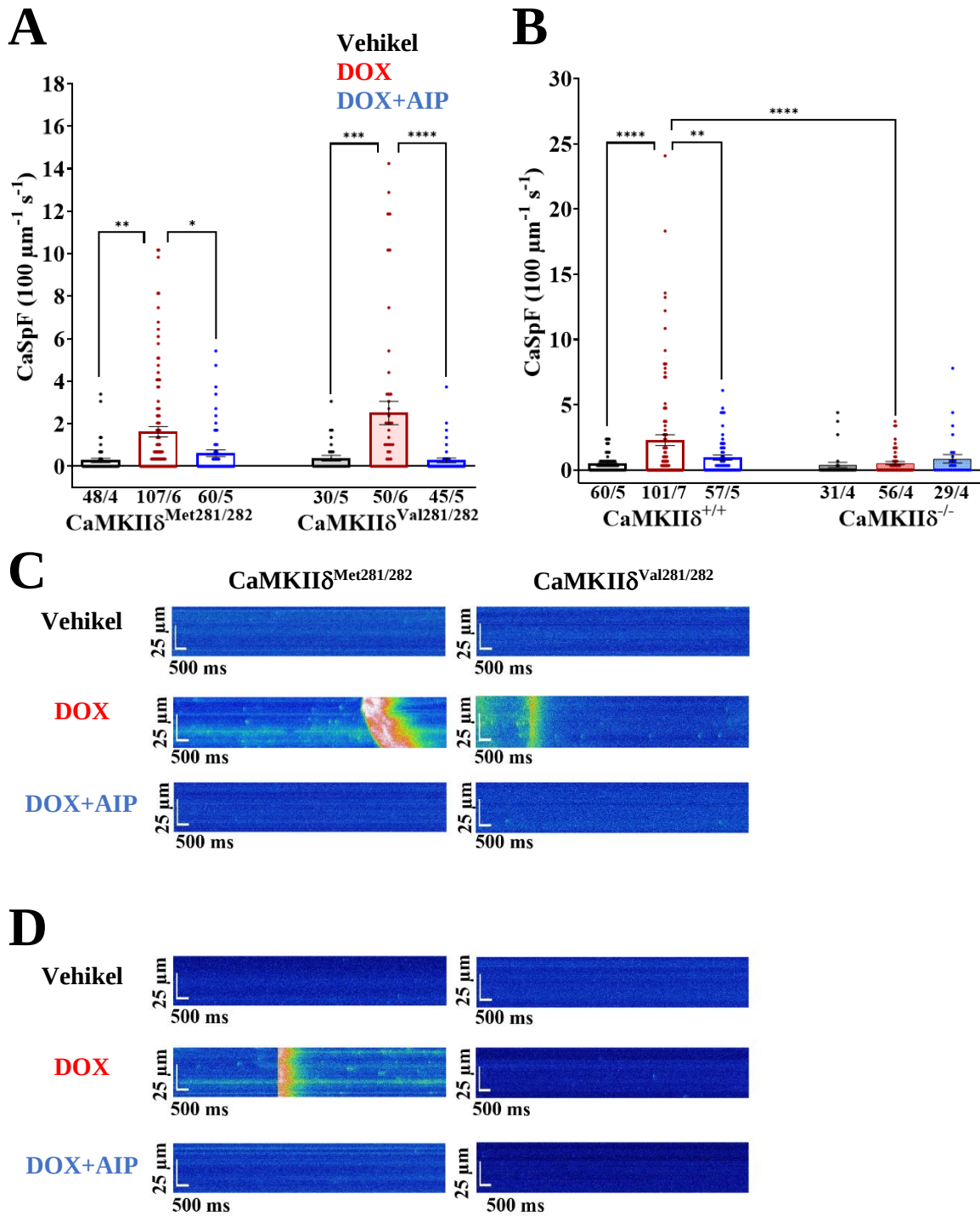


Abbildung 46 CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unter chronischer DOX-Behandlung

DOX-behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (A) und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse (B) weisen ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck auf, während unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP, sowie genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$) die DOX-induzierte Erhöhung des SR Ca^{2+} -Lecks verhindert wurde. Repräsentative Line-Scans Fluo4-AM beladener CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (C), sowie CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten (D). Die Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt ($n = \text{Zellen/Mäuse}$). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

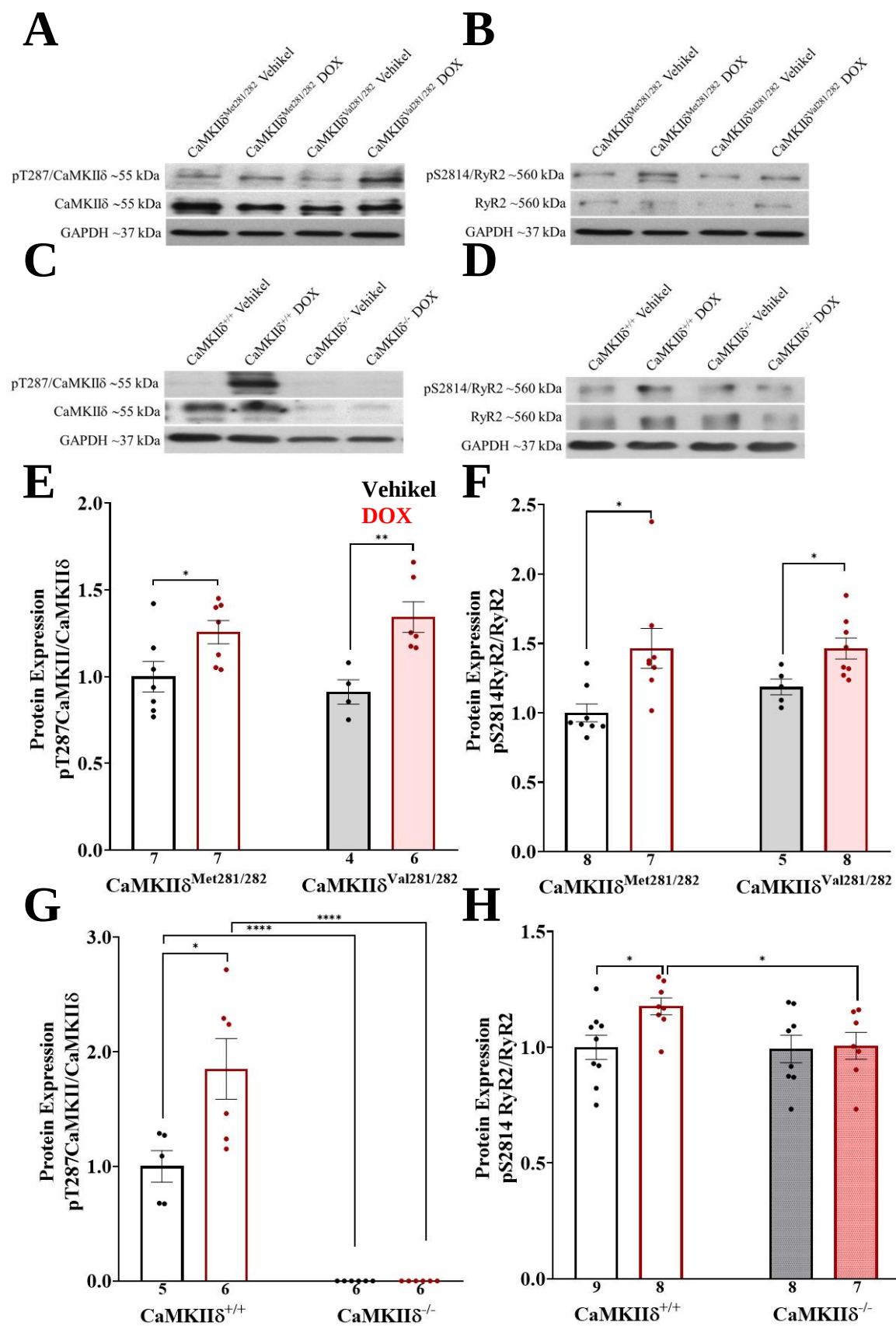


Abbildung 47 Verhinderung der DOX-induzierten CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung durch CaMKII δ -Deletion

DOX-behandelte CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäuse weisen eine Hyperaktivierung der CaMKII δ auf (A), welche mit einer CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung (an der Aminosäureposition Serin-2814) verbunden wird (B). Gleichmaßen weisen DOX-behandelte CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse eine DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung auf, was mit der konsekutiven CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung vergesellschaftet ist. Die genetische CaMKII δ -Deletion ist mit einer fehlenden RyR2-Hyperphosphorylierung verbunden (D). Die Mittelwerte verdeutlichen die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ (E) Mäusen und die konsekutive RyR2-Hyperphosphorylierung (F). Die fehlende Expression der CaMKII δ in CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen (G) ist mit einer fehlenden DOX-induzierten RyR2-Hyperphosphorylierung vergesellschaftet (H). Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

Tabelle 15 Normierte Proteinexpression in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen

* Signifikanz vs. Vehikel

Tabelle 15								
Protein	CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$				CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$			
	Vehikel	n	DOX	n	Vehikel	n	DOX	n
CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.151	7	0.932 $\pm$ 0.159	7	0.786 $\pm$ 0.113	4	0.584 $\pm$ 0.066	6
pT287/CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.232	7	1.257 $\pm$ 0.067*	7	0.912 $\pm$ 0.070	4	1.344 $\pm$ 0.088**	6
oxCaMKII	1.000 $\pm$ 0.344	5	0.911 $\pm$ 0.341	5	1.095 $\pm$ 0.349	4	1.020 $\pm$ 0.314	4
LTCC	1.000 $\pm$ 0.079	5	1.102 $\pm$ 0.143	6	1.090 $\pm$ 0.148	6	1.163 $\pm$ 0.114	6
PLB	1.000 $\pm$ 0.057	8	1.172 $\pm$ 0.100	9	0.882 $\pm$ 0.059	5	0.972 $\pm$ 0.051	6
pT17/PLB	1.000 $\pm$ 0.091	8	0.783 $\pm$ 0.066	9	0.948 $\pm$ 0.054	5	1.042 $\pm$ 0.124	6
RyR2	1.000 $\pm$ 0.180	8	1.043 $\pm$ 0.100	9	0.567 $\pm$ 0.090	5	0.769 $\pm$ 0.094	8
pS2814/RyR2	1.000 $\pm$ 0.064	8	1.415 $\pm$ 0.138*	9	1.187 $\pm$ 0.057	5	1.464 $\pm$ 0.076*	8
SERCA2a	1.000 $\pm$ 0.148	8	1.086 $\pm$ 0.134	9	0.880 $\pm$ 0.055	5	0.973 $\pm$ 0.129	6
Protein	CaMKII $\delta^{+/+}$				CaMKII $\delta^{-/-}$			
	Vehikel	n	DOX	n	Vehikel	n	DOX	n
CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.045	5	1.078 $\pm$ 0.032	6	n.d.	6	n.d.	6
pT287/CaMKII δ	1.000 $\pm$ 0.137	5	1.850 $\pm$ 0.265*	6	n.d.	6	n.d.	6
oxCaMKII	1.000 $\pm$ 0.2655	5	1.464 $\pm$ 0.276	6	n.d.	6	n.d.	6
LTCC	1.000 $\pm$ 0.088	9	1.011 $\pm$ 0.092	9	1.232 $\pm$ 0.161	8	0.887 $\pm$ 0.060	8
PLB	1.000 $\pm$ 0.097	9	0.998 $\pm$ 0.095	8	0.853 $\pm$ 0.244	7	0.764 $\pm$ 0.230	7
pT17/PLB	1.000 $\pm$ 0.012	9	1.065 $\pm$ 0.034	8	0.981 $\pm$ 0.186	7	1.071 $\pm$ 0.190	7
RyR2	1.000 $\pm$ 0.104	9	0.944 $\pm$ 0.124	8	1.178 $\pm$ 0.169	8	1.105 $\pm$ 0.135	7
pS2814/RyR2	1.000 $\pm$ 0.052	9	1.177 $\pm$ 0.037*	8	0.993 $\pm$ 0.059	8	1.006 $\pm$ 0.058*	7

3.6 Gesteigerte zytoplasmatische ROS-Formation unter chronischer DOX-Behandlung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen

Als zugrundeliegender Mechanismus der DOX-beeinträchtigten LV-Funktion und des damit vergesellschaftetem dysregulierten intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes kann die gesteigerte Formation reaktiver Sauerstoffspezies fungieren.

Entsprechend **Abbildung 48** konnte als Folge der *chronischen* DOX-Behandlung in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen die signifikant gesteigerte zytoplasmatische ROS-Formation nachgewiesen werden (jeweils $p < 0.001$ für die Interaktion vs. Vehikel). Interessanterweise konnte dabei eine signifikant verminderte zytoplasmatische ROS-Formation in DOX-behandelten CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen gegenüber den entsprechenden CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ Mäusen aufgezeigt werden ($p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ DOX). Gleichmaßen wurde die DOX-induzierte Formation zytoplasmatischer ROS unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) verhindert, wobei DOX-behandelte CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse signifikant verminderte ROS-Level im Vergleich zu den entsprechenden CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen aufwiesen ($p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII $\delta^{+/+}$ DOX vs. CaMKII $\delta^{-/-}$ DOX).

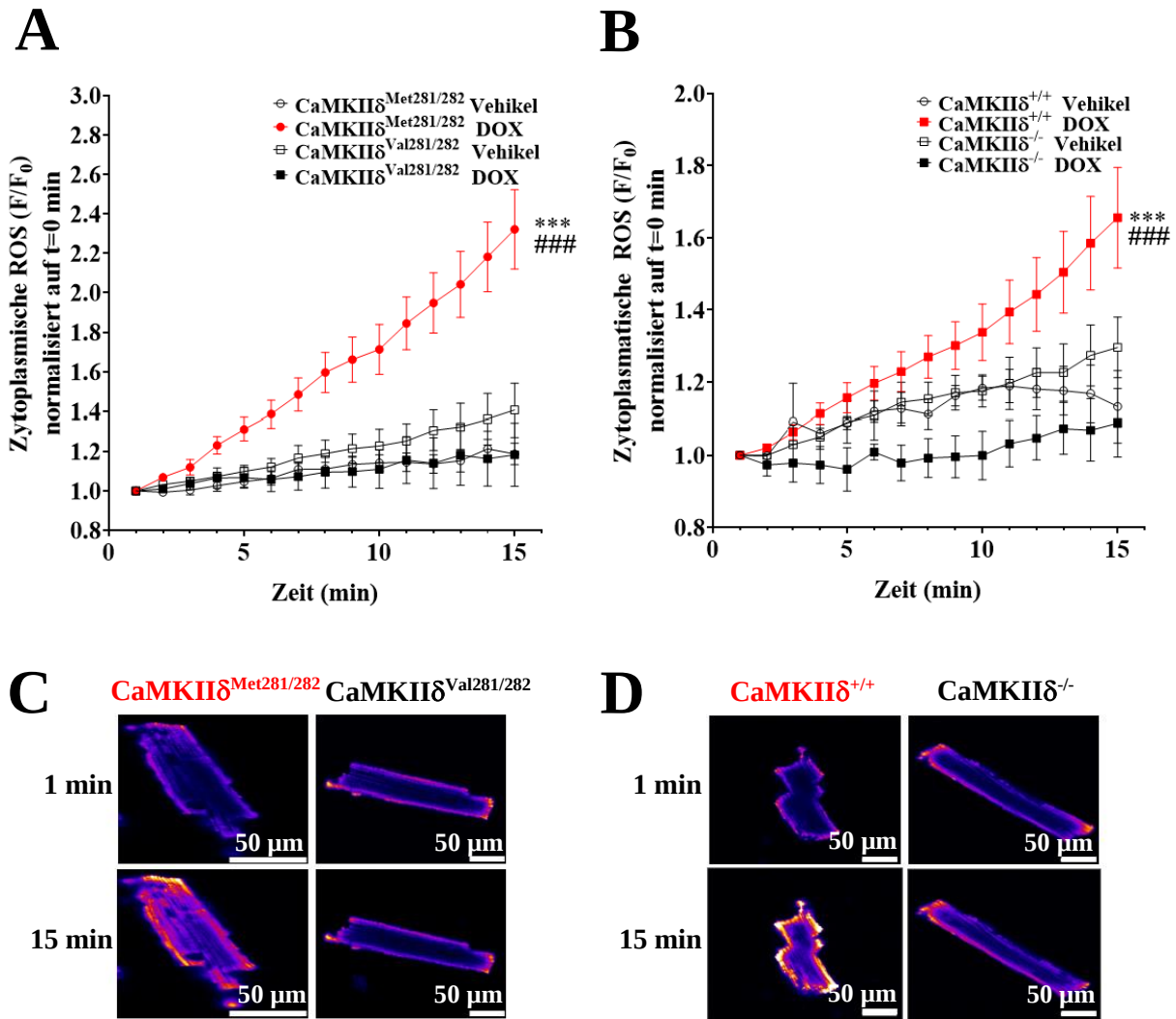


Abbildung 48 Verhinderung der DOX-induzierten zytoplasmatischen ROS-Formation durch CaMKIIδ^{Val281/282} und CaMKIIδ^{-/-} Mäuse

Sowohl in DOX-behandelten CaMKIIδ^{Met281/282} (A), als auch DOX-behandelten CaMKIIδ^{+/+} Mäusen (B) kommt es zum signifikanten Anstieg zytoplasmatischer ROS. Die Formation zytoplasmatischer ROS wird durch CaMKIIδ^{Val281/282}, sowie CaMKIIδ^{-/-} Mäuse signifikant verhindert. Originalaufnahmen CellRox Orange-gefärbter CaMKIIδ^{Met281/282} und CaMKIIδ^{Val281/282} Kardiomyozyten (nach erfolgter DOX-Behandlung) (C), sowie von CaMKIIδ^{+/+} und CaMKIIδ^{-/-} Kardiomyozyten (nach erfolgter DOX-Behandlung) (D). Die Daten sind als MW±SEM dargestellt. Die Statistik wurde mittels eines Two-Way-RM-Anovas durchgeführt. * Signifikanz vs. Vehikel; # Signifikanz vs. Genotyp

3.7 Der partielle Erhalt der LV-Funktion unter Losartan-Vorbehandlung ist mit einer Verminderung des CaMKII δ -induzierten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks trotz DOX-Exposition assoziiert

Abschließend sollte die Fragestellung geklärt werden, ob es unter Vorbehandlung mittels des Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonisten Losartan (LOS), welcher standardmäßig in der Therapie der Herzinsuffizienz Verwendung findet, zu einer Verhinderung oder Abschwächung der DOX-induzierten Kardiotoxizität kommt.

Im Rahmen dieses Experiments wurde ein Pool aus CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen (gepoolt als CaMKII δ^{WT} bezeichnet) verwendet und mittels LOS vorbehandelt. Simultan zu den vorhergehenden Versuchen zeigten DOX-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse eine signifikant reduzierte LVEF im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrolltieren ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p < 0.001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX). Interessanterweise konnte unter LOS-Vorbehandlung DOX-behandelter CaMKII δ^{WT} ebenfalls eine signifikante Reduktion der LVEF nachgewiesen werden ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.034$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS nach 12 Wochen; $p = 0.002$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Hervorzuheben ist jedoch, dass im Vergleich zu nur DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} ohne vorhergehende LOS-Behandlung eine signifikante Verringerung der DOX-induzierten LVEF-Abnahme von ~14 % auf ~8 % verzeichnet werden konnte ($p = 0.015$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) (siehe **Abb.49**).

Die DOX -induzierte LVEF-Abnahme war zudem mit einer Beeinträchtigung der FS ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p < 0.001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX) vergesellschaftet, welche ebenfalls in DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen nachweislich war ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.031$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS nach 12 Wochen; $p = 0.001$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Trotz der Reduktion des FS in DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen konnte dabei eine signifikant verminderte Reduktion im Vergleich zu DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen gezeigt werden ($p = 0.018$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

In Übereinstimmung mit der DOX-induzierten Beeinträchtigung der LVEF, wurde eine DOX-induzierte Verminderung des CO nachgewiesen ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p < 0.001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX). DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse wiesen im Vergleich zu Vehikel-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen hingegen lediglich eine trendhafte Verringerung des CO nach 12 Wochen auf ($p = 0.162$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.009$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS nach 12 Wochen; $p = 0.111$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Dabei konnte jedoch kein statistisches Signifikanzniveau zwischen DOX und DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen erreicht werden ($p = 0.114$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

Parallel zur DOX-abhängigen Beeinträchtigung des CO konnte eine Reduktion des SV beobachtet werden. DOX-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse wiesen dabei ein um ~ 10 μ L reduziertes SV auf ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p < 0.001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p < 0.001$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX), wohingegen DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse einen nicht signifikanten Abfall um ~ 3 μ L aufwiesen ($p = 0.331$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.018$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS nach 12 Wochen; $p = 0.219$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse verzeichneten somit eine signifikant verminderte Beeinträchtigung des SV im Vergleich zu DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen ($p = 0.040$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

Analog zu den vorherigen Versuchen wiesen DOX-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäusen keine Veränderung des LVEDD ($p = 0.154$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX) und des LVEDV ($p = 0.282$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX) auf. Gleichmaßen wurde keine Beeinflussung des LVEDD ($p = 0.848$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) und des LVEDV ($p = 0.775$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) in DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen nachgewiesen. DOX-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse wiesen hingegen eine Vergrößerung der systolischen Diameter und Volumina auf. In DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen wurde neben einem Anstieg des LVESD ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.028$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p = 0.024$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX), ein numerischer Anstieg des LVESV gezeigt ($p < 0.001$ für 12 Wochen vs. Start; $p = 0.025$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX nach 12 Wochen; $p = 0.072$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX). DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse wiesen hingegen keinen Anstieg des LVESD ($p = 0.852$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) und des LVESV ($p = 0.342$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) auf. Dabei konnte sowohl für den DOX-induzierte LVESD ($p = 0.198$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS), als auch LVESV-Anstieg ($p = 0.582$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS) keine statistische Signifikanz gegenüber DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen verzeichnet werden.

In dieser Messserie konnte interessanterweise eine trendhafte Ausdünnung der PWThs in DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen beobachtet werden ($p = 0.135$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX), während DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse keine Reduktion, sondern sogar eine trendhafte Zunahme der PWThs aufwiesen ($p = 0.107$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Statistisch ergab sich hieraus ein signifikanter Unterschied zwischen CaMKII δ^{WT} DOX und CaMKII δ^{WT} DOX+LOS Mäusen hinsichtlich der Wandstärke der linksventrikulären Hinterwand ($p = 0.003$ für die Interaktion CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

Des Weiteren wurde keine Beeinflussung des IVSs bzw. IVSd und der HR in Vehikel-, DOX-, und DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen gezeigt (siehe **Tab.16**). Zusammenfassend legt dieser Befund nahe, dass eine Vorbehandlung mit dem Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonisten LOS die DOX-induzierte Beeinträchtigung der LV-Funktion nicht

verhindern kann, im Vergleich zu DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen diesen aber signifikant um ca. 6 % abschwächt.

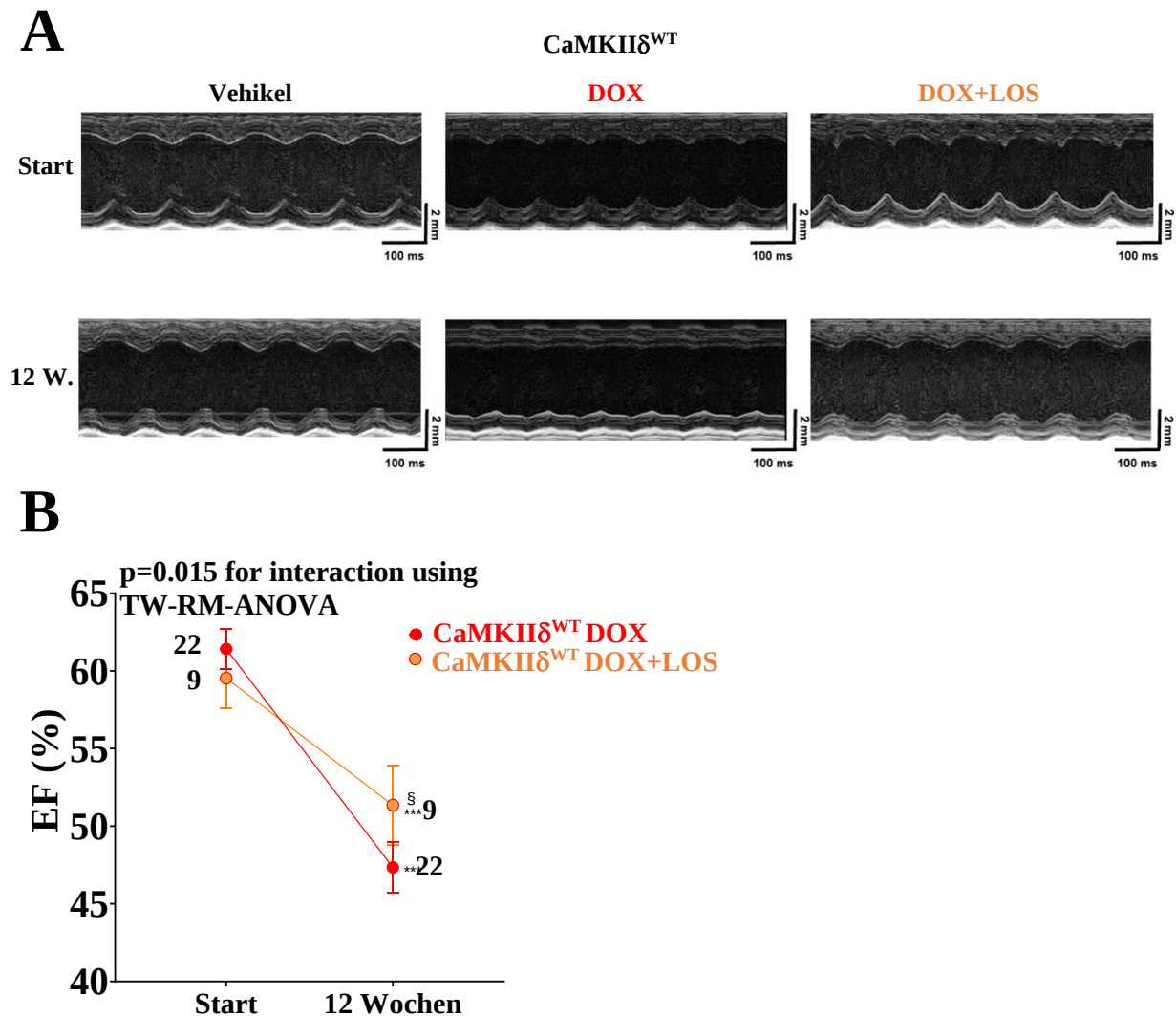


Abbildung 49 Abschwächung der DOX-induzierten LVEF-Abnahme unter LOS-Behandlung

DOX-, sowie DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse verweisen eine Reduktion der LV-Funktion, was sich als signifikante LVEF-Abnahme zeigt. Dabei weisen DOX+LOS-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse eine signifikant verminderte Beeinträchtigung im Vergleich zu DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen auf. Die Daten sind als MW $\pm$ SEM dargestellt (n=Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines Two-Way-RM-Anovas durchgeführt.

* Signifikanz vs. Vehikel; § Signifikanz vs. DOX+LOS

Tabelle 16 Erhobene echokardiographische Parameter zur Beurteilung der LV-Funktion

* Signifikanz vs. Start

\$ Signifikanz vs. Vehikel

§ Signifikanz vs. DOX+LOS

CaMKIIδ ^{WT}							Tabelle 16	Interaktion Vehikel vs. DOX+LOS	Interaktion DOX vs. DOX+LOS
	Vehikel Start (n=21)	Vehikel 12 W. (n=21)	DOX Start (n=22)	DOX 12 W. (n=22)	DOX+LOS Start (n=9)	DOX+LOS 12 W. (n=9)			
EF (%)	58.2±1.1	54.2±1.1 ⁺⁺	61.5±1.1 [§]	47.3±1.6 ^{***§§§§}	59.5±1.9	51.4±1.9 ^{***§}	=0.002		=0.015
FS (%)	30.9±0.9	29.0±0.9 [*]	32.7±0.9	23.4±0.9 ^{***§§§}	31.1±1.5	25.8±1.5 ^{***§}	=0.001		=0.018
CO (mL/min)	16.7±0.6	17.3±0.8	18.8±0.8 [§]	14.0±0.5 ^{***§§§}	15.8±1.0	13.9±1.0 ^{§§}	=0.111		=0.114
SV (µL)	36.9±1.4	38.3±1.4	40.9±1.3 ^{§§§}	30.7±1.3 ^{***§§§}	34.3±2.1	31.7±2.1 [§]	=0.219		=0.040
LVEDD (mm)	3.81±0.07	3.95±0.08	3.94±0.06 [§]	4.02±0.06	3.56±0.13	3.67±0.13	=0.848		=0.516
LVEDV (µL)	62.9±2.7	68.6±2.7 [*]	65.7±2.7	67.5±2.7	57.1±4.2	61.2±4.2	=0.775		=0.723
LVESD (mm)	2.64±0.07	2.81±0.07 [*]	2.64±0.06	3.02±0.06 ^{***§}	2.60±0.11	2.74±0.11	=0.852		=0.198
LVESV (µL)	25.9±1.8	30.3±1.8 [*]	26.5±1.8	36.1±1.8 ^{***§}	24.7±2.9	31.8±2.9 ^{**}	=0.342		=0.582
PWT _{hd} (mm)	0.84±0.04	0.82±0.05	0.81±0.02	0.74±0.02 ^{**§§}	0.78±0.03	0.87±0.05 [*]	=0.146		=0.005
PWT _{hs} (mm)	1.08±0.03	1.01±0.03	1.06±0.03	0.89±0.03 ^{***§§§§}	1.02±0.05	1.07±0.05	=0.135		=0.003
IVS _d (mm)	1.13±0.06	1.02±0.06	0.99±0.06 [§]	0.96±0.06 [§]	1.10±0.10	1.08±0.10	=0.857		=0.818
IVS _s (mm)	1.28±0.05	1.09±0.04	1.16±0.04	1.09±0.04	1.21±0.06	1.20±0.06	=0.389		=0.537
HR (bpm)	450±5	452±5	451±3	441±3	448±5	452±5	=0.828		=0.055

Mit der LOS-basierten Abschwächung der DOX-induzierten LV-Funktionsabnahme ging eine partielle Verhinderung DOX-induzierter struktureller Remodelingprozesse einher. Wie in **Abb.50** gezeigt, wurde unter DOX+LOS-Behandlung die DOX-induzierte kardiale Fibrosierung verhindert. Während DOX-behandelte CaMKII δ^{WT} Mäuse einen Anstieg kardialer fibrotischer Areale auf ~5% aufwiesen, konnten unter vorhergehender LOS-Behandlung (DOX+LOS) lediglich ein Anteil von ~1% fibrotischer Areale detektiert werden ($p<0.0001$ für CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

Interessanterweise zeigte sich hingegen trotz der echokardiographisch nicht ersichtlichen Atrophie der linksventrikulären Hinterwand unter DOX eine vergleichbar ausgeprägte zelluläre Atrophie in DOX+LOS-behandelten Mäusen ($p<0.0001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS; $p=0.122$ für CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS), wobei die Kapillardichte unbeeinflusst blieb.

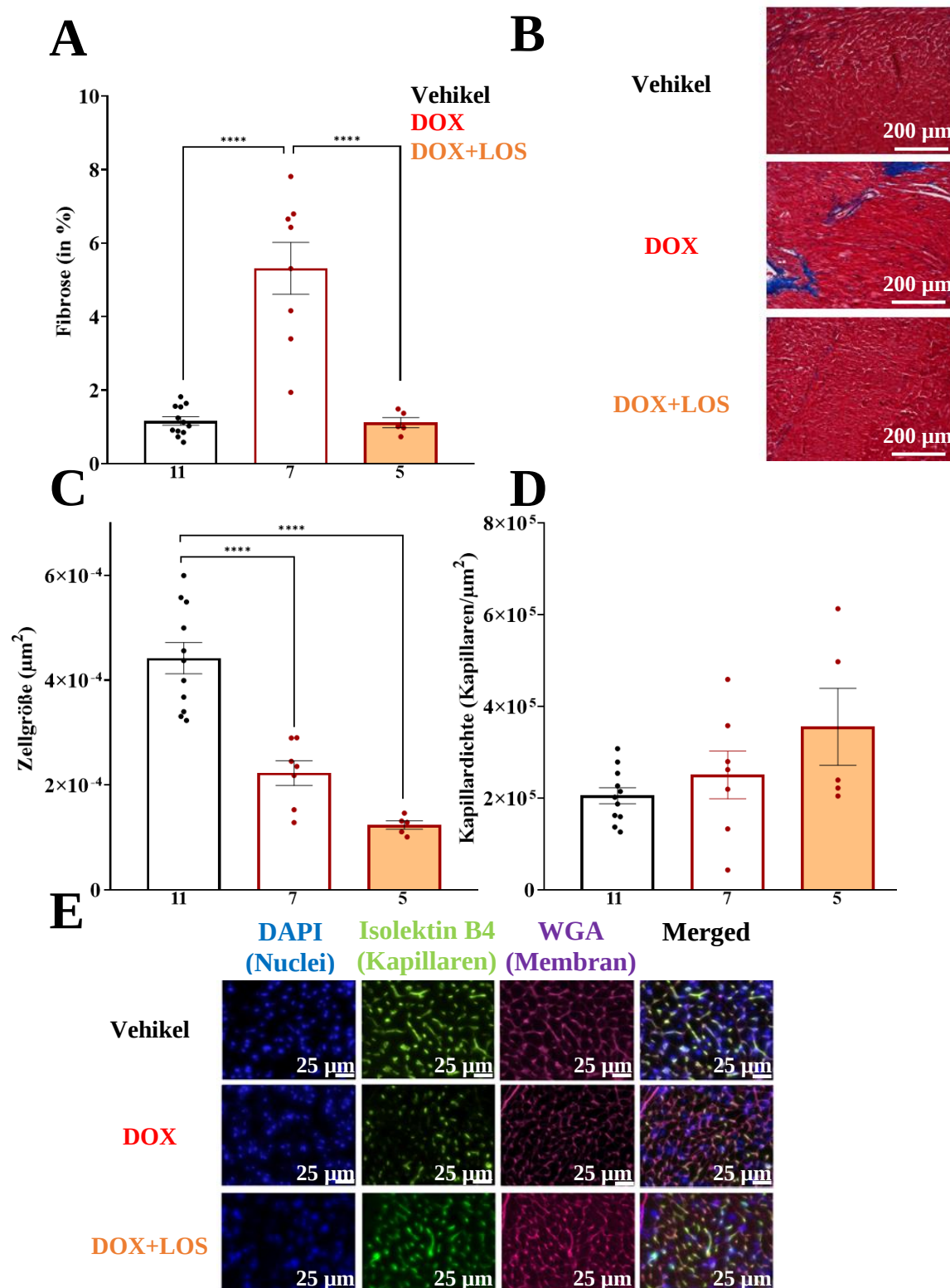


Abbildung 50 Verhinderung der DOX-induzierten myokardialen Fibrosierung unter LOS

Unter Behandlung mittels des Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonisten LOS wurde die DOX-induzierte Fibrosierung verhindert (A, B), während die DOX-induzierte Verminderung der mittleren Kardiomyozytengröße (C) bei unveränderter Kapillardichte keiner LOS-abhängigen Regulation unterliegt (D). Originalaufnahmen Trichrom-gefärbter Myokardschnitte verdeutlichen die DOX-induzierte Fibrosierung, welche unter LOS verhindert wird, sowie die DOX-abhängige zelluläre Atrophie. Dabei konnte die DOX-abhängige zelluläre Atrophie durch LOS-

Behandlung nicht verhindert werden (**E**). Die Daten sind als $MW \pm SEM$ dargestellt (n =Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

Im Zuge des vorherigen Versuchsvorhabens konnte die CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks als zugrundeliegender Mechanismus der DOX-induzierten Kardiotoxizität hervorgehoben werden, weswegen im weiteren Verlauf untersucht werden sollte, ob die LOS-induzierte Verminderung der LV-Beeinträchtigung unter DOX-Behandlung auf einer Reduktion des CaMKII δ -induzierten SR Ca²⁺-Lecks basiert.

Entsprechend **Abb.51** konnte die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung, welche durch einen signifikanten Anstieg der CaMKII-Autophosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-287 gekennzeichnet ist, unter vorhergehender LOS-Behandlung signifikant reduziert werden ($p=0.023$ für CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Somit konnte in DOX-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung nachgewiesen werden, während DOX+LOS-behandelte Mäuse eine Verringerung der CaMKII-Autophosphorylierung um ~5% vorweisen. Diese LOS-abhängige Verhinderung der DOX-induzierten CaMKII δ -Hyperaktivierung war mit einer Verhinderung der CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung vergesellschaftet ($p=0.024$ für CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Die Verhinderung der DOX/CaMKII δ -induzierten RyR2-Hyperphosphorylierung unter LOS-Behandlung war mit einer signifikanten Reduktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks verbunden ($p<0.0001$ für CaMKII δ^{WT} DOX vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS).

In Übereinstimmung mit dieser LOS-abhängigen Verhinderung des DOX-induzierten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks konnte zudem kein statistisch signifikanter Unterschied des SR Ca²⁺-Gehaltes und der systolischen Ca²⁺-Transientenamplituden zwischen Vehikel-, und DOX+LOS-behandelten CaMKII δ^{WT} Mäusen verzeichnet werden (siehe **Abb.52**). Erwähnenswert ist dabei, dass unter DOX+LOS-Behandlung eine geringfügige Reduktion des SR Ca²⁺-Gehaltes gegenüber Vehikel-behandelten Mäusen detektiert wurde, wobei jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wurde ($p=0.217$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS). Interessanterweise konnte jedoch die DOX-induzierte Relaxationsverlangsamung durch LOS nicht verhindert werden ($p<0.0001$ für CaMKII δ^{WT} Vehikel vs. CaMKII δ^{WT} DOX+LOS), wobei durch simultane pharmakologische CaMKII-Inhibition mittels AIP ebenso keine Beeinflussung der DOX+LOS-induzierten Relaxationsverlangsamung erzielt wurde.

Im Zuge dieses Datensatzes konnte somit zusammengefasst festgestellt werden, dass es durch die Verabreichung des Herzinsuffizienztherapeutikums LOS zwar zu einer abgeschwächten Beeinträchtigung der DOX-induzierten kardialen Dysfunktion kommt, was mutmaßlich auf einer Reduktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks basiert, die DOX-induzierte Relaxationsverlangsamung und zelluläre Atrophie jedoch nicht verhindert wird.

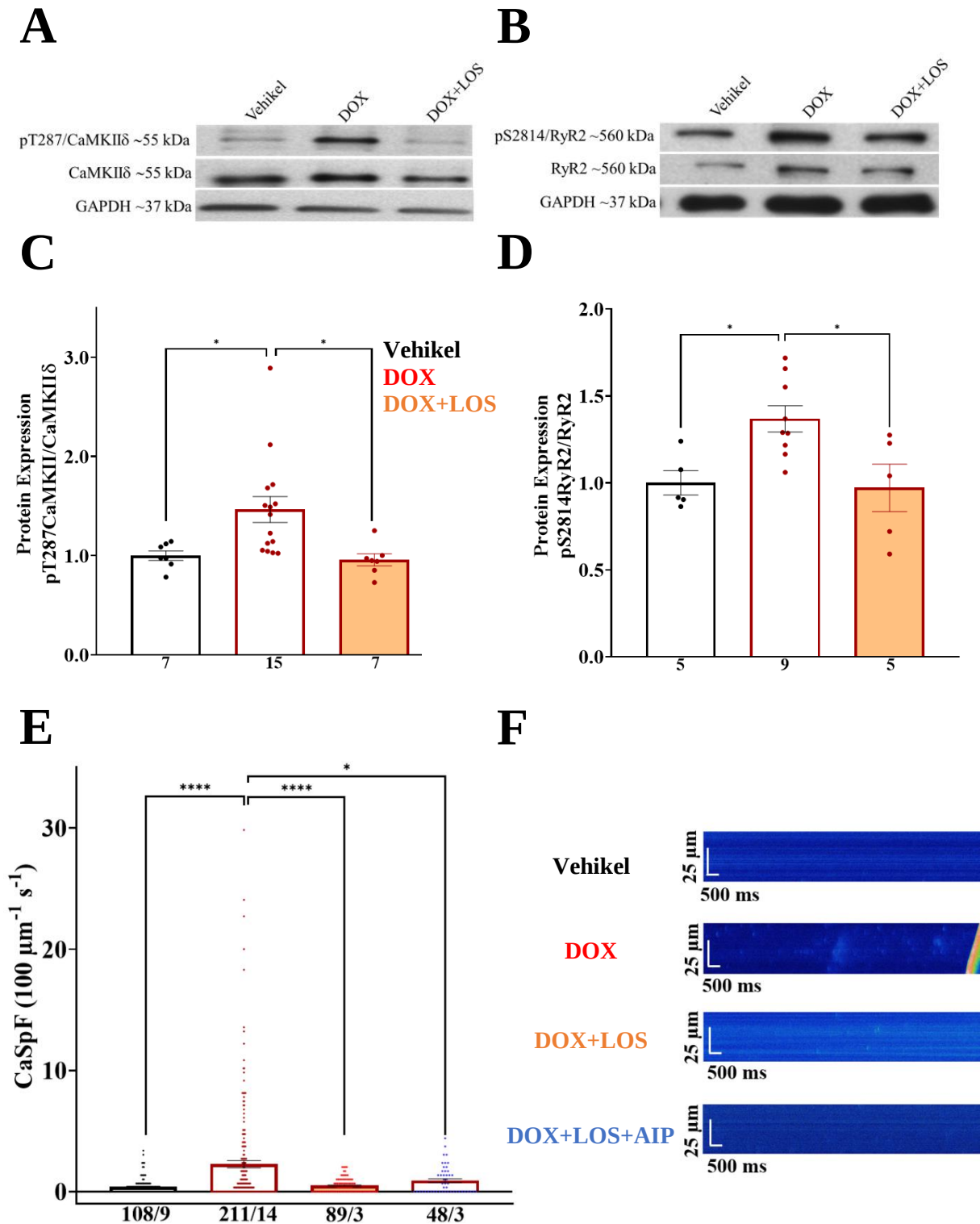


Abbildung 51 Verhinderung der DOX-induzierten CaMKIIδ-abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung unter LOS

Die *chronische* DOX-Behandlung wird mit einer gesteigerten CaMKIIδ-Aktivität verbunden (A), welche mit der konsekutiven CaMKIIδ-abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2814 vergesellschaftet wird (B). Im Zuge der LOS-Behandlung wird sowohl die DOX-abhängige CaMKIIδ-Hyperaktivierung (C), als auch die CaMKIIδ-abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung (D) verhindert, sowie das konsekutive SR Ca²⁺-Leck (E). Original Line-Scans visualisieren die verminderte CaSpF unter LOS-Behandlung (F). Die Daten sind als MW±SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

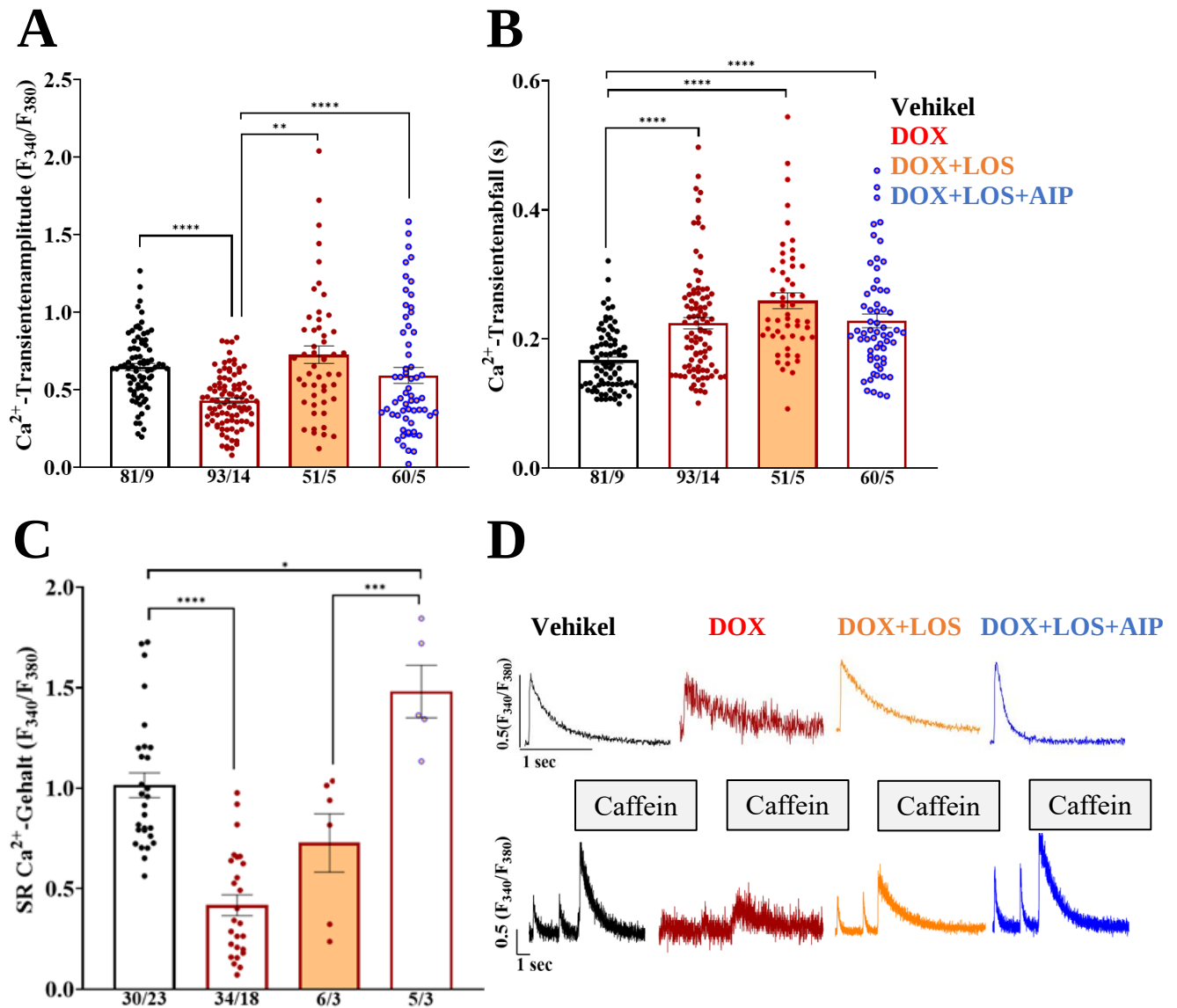


Abbildung 52 Verhinderung der DOX-induzierten SR Ca²⁺-Depletion und konsekutiver Verminderung systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden unter LOS

Die Reduktion systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden unter *chronischer* DOX-Behandlung wird unter LOS-Vorbehandlung verhindert (**A**), wobei die DOX-induzierte Verlangsamung des Ca²⁺-Transientenabfalls nicht verhindert wird (**B**). Der Erhalt systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden basiert dabei auf der LOS-abhängigen Verminderung der DOX-induzierten SR Ca²⁺-Depletion (**C**). Originalaufnahmen Fura2-AM beladener Kardiomyozyten verdeutlichen die Abnahme systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden und Relaxationsverlangsamung unter DOX, während unter LOS der Erhalt systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden erzielt wird. Ebenso visualisieren Caffein-induzierte Ca²⁺-Transienten die DOX-induzierte SR Ca²⁺-Depletion, welche unter LOS nicht beobachtet wurde (**D**). Die Daten sind als MW±SEM dargestellt (n=Zellen/Mäuse). Die Statistik wurde mittels eines One-Way-Anovas durchgeführt.

4 Diskussion

Im Zuge der vorliegenden Promotionsarbeit wurde erstmals der prädominante Aktivierungsmechanismus der CaMKII δ bei der Progression der DICM untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die CaMKII δ -Hyperaktivierung durch eine gesteigerte CaMKII-Autophosphorylierung durch Induktion der RyR2-Hyperphosphorylierung und das konsekutive SR Ca²⁺-Leck einen zentralen Pathomechanismus bei der Entwicklung der *akuten*, sowie *chronischen* DICM darstellt. Hervorzuheben ist dabei, dass die alleinige Verhinderung der oxidativen-Aktivierung der CaMKII δ die Induktion des CaMKII δ -induzierten SR Ca²⁺-Lecks nicht verhindert. Das CaMKII δ -induzierte SR Ca²⁺-Leck und die konsekutive Dysregulation des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes (z.B. SR Ca²⁺-Depletion, verminderte systolische Ca²⁺-Transientenamplituden) waren mit einer Verschlechterung der LV-Funktion und strukturellen Remodelingprozessen im Verlauf der DICM verbunden. In diesem Zusammenhang konnte ich beobachten, dass unter genetischer Deletion der CaMKII δ (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) eine verminderte Abnahme der LV-Funktion, sowie eine Verhinderung der DOX-induzierten zellulären Atrophie und Fibrose nach *chronischer* DOX-Behandlung vorliegen. Dieser Befund legt daher nahe, dass die CaMKII δ ein zentraler Mediator der DICM ist. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass der Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonist Losartan, welcher als bekanntes Herzinsuffizienztherapeutikum Verwendung findet, die DOX-induzierte Verschlechterung der LV-Funktion zwar nicht völlig verhindert, jedoch signifikant abschwächt, wobei dies mit einer Verhinderung des CaMKII δ -abhängigen diastolischen SR Ca²⁺-Lecks assoziiert war, was das CaMKII δ -abhängige SR Ca²⁺-Leck als einen zentralen Pathomechanismus der DICM nahelegt.

4.1 Die DOX-induzierte Dysregulation des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes basiert auf dem CaMKII δ -induziertem diastolischen SR Ca²⁺-Leck

Wie bereits durch Sag et al. im Modell der *akuten* Doxorubicin-Exposition an der isolierten Rattenherzmuskelzelle gezeigt wurde (Sag et al. 2011), konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine DOX-Exposition mit einer Dysregulation des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes einhergeht, die nicht nur *akut* auftritt, sondern auch nach *in-vivo* Behandlung der Maus zum Zeitpunkt 12 Wochen nach erstmaliger DOX-Applikation zu beobachten ist. Die Dysregulation des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes war dabei hauptsächlich durch die Verminderung systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden als Resultat einer DOX-induzierten SR Ca²⁺-Depletion durch ein gesteigertes diastolisches SR Ca²⁺-Leck gekennzeichnet.

Die Regulation des SR Ca²⁺-Gehaltes erfolgt durch die RyR2-induzierte SR Ca²⁺-Ausschüttung, sowie durch die SERCA2a/PLB-bedingte SR Ca²⁺-Aufnahme. Die RyR2-induzierte SR Ca²⁺-Ausschüttung wird dabei maßgeblich durch eine posttranslationale Modifikation, d.h. Phosphorylierung durch intrazellulärer Stresskinasen wie der PKA RI α oder der CaMKII δ reguliert. Einige Studien hoben bereits die PKA RI α /CaMKII δ -bedingte pathologische RyR2-Hyperphosphorylierung bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz hervor, wobei die gesteigerte CaMKII-Autophosphorylierung mit der posttranslationalen RyR2-Hyperphosphorylierung assoziiert war (Wehrens et al. 2004; Marx et al. 2000; Respress et al. 2012; van Oort et al. 2010). Im Rahmen des in meiner Promotionsarbeit verwendeten Versuchsmodells konnte gezeigt werden, dass sowohl die *akute*, als auch die *chronische* DOX-Exposition mit einer gesteigerten Autophosphorylierung der CaMKII an der

Aminosäureposition Threonin-287 verbunden war, was die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung zeigt.

Interessanterweise konnte jedoch trotz Nachweis einer DOX-induzierten Formation zytoplasmatischer ROS keine relevante oxidative Aktivierung der CaMKII δ nachgewiesen werden. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der o.g. Studie von Sag et al., welche ebenfalls eine DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung durch Autophosphorylierung ohne Regulation der oxidativen Aktivierbarkeit der CaMKII δ nachgewiesen hat (Sag et al. 2011). Dennoch scheint die oxidative Aktivierung der CaMKII eine Rolle für die ROS-Bildung unter DOX-Exposition zu spielen. So zeigten Basak et al., dass RGS7, ein Regulator der G-Protein gekoppelten Proteine, für die Formation DOX-induzierter ROS durch Komplexbildung mit der CaMKII verantwortlich ist (Basak et al. 2023). So konnte sowohl unter Verhinderung der oxidativen Aktivierbarkeit der CaMKII δ (Verhinderung der oxidativen CaMKII δ -Aktivierung durch Transition des redox-sensitiven Methioninpaars 281/282 zu Valin), als auch unter Verhinderung der CaMKII-Autophosphorylierung (Verhinderung der CaMKII-Autophosphorylierung durch Transition des Threonin-287 zu Alanin) in DOX-exponierten iPSC-CM die Formation von ROS verhindert werden (Basak et al. 2023), was in genereller Übereinstimmung mit der reduzierten ROS Formation in DOX-exponierten CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ist, wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

Die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung durch Autophosphorylierung führte sowohl im *akuten* als auch im *chronischen* Modell zu einer RyR2-Hyperphosphorylierung an der CaMKII δ -spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin-2814, was mit einem gesteigerten diastolischem SR Ca²⁺-Leck und einer konsekutiven SR Ca²⁺-Depletion vergesellschaftet war. Dieser Befund einer persistierenden DOX-induzierten RyR2-Hyperphosphorylierung an der CaMKII δ -spezifischen Phosphorylierungsstelle Serin-2814 fand sich in dem hier verwendeten Modell anders als in einer Vorarbeit von Llach et al.. So konnte Llach et al. bei der Progression der DICM zwar eine gesteigerte CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2814 nach 2-wöchiger DOX-Behandlung nachweisen. Diese erhöhte Phosphorylierung der RyR2 war hingegen 15 Wochen nach erster DOX-Applikation nicht mehr detektierbar (Llach et al. 2019). Im von Llach et al. untersuchten Modell kam es hingegen nach 15 Wochen zu einer gesteigerten RyR2-Hyperphosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2808, welche sowohl durch die PKA RI α , als auch die CaMKII δ induziert sein kann und damit eine Involvierung der PKA RI α nahelegt (Llach et al. 2019).

Des Weiteren ist anzuführen, dass neben der CaMKII δ -induzierten RyR2-Hyperphosphorylierung eine direkte Induktion des SR Ca²⁺-Lecks durch oxidativen Stress, welcher im Rahmen der DOX-Exposition entsteht, erfolgen kann. Eine direkte ROS-abhängige Oxidation redox-sensitiver Thiole als Folge der DOX-Exposition wurde bereits durch Hanna et al. gezeigt und könnte das hier gefundene CaMKII δ -induzierte SR Ca²⁺-Leck zusätzlich amplifizieren (Hanna et al. 2014). Im Rahmen des hier verwendeten Versuchsmodells konnte jedoch sowohl durch pharmakologische CaMKII-Inhibition mittels AIP als auch unter genetischer CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) das DOX-induzierte SR Ca²⁺-Leck nahezu vollständig verhindert werden, woraus sich auf ein primär CaMKII δ -induziertes SR Ca²⁺-Leck schlussfolgern lässt. Diese Befunde stehen in weitgehender Übereinstimmung mit Sag et al., wobei ebenfalls unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition mittels AIP eine signifikante Reduktion des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks in einem Modell der *akuten* DICM nachgewiesen wurde (Sag et al. 2011). Als Folge zeigte sich sowohl unter pharmakologischer als auch genetischer CaMKII δ -Inhibition ein reduziertes SR Ca²⁺-Leck mit einem Erhalt systolischer Ca²⁺-Transientenamplituden, was ebenfalls in genereller Übereinstimmung mit der Vorarbeit von Sag et al. ist. Erwähnenswert ist dabei jedoch, dass Sag et al. ebenfalls einen abschwächenden Effekt des ROS-Scavengers Melatonin auf das diastolische SR Ca²⁺-Leck

zeigen konnten, was mit einer Reduktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks und einer konsekutiven Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehaltes vergesellschaftet war (Sag et al. 2011). Entsprechende Untersuchungen wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit nicht durchgeführt, sodass der Befund von Sag et al. nahe legt, dass es im Rahmen einer *akuten* DOX-Exposition sowohl eine direkte ROS-induzierte RyR2-Oxidation, als auch eine CaMKII δ -vermittelte RyR2-Hyperphosphorylierung gibt, welche jeweils an der Induktion des DOX-bedingten diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks beteiligt sind, wobei gemäß der vorliegenden Arbeit geschlossen werden kann, dass die CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung auch notwendig für die ROS-vermittelte Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks unter DOX ist (primär wohl durch eine ROS-bedingte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR mit konsekutiver Ca^{2+} /Calmodulin-bedingter CaMKII δ -Aktivierung).

Des Weiteren konnte eine signifikante Verlangsamung des Ca^{2+} -Transientenabfalls unter *akuter* und *chronischer* DOX-Exposition verzeichnet werden, was eine reduzierte bzw. verlangsamte SR Ca^{2+} -Aufnahme unter DOX nahelegt. Einen möglichen Erklärungsansatz für eine verlangsamte SR Ca^{2+} -Aufnahme stellt die reduzierte SERCA2a-Funktion dar. Eine normale SERCA2a-Funktion ist essentiell zur Gewährleistung einer regulären SR Ca^{2+} -Aufnahme während der Diastole, d.h., um eine adäquate Auffüllung des SR Ca^{2+} -Gehaltes für die nachfolgende systolische Ca^{2+} -Freisetzung zu gewährleisten. Desai et al., sowie Arai et al. konnten in diesem Zusammenhang bereits eine Abhängigkeit der SERCA2a-Expression von der verwendeten Doxorubicin-Dosierung nachweisen, wobei erhöhte Doxorubicin-Konzentrationen mit einer verminderten SERCA2a-Expression korrelieren (Desai et al. 2022; Arai et al. 2000). Ebenso konnte durch Freiwan et al. und Llach et al. eine reduzierte SERCA2a-Expression nach *chronischer* DOX-Behandlung gezeigt werden (Freiwan et al. 2022; Llach et al. 2019). Olson et al. fand zudem einen Zusammenhang zwischen einer DOX-induzierten Verminderung der SERCA2a-Expression und einer Beeinträchtigung der echokardiographisch gemessenen systolischen LV-Funktion (genauer der fraktionellen Verkürzung (Olson et al. 2005)). Im hier verwendeten Versuchsmodell konnte hingegen weder unter *akuter*, noch nach *chronischer* DOX-Exposition eine Verringerung der SERCA2a-Expression trotz Verlangsamung des Ca^{2+} -Transientenabfalls nachgewiesen werden, wobei spekuliert werden kann, dass Mäuse mit besonders schlechter LV-Funktion unter DOX durchaus auch eine Reduktion der SERCA2a-Expression zeigen könnten (eine entsprechende Korrelation wurde hier nicht vorgenommen). Dies ist insofern interessant, als das in dem untersuchten Versuchstierkollektiv unterschiedlich DOX-sensible Mäuse waren, die einem Responder bzw. Non-Responder-Status entsprechen würden. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass in Abhängigkeit der Ausprägung der DOX-bedingten Abnahme der LV-Funktion auch eine negative Regulation der SERCA2a-Expression nachweisbar wäre.

Da die SERCA2a redox-sensitive Cysteinreste aufweist, ist zudem eine redox-abhängige Abnahme der SERCA2a-Funktion durch DOX-assoziierte ROS vorstellbar, was in Übereinstimmung mit der beobachteten Verminderung der SR Ca^{2+} -Aufnahme und der konsekutiven SR Ca^{2+} -Depletion wäre (Hanna et al. 2014). Eine mutmaßlich ROS-induzierte Oxidation der SERCA2a würde somit die Beeinträchtigung der SR Ca^{2+} -Aufnahme und der Relaxationsverlangsamung in DOX-exponierten CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäusen erklären, in welchen die DOX-induzierte ROS-Formation im *chronischen* Modell signifikant erhöht nachweisbar war. Dem gegenüberstehend kam es allerdings auch in CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen, in denen keine erhöhten ROS nach DOX gefunden werden konnten, zu einer DOX-induzierten Relaxationsverlangsamung, sodass andere Mechanismen abseits der SERCA2a-Expression bzw. redox-bedingten Funktionsregulation eine Rolle spielen müssen.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die SERCA2a-Funktion einer Phospholamban-abhängigen Regulation unterliegt. Phospholamban stellt eine Zielstruktur intrazellulärer Stresskinasen, wie der PKA und der CaMKII δ dar, welche PLB posttranslational

phosphorylieren können. Dabei fungiert PLB in der dephosphorylierten Form als endogener SERCA2a-Inhibitor, wohingegen die posttranslationale Phosphorylierung durch Dissoziation des phosphorylierten PLB in einer gesteigerten SERCA2a-Funktion resultiert. Folglich würde eine verminderte PLB-Phosphorylierung (z.B. an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Threonin-17) oder eine erhöhte PLB/SERCA2a Ratio den beobachteten Befund der DOX-induzierten Verlangsamung des Ca^{2+} -Transientenabfalls erklären, was jedoch nicht nachgewiesen wurde und in weitgehender Übereinstimmung mit Llach et al. ist (Llach et al. 2019).

Eine Verlangsamung der Relaxation unter DOX könnte alternativ auch auf einer Beeinträchtigung des NCX-Vorwärtsmodus (Ca^{2+} -Extrusion) oder einer verminderten NCX-Expression basieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fanden sich jedoch unveränderte Tau-Werte Caffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten, was eine relevante Beeinflussung der Relaxationsverlangsamung durch eine veränderte NCX-Funktion unwahrscheinlich macht und in Übereinstimmung zu der Vorarbeit von Llach et al. beobachtet wurde (Llach et al. 2019). Abschließend kann also nur geschlussfolgert werden, dass weder eine veränderte Expression von SERCA2a oder PLB bzw. eine Änderung des Phosphorylierungsgrades von PLB in dem von mir untersuchten Modell vorlag, sodass a.e. doch direkte DOX/ROS-Effekte zu einer reduzierten SR Ca^{2+} -Wiederaufnahme durch eine oxidativ-bedingte SERCA2a-Funktionsänderung geführt haben sollten.

4.2 Die genetische Deletion der CaMKII δ führt zu einer abgeschwächten Abnahme der LV-Funktion unter chronischer DOX-Behandlung

Verschiedentliche Studien zeigten bereits eine DOX-induzierte Abnahme der LV-Funktion in zahlreichen *in-vivo* Experimenten (u.a. Llach et al. 2019; Desai et al. 2022). Llach et al. konnte in diesem Zusammenhang beispielsweise eine DOX-induzierte Abnahme der LVEF und der FS in einem Wildtyp-Mausmodell 15 Wochen nach DOX-Applikation detektieren (Llach et al. 2019). Ein ähnliches Ergebnis konnte durch Desai et al. aufgezeigt werden, wobei die DOX-induzierte LV-Dysfunktion bereits 8 Wochen nach DOX-Applikation verzeichnet wurde (Desai et al. 2022). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Abnahme der LVEF um ~12-16 % in DOX-behandelten Wildtyp-Mäusen 12 Wochen nach DOX-Applikation nachgewiesen. Die reduzierte LVEF war dabei mit einer Verminderung der FS, des CO sowie des SV assoziiert, was eine DOX-induzierte systolische Herzinsuffizienz in dem von mir untersuchten Mausmodell zeigt. Interessanterweise konnte die DOX-induzierte Abnahme der LV-Funktion in allen untersuchten Mausmodellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum „redox-toten“ CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mausmodell zeigte sich die Abnahme der LV-Funktion aber nur im Modell der globalen CaMKII δ -Deletion (CaMKII $\delta^{-/-}$ Model) signifikant abgeschwächt. Diese signifikant abgeschwächte LVEF-Abnahme unter genetischer CaMKII δ -Deletion basiert dabei mutmaßlich u.a. auf der Verhinderung der DOX-induzierten Dysregulation des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes. Als zentraler Pathomechanismus der DOX-induzierten Beeinträchtigung des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes fungiert dabei eine CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks (vgl. oben). Die Progression der DICM war mit einer CaMKII δ -abhängigen Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks verbunden, welches jedoch weder bei der *akuten*, noch der *chronischen* DICM in Kardiomyozyten mit genetischer CaMKII δ -Deletion nachgewiesen werden konnte und mit einer reduzierten LV-Dysfunktion DOX-behandelter CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse verbunden war. Die Abschwächung der DOX-induzierten systolischen Dysfunktion unter genetischer CaMKII δ -Deletion führte jedoch nicht zu einem verbesserten Gesamtüberleben DOX-behandelter CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse. Trotz signifikant

reduzierter Verminderung der LVEF-Abnahme entwickelten DOX-behandelte CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse einen vergleichbaren DICM-Phänotypen (u.a. vergleichbar abgeschwächte Gewichtszunahme) wie DOX-behandelte CaMKII $\delta^{+/+}$ Mäuse, wobei ein gleichermaßen reduziertes Gesamtüberleben nachgewiesen wurde. Das reduzierte Gesamtüberleben trotz verbesserter LV-Funktion in CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen, legt nahe, dass systemische Effekte der DOX-Applikation wie eine konsekutiv verminderte Nahrungsaufnahme im Vergleich zur LV-Funktionsabnahme maßgeblich für das Überleben der Versuchstiere waren.

4.3 Verhinderung DOX-induzierter struktureller Remodelingprozesse unter genetischer CaMKII δ -Deletion

Die DOX-induzierte Verschlechterung der LV-Funktion kann neben Störungen des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes auch auf pathologischen strukturellen Remodelingprozessen basieren. Oxidativer Stress wurde in diesem Zusammenhang als zentraler Regulator der Pathogenese pathologischer Remodelingprozesse, wie der kardialen Fibrose durch direkte, sowie indirekte Induktion des pro-fibrotischen Wachstumsfaktors TGF β identifiziert (Telesca et al. 2023). Demzufolge sind erhöhte ROS-Level mit einer gesteigerten TGF β -Aktivierung, sowie einer gesteigerten Matrix-Metallproteinase 2 (MMP2)-Expression vergesellschaftet, welche als zentrale Elemente der Extrazellulärenmatrix (EZM)-Regulation dienen. Die gesteigerte ROS-abhängige TGF β -Aktivierung bzw. MMP2-Expression ist folglich mit einer gesteigerten Kollagenformation (und einer konsekutiv kardialen Fibrose) assoziiert.

Die DOX-abhängige Regulation fibrotischer Marker wurde bereits in einigen Studien untersucht, wobei die DOX-induzierte gesteigerte Expression zentraler Wachstumsfaktoren (z.B. CTGF und TGF β), aber auch die erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP2 und MMP9) gezeigt wurde. Trotz einiger Studien, welche den Zusammenhang der DOX-Behandlung mit der Entwicklung einer kardialen Fibrose untersuchten, bleibt dieser Zusammenhang kontrovers. Während durch Llach et al. keine Anzeichen einer DOX-induzierten Fibrose 15 Wochen nach DOX-Applikation beschrieben wurde, konnte durch Tadokoro et al. eine erheblich gesteigerte Kollagenablagerung als Folge der *chronischen* DOX-Behandlung beschrieben werden (Llach et al. 2019; Tadokoro et al. 2020). In Übereinstimmung mit Tadokoro et al. konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante DOX-induzierte Fibrosierung in Wildtyp-Mausmodellen nachgewiesen werden, welche interessanterweise unter Verhinderung der oxidativen CaMKII δ -Aktivierung, aber auch unter genetischer CaMKII δ -Deletion verhindert wurde. Die Verhinderung der DOX-induzierten myokardialen Fibrose in redox-toten CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen, als auch unter genetischer CaMKII δ -Deletion könnte dabei Resultat der verminderten ROS-Formation in CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen sein. Die Rolle der CaMKII δ bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz und der Entwicklung der kardialen Fibrose wurde zudem durch einige Studien untersucht (Zhang et al. 2023; Basak et al. 2023; Kreusser et al. 2014). In diesem Zusammenhang konnte durch Kreusser et al. die pathophysiologische Relevanz der CaMKII δ bei der Entwicklung der kardialen Fibrose durch Regulation des CaMKII δ -HDAC4-MEF2 Signalweges beschrieben werden, bei welchem die Aktivierung der CaMKII δ mit einer konsekutiven HDAC4-Phosphorylierung und der resultierenden MEF2-Inhibition verbunden wird. Als Folge dieses Signalweges konnten die Autoren dieser Studie eine gesteigerte myokardiale Fibrose beschreiben (Kreusser et al. 2014). Ebenso wurde bereits die Rolle der CaMKII δ bei der Entwicklung der *chronischen* DOX-induzierten Fibrose durch Basak et al. gezeigt (Basak et al. 2023). Basak et al. konnte eine Überexpression des Regulator der G-Protein-abhängigen Proteine (RGS7) nach *chronischer*

DOX-Behandlung nachweisen, wobei die Autoren ebenfalls eine Interaktion von RGS7 mit der CaMKII δ zeigen konnten (Basak et al. 2023). Diese RGS7/CaMKII δ -Interaktion wurde als zentraler Regulator der DOX-induzierten Fibrose nachgewiesen und hebt die Rolle der CaMKII δ bei der Entstehung der DOX-induzierten Fibrose weiter hervor (Basak et al. 2023). Dieser Befund von Basak et al. wäre demzufolge ein weiterer Erklärungsansatz für die Verhinderung der DOX-induzierten Fibrose unter genetischer CaMKII δ -Deletion. Bezogen auf die Befunde meiner Arbeit lässt sich daher vermuten, dass sowohl eine pathologische Hyperaktivierung der CaMKII δ , als auch direkte ROS-Effekte an der Entstehung der DOX-induzierten Fibrose beteiligt sind.

4.4 Abschwächung der DOX-induzierten LV-Dysfunktion unter Losartan basiert auf der Verhinderung des DOX-bedingten SR Ca²⁺-Lecks

Das Entstehen einer kardialen Dysfunktion ist generell mit einer Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) assoziiert. Die Hyperaktivierung des RAAS ist dabei mit einer gesteigerten Freisetzung von Angiotensin-II, einem bekannten Mediator von oxidativem Stress verbunden. Des Weiteren ist die gesteigerte Angiotensin-II Freisetzung mit der Induktion kardialer Fibrose, Apoptose und Beeinträchtigungen des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes vergesellschaftet (Chen et al. 2018; Xiao et al. 2018; Schnee und Hsueh 2000; Bhullar und Dhalla 2022). Aufgrund der pathologischen Relevanz des RAAS werden RAAS-Inhibitoren, sowie Angiotensin-Rezeptorblocker als Therapeutika von der American Heart Association zur Vorbeugung und Behandlung der Herzinsuffizienz empfohlen (Jia et al. 2018). Der Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonist Losartan wird standardmäßig zur Behandlung der Progression der Herzinsuffizienz eingesetzt. Dabei konnte durch klinische Studien, sowie *in-vivo* Studien bereits auch die positive Auswirkung von Losartan auf die Progression der DICM gezeigt werden (Kim et al. 2023; Freiwan et al. 2022). Kim et al. konnte beispielsweise eine LOS-abhängige Verminderung der DOX-induzierten Apoptose und der kardialen Fibrose nachweisen (Kim et al. 2023). Die Ergebnisse meiner Promotionsarbeit legen nahe, dass eine präventive LOS-Behandlung die DOX-induzierte Verschlechterung der LV-Funktion zwar nicht völlig verhindern, jedoch signifikant abschwächen kann. Diese Befunde stehen damit in teilweiser Übereinstimmung mit Freiwan et al., welcher ebenfalls eine DOX-induzierte LV-Verschlechterung unter LOS verzeichnete, jedoch keinen abschwächenden Effekt von LOS auf die DOX-induzierte LV-Dysfunktion beobachten konnte (Freiwan et al. 2022). Die LOS-bedingte Abschwächung der DOX-induzierten systolischen Dysfunktion, wie sie im Rahmen des hier untersuchten Modells gefunden wurde, war dabei mit einer verminderten Störung des intrazellulären Ca²⁺-Haushaltes vergesellschaftet. In LOS-behandelten CaMKII δ ^{WT} Mäusen konnte in diesem Versuchsmodell die DOX-induzierte CaMKII δ -Hyperaktivierung durch eine gesteigerte CaMKII-Autophosphorylierung verhindert werden, was mit einer Verhinderung des DOX-induzierten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks und einem Erhalt des SR Ca²⁺-Gehaltes verbunden war. Als Resultat des erhaltenen SR Ca²⁺-Gehaltes wiesen LOS-behandelte CaMKII δ ^{WT} Kardiomyozyten erhaltene systolische Ca²⁺-Transientenamplituden trotz vorheriger DOX-Behandlung der entsprechenden Mäuse auf. Im Gegensatz hierzu konnte die DOX-induzierte Relaxationsverlangsamung unter LOS, wie auch unter pharmakologischer CaMKII-Inhibition nicht verhindert werden, was einen CaMKII δ -unabhängigen Mechanismus

der Relaxationsverlangsamung nahelegt. In Übereinstimmung mit Kim et al. fand sich in DOX/LOS-behandelten Herzen eine signifikant reduzierte Fibrose, was die Potenz einer präventiven LOS-Behandlung im Rahmen der DICM-Entstehung nahelegt. Zusammenfassend legen meine Daten somit eine partielle Abschwächung der DOX-induzierte LV-Dysfunktion unter präventiver LOS-Gabe nahe, wobei der protektive LOS-Effekt mit einer Abschwächung des CaMKII δ -induzierten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks vergesellschaftet war.

5 Zusammenfassung und Conclusion

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die pathophysiologische Relevanz der CaMKII δ -Aktivierung durch Autophosphorylierung gegenüber der oxidativ-bedingten Aktivierung im Rahmen der Progression der DICM untersucht.

Die CaMKII δ -abhängige Hyperphosphorylierung des RyR2 und das konsekutive diastolische SR Ca²⁺-Leck scheinen dabei zentrale pathomechanistische Teilaspekte der Pathogenese der *akuten* als auch *chronischen* DICM darzustellen. Als Folge des pathologisch erhöhten diastolischen SR Ca²⁺-Lecks war die *akute* wie auch *chronische* DOX-Exposition mit einer Ca²⁺-Depletion des SR und verringerten systolischen Ca²⁺-Transientenamplituden vergesellschaftet. Interessanterweise konnte diese Störung des intrazellulären Ca²⁺-Haushalts jedoch nur unter genetischer Deletion der CaMKII δ , nicht jedoch durch Verhinderung der oxidativen Aktivierbarkeit der CaMKII δ verhindert werden. Entsprechend führte auch eine pharmakologische Blockade der CaMKII (mittels AIP) zu einer Verhinderung der DOX-induzierten Ca²⁺-Dysregulation.

Im *in-vivo* Modell der DOX-behandelten Maus fand sich eine unterschiedlich starke Abnahme der LV-Funktion in CaMKII δ ^{-/-} vs. CaMKII δ ^{Val281/282} Mäusen, wobei sich nur in CaMKII δ ^{-/-} Mäusen eine signifikant abgeschwächte Abnahme der LV-Funktion unter DOX im Vergleich zum ebenfalls DOX-behandelten WT-Geschwistertier fand. Dieser protektive Effekt in der CaMKII δ ^{-/-} Maus war mit dem Fehlen eines DOX-induzierten SR Ca²⁺-Lecks auf zellulärer Ebene verbunden, das in CaMKII δ ^{Val281/282} Kardiomyozyten trotz fehlender redox-bedingter CaMKII δ -Aktivierbarkeit weiterhin präsent war und eine pathophysiologisch relevante Rolle des CaMKII δ -abhängigen SR Ca²⁺-Lecks bei der DICM nahelegt.

Neben der Ausprägung einer systolischen Dysfunktion resultierte die *chronische* DOX-Behandlung auch in kardialen strukturellen Remodelingprozessen, gekennzeichnet durch gesteigerte Fibrosierung und Atrophie. Sowohl unter genetischer CaMKII δ -Deletion, als auch Verhinderung der oxidativen Aktivierung der CaMKII δ wurden diese strukturellen Remodelingprozesse signifikant verhindert, was die Relevanz nicht nur der CaMKII δ an sich, sondern auch der oxidativ-aktivierten CaMKII δ bei der Induktion pathologischer Remodelingprozesse nahelegt. Die potentiell protektiven Effekte des verminderten strukturellen Remodelings schlugen sich allerdings nicht innerhalb des untersuchten Beobachtungszeitraums von 12 Wochen im Sinne einer besseren LV-Funktion oder einem gesteigerten Gesamtüberleben nieder, wobei dies im Falle einer längeren Beobachtungsdauer zu erwarten wäre.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass der CaMKII δ eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der DICM durch Induktion von Ca²⁺-Dysregulation und strukturellen Remodelingprozessen zukommt. Bislang gibt es wenig Evidenz zur Prävention bzw. Therapie einer DICM (vgl. ESC Leitlinie 2022), sodass die Daten meiner Arbeit hypothesengenerierend interpretiert werden können, dass eine Therapie mit Losartan nicht nur über eine Verhinderung

der von Kim et al. beschriebenen Remodelingprozessen wirken könnte, sondern auch einen protektiven Effekt hinsichtlich der pathologischen Aktivierung der CaMKII δ haben könnte.

5.2 Conclusion

The aim of this thesis was to investigate the pathophysiological relevance of CaMKII δ -activation by autophosphorylation compared to oxidative-induced activation in the progression of DICM.

The CaMKII δ -dependent hyperphosphorylation of RyR2 and the consecutive diastolic SR Ca²⁺-leak appear to represent central pathomechanistic aspects of the pathogenesis of both *acute* and *chronic* DICM. As a consequence of the pathologically increased diastolic SR Ca²⁺-leak, *acute* as well as *chronic* DOX exposure was associated with a Ca²⁺-depletion of the SR and reduced systolic Ca²⁺-transient amplitudes. Interestingly, this disruption of the intracellular Ca²⁺-balance was only prevented by genetic deletion of CaMKII δ , but not by preventing the oxidative activation of CaMKII δ . Accordingly, pharmacological blockade of CaMKII (using AIP) also led to the prevention of DOX-induced Ca²⁺-dysregulation.

In an *in-vivo* model of DOX-treated mice, a different degree of decreased LV-function was found in CaMKII δ ^{-/-} vs. CaMKII δ ^{Val281/282} mice, with a significantly attenuated decrease in LV-function upon DOX in CaMKII δ ^{-/-} mice compared to the DOX-treated WT-littermate. This protective effect in the CaMKII δ ^{-/-} mouse was associated with the absence of a DOX-induced SR Ca²⁺-leak at the cellular level, which was still present in CaMKII δ ^{Val281/282} cardiomyocytes despite the absence of redox-induced CaMKII δ activatability, suggesting a pathophysiological relevant role of CaMKII δ -dependent SR Ca²⁺-leak in DICM.

Coinciding to the development of systolic dysfunction, *chronic* DOX treatment also resulted in cardiac structural remodelling processes, characterised by increased fibrosis and atrophy. Both genetic CaMKII δ -deletion and prevention of oxidative activation of CaMKII δ significantly prevented these structural remodelling processes, which suggests the relevance not only of CaMKII δ , but also of oxidatively-activated CaMKII δ in the induction of pathological remodelling processes.

In summary, it can be concluded that CaMKII δ plays a significant role in the pathogenesis of DICM by inducing Ca²⁺-dysregulation and structural remodelling processes. To date, there is little evidence on the prevention or treatment of DICM (see ESC Guideline 2022), so that the data from my work can be interpreted as generating a hypothesis that treatment with losartan could not only act by preventing the remodelling processes described by Kim et al., but could also have a protective effect with regard to the pathological activation of CaMKII δ .

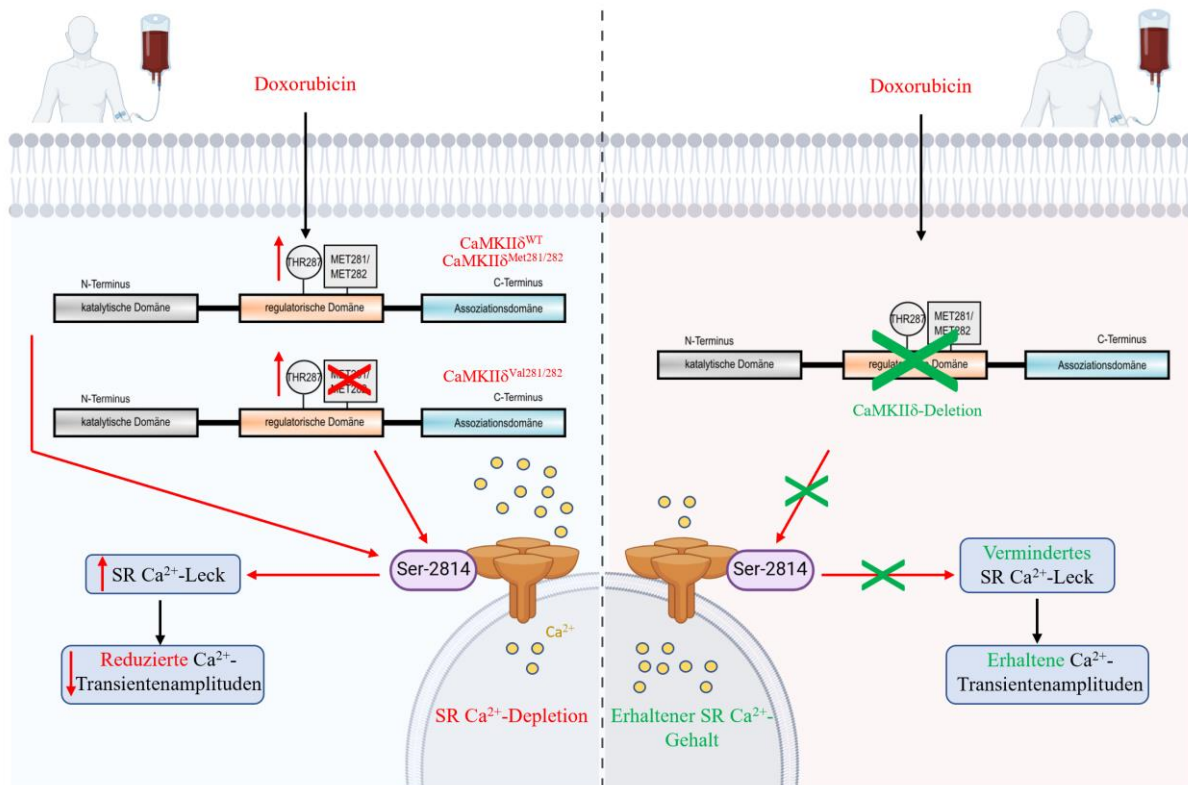


Abbildung 53 Verhinderung des DOX-induzierten diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion

Die *akute* und *chronische* DICM werden in $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$ und $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$ Mäusen mit einer DOX-induzierten gesteigerte CaMKII -Autophosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-287 verbunden, was in einer $\text{CaMKII}\delta$ -Hyperaktivierung resultiert. Die $\text{CaMKII}\delta$ -Hyperaktivierung führt zur $\text{CaMKII}\delta$ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung an der Aminosäureposition Serin-2814, was in einem konsekutiven diastolischem SR Ca^{2+} -Leck resultiert. Ein gesteigertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck wird mit einer Verminderung des SR Ca^{2+} -Gehaltes und der konsekutiven Verminderung systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden verbunden. Unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion ($\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Model) wird die DOX-induzierte $\text{CaMKII}\delta$ -Hyperaktivierung verhindert, was mit einer Verhinderung des DOX-induzierten diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks verbunden wird. Als Resultat der fehlenden RyR2-Hyperphosphorylierung und der Verhinderung des konsekutiven SR Ca^{2+} -Lecks wird der Erhalt des SR Ca^{2+} -Gehaltes und systolischer Ca^{2+} -Transientenamplituden trotz DOX beobachtet. Die *chronische* DOX-Exposition wird mit einer Verminderung der LVEF in $\text{CaMKII}\delta^{\text{Met281/282}}$, $\text{CaMKII}\delta^{\text{Val281/282}}$, $\text{CaMKII}\delta^{+/+}$ und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen verbunden, wobei unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion eine signifikant verminderte LVEF-Abnahme verzeichnet wurde. Die reduzierte LVEF-Abnahme unter genetischer $\text{CaMKII}\delta$ -Deletion basiert dabei mutmaßlich auf der Verhinderung des DOX-induzierten SR Ca^{2+} -Lecks. Eigene Darstellung, erstellt mittels BioRender.

6 Literaturverzeichnis

- Ai, Xun; Curran, Jerry W.; Shannon, Thomas R.; Bers, Donald M.; Pogwizd, Steven M. (2005): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. In: *Circulation research* 97 (12), S. 1314–1322. DOI: 10.1161/01.RES.0000194329.41863.89.
- Altschaf, Beth A.; Arvanitis, Demetrios A.; Fuentes, Oscar; Yuan, Qunying; Kranias, Evangelia G.; Valdivia, Héctor H. (2011): Dual role of junctin in the regulation of ryanodine receptors and calcium release in cardiac ventricular myocytes. In: *The Journal of physiology* 589 (Pt 24), S. 6063–6080. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.215988.
- Antos, C. L.; Frey, N.; Marx, S. O.; Reiken, S.; Gaburjakova, M.; Richardson, J. A. et al. (2001): Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. In: *Circulation research* 89 (11), S. 997–1004. DOI: 10.1161/hh2301.100003.
- Arai, M.; Yoguchi, A.; Takizawa, T.; Yokoyama, T.; Kanda, T.; Kurabayashi, M.; Nagai, R. (2000): Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene transcription. In: *Circulation research* 86 (1), S. 8–14. DOI: 10.1161/01.res.86.1.8.
- Arcamone, F.; Franceschi, G.; Penco, S.; Selva, A. (1969): Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. In: *Tetrahedron letters* (13), S. 1007–1010. DOI: 10.1016/s0040-4039(01)97723-8.
- Aronsen, J. M.; Swift, F.; Sejersted, O. M. (2013): Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, S. 11–19. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.06.003.
- Aubel-Sadron, G.; Londos-Gagliardi, D. (1984): Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. In: *Biochimie* 66 (5), S. 333–352. DOI: 10.1016/0300-9084(84)90018-x.
- Azam, Mohammed Ali; Chakraborty, Praloy; Bokhari, Mahmoud M.; Dadson, Keith; Du, Beibei; Massé, Stéphane et al. (2021): Cardioprotective effects of dantrolene in doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. In: *Heart Rhythm* O2 2 (6), S. 733–741. DOI: 10.1016/j.hroo.2021.08.008.
- Basak, Madhuri; Sengar, Abhishek Singh; Das, Kiran; Mahata, Tarun; Kumar, Manish; Kumar, Dinesh et al. (2023): A RGS7-CaMKII complex drives myocyte-intrinsic and myocyte-extrinsic mechanisms of chemotherapy-induced cardiotoxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (1), e2213537120. DOI: 10.1073/pnas.2213537120.
- Bauerová-Hlinková, Vladena; Hajdúchová, Dominika; Bauer, Jacob A. (2020): Structure and Function of the Human Ryanodine Receptors and Their Association with Myopathies-Present State, Challenges, and Perspectives. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (18). DOI: 10.3390/molecules25184040.
- Beckendorf, Jan; van den Hoogenhof, Maarten M. G.; Backs, Johannes (2018): Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. In: *Basic research in cardiology* 113 (4), S. 29. DOI: 10.1007/s00395-018-0688-8.
- Bennett, Pauline M. (2018): Riding the waves of the intercalated disc of the heart. In: *Biophysical reviews* 10 (4), S. 955–959. DOI: 10.1007/s12551-018-0438-z.

- Berlin, V.; Haseltine, W. A. (1981): Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. In: *The Journal of biological chemistry* 256 (10), S. 4747–4756.
- Bers, Donald M. (1993): Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Dordrecht: Springer Netherlands (122).
- Bers, Donald M. (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. In: *Nature* 415 (6868), S. 198–205. DOI: 10.1038/415198a.
- Bhattacharyya, Moitrayee; Karandur, Deepti; Kuriyan, John (2020): Structural Insights into the Regulation of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII). In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 12 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a035147.
- Bhullar, Sukhwinder K.; Dhalla, Naranjan S. (2022): Angiotensin II-Induced Signal Transduction Mechanisms for Cardiac Hypertrophy. In: *Cells* 11 (21). DOI: 10.3390/cells11213336.
- Birkeland, Jon Arne; Sejersted, Ole M.; Taraldsen, Tore; Sjaastad, Ivar (2005): EC-coupling in normal and failing hearts. In: *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* 39 (1-2), S. 13–23. DOI: 10.1080/14017430410004632.
- Bohdan, Michał; Kowalczyś, Anna; Mickiewicz, Agnieszka; Gruchała, Marcin; Lewicka, Ewa (2021): Cancer Therapy-Related Cardiovascular Complications in Clinical Practice: Current Perspectives. In: *Journal of clinical medicine* 10 (8). DOI: 10.3390/jcm10081647.
- Braun, A. P.; Schulman, H. (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. In: *Annual review of physiology* 57, S. 417–445. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002221.
- Brette, Fabien; Orchard, Clive (2003): T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. In: *Circulation research* 92 (11), S. 1182–1192. DOI: 10.1161/01.RES.0000074908.17214.FD.
- Brown, A. M.; Lee, K. S.; Powell, T. (1981): Sodium current in single rat heart muscle cells. In: *The Journal of physiology* 318, S. 479–500. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013879.
- Burgoyne, Joseph R.; Mongue-Din, Héloïse; Eaton, Philip; Shah, Ajay M. (2012): Redox signaling in cardiac physiology and pathology. In: *Circulation research* 111 (8), S. 1091–1106. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.255216.
- Cardinale, Daniela; Colombo, Alessandro; Bacchiani, Giulia; Tedeschi, Ines; Meroni, Carlo A.; Veglia, Fabrizio et al. (2015): Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. In: *Circulation* 131 (22), S. 1981–1988. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777.
- Chatterjee, Kanu; Zhang, Jianqing; Honbo, Norman; Karliner, Joel S. (2010): Doxorubicin cardiomyopathy. In: *Cardiology* 115 (2), S. 155–162. DOI: 10.1159/000265166.
- Chen, Bih-Cheng; Shibu, Marthandam Asokan; Kuo, Chia-Hua; Shen, Chia-Yao; Chang-Lee, Shu Nu; Lai, Chao-Hung et al. (2018): E4BP4 inhibits AngII-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts by activating the PI3K-Akt pathway and promoting calcium uptake. In: *Experimental cell research* 363 (2), S. 227–234. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.01.012.
- Colomer, Josep M.; Mao, Lan; Rockman, Howard A.; Means, Anthony R. (2003): Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 17 (2), S. 183–192. DOI: 10.1210/me.2002-0350.

- Colyer, J. (1993): Control of the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. A specific role for the pentameric structure of phospholamban? In: *Cardiovascular research* 27 (10), S. 1766–1771. DOI: 10.1093/cvr/27.10.1766.
- Desai, Varsha G.; Vijay, Vikrant; Han, Tao; Moland, Carrie L.; Phanavanh, Bounleut; Lee, Taewon et al. (2022): Doxorubicin-induced delayed-onset subclinical cardiotoxicity in mice. In: *Journal of applied toxicology : JAT* 42 (5), S. 778–792. DOI: 10.1002/jat.4256.
- Dewenter, Matthias; Neef, Stefan; Vettel, Christiane; Lämmle, Simon; Beushausen, Christina; Zelarayan, Laura C. et al. (2017): Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activity Persists During Chronic β -Adrenoceptor Blockade in Experimental and Human Heart Failure. In: *Circulation. Heart failure* 10 (5), e003840. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.003840.
- Doroshov, James H.; Esworthy, R. Steven; Chu, Fong-Fong (2020): Control of doxorubicin-induced, reactive oxygen-related apoptosis by glutathione peroxidase 1 in cardiac fibroblasts. In: *Biochemistry and Biophysics Reports* 21, S. 100709. DOI: 10.1016/j.bbrep.2019.100709.
- Dröge, Wulf (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. In: *Physiological reviews* 82 (1), S. 47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Duve, C. de; Baudhuin, P. (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). In: *Physiological reviews* 46 (2), S. 323–357. DOI: 10.1152/physrev.1966.46.2.323.
- Erickson, Jeffrey R.; Joiner, Mei-ling A.; Guan, Xiaoqun; Kutschke, William; Yang, Jinying; Oddis, Carmine V. et al. (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. In: *Cell* 133 (3), S. 462–474. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
- Erickson, Jeffrey R.; Pereira, Laetitia; Wang, Lianguo; Han, Guanghui; Ferguson, Amanda; Dao, Khanh et al. (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. In: *Nature* 502 (7471), S. 372–376. DOI: 10.1038/nature12537.
- Fabiato, A. (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. In: *The American journal of physiology* 245 (1), C1–14. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
- Flohé, Leopold (2013): The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. In: *Biochimica et biophysica acta* 1830 (5), S. 3139–3142. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.10.020.
- Freiwan, Marah; Kovács, Mónika G.; Kovács, Zsuzsanna Z. A.; Szűcs, Gergő; Dinh, Hoa; Losonczy, Réka et al. (2022): Investigation of the Antiremodeling Effects of Losartan, Mirabegron and Their Combination on the Development of Doxorubicin-Induced Chronic Cardiotoxicity in a Rat Model. In: *International journal of molecular sciences* 23 (4). DOI: 10.3390/ijms23042201.
- G. MALL (Hg.) (1993): *Ultrastruktur des Myokard*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gambardella, Jessica; Sorriento, Daniela; Ciccarelli, Michele; Del Giudice, Carmine; Fiordelisi, Antonella; Napolitano, Luigi et al. (2017): Functional Role of Mitochondria in Arrhythmogenesis. In: *Advances in experimental medicine and biology* 982, S. 191–202. DOI: 10.1007/978-3-319-55330-6_10.
- Gellens, M. E.; George, A. L.; Chen, L. Q.; Chahine, M.; Horn, R.; Barchi, R. L.; Kallen, R. G. (1992): Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (2), S. 554–558. DOI: 10.1073/pnas.89.2.554.

- Giantris, A.; Abdurrahman, L.; Hinkle, A.; Asselin, B.; Lipshultz, S. E. (1998): Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 27 (1), S. 53–68. DOI: 10.1016/s1040-8428(97)10007-5.
- Gill, J. S.; McKenna, W. J.; Camm, A. J. (1995): Free radicals irreversibly decrease Ca^{2+} currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. In: *European journal of pharmacology* 292 (3-4), S. 337–340. DOI: 10.1016/0926-6917(95)90042-X.
- Gomes, Aldrin V.; Potter, James D.; Szczesna-Cordary, Danuta (2002): The role of troponins in muscle contraction. In: *IUBMB life* 54 (6), S. 323–333. DOI: 10.1080/15216540216037.
- Gray, Stephen P.; Shah, Ajay M.; Smyrniak, Ioannis (2019): NADPH oxidase 4 and its role in the cardiovascular system. In: *Vascular biology (Bristol, England)* 1 (1), H59-H66. DOI: 10.1530/VB-19-0014.
- Grenier, M. A.; Lipshultz, S. E. (1998): Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. In: *Seminars in oncology* 25 (4 Suppl 10), S. 72–85.
- Grimm, Michael; Brown, Joan Heller (2010): Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (2), S. 322–330. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.10.016.
- Grueter, Chad E.; Abiria, Sunday A.; Dzhura, Igor; Wu, Yuejin; Ham, Amy-Joan L.; Mohler, Peter J. et al. (2006): L-type Ca^{2+} channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. In: *Molecular cell* 23 (5), S. 641–650. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.07.006.
- Halliwell, Barry (2005): Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences: Wiley*, S. 1–9.
- Hallman, Briana E.; Hauck, Marlene L.; Williams, Laurel E.; Hess, Paul R.; Suter, Steven E. (2019): Incidence and risk factors associated with development of clinical cardiotoxicity in dogs receiving doxorubicin. In: *Journal of veterinary internal medicine* 33 (2), S. 783–791. DOI: 10.1111/jvim.15414.
- Hanna, Amy D.; Lam, Alex; Tham, Steffi; Dulhunty, Angela F.; Beard, Nicole A. (2014): Adverse Effects of Doxorubicin and Its Metabolic Product on Cardiac RyR2 and SERCA2A. In: *Molecular Pharmacology* 86 (4), S. 438–449. DOI: 10.1124/mol.114.093849.
- Henning, Robert J.; Harbison, Raymond D. (2017): Cardio-oncology: cardiovascular complications of cancer therapy. In: *Future cardiology* 13 (4), S. 379–396. DOI: 10.2217/fca-2016-0081.
- Herzog, Walter; Schappacher-Tilp, Gudrun (2023): Molecular mechanisms of muscle contraction: A historical perspective. In: *Journal of biomechanics* 155, S. 111659. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2023.111659.
- Hoff, D. D. von; Layard, M. W.; Basa, P.; Davis, H. L.; Hoff, A. L. von; Rozenzweig, M.; Muggia, F. M. (1979): Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. In: *Annals of internal medicine* 91 (5), S. 710–717. DOI: 10.7326/0003-4819-91-5-710.
- Hund, Thomas J.; Decker, Keith F.; Kanter, Evelyn; Mohler, Peter J.; Boyden, Penelope A.; Schuessler, Richard B. et al. (2008): Role of activated CaMKII in abnormal calcium homeostasis and $\text{I}(\text{Na})$ remodeling after myocardial infarction: insights from mathematical modeling. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 45 (3), S. 420–428. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.06.007.
- Hund, Thomas J.; Koval, Olha M.; Li, Jingdong; Wright, Patrick J.; Qian, Lan; Snyder, Jedidiah S. et al. (2010): A $\beta(\text{IV})$ -spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane

- excitability in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (10), S. 3508–3519. DOI: 10.1172/JCI43621.
- Hunter, Tony; Schulman, Howard (2005): CaMKII structure--an elegant design. In: *Cell* 123 (5), S. 765–767. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.017.
- Huxley, H. E. (1969): The mechanism of muscular contraction. In: *Science (New York, N.Y.)* 164 (3886), S. 1356–1365. DOI: 10.1126/science.164.3886.1356.
- HUXLEY, A. F.; NIEDERGERKE, R. (1954): Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. In: *Nature* 173 (4412), S. 971–973. DOI: 10.1038/173971a0.
- Jia, Guanghong; Aroor, Annayya R.; Hill, Michael A.; Sowers, James R. (2018): Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Activation in Promoting Cardiovascular Fibrosis and Stiffness. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 72 (3), S. 537–548. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11065.
- Kang, Y. J.; Chen, Y.; Epstein, P. N. (1996): Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (21), S. 12610–12616. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12610.
- Kim, Hyeon A.; Kim, Kwan Chang; Lee, Hyeryon; Hong, Young Mi (2023): Losartan Reduces Remodeling and Apoptosis in an Adriamycin-Induced Cardiomyopathy Rat Model. In: *Journal of chest surgery* 56 (5), S. 295–303. DOI: 10.5090/jcs.23.044.
- Kim, Taehoon; Lee, Jinhyuk; Im, Wonpil (2009): Molecular dynamics studies on structure and dynamics of phospholamban monomer and pentamer in membranes. In: *Proteins* 76 (1), S. 86–98. DOI: 10.1002/prot.22322.
- Kockskämper, Jens (2016): Excitation–Contraction Coupling of Cardiomyocytes. In: Klaus-Dieter Schlüter (Hg.): *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease*. Cham: Springer International Publishing, S. 67–96.
- Kohen, Ron; Nyska, Abraham (2002): Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. In: *Toxicologic pathology* 30 (6), S. 620–650. DOI: 10.1080/01926230290166724.
- Köhler, Anne C.; Sag, Can M.; Maier, Lars S. (2014): Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 73, S. 92–102. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.001.
- Kong, Chun-Yan; Guo, Zhen; Song, Peng; Zhang, Xin; Yuan, Yu-Pei; Teng, Teng et al. (2022): Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. In: *International journal of biological sciences* 18 (2), S. 760–770. DOI: 10.7150/ijbs.65258.
- Koval, Olha M.; Guan, Xiaoquan; Wu, Yuejin; Joiner, Mei-Ling; Gao, Zhan; Chen, Biyi et al. (2010): CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11), S. 4996–5000. DOI: 10.1073/pnas.0913760107.
- Kreusser, Michael M.; Lehmann, Lorenz H.; Keranov, Stanislav; Hoting, Marc-Oscar; Oehl, Ulrike; Kohlhaas, Michael; Reil, Jan-Christian; Neumann, Kay; Schneider, Michael D.; Hill, Joseph A.; Dobrev, Dobromir; Maack, Christoph; Maier, Lars S.; Gröne, Hermann-Josef; Katus, Hugo A.; Olson, Eric N.; Backs, Johannes (2014): Cardiac CaM Kinase II genes δ and γ contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy. In: *Circulation*, S. 1262–1273. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006185

- Krischer, J. P.; Epstein, S.; Cuthbertson, D. D.; Goorin, A. M.; Epstein, M. L.; Lipshultz, S. E. (1997): Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15 (4), S. 1544–1552. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.4.1544.
- Kushnir, Alexander; Wajsberg, Benjamin; Marks, Andrew R. (2018): Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1865 (11 Pt B), S. 1687–1697. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.011.
- Lanner, Johanna T. (2012): Ryanodine receptor physiology and its role in disease. In: *Advances in experimental medicine and biology* 740, S. 217–234. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2_9.
- Lassègue, Bernard; San Martín, Alejandra; Griendling, Kathy K. (2012): Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. In: *Circulation research* 110 (10), S. 1364–1390. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243972.
- Lee, Jooyeon; Jang, Jimin; Park, Sung-Min; Yang, Se-Ran (2021): An Update on the Role of Nrf2 in Respiratory Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. In: *International journal of molecular sciences* 22 (16). DOI: 10.3390/ijms22168406.
- Lipshultz, Steven E.; Alvarez, Jorge A.; Scully, Rebecca E. (2008): Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. In: *Heart (British Cardiac Society)* 94 (4), S. 525–533. DOI: 10.1136/hrt.2007.136093.
- Llach, Anna; Mazevet, Marianne; Mateo, Philippe; Villejouvert, Olivier; Ridoux, Audrey; Rucker-Martin, C. et al. (2019): Progression of excitation-contraction coupling defects in doxorubicin cardiotoxicity. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 126, S. 129–139. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.11.019.
- Lohse, Martin J.; Engelhardt, Stefan; Eschenhagen, Thomas (2003): What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? In: *Circulation research* 93 (10), S. 896–906. DOI: 10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA.
- Lyon, Alexander R.; López-Fernández, Teresa; Couch, Liam S.; Asteggiano, Riccardo; Aznar, Marianne C.; Bergler-Klein, Jutta et al. (2022): 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). In: *European heart journal* 43 (41), S. 4229–4361. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac244.
- Ma, Zhen-Guo; Kong, Chun-Yan; Wu, Hai-Ming; Song, Peng; Zhang, Xin; Yuan, Yu-Pei et al. (2020): Toll-like receptor 5 deficiency diminishes doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in mice. In: *Theranostics* 10 (24), S. 11013–11025. DOI: 10.7150/thno.47516.
- Maier, Lars S.; Bers, Donald M. (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 34 (8), S. 919–939. DOI: 10.1006/jmcc.2002.2038.
- Maier, Lars S.; Bers, Donald M. (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. In: *Cardiovascular research* 73 (4), S. 631–640. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.005.

- Manring, Heather R.; Dorn, Lisa E.; Ex-Willey, Aidan; Accornero, Federica; Ackermann, Maegen A. (2018): At the heart of inter- and intracellular signaling: the intercalated disc. In: *Biophysical reviews* 10 (4), S. 961–971. DOI: 10.1007/s12551-018-0430-7.
- Marty, Isabelle (2015): Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. In: *The Journal of physiology* 593 (15), S. 3261–3266. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.281147.
- Marx, S. O.; Reiken, S.; Hisamatsu, Y.; Jayaraman, T.; Burkhoff, D.; Rosemblyt, N.; Marks, A. R. (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. In: *Cell* 101 (4), S. 365–376. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8.
- Mattioli, Roberto; Ilari, Andrea; Colotti, Beatrice; Mosca, Luciana; Fazi, Francesco; Colotti, Gianni (2023): Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. In: *Molecular aspects of medicine* 93, S. 101205. DOI: 10.1016/j.mam.2023.101205.
- McGowan, John V.; Chung, Robin; Maulik, Angshuman; Piotrowska, Izabela; Walker, J. Malcolm; Yellon, Derek M. (2017): Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. In: *Cardiovascular drugs and therapy* 31 (1), S. 63–75. DOI: 10.1007/s10557-016-6711-0.
- Micallef I, Baron B. (2020): Doxorubicin: An Overview of the Anti-Cancer and Chemoresistance Mechanisms.
- Murphy, A. J. (1976): Sulfhydryl group modification of sarcoplasmic reticulum membranes. In: *Biochemistry* 15 (20), S. 4492–4496. DOI: 10.1021/bi00665a025.
- National Academies Press (US) (2011): Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th. Washington (DC).
- Nazari, Bahareh; Jaquet, Vincent; Krause, Karl-Heinz (2023): NOX family NADPH oxidases in mammals: Evolutionary conservation and isoform-defining sequences. In: *Redox biology* 66, S. 102851. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102851.
- Neef, Stefan; Dybkova, Nataliya; Sossalla, Samuel; Ort, Katharina R.; Fluschnik, Nina; Neumann, Kay et al. (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. In: *Circulation research* 106 (6), S. 1134–1144. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.203836.
- Nguyen Dinh Cat, Aurelie; Montezano, Augusto C.; Burger, Dylan; Touyz, Rhian M. (2013): Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. In: *Antioxidants & redox signaling* 19 (10), S. 1110–1120. DOI: 10.1089/ars.2012.4641.
- Novotney, C. A.; Page, R. L.; Macy, D. W.; Dewhirst, M. W.; Ogilvie, G. K.; Withrow, S. J. et al. (1992): Phase I evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. In: *Journal of veterinary internal medicine* 6 (4), S. 245–249. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1992.tb00346.x.
- Olson, Richard D.; Gambliel, Hervé A.; Vestal, Robert E.; Shadle, Susan E.; Charlier, Henry A.; Cusack, Barry J. (2005): Doxorubicin cardiac dysfunction: effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine. In: *Cardiovascular toxicology* 5 (3), S. 269–283. DOI: 10.1385/ct:5:3:269.
- Palmer, R. M.; Rees, D. D.; Ashton, D. S.; Moncada, S. (1988): L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 153 (3), S. 1251–1256. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)81362-7.

- Phaniendra, Alugoju; Jestadi, Dinesh Babu; Periyasamy, Latha (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. In: *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 30 (1), S. 11–26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Prestle, J.; Quinn, F. R.; Smith, G. L. (2003): Ca(2+)-handling proteins and heart failure: novel molecular targets? In: *Current medicinal chemistry* 10 (11), S. 967–981. DOI: 10.2174/0929867033457656.
- Rawat, Pushkar Singh; Jaiswal, Aiswarya; Khurana, Amit; Bhatti, Jasvinder Singh; Navik, Umashanker (2021): Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 139, S. 111708. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111708.
- Renu, Kaviyarasi; V G, Abilash; P B, Tirupathi Pichiah; Arunachalam, Sankarganesh (2018): Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. In: *European journal of pharmacology* 818, S. 241–253. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.
- Respress, Jonathan L.; van Oort, Ralph J.; Li, Na; Rolim, Natale; Dixit, Sayali S.; deAlmeida, Angela et al. (2012): Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. In: *Circulation research* 110 (11), S. 1474–1483. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268094.
- Romero, Atocha; Caldés, Trinidad; Díaz-Rubio, Eduardo; Martín, Miguel (2012): Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy? In: *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 14 (3), S. 163–168. DOI: 10.1007/s12094-012-0779-1.
- Sag, Can M.; Köhler, Anne C.; Anderson, Mark E.; Backs, Johannes; Maier, Lars S. (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 51 (5), S. 749–759. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.016.
- Sag, Can M.; Wagner, Stefan; Maier, Lars S. (2013): Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. In: *Free radical biology & medicine* 63, S. 338–349. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.035.
- Sag, Can M.; Wadsack, Daniel P.; Khabbazzadeh, Sepideh; Abesser, Marco; Grefe, Clemens; Neumann, Kay; Opiela, Marie-Kristin; Backs, Johannes; Olson, Eric N.; Brown, Joan Heller; Neef, Stefan; Maier, Sebastian G. K.; Maier, Lars S. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. In: *Circulation Heart Failure*, S. 664–75. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.865279.
- Saleem, Tabinda; Kasi, Anup (2023): StatPearls. Daunorubicin. Treasure Island (FL).
- Schieber, Michael; Chandel, Navdeep S. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. In: *Current biology : CB* 24 (10), R453–62. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Schlüter, Klaus-Dieter (Hg.) (2016): *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease*. Cham: Springer International Publishing.
- Schnee, J. M.; Hsueh, W. A. (2000): Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. In: *Cardiovascular research* 46 (2), S. 264–268. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00044-4.
- Sheikh, Farah; Ross, Robert S.; Chen, Ju (2009): Cell-cell connection to cardiac disease. In: *Trends in cardiovascular medicine* 19 (6), S. 182–190. DOI: 10.1016/j.tcm.2009.12.001.

- Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Wagle, Nikita Sandeep; Jemal, Ahmedin (2023): Cancer statistics, 2023. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 73 (1), S. 17–48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- Simmerman, H. K.; Collins, J. H.; Theibert, J. L.; Wegener, A. D.; Jones, L. R. (1986): Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (28), S. 13333–13341. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)69309-3.
- Simmerman, H. K.; Jones, L. R. (1998): Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. In: *Physiological reviews* 78 (4), S. 921–947. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.4.921.
- Speyer, J. L.; Green, M. D.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Wernz, J. C.; Rey, M.; Sanger, J. et al. (1992): ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 10 (1), S. 117–127. DOI: 10.1200/JCO.1992.10.1.117.
- Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5090), S. 1898–1902. DOI: 10.1126/science.1281928.
- Strack, S.; Barban, M. A.; Wadzinski, B. E.; Colbran, R. J. (1997): Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. In: *Journal of neurochemistry* 68 (5), S. 2119–2128. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.68052119.x.
- Swain, Sandra M.; Whaley, Fredrick S.; Ewer, Michael S. (2003): Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. In: *Cancer* 97 (11), S. 2869–2879. DOI: 10.1002/cncr.11407.
- Sweeney, H. Lee; Hammers, David W. (2018): Muscle Contraction. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a023200.
- Tadokoro, Tomonori; Ikeda, Masataka; Ide, Tomomi; Deguchi, Hiroko; Ikeda, Soichiro; Okabe, Kosuke et al. (2020): Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. In: *JCI insight* 5 (9). DOI: 10.1172/jci.insight.132747.
- Takemura, Genzou; Fujiwara, Hisayoshi (2007): Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. In: *Progress in cardiovascular diseases* 49 (5), S. 330–352. DOI: 10.1016/j.pcad.2006.10.002.
- Takla, Michael; Huang, Christopher L-H; Jeevaratnam, Kamalan (2020): The cardiac CaMKII-Nav1.5 relationship: From physiology to pathology. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 139, S. 190–200. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.12.014.
- Telesca, Marialucia; Donniacuo, Maria; Bellocchio, Gabriella; Riemma, Maria Antonietta; Mele, Elena; Dell'Aversana, Carmela et al. (2023): Initial Phase of Anthracycline Cardiotoxicity Involves Cardiac Fibroblasts Activation and Metabolic Switch. In: *Cancers* 16 (1). DOI: 10.3390/cancers16010053.
- Toyoshima, Chikashi; Nomura, Hiromi (2002): Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. In: *Nature* 418 (6898), S. 605–611. DOI: 10.1038/nature00944.
- Valko, Marian; Leibfritz, Dieter; Moncol, Jan; Cronin, Mark T. D.; Mazur, Milan; Telser, Joshua (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (1), S. 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

- van Oort, Ralph J.; McCauley, Mark D.; Dixit, Sayali S.; Pereira, Laetitia; Yang, Yi; Respress, Jonathan L. et al. (2010): Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. In: *Circulation* 122 (25), S. 2669–2679. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982298.
- Volkova, Maria; Russell, Raymond (2011): Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. In: *Current cardiology reviews* 7 (4), S. 214–220. DOI: 10.2174/157340311799960645.
- Wagner, Stefan; Dantz, Christian; Flebbe, Hannah; Azizian, Azadeh; Sag, Can Martin; Engels, Susanne et al. (2014): NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 75, S. 206–215. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.07.011.
- Wang, Qinchuan; Hernández-Ochoa, Erick O.; Viswanathan, Meera C.; Blum, Ian D.; Do, Danh C.; Granger, Jonathan M. et al. (2021): CaMKII oxidation is a critical performance/disease trade-off acquired at the dawn of vertebrate evolution. In: *Nature communications* 12 (1), S. 3175. DOI: 10.1038/s41467-021-23549-3.
- Wehrens, Xander H. T.; Lehnart, Stephan E.; Reiken, Steven R.; Marks, Andrew R. (2004): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. In: *Circulation research* 94 (6), e61-70. DOI: 10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2.
- Wu, Yuejin; Temple, Joel; Zhang, Rong; Dzhura, Igor; Zhang, Wei; Trimble, Robert et al. (2002): Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. In: *Circulation* 106 (10), S. 1288–1293. DOI: 10.1161/01.cir.0000027583.73268.e7.
- Wuytack, F.; Raeymaekers, L.; Missiaen, L. (2002): Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. In: *Cell calcium* 32 (5-6), S. 279–305. DOI: 10.1016/S0143416002001847.
- Xiao, Yun-Fei; Zeng, Zhi-Xiong; Guan, Xiao-Hui; Wang, Ling-Fang; Wang, Chan-Juan; Shi, Huidong et al. (2018): FKBP12.6 protects heart from AngII-induced hypertrophy through inhibiting Ca²⁺ /calmodulin-mediated signalling pathways in vivo and in vitro. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 22 (7), S. 3638–3651. DOI: 10.1111/jcmm.13645.
- Xiong, Ye; Liu, Xuwan; Lee, Chuan-Pu; Chua, Balvin H. L.; Ho, Ye-Shih (2006): Attenuation of doxorubicin-induced contractile and mitochondrial dysfunction in mouse heart by cellular glutathione peroxidase. In: *Free radical biology & medicine* 41 (1), S. 46–55. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.024.
- Xu, L.; Eu, J. P.; Meissner, G.; Stamler, J. S. (1998): Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5348), S. 234–237. DOI: 10.1126/science.279.5348.234.
- Yeh, Edward T. H.; Bickford, Courtney L. (2009): Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. In: *Journal of the American College of Cardiology* 53 (24), S. 2231–2247. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.02.050.
- Yen, H. C.; Oberley, T. D.; Gairola, C. G.; Szweda, L. I.; St Clair, D. K. (1999): Manganese superoxide dismutase protects mitochondrial complex I against adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 362 (1), S. 59–66. DOI: 10.1006/abbi.1998.1011.
- Yen, H. C.; Oberley, T. D.; Vichitbandha, S.; Ho, Y. S.; St Clair, D. K. (1996): The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity

- in transgenic mice. In: *The Journal of clinical investigation* 98 (5), S. 1253–1260. DOI: 10.1172/JCI118909.
- Zable, A. C.; Favero, T. G.; Abramson, J. J. (1997): Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca^{2+} release mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (11), S. 7069–7077. DOI: 10.1074/jbc.272.11.7069.
- Zahradník, Ivan; Györke, Sándor; Zahradníková, Alexandra (2005): Calcium activation of ryanodine receptor channels--reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure. In: *The Journal of general physiology* 126 (5), S. 515–527. DOI: 10.1085/jgp.200509328.
- Zerikiotis, Stelios; Angelidis, Charalampos; Dhima, Irida; Naka, Katerina K.; Kasioumi, Panagiota; Kalfakakou, Vasiliki et al. (2019): The increased expression of the inducible Hsp70 (HSP70A1A) in serum of patients with heart failure and its protective effect against the cardiotoxic agent doxorubicin. In: *Molecular and cellular biochemistry* 455 (1-2), S. 41–59. DOI: 10.1007/s11010-018-3469-7.
- Zhang, Lei; Liu, Huan-Huan; Yang, Fan; Zhang, Zhi-Yuan; Zhang, Zhen-Ye; Zhao, Xiao-Xi et al. (2023): Glucose fluctuations aggravate myocardial fibrosis via activating the CaMKII/Stat3 signaling in type 2 diabetes. In: *Diabetology & metabolic syndrome* 15 (1), S. 217. DOI: 10.1186/s13098-023-01197-5.
- Zhang, Ruihong; Zhu, Jie; Sun, Dan; Li, Jie; Yao, Lina; Meng, Shuangshuang et al. (2022): The Mechanism of Dynamic Interaction between Doxorubicin and Calf Thymus DNA at the Single-Molecule Level Based on Confocal Raman Spectroscopy. In: *Micromachines* 13 (6). DOI: 10.3390/mi13060940.
- Zhang, Sui; Liu, Xiaobing; Bawa-Khalife, Tasneem; Lu, Long-Sheng; Lyu, Yi Lisa; Liu, Leroy F.; Yeh, Edward T. H. (2012): Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. In: *Nature medicine* 18 (11), S. 1639–1642. DOI: 10.1038/nm.2919.
- Zhao, Youyou; McLaughlin, Declan; Robinson, Emma; Harvey, Adam P.; Hookham, Michelle B.; Shah, Ajay M. et al. (2010): Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. In: *Cancer research* 70 (22), S. 9287–9297. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2664.
- Zheng, Hui; Xu, Nannan; Zhang, Zihao; Wang, Fen; Xiao, Jie; Ji, Xiaoping (2022): Setanaxib (GKT137831) Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting the NOX1/NOX4/Reactive Oxygen Species/MAPK Pathway. In: *Frontiers in pharmacology* 13, S. 823975. DOI: 10.3389/fphar.2022.823975.
- Zhihao, Liu; Jingyu, Ni; Lan, Li; Michael, Sarhene; Rui, Guo; Xiyun, Bian et al. (2020): SERCA2a: a key protein in the Ca^{2+} cycle of the heart failure. In: *Heart failure reviews* 25 (3), S. 523–535. DOI: 10.1007/s10741-019-09873-3.

7 Abkürzungsverzeichnis

AIP: autocamtide-2-related inhibitory peptide

AngII: Angiotensin II

β -ME: β -Mercaptoethanol

CaMKII: Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

CaMKII $\delta^{+/+}$: Wildtyp-Mäuse, Geschwistertiere der CaMKII $\delta^{-/-}$ Linie

CaMKII $\delta^{-/-}$: Mauslinie mit genetischer CaMKII δ Deletion

CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$: Wildtyp-Mäuse, Geschwistertiere der CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ Linie

CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$: Mauslinie mit redox-toter CaMKII δ

CaSpF: Ca^{2+} -Sparkfrequenz

CO: Herzzeitvolumen

oxCaMKII: oxidativ-aktivierte CaMKII

DICM: Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie

DOX: Doxorubicin

EAD: frühe Nachdepolarisation

ETC: Elektronentransportkette

EZM: Extrazelluläre Matrix

FKBP12.6: FK506-bindendes Protein

FS: fraktionelle Verkürzung

GPx: Glutathionperoxidase

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathiondisulfid

H_2O_2 : Wasserstoffperoxid

$\text{HO}\cdot$: Hydroxylradikal

HOCL: Hypochlorsäure

HR: Herzfrequenz

HRP: Meerrettich-Peroxidase

I_{Ca} : transienter Ca^{2+} -Einwärtsstrom

IVSd: end-diastolisches interventrikuläres Septum

IVSs: end-systolisches interventrikuläres Septum
KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1
LOS: Losartan
LTCC: L-Typ- Ca^{2+} -Kanal
LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD: linksventrikulärer end-diastolischer Durchmesser
LVEDV: linksventrikuläres end-diastolische Volumen
LVESD: linksventrikulärer end-systolischer Durchmesser
LVESV: linksventrikuläres end-systolisches Volumen
MEF2: myocyte enhancer factor 2
MMP: Matrix-Metalloproteinase
NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NO $\cdot$: Stickstoffmonoxidradikal
NOS: Stickstoffmonoxidsynthetase
NOX: NADPH-Oxidase
Nrf2: nuclear factor erythroid-related factor 2
 O_2^- : Superoxidanion
ONOO $\cdot$: Peroxynitritanion
PLB: Phospholamban
PKA: Proteinkinase A
PP: Protein-Phosphatase
PWThd: linksventrikuläre end-diastolische posteriore Wand
PWThs: linksventrikuläre end-systolische posteriore Wand
RO $\cdot$: Alkylradikal
ROO $\cdot$: Peroxylradikal
ROS: reaktive Sauerstoffspezies
RT: Raumtemperatur
RyR: Ryanodin-Rezeptor
SERCA: SR- Ca^{2+} -ATPase
SOD: Superoxid-Dismutase

SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

SV: Schlagvolumen

TnC: Ca^{2+} -bindendes Troponin C

TnI: inhibitorisches Troponin I

TnT: Tropomyosin-bindendes Troponin T

Top2: Topoisomerase II

T-Tubuli: Transversaltubuli

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Struktur von Doxorubicin -----	2
Abbildung 2 Die Reduktion von Doxorubicin zum instabilen Doxorubicin-Semiquinon -----	3
Abbildung 3 Die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität -----	4
Abbildung 4 Die Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten -----	6
Abbildung 5 Der schematische Aufbau des Sarkomers -----	8
Abbildung 6 Die elektromechanische Kopplung -----	10
Abbildung 7 Die SERCA2a-abhängige SR Ca^{2+} -Aufnahme -----	12
Abbildung 8 Die Phospholamban-abhängige Regulation der SERCA2a-Aktivität -----	13
Abbildung 9 Struktur des Ryanodin-Rezeptors und Induktion des SR Ca^{2+} -Lecks -----	15
Abbildung 10 Aufbau und Aktivierung der CaMKII -----	17
Abbildung 11 Zielsetzungen der vorliegenden Promotionsarbeit -----	24
Abbildung 12 Verwendete Mausmodelle -----	25
Abbildung 13 Versuchsmodell zur Untersuchung der akuten DICM -----	26
Abbildung 14 Das Versuchsmodell zur Untersuchung der chronischen DICM -----	27
Abbildung 15 Kleintierechokardiographie -----	28
Abbildung 16 Retrograde Perfusion des isolierten Herzens -----	29
Abbildung 17 Detektion des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes mittels des ratiometrischen Farbstoffes Fura2-AM -----	31
Abbildung 18 Fluoreszenzspektrum von Fura2 -----	32
Abbildung 19 Auswertung der Ca^{2+} -Transienten -----	35
Abbildung 20 Vereinfachte Darstellung des Epifluoreszenzmikroskops zur Untersuchung des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes -----	36
Abbildung 21 Fluoreszenzspektrum von Fluo4-AM -----	37
Abbildung 22 Die Ermittlung spontaner diastolischer Ca^{2+} -Freisetzungen mittels Fluo4-AM -----	38
Abbildung 23 Schematische Darstellung des konfokalen Lasermikroskops -----	40
Abbildung 24 Beispielmessung eines Line-Scans eines Fluo4-AM beladenen Kardiomyozyten -----	40
Abbildung 25 Fluoreszenzspektrum von CellRox Orange -----	41
Abbildung 26 Bearbeitung der CellRox Orange Aufnahmen -----	43
Abbildung 27 Durchführung der Masson-Trichrom-Färbung zur Ermittlung der kardialen Fibrose -----	44
Abbildung 28 Durchführung der WGA-Färbung -----	46
Abbildung 29 Fluoreszenzspektren von Hoechst und Alexa Fluor 594 -----	47
Abbildung 30 Schrittweises Prozessieren der WGA-gefärbten Gewebeschnitte mittels eines Makros -----	48
Abbildung 31 Schrittweises Prozessieren der Isolektin B4-gefärbten Gewebeschnitte mittels eines Makros -----	49
Abbildung 32 Vorbereitung der Proben für den Western Blot -----	51
Abbildung 33 Ablauf des Western Blots -----	52
Abbildung 34 CaMKII δ -abhängige Ca^{2+} -Dysregulationen unter akuter DOX-Exposition -----	59
Abbildung 35 CaMKII δ -abhängige SR Ca^{2+} -Depletion -----	60
Abbildung 36 CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks unter akuter DOX-Exposition -----	61

Abbildung 37 CaMKII δ -abhängige RyR2-Hyperphosphorylierung unter akuter DOX-Exposition-----	63
Abbildung 38 Kennzeichnung des DOX-induzierten Phänotypen durch fehlende Körpergewichtszunahme -----	66
Abbildung 39 Reduktion des kumulativen Gesamtüberlebens als Charakteristikum des DICM-Phänotyps -----	67
Abbildung 40 Verminderung der DOX-induzierten Beeinträchtigung der LV-Funktion in CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen-----	71
Abbildung 41 Verhinderung der DOX-induzierten Fibrose in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen-----	74
Abbildung 42 Verhinderung der DOX-induzierten zellulären Atrophie in CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen -----	75
Abbildung 43 Originalaufnahmen der DAPI-, WGA-, Isolektin B4-gefärbten Myokardschnitte -----	76
Abbildung 44 CaMKII δ -abhängige Verminderung systolischer Ca $^{2+}$ -Transientenamplituden und Relaxationsverlangsamung unter chronischer DOX-Behandlung-----	79
Abbildung 45 CaMKII δ -abhängige Induktion der DOX-bedingten SR Ca $^{2+}$ -Depletion-----	80
Abbildung 46 CaMKII δ -abhängige Induktion des diastolischen SR Ca $^{2+}$ -Lecks unter chronischer DOX-Behandlung-----	81
Abbildung 47 Verhinderung der DOX-induzierten CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung durch CaMKII δ -Deletion -----	83
Abbildung 48 Verhinderung der DOX-induzierten zytoplasmatischen ROS-Formation durch CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse-----	85
Abbildung 49 Abschwächung der DOX-induzierten LVEF-Abnahme unter LOS-Behandlung -----	88
Abbildung 50 Verhinderung der DOX-induzierten myokardialen Fibrosierung unter LOS---	90
Abbildung 51 Verhinderung der DOX-induzierten CaMKII δ -abhängigen RyR2-Hyperphosphorylierung unter LOS -----	92
Abbildung 52 Verhinderung der DOX-induzierten SR Ca $^{2+}$ -Depletion und konsekutiver Verminderung systolischer Ca $^{2+}$ -Transientenamplituden unter LOS -----	93
Abbildung 53 Verhinderung des DOX-induzierten diastolischen SR Ca $^{2+}$ -Lecks unter genetischer CaMKII δ -Deletion -----	103

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Isolationslösung-----	30
Tabelle 2 Fura2-AM Farbstofflösung-----	33
Tabelle 3 Messtyrode -----	34
Tabelle 4 Fluo4-AM Farbstofflösung-----	39
Tabelle 5 CellRox Orange Farbstofflösung-----	42
Tabelle 6 Lysepuffer -----	51
Tabelle 7 Laufpuffer -----	53
Tabelle 8 Transferpuffer -----	54
Tabelle 9 Ponceau S-----	54
Tabelle 10 Waschpuffer TBS-T -----	54
Tabelle 11 Primärantikörper -----	55
Tabelle 12 Sekundärantikörper -----	56
Tabelle 13 Normierte Proteinexpression in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Kardiomyozyten -----	64
Tabelle 14 Erhobene echokardiographische Parameter zur Beurteilung der LV-Funktion ----	72
Tabelle 15 Normierte Proteinexpression in CaMKII $\delta^{\text{Met281/282}}$, CaMKII $\delta^{\text{Val281/282}}$, CaMKII $\delta^{+/+}$ und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen -----	83
Tabelle 16 Erhobene echokardiographische Parameter zur Beurteilung der LV-Funktion ----	89

10 Publikationsverzeichnis

Feder AL, Pion E, Troebis J, Lenze U, Prantl L, Htwe MM, Phyo A, Haerteis S, Aung T. Extended analysis of intratumoral heterogeneity of primary osteosarcoma tissue using 3D-in-vivo-tumor-model. Clin Hemorheol Microcirc. (2020)

Pion E, Asam C, **Feder AL**, Felthaus O, Heidekrueger PI, Prantl L, Haerteis S, Aung T. Laser speckle contrast analysis (LASCA) technology for the semiquantitative measurement of angiogenesis in in-ovotumor-model. Microvasc Res. (2020)

Zucal I, **Feder AL**, Kyaw T, Khin S, Heidekrueger P, Prantl L, Haerteis S, Aung T. An innovative simulation model for microvascular training. Plastic and Reconstructive Surgery. (2022) (**geteilte Erstautorenschaft**)

Pion E, Zucal I, Troebis J, **Feder AL**, Kyaw T, Khin S, Heidekrueger PI, Prantl L, Haerteis S, Aung T. New, Innovative 3D-in-vivo-Model for High-level Microsurgical and Supramicrosurgical Training - A Replacement for Animal Models. Plastic and Reconstructive Surgery (2022)

Tarnowski D, **Feder AL**, Trum M, Kreitmeier KG, Stengel L, Maier LS, Sag CM. Ibrutinib impairs IGF-1-dependent activation of intracellular Ca handling in isolated mouse ventricular myocytes. Frontiers in Cardiovascular Medicine (2023)

Gissibl T, Stengel L, Tarnowski D, Maier LS, Wagner S, **Feder AL**, Sag CM. The inotropic and arrhythmogenic effect of acutely increased late I_{Na} is associated with elevated ROS, but does not involve oxidation of PKAR1 α . Frontiers in Cardiovascular Medicine (2024, in press) (**geteilte Letztautorenschaft**)

11 Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater, **Prof. Dr. Lars Maier**, für die Unterstützung meiner Laufbahn in der kardiologischen Grundlagenforschung. Im Rahmen eines Vortrages von Prof. Dr. Lars Maier konnte meine persönliche Leidenschaft für die kardiologische Grundlagenforschung geweckt werden, welche er im Rahmen der Betreuung meiner Masterarbeit und Promotion stets unterstützte. Für diese konstante Unterstützung meiner Abschlussarbeiten, sowie meiner wissenschaftlichen Laufbahn (z.B. durch die Ermöglichung der Teilnahme an verschiedensten Kongressen) bin ich meinem Doktorvater sehr dankbar.

Ebenfalls großer Dank gilt **Prof. Dr. Can Martin Sag**, welcher mich nicht nur stetig unterstützte im Vorankommen meiner Promotion, sondern auch stets als wissenschaftliches, sowie persönliches Vorbild eines kardio-onkologischen Grundlagenforschers und Gruppenleiters diente. Ich bewundere die Fähigkeit von Prof. Dr. Can Martin Sag die persönliche Entwicklung jedes Mitarbeiters voranzutreiben und stets ein offenes Ohr bei Problemen/Anliegen zu besitzen bzw. Probleme konstruktiv zu überarbeiten. Ich bin Prof. Dr. Can Martin Sag darüber hinaus überaus dankbar, dass er mir die Möglichkeit gab, kardio-, sowie onkologische Forschung zu verbinden, und im Rahmen der Promotion nicht nur einer beruflichen Tätigkeit nachzugehen, sondern aus Leidenschaft arbeiten zu können. Ich schätze meine berufliche Tätigkeit in der Arbeitsgruppe sehr und hoffe hier noch lange Erfahrungen zu gewinnen und Teil dieses Teams zu sein.

Weiterhin möchte ich **Dr. Daniel Tarnowski** dafür danken, dass er mich nicht nur neben seiner Tätigkeit als Kardiologe bei Durchführung der kleintierechokardiographischen Untersuchungen stetig unterstützt hat, sondern stets auch mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand, wenn Probleme auftraten. Ich danke Dr. Daniel Tarnowski außerdem für sein unermüdliches Engagement zur Bewilligung weiterer Tierversuchsanträge, ohne welcher mein weiterer beruflicher Werdegang sicherlich in Zukunft erschwert werden würde.

Ebenfalls großer Dank gilt den **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** von Prof. Dr. Lars Maier, die mich seit dem ersten Praktikumstag im Zuge meines Masterstudiums der Molekularen Medizin herzlich aufgenommen haben und stets unterstützt haben. Meine methodische Erfahrung verdanke ich hierbei größtenteils **Frau Dr. Karin Hammer**, welche mir die Grundlagen sämtlicher Versuchsdurchführungen näherbrachte und sich auch stets für mich eingesetzt hat.

Zuletzt möchte ich meinen **Eltern, Markus und Ilse Feder**, sowie meinem **Partner, Tim Lachenmaier**, für die immerwährende Unterstützung während meines Studiums und der Promotion danken. Besonders am Herzen liegt mir hierbei auch der Dank für die vielseitige Unterstützung von **Hildegard Feder**, Du hast stets an mich geglaubt. Ihr habt alle Phasen des Studiums/der Promotion miterlebt, und somit an allen Höhen und Tiefen teilgehabt, und mich hierbei durch einige Ratschläge, stetiges kritisches Anhören von Vorträgen, sowie den persönlichen Ausgleich unterstützt. In meinen Entscheidungen habe ich immer Unterstützung von Euch erfahren, und wurde mit Gewissheit auch auf den für mich richtigen Forschungszweig geleitet und in diesem bestärkt, wofür ich Euch unendlich dankbar bin.