

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

**Die Regulation des kardialen Natriumhaushalts unter Einfluss der
Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) in einem neuartigen
Schlafapnoe-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Florian Maria Ofner

2025

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

**Die Regulation des kardialen Natriumhaushalts unter Einfluss der
Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) in einem neuartigen
Schlafapnoe-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Florian Maria Ofner

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Diane Bitzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom.....	7
1.2 Klinischer Zusammenhang zwischen der obstruktiven Schlafapnoe und kardialen Pathologien	11
1.2.1 Obstruktive Schlafapnoe und Vorhofflimmern	11
1.2.2 Obstruktive Schlafapnoe und Herzinsuffizienz	13
1.3 Grundlagen der kardialen Physiologie	14
1.3.1 Die Herzmuskelzelle.....	14
1.3.2 Elektromechanische Kopplung	15
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies.....	18
1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II	20
1.5.1 Struktur der CaMKII.....	20
1.5.2 Funktionen der CaMKII.....	21
1.5.3 Regulation der CaMKII	22
1.5.4 CaMKII-abhängige Dysregulation der zellulären Kalziumhomöostase	25
1.5.5 CaMKII-abhängige Dysregulation der zellulären Natriumhomöostase	26
1.6 Fragestellung der Dissertation	31
2. Material und Methoden.....	32
2.1 Versuchstiere	32
2.1.1 Operationsablauf	32
2.1.2 Sonographische Kontrolle des Zungendiameters	35
2.2 Ganzkörperplethysmographie	37
2.2.1 Aufbau des Buxco Setups	37
2.2.2 Durchführung der Ganzkörperplethysmographien.....	38
2.2.3 Auswertung der Ganzkörperplethysmographien.....	38

2.3 Isolation muriner Kardiomyozyten	39
2.4 Konfokalmikroskopie	43
2.4.1 Grundlagen.....	43
2.4.2 Versuchsdurchführung	44
2.4.3 Auswertung	47
2.5 Epifluoreszenzmikroskopie	48
2.5.1 Grundlagen.....	48
2.5.2 Versuchsaufbau.....	53
2.5.3 Versuchsdurchführung	56
2.5.4 Auswertung	58
2.6 Natriumkalibrierung.....	59
2.6.1 Versuchsaufbau.....	59
2.6.2 Versuchsdurchführung	60
2.6.3 Berechnung der absoluten Natriumkonzentration	61
2.7 Datenauswertung und Statistik	62
3. Ergebnisse.....	63
3.1 Murine Veränderungen im Rahmen des Mausmodells einer obstruktiven SBAS	64
3.1.1 Gesteigerte Frequenz an inspiratorischen Flusslimitationen	64
3.1.2 Kontrolle der murinen Entwicklung	66
3.2 Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies.....	68
3.2.1 Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien von PTFE Mäusen.....	68
3.2.2 Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies im Zytoplasma von PTFE Mäusen.....	72
3.3 Messung des intrazellulären Natriumgehalts	76
3.3.1 CaMKII-abhängige Erhöhung des Natriumhaushalts bei PTFE-Mäusen..	77

3.3.2 Korrelation der Natriumwerte mit der Schwere der Atemstörung	84
3.3.3 Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die Natriumkonzentration	87
3.4 Analyse der diastolischen Relaxationszeit	90
4. Diskussion	93
4.1 PTFE-Injektion als geeignetes Modell für SBAS	95
4.2 Erhöhte Anwesenheit und Bildung reaktiver Sauerstoffradikale im Rahmen einer obstruktiven SBAS	98
4.3 Veränderungen im Natriumhaushalt bei SBAS	100
4.3.1 CaMKII-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration .	100
4.3.2 Die Bedeutung des Natriumkanals Nav1.8 bei der Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei SBAS	103
4.4 Verlängerung der Relaxationszeit in atrialen Kardiomyozyten von SBAS-Mäusen	106
4.5 Limitationen des SBAS-Modell und der Messungen	109
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	110
5. Zusammenfassung	113
6. Literaturverzeichnis	114
7. Anhang	134
7.1 Abkürzungsverzeichnis	134
7.2 Abbildungsverzeichnis	137
7.3 Tabellenverzeichnis	141
7.4 Danksagung	142
7.5 Lebenslauf	143
7.6 Eidesstattliche Erklärung.....	145

1. Einleitung

Schlafbezogene Atemstörungen (SBAS) sind eine weit verbreitete Erkrankungsgruppe, welche aufgrund potenziell schwerwiegender Komorbiditäten eine besonders hohe sozioökonomische Bedeutung aufweist. Ca. 24% der Bevölkerung über 65 Jahren leidet an einem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) (1). Aktuell sind weltweit etwa eine Milliarde Menschen betroffen (2, 3), wobei die Prävalenz aufgrund des demographischen Wandels in den kommenden Jahrzehnten weiter steigen wird (4). Eine besonders häufige Komorbidität der obstruktiven Schlafapnoe stellt neben der Herzinsuffizienz das Vorhofflimmern dar, welches einen negativen Einfluss auf Hospitalisierung, Morbidität und Mortalität aufweist (5). Leider gestaltet sich die Behandlung der Folgeerkrankungen im Moment sehr schwierig und ist oft mit vielen Nebenwirkungen verbunden. Deshalb ist die Entwicklung neuer Präventions- und Behandlungsstrategien sowie neuer diagnostischer Möglichkeiten von großer Relevanz. Hierfür sind jedoch genaue Kenntnisse über den zugrundeliegenden Pathomechanismus essentiell. Lebek et al. lieferten als Grundlage für diese Arbeit den Nachweis einer gesteigerten Aktivität der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) in Vorhofbiopsien von Patienten mit SBAS, was zur Entstehung von Arrhythmien bei SBAS beiträgt (6).

Die erhöhte CaMKII-abhängige Phosphorylierung der Natriumkanäle führt zu einer Veränderung der kardialen Natriumströme (7). Dazu zählt auch ein erhöhter verzögerter Natriumeinstrom. Dieser vermehrte Ionen-Einstrom kann eine Störung der intrazellulären Natrium- und Kalziumhomöostase induzieren und so die Ursache für eine verlängerte Aktionspotenzialdauer darstellen. Der erhöhte verzögerte Natriumeinstrom kann dabei auf verschiedenen Wegen zelluläre proarrhythmische Trigger hervorrufen, die zu verfrühten (EAD, early afterdepolarisation) und verzögerten (DAD, delayed afterdepolarisation) Nachdepolarisationen führen und die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigen (6).

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe eines neuartigen SBAS-Mausmodells die CaMKII-abhängige Regulation des kardialen Natriumhaushalts untersucht, um Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der Entstehung von kardialen Erkrankungen bei SBAS ziehen zu können.

1. Einleitung

1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist eine der häufigsten respiratorischen Erkrankungen mit einer erhöhten Mortalität (8), bei der es während des Schlafes durch einen pharyngealen Kollaps zu einer Verengung des oberen Atemwegs um mehr als 90% kommt (9). Das anschließende Erwachen aus der Schlafphase ist so kurz, dass es von den Patienten meist nicht wahrgenommen wird. Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom betrifft 5-15% der weltweiten Bevölkerung mit einem Anstieg parallel zum Alter der Patienten (10). Neueste Studien beziffern die weltweite Prävalenz des obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom auf ca. eine Milliarde betroffener Menschen zwischen dem 30. und 65. Lebensjahr (2), wobei Männer zwei- bis dreimal häufiger als Frauen betroffen sind (11). Die Prävalenz steigt jedoch auch bei Frauen, möglicherweise durch eine Umverteilung des Fettgewebes, nach der Menopause deutlich an (12). In den kommenden Jahrzehnten wird eine massive Zunahme dieses Krankheitsbildes erwartet, da aufgrund des demographischen Wandels die Bevölkerung einerseits älter wird, andererseits durch den ungesunden Lebensstil die Prävalenz von Adipositas und somit des wichtigsten Risikofaktors für eine obstruktive Schlafapnoe deutlich steigen wird (4). Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören neben Adipositas und dem männlichen Geschlecht auch das Alter, Rauchen sowie die Verengung des oberen Atemwegs durch kraniofaziale Veränderungen oder durch eine Zungengrundverlagerung (13–15). Ebenso spielen genetische Faktoren bei der Entwicklung einer obstruktiven Schlafapnoe eine Rolle (16). Zur Verstärkung des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms führen außerdem eine vermehrte rostrale Flüssigkeitsverschiebung, eine Steigerung des Halsumfangs und aufgrund der geringeren Belastbarkeit eine verminderte körperliche Aktivität (15, 17).

Pathophysiologisch kommt es bei einer obstruktiven Schlafapnoe durch den Verlust der Muskelspannung im Schlaf aufgrund von anatomischen oder funktionellen Veränderungen zu einer Verengung oder sogar zu einem Kollaps der oberen Atemwege. Als Folge der intermittierenden Hypoxie und Hyperkapnie sowie der folgenden Reoxygenierung wird die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) deutlich gesteigert, was wiederum die Entstehung von verschiedensten kardiovaskulären Pathologien begünstigt (18–20). Das Ausmaß der Radikalbildung ist dabei abhängig von der Schwere und der Dauer der obstruktiven Schlafapnoe (zum Beispiel gemessen anhand des Apnoe-Hypopnoe-Indexes) (21). Zudem führt das

1. Einleitung

Schlafapnoe-Syndrom zur vermehrten nächtlichen Aktivierung des sympathischen Nervensystems (22). Das wiederum hat neben dem erhöhten Katecholaminspiegel während des Erwachens aus der Schlafphase eine vermehrte Reninbildung mit konsekutiv erhöhtem Angiotensin II- und Aldosteron-Level zur Folge, was langfristig ebenfalls über die erhöhte Bildung der ROS die pathologischen Prozesse fördert (23–25).

Die obstruktive Schlafapnoe wird von der zentralen Schlafapnoe unterschieden, deren Ursache für die Atemaussetzer im zentralen Nervensystem liegt. Im Gegensatz zur obstruktiven Form können hierbei keine Atemanstrengungen gegen einen erhöhten Widerstand in den Apnoephasen detektiert werden, da es zu keiner mechanischen Verlegung der Atemwege kommt, sondern der Atemantrieb gänzlich fehlt. Die Prävalenz ist im Vergleich zur obstruktiven Form der Schlafapnoe jedoch weitaus geringer (26). Die Diagnose eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms wird mithilfe der Polysomnographie als Goldstandard gestellt (27). Sie umfasst neurophysiologische, kardiale und respiratorische Messungen. Bei der Atemwegsverlegung kann man dabei eine Apnoe von einer Hypopnoe unterscheiden (s. Abbildung 1). Eine obstruktive Apnoe ist definiert als ein Verschluss von mehr als 90% des oberen Atemwegs. In den polysomnographischen Messungen zählt ein respiratorisches Ereignis über einen Zeitraum von mindestens 10 Sekunden ohne Atemfluss als Apnoe (28). Ein unvollständiger Verschluss dagegen führt zur Hypopnoe, welche als eine Reduktion der Ventilation um mehr als 30% und einem Abfall der Sauerstoffsättigung um $> 3\%$ vom Ausgangswert sowie einem kurzzeitigen Erwachen definiert ist (29). Aus den gemessenen Apnoen und Hypopnoen innerhalb einer Stunde lässt sich anschließend der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) berechnen, anhand dessen die Schwere des Schlafapnoe-Syndroms beurteilt werden kann. Eine Schlafapnoe wird bei einem AHI $>5/h$ diagnostiziert. Ein AHI von $>5 - 15/h$ stellt eine leichte, ein AHI von $>15 - 30/h$ eine mittelgradige und ein AHI $>30/h$ eine schwere Schlafapnoe dar (15). Neben mindestens 5 obstruktiven respiratorischen Ereignissen pro Schlafstunde muss zur Diagnosestellung eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms jedoch zusätzlich wenigstens ein für die Erkrankung charakteristisches klinisches Symptom vorliegen. Dazu zählen Schnarchen und Atemaussetzer, ausgeprägte Tagesmüdigkeit, unerholsamer Schlaf, vermehrter nächtlicher

1. Einleitung

Speichelfluss, morgendlicher Kopfschmerz sowie Husten bzw. Keuchen beim Erwachen (9, 10).

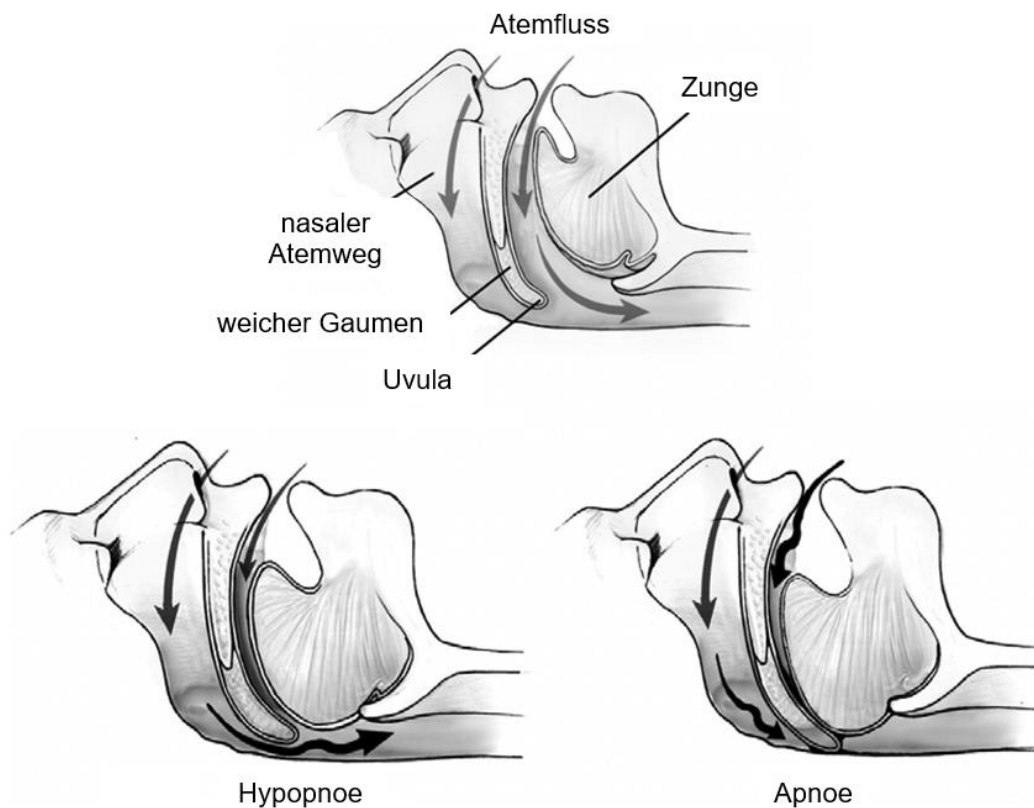


Abbildung 1 - Partielle bzw. vollständige Verlegung der Atemwege bei Hypopnoe und Apnoe. Modifiziert nach (28).

Bei mehr als 50% der Patienten mit einem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom konnten kardiovaskuläre oder metabolische Auffälligkeiten beobachtet werden (30). Zu diesen gehören Erkrankungen wie die Hypertension, Arrhythmien, Schlaganfälle, koronare Herzerkrankungen und Atherosklerose als Ursachen einer überdurchschnittlich erhöhten kardiovaskulären Mortalität. Auch die Prävalenz von endothelialen und metabolischen Dysfunktionen wie ein Diabetes mellitus oder die Hyperlipidämie ist bei Patienten mit einer obstruktiven Schlafapnoe erhöht (15, 31–34), wobei ein deutlicher geschlechtsbezogener Unterschied beobachtet werden konnte (35, 36). Zudem leiden die Patienten neben den Erkrankungen der verschiedenen Organsysteme unter einer enorm eingeschränkten Lebensqualität, die beispielsweise in einer verminderten Konzentrationsfähigkeit oder in einer erhöhten Rate an Verkehrsunfällen infolge der ausgeprägten Tagesmüdigkeit erkennbar wird (37).

1. Einleitung

Die seit über 40 Jahren vorrangige Behandlung bei Patienten mit einem schweren Schlafapnoe-Syndrom ist die CPAP-Therapie (*Continuous Positive Airway Pressure*) (38). Dabei wird durch einen kontinuierlichen positiven Druck der Kollaps des oberen Atemwegs verhindert. Die Effekte der CPAP-Therapie in Form einer Symptomreduktion und Steigerung der Lebensqualität durch die verminderte Tagesmüdigkeit treten bereits nach wenigen Tagen ein, sind aber stark abhängig von der Compliance des Patienten (39). Einige Studien deuten darauf hin, dass eine CPAP-Therapie die Prävalenz von schweren kardiovaskulären Erkrankungen wie Arrhythmien, Schlaganfällen oder Herzinfarkten reduzieren kann (40–42). Jedoch kann das Auftreten von kardialen Pathologien im Langzeitverlauf durch die CPAP-Therapie kaum verhindert werden (43, 44). Das könnte auch an der mangelnden Compliance in Bezug auf die CPAP-Therapie liegen. Dieses häufige Nicht-Einhalten des Therapieplans konnte bei kardiovaskulär belasteten Patienten in einer Langzeitstudie nachgewiesen werden (45). Deshalb ist im Rahmen einer multimodalen Therapie eine Gewichtsreduktion und ein gesunder Lebensstil bei einer erfolgreichen Behandlung der obstruktiven Schlafapnoe und der Vermeidung von Folgeerkrankungen unumgänglich (46, 47). Ebenso gibt es orale Hilfsmittel in Form einer mandibulären Mundspange (*Mandibular Advancement Devices*, MAD), die den oberen Atemweg in der Nacht stabilisieren und so die Kollapsneigung verhindern soll. Dessen Wirkung ist jedoch weniger effektiv als die CPAP-Therapie (48). In schweren Fällen kann auch eine Operation zur Vergrößerung des oropharyngealen Raums (49) oder ein bariatrischer Eingriff als therapeutischer Ansatz indiziert sein. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom einen großen Risikofaktor für eine Operation darstellt, da in Zusammenhang mit der Erkrankung eine erhöhte Anzahl an postoperativen Thromboembolien, eine verlängerte Hospitalisierung und eine erhöhte intraoperative Todesrate beobachtet werden konnte (50).

1. Einleitung

1.2 Klinischer Zusammenhang zwischen der obstruktiven Schlafapnoe und kardialen Pathologien

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Zu den häufigsten kardialen Komorbiditäten zählen das Vorhofflimmern und die Herzinsuffizienz, welche ich im folgenden Abschnitt näher erläutern möchte.

1.2.1 Obstruktive Schlafapnoe und Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist definiert durch eine schnelle und unregelmäßige Aktivität der Vorhöfe, wodurch keine suffiziente Kontraktion und somit eine reduzierte kardiale Pumpfunktion zustande kommt. Durch die inadäquate atrioventrikuläre Erregungsüberleitung entstehen zudem häufig Tachyarrhythmien, welche die Pumpfunktion weiter verschlechtern. Außerdem ist das Risiko einer Thrombusbildung durch die Verlangsamung des Blutflusses in den Vorhöfen deutlich erhöht, was schlussendlich einen Schlaganfall zur Folge haben kann (51). Je nach Beständigkeit der Rhythmusstörung wird das Vorhofflimmern in unterschiedliche klinische Stadien eingeteilt. Das paroxysmale Vorhofflimmern ist durch eine spontane Konvertierung in den Sinusrhythmus innerhalb von maximal 7 Tagen gekennzeichnet. Persistierendes Vorhofflimmern dagegen muss aufgrund seiner Persistenz zur Wiederherstellung des Sinusrhythmus medikamentös oder elektrisch mittels einer Kardioversion therapiert werden. Sind sowohl medikamentöse als auch elektrische Behandlungsversuche frustan, spricht man von einem permanenten Vorhofflimmern (51). Mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 2% gehört das Vorhofflimmern zu den häufigsten Herzrhythmusstörungen, wobei die Häufigkeit der Erkrankung mit dem Alter deutlich zunimmt (52). Klinisch kann sich die Erkrankung von asymptomatisch bis hin zu schweren hämodynamischen Beeinträchtigungen wie Leistungsminderung, schwerer Hypo- oder Hypertonie und einer pulmonalvenösen Stauung sehr variabel präsentieren. Neben einer arteriellen Hypertonie und dem Alter zählen unter anderem auch die Herzinsuffizienz und ein Diabetes mellitus zu den häufigsten Risikofaktoren für die Entstehung von thromboembolischen Komplikationen eines Vorhofflimmerns (51). Im Rahmen der Therapie spielt neben der Rhythmuskontrolle daher vor allem die Thromboembolieprophylaxe eine zentrale Rolle.

1. Einleitung

Vorhofflimmern ist mit einer Prävalenz von 5% die häufigste Arrhythmie bei Patienten mit einer schlafbezogenen Atemstörung (53–55). In der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns bei Patienten mit einer obstruktiven Schlafapnoe spielen die hämodynamischen Veränderungen während den Apnoephasen eine entscheidende Rolle. Der Wechsel zwischen Hypoxie und Reoxygenierung führt durch die vermehrte Bildung von ROS zu einem erhöhten oxidativen Stress, welcher den strukturellen und elektrischen Umbau des Herzens unterstützt. Darüber hinaus begünstigen kleinste Abweichung in der kardialen Physiologie wie ein Anstieg des verzögerten Natriumeinstroms die zelluläre Arrhythmogenese (56), die ich im Verlauf dieser Arbeit weiter erörtern möchte. Die Hypoxämie und Hyperkapnie führen außerdem zu Tachykardien und Hypertension, was einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Myokards trotz des geringeren Sauerstoffangebots zur Folge hat. So können sich Myokardschäden mit Fibrosierungen bilden, die wiederum die Entwicklung eines Vorhofflimmerns weiterhin begünstigen (57). Zudem bewirkt der negative intrathorakale Druck über eine vermehrte vagale Stimulation eine Verkürzung der effektiven atrialen Refraktärzeit, was die Entwicklung des Vorhofflimmerns weiter fördert (58). Die schlafbezogene Atemstörung kann also den Beginn eines Vorhofflimmerns induzieren und, vor allem bei Vorliegen von weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie einer Herzinsuffizienz oder einer koronaren Herzerkrankung (59), zu dessen Persistenz beitragen (60). So konnten Mehra et al. zeigen, dass Patienten mit einer schweren obstruktiven Schlafapnoe ein vierfach höheres Risiko aufweisen, Vorhofflimmern zu entwickeln als Patienten ohne die nächtliche Atemstörung (53). Kanagala et al. beobachteten zudem, dass es bei Patienten mit obstruktiver Schlafapnoe und gleichzeitiger Rhythmusstörung nach einer Kardioversion oder Ablation häufiger zu einem Rezidiv kommt (61). Auch der Erfolg einer medikamentösen antiarrhythmischen Therapie ist bei Patienten mit einer schweren obstruktiven Schlafapnoe reduziert (62). Deshalb ist auch aufgrund des bereits erläuterten mangelnden Erfolgs einer standardisierten CPAP-Therapie hinsichtlich der kardialen Pathogenese vor allem im Langzeitverlauf die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze von großer Bedeutung.

1. Einleitung

1.2.2 Obstruktive Schlafapnoe und Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz kennzeichnet sich durch die verminderte Fähigkeit des Herzens, Organe mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen. In der Folge treten Symptome wie Leistungsminderung und Dyspnoe auf (51). In den westlichen Ländern sind ca. 2% der Erwachsenen an einer Herzinsuffizienz erkrankt, wobei die Prävalenz bei Menschen über 70 Jahren bis auf 10% ansteigt (63). Trotz kontinuierlich besser werdender Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose einer Herzinsuffizienz infaust. Knapp die Hälfte aller Patienten verstirbt innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung (64). Es gibt viele verschiedene Ursachen für eine Störung der Pumpfunktion. Zu diesen zählen neben Herzrhythmusstörungen und ischämischen Herzerkrankungen unter anderem auch die arterielle Hypertonie und Herzklappenvitien. Diese führen durch eine erhöhte Druck- bzw. Volumenbelastung über die Dilatation der Ventrikel zur Herzinsuffizienz (51). Infolgedessen kommt es zu einem strukturellen Umbau des Myokards (sog. Remodeling), welcher die Entstehung einer kardialen Dysfunktion und das Risiko für die Entwicklung von Arrhythmien weiter begünstigt. Dabei spielen besonders der Natrium- und Kalziumstoffwechsel der Kardiomyozyten eine zentrale Rolle.

Es konnte beobachtet werden, dass vor allem Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz eine hohe Prävalenz für ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom aufweisen (65, 66). Die obstruktive Schlafapnoe führt über die intermittierende Hypoxie zu einem vermehrten inflammatorischen und oxidativen Stress sowie zur erhöhten sympathischen Aktivität mit Steigerung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (15). Aus der arteriellen Hypertonie kann eine erhöhte systolische linksventrikuläre Dysfunktion resultieren, die die Pathogenese der Herzinsuffizienz weiter begünstigt. Auch führt Angiotensin II über die Stimulation der NADPH-Oxidase zur vermehrten Bildung von ROS (25, 67). Ergänzend zeigten Zhou und Tian, dass die vermehrte Anwesenheit der ROS die Progression der Erkrankung weiter vorantreibt (68). Rao et al. konnte außerdem beobachten, dass es bei Patienten mit einer obstruktiven Schlafapnoe und einer Herzinsuffizienz zur signifikanten Zunahme schwerer Symptome wie Kurzatmigkeit, Müdigkeit, chronische Ödeme und einer Reduktion der Lebensqualität kommt (69).

1. Einleitung

1.3 Grundlagen der kardialen Physiologie

Um die Pathogenese kardialer Erkrankungen im Rahmen des Schlafapnoe-Syndroms besser zu verstehen und aufbauend auf diesen Erkenntnissen neue Wege der Diagnostik und Behandlung entwickeln zu können, ist das Verständnis der kardialen Physiologie von essentieller Bedeutung.

1.3.1 Die Herzmuskelzelle

Das Myokard besteht aus Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), die sich in Ketten zu Herzmuskelfasern anordnen und so die funktionelle Grundlage des Herzens bilden. Jeder Kardiomyozyt wird ringsum von einer Zellmembran, dem Sarkolemm, begrenzt. In der Phospholipid-Doppelschicht des Sarkolemm befinden sich zahlreiche Proteine, die unter anderem als Kanäle oder Ionenpumpen beim Übertritt von Molekülen in die Zelle oder aus dieser hinaus eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung zwischen Intra- und Extrazellulärraum spielen. Die Verbindung zwischen den einzelnen Zellen ist mikroskopisch als Discus intercalaris („Glanzstreifen“) sichtbar. Zum einen verknüpfen diese Disci die Kardiomyozyten über Desmosomen mechanisch miteinander, zum anderen haben sie aber auch eine wichtige funktionelle Aufgabe. Über sogenannte Gap junctions verbinden sie alle Kardiomyozyten zu einem funktionellen System und ermöglichen so eine gezielte Erregungsausbreitung über das gesamte Myokard, welche für die anschließende synchrone Kontraktion entscheidend ist (70).

Jeder Kardiomyozyt setzt sich in etwa gleichen Teilen aus Aktin- und Myosinfilamenten zusammen, welche die Grundlage des kontraktile Apparats bilden. Mikroskopisch lässt sich ein Bandenmuster erkennen, weshalb die Herzmuskulatur eine besondere Art der quergestreiften Muskulatur darstellt. Die kleinste Untereinheit des kontraktile Systems bilden die Sarkomere (s. Abbildung 2). Jedes Sarkomer wiederum besteht aus einer dunklen A-Bande und jeweils einer halben benachbarten hellen I-Bande. An den Seiten wird das Sarkomer durch die Z-Streifen begrenzt. Die I-Bande enthält die Aktinfilamente, die in den Z-Streifen verankert sind. Die A-Bande setzt sich aus den von Aktinfilamenten umschlungenen Myosinfilamenten zusammen. Jedoch liegen in der Mitte der A-Bande auch Myosinfilamente ohne Aktinverankerungen vor, was lichtmikroskopisch als Aufhellung sichtbar ist und als H-Bande bezeichnet wird. In der H-Bande kann man zudem eine M-Linie erkennen, die durch eine Verdrillung der

1. Einleitung

Myosinfilamente untereinander entsteht. Durch die parallele Anordnung sind die Filamente gegeneinander beweglich und ermöglichen während der Kontraktion eine Verschiebung ineinander (71).

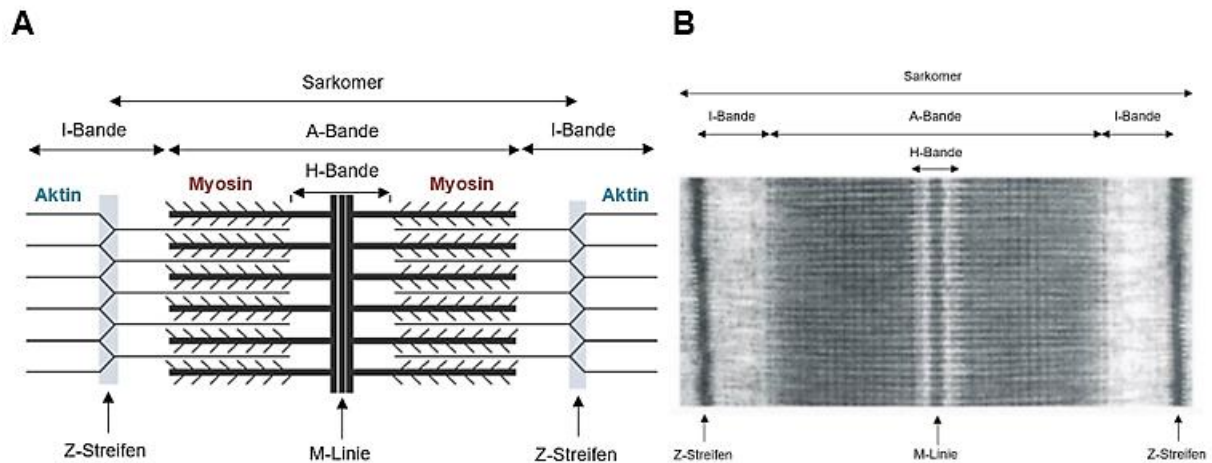


Abbildung 2 - Aufbau eines Sarkomers

A: Schematische Darstellung eines Sarkomers. Modifiziert nach (71).

B: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Sarkomers. Modifiziert nach (72).

1.3.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Vorgang, bei dem die elektrische Stimulation in Form des Aktionspotenzials in eine mechanische Kontraktion der Kardiomyozyten umgesetzt wird (s. Abbildung 3). Zu Beginn des Aktionspotenzials öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle und es kommt zu einem Nettoeinstrom positiver Ladungen, welcher zur Depolarisation der Zellmembran führt (schneller Aufstrich des Aktionspotenzials). Daraufhin kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle (sog. Dihydropyridin-Rezeptoren), welche einen Einstrom von Kalziumionen bewirken und so die nachfolgende Plateauphase des Aktionspotenzials begünstigen. Über die Bindung an Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) triggern die Kalziumionen eine Entleerung des intrazellulären Kalziumspeichers (73). Dieser Vorgang wird auch als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet (74). Dadurch steigt die Kalziumkonzentration in der Zelle schlagartig an. Die Kalziumabgabe aus dem SR wird durch die zelluläre Ultrastruktur vereinfacht, da spannungsabhängige Kalziumkanäle und RyR2 durch Einstülpungen der Zellmembran (T-Tubuli) nahe beieinander liegen. Die freien Kalziumionen dienen als sekundärer Botenstoff, indem

1. Einleitung

sie an das Myofilamentprotein Troponin C binden und die Verkürzung der Sarkomere einleiten. Troponin C bildet einen Komplex mit Tropomyosin, das an die Aktinfilamente angelagert ist (75). Durch die Kalziumbindung kommt es zu einer Konformationsänderung dieses Komplexes mit nachfolgender Freilegung der Myosin-Bindungsstellen an den Aktinfilamenten. Myosin, welches ATP gebunden hat, kann nun eine Verbindung mit dem Aktinfilament knüpfen. Das ATP wird dabei in ADP und ein anorganisches Phosphat hydrolysiert und somit die Energie für die anschließende Kontraktion bereitgestellt. Die Myosinköpfe knicken nach der Abgabe des Phosphat-Ions ab und verschieben die Aktinfilamente ineinander, was zur Verkürzung des Sarkomers führt. Durch eine erneute ATP-Bindung am Myosin kann der Myosinkopf wieder vom Aktinfilament abdissoziieren und steht für einen neuen Querbrückenzyklus zur Verfügung (70).

Um in der anschließenden Diastole die Relaxation der Myofilamente zu erreichen, muss die zytosolische Kalziumkonzentration wieder auf das Ausgangsniveau absinken. Dabei spielt die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase (SERCA2a) und deren Regulation durch das Peptid Phospholamban (PLB) eine zentrale Rolle. Sie transportiert freie Kalziumionen unter ATP-Verbrauch aus dem Zytosol wieder zurück in das sarkoplasmatische Retikulum (73). Zusätzlich werden die Kalziumionen durch den membranständigen Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX) im Austausch mit drei Natriumionen je Kalziumion entlang des elektrochemischen Gradienten aus der Zelle befördert. Dabei wird der physiologische Gradient durch die Natrium/Kalium-ATPase aufrechterhalten. Ein kleiner Teil der Kalziumionen wird auch durch membranständige Kalzium-ATPasen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum eliminiert oder von Mitochondrien aufgenommen und in diesen gespeichert (73). Die vollständige Repolarisation der Zelle gelingt über spannungsabhängige Kaliumkanäle, die durch den auswärts gerichteten Kaliumstrom das negative Ruhemembranpotenzial der Zelle wiederherstellen (70).

1. Einleitung

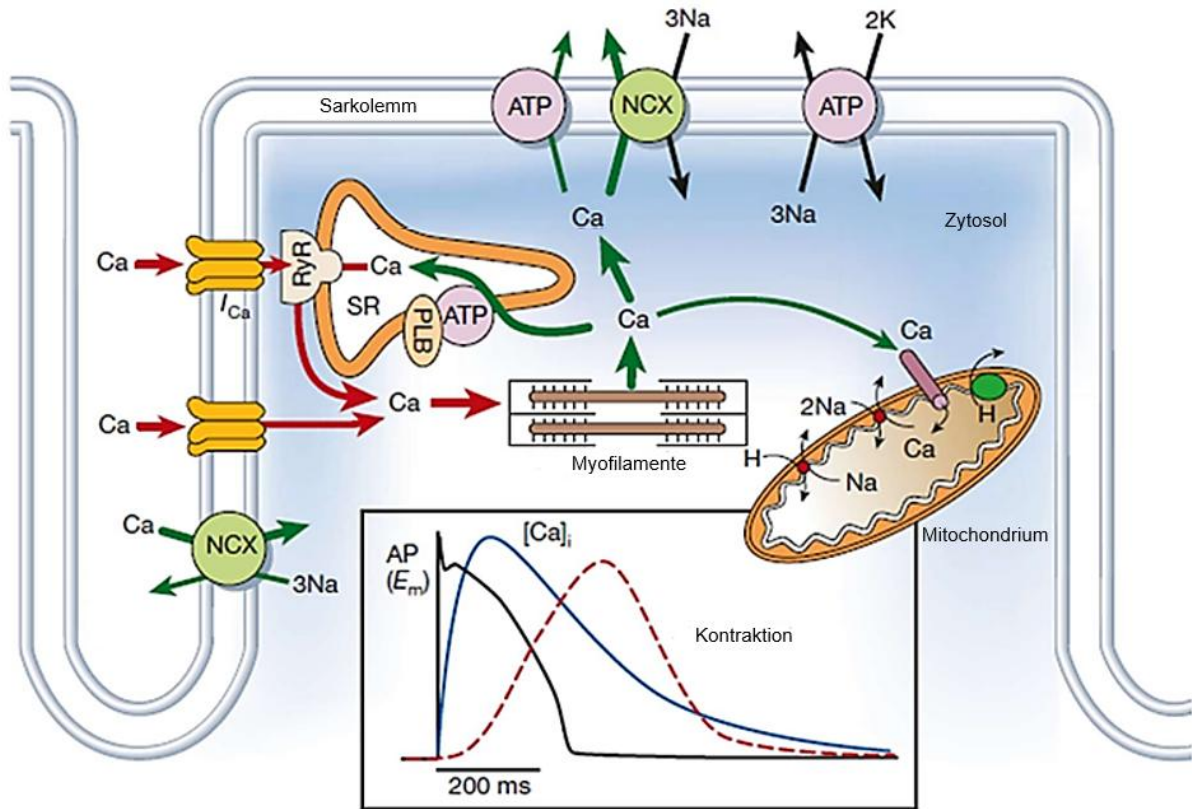


Abbildung 3 - Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen. Modifiziert nach (73).

1. Einleitung

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Da der menschliche Organismus permanent mit schädlichen Mikroorganismen konfrontiert wird, hat er ein System zu deren Bekämpfung entwickelt. Darin spielen ROS eine entscheidende Rolle. ROS können in physiologischem Maße direkt durch spezielle Enzyme wie Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen (NADPH-Oxidasen, NOX) oder der Xanthinoxidase gebildet werden (76). So kann die Isoform NOX2, welche in der Zellmembran lokalisiert ist und unter physiologischen Bedingungen keine ROS bildet, durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden. Zu diesen zählen mechanischer Stress und Angiotensin II, welche beispielsweise im Rahmen einer Herzinsuffizienz vermehrt auftreten (77). Der Großteil der ROS entsteht jedoch als Nebenprodukt der Zellatmung bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien (78, 79). Eine übermäßige mitochondriale Aktivität führt über die Entkopplung des Elektronentransports der Atmungskette zur vermehrten ROS-Produktion, welche wiederum zu vielen myokardialen Dysfunktionen beiträgt (80). Generell ist die ROS-Konzentration aufgrund der kurzen Halbwertszeit, ihrer schnellen Beseitigung und der limitierten Diffusionsfähigkeit am höchsten in der unmittelbaren Umgebung der ROS-produzierenden Quelle. Bei einer vermehrten Synthese der ROS können sich jedoch weitreichende Folgen über die lokale Begrenzung hinaus ergeben (81, 82). Die intrazellulären Folgen sind zudem selbstverstärkend, da es durch die vermehrte Anwesenheit der Radikale zur ROS-induzierten ROS-Freisetzung aus den Mitochondrien kommen kann (83).

Es gibt viele verschiedene ROS, wobei das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) und das Wasserstoffperoxid-Molekül (H_2O_2) zu den wichtigsten zählen. Zu Beginn der ROS-Bildung wird ein Elektron auf das Sauerstoffmolekül übertragen. Das entstandene Superoxid-Anion wird durch die Superoxid-Dismutase nach Aufnahme eines weiteren Elektrons und zweier Wasserstoffprotonen in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Durch ein weiteres Elektron und Wasserstoffatom entsteht ein Hydroxyl-Radikal (s. Abbildung 4) (76, 79). Um die schädlichen Auswirkungen der Radikale zu kontrollieren, werden diese unter anderem in Peroxisomen abgebaut. Mithilfe von katalysierenden Enzymen werden sie dabei in Sauerstoff und Wasser umgesetzt. Außerdem nutzt der menschliche Organismus Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin C zum Schutz vor einer übermäßigen ROS-Schädigung.

1. Einleitung

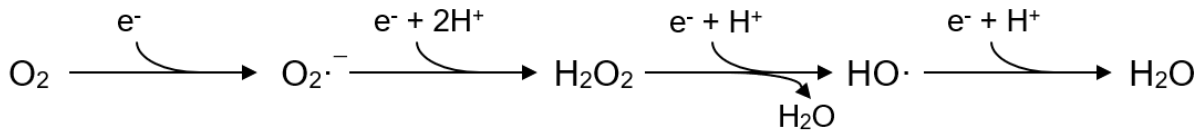


Abbildung 4 - Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies

In physiologischen Konzentrationen tragen ROS über die von ihnen ausgelösten Redoxreaktionen zur Regulation vieler Enzyme und Signalwege bei. Ein Beispiel ist die Auswirkung der ROS während der Dehnung der kardialen Myofilamente. Die Dehnung aktiviert NADPH-Oxidasen, welche eine der wichtigsten direkten ROS-Quellen im kardiovaskulären System darstellen. Die durch den mechanischen Reiz lokal aktivierte NOX produziert ROS, was wiederum in einer regional begrenzten Aktivierung des RyR2 mündet. Die anschließende Kalziumfreisetzung aus dem SR unterstützt die feine Abstimmung der Kontraktion (84). Somit ist es offensichtlich, dass bereits kleinste Veränderungen der ROS-Konzentration große Auswirkungen auf den kardialen Exzitations-Kontraktionszyklus nehmen können. Es ist zudem bekannt, dass ROS auf vielfältige Weise in die Regulation des kardialen Natrium- und Kalziumhaushaltes eingreifen können (85–87). Dazu zählen neben direkten Modifikationen wie beispielsweise der Oxidation von Kanalproteinen auch indirekte Modifikationen wie die Oxidation von Kinasen oder Phosphatasen, welche die Funktion der Kanalproteine regulieren. Direkte Modifikationen finden sich häufig in unmittelbarer Nähe zur ROS-produzierenden Quelle, wohingegen indirekte Effekte durch aktivierte Proteinkinasen in der gesamten Zelle auftreten können (81, 82). Eine direkte Modifikation ist beispielsweise die bereits erwähnte Oxidation des RyR2. Im Rahmen einer übermäßigen Aktivierung konnte dabei gezeigt werden, dass ROS über dessen Modifikation ein erhöhtes SR Kalziumleck in insuffizienten Kardiomyozyten induzieren (88). Der erhöhte Ausstrom von Kalziumionen in das Zytoplasma kann die Pathogenese der Herzinsuffizienz weiter vorantreiben, da durch das SR Kalziumleck eine erhöhte diastolische Kalziumkonzentration vorliegt. Die Reduktion des SR Kalziumgehalt führt so zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten in der Systole (89). Ein wichtiges Beispiel für eine indirekte Modifikation stellt die Aktivierung der CaMKII durch die ROS dar, welche ich im folgenden Kapitel näher erläutern möchte.

1. Einleitung

1.5 Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ist eine multifunktionelle Serin/Threonin-Proteinkinase mit einer weit verbreiteten Expression in Muskeln, Nerven und immunologischem Gewebe. Als kardiale Stresskinase ist sie wesentlich an der Regulation der myokardialen Natrium- und Kalziumhomöostase beteiligt. Es gibt verschiedene CaMKII-Isoformen. Alle CaMKII-Isoformen scheinen ähnliche regulatorische Mechanismen und Proteinziele zu haben, unterscheiden sich jedoch in ihrer Gewebeverteilung. So werden die α - und β -Isoform beispielsweise hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Die CaMKII δ ist die vorherrschende Variante im Herzen (90), wobei diese Isoform auch im Gehirn an wichtigen Signalwegen beteiligt ist (91). Wie jede Kinase moduliert sie die Aktivität ihrer Zielstrukturen über deren Phosphorylierung.

1.5.1 Struktur der CaMKII

Die CaMKII ist ein dodekamerer Holoenzym bestehend aus zwei Ringen mit jeweils 6 Monomeren. Jedes der Monomere besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer mittig gelegenen regulatorischen Domäne und einer Assoziationsdomäne am C-Terminus (s. Abbildung 5) (92, 93). Über die Assoziationsdomäne lagern sich die 6 Monomere zu einer ringförmigen Struktur zusammen (s. Abbildung 6), wobei zwei dieser Hexamere das vollständige Enzym bilden (94). Wie auch andere Kinasen besitzt die katalytische Domäne der CaMKII eine Bindungstasche für das ATP um dessen Hydrolyse zu erleichtern (95).

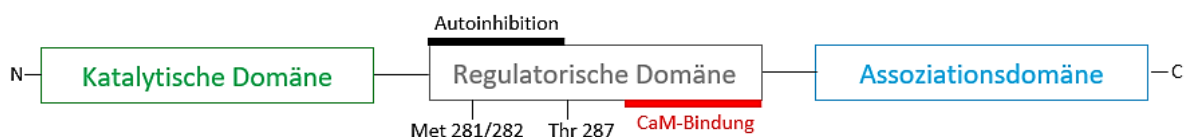


Abbildung 5 - Struktur eines CaMKII-Monomers. Modifiziert nach (93)

1. Einleitung

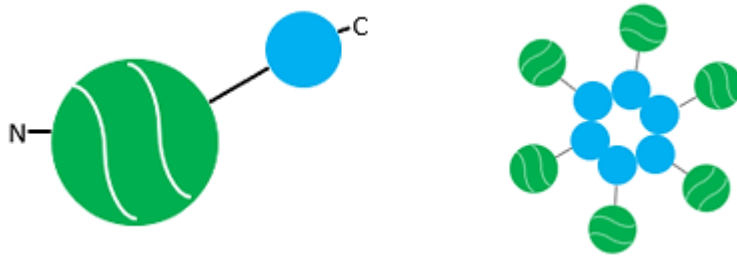


Abbildung 6 - Ringstruktur der CaMKII. Modifiziert nach (93)

Die Verbindung zwischen der Assoziationsdomäne und der regulatorischen Domäne enthält eine variable Region mit verschiedenen Aminosäuresequenzen je nach Splicevariante. Ein bedeutendes Beispiel ist neben der CaMKII δ c-Variante auch die Splicevariante CaMKII δ b, welche eine Kernlokalisationssequenz enthält (96). Die Anwesenheit dieser Kernlokalisationssequenz bei einer mehrheitlichen Anzahl der CaMKII Monomere bewirkt einen überwiegenden Aufenthalt des gesamten Holoenzym im Zellkern. Der CaMKII δ c-Variante dagegen fehlt diese Sequenz, weshalb sie sich hauptsächlich im Zytoplasma befindet. Dort spielt sie unter anderem bei der Regulation der Membranerregbarkeit und der Homöostase des intrazellulären Natrium- und Kalziumhaushalts eine wichtige Rolle (97, 98).

1.5.2 Funktionen der CaMKII

Die CaMKII verbindet die Regulation vieler physiologischer Schlüsselfunktionen im Herzen. Dazu gehören neben der Kopplung von Erregung und Kontraktion auch die Modulation der Herzfrequenz. Wie bei vielen Enzymen bestimmt auch bei diesem Schlüsselprotein die Struktur dessen Funktion. Ihre Hauptaufgabe ist wie bei anderen Kinasen die Erniedrigung der Aktivierungsenergie und somit die Katalyse einer chemischen Reaktion, bei der das endständige Phosphat eines ATPs (γ -Phosphat) auf ein Serin oder Threonin des Zielproteins übertragen wird (95). Die CaMKII katalysiert bevorzugt die Phosphorylierung innerhalb einer sog. RXXS/T-Modifikation. R steht dabei für die Aminosäure Arginin, X kann eine beliebige Aminosäure sein. Das S stellt die Aminosäure Serin und das T die Aminosäure Threonin dar (99). Somit kann die RXXS/T-Sequenz als Leitstruktur dienen, um potenzielle Stellen für eine CaMKII-Modifikation zu identifizieren.

Die Phosphorylierung ist ein grundlegender Mechanismus in vielen biologischen Systemen, um die Funktion oder die Reaktionsgeschwindigkeit von verschiedenen

1. Einleitung

Molekülen wie Proteinen oder Lipiden in kürzester Zeit zu verändern. Die CaMKII ist ein Schlüsselregulator im intrazellulären Natriumhaushalt der Kardiomyozyten, da sie einen erheblichen Einfluss auf die kardialen spannungsgesteuerten Natriumkanäle und den verzögerten Natriumeinstrom ausübt (7, 100, 101). Auch im Kalziumzyklus der Herzmuskelzellen spielt das Enzym eine zentrale Rolle. Es moduliert den Kalziumeinstrom, die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und die Kalziumwiederaufnahme ins SR (102–104). Diese Veränderungen können über die Phosphorylierung und damit Aktivitätssteigerung von kalziumregulierenden Proteinen wie beispielsweise dem RyR2 oder der SERCA2a erreicht werden (103, 105, 106). Jede Phosphorylierung durch die CaMKII ist mithilfe von speziellen Protein-Phosphatasen reversibel. Phosphatasen sind Enzyme, welche die Abspaltung des zusätzlichen Phosphatgruppe katalysieren.

1.5.3 Regulation der CaMKII

Es gibt mehrere mögliche Aktivierungswege der CaMKII. Unter Ruhebedingungen (d.h. bei einem niedrigen Redoxpotenzial und niedriger intrazellulärer Kalziumkonzentration) ist die CaMKII weitgehend enzymatisch inaktiv, da die katalytische Domäne mit der autoinhibitorischen Region am N-Terminus der regulatorischen Domäne verbunden ist. Das Enzym wird aktiviert, sobald es durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehalts zu einer vermehrten Bindung von Kalziumionen an Calmodulin, einem ubiquitär vorhandenem intrazellulären Kalziumbindungsprotein, kommt (95). Der Kalzium/Calmodulin-Komplex (Ca/CaM) bindet an die Kalzium/Calmodulin-Bindungsregion, welche sich am C-Terminus der regulatorischen Domäne der CaMKII befindet (s. Abbildung 7). Durch das Ablösen des Kalzium/Calmodulin-Komplexes geht die CaMKII wieder in ihre inaktive Form über.

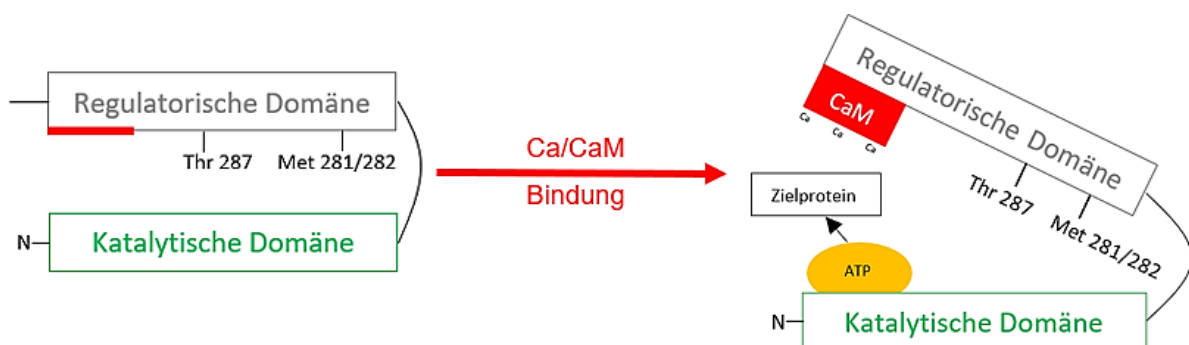


Abbildung 7 - Aktivierung der CaMKII durch Kalzium/Calmodulin-Bindung. Modifiziert nach (93)

1. Einleitung

Wenn der Kalzium/Calmodulin-Komplex jedoch länger an die CaMKII gebunden ist, bewirkt das eine Autophosphorylierung der CaMKII am Threonin (Thr) 287 der regulatorischen Domäne (s. Abbildung 8). Diese Autophosphorylierung verstärkt die Aktivität der CaMKII über zwei Prozesse. Erstens erhöht sie die Affinität der CaMKII für den Kalzium/Calmodulin-Komplex um das 1000-fache (sog. „Calmodulin-trapping“). Zweitens bleibt die am Thr 287 autophosphorylierte CaMKII selbst nach der Dissoziation des Kalzium/Calmodulin-Komplexes weiterhin enzymatisch aktiv, da der Phosphatrest am Thr 287 eine effektive Reassoziaton der katalytischen Domäne mit der autoinhibitorischen Region der regulatorischen Domäne verhindert (90, 95). Die Inaktivierung der CaMKII nach der Autophosphorylierung kann dann jedoch über eine Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen erfolgen (107).

Eine Kalzium/Calmodulin-unabhängige Aktivierung kann auch durch die Oxidation der Methionine (Met) 281/282 durch ROS zustande kommen (s. Abbildung 8) (24). Das Resultat dieser Oxidation ist vergleichbar mit der Phosphorylierung am Thr 287. Ebenso wie bei der Autophosphorylierung schützt die Oxidation des Met 281/282 vor der Reassoziaton der katalytischen Domäne mit der autoinhibitorischen Region auch im Kalzium/Calmodulin-ungebundenem Zustand, was zur Kalzium/Calmodulin-unabhängigen Aktivität der CaMKII führt (95). Interessanterweise könnte die Oxidation die Sensitivität der CaMKII für eine Kalzium/Calmodulin-Aktivierung zudem weiter erhöhen, was eine vermehrte Aktivität der CaMKII bei erhöhten ROS-Bedingungen bewirkt, selbst wenn die intrazelluläre Kalziumkonzentration dabei unverändert ist (108). Auch ein vermehrtes Aufkommen an ROS kann also zu einer Kalzium/Calmodulin-unabhängigen Aktivität der CaMKII führen (95).

Neben der Kalzium/Calmodulin-gesteuerten und den beiden Kalzium/Calmodulin-unabhängigen Aktivierungswegen gibt es aber auch eine Vielzahl von modulierenden Einflüssen auf die CaMKII. Dazu zählt beispielsweise die Aktivierung der CaMKII infolge einer β -adrenergen Stimulation (109), welche bei Patienten mit SBAS durch das wiederkehrende Erwachen aus der Schlafphase begünstigt wird. Ein weiterer Aktivierungsmechanismus unter den Konditionen einer schlafbezogenen Atemstörung ist ein erhöhter transmuraler Druckgradient mit gesteigerter atrialer Wandspannung, der zur erhöhten Nachlast führt. Eine mögliche Ursache könnten dabei die erhöhten intrathorakalen Drücke aufgrund der SBAS sein (6). Durch das Erwachen aus dem

1. Einleitung

Schlaf sowie den zyklischen Wechsel von Hypoxämie und Reoxygenierung kommt es zu stark schwankenden thorakalen Druckverhältnissen bei SBAS (58, 110, 111).

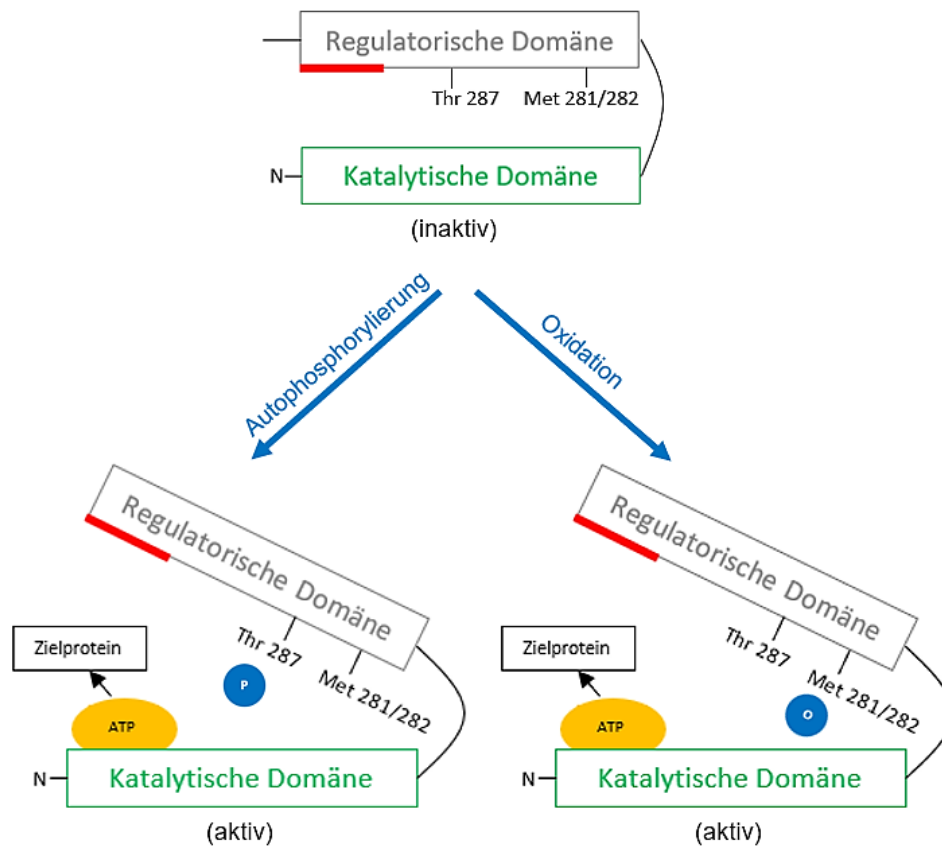


Abbildung 8 – Kalzium/Calmodulin-unabhängige Aktivierung der CaMKII. Modifiziert nach (93)

Die CaMKII kann auch die Anfälligkeit für das Auftreten von Arrhythmien steigern. So induziert eine exzessive CaMKII-Aktivität beispielsweise Signalwege der Apoptose, welche in Form von vermehrten Umbauprozessen und Fibrosierungen in Erscheinung treten (112, 113). Damit kann sie durch die Beteiligung an strukturellen Veränderungen das Auftreten von Arrhythmien begünstigen. Zudem ist die CaMKII an vielen inflammatorischen Prozessen beteiligt. Die Fähigkeit des Enzyms, unterschiedliche entzündliche Signalwege zu aktivieren und durch diese aktiviert zu werden, legt nahe, dass die CaMKII eine wichtige molekulare Verbindung zwischen Entzündungsreaktionen und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen spielt (114). Die CaMKII spielt aber auch in der Regulation der zellulären Ionenhomöostase eine entscheidende Rolle. Vor allem auf den Kalzium- und Natriumhaushalt hat die übermäßige Aktivierung der CaMKII weitreichende Folgen.

1. Einleitung

1.5.4 CaMKII-abhängige Dysregulation der zellulären Kalziumhomöostase

Die CaMKII kann die spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanäle am Thr498 der β_{2a} -Untereinheit phosphorylieren, was eine verlängerte Öffnung bewirkt und so zu einem vermehrten Einstrom von Kalziumionen führt (115, 116). Die zytosolische Kalziumkonzentration ist der wichtigste Faktor der Öffnungswahrscheinlichkeit der kardialen Ryanodin-Rezeptoren am SR. Über die physiologische Kopplung werden die RyR2 durch Kalziumionen aktiviert, was zu deren Öffnung und nachfolgend einer erheblichen Kalziumfreisetzung ins Zytosol führt. Auch an dieser Stelle kann die CaMKII durch eine Phosphorylierung des RyR2 und somit einer Steigerung der diastolischen Öffnungswahrscheinlichkeit in die Kalziumhomöostase eingreifen (95). Durch die spontanen Kalziumfreisetzungen aus dem SR („Kalziumsparks“) während der Diastole entsteht ein gesteigertes sarkoplasmatisches Kalziumleck, was zu einer reduzierten Kalziumkonzentration im SR führt (95). Bei der anschließenden Kalziumeliminierung in das SR wiederum spielt die SERCA2a eine große Rolle. Deshalb werden Kalziumsparks als wichtiges Surrogat von DADs und getriggerten Arrhythmien betrachtet (56, 117, 118). Auch wird durch den vorherrschenden Kalziumüberschuss die CaMKII über die vermehrte Bindung von Kalzium an Calmodulin verstärkt aktiviert (56, 103). Während EADs noch vor einer vollständigen Repolarisation erscheinen und daher eine Verlängerung des Aktionspotenzials zur Folge haben, treten DADs erst nach der vollständigen Repolarisation der Zelle aufgrund des erhöhten intrazellulären Kalziumgehalts auf. Sowohl EADs als auch DADs sind ein Trigger für die Genese von Arrhythmien (104).

1. Einleitung

1.5.5 CaMKII-abhängige Dysregulation der zellulären Natriumhomöostase

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav) spielen eine überaus wichtige Rolle in der Erregungsweiterleitung des Herzens. Unter physiologischen Bedingungen werden sie innerhalb von wenigen Millisekunden nach ihrer Aktivierung wieder inaktiviert. Der vorherrschende Natriumkanal im Herzen ist die Isoform $\text{Nav}1.5$ (119). Er hat den größten Anteil am initialen Natriumspitzenstrom, welcher als steilen Aufstrich des Aktionspotenzials erkennbar wird. Wie die anderen spannungsabhängigen Ionenkanäle werden auch $\text{Nav}1.5$ -Kanäle sehr schnell aktiviert, aber ebenso rasch wieder inaktiviert. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen kann es jedoch nach dem Natriumspitzenstrom zu einem zwar geringeren, aber kontinuierlichen Natriumeinstrom während des gesamten Aktionspotenzials kommen, welcher als verzögerter oder auch später Natriumeinstrom bezeichnet wird (120, 121). Obwohl die Amplitude des verzögerten Natriumeinstroms im Vergleich zum anfänglichen Natriumspitzenstrom relativ gering ist, wird der Strom infolge seiner langen Persistenz und der späten Inaktivierung der Natriumkanäle vor allem unter pathophysiologischen Konditionen äußerst relevant (122, 123).

Glynn et. al konnten zeigen, dass die Regulation des $\text{Nav}1.5$ durch die CaMKII über eine Phosphorylierung am Ser571 erfolgt (101). Eine pathologisch erhöhte Aktivität der CaMKII kann folglich zu verschiedenen Pathologien wie Arrhythmien, kardialen Umbauprozessen und anderen Erkrankungen führen, welche unter anderem durch den gesteigerten verzögerten Natriumstrom unterstützt werden (101, 122). Dieser erhöhte verzögerte Natriumeinstrom kann eine gesteigerte intrazelluläre Natriumkonzentration (*Natrium-Overload*) induzieren (117, 121). Die gesteigerte Natriumkonzentration wiederum kann zur Erhöhung des Membranpotentials und damit zur Aktivierung von spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen führen. Ebenso kann ein Anstieg des verzögerten Natriumeinstroms und eine damit einhergehenden verlängerte Aktionspotenzialdauer auch direkt zu proarrhythmischen Ereignissen wie EADs führen (120, 124, 125). Durch die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration wird der *reverse mode* des Natrium/Kalzium-Austauschers aktiviert, der zum Natriumexport aus der Zelle und Kalziumeinstrom führt (122, 126, 127). Das wiederum kann zum proarrhythmischen Kalziumüberschuss führen (126, 128). In der weiteren Konsequenz wird bei einem diastolischen Kalziumüberschuss die CaMKII vermehrt aktiviert, was zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 führt. Das

1. Einleitung

daraus resultierende Kalziumleck begünstigt wiederum die Entstehung von DADs. Ebenso wird die Aktivität des NCX durch den diastolischen Kalziumüberschuss erhöht, um die Kalziumionen aus der Zelle zu transportieren (6, 122). Diese Mechanismen verdeutlichen den engen Zusammenhang zwischen dem Natrium- und Kalziumhaushalt in den Kardiomyozyten.

Neben der Phosphorylierung der Kanäle durch Proteinkinasen können die spannungsabhängigen Natriumkanäle durch freien ROS direkt oxidiert und damit aktiviert werden. Einige voneinander unabhängige Studien konnten beobachten, dass vor allem die Zunahme des verzögerten Natriumeinstroms unter den Konditionen einer erhöhten ROS-Generierung große Auswirkungen im Hinblick auf die arrhythmogene Aktivität und die kontraktile Dysfunktion hat. So führt eine ROS-induzierte Erhöhung des verzögerten Natriumeinstroms zu einer Verlängerung des Aktionspotenzials und zur Induktion von EADs (85, 117). Ebenso kann die Aktivität der Natrium/Kalium-ATPase durch freie ROS deutlich vermindert werden, was einen zellulären Natriumüberschuss zur Folge hat (129). Im Gegenzug kann ein gestörter Ionenhaushalt zur weiteren Progression kardialer Erkrankungen führen. So bewirkt ein erhöhter verzögerter Natriumeinstrom eine vermehrte ROS-Produktion, was wiederum die vermehrte Aktivierung der CaMKII mit allen bereits genannten proarrhythmogenen Konsequenzen zur Folge hat (88). Auch führt die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration über die vermehrte Bildung von ROS zur verminderten Aufnahme von Kalziumionen in die Mitochondrien (130). Neben einem gesteigerten Natriumgehalt kann auch die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration eine vermehrte mitochondriale ROS-Generierung induzieren (131).

1. Einleitung

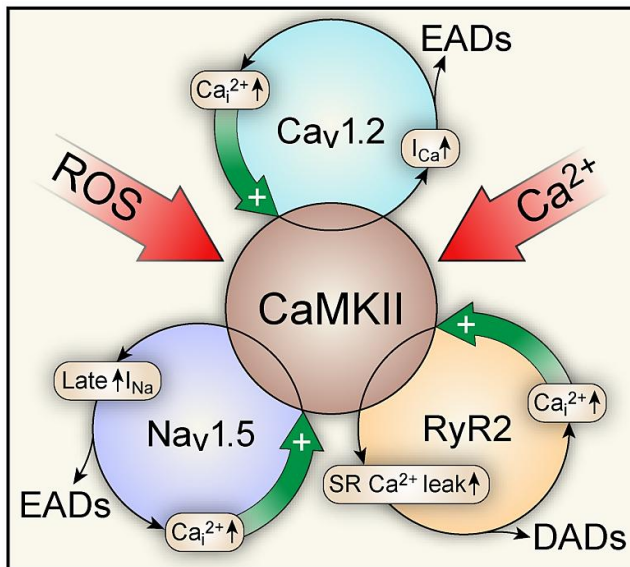


Abbildung 9 - Auswirkungen einer erhöhten CaMKII-Aktivierung (95)

Erklärung zu Abbildung 9: Die CaMKII wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder aufgrund der Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies verstärkt aktiviert. Daraufhin phosphoryliert sie L-Typ Kalziumkanäle (Cav1.2), welche dadurch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit aufweisen und so über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu EADs führen. Auch die Phosphorylierung von Natriumkanälen (Nav1.5) führt zur einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit und infolgedessen zur Erhöhung des verzögerten Natriumeinstroms, welcher ebenfalls EADs begünstigt. Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 erhöht das SR Kalziumleck und somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration, was wiederum die Aktivität des Natrium/Kalzium-Austauschers steigert und deshalb über den vermehrten Natriumeinstrom auch die Entstehung von DADs fördert.

Bisher ist allerdings unklar, welche Natriumkanal-Isoformen am wichtigsten für die Entstehung des verzögerten Natriumeinstroms sind. Bei Patienten mit SBAS konnte beobachtet werden, dass die Expression des Nav1.5 im Vergleich zu Patienten ohne SBAS vermindert ist. Im Zusammenhang damit konnte auch eine Reduktion des initialen Natriumspitzenstroms beobachtet werden. Interessanterweise war der verzögerte Natriumeinstroms in den Kardiomyozyten bei Patienten mit SBAS ebenso wie die CaMKII-Aktivität jedoch signifikant erhöht (6). Das weist darauf hin, dass neben dem dominanten Nav1.5 vor allem bei der Entstehung des verzögerten Natriumeinstroms unter pathologischen Konditionen auch andere, bisher weniger

1. Einleitung

erforschte Natriumkanal-Isoformen CaMKII-abhängig eine bedeutsame Rolle spielen. Dabei rückte vor allem der Natriumkanal Nav1.8 in letzter Zeit in den Fokus der Wissenschaft. So konnten Lebek et. al. kürzlich zeigen, dass in atrialen Biopsien von Patienten mit SBAS neben der Erhöhung des verzögerten Natriumeinstroms auch die Expression des SCN10A-Gens, welches für den Nav1.8 kodiert, deutlich gesteigert ist (132). Diese Hypothese unterstützend wiesen Macri et al. sowie Maier et al. bereits die Assoziation einiger Varianten des SCN10A-Gens mit einem verzögerten Natriumeinstrom nach (133, 134). Auch Dybkova et al. zeigen, dass dieser Natriumkanal unter pathologischen Konditionen am erhöhten verzögerten Natriumeinstroms beteiligt ist (122).

Erstmals wurde der Nav1.8 in sensorischen Neuronen von kleinem bis mittlerem Durchmesser beobachtet, welche die Schmerzwahrnehmung vermitteln (135). Die mRNA des Nav1.8 konnte jedoch auch sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Kardiomyozyten von Mäusen (136, 137), ebenso wie in humanem Gewebe nachgewiesen werden, wobei die Expression im Vorhof deutlich höher als im Ventrikel zu sein scheint (137, 138). Verschiedene *Genome-wide association*-Studien lieferten erste Hinweise auf die Beteiligung der Nav1.8-Kanäle bei der atrialen Erregungsleitung (139, 140). So wurde gezeigt, dass der Nav1.8 die kardiale Erregungsleitung über einen Einfluss auf das PR- und QRS-Intervall modulieren kann (141). Casini et al. beobachteten, dass der Nav1.8 unter physiologischen Bedingungen keine große Rolle in der kardialen Elektrophysiologie zu spielen scheint (142). Das ändert sich jedoch deutlich unter pathologischen Bedingungen, da der Natriumkanal über seinen Einfluss auf den verzögerten Natriumeinstrom eine tragende Rolle bei der Aktionspotenzial-Verlängerung spielen kann. So könnte er die Ursache für potenzielle proarrhythmische Trigger wie der erhöhten Wahrscheinlichkeit für EADs und DADs beispielsweise im Rahmen einer Herzinsuffizienz darstellen (122). Weiterhin wurde festgestellt, dass verschiedene Varianten des Nav1.8 mit der Entstehung von Vorhofflimmerns assoziiert sind (143). Auch der Zusammenhang von SCN10A-Polymorphismen mit der Veränderung der Herzfrequenz und dem Arrhythmie-Risiko wurde demonstriert (140, 144). Des Weiteren konnten mehrere Studien an isolierten Kardiomyozyten von Mäusen mit einem genetischen Knock-out des Nav1.8 einen geringeren verzögerten Natriumeinstrom sowie eine signifikante Verkürzung des Aktionspotenzials im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nachweisen (136, 137, 145). Durch eine

1. Einleitung

pharmakologische Nav1.8-Blockade waren proarrhythmische Ereignisse reversibel, weshalb die Inhibitoren als neuer medikamentöser Ansatz eine wichtige Rolle in der Therapie der Herzinsuffizienz spielen könnten (145, 146). Vor allem der selektive Nav1.8-Inhibitor PF-01247324 scheint ein potenzieller Kandidat für weitere präklinische Studien *in vivo* zu sein, da er eine hohe orale Bioverfügbarkeit aufweist (146). Weiterhin konnte dieser Inhibitor bei humanen atrialen Kardiomyozyten eine deutliche Reduktion von EADs, DADs und spontanen Aktionspotenzialen erzielen (137). Auch der gesteigerte verzögerte Natriumeinstrom sowie die Inzidenz von Arrhythmien konnte in atrialen Biopsien von Patienten mit SBAS durch eine Inhibition des Nav1.8 mittels PF-01247324 signifikant reduziert werden (132). Ein besonderer Vorteil von PF-01247324 ist seine äußerst hohe Selektivität für den Nav1.8. Selbst in sehr hohen Konzentrationen nimmt die Substanz kaum Einfluss auf andere Natriumkanäle (146).

Richtungsweisend konnten Bengel et al. kürzlich erstmals nachweisen, dass ein Zusammenhang zwischen der CaMKII und dem Nav1.8 besteht. So zeigte sich, dass Mäuse mit einer transgenen Überexpression der CaMKII einen erhöhten verzögerten Natriumeinstrom aufweisen, welcher sowohl durch die pharmakologische Blockade des Nav1.8 als auch durch dessen genetische Ablation deutlich reduziert werden konnte (147). Im Rahmen dieser Studie wurde auch bei isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit einer Herzinsuffizienz gezeigt, dass sowohl eine Nav1.8-Blockade als auch eine CaMKII-Inhibition den verzögerten Natriumeinstrom signifikant reduziert. Die gleichzeitige Blockade beider Ziele dagegen erzielte im Vergleich zur alleinigen CaMKII-Inhibition keine weitere Reduktion des verzögerten Natriumeinstroms. Ebenso konnte nach der Nav1.8-Blockade beobachtet werden, dass das erhöhte SR Kalziumleck infolge einer übermäßigen CaMKII-Aktivität reduziert wurde (147). Grundlegend für diese Dissertation zeigten Lebek et. al darüber hinaus vor kurzem eine signifikante Korrelation zwischen der myokardialen Expression der mRNA des SCN10A-Gens und der Schwere der Atemstörung bei Patienten mit SBAS (132).

1.6 Fragestellung der Dissertation

Aufgrund der hohen klinischen Bedeutung schlafbezogener Atemstörungen im Kontext von Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz ist das Verständnis der genauen pathophysiologischen Veränderungen unerlässlich, um neue therapeutische Wege zu identifizieren. Es existieren zwar bereits experimentelle Studien an murinen und humanen Kardiomyozyten rund um den Zusammenhang zwischen schlafbezogenen Atemstörungen und ihren kardiovaskulären Folgeerkrankungen, jedoch haben diese Studien Limitationen. Bei der Untersuchung von Patientenproben mussten sich die Studien mit einer Vielzahl an Komorbiditäten als mögliche Confounder auseinandersetzen. Somit waren die beobachteten Effekte nur bedingt auf die schlafbezogene Atemstörung zurückzuführen. Weitere Studien mit SBAS-Mausmodellen waren limitiert durch eine Induktion der SBAS unter Anästhesie oder die Verwendung von New Zealand Obese Mäusen, welche durch ihr erhöhtes Gewicht neben SBAS eine Vielzahl von weiteren Erkrankungen aufweisen (148, 149).

Im Rahmen meiner Promotion habe ich mithilfe eines neuartigen SBAS-Mausmodells unter Ausschluss potenziell beeinflussender Komorbiditäten den intrazellulären ROS-Gehalt bei Mäusen mit einer Obstruktion der oberen Atemwege untersucht, um einen möglichen Anhalt auf eine vermehrte oxidative CaMKII-Aktivierung zu erforschen. Zudem habe ich den Natriumstoffwechsel unter Einfluss der CaMKII und dabei insbesondere die Rolle des neuronalen Natriumkanals Nav1.8 bei SBAS analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei folgende Fragestellungen überprüft:

1. Zeigen Kardiomyozyten von Mäusen mit einer obstruktiven SBAS eine gesteigerte Produktion von mitochondrialen bzw. zellulären reaktiven Sauerstoffradikalen?
2. Besteht eine CaMKII-abhängige Verbindung zwischen der obstruktiven SBAS und der Höhe der intrazellulären Natriumkonzentration in isolierten Kardiomyozyten?
3. Welche CaMKII-abhängigen Auswirkungen hat eine obstruktive SBAS auf den Kontraktionszyklus der isolierten Kardiomyozyten?
4. Lassen sich die CaMKII-abhängigen Veränderungen der zellulären Natriumkonzentration und im Kontraktionszyklus durch eine gezielte Nav1.8-Inhibition verhindern?

2. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem neuartigen Mausmodell, welches sich von bisherigen tierexperimentellen Ansätzen unterscheidet (111, 148, 149). Dieses ermöglicht die Untersuchung der oben genannten Fragestellungen im Rahmen einer obstruktiven SBAS ohne Beeinflussung von etwaigen Komorbiditäten. Die Isolation der Kardiomyozyten sowie die anschließenden konfokal- und epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten acht Wochen nach der SBAS-Induktion.

2.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden von der zuständigen Tierschutzkommission im Rahmen des Tierversuchsantrags „perkMitoCa“ (Regierung von Unterfranken, Bayern, AZ 55.2-2532-2-5-12) genehmigt und unter Berücksichtigung der *Guide for the care and use of Laboratory Animals* (150) durchgeführt. Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Regensburg unter Standardbedingungen (Temperatur 23 ± 2 °C, Luftfeuchtigkeit: 55 ± 5 %, Hell-Dunkel-Intervall: 12h, Futter und Wasser ad libitum).

In den Versuch wurden ausschließlich männliche Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund im Alter von 8-12 Wochen eingeschlossen. Untersucht wurden die Fragestellungen an Wildtyp (WT) Mäusen sowie an Mäusen mit einem herzspezifischen CaMKII δ -Knock-out (CaMKII $\delta^{-/-}$).

2.1.1 Operationsablauf

Um die Verengung der Atemwege zu imitieren und damit eine SBAS zu induzieren, wurde den 8-12 Wochen alten Mäusen 100 μ l Polytetrafluorethylen (PTFE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einer Partikelgröße von 35 μ m und einer Dichte von 2,1 g/ml in das pharynxnahe Bindegewebe der Zunge injiziert (151). Polytetrafluorethylen ist ein inertes Kunststoffpolymer (s. Abbildung 10), welches sich in der plastischen Chirurgie und auch der Urologie beispielsweise bei der Behandlung des primären vesikoureteralen Rückflusses etabliert hat (152).

2. Material und Methoden

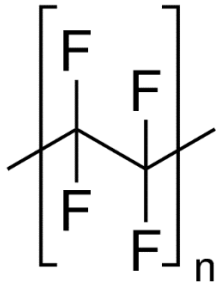


Abbildung 10 - Strukturformel von PTFE (©Sigma Aldrich)

Für die Intervention wurden 50 mg der Substanz mit 100 µl Glycerol (50% w/v, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Lösung gebracht. Somit enthielt das Gesamtvolumen eine Menge von 24 µl reinem PTFE. Die Operation erfolgte an 18 Wildtyp- und 10 CaMKIIδ Knock-out Tieren, wobei 13 Wildtyp- und 11 CaMKIIδ^{-/-}- Mäuse als Kontrollen in den Versuch aufgenommen wurden. Die PTFE-Injektion wurde durch meine Betreuer Prof. Dr. Simon Lebek und Dr. Philipp Hegner, Assistenzärzte der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg, durchgeführt.

Vor Operationsbeginn wurden die Mäuse nach Bestimmung des Körpergewichts durch eine intraperitoneale Injektion von Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht [KG]) analgesiert. Anschließend erfolgte die Anästhesie durch eine intraperitoneale Gabe von Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) sowie Fentanyl (0,05 mg/kg KG). Nach dem Wirkeintritt wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert und die Körpertemperatur kontinuierlich mit einer rektalen Sonde kontrolliert (s. Abbildung 11). Zusätzlich wurde auch die Anästhesie während der gesamten Intervention überwacht. Die murine Zunge wurde mithilfe einer kleinen Krokodil-Klemme so weit wie möglich aus der Mundhöhle mobilisiert, um einen optimalen Zugang zum Zungengrund zu erlangen (s. Abbildung 12). Dort wurde durch eine 27G-Kanüle 100 µl der zuvor beschriebenen Lösung injiziert (s. Abbildung 13). Um eine möglichst ausgewogene Vergrößerung der Zunge zu erzielen, wurde anstatt eines einzigen großen Bolus viele kleinere Depots an dorsalen und ventralen Stellen der Zunge angelegt. Anschließend wurde die Zunahme des Zungendiameters stichprobenartig sonographisch bestätigt (151). Das Ziel war es, eine vergleichbare Verengung des oberen Atemweges wie bei New Zealand Obese – Mäusen zu erreichen. Diese zeigten in vorangegangenen Studien ein signifikantes Auftreten von spontanen Apnoen (148). Nach der Operation wurde die Anästhesie mithilfe einer

2. Material und Methoden

intraperitonealen Injektion von Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) antagonisiert. Zusätzlich erhielten die Tiere erneut Buprenorphin (0,1 mg/kg KG). Für jeden Operationstag wurde die gleiche Anzahl an unbehandelten Wurfgeschwistern als Kontrollmäuse in den Versuch aufgenommen, wobei die Zuteilung zu Operations- und Kontrollgruppe kurz vor Interventionsbeginn per Zufall erfolgte.

Postoperativ wurde täglich eine visuelle Kontrolle durchgeführt. Dabei wurden die Zunge, die Fellpflege, die Nahrungsaufnahme, die Bewegungen und die Interaktion mit anderen Mäusen analysiert. Alle Beobachtungen wurden in einem separaten Laborbuch festgehalten. Falls eine Maus ein abnormes Verhalten präsentierte, wurde sie im Sinne des Tieres von ihren Leiden erlöst.



Abbildung 11 - Fixierung und Überwachung der Vitalparameter



Abbildung 12 - Mobilisierung der Zunge

2. Material und Methoden



Abbildung 13 - Injektion eines PTFE-Depots am ventralen Zungengrund

2.1.2 Sonographische Kontrolle des Zungendiameters

Die Zungengröße wurde bereits während der PTFE-Injektion sonographisch kontrolliert. Dafür wurde die Zunge der in Rückenlage auf der Heizplatte fixierten Maus mithilfe einer Krokodil-Klemme gegriffen. Anschließend wurde eine kleine Menge an Ultraschall-Gel auf der murinen Kehle und dem Unterkiefer verteilt. Die Nasenlöcher durften dabei nicht mit dem Gel bedeckt werden, um eine mögliche Atembehinderung zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Anlage eines 30 MHz Frequenz-Transducer (Vevo 3100-System von VisualSonics, Toronto, Kanada) in medianer Position auf der murinen Kehle und der dorso-ventrale Zungendurchmesser in sagittaler Ebene konnte gemessen werden. In regelmäßigen Abständen wurde der Ultraschallkopf zusätzlich um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, um auch den lateralen Zungendurchmesser in transversaler Ebene zu erfassen (151). Die Aufnahmen erfolgten mit einer Bildwiederholfrequenz von 56 Aufzeichnungen pro Sekunde (Gain 30 dB). Für die optimale Bildvergrößerung wurde eine Tiefe von 10,00 mm und eine Weite von 15,36 mm gewählt (151). Da die Voreinstellung von VisualSonics genutzt wurden war keine zusätzliche Kalibrierung erforderlich. Unter vorsichtiger Mobilisierung der Zunge mithilfe der Krokodil-Klemme wurde die Zungenbeweglichkeit im Vergleich zu den anderen pharyngealen Strukturen sonographisch verglichen. Dabei konnte die Zungenoberfläche leicht vom angrenzenden Pharynxgewebe differenziert und der Zungendurchmesser gut beurteilt werden. Alle Messungen wurden auf die gleiche, standardisierte Weise sowohl vor als auch nach der PTFE-Injektion vollzogen. Um untersucherabhängige Unterschiede zu vermeiden, wurden alle Aufzeichnungen von derselben Person durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die Messung der Zungen nach erfolgter PTFE-Injektion ergab eine signifikante Zunahme des sagittalen Diameters von $2,75 \pm 0,16$ mm bei den Kontrolltieren auf $3,67 \pm 0,20$ mm bei Mäusen nach der PTFE-Injektion ($n = 31$, $p = 0,002$) (151). Auch der transversale Durchmesser der Zunge vergrößerte sich in gleicher Weise, woraus sich eine Vergrößerung der Zunge von $9,23 \pm 0,41$ mm² auf $19,90 \pm 0,86$ mm² errechnete ($n = 5$, $p < 0,001$) (151). Um zu kontrollieren, ob die PTFE-Depots auch 8 Wochen nach der Intervention noch in der Zunge vorhanden waren, wurden die sonographischen Messungen nach diesem Zeitraum und somit kurz vor der Isolation der Kardiomyozyten wiederholt. Wie in Abbildung 14 ersichtlich lag auch nach dieser Zeit weiterhin eine signifikante Vergrößerung des Zungendurchmessers im Vergleich zu den Kontrollmäusen vor ($n = 10$, $p = 0,04$) (151).

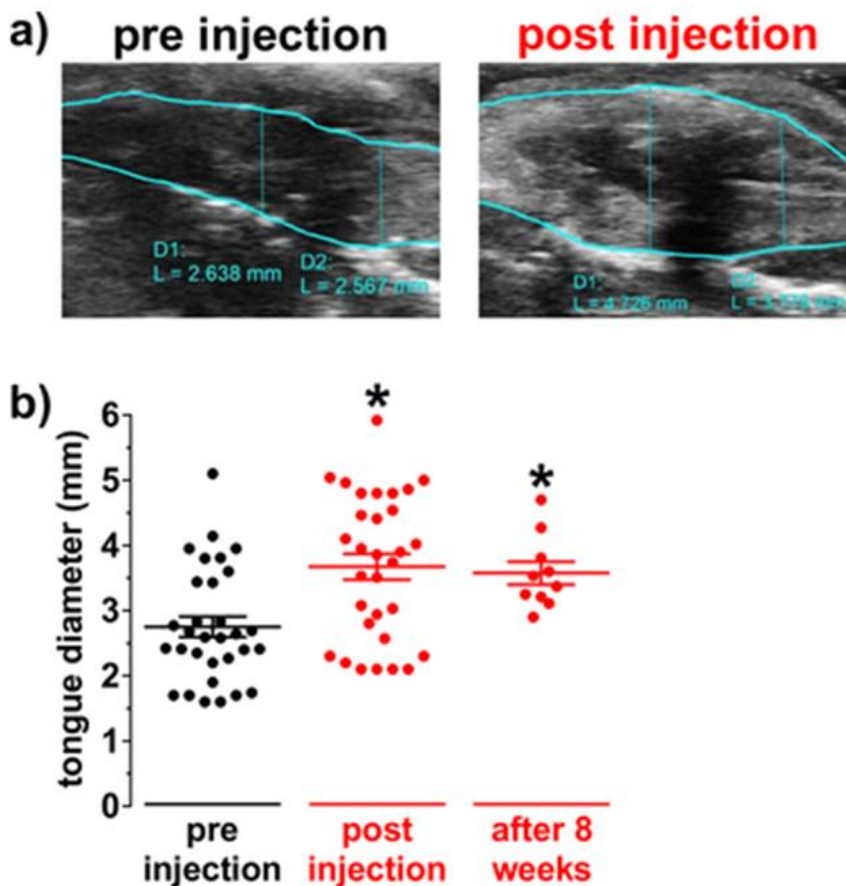


Abbildung 14 - Sonographische Messung und Vergleich des sagittalen Zungendurchmessers (151)

2. Material und Methoden

2.2 Ganzkörperplethysmographie

Zwei Wochen nach der PTFE-Injektion wurde die Atemtätigkeit aller Mäuse durch eine Ganzkörperplethysmographie (Buxco Electronics, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA) aufgezeichnet und hinsichtlich der inspiratorischen Flusslimitationen (IFLs) analysiert (FinePointe Software, Version 2.4.6.9414). Außerdem wurde erneut das Körpergewicht der Tiere bestimmt, um die Entwicklung der operierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu beobachten.

2.2.1 Aufbau des Buxco Setups

Die Mäuse wurden in die luftdicht verschließbare Plethysmographie-Kammer (Durchmesser 9 cm, Höhe 8 cm) gesetzt, welche einen Anschluss für die Ganzkörperplethysmographie (Buxco), eine Öffnung für die Flüssigkeitszufuhr und einen Luftauslass enthielt (Luftabsaugung 0,2 Liter pro Minute, Buxco Bias Flow Regulator) (s. Abbildung 15). Außerdem enthielt jede Druckmesskammer während der achtstündigen Messung ausreichend Futter. Das Gerät wurde entsprechend der Herstellerangaben regelmäßig kalibriert.

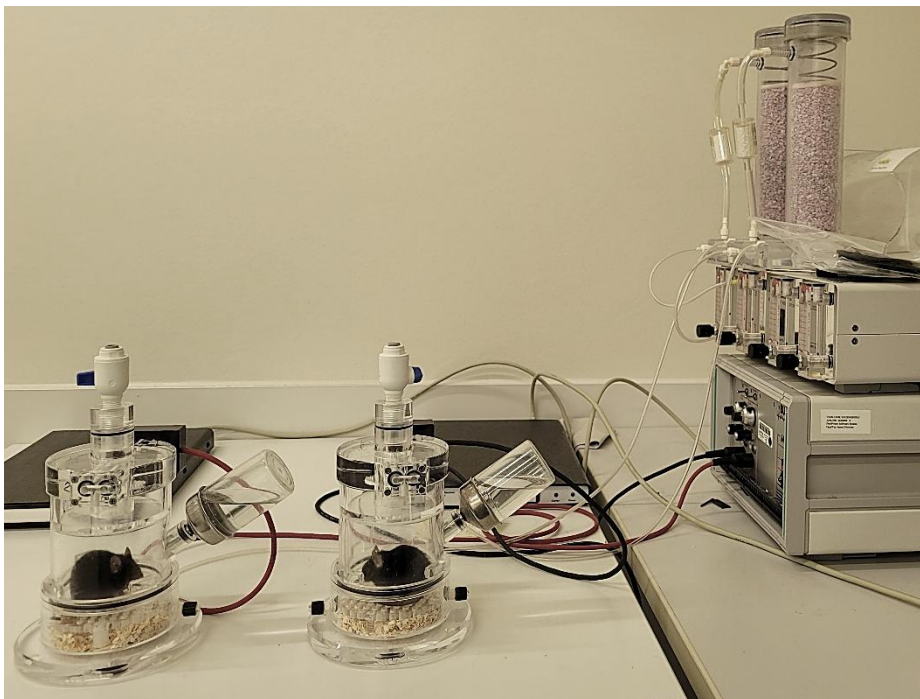


Abbildung 15 - Aufbau der Plethysmographie-Vorrichtung (Buxco-Setup)

2. Material und Methoden

2.2.2 Durchführung der Ganzkörperplethysmographien

Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, wurden die Aufnahmen (Messfrequenz 1 kHz) am Tag, also dem Zeitraum mit der höchsten Schlafdauer im murinen Ruhezyklus (153), über 8 Stunden durchgeführt. Um den Tieren einen ungestörten Schlaf zu ermöglichen, wurden die Druckmesskammern vor visuellen Störfaktoren abgeschirmt, jedoch immer darauf geachtet, dass weiterhin genügend Licht zu den Mäusen durchdrang. Auch wurden Vorkehrungen getroffen, um die akustischen Störungen auf ein Minimum zu reduzieren.

2.2.3 Auswertung der Ganzkörperplethysmographien

Mithilfe der FinePointe Software konnte die Anzahl der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde gemessen werden. Dabei wurde für jeden Atemzug das Verhältnis aus inspiratorischer Zeit und Tidalvolumen berechnet. Ein Atemzug wurde als flusslimitiert betrachtet, wenn das Verhältnis mindestens um 2,576 Standardabweichungen im Vergleich zum Mittelwert der letzten 100 Atemzüge erhöht war, was einem 99%igen Konfidenzintervall entspricht. Die Abweichung kommt entweder durch eine Verlängerung der Inspirationsdauer, durch eine Verringerung des Tidalvolumen oder durch die Kombination beider Fälle zustande. Der Cut-off Wert wurde nach einer umfassenden manuellen Auswertung der Plethysmographien gewählt. Zusätzlich wurde zur Vermeidung von falsch positiven Erfassungen der Fluss nur als flusslimitiert betrachtet, wenn sein inspiratorischer Spitzenfluss mindestens 2,576 Standardabweichungen niedriger war als der mittlere inspiratorische Spitzenfluss der letzten 100 Atemzüge. Die absolute Frequenz (pro Stunde) und die proportionale Frequenz (in Prozent) der inspiratorischen Flusslimitationen wurde als die normalisierte Anzahl entweder zum gesamten Beobachtungszeitraum oder zur Anzahl aller Atemzüge berechnet.

2. Material und Methoden

2.3 Isolation muriner Kardiomyozyten

Acht Wochen nach der PTFE-Injektion erfolgte die getrennte Isolation der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Zunächst wurden die Mäuse erneut gewogen, um das Gewicht der operierten Tiere mit dem der Kontrollmäuse zu vergleichen und eine Mangelernährung nach der Intervention ausschließen zu können. Anschließend erfolgte die Tötung durch eine zervikale Dislokation, welche von einem erfahrenen Labormitarbeiter vollzogen wurde. Daraufhin wurde die Maus zügig in Rückenlage fixiert und das Abdomen unterhalb des Zwerchfells durch eine Querinzision eröffnet. Nach Darstellung des Diaphragmas konnte der Schnitt Y-förmig über den Thorax in Richtung Axilla erweitert werden. Nachfolgend wurde die ventrale Thoraxwand nach kranial umgeklappt und so das Herz dargestellt. Nachdem die Aorta ascendens kurz vor dem Arcus aortae durchtrennt wurde, konnte das Herz mobilisiert und entnommen werden. Das Herz wurde außerhalb des Thorax vorsichtig komprimiert und gespült, um das verbliebene Blut aus den Herzhöhlen zu entfernen und eine Thrombenbildung zu verhindern. Anschließend wurde das Herzgewichts mittels einer Feinwaage (Sartorius Analytic) gemessen und dokumentiert.

Da das Herz am Ende des Aorta ascendens abgetrennt worden war, verblieb ein gut sichtbarer Aortenstumpf. Dieser wurde unter Sichtkontrolle an einem Binokular (Olympus SZ51) mit einer 18G-Nadel, welche zuvor mit Isolationstyrode entlüftet wurde, kanüliert und diese Position mit einem doppelten Maschinenknoten eines Prolene-Fadens (Ethicon Vicryl® Polyglactin 910) sowie einer kleinen Klemme fixiert. Nun konnte das Herz retrograd über die kurz oberhalb der Koronarabgänge liegende Kanäle perfundiert werden und so sowohl die Dichtheit der Verbindung zwischen Aorta ascendens und Kanüle überprüft als auch das übrige Blut aus den Koronararterien ausgewaschen werden, um thrombotische Verschlüsse zu unterbinden. Anschließend wurde die Kanüle mit dem befestigten Herzen an eine Langendorff-Perfusionsanlage (s. Abbildung 16) angeschlossen. Diese wurde vor Beginn der Isolation mit der Perfusionslösung (s. Tabelle 1) retrograd durchspült und mithilfe einer durch ein Wasserbad beheizten Blasenfalle stabil auf einer Temperatur von ca. 36,5°C gehalten. Auch der Fluss der enzymhaltigen Lösung, welche Liberase™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Trypsin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) enthielt (s. Tabelle 2), wurde durch die Blasenfalle temperiert. Der Verdau erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 3-3,5 ml/min für 8:30 Minuten. Mit

2. Material und Methoden

fortschreitender Verdauungszeit konnte eine milchglasartige Verfärbung des Herzens beobachtet werden. Während des Verdaus wurden die murine Leber, Lungen, Nieren und Gehirn entnommen, gewogen und zu späteren Forschungszwecken bei -80°C aufbewahrt. Ebenso wurde die Tibialänge als Maß für die murine Entwicklung dokumentiert.

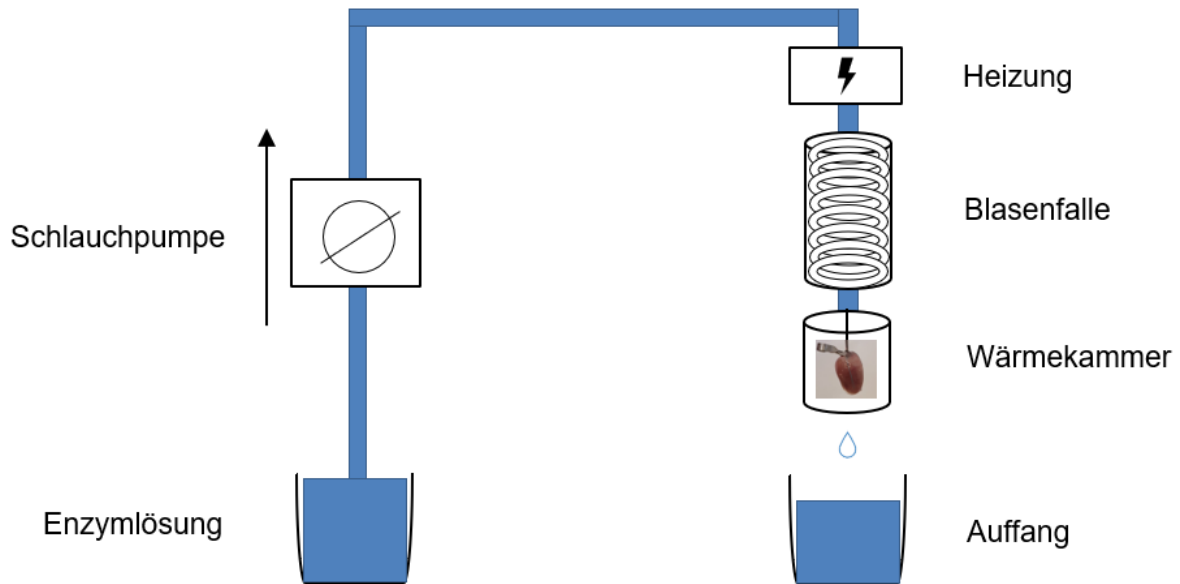


Abbildung 16 - Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. Modifiziert nach (154)

	Substanz	Konzentration	
Isolationstyrode	NaCl	113 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 bei 37 °C; eingestellt mit NaOH; Lagerung bei 4 °C
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	
	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,6 mmol/l	
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,2 mmol/l	
	NaHCO ₃	12 mmol/l	
	KHCO ₃	10 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	Taurin	30 mmol/l	
	Glucose	5,5 mmol/l	
	2,3-Butanedionmonoxim	10 mmol/l	

Tabelle 1 – Isolationstyrode, ddH₂O = zweifach destilliertes Wasser

2. Material und Methoden

	Substanz	Volumen
Enzymlösung	Isolationstyrode	15 ml
	Liberase™	105 µl = 525 µg
	Trypsin 2,5% (Gibco)	64 µl
	CaCl ₂ 10 mM	18,8 µl

Tabelle 2 – Enzymlösung

Nach Ablauf der Zeit wurde das Herz von der Kanüle genommen und die Vorhöfe unter Sichtkontrolle durch das Binokular von den Ventrikeln getrennt. Beide Herzanteile wurden separat in ca. 2,5 ml der Enzymlösung durch vorsichtige gegenläufige Zugbewegungen mit zwei Pinzetten zerkleinert. Im nächsten Schritt wurden durch das langsame Auf- und Abpipettieren einzelne Kardiomyozyten aus dem Zellverband gelöst. Anschließend konnte der Verdau durch eine Stopplösung mit 10% BCS (bovine calf serum, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (s. Tabelle 3) beendet werden. Die Zellsuspension wurde daraufhin durch eine Nylongaze mit einem Porendurchmesser von 200 µm in ein 15 ml Falconröhrchen geleitet, um größere unverdaute Zellverbände herauszufiltern.

	Substanz	Volumen
Stopplösung 1	Isolationstyrode	2,25 ml
	Bovine calf serum (BCS)	0,25 ml
	CaCl ₂ 10 mM	3,125 µl

Tabelle 3 - Stopplösung 1

Im letzten Schritt der Isolation wurden die Zellen durch einen langsamen Anstieg stufenweise an die spätere Kalziummesskonzentration von 1 mmol/l gewöhnt, um eine Schädigung der Kardiomyozyten durch einen zu schnellen Kalziumanstieg zu vermeiden. Zuerst konnten die vitalen Kardiomyozyten in einer 7-minütigen manipulationsfreien Zeit absinken, damit sich ein Zellpellet bildete. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand der Suspension abpipettiert, verworfen und die erste Lösung des Kalziumaufbaus mit einer Kalziumkonzentration von 0,1 mmol/l (s. Tabelle 4) hinzugegeben. Das Kalzium wurde dabei in einer leicht modifizierten Stopplösung gelöst (s. Tabelle 5). Anschließend wurde eine erneute Sedimentationszeit von 7 Minuten eingehalten. In den 3 folgenden Aufbausritten wurde dieser Vorgang mit einer kontinuierlich ansteigenden Kalziumkonzentration (0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l und

2. Material und Methoden

0,8 mmol/l) wiederholt. Die endgültige Kalziummesskonzentration von 1 mmol/l wurde erst bei der Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff erreicht. Die restlichen, nicht in den Versuch eingeschlossenen Myokardzellen, wurden ebenfalls bei -80 °C für spätere Western Blot Experimente aufbewahrt.

	Schritt	CaCl ₂ Konzentration	Volumen CaCl ₂ 100 mM	Volumen CaCl ₂ 100 mM
Kalzium Aufbaulösung	1	0,1 mM	10 µl	Jeweils auf 10 ml Zielvolumen in Stopplösung 2 gelöst
	2	0,2 mM	20 µl	
	3	0,4 mM	40 µl	
	4	0,8 mM	80 µl	

Tabelle 4 - Kalzium Aufbaulösung

	Substanz	Volumen
Stopplösung 2	Isolationstyrode	47,5 ml
	Bovine calf serum (BCS)	2,5 ml

Tabelle 5 - Stopplösung 2

2. Material und Methoden

2.4 Konfokalmikroskopie

Um die Produktion von ROS in den Kardiomyozyten der operierten Tiere mit dem der Kontrolltiere vergleichen zu können, wurde die Konfokalmikroskopie als Analysetechnik gewählt.

2.4.1 Grundlagen

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der konfokalen Lasermikroskopie nur eine bestimmte Schnittebene der Zelle betrachtet. Es kommt also nicht zur Überlagerung der Bildinformationen durch das Licht aus den benachbarten Ebenen. Das gesamte Setup des Konfokalmikroskops besteht aus einer Lichtquelle, dem Mikroskop, einem Scan-Modul, einem Photomultiplier, einem Steuerungsmodul und einem Rechner mit der entsprechenden Software. Die punktgenaue Fokussierung und Abbildung in horizontaler Schnittebene wird durch ein technisch sehr aufwändiges Konstrukt bestehend aus Linsen und Lochblenden (Pinhole) erreicht, welche das Licht außerhalb der fokussierten Ebene ausblendet (s. Abbildung 17). Als Lichtquelle ist ein Laser besonders gut geeignet, da er Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt konzentriert. So kann die punktgenaue Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes zu einem Zeitpunkt erfolgen. Bei der Messung werden Line-Scans mit einer festgelegten Länge von 35,6 μm (512 Pixel) durch die Zelle gelegt. Durch einen Laserscan wird zunächst nur ein Bildpunkt generiert. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden über einen variablen dichroitischen Spiegel an den Photomultiplier übermittelt, der die Informationen in elektrische Spannung übersetzt und verstärkt an den Computer weiterleitet. Das gesamte Bild entsteht, indem der Laser die Zelle Stück für Stück abtastet und der Rechner die Rasterung im zeitlichen Verlauf aufzeichnet. Da der Photomultiplier nur Grauwerte erfasst, werden die Bilder zur besseren Darstellung künstlich angefärbt. Dies sowie die Steuerung der Anlage und die Erfassung der Daten erfolgte automatisiert durch die Software LSM Pascal (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland).

2. Material und Methoden

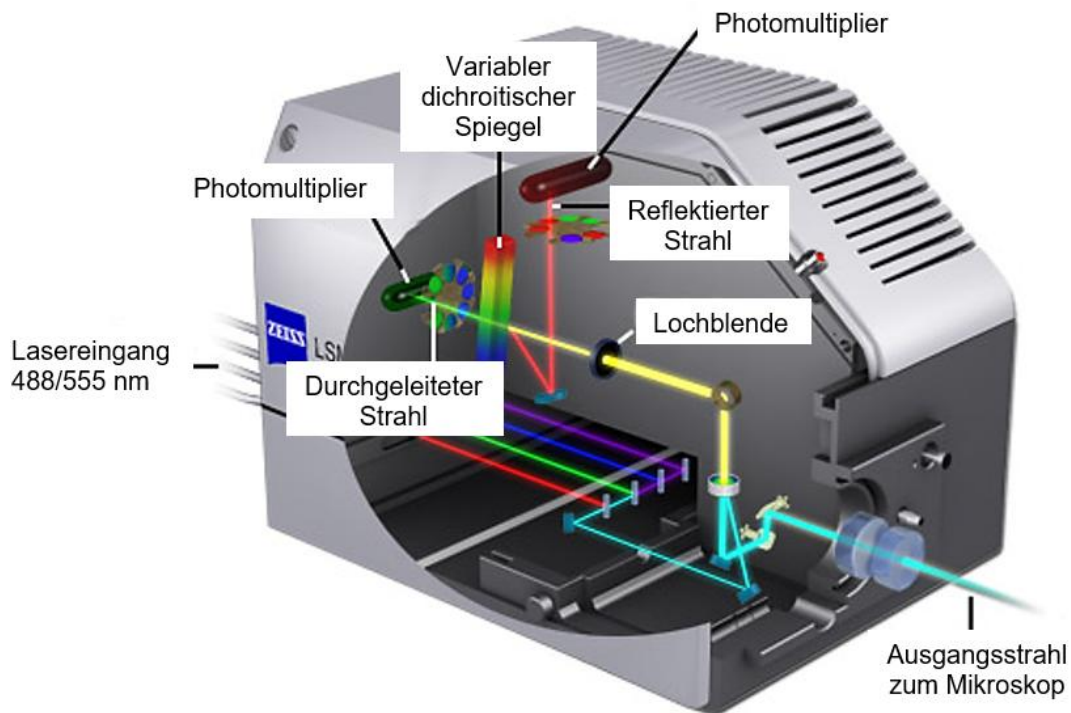


Abbildung 17 - Schematischer Aufbau des Konfokalmikroskops (Zeiss LSM 700). Modifiziert nach (155).
Bildquelle: Carl Zeiss

2.4.2 Versuchsdurchführung

Die getrennte Isolation atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten sowie der Kalziumaufbau erfolgte wie bereits beschrieben. Die Untersuchung der Kardiomyozyten erfolgte in speziell gefertigten Messkammern. Um die Kardiomyozyten am Objektträger zu fixieren, wurde die befüllbare Oberseite der Messkammer gleichmäßig mit 3,5 μl Laminin (L2020-1MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) beschichtet. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das als physiologischer Bestandteil der Basalmembran eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt und während den Messungen als Klebereiweiß fungierte. Nach dem letzten Kalziumaufbauschnitt wurden nun jeweils 400 μl der Zellsuspension in die Messkammern überführt. Anschließend konnten die Zellen in einer 15-minütigen manipulationsfreien Zeit sedimentieren und an das Laminin anhaften, bevor die Inkubation mit dem Farbstoff begann.

Nach der 15-minütigen Sedimentationszeit wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Inkubator bei 37 °C in einem lichtundurchlässigen Behälter inkubiert. Die ROS im Zytoplasma der Zelle wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CellRox™ Orange (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) detektiert. Bei

2. Material und Methoden

diesem Farbstoff handelt es sich um ein membrangängiges Reagenz, das in seinem reduzierten Zustand kaum fluoreszierende Eigenschaften aufweist. Sein Absorptionsmaximum befindet sich bei $\lambda = 545$ nm. Nachdem der Farbstoff die Zellmembran überwunden hat, wird er durch ROS im Zytoplasma der Zelle oxidiert und entfaltet nun bei einer Anregungswellenlänge von 555 nm, die somit sehr dicht am Absorptionsmaximum liegt, seine fluoreszierenden Eigenschaften (s. Abbildung 18). Am Messtag wurden 2 μ l des gelieferten Farbstoffcups mit 1 μ l Pluronic F-127 (20% w/v in DMSO) und 1 ml Normaltyrode zu einem Farbstoffgemisch mit einer Konzentration von 5 μ M CellRox™ Orange vermengt. Anschließend wurden 250 μ l des Farbstoffes auf die Zellen pipettiert und es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde der überschüssige Farbstoff aus der Messkammer entfernt und 400 μ l Normaltyrode hinzugegeben. Nachdem die Kammer in die Messvorrichtung am Konfokalmikroskop eingespannt wurde, erfolgte die Messung der zellulären ROS.

Neben der Detektion der zellulären ROS wurde auch die Menge der mitochondrialen ROS gemessen. Dafür wurde der Farbstoff MitoSox™ Red (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 510$ nm verwendet. Dieses Fluoreszenzagens permeiert nach Zelleintritt spezifisch in die Mitochondrien und entfaltet dort ebenfalls nach der Oxidation durch Superoxidionen seine fluoreszierenden Eigenschaften bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (s. Abbildung 19). Vorab wurde der Farbstoff mit 13 μ l DMSO vermischt, in lichtgeschützte Eppendorf-Cups zu je 2 μ l aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am jeweiligen Messtag wurde 1 μ l der Lösung mit 1 μ l Pluronic F-127 (20% w/v in DMSO) und 1 ml Normaltyrode angesetzt. Danach konnten 250 μ l des Farbstoffgemisches mit der Konzentration von 5 μ M auf die Zellen pipettiert werden und die Zellen ebenfalls bei 37 °C für 10 Minuten inkubieren, ehe die Messungen am Mikroskop begannen.

2. Material und Methoden

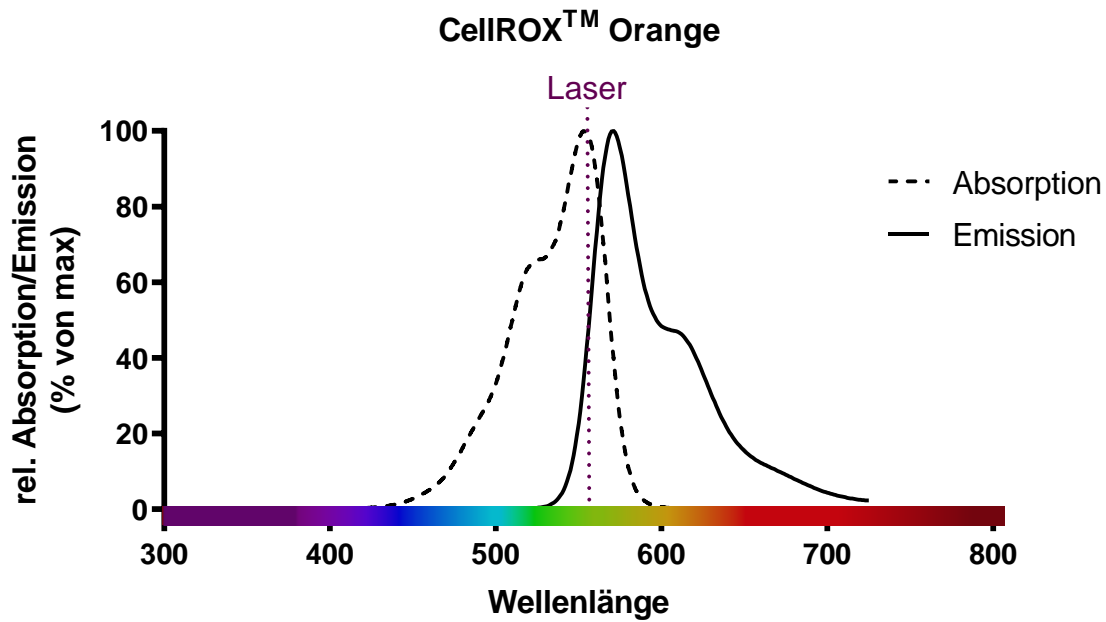


Abbildung 18 - Relative Absorption/Emission von CellRox™ Orange (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectralviewer (156))

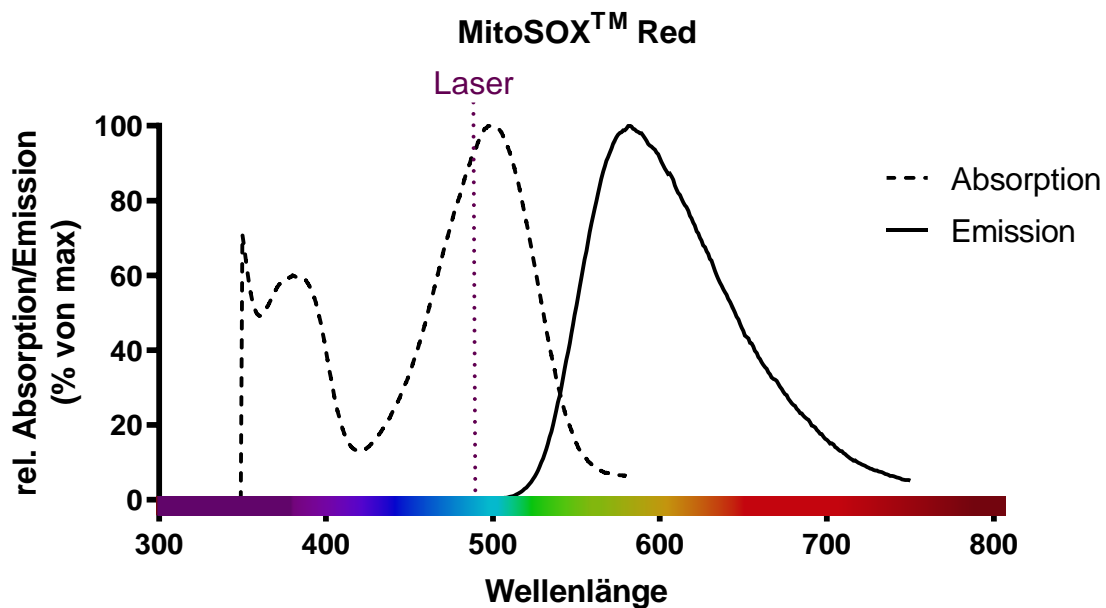


Abbildung 19 - Relative Absorption/Emission von MitoSox™ Red (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectralviewer (156))

Zunächst wurde jeweils zum Zeitpunkt 0 ein basales Bild der Zelle erzeugt. Der gemessene Fluoreszenzwert galt als zugrundeliegender Ausgangswert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 60 Sekunden eine Messung der Fluoreszenzintensität durchgeführt. In den Zeiträumen zwischen den einzelnen

2. Material und Methoden

Aufnahmen erfolgte die elektrische Stimulation der Zellen bei 1 Hz (20 V für 4 ms), welche während der Bildaufzeichnung kurzzeitig pausiert wurde, um eine störungsfreie Erfassung der gesamten Zelle zu gewährleisten. Bei den Messungen wurde ein 40x Objektiv (Ölimmersion) verwendet. Um die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden neben der Beladung auch die Aufnahmeeinstellungen am Mikroskop standardmäßig immer gleich angewendet. Für die Bildaufnahmen wurden die folgenden Einstellungen verwendet.

Aufnahmeeinstellungen CellRox™ Orange:

Lasertransmission = 2,0 (in Prozent)

Pinhole 3,97 AU (Airy Units), entspricht einer Schichtdicke von 3,5 µm

Signalverstärkung: Maser Gain = 550

Auflösung = 512x512 Pixel bei 16 Bit Tiefe, mit maximaler Aufnahmegeschwindigkeit

Aufnahmeeinstellungen MitoSox™ Red:

Lasertransmission = 4,0 (in Prozent)

Pinhole 3,97 AU (Airy Units), entspricht einer Schichtdicke von 3,1 µm

Signalverstärkung: Maser Gain = 650

Auflösung = 512x512 Pixel bei 16 Bit Tiefe, mit maximaler Aufnahmegeschwindigkeit

2.4.3 Auswertung

Mithilfe des Programms ImageJ konnte die Intensität des detektierten Signals ausgewertet werden. Dafür wurde ein Polygon um die gemessene Zelle gezeichnet. In diesem Polygon wurde die mittlere Fluoreszenzintensität als Zahlenwert ohne Einheit gemessen. Der Vorgang wurde für alle detektierten Bilder einer Messreihe wiederholt. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend auf die Hintergrundfluoreszenz normalisiert. Danach erfolgte die Übertragung der Fluoreszenzwerte in Microsoft Office Excel. Die graphische Darstellung der relativen Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität im Vergleich zum basalen Fluoreszenzwert über die Zeit (ROS-Produktion) und der Vergleich der Interventionsgruppe mit der Kontrollgruppe erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 9.3.

2. Material und Methoden

2.5 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung des kardialen Natriumhaushalts unter Einfluss der CaMKII sowie die Bedeutung des Natriumkanals Nav1.8 wurden an einem Epifluoreszenzsystem (IonOptix Corporation, Westwood, MA, USA) mit einem inversen Mikroskop und Öl-Immersionsobjektiv unter 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.5.1 Grundlagen

Der Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops ähnelt dem eines Auflichtmikroskops (s. Abbildung 20). Der Objektträger wird jedoch nicht von unten durchstrahlt, sondern durch die über der Messkammer gelegene Lichtquelle beleuchtet. Die Wellenlänge, welche für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendig ist, wird mithilfe von optischen Filtern isoliert und auf die Zelle geleitet, woraufhin das Fluorochrom zu fluoreszieren beginnt.

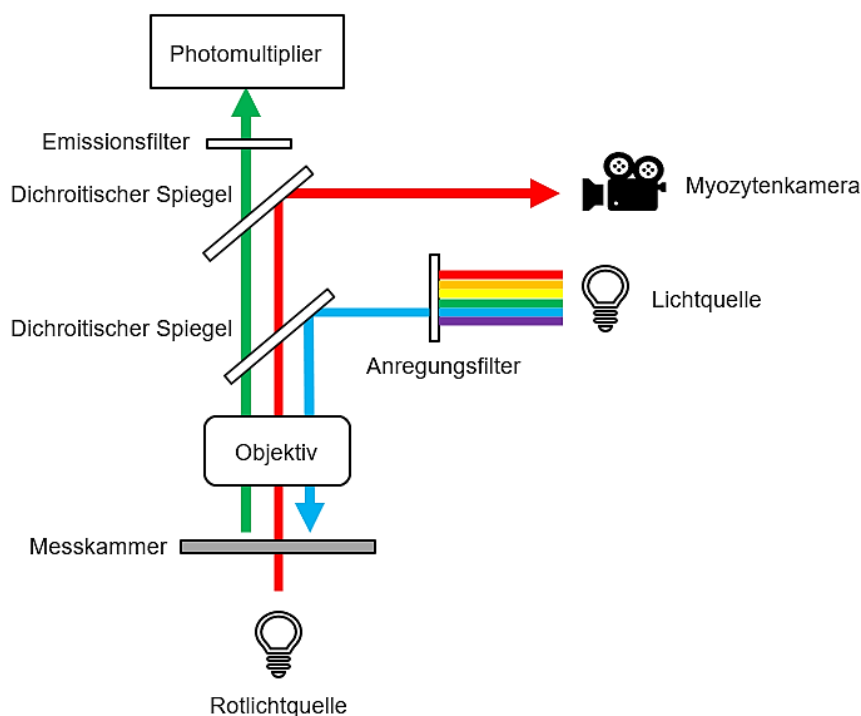


Abbildung 20 - Schematischer Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops

In der Messkammer wird bei einer 40-fachen Vergrößerung eine intakte und rhythmisch schlagende Herzmuskelzelle eingestellt. Das UV-Licht passiert einen rotierenden Spiegel (Hyperswitch), der sich mit einer Frequenz von 250 Hz dreht. Dieser wird nur bei ratiometrischen Farbstoffen benötigt, um schnell zwischen zwei

2. Material und Methoden

verschiedenen Wellenlängenbereichen alternieren zu können. Das UV-Licht wird so über zwei verschiedene Filter gelenkt. Ein Filter lässt nur Licht mit einer Wellenlänge von 340 ± 5 nm passieren, der andere nur Licht mit einer Wellenlänge von 380 ± 5 nm. Anschließend gelangt das Licht dieser beiden Wellenlängen über ein Spiegelsystem wieder in einen gleichmäßigen Lichtleiter, welcher das Anregungslicht (in der Abbildung blau) bildet. Danach wird das Anregungslicht durch einen Spiegel auf die fokussierte Zelle weitergeleitet. Bei dem Spiegel handelt es sich um einen dichroitischen Spiegel (370DCLP), welcher selektiv die beiden Lichtwellenlänge reflektiert, gleichzeitig aber Licht mit einer anderen Wellenlänge passieren lässt. Nachdem das Licht über einen weiteren dichroitischen Spiegel (400DCLP) auf die Zelle trifft und das natriumgebundene SBF1 in der Zelle mit einer Frequenz von 250 Hz abwechselnd mit den beiden Wellenlängen angeregt wird, emittiert das Fluorochrom die Lichtenergie bei den zwei bestimmten, für den Farbstoff typischen Emissions-Wellenlängen. Das emittierte Fluoreszenzlicht (in der Abbildung grün) gelangt getrennt vom Exzitationslicht über weitere dichroitische Spiegel und Filter zu einer auch als Photomultiplier bekannten Photoelektronenvervielfachungsröhre, welcher das empfangene Lichtsignal wie beim Konfokalmikroskop verstärkt und in eine elektrische Spannung umwandelt. Anschließend wird die Spannung vom Fluoreszenz-System Interface in digitale Daten konvertiert und an den Computer zur Aufzeichnung weitergeleitet. Zusätzlich werden die Kardiomyozyten von unten mit einer Rotlichtquelle durchleuchtet, um die Kontraktion mit der Myozytenkamera aufzuzeichnen (in der Abbildung rot). Ein eingebauter dichroitischer Spiegel (685DCLP) trennt dabei das Rotlicht von dem Fluoreszenzlicht. So wird sichergestellt, dass die Natriumfluoreszenzmessungen durch das zusätzliche Licht nicht gestört werden. Sämtliche Aufzeichnungen der Signale sowie die Ansteuerung der Geräte erfolgt durch die Software IonWizard 6.4 (IonOptix Corporation, Westwood, MA, USA).

Eine wichtige Struktureigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe sind die aromatischen Ringstrukturen mit delokalisierten Elektronen, welche leicht mit ihrer Umgebung wechselwirken können. Trifft nun das Anregungslicht auf das Fluorochrom, werden Photonen absorbiert und die Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau angehoben. Dieses hohe Energieniveau ist jedoch sehr instabil, sodass die Elektronen ihrem Bestreben nach innerhalb von Nanosekunden wieder auf ihr anfängliches Energieniveau herabfallen. Dabei wird die überschüssige Energie als Lichtenergie

2. Material und Methoden

emittiert. Deshalb ist das Emissionslicht im Vergleich zum Anregungslicht energieärmer und besitzt folglich eine größere Wellenlänge. Die Differenz der Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionslicht wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet (157).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Natriumfluoreszenzfarbstoff SBFI (*sodium-binding benzofuran isophthalate*) verwendet. SBFI ist in seiner freien Form unfähig die Zellmembran zu durchdringen, da es einen polaren Charakter aufweist. Der Acetoxymethylester-Rest (AM) verändert die Eigenschaft von SBFI hin zu einer höheren Lipophilie. Somit kann es die Zellmembran der Kardiomyozyten entlang des Konzentrationsgradienten per Diffusion leichter überwinden. Angelangt im Zytosol wird der Acetoxymethyl-Anhang durch unspezifische zytosolische Esterasen als Acetoxymethanol abgespalten und die Carboxylgruppen des Farbstoffes freigelegt. Der bei einem intrazellulären pH von 7,2 polare Farbstoff ist jetzt nicht mehr in der Lage, die Zelle zu verlassen oder durch Lipiddoppelschichten weiter in andere Zellkompartimente zu permeieren (s. Abbildung 21).

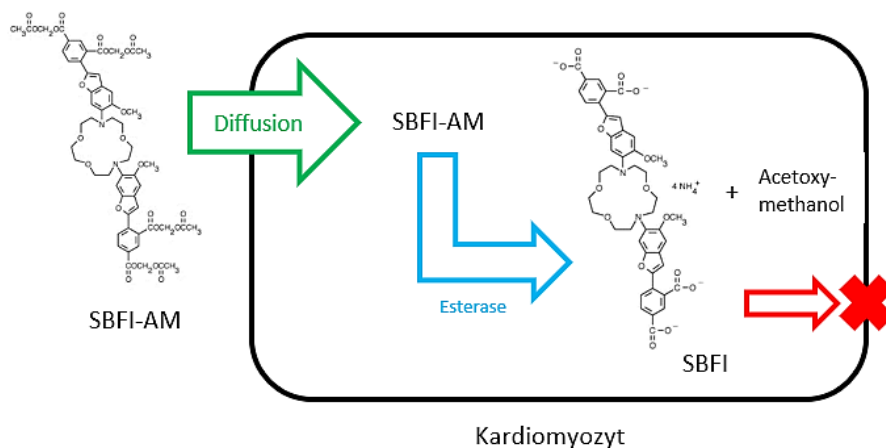


Abbildung 21 - Strukturformel SBFI-AM (©Thermo Fisher Scientific) und Beladung eines Kardiomyozyt. Modifiziert nach (158)

SBFI bindet selektiv an intrazelluläre Natriumionen und bildet mit ihnen einen Chelatkomplex. Das hat eine Verschiebung der Spitzenanregungs- und Spitzenemissionswellenlängen mit einer Veränderung der epifluoreszenzmikroskopisch gemessenen Emissionsintensitäten zur Folge. Nur als Komplex mit Natriumionen entfaltet SBFI seine gesamte fluoreszierende Eigenschaft, wohingegen SBFI-Moleküle mit leeren Natriumbindungsstellen einen deutlich

2. Material und Methoden

geringeren fluoreszierenden Charakter besitzen. Auch die kaum vorhandene Eigenfluoreszenz der Zellen kann davon abgegrenzt werden. Nach der Ionenbindung verschiebt sich das Extinktionsmaximum wie bei anderen Fluoreszenzfarbstoffen in Richtung einer kürzeren Wellenlänge (s. Abbildung 22). Im Fall von SBF1 gibt es zwei Extinktionsmaxima, welche bei 340 nm und 380 nm liegen. Aus beiden lässt sich nun das Verhältnis (340/380 nm), die sog. Ratio, bilden, weshalb SBF1 auch als ratiometrischer Farbstoff bezeichnet wird. Die Bildung des Verhältnisses hat den Vorteil, dass die einzelnen Fluoreszenzintensitäten, die stark von der Farbstoffkonzentration abhängen, das Gesamtergebnis bei schwankenden Konzentrationen nicht verfälschen.

2. Material und Methoden

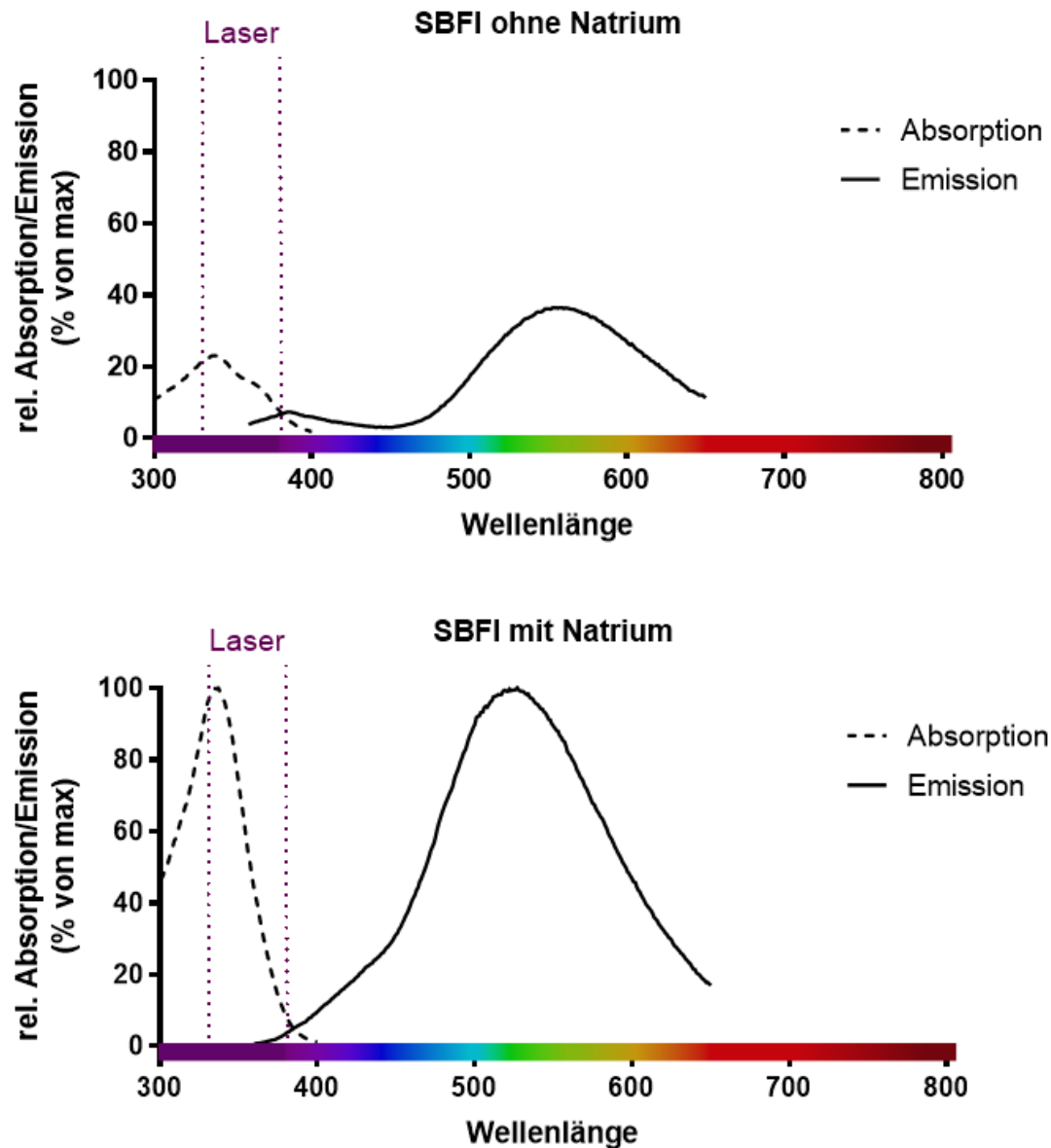


Abbildung 22 - Relative Absorption/Emission von SBFi in Abhängigkeit zur Natriumbindung (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectraviewer (156))

Während es nach der Natriumbindung von SBFi bei der Anregungswellenlänge von 340 nm zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzemission kommt, ändert sich die Emissionsintensität bei der Anregungswellenlänge von 380 nm nur sehr wenig (s. Abbildung 23).

2. Material und Methoden

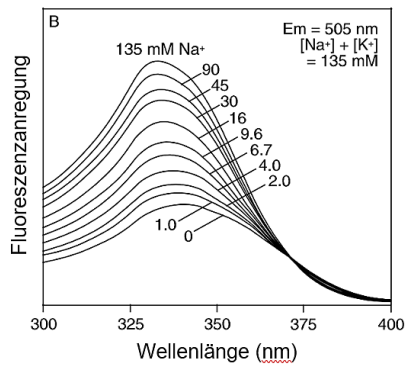


Abbildung 23 - Abhängigkeit der SBF1-Fluoreszenz von der Natriumkonzentration und der Wellenlänge (©ThermoFisher Scientific)

Mit zunehmender Natriumkonzentration vergrößert sich somit das Verhältnis der Emissionsintensitäten (F_{340}/F_{380}) bei unverändertem Emissionsmaximum bei 505 nm. Diese Eigenschaft erlaubt eine quantitative Aussage über die intrazelluläre Natriumkonzentration, da sich die Emissionsintensitäten in eine exakte Ionenkonzentration umrechnen lassen. Die Grundlage dafür bildet eine zuvor durchgeführte Kalibrierung.

2.5.2 Versuchsaufbau

SBFI wurde als Acetoxymethylester SBF1-AM (Invitrogen S-1264, MG 1127,07 g/mol, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in Pulverform (50 µg) geliefert. Um eine gelöste Färbetinktur zu erhalten, musste das Pulver mit 44,4 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, MG 78,13 g/mol, Carl Roth) angesetzt werden. Da der Farbstoff äußerst lichtempfindlich ist, geschah die Auflösung des Pulvers in einer Dunkelkammer. Die erhaltene Vorratslösung wurde bis zum Gebrauch lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Für jeden Messtag wurden 5 µl der Vorratslösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l mit 1 µl einer 20-prozentigen Lösung von Pluronic F-127 (Thermo Fisher Scientific, 20% w/v in DMSO) in lichtundurchlässigen Eppendorf-Cups mit 494 µl Normaltyrode (s. Tabelle 6) vermischt. Die Zugabe von Pluronic F-127 war notwendig, um eine Mizellenbildung zu induzieren, da der Farbstoff sehr schlecht fettlöslich ist und ohne die Zugabe des Detergens die Beladung der Zellen kaum möglich wäre. Jedes Eppendorfgefäß enthielt somit 500 µl des endgültigen Farbstoffes mit einer Konzentration von 10 µmol/l (s. Tabelle 7).

2. Material und Methoden

	Substanz	Konzentration	
Normaltyrode	NaCl	140 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,4 bei 37 °C eingestellt mit NaOH; Lagerung bei 4 °C
	KCl	4 mmol/l	
	MgCl ₂	1 mmol/l	
	HEPES	5 mmol/l	
	Glucose	10 mmol/l	
	CaCl ₂	1 mmol/l	

Tabelle 6 – Normaltyrode

	Substanz	Volumen	
Beladungslösung SBFI AM 10 µM	SBFI AM in DMSO 1 mM	5 µl	Gelöst in Normaltyrode; pH 7,4 bei 37 °C; Zielvolumen 0,5 ml
	Pluronic-F127 (20% w/v in DMSO)	1 µl	

Tabelle 7 - Beladungslösung SBFI-AM

Die getrennte Isolation atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten sowie der Kalziumaufbau erfolgte wie bereits beschrieben. Nach dem letzten Kalziumaufbauschnitt wurden nun jeweils 400 µl der Zellsuspension in die Messkammern überführt. Im Rahmen der Farbstoffinkubation erfolgte der letzte Aufbauschnitt zu einer Kalziumkonzentration von 1 mmol/l. Nach Ablauf der 15-minütigen Sedimentationszeit wurde die Messkammer vorsichtig geleert und 250 µl des Farbstoffes hinzugegeben. Anschließend wurden die Messkammern für 90 Minuten lichtundurchlässig abgedeckt, um eine optimale Inkubation des Fluorochroms zu erzielen. Nach Ablauf der Zeit wurde der überschüssige und nicht von der Zelle aufgenommene Farbstoff mit Normaltyrode ausgewaschen.

Die Blockade des Nav1.8-Kanals wurde durch den selektiven Inhibitor PF-01247324 (PZ0274-25MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) erzielt (s. Abbildung 24). Zur Herstellung der Messkonzentration wurden 10 µl der 10 mM Stammlösung in 100 ml Normaltyrode pipettiert und gut vermischt. Somit enthielt die Messlösung eine Konzentration von 1 µM des Nav1.8-Inhibitors (s. Tabelle 8).

2. Material und Methoden

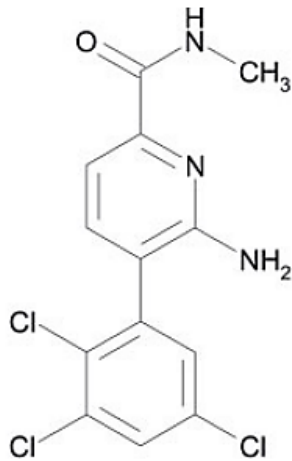


Abbildung 24 - Strukturformel PF-01247324 (146)

	Substanz	Volumen	
Beladungslösung PF-01247324 1 µM	PF-01247324 10 mM	10 µl	Messung mit 500 µl
	Normaltyrode	100 ml	

Tabelle 8 - Beladungslösung PF-01247324

Nachdem die Kardiomyozyten 90 Minuten mit dem Farbstoff SBFI-AM inkubiert wurden, wurde die SBFI-haltige Lösung aus der Messkammer entfernt und mit 500 µl Normaltyrode ersetzt (entweder mit oder ohne PF-01247324). Daraufhin folgte eine erneute Inkubationszeit von 15 Minuten. Anschließend wurde ohne weiteren Zwischenschritt mit der epifluoreszenzmikroskopischen Messung der Natriumkonzentration begonnen. Nach der Inkubation des Farbstoffs und ggf. des Nav1.8-Inhibitors wurde die Messkammer auf dem Objektisch platziert. Oberhalb des Mikroskops befand sich das Superperfusionssystem, welches einen kontinuierlichen Zufluss von Normaltyrode (s. Tabelle 6) bei einer Zulaufgeschwindigkeit von 83 ml/h und einer Temperatur von 37°C gewährleistete. Zusätzlich wurde am Rand der Messkammer eine Absaugvorrichtung installiert, welche an eine Pumpe angeschlossen war. Die Saugkraft der Pumpe wurde so gewählt, dass ein gleichmäßiger Zulauf sowie Ablauf der Normaltyrode erfolgte und ein konstanter Badspiegel in der Messkammer vorlag. Außerdem wurde eine Feldstimulationselektrode in der Kammer platziert, welche an einen elektrischen Stimulator (MyoPacer, IonOptix Corporation, Westwood, MA, USA) angeschlossen war. So konnten die Stimulationsfrequenzen je nach Bedarf gewählt werden. Für alle

2. Material und Methoden

Versuche wurde die gleiche Grundeinstellung gewählt. Diese umfasste eine Spannung von 20 V sowie eine Stimulationsdauer von 4 ms.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Zu Beginn jeder Messung wurden die Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 1 Hz für ca. 5 Minuten stimuliert, um sich äquilibrieren zu können. Unter Verwendung eines Immersionsöls (40x Objektiv) wurde eine Zelle ausgewählt, die sich regelmäßig und synchron zu der Stimulation verkürzte. Anschließend begann die Messung bei der angelegten Stimulationsfrequenz von 1 Hz, bis sich das Verhältnis der beiden fluoreszierten Lichtsignale in einen stabilen Zustand („steady state“) eingependelt hatte. Im nächsten Schritt wurde der Versuch mit einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz und folgend mit einer Frequenz von 4 Hz wiederholt (s. Abbildung 25). Am Ende erfolgte die Aufnahme der Hintergrundfluoreszenz, indem eine leere Stelle neben der gemessenen Zelle fokussiert wurde.

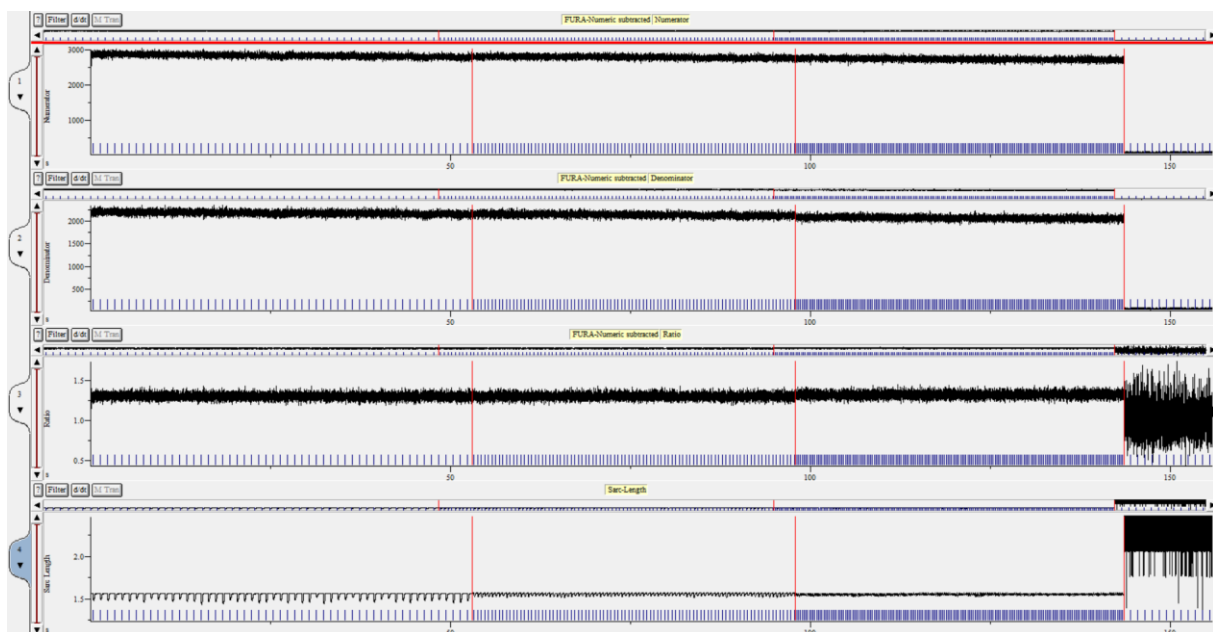


Abbildung 25 - Messung des Fluoreszenzsignals bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen

Pro Messkammer wurden nach diesem Protokoll drei bis vier Zellen gemessen. Um zu verhindern, dass die Zellen mit dem Nav1.8-Inhibitor stets am Ende gemessen wurden, wurden zwei Messprotokolle verfasst (s. Abbildung 26). Dabei wurde auch die Reihenfolge der Messungen von Vorhofzellen (VH) und Ventrikelzellen (VEK) verändert. So konnte die Abfolge der Messungen von Kontroll- und Inhibitorgruppe

2. Material und Methoden

variiert werden, um ein Zustandekommen von potenziell zeitabhängigen Unterschieden zu verhindern.

Messprotokoll 1	
Minute	Ereignis
0	VEK 1 Farbstoff
45	VH 1 Farbstoff
90	- VEK 1 mit PF beladen - Kontrollkammer ohne SBFI messen
105	- VEK 2 Farbstoff - VEK 1 mit PF messen
135	- VH 1 mit PF beladen
150	- VH 2 Farbstoff - VH 1 mit PF messen
195	VEK 2 messen
240	VH 2 messen

Messprotokoll 2	
Minute	Ereignis
0	VEK 1 Farbstoff
45	VH 1 Farbstoff
75	VEK 2 Farbstoff
90	VEK 1 messen
120	VH 2 Farbstoff
135	VH 1 messen
165	VEK 2 mit PF beladen
180	VEK 2 mit PF messen
210	VH 2 mit PF beladen
225	VH 2 mit PF messen
270	Kontrollkammer ohne SBFI messen

Abbildung 26 - Messprotokoll 1 und 2

Neben der Fluoreszenzintensität wurde auch das lichtmikroskopische Bild der Zelle durch die Myozytenkamera aufgenommen und in das Computerprogramm IonWizard übertragen. Dieses war in der Lage, die Sarkomerverkürzung sowie die anschließende diastolische Relaxation zu messen und als Funktion der Zeit zu speichern. Bei allen Versuchen wurden atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten getrennt voneinander betrachtet.

2. Material und Methoden

2.5.4 Auswertung

Mithilfe des Programmes IonWizard 6.4 (IonOptix Corporation, Westwood, MA, USA) erfolgte die Analyse der gemessenen Natriumtransienten und Kontraktionskurven im ausgewählten Zellabschnitt (s. Abbildung 27). Im ersten Schritt wurde die jeweils gemessene Hintergrundfluoreszenz von den Natriumfluoreszenzkurven abgezogen. Anschließend wurde bei jeder Stimulationsfrequenz der Steady State-Bereich ausgewählt und die Signale von circa zehn Stimulationen gemittelt. Die automatisch berechneten Parameter beschreiben sowohl die Amplitude der Kontraktionskurve für jede Stimulationsfrequenz als auch die Relaxationskinetik während der Sarkomerverkürzung. Auch die diastolische Sarkomerlänge konnte bestimmt werden.

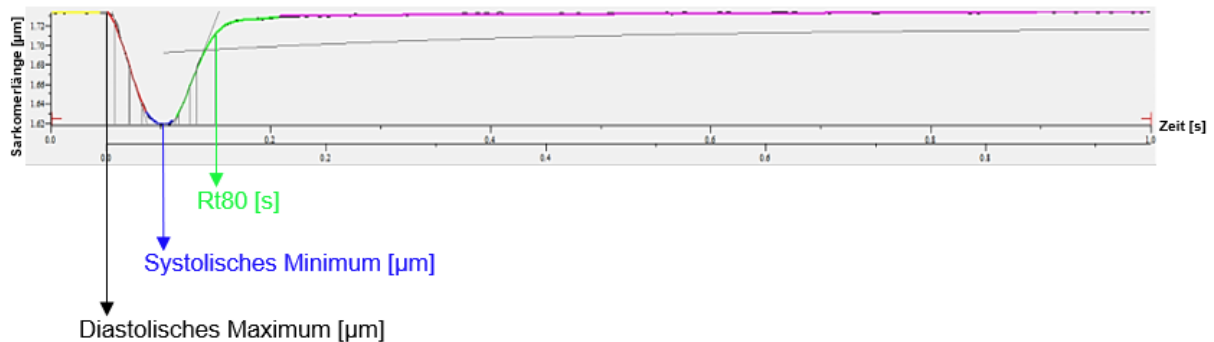


Abbildung 27 - Analyse der Kontraktionskurve

Als Maß für die Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten wurde die Zeit nach erfolgter Kontraktion bis zum Erreichen von 80% der diastolischen Sarkomerlänge gemessen (RT80).

2. Material und Methoden

2.6 Natriumkalibrierung

Ziel der Kalibrierungsmessungen war das Erstellen einer Eichgerade. Anhand der Eichgerade konnten die epifluoreszenzmikroskopisch ermittelten SBFI-Ratiowerte (F_{340}/F_{380}) in eine tatsächliche Natriumkonzentration umgerechnet werden.

2.6.1 Versuchsaufbau

Für die Kalibrierung wurden neben der Normaltyrode noch drei weitere Lösungen mit unterschiedlichen Natriumkonzentrationen benötigt. Dafür wurde initial eine natriumhaltige (s. Tabelle 9) und eine kaliumhaltige Kalibrierungslösung (s. Tabelle 10) hergestellt.

	Substanz	Konzentration	
natriumhaltige Kalibrierungslösung	NaCl	30 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,2 bei 37 °C; eingestellt mit TRIS; Lagerung bei 4 °C
	Na-Gluconat	115 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	EGTA	2 mmol/l	
	Glucose	10 mmol/l	

Tabelle 9 - Natriumhaltige Kalibrierungslösung

	Substanz	Konzentration	
kaliumhaltige Kalibrierungslösung	KCl	30 mmol/l	gelöst in ddH ₂ O; pH 7,2 bei 37 °C; eingestellt mit TRIS; Lagerung bei 4 °C
	K-Gluconat	115 mmol/l	
	HEPES	10 mmol/l	
	EGTA	2 mmol/l	
	Glucose	10 mmol/l	

Tabelle 10 - Kaliumhaltige Kalibrierungslösung

Beide Messlösungen wurden auf einen physiologischen intrazellulären pH von 7,2 bei 37 °C mit TRIS-Base (Trishydroxymethylaminomethan, Puffersubstanz) eingestellt. Anschließend konnten drei Kalibrierungslösungen mit einer Natriumkonzentration von 0 mmol/l, 10 mmol/l und 20 mmol/l nach einem fest definierten Schema aus den beiden zuvor angesetzten Lösungen hergestellt werden (s. Tabelle 11).

2. Material und Methoden

[Na ⁺] in (mmol/l)	Natriumlösung (ml)	Kaliumlösung (ml)	Gesamtvolumen (ml)
0	0	500	500
10	34,5	465,5	
20	69,0	431,0	

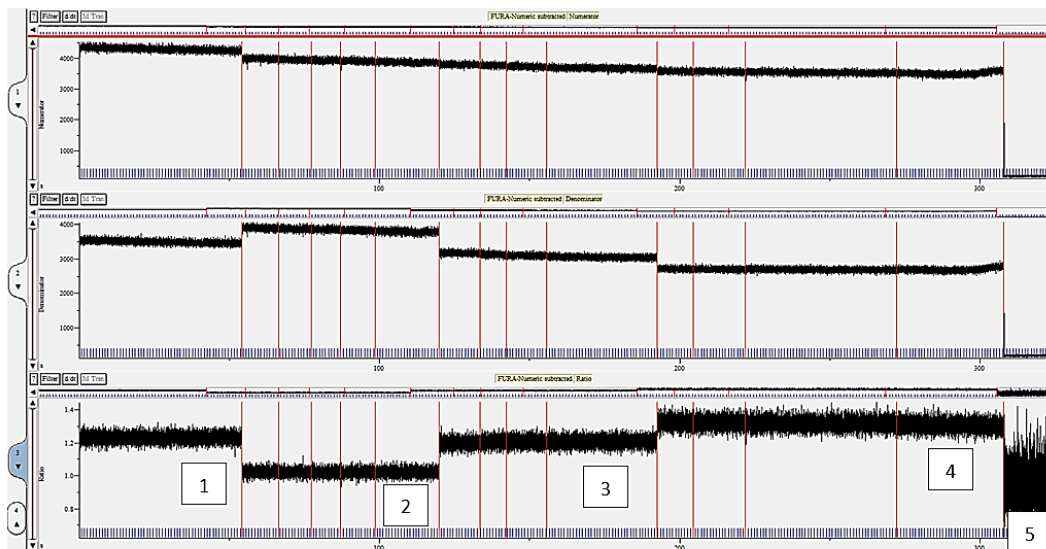
Tabelle 11 - Pipettierschema der Kalibrierungslösungen

Zu 100 ml der 0 [Na⁺] - Lösungen wurde das Natriumionophor Gramicidin D (10 µmol/l, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) hinzugefügt. Die 10 [Na⁺] - und 20 [Na⁺] - Lösungen enthielten ebenfalls Gramicidin D (10 µmol/l) sowie zusätzlich den Natrium/Kalium-ATPase-Inhibitor Strophantidin (100 µmol/l, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Das Antibiotikum Gramicidin D sorgte über eine Porenbildung in der Zellmembran für die ungehinderte Passage der Natriumionen. Somit glich sich der intrazelluläre und extrazelluläre Natriumgehalt an. Die Zugabe des Natrium/Kalium-ATPase-Inhibitors Strophanthidin war nötig, damit die einströmenden Natriumionen nicht sofort wieder durch die Natrium/Kalium-ATPase aus der Zelle entfernt wurden.

2.6.2 Versuchsdurchführung

Die Kalibrierungslösungen wurden in aufsteigender Reihenfolge auf die mit SBFI-beladenen Kardiomyozyten gegeben. Bei einer kontinuierlichen Stimulationsfrequenz von 1 Hz und einer Superperfusion von 83 ml/h wurde die SBFI-Ratio für mindestens 20 Minuten bis zum Eintritt des stationären Zustandes gemessen (s. Abbildung 28). Um potenzielle Verzerrungen zu verhindern, wurden die Kalibrierungsmessungen regelmäßig wiederholt. Somit ließen sich etwaige Veränderungen der äußeren Bedingungen, wie etwa Veränderungen der Intensität der Lichtquelle über die Zeit, berücksichtigen.

2. Material und Methoden



- 1 Ratio unter Normaltyrode
- 2 Ratio unter 0 Na – Kalibrierungslösung
- 3 Ratio unter 10 Na – Kalibrierungslösung
- 4 Ratio unter 20 Na – Kalibrierungslösung
- 5 Hintergrundfluoreszenz

Abbildung 28 - Kalibrierungsmessung

2.6.3 Berechnung der absoluten Natriumkonzentration

Auch von diesen gemessenen Fluoreszenzverhältnissen wurden wie oben beschrieben die Hintergrundfluoreszenzwerte abgezogen. Mithilfe einer linearen Regression wurde die Eichkurve erstellt, an der für jede gemessene SBF1-Ratio die entsprechende Natriumkonzentration abgelesen bzw. über die Funktion der Geradengleichung berechnet werden konnte. Die Eigenschaften des ratiometrischen Farbstoffes erlaubten eine quantitative Aussage über die Natriumkonzentration in mmol/l. Nach Umstellung der Funktion der Regressionsgeraden konnte die Natriumkonzentration aus den aufgezeichneten Fluoreszenzwerten errechnet werden.

2. Material und Methoden

2.7 Datenauswertung und Statistik

Für die Datenauswertung wurden die Programme ImageJ (Version 1.53f51), IonWizard 6.4 und Microsoft Office Excel 2016 verwendet. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 10.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle dargestellten Daten wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) präsentiert. Die Berechnung des Standardfehlers erfolgte mit folgender Formel:

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

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

Mithilfe von statistischen Tests wurde überprüft, ob Unterschiede zwischen den Gruppen zufällig zustande kamen oder tatsächlich durch biologische Prozesse bedingt waren. In allen Vergleichen steht die Versuchszahlangabe „n“ für die Anzahl der in den Versuch eingeschlossenen Tiere. Zwei Gruppen wurden mittels eines ungepaarten Student t-Tests verglichen. Durch die einseitige Varianzanalyse (Ein Weg ANOVA, post-hoc korrigiert nach Holm-Sidak) konnten mehrere Gruppen miteinander verglichen werden. Durch einen Zwei Wege ANOVA mit post hoc Korrektur nach Holm-Sidak konnten zwei Genotypen (WT versus CaMKII $\delta^{-/-}$) mit unterschiedlichen Interventionen (Vehikel versus PF-Inkubation) verglichen werden. Ein RM Zwei Wege ANOVA mit post hoc Korrektur nach Holm-Sidak wurde für den Vergleich der zwei Genotypen an zwei verschiedenen Zeitpunkten verwendet. Die Korrelation von zwei Variablen wurde mithilfe einer linearen Regressionsanalyse getestet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0.05 angenommen. Dies bedeutet, dass als signifikant betrachtete Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit von $< 5\%$ zufällig zustande kamen.

3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der ROS in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten bei Mäusen mit einer schlafbezogenen Atemstörung im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Dabei wurden sowohl mitochondriale als auch zelluläre ROS mithilfe konfokalmikroskopischer Analysen über einen Zeitraum von 10 Minuten untersucht. In allen durchgeführten Experimenten wurden dabei die Messergebnisse von Wildtyp PTFE-Mäusen mit den Effekten bei Kontrolltieren ohne PTFE-Injektion verglichen. Durchschnittlich betrug die Zahl der betrachteten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten pro Maus jeweils $n = 3$ Zellen.

Zur Beantwortung der Fragestellungen, ob Mäuse mit einer obstruktiven SBAS Veränderungen im intrazellulären Natriumgehalt aufweisen und inwiefern ein Knock-out der CaMKII δ bzw. die pharmakologische Inhibition des Nav1.8 Einfluss auf die Natriumhomöostase nehmen, wurde mittels epifluoreszenzmikroskopischer Messungen die intrazelluläre Natriumkonzentration von isolierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten getrennt analysiert. Zudem wurde dabei auch die Relaxationskinetik der Zellen aufgezeichnet, um Unterschiede in der Dauer der Relaxation nach der Sarkomerverkürzung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erfassen. Außerdem wurde jede Messung mit der Schwere der obstruktiven Atemstörung der analysierten Maus korreliert.

Die konfokalmikroskopischen Fluoreszenzergebnisse werden als Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Ausgangswert (F/F_0) beschrieben. Epifluoreszenzintensitäten sind als „SBFI-Ratio“ (Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm, F_{340}/F_{380}) angegeben. Alle Zahlenangaben sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Murine Veränderungen im Rahmen des Mausmodells einer obstruktiven SBAS

Sowohl bei PTFE-Mäusen als auch bei den Kontrolltieren ohne Intervention wurde die Größe der Zunge durch eine stichprobenartige Sonographie des Zungendurchmessers ermittelt. Zudem wurde bei jeder in den Versuch eingeschlossenen Maus eine Ganzkörperplethysmographie durchgeführt. Außerdem wurde von jeder Maus eine Vielzahl weiterer Organdaten hinsichtlich ihrer Entwicklung ermittelt.

3.1.1 Gesteigerte Frequenz an inspiratorischen Flusslimitationen

Zwei Wochen nach der PTFE-Injektion wurde bei allen Tieren eine Ganzkörperplethysmographie durchgeführt. Dabei erfolgte die Detektion inspiratorischer Flusslimitationen anhand des Boxflusses in der Plethysmographiekammer. In Abbildung 29 ist die Originalregistrierung einer solchen Restriktion des Atemflusses im Vergleich zur Atemtätigkeit einer gesunden Maus ohne Atemwegsobstruktion dargestellt.

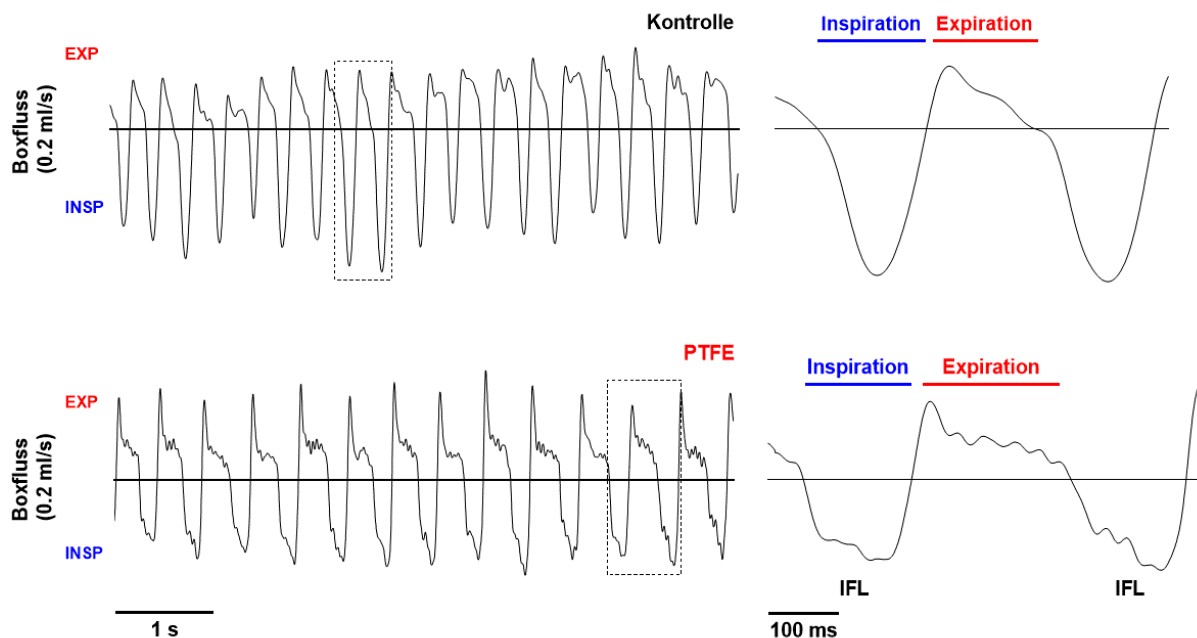


Abbildung 29 - Originalregistrierung einer inspiratorischen Flusslimitation (IFL)

3. Ergebnisse

Der Vergleich der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde ergab eine signifikante Zunahme der Atemflussbegrenzung bei PTFE-Mäusen von $18,73 \pm 5,90$ IFL/h auf $49,89 \pm 6,72$ IFL/h ($n = 29$, $p = 0,005$, Student t-Test).

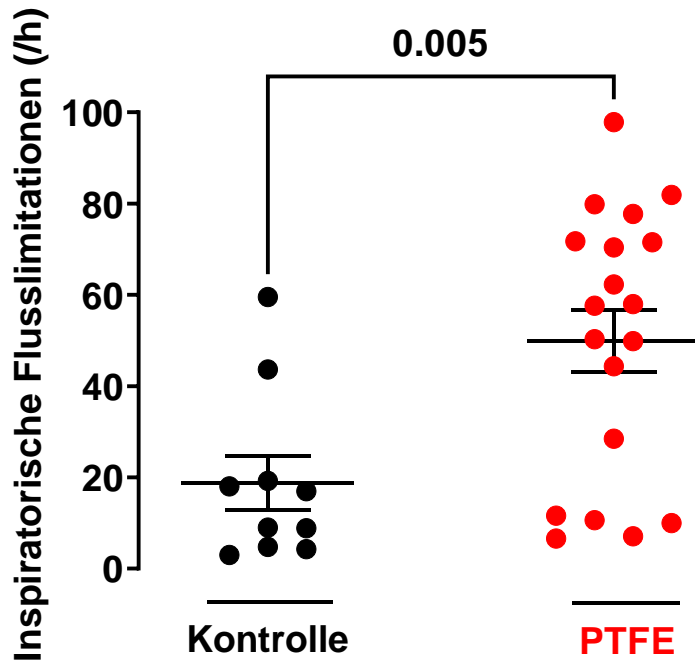


Abbildung 30 - Frequenz der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde

3. Ergebnisse

3.1.2 Kontrolle der murinen Entwicklung

Um ausschließen zu können, dass potenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen aufgrund einer mangelhaften körperlichen Entwicklung nach der PTFE-Injektion zustande kommen, wurden mehrere Parameter der Mäuse miteinander verglichen. Dazu zählte primär die Zunahme des Körpergewichts innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Wochen nach der Intervention. Zur statistischen Begutachtung wurde hierfür ein RM Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur verwendet ($p_{\text{Zeitraum}} < 0,001$, $p_{\text{Intervention}} = 0,205$, $p_{\text{Zeitraum} \times \text{Intervention}} = 0,019$, $p_{\text{Subjekt}} < 0,001$). Dabei zeigte sich wie in Abbildung 31 dargestellt ein ähnlicher signifikanter Anstieg des Gewichts der nicht-operierten Kontrollmäuse von $27,60 \pm 0,44$ g auf $30,78 \pm 0,50$ g ($n = 24$, $p < 0,001$) im Vergleich zur Erhöhung des Körpergewichts bei PTFE-Mäusen von $27,38 \pm 0,42$ g auf $29,45 \pm 0,44$ g ($n = 28$, $p < 0,001$).

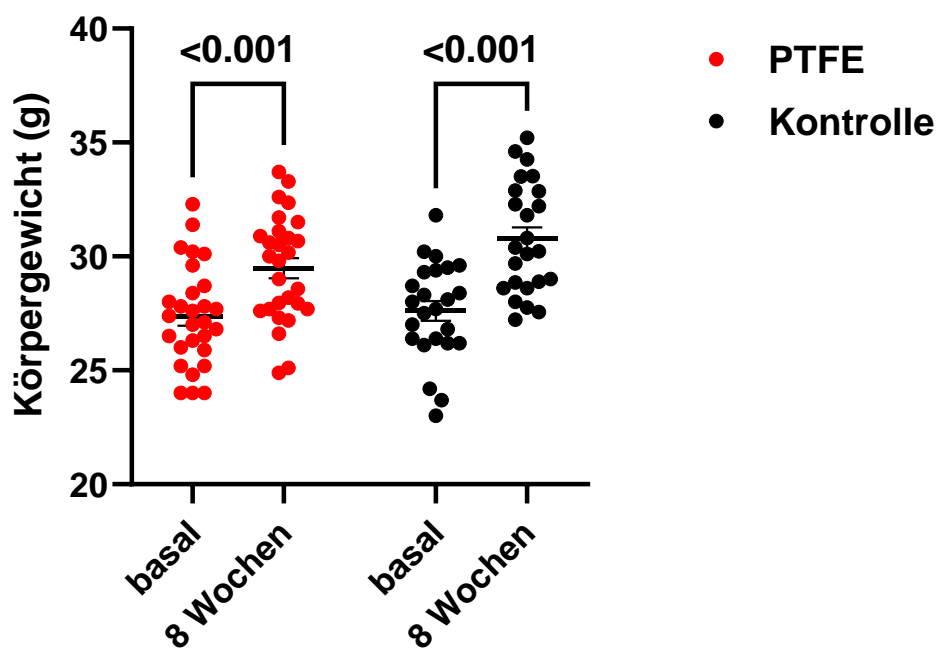


Abbildung 31 - Zunahme des Körpergewichts nach 8 Wochen

3. Ergebnisse

Neben dem Körpergewicht wurde auch die Tibiallänge nach deren Isolation bestimmt und in Bezug auf das Körpergewicht (KG) der Mäuse betrachtet. Dabei war keine signifikante Differenz zwischen der Kontrollgruppe ($1,70 \pm 0,03$ g/mm, $n = 24$) und der Interventionsgruppe ($1,63 \pm 0,01$ g/mm, $n = 28$) zu erkennen ($p = 0,919$, Student t-Test).

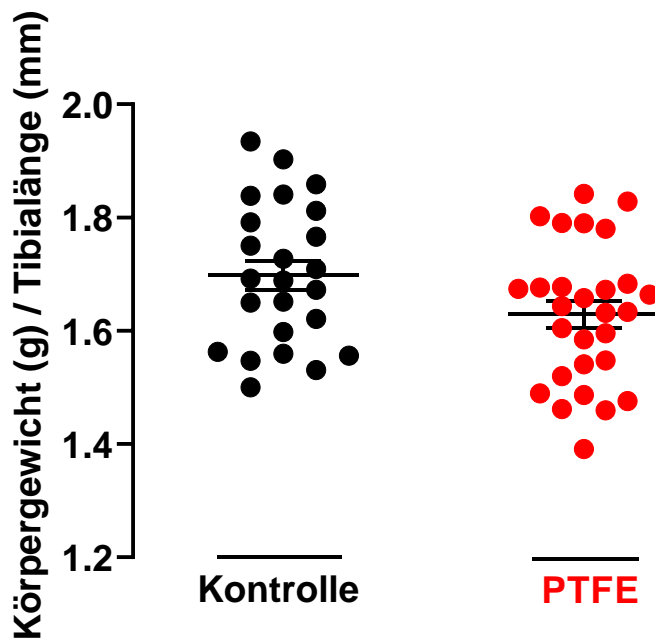


Abbildung 32 - Körpergewicht (g) normalisiert auf die Tibiallänge (mm) der jeweiligen Maus

Beim Vergleich der Parameter zwischen den Genotyp-Gruppen konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Wildtyp- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen beobachtet werden.

3. Ergebnisse

3.2 Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies

Neben der Ermittlung der Menge und Produktion der ROS in den Mitochondrien wurden auch die ROS im Zytoplasma der Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen untersucht und mit den Messungen bei den Kontrolltieren verglichen.

3.2.1 Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien von PTFE Mäusen

Um die Menge der ROS in den Mitochondrien genauer zu untersuchen, wurden die isolierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen getrennt voneinander mit dem Farbstoff MitoSox™ Red inkubiert und die Fluoreszenzintensität des durch die ROS aktivierten Farbstoffes mithilfe der konfokalen Mikroskopie detektiert. In Abbildung 33 ist eine Originalregistrierung zu sehen. Dargestellt ist beispielhaft sowohl das basale Ausgangsbild als auch das abschließende Fluoreszenzsignal eines Kardiomyozyten nach einem Zeitraum von 10 Minuten von jeder Versuchsgruppe. Dabei ist das typische mitochondriale Beladungsmuster deutlich zu erkennen, welches durch eine streifen- bzw. paketförmige Anreicherung des Farbstoffes gekennzeichnet ist.

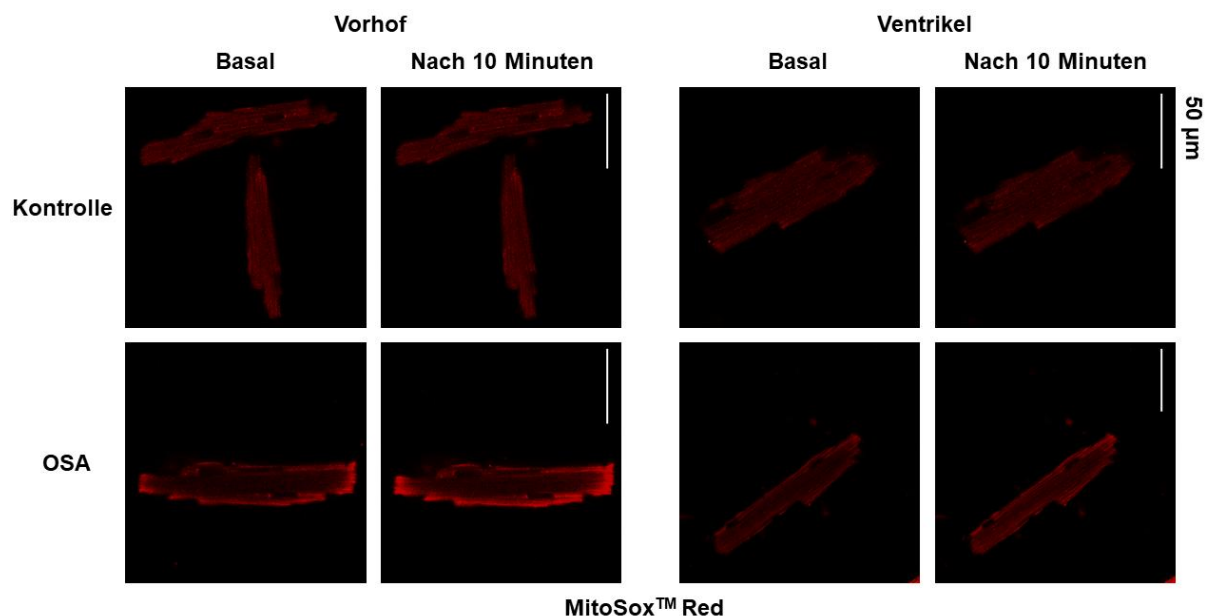


Abbildung 33 - Originalregistrierung einer Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien

3. Ergebnisse

Bei der Detektion der ROS in den Mitochondrien wurden Messungen über 10 Minuten durchgeführt, wobei alle 60 Sekunden eine konfokale Aufnahme erfolgte. Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Ausgangswert normalisiert (F/F_0) und für jede Aufnahme gegen die Zeit aufgetragen. Mithilfe einer linearen Regression konnte die Steigungsgerade hinsichtlich des Anstiegs des Fluoreszenzsignals für atriale und ventrikuläre Analysen ermittelt werden (Abbildung 34). Dabei konnte eine deutlich gesteigerte ROS-Produktion in atrialen Kardiomyozyten von PTFE-Tieren festgestellt werden ($p < 0,001$, $r^2 = 0,578$, $n = 7$ Mäuse), welche sich signifikant erhöht gegenüber der ROS-Produktion bei Kontrolltieren präsentierte ($p < 0,001$, $r^2 = 0,540$, $n = 7$ Mäuse). Auch in ventrikulären Kardiomyozyten zeigte sich eine gesteigerte ROS-Produktion bei PTFE-Tieren ($p < 0,001$, $r^2 = 0,656$, $n = 7$ Mäuse) im Gegensatz zu den Kontrollmäusen ($p < 0,001$, $r^2 = 0,456$, $n = 7$ Mäuse).

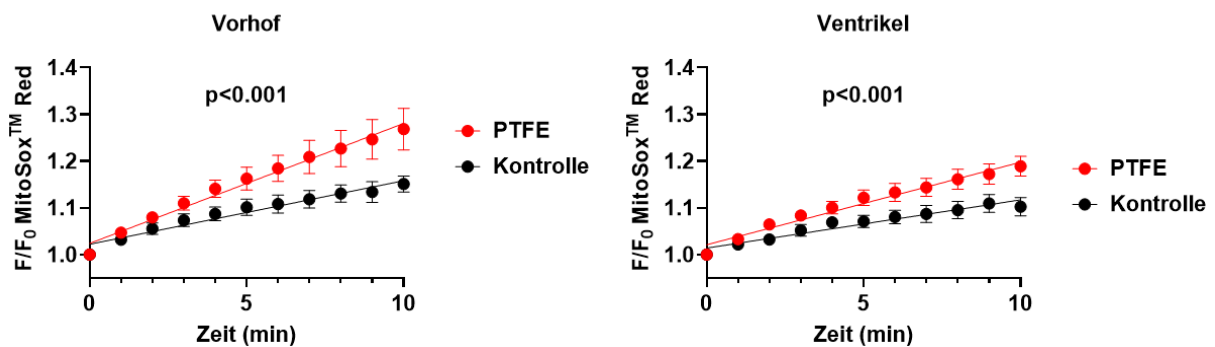


Abbildung 34 - Fluoreszenzanstieg bei den Messungen der mitochondrialen Sauerstoffradikale über 10 Minuten

3. Ergebnisse

Anschließend wurden die mittleren Fluoreszenzwerte der Aufnahmen nach 10 Minuten gegen die der basalen Bilder aufgetragen und mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur miteinander verglichen ($p_{\text{Zellart}} = 0,031$, $p_{\text{Intervention}} = 0,001$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,586$). Dabei zeigte sich ein Anstieg der atrialen Fluoreszenzintensität von $1,15 \pm 0,02$ bei Kontrolltieren auf $1,27 \pm 0,04$ bei PTFE-Mäusen nach 10 Minuten ($p = 0,013$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse). Auch in ventrikulären Kardiomyozyten konnte eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals von $1,10 \pm 0,02$ auf $1,19 \pm 0,02$ bei Mäusen mit einer PTFE-Injektion registriert werden ($p = 0,038$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse).

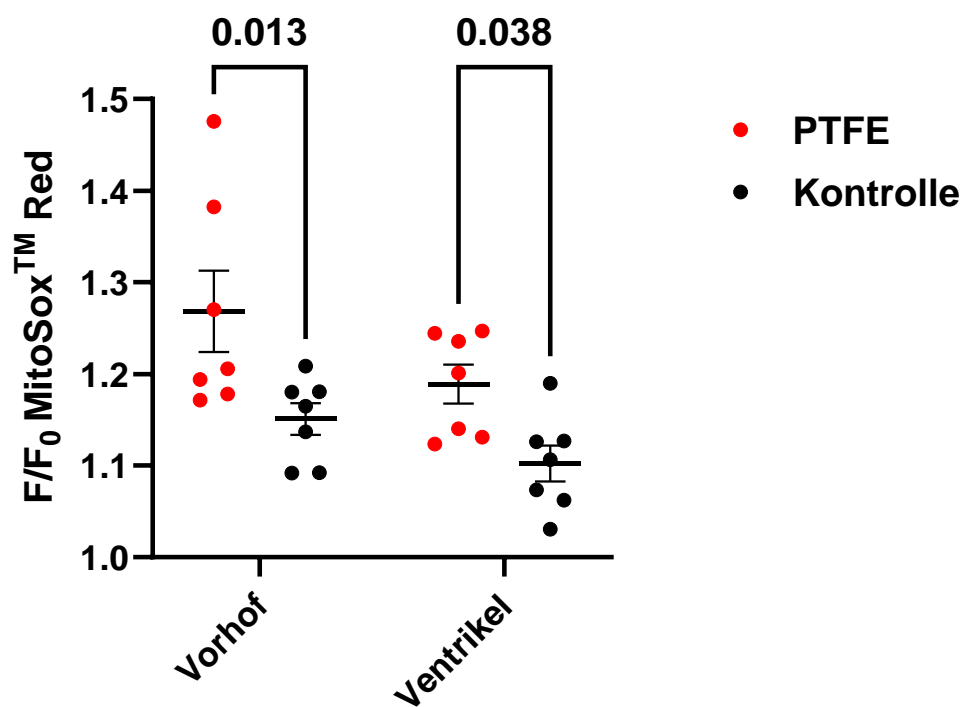


Abbildung 35 - Fluoreszenzanstieg der Messungen von mitochondrialen ROS nach 10 Minuten

3. Ergebnisse

Abschließend erfolgte die Berechnung des Anstieges der Fluoreszenzintensität von MitoSox™ Red pro Minute. Dabei wurde die Differenz des auf den Basalwert normalisierten Fluoreszenzwert durch die Zeitdauer von 10 Minuten dividiert $[(\Delta F/F_0)/10]$ und die statistische Analyse erneut mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur durchgeführt ($p_{\text{Zellart}} = 0,031$, $p_{\text{Intervention}} = 0,001$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,586$). Auch hierbei zeigte sich wie in Abbildung 36 zu sehen ist eine deutlich gesteigerte Zunahme der Fluoreszenzintensität bei atrialen Kardiomyozyten von $0,015 \pm 0,002$ pro Minute bei Kontrolltieren auf $0,027 \pm 0,004$ pro Minute bei PTFE-Mäusen ($p = 0,013$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse), was auf eine gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion hindeutet. Dies zeigte sich auch bei den ventrikulären Zellen, bei welchen sich der Anstieg der Fluoreszenzwerte von $0,010 \pm 0,002$ auf $0,019 \pm 0,002$ pro Minute bei Mäusen mit der obstruktiven Atemstörung erhöhte ($p = 0,038$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse).

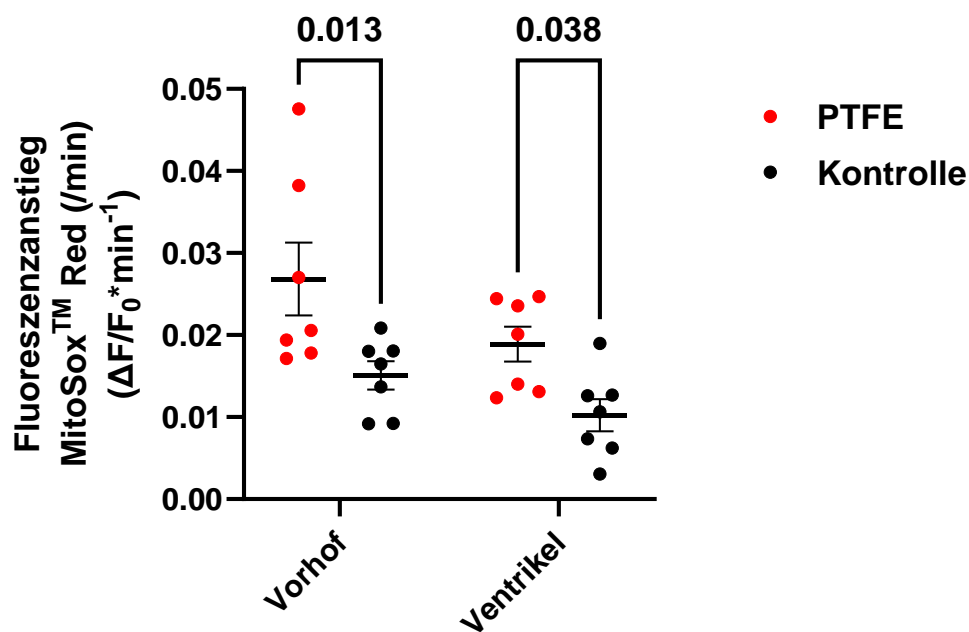


Abbildung 36 - Anstieg der Fluoreszenzintensität von MitoSox™ Red pro Minute in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten

3. Ergebnisse

3.2.2 Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies im Zytoplasma von PTFE Mäusen

Zur Bestimmung der Menge an ROS im Zytoplasma wurden atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen mit dem Farbstoff CellRox™ Orange inkubiert und die Fluoreszenzintensität ebenfalls mithilfe des Konfokalmikroskops bestimmt. In Abbildung 37 ist eine Originalregistrierung dargestellt. Dabei ist neben dem basalen Ausgangsbild auch das Fluoreszenzsignal nach 10 Minuten für jede Interventionsgruppe zu sehen.

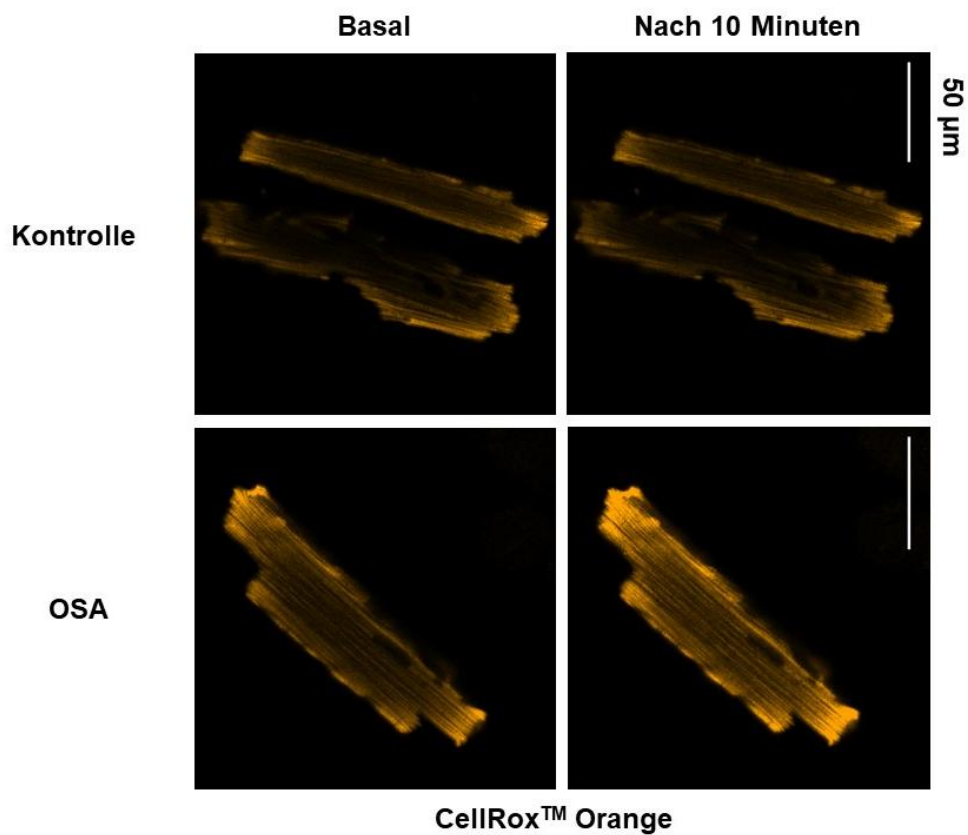


Abbildung 37 - Originalregistrierung einer Messung von reaktiven Sauerstoffspezies im Zytoplasma

3. Ergebnisse

Zur Erfassung der Fluoreszenzintensität wurden wieder Messungen über einen Zeitraum von 10 Minuten mit einer Frequenz von einem Bild pro Minute aufgezeichnet. Die Auftragung der Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzsignale normalisiert auf deren Ausgangswert sind gegen die Zeit in Abbildung 38 dargestellt. Auch bei diesen Analysen wurde durch eine lineare Regression die Steigungsgerade ermittelt. Dabei konnte erneut eine gesteigerte ROS-Produktion in atrialen Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen festgestellt werden ($p < 0,001$, $r^2 = 0,666$, $n = 7$ Mäuse), welche sich erhöht gegenüber der ROS-Produktion bei Kontrolltieren präsentierte ($p < 0,001$, $r^2 = 0,327$, $n = 7$ Mäuse). Auch in ventrikulären Zellen zeigte sich eine erhöhte ROS-Produktion bei PTFE-Tieren ($p < 0,001$, $r^2 = 0,839$, $n = 7$ Mäuse) im Gegensatz zu den Kontrollmäusen ($p < 0,001$, $r^2 = 0,461$, $n = 7$ Mäuse).

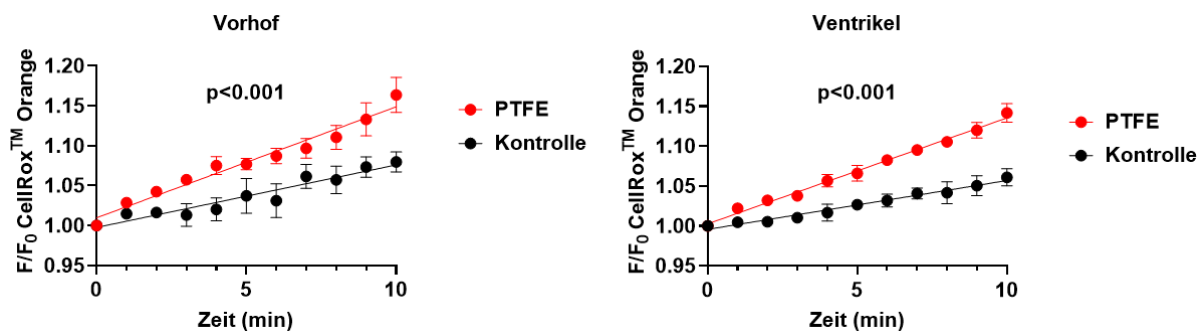


Abbildung 38 - Fluoreszenzanstieg bei den Messungen der zellulären Sauerstoffradikale über 10 Minuten

3. Ergebnisse

Im Anschluss wurden die mittleren Fluoreszenzwerte nach 10 Minuten gegen die Ausgangswerte aufgetragen und mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur gegenübergestellt ($p_{\text{zellart}} = 0,186$, $p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,914$). Auch bei den Messungen der zellulären ROS zeigte sich eine deutliche Zunahme der atrialen Fluoreszenzintensität nach 10 Minuten von $1,08 \pm 0,01$ bei Kontrolltieren auf $1,16 \pm 0,02$ bei PTFE-Mäusen ($p = 0,001$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse). Ebenso war das Fluoreszenzsignal in ventrikulären Kardiomyozyten von $1,06 \pm 0,01$ auf $1,14 \pm 0,01$ bei Mäusen nach einer PTFE-Intervention signifikant erhöht ($p = 0,001$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse).

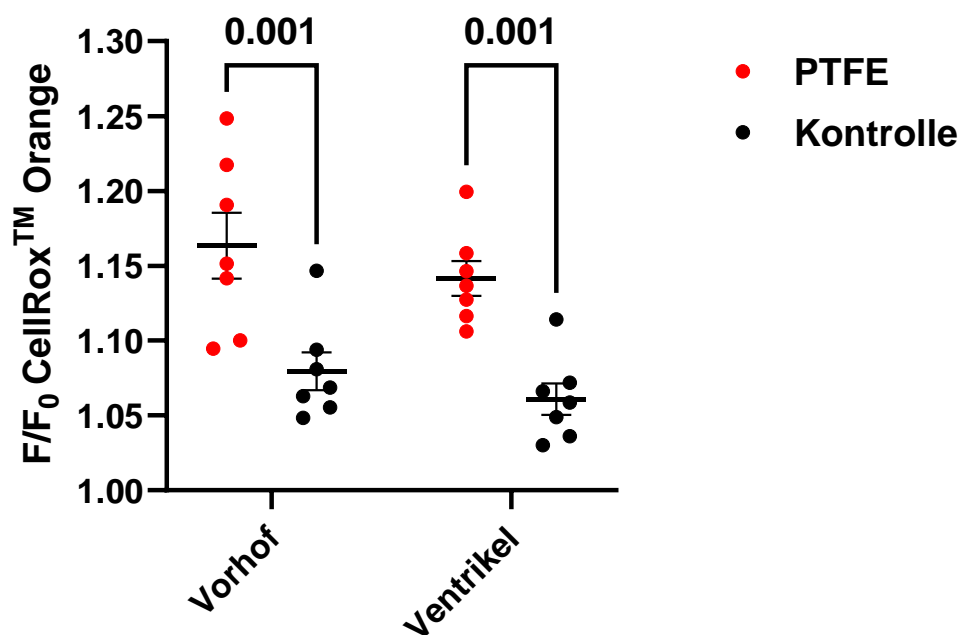


Abbildung 39 - Fluoreszenzanstieg der Messungen von zellulären ROS nach 10 Minuten

3. Ergebnisse

Zur finalen Berechnung des Fluoreszenzanstiegs im Zytoplasma pro Minute wurde ebenfalls die Differenz des auf den Basalwert normalisierten Fluoreszenzwert durch die Zeitdauer von 10 Minuten dividiert $[(\Delta F/F_0)/10]$ und die statistische Analyse erneut mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur durchgeführt ($p_{\text{Zellart}} = 0,186$, $p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,914$). Dabei präsentierte sich eine signifikant gesteigerte Zunahme der Fluoreszenzintensität bei atrialen Zellen von $0,008 \pm 0,001$ bei den Kontrolltieren auf $0,016 \pm 0,002$ bei PTFE-Mäusen je Minute ($p = 0,001$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse). Gleichermaßen war auch in ventrikulären Kardiomyozyten von Tieren mit einer schlafbezogenen Atemstörung ein deutlich erhöhter Anstieg der Fluoreszenzwerte von $0,006 \pm 0,001$ auf $0,014 \pm 0,001$ pro Minute zu beobachten ($p = 0,001$, $n = 7$ vs. 7 Mäuse).

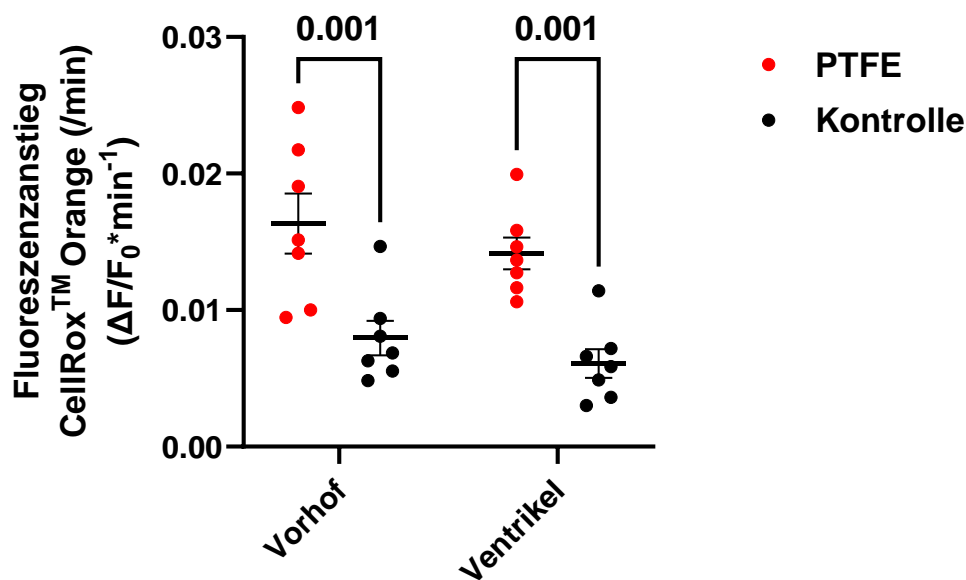


Abbildung 40 - Anstieg der Fluoreszenzintensität von CellRox™ Orange pro Minute in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten

3. Ergebnisse

3.3 Messung des intrazellulären Natriumgehalts

Um die intrazelluläre Natriumkonzentration der Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen mit dem Natriumgehalt von Kontroll-Mäusen vergleichen zu können, wurde unter Verwendung des natriumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes SBFI-AM die intrazelluläre Natriumkonzentration gemessen, wobei einige Kardiomyozyten zusätzlich mit dem selektiven Nav1.8-Inhibitor PF-01247324 inkubiert wurden. Alle Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen, die nicht mit dem Nav1.8-Inhibitor behandelt wurden, werden im Folgenden als Vehikel (Veh) bezeichnet. Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop ergaben das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den zwei Extinktionsmaxima von 340 nm und 380 nm (sog. SBFI-Ratio). In Abbildung 41 ist jeweils eine repräsentative Originalregistrierung von den verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt.

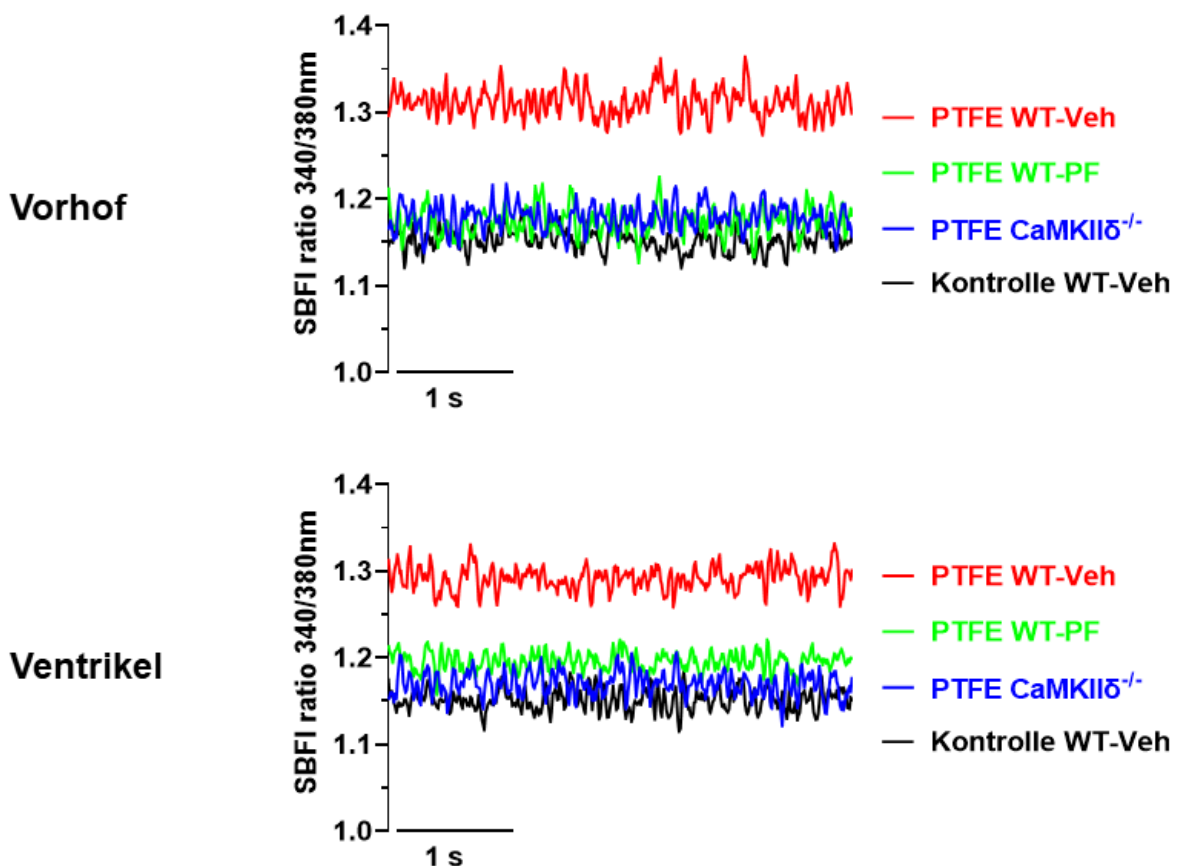


Abbildung 41 - Originalregistrierungen der epifluoreszenzmikroskopischen Messungen

3. Ergebnisse

3.3.1 CaMKII-abhängige Erhöhung des Natriumhaushalts bei PTFE-Mäusen

Bei der Analyse der SBFI-Ratio von Wildtyp Mäusen, welche mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur durchgeführt wurde ($p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,010$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,059$), zeigte sich unter einer elektrischen Feldstimulation mit einer Frequenz von 1 Hz signifikant erhöhte Werte in atrialen Kardiomyozyten bei den Mäusen nach einer PTFE-Injektion von $1,26 \pm 0,01$ im Vergleich zu Kontrolltieren mit einer SBFI-Ratio von $1,17 \pm 0,01$ ($p < 0,001$, $n = 10$ vs. 5 Mäuse). Nach Zugabe des Nav1.8-Inhibitors zu den Kardiomyozyten der PTFE-Tiere konnte wie in Abbildung 42 zu sehen ist eine deutliche Reduktion der SBFI-Ratio auf $1,20 \pm 0,01$ beobachtet werden ($p < 0,001$, $n = 10$ Mäuse), wohingegen sich die Fluoreszenzintensität bei den Zellen der Kontrolltiere nach der Zugabe von PF-01247324 nicht veränderte (SBFI-Ratio $1,16 \pm 0,01$, $p = 0,663$, $n = 5$ Mäuse). Bei den Kardiomyozyten von CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen nach PTFE-Injektion dagegen präsentierte sich in der Analyse des Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur ($p_{\text{Intervention}} = 0,122$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,422$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,579$) unter einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz kein signifikanter Anstieg der atrialen SBFI-Ratio von $1,18 \pm 0,01$ im Vergleich zur Fluoreszenz-Ratio von CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen ohne PTFE-Behandlung von $1,17 \pm 0,01$ ($p = 0,716$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse). Die Zugabe des Nav1.8-Inhibitors hatte dabei sowohl auf die Zellen von operierten CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen (SBFI-Ratio $1,18 \pm 0,02$, $p = 0,861$, $n = 9$ Mäuse) als auch auf die der nicht-operierten Kontrollen (SBFI-Ratio $1,15 \pm 0,01$, $p = 0,702$, $n = 10$ Mäuse) keine signifikante Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität.

3. Ergebnisse

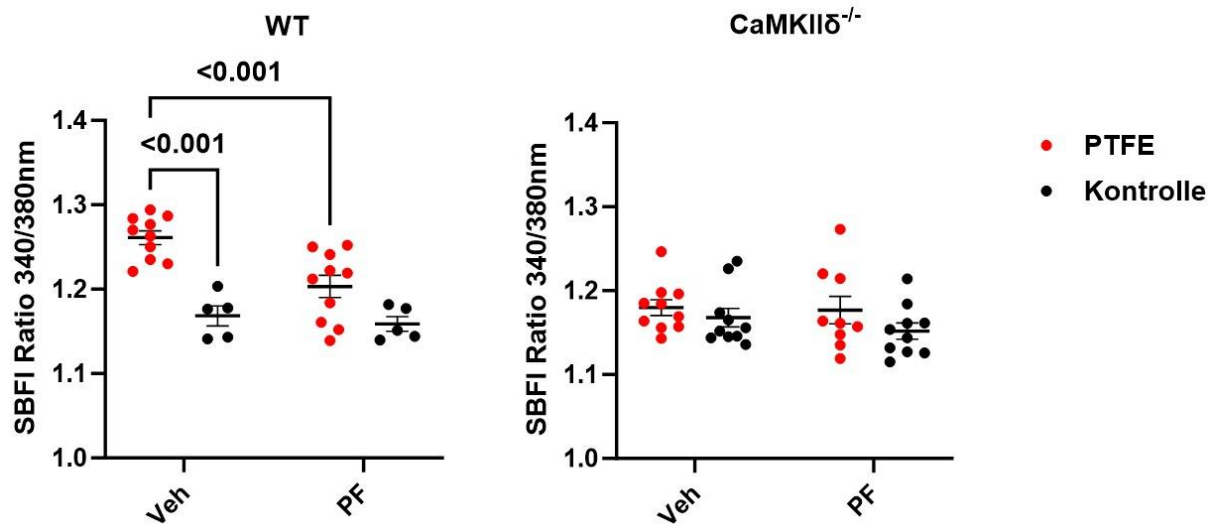


Abbildung 42 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei den Untersuchungen der ventrikulären Kardiomyozyten mithilfe des Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur festgestellt werden ($p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,046$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,062$). Die PTFE-Mäuse wiesen mit einer SBFI-Ratio von $1,26 \pm 0,01$ erneut eine deutlich höhere Natriumkonzentration im Vergleich zu den Wildtyp Kontrolltieren mit einer SBFI-Ratio von $1,16 \pm 0,02$ auf ($p < 0,001$, $n = 5$ vs. 10 Mäuse). Unter PF-01247324 sank das SBFI-Verhältnis bei PTFE-Mäusen ebenfalls signifikant auf $1,20 \pm 0,01$ ($p = 0,002$, $n = 10$ Mäuse). Bei den Kontrolltieren ohne PTFE-Injektion hatte die Nav1.8-Inhibition keine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität ($1,16 \pm 0,01$, $p = 0,931$, $n = 5$ Mäuse).

3. Ergebnisse

Auch die CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kardiomyozyten wurden mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur überprüft ($p_{\text{Intervention}} = 0,799$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,280$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,761$). In den Zellen der Mäuse mit einer genetischen Ablation der CaMKII δ konnte mit einem SBFI-Verhältnis sowohl bei den Tieren mit als auch ohne PTFE-Injektion von $1,18 \pm 0,01$ kein Unterschied detektiert werden ($p = 0,971$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse). Die Zugabe von PF-01247324 zu den Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen hatte eine vernachlässigbare Reduktion der Fluoreszenzintensität auf $1,17 \pm 0,01$ zur Folge ($p = 0,828$, $n = 9$ Mäuse). Auch bei den Zellen der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kontrolltiere konnte nach der PF-Inkubation mit einer SBFI-Ratio von $1,16 \pm 0,01$ keine signifikante Veränderung detektiert werden ($p = 0,687$, $n = 10$ Mäuse). Alle in Abbildung 43 dargestellten Werte wurden ebenfalls bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz erfasst.

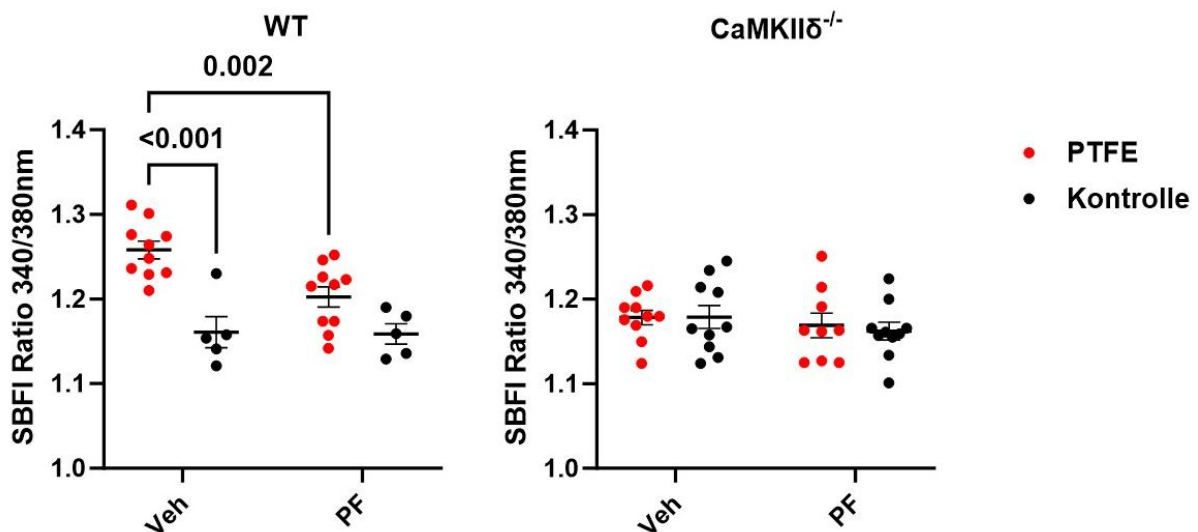


Abbildung 43 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz

Diese Ergebnisse konnten wie in Abbildung 44 ersichtlich ist in ähnlicher Weise auch bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz in den atrialen Kardiomyozyten beobachtet werden. Für die statistische Analyse wurde der Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur verwendet ($p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,017$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,055$). So stieg die SBFI-Ratio in Vorhofzellen von Wildtyp Mäusen von $1,19 \pm 0,01$ bei Kontrolltieren auf $1,27 \pm 0,01$ bei PTFE-Mäusen ($p < 0,001$, $n = 5$ vs. 10 Mäuse), wohingegen die SBFI-Ratio in den Zellen der PTFE-behandelten Wildtyp Tiere nach Inkubation mit PF-01247324 auf $1,21 \pm 0,01$ sank ($p < 0,001$, $n = 10$ Mäuse). Die Zugabe des Nav1.8-Inhibitors zu Kardiomyozyten der Kontrolltiere zeigte eine vernachlässigbare Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses auf $1,18 \pm 0,01$ ($p =$

3. Ergebnisse

0,787, n = 5 Mäuse). Auch die CaMKII $\delta^{-/-}$ Daten wurden mithilfe eines Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur betrachtet ($p_{\text{Intervention}} = 0,339$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,367$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,484$). In atrialen Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen mit einem Knock-out der CaMKII δ wurde eine SBFI-Ratio von $1,19 \pm 0,01$ gemessen, wobei die nicht-operierten Kontrolltiere eine ähnliche Fluoreszenzintensität von $1,18 \pm 0,01$ aufwiesen ($p = 0,978$, n = 10 vs. 10 Mäuse). Auch unter PF-01247324 zeigten sich bei einer SBFI-Ratio von $1,18 \pm 0,02$ keine Auswirkung auf den fluoreszenzmikroskopisch gemessenen Natriumgehalt der PTFE-Mäuse ($p = 0,978$, n = 9 Mäuse). Die SBFI-Ratio der CaMKII $\delta^{-/-}$ Kontrollen nach der pharmakologischen Intervention mit PF-01247324 lag bei $1,16 \pm 0,01$ ($p = 0,583$, n = 10 Mäuse).

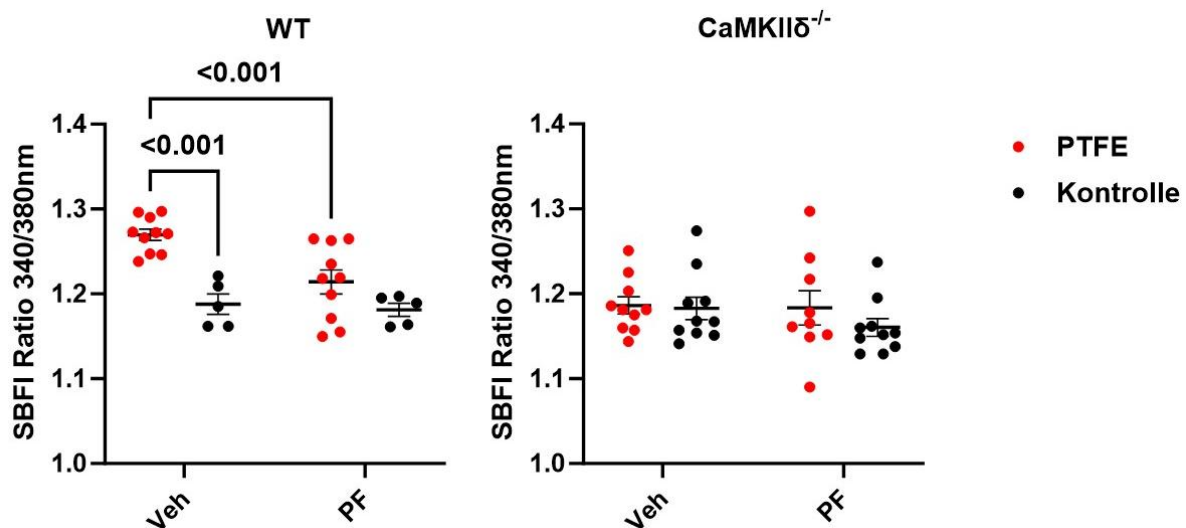


Abbildung 44 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz

Auch die ventrikulären Kardiomyozyten wurden mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert ($p_{\text{Intervention}} < 0,001$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,070$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,105$). Bei den Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen zeigte sich unter einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz ein ähnlicher Anstieg der SBFI-Ratio in den Kardiomyozyten von PTFE-Tieren auf $1,27 \pm 0,01$ im Vergleich zu gesunden Mäusen mit einem Fluoreszenzverhältnis von $1,18 \pm 0,02$ ($p < 0,001$, n = 5 vs. 10 Mäuse). Nach Zugabe des Nav1.8-Inhibitors kam es zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenz auf $1,22 \pm 0,01$ ($p = 0,005$, n = 10 Mäuse). Die gemessene Fluoreszenzintensität bei den Kardiomyozyten der Kontrolltiere zeigte nach Inkubation mit PF keine Veränderung im Vergleich zur Vehikelgruppe (SBFI-Ratio $1,18 \pm 0,01$, $p = 0,891$, n = 5 Mäuse).

3. Ergebnisse

Ähnliche Ergebnisse wie in den vorangegangenen Messungen konnten bei den Analysen der ventrikulären Zellen der Tiere mit einem Knock-out der CaMKII δ , welche erneut mithilfe des Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur durchgeführt wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,729$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,229$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,651$), unter der Stimulationsfrequenz von 2 Hz beobachtet werden. Dabei wiesen die CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäuse nach PTFE-Injektion eine SBFI-Ratio von $1,20 \pm 0,01$ auf, welche in der gleichen Höhe auch bei den gesunden CaMKII $\delta^{-/-}$ Kontrollen gemessen werden konnte ($1,20 \pm 0,01$, $p = 0,939$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse). Zudem wurde wie in Abbildung 45 zu sehen ist nach der Inkubation mit PF-01247324 erneut keine nennenswerte Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität beobachtet (SBFI-Ratio $1,19 \pm 0,01$, $p = 0,836$, $n = 9$ Mäuse). Auch auf die Kardiomyozyten der gesunden CaMKII $\delta^{-/-}$ -Kontrolltiere hatte die Nav1.8-Blockade keine relevanten Auswirkungen (SBFI-Ratio $1,18 \pm 0,01$, $p = 0,555$, $n = 10$ Mäuse).

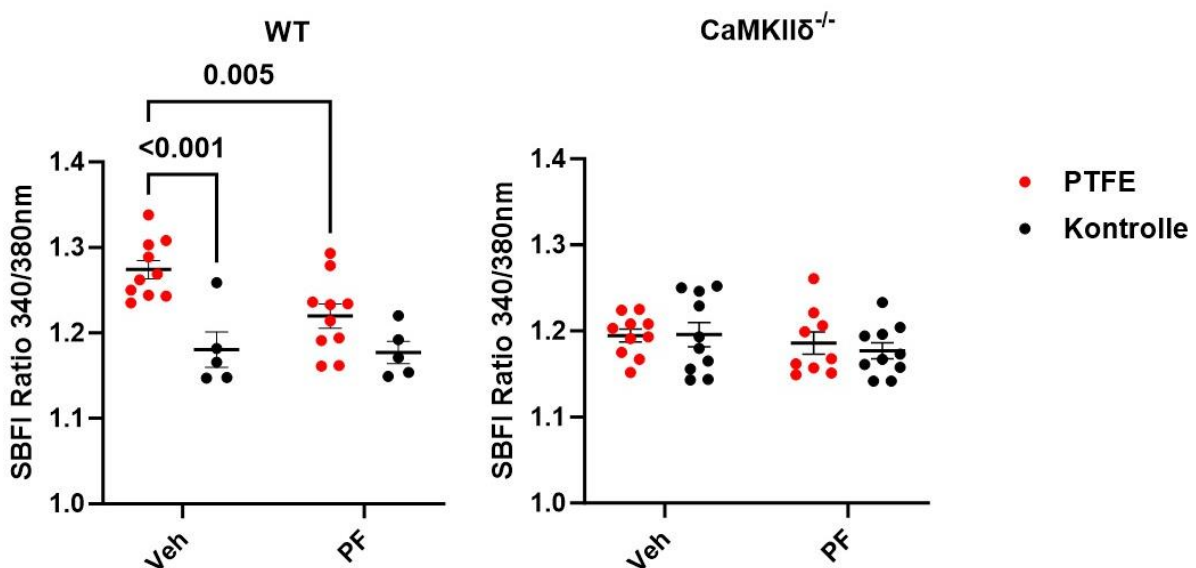


Abbildung 45 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz.

3. Ergebnisse

Auch bei den Messungen in atrialen Kardiomyozyten unter einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz, welche mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur untersucht wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,003$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,033$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,049$), zeigte sich die Erhöhung des Natriumgehalts bei PTFE-Mäusen mit einer intakten CaMKII δ (Wildtyp). So konnte bei gesunden Wildtyp Kontrolltieren eine SBFI-Ratio von $1,21 \pm 0,01$ gemessen werden. Die operierten Tiere wiesen dagegen wie in Abbildung 46 ersichtlich ist signifikant erhöhte Werte von $1,28 \pm 0,01$ auf ($p = 0,002$, $n = 5$ vs. 10 Mäuse), die durch eine Nav1.8-Blockade auf $1,22 \pm 0,02$ gesenkt wurden ($p = 0,002$, $n = 10$ Mäuse). Bei den Zellen der gesunden Wildtyp Kontrollen hatte PF-01247324 keine Auswirkung (SBFI-Ratio $1,20 \pm 0,01$, $p = 0,928$, $n = 5$ Mäuse). In den atrialen Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen mit Knock-out der CaMKII δ , deren Messwerte ebenfalls mithilfe des Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,380$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,676$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,576$), konnte eine SBFI-Ratio von $1,19 \pm 0,01$ im Vergleich zu $1,19 \pm 0,02$ bei Kontrolltieren detektiert werden ($p = 0,967$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse). Nach der Nav1.8-Blockade zeigte sich bei den Kardiomyozyten der PTFE-Mäuse mit einer SBFI-Ratio von $1,20 \pm 0,02$ (wie auch unter den anderen Stimulationsfrequenzen) kein Unterschied ($p = 0,967$, $n = 9$ Mäuse). Die SBFI-Ratio bei den CaMKII $\delta^{-/-}$ Kontrollen betrug nach der pharmakologischen Inhibition des Natriumkanals $1,17 \pm 0,01$ ($p = 0,863$, $n = 10$ Mäuse).

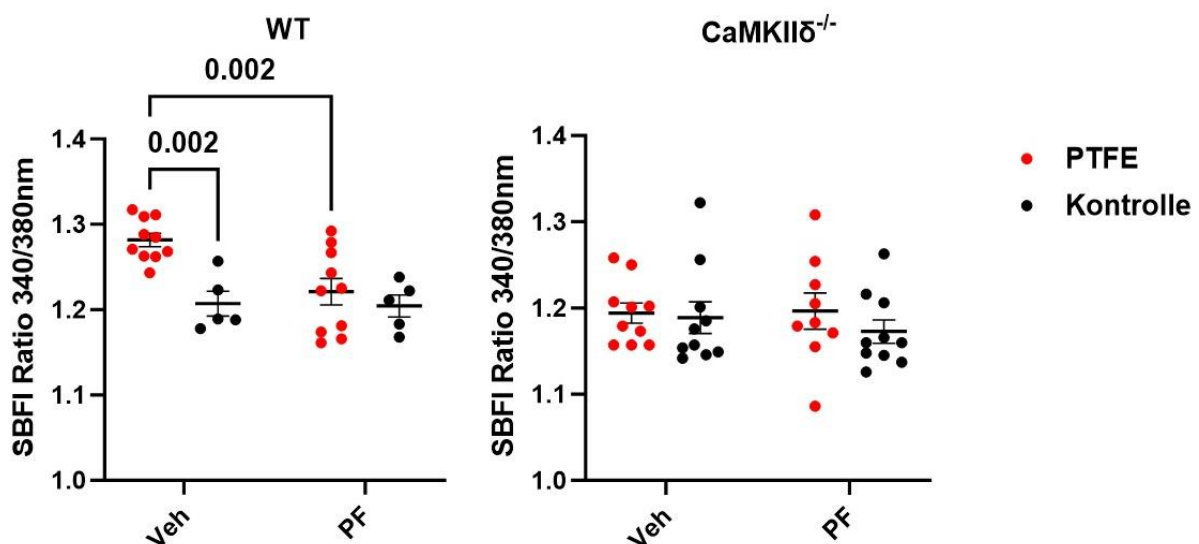


Abbildung 46 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz.

3. Ergebnisse

Bei den ventrikulären Zellen der Wildtyp Tiere, die wieder mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur untersucht wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,004$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,119$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,228$), zeigte sich unter einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz ebenfalls ein Anstieg der SBFI-Ratio von $1,21 \pm 0,03$ bei gesunden Kontrollen auf $1,29 \pm 0,01$ bei PTFE-Mäusen ($p = 0,009$, $n = 5$ vs. 10 Mäuse). Wie bei allen Experimenten mit Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen bewirkte PF-01247324 auch bei diesen Zellen eine Reduktion der SBFI-Ratio bei PTFE-Mäusen auf $1,24 \pm 0,02$ ($p = 0,021$, $n = 10$ Mäuse), wohingegen die Kardiomyozyten der gesunden Wildtyp Kontrollen keine Reaktion auf die Substanz zeigten (SBFI-Ratio $1,20 \pm 0,02$, $p = 0,793$, $n = 5$ Mäuse). Die Messungen der SBFI-Ratio in den Ventrikelzellen der $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ -Mäuse, die ebenfalls mit dem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,396$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,149$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,303$), zeigten bei dieser Stimulationsfrequenz kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Während die Kontrolltiere ohne PTFE-Injektion eine SBFI-Ratio von $1,22 \pm 0,01$ aufwiesen, konnte in den Kardiomyozyten der PTFE-Mäuse mit der genetischen Ablation der $\text{CaMKII}\delta$ eine Fluoreszenzintensität von $1,21 \pm 0,01$ detektiert werden ($p = 0,946$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse). Auch nach Inkubation mit dem Nav1.8-Inhibitor präsentierte sich mit einer SBFI-Ratio in den Kardiomyozyten der PTFE-Mäuse von $1,21 \pm 0,01$ kein Unterschied zu den beiden vorangegangenen Messgruppen ($p = 0,946$, $n = 9$ Mäuse). Die SBFI-Ratio bei $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ - Kontrollen nach Inkubation mit PF-01247324 lag bei $1,19 \pm 0,01$ ($p = 0,220$, $n = 10$ Mäuse).

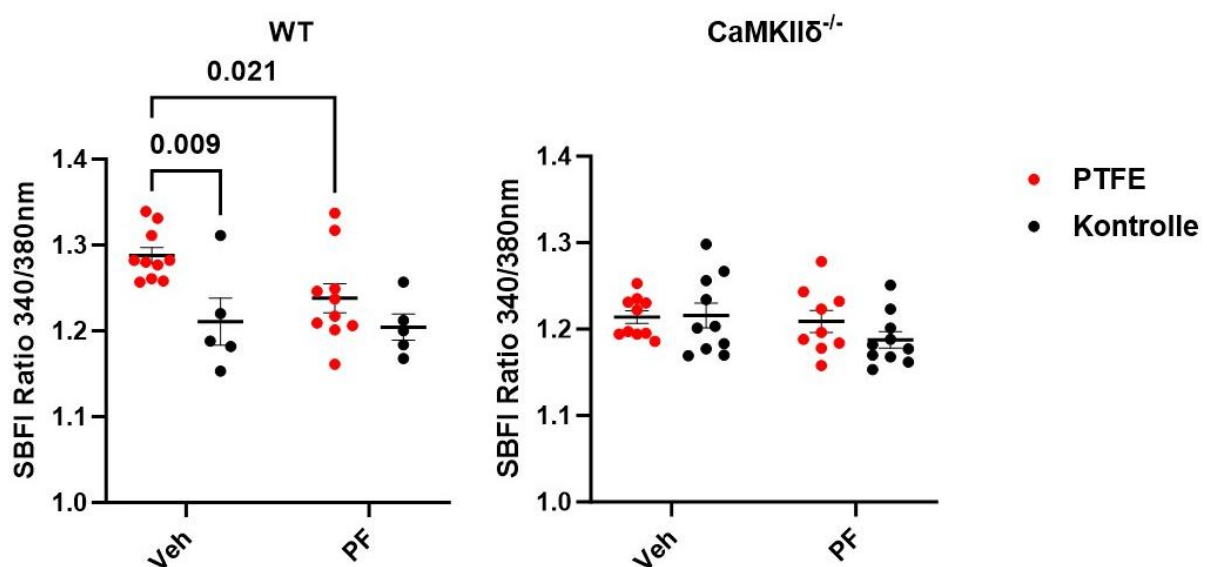


Abbildung 47 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz

3. Ergebnisse

3.3.2 Korrelation der Natriumwerte mit der Schwere der Atemstörung

Der Zusammenhang der Natriumwerte mit der Schwere der Atemstörung wurde mithilfe von linearen Regressionen analysiert. Bei einer Stimulation von 1 Hz zeigte sich eine signifikante Korrelation der Frequenz inspiratorischer Flusslimitationen mit dem SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen ($p = 0,021$, $r^2 = 0,40$, $n = 13$ Mäuse). Nach Inkubation mit PF-01247324 war dieser Zusammenhang aufgehoben ($p = 0,593$, $r^2 = 0,03$, $n = 13$ Mäuse). Bei den $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der SBAS und der SBFI-Ratio ($p = 0,027$, $r^2 = 0,31$, $n = 16$ Mäuse). Auch bei der Untersuchung der ventrikulären Kardiomyozyten zeigte sich wie in Abbildung 48 ersichtlich eine deutliche Tendenz dieses Zusammenhangs ($p = 0,057$, $r^2 = 0,29$, $n = 13$ Mäuse). Nach Zugabe des Nav1.8-Inhibitors war dieser Zusammenhang vollkommen aufgehoben ($p = 0,926$, $r^2 < 0,01$, $n = 13$ Mäuse). Bei den Mäusen mit einer genetischen Ablation der $\text{CaMKII}\delta$ zeigte sich unter einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz in ventrikulären Zellen ebenfalls keine Korrelation zwischen der Frequenz der inspiratorischen Flusslimitationen und der SBFI-Ratio ($p = 0,109$, $r^2 = 0,17$, $n = 16$ Mäuse).

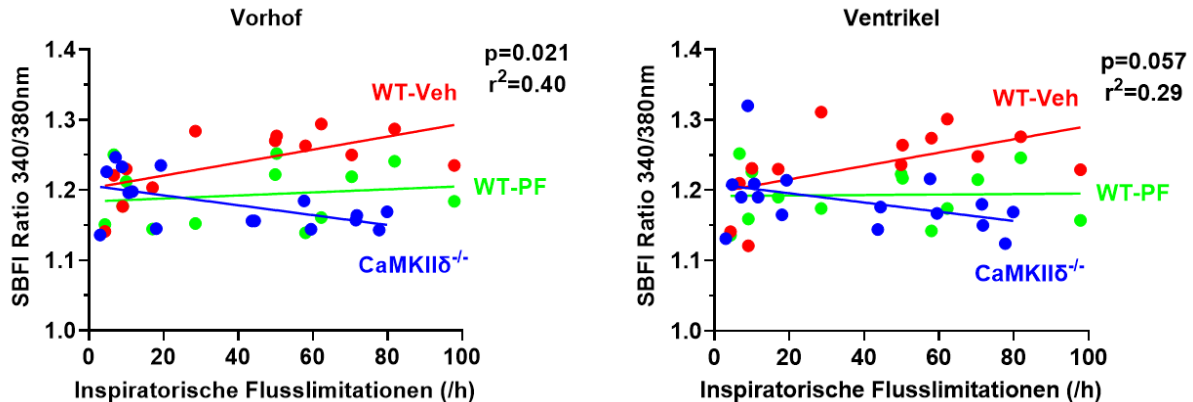


Abbildung 48 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz

3. Ergebnisse

Auch der Zusammenhang zwischen den inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde und der SBFI-Ratio bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz präsentierte sich wie in Abbildung 49 zu sehen ist in ähnlicher Weise in atrialen Kardiomyozyten ($p = 0,022$, $r^2 = 0,39$, $n = 13$ Mäuse), wohingegen dieser Zusammenhang nach Blockade des Nav1.8 mit PF-01247324 aufgehoben wurde Kardiomyozyten ($p = 0,724$, $r^2 = 0,01$, $n = 13$ Mäuse). Bei den Tieren mit dem Knock-out der CaMKII δ zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,063$, $r^2 = 0,24$, $n = 15$ Mäuse). Bei den ventrikulären Zellen konnte eine starke Tendenz der beiden Parameter beobachtet werden ($p = 0,088$, $r^2 = 0,24$, $n = 13$ Mäuse). Diese Zusammenhänge waren ebenfalls unter Nav1.8 Inhibition mit PF-01247324 ($p = 0,857$, $r^2 < 0,01$, $n = 13$ Mäuse) oder bei genetischem Knock-out der CaMKII δ aufgehoben ($p = 0,149$, $r^2 = 0,15$, $n = 15$ Mäuse).

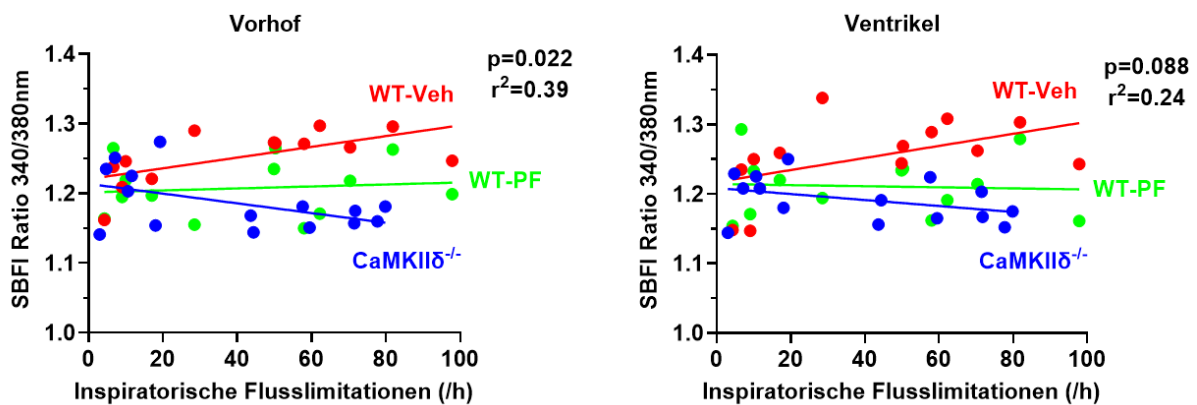


Abbildung 49 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz

3. Ergebnisse

Die starke Korrelation in atrialen Kardiomyozyten präsentierte sich auch bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz. Dabei zeigte sich in den Vorhofszellen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Schwere der obstruktiven Atemstörung (inspiratorische Flusslimitationen (/h)) und der SBFI-Ratio ($p = 0,036$, $r^2 = 0,34$, $n = 13$ Mäuse, lineare Regression). Dieser Zusammenhang konnte weder nach Inkubation mit PF-01247324 ($p = 0,947$, $r^2 < 0,01$, $n = 13$ Mäuse) noch bei $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ - Tieren ($p = 0,076$, $r^2 = 0,22$, $n = 15$ Mäuse) beobachtet werden. Bei den ventrikulären Zellen war erneut keine signifikante Abhängigkeit der SBFI-Ratio zur SBAS zu erkennen ($p = 0,149$, $r^2 = 0,18$, $n = 13$ Mäuse). Unter Nav1.8-Blockade ($p = 0,634$, $r^2 = 0,02$, $n = 13$ Mäuse) oder bei $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ - Mäusen gab es ebenfalls keinen Zusammenhang ($p = 0,155$, $r^2 = 0,15$, $n = 15$ Mäuse).

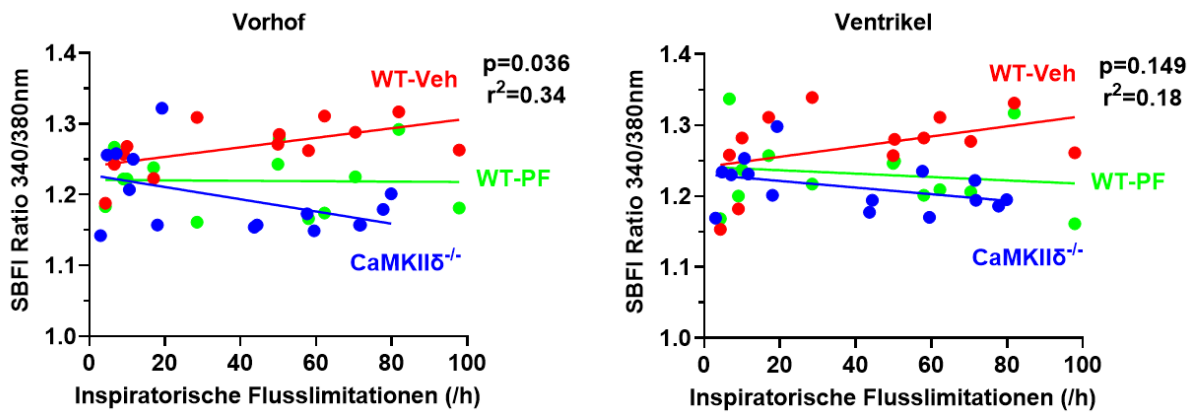


Abbildung 50 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz

3. Ergebnisse

3.3.3 Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die Natriumkonzentration

Um die gemessenen SBFI-Fluoreszenz-Ratios in eine Natriumkonzentration in mmol/l umrechnen zu können, wurde mithilfe von Kalibrierungsmessungen unter Verwendung der beiden Antibiotika Gramicidin D und Strophanthidin eine Eichgerade für atriale und ventrikuläre Messungen getrennt erstellt. Die Kalibrierungen erfolgten in regelmäßigen Abständen während des gesamten Zeitraums der Datenerhebung. Nachfolgend ist eine Originalregistrierung einer Kalibrierungsmessung abgebildet.

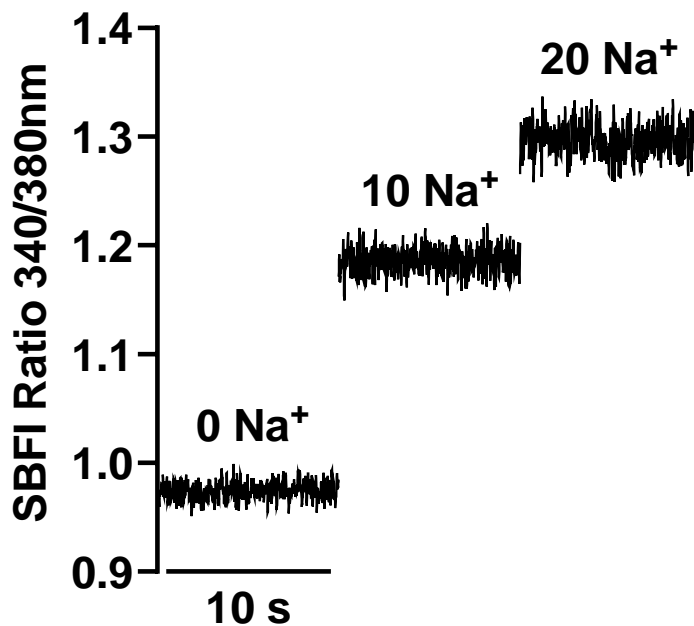


Abbildung 51 - Originalregistrierung einer Kalibrierungsmessung

Aus den erhobenen F_{340}/F_{380} -Verhältnissen bei den Natriumkonzentrationen der Eichlösungen von 0 mmol/l, 10 mmol/l und 20 mmol/l wurden die in Abbildung 52 dargestellten Geraden sowohl für Vorhofzellen ($p < 0,001$, $r^2 = 0,72$, $n = 39$ Zellen von 14 Mäusen) als auch für Ventrikelzellen ($p < 0,001$, $r^2 = 0,82$, $n = 55$ Zellen von 19 Mäusen) anhand einer linearen Regression verfasst.

3. Ergebnisse

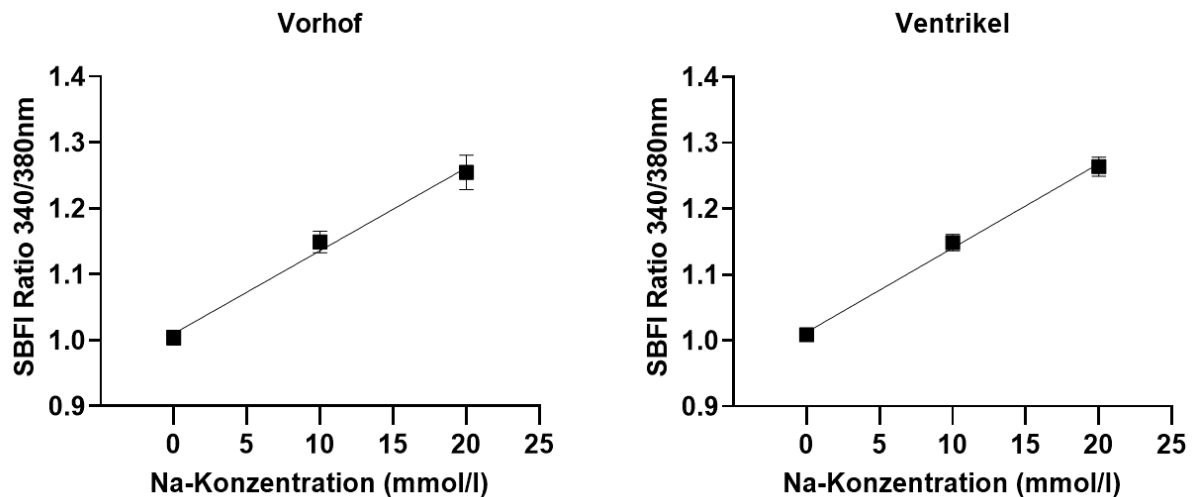


Abbildung 52 - Eichgeraden zur Umrechnung der SBFI-Ratio in eine Natriumkonzentration

Für jede der beiden Geraden konnte anschließend eine Steigungsgleichung bestimmt werden:

Vorhof

$$y = 0,01258x + 1,010$$

Ventrikel

$$y = 0,01278x + 1,012$$

Nach Umformulierung der Geradengleichung wurden die SBFI-Ratios (getrennt für atriale und ventrikuläre Messungen) in die entsprechenden Natriumkonzentrationen umgerechnet und mithilfe eines Ein Weg ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Natriumkonzentration von Wildtyp PTFE-Mäusen deutlich gesteigert war. So wiesen die atrialen Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz nach der PTFE-Behandlung eine Natriumkonzentration von $19,96 \pm 0,65$ mmol/l auf, welche signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollmäusen war (Natriumkonzentration $12,59 \pm 0,94$ mmol/l, $p < 0,001$, $n = 10$ vs. 5 Mäuse). Durch die Inhibition des Nav1.8 konnte der erhöhte Natriumgehalt bei PTFE-Mäusen auf eine Natriumkonzentration von $15,36 \pm 1,05$ mmol/l gesenkt werden ($p < 0,001$, $n = 10$ Mäuse). Bei den Mäusen mit einem Knock-out der CaMKII δ wurde trotz der PTFE-Injektion im Vergleich zu Wildtyp Kontrollmäusen kein erhöhter Natriumgehalt gemessen (Natriumkonzentration $13,50 \pm 0,74$ mmol/l, $p = 0,549$, $n = 10$ Mäuse), welche zudem signifikant niedriger als bei Wildtyp PTFE-Mäusen war ($p < 0,001$, $n = 10$ vs. 10 Mäuse).

3. Ergebnisse

Ebenso konnte in den ventrikulären Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz eine deutlich erhöhte Natriumkonzentration von $19,25 \pm 0,81$ mmol/l bei den PTFE-Mäusen gemessen werden, wohingegen der Natriumgehalt bei den Kontrolltieren bei $11,64 \pm 1,44$ mmol/l lag ($p < 0,001$, $n = 10$ vs. 5 Mäuse). Auch hier wurde durch die Blockade des Nav1.8 die Natriumkonzentration in den Kardiomyozyten der PTFE-Tiere signifikant gesenkt (Natriumkonzentration $14,91 \pm 0,94$ mmol/l, $p = 0,001$, $n = 10$ Mäuse). Die Natriumkonzentration der CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäuse mit PTFE-Intervention unterschied sich ebenfalls nicht zu dem Natriumgehalt der Kontrolltiere (Natriumkonzentration $13,02 \pm 0,66$ mmol/l, $p = 0,395$, $n = 10$ Mäuse) und war signifikant niedriger als bei Wildtyp PTFE-Mäusen ($p < 0,001$, $n = 10$ vs. 10). Diese Unterschiede konnten wie in Abbildung 53 und Abbildung 54 zu sehen ist auch bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz und 4 Hz beobachtet werden.

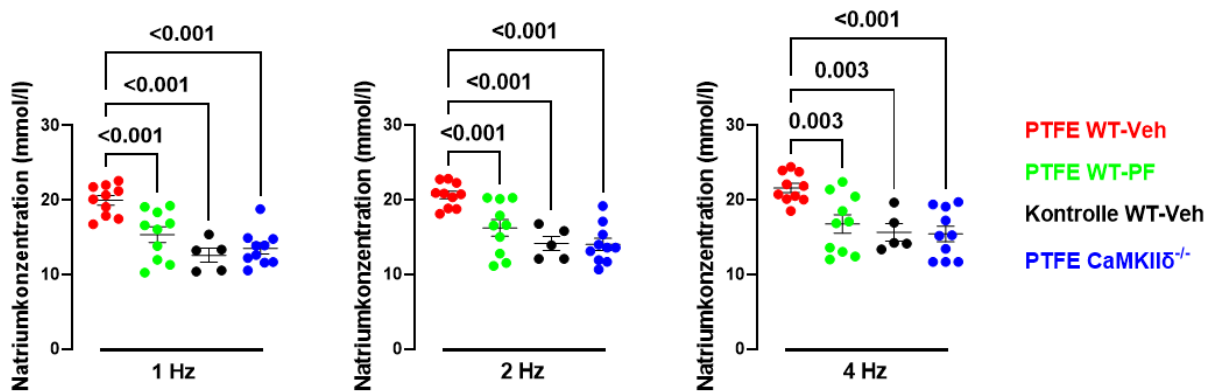


Abbildung 53 - Natriumkonzentration in atrialen Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Stimulationsfrequenz

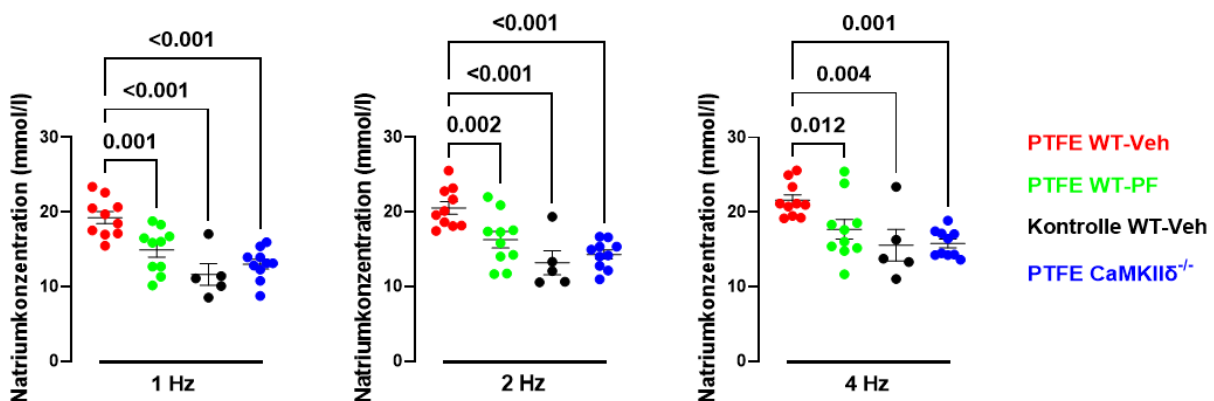


Abbildung 54 - Natriumkonzentration in ventrikulären Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Stimulationsfrequenz

3. Ergebnisse

3.4 Analyse der diastolischen Relaxationszeit

Um die Geschwindigkeit der Relaxation bis 80% der diastolischen Länge nach erfolgter Sarkomerverkürzung zu vergleichen, wurde diese in einem ausgewählten Zellabschnitt mit einer Myozytenkamera parallel zu den epifluoreszenzmikroskopischen Messungen aufgezeichnet. Dabei wurden jedoch nur die Relaxationszeiten bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz miteinander verglichen, da bei einer höheren Frequenz die Myozytenverkürzungen nicht mehr suffizient von der Kamera erkannt und unterschieden werden konnten. Als Zeit der Relaxation wurde die Dauer von der minimalen systolischen Zelllänge bis auf 80% der maximalen diastolischen Zelllänge gewählt. In Abbildung 55 ist eine Originalregistrierung von Vorhof- und Ventrikelzellen dargestellt.

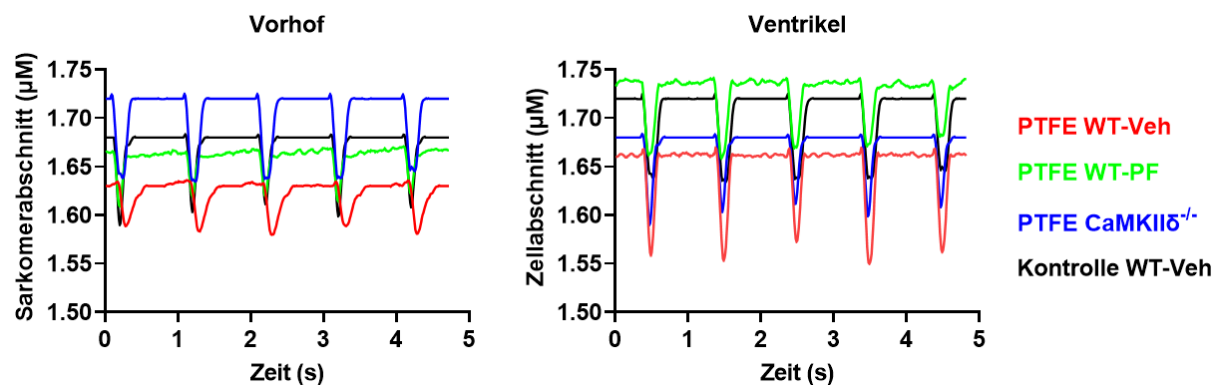


Abbildung 55 - Originalregistrierungen der Messungen der Relaxationszeiten

Die Daten der atrialen Kardiomyozyten wurden anschließend mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert ($p_{\text{Intervention}} = 0,061$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,040$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,079$). Dabei zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Relaxationszeit der PTFE-behandelten Wildtyp Mäuse von $0,11 \pm 0,01$ Sekunden im Vergleich zur Relaxationsdauer der atrialen Kardiomyozyten bei den Kontrolltieren von $0,08 \pm 0,01$ Sekunden ($p = 0,015$, $n = 9$ vs. 4 Mäuse). Nach Inkubation mit dem selektiven Nav1.8-Inhibitor PF-01247324 normalisierte sich die die Relaxationszeit der PTFE-Mäuse vom Wildtyp signifikant auf $0,08 \pm 0,01$ Sekunden ($p = 0,004$, $n = 9$ Mäuse). Damit lag die Relaxationszeit der Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen nach der pharmakologischen Blockade des Natriumkanals wie in Abbildung 56 ersichtlich ist auf dem Niveau der Kontrolltiere. Die Inkubation der Zellen der nicht-operierten Kontrolltiere mit dem Nav1.8-Inhibitor hatte keine Auswirkung im Vergleich zur Vehikelgruppe ($p = 0,856$, $0,08 \pm 0,01$ Sekunden, $n = 4$ Mäuse).

3. Ergebnisse

Bei den atrialen Kardiomyozyten der $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Tiere, die ebenfalls mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur untersucht wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,264$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,108$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,493$), zeigte sich sowohl bei PTFE-behandelten Mäusen ($0,07 \pm 0,01$ Sekunden, $n = 10$ Mäuse) als auch bei den Tieren ohne die Intervention ($0,06 \pm 0,01$ Sekunden, $n = 11$ Mäuse) keine nennenswerten Unterschiede in der Zeitdauer der Relaxation ($p = 0,919$). Nach Inkubation mit dem Nav1.8-Inhibitor konnte eine Relaxationszeit der Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen mit genetischer Ablation der $\text{CaMKII}\delta$ von $0,08 \pm 0,01$ Sekunden gemessen werden ($p = 0,316$, $n = 9$ Mäuse). Die Zellen der $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Kontrolltiere wiesen nach der pharmakologischen Nav1.8-Blockade mit einer Relaxationsdauer von $0,07 \pm 0,01$ Sekunden ebenfalls keine Differenz auf ($p = 0,736$, $n = 11$ Mäuse).

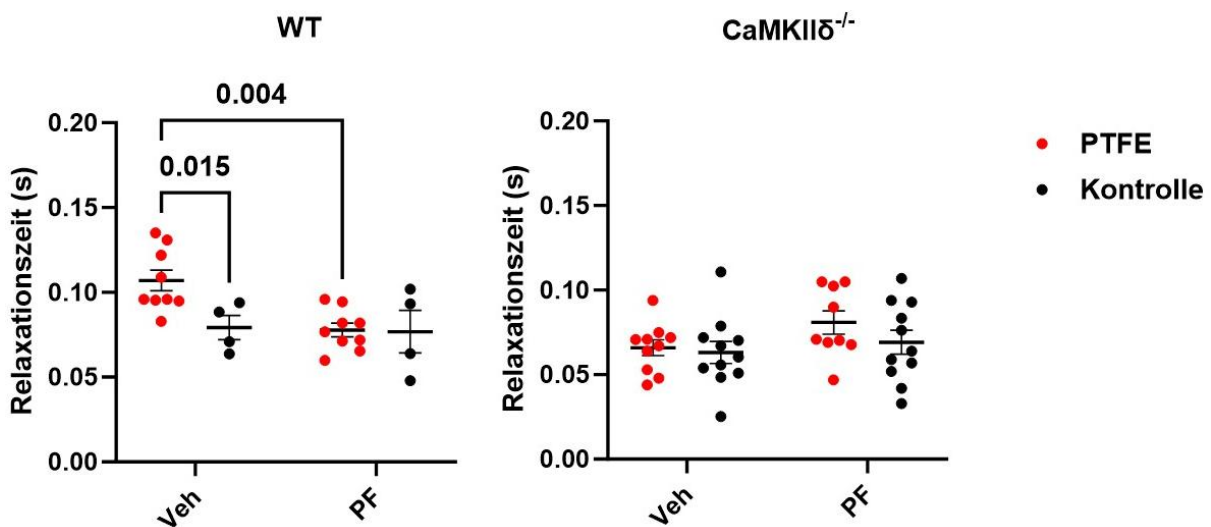


Abbildung 56 - Relaxationszeit von atrialen Kardiomyozyten bei WT- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz

Bei der Untersuchung der ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen, die auch mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur durchgeführt wurde ($p_{\text{Intervention}} = 0,192$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,899$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,661$), konnte anders als bei den atrialen Analysen keine Differenz zwischen den Mäusen mit und ohne PTFE-Injektion beobachtet werden. Während die Zellen der PTFE-Mäuse eine Relaxationsdauer von $0,09 \pm 0,01$ Sekunden aufwiesen, wurde bei den Kontrolltieren eine Zeitdauer von $0,10 \pm 0,02$ Sekunden detektiert ($p = 0,758$, $n = 10$ vs. 4 Mäuse). Die Inkubation der Ventrikelzellen von PTFE-Mäusen mit PF-01247324 hatte bei einer anschließend gemessenen Relaxationszeit weder bei PTFE-Tieren ($0,09 \pm 0,01$ Sekunden, $p = 0,758$, $n = 10$ Mäusen) noch bei gesunden Kontrolltieren ($0,11 \pm 0,01$ Sekunden, $p =$

3. Ergebnisse

0,934, $n = 3$ Mäusen) eine signifikante Auswirkung auf die Relaxationszeit. In ventrikulären Kardiomyozyten von $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen, die ebenfalls mit einem Zwei Wege ANOVA mit Holm-Sidak post hoc Korrektur analysiert wurden ($p_{\text{Intervention}} = 0,083$, $p_{\text{Behandlung}} = 0,712$, $p_{\text{Interaktion}} = 0,954$), konnte wie in Abbildung 57 zu sehen ist nach einer PTFE-Injektion eine Relaxationsdauer von $0,08 \pm 0,01$ Sekunden gemessen werden, welche sich auch nach Zugabe des $\text{Nav}1.8$ -Inhibitoren nicht veränderte ($p = 0,771$, $n = 10$ vs. 9 Mäuse). Die Kontrolltiere ohne PTFE-Injektion wiesen eine ähnliche Relaxationszeit von $0,07 \pm 0,01$ Sekunden auf ($p = 0,534$, $n = 11$ Mäuse). Auch bei den nicht-operierten $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen hatte die Zugabe des $\text{Nav}1.8$ -Inhibitors keine Auswirkung auf die Relaxationsdauer ($p = 0,948$, $n = 11$ Mäuse).

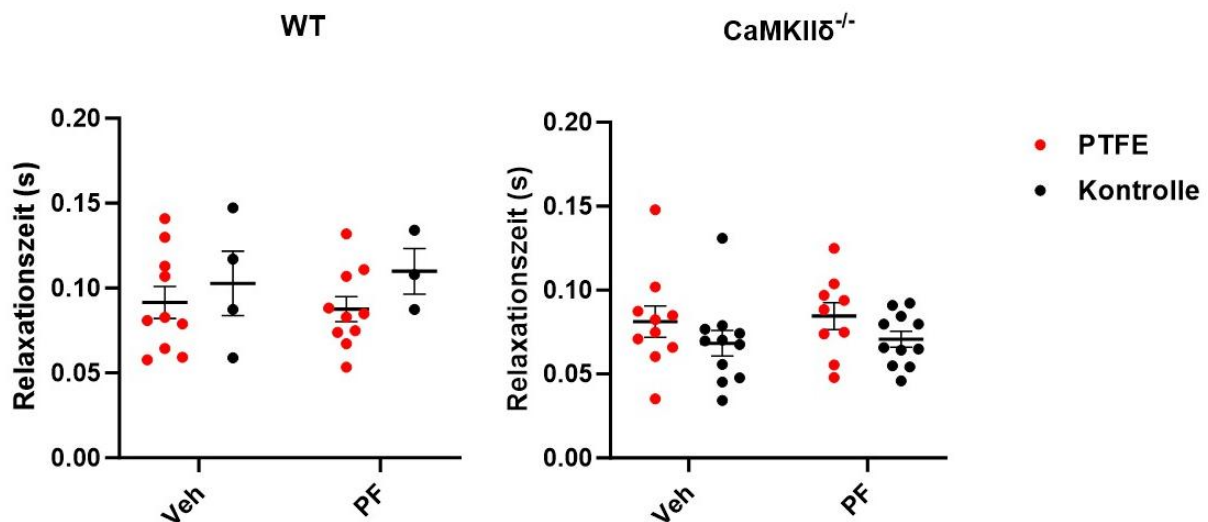


Abbildung 57 - Relaxationszeit von ventrikulären Kardiomyozyten bei WT- und $\text{CaMKII}\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz

4. Diskussion

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom steht im Zusammenhang mit vielen kardialen Komorbiditäten, wobei vor allem die Assoziation mit Vorhofflimmern und der Herzinsuffizienz große Auswirkungen auf die Morbidität und Mortalität der Patienten aufweist (5, 69). So reduziert das Vorliegen von SBAS beispielsweise den elektrischen und pharmakologischen antiarrhythmischen Therapieerfolg, wohingegen eine Behandlung der SBAS durch eine CPAP-Therapie das Wiederauftreten eines Vorhofflimmerns nach einer elektrischen Kardioversion, einer Katheterablation oder einer pharmakologischen Behandlung vermindert (159). Vor dem Hintergrund des demographischen Wandels wird eine deutliche Zunahme der bereits gegenwärtig hohen Prävalenz der obstruktiven Schlafapnoe prognostiziert (4). Da es Hinweise darauf gibt, dass eine CPAP-Therapie nicht bei allen Patienten mit SBAS den gewünschten Therapieerfolg aufweist (43, 160), ist die Untersuchung des Pathomechanismus bei der Entstehung von kardialen Komorbiditäten im Rahmen von SBAS unerlässlich, um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Bei der Pathogenese der kardialen Erkrankungen ist in den letzten Jahren vor allem die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II in den Fokus gerückt. Dabei zeigte sich das Enzym als ein Schlüsselregulator in der kardialen Pathophysiologie, dessen übermäßige Aktivität in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt (56, 103, 104, 117, 118). Somit sind die CaMKII und die von dem Enzym regulierten Proteine potenzielle Zielstrukturen für Therapieansätze. Es gibt zahlreiche Studien über den Zusammenhang zwischen der CaMKII und der kardialen Kalziumhomöostase. Der Einfluss der CaMKII auf den Natriumhaushalt, welcher eng mit dem Kalziumhaushalt verknüpft ist, ist dagegen weitaus weniger erforscht. Vor allem der verzögerte Natriumeinstrom scheint einen großen Einfluss auf die Entwicklung kardialer Komorbiditäten zu nehmen. So konnte bei Patienten mit schlafbezogenen Atemstörungen ein deutlich erhöhter verzögerter Natriumeinstrom sowie eine verstärkte Aktivität der CaMKII nachgewiesen werden (6, 132).

Bisherige Studien mit Patientenproben über die Pathophysiologie bei SBAS haben Limitationen, da Patienten mit SBAS eine Vielzahl an Komorbiditäten präsentierten. Somit waren die Ergebnisse nur bedingt auf SBAS als auslösenden Faktor zurückzuführen und könnten auch durch Komorbiditäten mitbeeinflusst sein (6). Um die Pathogenese besser zu verstehen, untersuchte ich in der vorliegenden Arbeit die

4. Diskussion

Bildung von ROS als mögliche Ursache der vermehrten CaMKII-Aktivierung bei SBAS. Außerdem habe ich mich mit der Fragestellung beschäftigt, ob SBAS Einfluss auf die intrazelluläre Natriumkonzentration zeigen und inwieweit der Natriumhaushalt einer Regulation durch die CaMKII unterliegt. Weiterhin habe ich den Einfluss der Blockade des neuronalen Natriumkanals Nav1.8 auf den kardialen Natriumgehalt untersucht. Dabei verwendete ich für meine Untersuchungen ein SBAS-Mausmodell, welches die differenzierte Analyse in Abwesenheit jeglicher potenzieller Störvariablen ermöglichte.

Die zentralen Ergebnisse meiner Arbeit sind:

1. Mäuse mit einer PTFE-induzierten SBAS zeigen vermehrt mitochondriale und zytosolische reaktive Sauerstoffspezies in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten.
2. Im SBAS-Mausmodell ist die intrazelluläre Natriumkonzentration in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten erhöht.
3. Der gesteigerte intrazelluläre Natriumgehalt in SBAS-Mäusen lässt sich sowohl durch Inhibition des Natriumkanals Nav1.8 als auch durch genetischen Knock-out der CaMKII δ normalisieren.

4. Diskussion

4.1 PTFE-Injektion als geeignetes Modell für SBAS

In Vorarbeiten konnte mittels sonographischer Kontrollen nach der Intervention bereits eine signifikante Zunahme des murinen Zungendiameters gezeigt werden (151). Vor allem die Größe der Zunge scheint ein entscheidender Faktor in der Entwicklung einer obstruktiven SBAS zu sein. So konnten Schwab et al. nachweisen, dass ein erhöhtes Zungenvolumen die wichtigste Risikostruktur bei der Ausbildung der schlafbezogenen Atemstörung ist und dabei sogar unabhängig von anderen Risikofaktoren wie dem Alter, dem Geschlecht oder parapharyngealen Fetteinlagerungen zu sein scheint (161). Zudem war die Frequenz der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde bei den Mäusen nach der PTFE-Intervention im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. Somit präsentierte sich die Intervention in der Induktion einer obstruktiven Verengung des oberen Atemweges als erfolgreich. Bei dem nach zwei und acht Wochen ermittelten Körpergewicht der Mäuse konnte beobachtet werden, dass sich dieses bei den Tieren, die der Intervention unterzogen wurden, im gleichen Ausmaß wie bei den Kontrollen entwickelte. Das deutet darauf hin, dass die Intervention keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme wie beispielsweise durch eine übermäßig große Zunge nimmt. Da die PTFE-behandelten Mäuse bis auf ein vergrößertes Zungenvolumen und damit einhergehenden inspiratorischen Flusslimitationen zunächst keinen Unterschied zu unbehandelten Kontrolltieren zeigten, können die beobachteten Ergebnisse auf den Einfluss von SBAS zurückgeführt werden. Sowohl bei Wildtyp Mäusen als auch bei den Tieren mit der genetischen Ablation der CaMKII δ zeigte sich dabei keine Differenz in der Entwicklung operierter und nicht-operierter Tiere.

In der Forschung rund um das Thema einer obstruktiven Schlafapnoe wurden bereits diverse Tiermodelle entwickelt. Jedes dieser Modelle zeigte jedoch für sich entscheidende Limitationen auf. So wurden beispielsweise in einem vorangegangenen Mausmodell New Zealand Obese Mice verwendet (148). Durch ihre im Vergleich zu anderen Mäusen dickere Zunge weisen diese Tiere von Natur aus eine Neigung zur Entwicklung einer obstruktiven SBAS auf. Jedoch entwickeln sie durch ihr erhöhtes Gewicht auch eine Vielzahl von weiteren Erkrankungen wie einer arteriellen Hypertonie, einer Hyperinsulinämie und einer Hypercholesterinämie (162). Somit kann kein Rückschluss auf eine Genese der kardialen Erkrankungen durch die obstruktive Schlafapnoe als einzigen induzierenden Faktor gezogen werden. Ähnliche

4. Diskussion

Limitationen weisen auch die Ergebnisse sämtlicher Studien an humanen Kardiomyozyten auf, da die Patienten an einer Vielzahl von möglichen beeinflussenden Komorbiditäten litten (53, 59, 60, 69). Bei allen Studien zeigte sich eindeutig, dass eine obstruktive Schlafapnoe mit einer Vielzahl von Komorbiditäten einhergeht. In welchem Ausmaß die SBAS unabhängig von all diesen potenziellen Störvariablen einen entscheidenden Faktor für die Entwicklung der kardialen Erkrankungen darstellt, konnte jedoch nicht gezeigt werden. In einem anderen Tiermodell wurde an Ratten eine obstruktive Schlafapnoe induziert, indem über eine angepasste Maske intermittierend ein negativer Druck in den oberen Atemwegen erzeugt und so die pathophysiologischen Bedingungen einer obstruktiven Schlafapnoe imitiert wurden (149). Diese Intervention erforderte jedoch eine kontinuierliche Anästhesie der Tiere, wodurch das für die Erkrankung typische Erwachen durch die Atemwegsobstruktion mit allen konsekutiven Veränderungen des vegetativen Nervensystems wie der vermehrten nächtlichen Aktivierung des Sympathikus unterdrückt wurde (163). In einem weiteren Versuchsmodell induzierten Iwasaki et al. ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom über den mechanischen Verschluss der Trachea bei Ratten (111). Eine ähnlicher Versuchsaufbau wurde bei den Forschungen von Linz et. al. in Form einer Tracheotomie zur Okklusion des Atemweges bei Schweinen gewählt (19). Auch diese Versuchsansätze weisen durch die Sedierung der Tiere die bereits genannten Limitationen auf.

Im Vergleich zu den bisherigen Forschungen rund um den Zusammenhang von obstruktiven SBAS und kardiovaskulären Folgeerkrankungen eröffnete das neuartige Mausmodell eine einzigartige Möglichkeit für die Forschung an der kardialen Pathophysiologie. Durch die PTFE-Injektion in den Zungengrund der Tiere, was zu einer Verengung der Atemwege führte, waren permanente Sedierungen nicht nötig. Ein weiterer Unterschied zu bisherigen Tiermodellen besteht in der Beobachtungsdauer. Während in anderen Studien die Untersuchungen bereits nach 3-5 Wochen erfolgte (111, 149), wurden die Kardiomyozyten in der vorliegenden Arbeit erst 8 Wochen nach der PTFE-Intervention untersucht. Da die Mäuse keine Probleme bei der Nahrungsaufnahme aufwiesen und sich ihr Körpergewicht normal entwickelte, kann darauf geschlossen werden, dass die vergrößerte Zunge auch keine wesentlichen Behinderungen im wachen Zustand darstellte. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das vergrößerte Zungenvolumen in einer erhöhten Frequenz an

4. Diskussion

Apnoen und inspiratorischen Flusslimitationen mit vorübergehender Hypoxie resultierte. Somit konnte die Pathophysiologie von SBAS-Patienten in Abwesenheit von sämtlichen Komorbiditäten simuliert werden. Dabei zeigten sowohl PTFE-behandelte Mäuse als auch Kontrolltiere abseits ihrer Schlafphasen ein ähnliches Atemmuster, was darauf hindeutet, dass es durch die Intervention zu keiner permanenten Verengung des oberen Atemweges kommt (151). Da in dem hier verwendeten Mausmodell alle Experimente in Abwesenheit von jeglichen Komorbiditäten durchgeführt wurden, können die Ergebnisse auf die obstruktive SBAS zurückgeführt werden.

4.2 Erhöhte Anwesenheit und Bildung reaktiver Sauerstoffradikale im Rahmen einer obstruktiven SBAS

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist der deutliche Anstieg von ROS in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytoplasma. Dies kann neben einer erhöhten Produktion von ROS auch durch einen übermäßigen Verbrauch und damit einer mangelnden Anwesenheit an schützenden Antioxidantien zustande kommen. Einerseits deckt sich dieses Resultat mit den Erkenntnissen aus humanen Studien, in welchen bei Patienten mit SBAS ebenfalls eine erhöhte ROS-Produktion detektiert werden konnte (6). Insbesondere der zyklische Wechsel von Hypoxie und Reoxygenierung im Rahmen von SBAS führt zur Bildung von ROS (20). Aber auch durch das kurzzeitige Erwachen aus dem Schlaf und die deutliche Aktivitätssteigerung des β -adrenergen Systems mit Aktivierung der NADPH-Oxidase führen zur gesteigerten ROS-Produktion (25). Zudem aktiviert das β -adrenerge System das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, was ebenfalls zur vermehrten ROS-Bildung führt (15, 24, 25). Vor allem bei obstruktiven SBAS führt die Inspiration gegen den verlegten oberen Atemweg zu einem negativen intrathorakalen Druck mit erhöhter Nachlast (18, 20). Dies wiederum steigert den myokardialen Sauerstoffbedarf und könnte somit ebenfalls eine erhöhte ROS-Bildung fördern. Andererseits liefert der Nachweis einer deutlich erhöhten Anwesenheit von ROS auch eine mögliche Ursache für eine vermehrte CaMKII-Aktivität, die wie aus einigen Studien ersichtlich eine zentrale Rolle in vielen kardialen Pathomechanismen spielt (6, 147). So könnte die überschießende Aktivierung vorrangig durch die Oxidation an den Methioninen 281/282 zustande kommen. In einem Mausmodell konnten Purohit et al. zeigen, dass eine oxidierte und damit aktivierte CaMKII in Zusammenhang mit der Induktion atrialer Arrhythmien steht (164). Somit scheint der oxidative Aktivierungsweg der CaMKII eine wichtige Rolle bei SBAS zu spielen. Auch Arzt et. al. konnten eine signifikant vermehrte Oxidation der CaMKII in atrialen Biopsien von Patienten mit SBAS nachweisen (55). Des Weiteren könnten die ROS auch andere zelluläre Strukturen oxidieren und somit weitere potenziell schädliche Mechanismen aktivieren. Vor allem im Rahmen der Herzinsuffizienz könnte die wechselseitige Beeinflussung der CaMKII-Aktivität, des Kalziumhaushalts und der Produktion an ROS eine entscheidende Rolle bei der Progression der Erkrankung spielen (24, 68, 95, 130). Eine weitere Verminderung der protektiven Antioxidantien durch den erhöhten

4. Diskussion

Verbrauch infolge einer übermäßigen Bildung von Radikalen verstärkt somit den ROS-induzierten Zellschaden maßgeblich (130).

4.3 Veränderungen im Natriumhaushalt bei SBAS

Bei der Untersuchung des intrazellulären Natriumhaushalts wurde der ratiometrische Natriumfluoreszenzfarbstoff SBFI verwendet. Ein ratiometrischer Farbstoff zeichnet sich durch unterschiedliche Absorptions- und Emissionsmaxima aus, je nachdem ob er an Natrium gebunden ist oder nicht. Durch den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei zwei Wellenlängen kann unabhängig von der Farbstoffkonzentration eine quantitative Aussage hinsichtlich der Natriumkonzentration gemacht werden.

4.3.1 CaMKII-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration

Die epifluoreszenzmikroskopischen Messungen ergaben signifikant erhöhte SBFI-Ratios bei PTFE-Mäusen mit intakter CaMKII δ (Wildtyp) im Vergleich zu ihren nicht-operierten Wurfgeschwistern. Mithilfe der Kalibrierungsmessungen wurden diese Werte in Natriumkonzentrationen in mmol/l umgerechnet. Dabei entsprachen die gemessenen Natriumkonzentrationen der Kontrolltiere den Werten in der Literatur (165–167). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse eine sinnvolle Abbildung der kardialen Physiologie bei Mäusen darstellen. Die Natriumkonzentrationen von Wildtyp PTFE-Mäusen präsentierten sich dagegen deutlich erhöht im Vergleich zur physiologischen murinen Natriumkonzentration (166, 167). Da es bei CaMKII δ Knock-out Mäusen zu keinen gesteigerten Natriumwerten nach PTFE-Behandlung kam, scheint die CaMKII δ eine wichtige Rolle für den intrazellulären Natriumhaushalt bei SBAS zu spielen. Diese Erkenntnisse knüpfen an den aktuellen Stand der Wissenschaft an. So wurde bei Patienten mit SBAS ein erhöhter verzögerter Natriumeinstrom entdeckt, welcher mit einer Erhöhung der CaMKII-Aktivität einherging und sich durch CaMKII Inhibition normalisieren ließ (6). Auch bei Kardiomyozyten von Patienten mit einer Herzinsuffizienz konnte eine deutlich erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration gemessen werden (126, 168). Ebenso wurde in tierexperimentellen Studien bei einer CaMKII-Überexpression eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration beobachtet (7). Die vermehrte Anwesenheit an ROS könnte die CaMKII im vorliegenden Versuch vermehrt oxidativ aktivieren und die in dieser Arbeit registrierte Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration über eine Steigerung des verzögerten Natriumeinstroms bewirken (122, 147). Durch die erhöhte Natriummenge wiederum könnten in der Folge auch aufgrund der engen

4. Diskussion

Verknüpfung des Natrium- und Kalziumhaushalts in der Zelle über verschiedene Mechanismen kardiale Erkrankungen entstehen. So könnte beispielsweise der Natrium/Kalzium-Austauscher in geringerem Ausmaß aktiviert werden, woraufhin weniger Kalziumionen im Austausch gegen Natriumionen aus dem Zellinneren befördert werden. In diesem Kontext konnten Sossalla et al. nachweisen, dass ein erhöhter verzögerter Natriumeinstrom bei insuffizienten Kardiomyozyten zu einem natriumbedingten Kalziumüberschuss im Zytoplasma führt (128). Die intrazelluläre Akkumulation des Kalziums wiederum kann durch das vermehrte Auftreten von frühen und verzögerten Nachdepolarisationen als proarrhythmisches Surrogat gewertet werden.

Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die hier gezeigten Ergebnisse an murinen Kardiomyozyten entstanden sind. Im Gegensatz zur humanen Physiologie spielt der NCX bei Mäusen nur eine untergeordnete Rolle in der Kalziumhomöostase. So werden ca. 7% des Kalziums durch den NCX nach extrazellulär befördert, wohingegen 92% der intrazellulären Kalziumionen durch die Kalzium-ATPase SERCA2a in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert werden (73). Unter pathologischen Bedingungen können dagegen deutliche Veränderungen auch in der murinen Physiologie auftreten. Hierbei könnte die von Lebek et al. beobachtete vermehrte Aktivität der CaMKII bei SBAS entscheidend sein (151). So könnte die verstärkte Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Rezeptoren führen und damit den Ausstrom der Kalziumionen aus dem SR bedingen, welcher die intrazelluläre Kalziumkonzentration während der Diastole erhöht (97). Damit könnte dieser Pathomechanismus die vermehrt beobachteten DADs bei Patienten mit SBAS erklären (6, 56). Ebenso könnte bei SBAS die SERCA2a infolge ihrer CaMKII-abhängigen Regulation vermehrt aktiviert werden. Das würde zu einer beschleunigten und übermäßigen Aufnahme der Kalziumionen in den SR-Speicher führen, was wiederum die Entstehung eines Kalziumlecks begünstigen könnte (95). Der spontane Austritt von Kalziumionen aus dem SR kann in Form von vermehrten Kalziumsparks beobachtet werden (103). Als Folge eines zytosolischen Kalziumüberschusses wäre eine gesteigerte Aktivierung des NCX (trotz seiner physiologisch eher geringen Bedeutung) unter diesen pathologischen Konditionen denkbar, was ebenfalls zu einem vermehrten Einstrom von Natriumionen führen würde (122). Dies ist ein elektrogener Prozess, welcher

4. Diskussion

verzögerte Nachdepolarisationen und damit Arrhythmien verursachen kann (6). Somit kann es weiterhin auch indirekt zu einer Zunahme für die in dieser Arbeit beobachtete, CaMKII-abhängige Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei PTFE-Mäusen kommen. Ebenso stärkt die in dieser Arbeit gezeigte Korrelation der Höhe der intrazellulären Natriumkonzentration mit der Anzahl der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde die Hypothese eines bedeutsamen Einflusses von schlafbezogenen Atemstörungen auf die Pathogenese der kardialen Komorbiditäten. Der Anstieg des Natriumgehalts in Abhängigkeit zur Schwere der Atemwegsobstruktion bei den Mäusen liefert dabei ähnliche Erkenntnisse wie die Studien an humanen Kardiomyozyten. Auch bei diesen Forschungen fand sich eine direkte Korrelation des Apnoe-Hypopnoe-Indexes mit den proarrhythmischen Ereignissen wie vermehrten EADs und DADs (6). Zudem wurde festgestellt, dass die Patienten mit steigendem AHI vermehrt an kardialen Pathologien wie Vorhofflimmern oder einer Herzinsuffizienz litten (53, 54, 65).

Bei der Untersuchung des intrazellulären Natriumgehalts von Mäusen mit einem CaMKII δ Knock-out konnte keine Differenz der Natriumkonzentration zwischen Mäusen mit und ohne PTFE-Behandlung festgestellt werden. Dabei lag der gemessene Natriumgehalt bei allen Versuchsgruppen mit der genetischen Ablation des Enzyms auf dem Niveau der gesunden Wildtyp Kontrolltiere und damit auch auf dem Niveau der in der Literatur angegebenen physiologischen Natriumkonzentrationen (167). Ebenso war die positive Korrelation des intrazellulären Natriumgehalts mit der Anzahl der inspiratorischen Flusslimitationen vollständig aufgehoben. Das deutet darauf hin, dass die CaMKII eine Schlüsselrolle in der Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei der Entwicklung von kardialen Folgeerkrankungen im Rahmen einer obstruktiven SBAS spielt. Dies ist im Einklang mit Untersuchungen, bei welchen eine signifikant erhöhte Aktivität der CaMKII in humanen Kardiomyozyten von SBAS Patienten entdeckt wurde (6). Durch eine CaMKII-Inhibition konnte dabei eine Verringerung der pathophysiologischen Bedingungen wie zum Beispiel eine Verminderung des verzögerten Natriumeinstroms sowie eine Reduktion des SR Kalziumlecks beobachtet werden, was einen deutlichen Rückgang der Inzidenz von EADs und DADs nach sich zog (6, 55). In anderen Studien konnte im Zusammenhang mit vielen kardialen Erkrankungen eine erhöhte Expression und Aktivität der CaMKII beobachtet werden (109, 113, 114, 122, 169, 170). Somit

4. Diskussion

stimmt die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Bedeutung der CaMKII unter pathologischen Bedingungen mit dem aktuellen Wissenstand der Forschung überein, womit auch die Funktionsfähigkeit des verwendeten Tiermodells weiter bekräftigt wird.

4.3.2 Die Bedeutung des Natriumkanals Nav1.8 bei der Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei SBAS

Nach Zugabe des Nav1.8-Inhibitors PF-01247324 konnte bei Wildtyp Mäusen nach PTFE-Behandlung sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Kardiomyozyten eine signifikante Reduktion der intrazellulären Natriumkonzentration beobachtet werden, wohingegen die Blockade keinen Einfluss auf den Natriumgehalt der Zellen von gesunden Kontrolltieren zu haben scheint. Dieses Resultat deutet auf eine essentielle Rolle des Nav1.8 im Herzen im Rahmen einer obstruktiven SBAS hin. Die Bedeutung des neuronalen Natriumkanals ist jedoch ein kontrovers diskutiertes Thema. Einige Autoren stellen in ihren Studien die Relevanz des Nav1.8 infrage. So beobachteten Casini et al. beispielsweise keine Konsequenzen einer Nav1.8-Blockade in humanen Kardiomyozyten (142). Dabei zeigten sich nach einer Inhibition des Natriumkanals weder Auswirkungen auf den verzögerten Natriumeinstrom noch auf die Dauer des Aktionspotenzials. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Studie nur eine sehr geringe Expression des SCN10A-Gens nachgewiesen werden. Auch Stroud et al. konnten in ihren Analysen weder eine nennenswerte Bedeutung des Nav1.8 bzw. dessen Blockade auf die kardialen Elektrophysiologie zeigen noch dessen übermäßige Expression in murinen Kardiomyozyten nachweisen (171). In diesem Kontext ist es allerdings wichtig zu diskutieren, dass die Ergebnisse ausschließlich durch die Untersuchung von Kardiomyozyten gesunder Probanden bzw. Tiere zustande kamen. Unter physiologischen Konditionen scheint der Nav1.8 keinen nennenswerten Einfluss auf die kardiale Funktion zu nehmen (171). Das ändert sich jedoch unter pathologischen Bedingungen. So konnte bereits in vielen tierexperimentellen Studien aber auch im Rahmen von Forschungen an humanen Kardiomyozyten nachgewiesen werden, dass der Natriumkanal Nav1.8 im Krankheitsgeschehen vermehrt exprimiert wird und der verzögerte Natriumeinstrom signifikant erhöht ist, wohingegen die Expression des Nav1.5 im Myokard unter pathologischen Konditionen vermindert ist (6, 122, 172). Daneben zeigten Analysen eine Beteiligung des Nav1.8 bei vielen kardialen Erkrankungen in Kombination mit einer Erhöhung des verzögerten Natriumeinstroms (122, 132, 145). Dadurch liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der

4. Diskussion

Nav1.8 einen wichtigen Einfluss auf den verzögerten Natriumeinstrom und damit auf die kardiale Pathophysiologie aufweist. Der Natriumkanal ist beispielsweise mit der Induktion eines Vorhofflimmerns assoziiert (137, 143). Auch im Rahmen der Herzinsuffizienz wurde eine vermehrte Expression des SCN10A-Gens nachgewiesen (122, 147). Zudem scheinen viele Polymorphismen des SCN10A-Gens mit einer Veränderung der Herzfrequenz und der Erhöhung des Arrhythmie-Risikos assoziiert zu sein (140, 144). Durch eine Blockade des Nav1.8 konnte dabei in allen genannten Studien der verzögerte Natriumeinstrom deutlich gesenkt werden (122, 136, 137, 145, 147). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine genetische Ablation des Nav1.8 bei Mäusen mit einer erhöhten CaMKII δ -Aktivität unter den Bedingungen einer Herzinsuffizienz die murine Mortalität signifikant senkt (147). Auch dieses Erkenntnis weist auf eine relevante Bedeutung des Natriumkanals in der kardialen Pathophysiologie hin. So könnte es durch den Knock-out zur Verminderung des verzögerten Natriumeinstroms kommen, was wiederum eine Reduktion letaler Arrhythmien und eine Verringerung des Pumpversagens zur Folge haben könnte und dementsprechend die verminderte Sterblichkeit erklären würde (147).

Die Ergebnisse der Messungen in dieser Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass der neuronale Natriumkanal Nav1.8 im Rahmen der obstruktiven SBAS einen durchaus nennenswerten Einfluss auf die kardiale Pathophysiologie aufweist. Sie bekräftigen damit die Forschungsergebnisse von Bengel et al., welche eine hohe Beteiligung des Nav1.8 beim späten Natriumeinstrom unter pathologischen Bedingungen in Abhängigkeit der CaMKII zeigten (147). Durch die deutliche Verringerung des intrazellulären Natriumgehalts sowohl in atrialen wie auch in ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen nach PTFE-Behandlung könnte auch die Inzidenz für verschiedene kardiale Pathologien wie dem Vorhofflimmern und der Herzinsuffizienz sinken, da es neben der Reduktion des verzögerten Natriumeinstroms zu einer geringeren Hemmung des Natrium/Kalzium-Austauschers und einer Reduktion des diastolischen Kalziumlecks kommen könnte (122, 145). Dadurch würde der intrazelluläre Kalziumgehalt in einem weitaus geringeren Umfang ansteigen, was das Risiko der Entstehung von frühen und späten Nachdepolarisationen beträchtlich senken würde. Zudem konnten Lebek et al. kürzlich zeigen, dass die Expression des Nav1.8 signifikant mit dem Ausmaß einer schlafbezogenen Atemstörung korreliert und sich dieser Zusammenhang auch auf die Höhe des verzögerten Natriumeinstroms bei

4. Diskussion

den Patienten mit SBAS auswirkt (132). Auch mit diesen Erkenntnissen werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter unterstützt.

Im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen konnte bei PTFE-Mäusen mit dem Knock-out der CaMKII δ keine Veränderung der intrazellulären Natriumkonzentration nach Inkubation mit PF-01247324 weder in atrialen noch in ventrikulären Kardiomyozyten beobachtet werden. Nach Zugabe des Nav1.8-Inhibitors blieb der gemessene Natriumgehalt auf dem Konzentrationsniveau aller untersuchten CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäuse sowie der Kontrolltiere vom Wildtyp. Auch dieses Ergebnis kann man auf die entscheidende Bedeutung der CaMKII in der kardialen Pathophysiologie zurückführen (95). Im Rahmen der SBAS wird das Enzym auf unterschiedlichen Wegen wie beispielsweise der Autophosphorylierung oder der Oxidation verstärkt aktiviert (55). Die in dieser Arbeit gemessene erhöhte ROS-Produktion deutet darauf hin, dass vor allem der oxidative Aktivierungsweg eine bedeutende Rolle in der CaMKII-Aktivierung im Rahmen der obstruktiven SBAS spielen könnte. Das wiederum führt zur vermehrten Aktivierung von CaMKII-gesteuerten Ionenkanäle, welche unter anderem für die Erhöhung des verzögerten Natriumeinstroms und des intrazellulären Natriumgehalts verantwortlich sind (122, 145). Zu diesen Proteinen gehört auch der Nav1.8, dessen CaMKII-Abhängigkeit kürzlich gezeigt wurde (147). Die Beobachtungen decken sich ebenfalls mit den Erkenntnissen von Bengel et al., dass Mäuse mit einer Überexpression der CaMKII einen erhöhten späten Natriumeinstrom präsentieren, welcher sowohl durch eine pharmakologische Blockade des Nav1.8 als auch durch dessen genetische Ablation deutlich gesenkt werden konnte. Wurden die Kardiomyozyten parallel zur Blockade des Nav1.8 zusätzlich mit dem CaMKII-Inhibitor AIP inkubiert, konnte dagegen keine weitere Reduktion des späten Natriumeinstroms und weiterer pro-arrhythmogener Mechanismen nachgewiesen werden (147). Somit scheint der Nav1.8 einen erheblichen Einfluss auf die intrazelluläre Natriumkonzentration unter pathologischen Bedingungen zu haben, wobei sich die Bedeutung dieses Natriumkanals in Abhängigkeit der CaMKII-Aktivität zu äußern scheint.

4.4 Verlängerung der Relaxationszeit in atrialen Kardiomyozyten von SBAS-Mäusen

Die Aufnahme der Relaxationszeit erfolgte parallel zur Detektion der intrazellulären Natriumkonzentration. Dadurch konnte die Zeitdauer der diastolischen Entspannung und auch die Wirkung einer Nav1.8-Blockade auf diese Phase in den Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen mit den Messungen bei den Kontrolltieren verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dabei eine signifikant verlängerte Relaxationszeit in atrialen Kardiomyozyten bei PTFE-Mäusen mit einer intakten CaMKII δ (Wildtyp) im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Die Verlängerung des Kontraktionszyklus der Kardiomyozyten im Rahmen der schlafbezogenen Atemstörung steht im Einklang mit der gemessenen erhöhten Natriumkonzentration. Auch in vorangegangenen tierexperimentellen Studien konnte eine Verlängerung der Relaxationszeit mit der Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration assoziiert werden (173). Einen Erklärungsansatz könnte erneut die Verschiebung des intrazellulären Ionenhaushalt liefern. Die gesteigerte Natriumkonzentration muss am Ende der Systole wieder aus der Zelle eliminiert werden. Diese Aufgabe übernehmen verschiedene Proteine wie zum Beispiel die Natrium/Kalium-ATPase oder ATP-abhängige Natriumtransporter (70). Die Normalisierung des intrazellulären Natriumgehalts könnte jedoch aufgrund der erhöhten Ionenmenge mehr Zeit in Anspruch nehmen (174). Deshalb geht das Membranpotenzial nach der initialen Depolarisation langsamer als bei der physiologischen Repolarisation zurück auf das Ruhemembranpotenzial, woraus eine verlängerte diastolische Relaxation resultieren könnte (174, 175). Wie bereits beschrieben kann es durch die übermäßige Aktivität der CaMKII zur vermehrten diastolischen Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 und somit zur Entstehung eines relevanten Kalziumlecks kommen (93, 97). Auch eine erhöhte diastolische Kalziumkonzentration könnte in Form der detektierten verlängerten Relaxationszeit in Erscheinung treten. Die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration könnte zudem die Aktivität des NCX mindern und folglich ebenfalls den Export von Kalziumionen erschweren, was ebenfalls zur verlängerten Relaxationsdauer der Kardiomyozyten beitragen könnte (122, 174, 175). Die Tatsache, dass die Verlängerung der Relaxationszeit ausschließlich in atrialen und nicht in ventrikulären Kardiomyozyten beobachtet wurde, kann möglicherweise durch Unterschiede in der Expression des Nav1.8 als wichtige pathologische Natriumkanal-

4. Diskussion

Isoform erklärt werden. Dabei wurde gezeigt, dass dieser Natriumkanal deutlich stärker in atrialen Zellen exprimiert wird (138).

Bei CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen konnte im Gegensatz zu den Analysen bei Wildtyp Tieren keine Verlängerung der Relaxationsdauer nach PTFE-Injektion beobachtet werden. Stattdessen wiesen sowohl die atrialen als auch die ventrikuläre Kardiomyozyten von CaMKII δ Knock-out Mäusen mit einer obstruktiven SBAS und ebenso die Zellen von CaMKII $\delta^{-/-}$ Kontrolltieren ohne Intervention eine ähnliche Relaxationszeit auf wie sie bei den gesunden Kardiomyozyten von Wildtyp Mäusen ohne Intervention gemessen wurde. Auch diese Beobachtung lässt sich mit dem fehlenden Einfluss der CaMKII δ aufgrund des Knock-outs erklären. Da durch deren Abwesenheit trotz der Bedingungen einer obstruktiven SBAS keine CaMKII-abhängige Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zustande kommt, ist der diastolische Kalziumgehalt bei allen Mäusen mit der genetischen Ablation des Enzyms vergleichbar mit dem der gesunden Wildtyp Mäuse (55, 93, 97). Auch aufgrund der fehlenden CaMKII δ -abhängigen Erhöhung der zellulären Natriumkonzentration durch einen pathologisch gesteigerten verzögerten Natriumeinstrom erfolgt keine natriumbedingte Verlängerung des Aktionspotenzials (120, 123, 124). Somit kommt es auch nicht zu einer verzögerten Kalziumeliminierung und die Relaxation präsentiert sich aufgrund eines nicht vorhandenen Kalziumüberschusses mit einer normalen Zeitdauer. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit SBAS zu einer gesteigerten Expression des neuronalen Natriumkanals Nav1.8 kommt (132). Zudem beobachtete man bei Patienten mit SBAS einen verstärkten späten Natriumstrom, der durch spezifische Inhibition des Natriumkanals Nav1.8 mit PF-01247324 komplett normalisiert werden konnte (6, 132). Diese Daten legen nahe, dass der Natriumkanal Nav1.8 wesentlich für die erhöhte zelluläre Natriumkonzentration bei SBAS ist und so über die oben beschriebenen Mechanismen eine Verlängerung der Relaxationszeit in atrialen Kardiomyozyten bewirkt (6). Entsprechend ließ sich diese Verlängerung durch spezifische Inhibition mit PF-01247324 normalisieren. Da erst kürzlich CaMKII-abhängige mit Nav1.8-abhängigen Signalwegen eng in Verbindung gebracht wurden (147), ist es ersichtlich warum die pathologischen Befunde bei PTFE-Mäusen mit SBAS sowohl durch Knock-out der CaMKII δ als auch durch Inhibition des Nav1.8 verbessert werden konnten. Zusammenfassend wurde somit in Übereinstimmung mit den aktuellen Forschungen auch in dieser Arbeit die Bedeutung des Nav1.8 im

4. Diskussion

kardialen Exzitations-Kontraktions-Zyklus unter pathologischen Bedingungen dargestellt (132, 147).

4.5 Limitationen des SBAS-Modell und der Messungen

Abschließend möchte ich auf die Limitationen des in dieser Arbeit verwendeten Mausmodells und der Messtechniken eingehen. Die auf der Basis dieses Mausmodells entstandenen Erkenntnisse liefern wichtige Einblicke in die möglichen Ursachen der übermäßigen CaMKII-Aktivität und die Dysregulation der kardialen Natriumhomöostase bei SBAS in Abwesenheit potenziell beeinflussender Erkrankungen. Jedoch fanden alle durchgeführten Experimente an isolierten Kardiomyozyten statt. Um weitere Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der kardialen Erkrankungen ziehen zu können, müsste man die *in vitro*-Experimente mit *in vivo*-Modellen ergänzen. Des Weiteren wurden in die Versuche ausschließlich männliche Tiere eingeschlossen. In vorangegangenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass es aufgrund des geschlechtsspezifischen Hormonstatus zu unterschiedlichen Ausprägungen der Folgen einer Schlafapnoe kommen kann (35, 36). Somit besteht die Möglichkeit einer geschlechtsbezogenen Verzerrung der Messergebnisse.

Während die Messungen bei den Stimulationsfrequenzen von 1, 2 und 4 Hz durchgeführt wurden, spiegelt das zwar in etwa die physiologische humane, nicht jedoch die murine Herzfrequenz wider, welche in etwa einer Stimulationsfrequenz um 7 Hz entspricht (176). Da die Natriumdaten bei allen gemessenen Stimulationsfrequenzen in Kardiomyozyten von PTFE-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht war, kann man davon ausgehen, dass dieser Unterschied auch bei höheren Stimulationsfrequenzen besteht. Die Beobachtungen der verlängerten Relaxationszeit dagegen wurden technisch bedingt nur bei einer Feldstimulation mit einer Frequenz von 1 Hz untersucht. Zudem gilt der in dieser Arbeit verwendete Nav1.8-Inhibitor PF-01247324 zwar bei den verwendeten Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ aufgrund seiner hohen Selektivität und Bioverfügbarkeit im Vergleich zu anderen Nav1.8-Inhibitoren als sehr gut (136, 146), dennoch besteht wie bei allen Ionenkanal-Inhibitoren die Möglichkeit einer bisher unbekanntem Interaktion mit weiteren zellulären Strukturen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Anhand unseres Mausmodells konnte gezeigt werden, dass obstruktive SBAS im Zusammenhang mit einer erhöhten Anwesenheit an ROS als mögliche Ursache einer übermäßigen CaMKII-Aktivierung steht. Des Weiteren konnte eine Verbindung zwischen der schlafbezogenen Atemstörung und einer CaMKII-abhängig erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration festgestellt werden. Auch wenn diese Hypothese bereits von anderen Autoren geäußert wurde, war es bislang nicht möglich, den intrazellulären Natriumhaushalt gezielt in Abhängigkeit von der schlafbezogenen Atemstörung und in Abwesenheit jeglicher Komorbiditäten zu analysieren. Die Ergebnisse wiederum bekräftigen die von vielen Autoren geäußerten Überlegungen hinsichtlich der Pathogenese von Arrhythmien im Zusammenhang mit SBAS, wobei die Aktivität der CaMKII eine überaus bedeutsame Rolle zu spielen scheint (6, 55). Zur Behandlung der kardialen Erkrankungen ist eine generelle Hemmung sämtlicher Isoformen der CaMKII jedoch nicht tragbar, da dieses Enzym an vielen essentiellen physiologischen Signalwegen wie beispielsweise an Lernprozessen zentral beteiligt ist (91). Deshalb wurde kürzlich von Lebek et al. eine CRISPR-Cas9 Gen-Editing Strategie entwickelt, mithilfe derer man gezielt die oxidative Aktivierungsstelle der CaMKII δ *in vivo* ausschalten kann. Durch Nutzung eines Troponin T-Promoters wurde ausschließlich die CaMKII δ in Kardiomyozyten modifiziert, was das Risiko potenzieller Nebenwirkungen reduziert (177).

Ein anderer potenzieller therapeutischer Ansatz ist die Inhibition des Nav1.8. In Anlehnung an die Forschung von Macri et al. sind allerdings weitere Studien hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen SCN10A-Varianten sowie deren verstärkter Expression und dem verzögerten Natriumeinstrom notwendig (133). Die Wirkung einer Nav1.8-Inhibition auf den Natriumhaushalt in isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit einer obstruktiven Schlafapnoe scheint unter Berücksichtigung der Resultate dieser Arbeit dabei äußerst vielversprechend zu sein. Somit könnte die selektive Blockade des Natriumkanals durch die Verifizierung der Erkenntnisse aus dieser Arbeit in weiteren Untersuchungen auch an humanen Proben und in klinischen Studien in Zukunft einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von SBAS-verbundenen kardiovaskulären Komorbiditäten darstellen. Der große Vorteil von PF-01247324 im Vergleich zu anderen Nav1.8-Inhibitoren ist die hohe orale Bioverfügbarkeit, was diese Substanz für den klinischen Alltag potenziell interessant

4. Diskussion

erscheinen lässt. Der verwendete Nav1.8-Inhibitor muss allerdings auch kritisch betrachtet werden. In Studien über die Wirkungsweise der Substanz zeigte sich, dass die chemische Verbindung die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren kann (146). Zwar wiesen die Ratten in diesem Versuch keine neurologischen Auffälligkeiten auf, dennoch ist eine Untersuchung dieser leichtgängigen Passage mit allen Konsequenzen obligat. Um eine mögliche Wirkung des Nav1.8-Inhibitors abseits seiner Natriumkanal-Isoform zu untersuchen, könnte man die durchgeführten Experimente an Mäusen mit einer genetischen Ablation des Nav1.8 wiederholen und die Daten mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen.

In auf der Methodik des Mausmodells aufbauenden Studien könnte man zudem die plethysmographischen Messungen erweitern. So wären häufigere Messungen der murinen Atemaktivität in kontinuierlichen Abständen sinnvoll, um die Tiere an die anfangs fremde Schlafumgebung zu gewöhnen. Auch könnten elektrokardiographische Untersuchungen und Messungen der arteriellen Sauerstoffkonzentration in der murinen Schlafphase sehr aufschlussreich sein. Des Weiteren könnte man die Hypothese einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch einen gesteigerten verzögerten Natriumeinstrom mithilfe von Patch-clamp-Analysen untermauern. Dies wurde bereits in humanen Proben von Patienten mit SBAS gezeigt, jedoch noch nicht in SBAS-Mäusen in Abwesenheit von potenziellen Störvariablen (6). Dabei wäre es außerdem möglich, die isolierten Kardiomyozyten der PTFE-Mäuse hinsichtlich spontan auftretenden Membranpotenzialveränderungen zu untersuchen. Ferner könnte der Ursprung der in dieser Arbeit beobachteten vermehrten ROS-Produktion analysiert werden, da die ROS nicht nur die Pathogenese kardialer Erkrankungen fördern, sondern auch einen erheblichen Einfluss auf andere bedeutende Signalwege auf zellulärer Ebene nehmen. Zudem wäre die Analyse der Expression und Aktivität vieler unterschiedlicher Proteine wie dem Nav1.8, dem NCX, der oxidierten Form der CaMKII und des RyR2 in Kardiomyozyten von Mäusen mit SBAS im Vergleich zu Kontrolltieren für weitere Schlussfolgerungen hilfreich. Darüber hinaus könnte man durch eine PTFE-Injektion die Zunahme des Zungendiameters auch an anderen Tierarten wie zum Beispiel Schweinen erwägen, da deren Physiologie mit dem humanen Stoffwechsel wesentlich vergleichbarer ist als die physiologischen Eigenschaften der Nagetiere (178). Da aus einigen Studien ein geschlechtsspezifischer Unterschied abgeleitet werden konnte

4. Diskussion

(35, 36), wäre es auch interessant, weibliche Versuchstiere in zukünftige Forschungen zu inkludieren. Für weitere Schlüsse in Bezug auf die Korrelation zwischen der Schwere der Atemstörung und der Erhöhung des intrazellulären Natriumgehalts wäre es weiterhin hilfreich, humane Kardiomyozyten von Patienten mit einer obstruktiven Schlafapnoe in Abhängigkeit von dem vorab gemessenen AHI hinsichtlich der intrazellulären Natriumkonzentration zu untersuchen. Hierbei müsste jedoch unter anderem das Einwirken möglicher Komorbiditäten beachtet werden.

5. Zusammenfassung

Schlafbezogene Atemstörungen (SBAS) sind eine weit verbreitete Erkrankungsgruppe, welche aufgrund potenzieller Komorbiditäten wie dem Vorhofflimmern und der Herzinsuffizienz eine äußerst hohe sozioökonomische Bedeutung aufweisen. Vor allem die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ), ein Schlüsselenzym in der kardialen Pathophysiologie, scheint dabei über unterschiedlichste Mechanismen vermehrt aktiviert zu werden und zur Pathogenese der kardialen Komorbiditäten entscheidend beizutragen. Zur Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten ist das Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen von essentieller Bedeutung. In meiner Arbeit habe ich mich mithilfe eines neuartigen SBAS-Mausmodells neben der Detektion reaktiver Sauerstoffspezies auf die CaMKII δ -abhängige Regulation des kardialen Natriumhaushalts und dabei insbesondere die Rolle des neuronalen Natriumkanals Nav1.8 konzentriert.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte ich eine vermehrte Anwesenheit und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nachweisen, welche sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytoplasma von atrialen und ventrikulären Zellen der Mäuse mit einer schlafbezogenen Atemstörung imponierte. Zudem zeigte sich bei den Tieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollmäusen sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Kardiomyozyten eine deutlich erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration, welche mit der Schwere der Atemwegobstruktion korrelierte. Des Weiteren konnte in atrialen Kardiomyozyten eine signifikante Verlängerung der diastolischen Relaxationszeit nach der Sarkomerverkürzung beobachtet werden. Unter Zugabe des selektiven Nav1.8-Inhibitors PF-01247324 wurde der erhöhte Natriumgehalt und die verlängerte Relaxationsdauer normalisiert. Eine genetische Ablation der CaMKII δ verhinderte bei Mäusen mit der schlafbezogenen Atemstörung sowohl einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration, eine Korrelation der Daten mit der Schwere ihrer Atemstörung als auch eine Veränderung unter Nav1.8-Blockade. Unter Berücksichtigung der gesteigerten reaktiven Sauerstoffspezies bei SBAS-Mäusen ist die CaMKII δ -Abhängigkeit am besten durch eine oxidative Aktivierung dieses Enzyms zu erklären. Damit stellen die CaMKII δ und der Nav1.8 potenzielle therapeutische Ansatzpunkte für die zukünftige Behandlung von Patienten mit SBAS und kardiovaskulären Erkrankungen dar.

6. Literaturverzeichnis

Literatur

1. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328(17):1230–5. doi: 10.1056/NEJM199304293281704.
2. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine* 2019; 7(8):687–98. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30198-5.
3. Lechat B, Naik G, Reynolds A, Aishah A, Scott H, Loffler KA et al. Multinight Prevalence, Variability, and Diagnostic Misclassification of Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2022; 205(5):563–9. doi: 10.1164/rccm.202107-1761OC.
4. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013; 177(9):1006–14. doi: 10.1093/aje/kws342.
5. Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T et al. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(5):565–71. doi: 10.1016/j.jacc.2006.08.060.
6. Lebek S, Pichler K, Reuthner K, Trum M, Tafelmeier M, Mustroph J et al. Enhanced CaMKII-Dependent Late INa Induces Atrial Proarrhythmic Activity in Patients With Sleep-Disordered Breathing. *Circ Res* 2020; 126(5):603–15. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315755.
7. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 2006; 116(12):3127–38. doi: 10.1172/JCI26620.
8. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(2):136–43. doi: 10.1513/pats.200709-155MG.
9. Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2002; 360(9328):237–45. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09464-3.

6. Literaturverzeichnis

10. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(9):1217–39. doi: 10.1164/rccm.2109080.
11. Quintana-Gallego E, Carmona-Bernal C, Capote F, Sánchez-Armengol A, Botebol-Benhamou G, Polo-Padillo J et al. Gender differences in obstructive sleep apnea syndrome: a clinical study of 1166 patients. *Respir Med* 2004; 98(10):984–9. doi: 10.1016/j.rmed.2004.03.002.
12. Resta O, Bonfitto P, Sabato R, Pergola G de, Barbaro MPF. Prevalence of obstructive sleep apnoea in a sample of obese women: effect of menopause. *Diabetes Nutr Metab* 2004; 17(5):296–303.
13. Mayer P, Pépin JL, Bettega G, Veale D, Ferretti G, Deschaux C et al. Relationship between body mass index, age and upper airway measurements in snorers and sleep apnoea patients. *Eur Respir J* 1996; 9(9):1801–9. doi: 10.1183/09031936.96.09091801.
14. Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA* 2004; 291(16):2013–6. doi: 10.1001/jama.291.16.2013.
15. Abbasi A, Gupta SS, Sabharwal N, Meghrajani V, Sharma S, Kamholz S et al. A comprehensive review of obstructive sleep apnea. *Sleep Sci* 2021; 14(2):142–54. doi: 10.5935/1984-0063.20200056.
16. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. The genetics of obstructive sleep apnoea. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(6):536–42. doi: 10.1097/MCP.0b013e32833ef7fe.
17. Chiu K-L, Ryan CM, Shiota S, Ruttanaumpawan P, Arzt M, Haight JS et al. Fluid shift by lower body positive pressure increases pharyngeal resistance in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(12):1378–83. doi: 10.1164/rccm.200607-927OC.
18. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* 2015; 20:27–45. doi: 10.1016/j.smrv.2014.07.003.
19. Linz D, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Wagner M, Ewen S et al. Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive

6. Literaturverzeichnis

- sleep apnea. Hypertension 2013; 62(4):767–74. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01728.
20. Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 2009; 33(6):1467–84. doi: 10.1183/09031936.00086608.
21. Troncoso Brindeiro CM, Da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(5):H2971-6. doi: 10.1152/ajpheart.00219.2007.
22. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 1995; 96(4):1897–904. doi: 10.1172/JCI118235.
23. Barceló A, Piérola J, Esquinas C, La Peña M de, Arqué M, Alonso-Fernández A et al. Relationship between aldosterone and the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome: effect of continuous positive airway pressure treatment. *PLoS One* 2014; 9(1):e84362. doi: 10.1371/journal.pone.0084362.
24. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 2008; 133(3):462–74. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
25. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A et al. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol* 2013; 4:324. doi: 10.3389/fphys.2013.00324.
26. Muza RT. Central sleep apnoea-a clinical review. *J Thorac Dis* 2015; 7(5):930–7. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.45.
27. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2014; 383(9918):736–47. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60734-5.
28. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education

6. Literaturverzeichnis

- Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(8):686–717. doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.002.
29. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 2012; 8(5):597–619. doi: 10.5664/jcsm.2172.
30. McNicholas WT, Bonsignore MR, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 2007; 29(1):156–78. doi: 10.1183/09031936.00027406.
31. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1:15015. doi: 10.1038/nrdp.2015.15.
32. Hermann DM, Bassetti CL. Role of sleep-disordered breathing and sleep-wake disturbances for stroke and stroke recovery. *Neurology* 2016; 87(13):1407–16. doi: 10.1212/WNL.0000000000003037.
33. Lippi G, Mattiuzzi C, Franchini M. Sleep apnea and venous thromboembolism. A systematic review. *Thromb Haemost* 2015; 114(5):958–63. doi: 10.1160/TH15-03-0188.
34. Arzt M, Young T, Finn L, Skatrud JB, Bradley TD. Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(11):1447–51. doi: 10.1164/rccm.200505-702OC.
35. Hegner P, Lebek S, Maier LS, Arzt M, Wagner S. The Effect of Gender and Sex Hormones on Cardiovascular Disease, Heart Failure, Diabetes, and Atrial Fibrillation in Sleep Apnea. *Front Physiol* 2021; 12:741896. doi: 10.3389/fphys.2021.741896.
36. Martins FO, Conde SV. Gender Differences in the Context of Obstructive Sleep Apnea and Metabolic Diseases. *Front Physiol* 2021; 12:792633. doi: 10.3389/fphys.2021.792633.

6. Literaturverzeichnis

37. Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J. The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med* 1999; 340(11):847–51. doi: 10.1056/NEJM199903183401104.
38. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1981; 1(8225):862–5. doi: 10.1016/s0140-6736(81)92140-1.
39. Antic NA, Catcheside P, Buchan C, Hensley M, Naughton MT, Rowland S et al. The effect of CPAP in normalizing daytime sleepiness, quality of life, and neurocognitive function in patients with moderate to severe OSA. *Sleep* 2011; 34(1):111–9. doi: 10.1093/sleep/34.1.111.
40. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AGN. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365(9464):1046–53. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71141-7.
41. Buchner NJ, Sanner BM, Borgel J, Rump LC. Continuous positive airway pressure treatment of mild to moderate obstructive sleep apnea reduces cardiovascular risk. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(12):1274–80. doi: 10.1164/rccm.200611-1588OC.
42. Peker Y, Thunström E, Glantz H, Eulenburg C. Effect of Obstructive Sleep Apnea and CPAP Treatment on Cardiovascular Outcomes in Acute Coronary Syndrome in the RICCADSA Trial. *J Clin Med* 2020; 9(12). doi: 10.3390/jcm9124051.
43. Traaen GM, Aakerøy L, Hunt T-E, Øverland B, Bendz C, Sande LØ et al. Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Arrhythmia in Atrial Fibrillation and Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2021; 204(5):573–82. doi: 10.1164/rccm.202011-4133OC.
44. Peker Y, Glantz H, Eulenburg C, Wegscheider K, Herlitz J, Thunström E. Effect of Positive Airway Pressure on Cardiovascular Outcomes in Coronary Artery Disease Patients with Nonsleepy Obstructive Sleep Apnea. The RICCADSA Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194(5):613–20. doi: 10.1164/rccm.201601-0088OC.

6. Literaturverzeichnis

45. Zinchuk AV, Chu J-H, Liang J, Celik Y, Beeck S op de, Redeker NS et al. Physiological Traits and Adherence to Sleep Apnea Therapy in Individuals with Coronary Artery Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2021; 204(6):703–12. doi: 10.1164/rccm.202101-0055OC.
46. Araghi MH, Chen Y-F, Jagielski A, Choudhury S, Banerjee D, Hussain S et al. Effectiveness of lifestyle interventions on obstructive sleep apnea (OSA): systematic review and meta-analysis. *Sleep* 2013; 36(10):1553-62, 1562A-1562E. doi: 10.5665/sleep.3056.
47. Chirinos JA, Gurubhagavatula I, Teff K, Rader DJ, Wadden TA, Townsend R et al. CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014; 370(24):2265–75. doi: 10.1056/NEJMoa1306187.
48. Cammaroto G, Galletti C, Galletti F, Galletti B, Gay-Escoda C. Mandibular advancement devices vs nasal-continuous positive airway pressure in the treatment of obstructive sleep apnoea. Systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017; 22(4):e417-e424. doi: 10.4317/medoral.21671.
49. Randerath WJ, Verbraecken J, Andreas S, Bettega G, Boudewyns A, Hamans E et al. Non-CPAP therapies in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011; 37(5):1000–28. doi: 10.1183/09031936.00099710.
50. Flum DR, Belle SH, King WC, Wahed AS, Berk P, Chapman W et al. Perioperative safety in the longitudinal assessment of bariatric surgery. *N Engl J Med* 2009; 361(5):445–54. doi: 10.1056/NEJMoa0901836.
51. Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2021: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; 2021; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold; 2021.
52. Kornej J, Börschel CS, Benjamin EJ, Schnabel RB. Epidemiology of Atrial Fibrillation in the 21st Century: Novel Methods and New Insights. *Circ Res* 2020; 127(1):4–20. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316340.
53. Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL et al. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(8):910–6. doi: 10.1164/rccm.200509-1442OC.

6. Literaturverzeichnis

54. Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE et al. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation* 2004; 110(4):364–7. doi: 10.1161/01.CIR.0000136587.68725.8E.
55. Arzt M, Drzymalski MA, Ripfel S, Meindl S, Biedermann A, Durczok M et al. Enhanced Cardiac CaMKII Oxidation and CaMKII-Dependent SR Ca Leak in Patients with Sleep-Disordered Breathing. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(2). doi: 10.3390/antiox11020331.
56. Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH et al. Enhanced late INa induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 76:94–105. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.016.
57. Zhang L, Hou Y, Po SS. Obstructive Sleep Apnoea and Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2015; 4(1):14–8. doi: 10.15420/aer.2015.4.1.14.
58. Linz D, Schotten U, Neuberger H-R, Böhm M, Wirth K. Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation. *Heart Rhythm* 2011; 8(9):1436–43. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.03.053.
59. Javaheri S, Parker TJ, Liming JD, Corbett WS, Nishiyama H, Wexler L et al. Sleep apnea in 81 ambulatory male patients with stable heart failure. Types and their prevalences, consequences, and presentations. *Circulation* 1998; 97(21):2154–9. doi: 10.1161/01.cir.97.21.2154.
60. Youssef I, Kamran H, Yacoub M, Patel N, Goulbourne C, Kumar S et al. Obstructive Sleep Apnea as a Risk Factor for Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis. *J Sleep Disord Ther* 2018; 7(1). doi: 10.4172/2167-0277.1000282.
61. Kanagala R, Murali NS, Friedman PA, Ammash NM, Gersh BJ, Ballman KV et al. Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation. *Circulation* 2003; 107(20):2589–94. doi: 10.1161/01.CIR.0000068337.25994.21.
62. Monahan K, Brewster J, Wang L, Parvez B, Goyal S, Roden DM et al. Relation of the severity of obstructive sleep apnea in response to anti-arrhythmic drugs in patients with atrial fibrillation or atrial flutter. *Am J Cardiol* 2012; 110(3):369–72. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.03.037.
63. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007; 93(9):1137–46. doi: 10.1136/hrt.2003.025270.

6. Literaturverzeichnis

64. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347(18):1397–402. doi: 10.1056/NEJMoa020265.
65. Khayat RN, Jarjoura D, Patt B, Yamokoski T, Abraham WT. In-hospital testing for sleep-disordered breathing in hospitalized patients with decompensated heart failure: report of prevalence and patient characteristics. *J Card Fail* 2009; 15(9):739–46. doi: 10.1016/j.cardfail.2009.05.005.
66. Paulino A, Damy T, Margarit L, Stoïca M, Deswarte G, Khouri L et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in a 316-patient French cohort of stable congestive heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102(3):169–75. doi: 10.1016/j.acvd.2008.12.006.
67. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:269–80. doi: 10.1152/physiol.00004.2006.
68. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest* 2018; 128(9):3716–26. doi: 10.1172/JCI120849.
69. Rao A, Georgiadou P, Francis DP, Johnson A, Kremastinos DT, Simonds AK et al. Sleep-disordered breathing in a general heart failure population: relationships to neurohumoral activation and subjective symptoms. *J Sleep Res* 2006; 15(1):81–8. doi: 10.1111/j.1365-2869.2006.00494.x.
70. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd Edition. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 2001.
71. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2020; 12(1):e1462. doi: 10.1002/wsbm.1462.
72. Squire JM. Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. *Glob Cardiol Sci Pract* 2016; 2016(2):e201611. doi: 10.21542/gcsp.2016.11.
73. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868):198–205. doi: 10.1038/415198a.

6. Literaturverzeichnis

74. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245(1):C1-14. doi: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
75. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* 1992; 63(2):497–517. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81615-6.
76. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87(1):245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
77. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li J-M, Gove C, Lambeth JD et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003; 93(9):802–5. doi: 10.1161/01.RES.0000099504.30207.F5.
78. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85(4):357–63. doi: 10.1161/01.res.85.4.357.
79. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70(2):200–14. doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.
80. Sawyer DB, Colucci WS. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited. *Circ Res* 2000; 86(2):119–20. doi: 10.1161/01.res.86.2.119.
81. Sag CM, Wagner S, Maier LS. Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2013; 63:338–49. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.035.
82. Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(9):1063–77. doi: 10.1089/ars.2012.4818.
83. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000; 192(7):1001–14. doi: 10.1084/jem.192.7.1001.

6. Literaturverzeichnis

84. Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 2011; 333(6048):1440–5. doi: 10.1126/science.1202768.
85. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T et al. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 2011; 108(5):555–65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221911.
86. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(7):777–93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003.
87. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res* 2012; 111(8):1091–106. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.255216.
88. Hegyi B, Pölönen R-P, Hellgren KT, Ko CY, Ginsburg KS, Bossuyt J et al. Cardiomyocyte Na⁺ and Ca²⁺ mishandling drives vicious cycle involving CaMKII, ROS, and ryanodine receptors. *Basic Res Cardiol* 2021; 116(1):58. doi: 10.1007/s00395-021-00900-9.
89. Terentyev D, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y et al. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ Res* 2008; 103(12):1466–72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184457.
90. Hudmon A, Schulman H. Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:473–510. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135410.
91. Zalcmán G, Federman N, Romano A. CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function. *Front Mol Neurosci* 2018; 11:445. doi: 10.3389/fnmol.2018.00445.
92. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:417–45. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002221.

6. Literaturverzeichnis

93. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(8):919–39. doi: 10.1006/jmcc.2002.2038.
94. Rosenberg OS, Deindl S, Comolli LR, Hoelz A, Downing KH, Nairn AC et al. Oligomerization states of the association domain and the holoenzyme of Ca²⁺/CaM kinase II. *FEBS J* 2006; 273(4):682–94. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05088.x.
95. Rokita AG, Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 2012; 126(17):2125–39. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.124990.
96. Srinivasan M, Edman CF, Schulman H. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* 1994; 126(4):839–52. doi: 10.1083/jcb.126.4.839.
97. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 2003; 92(8):904–11. doi: 10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1.
98. Mishra S, Gray CBB, Miyamoto S, Bers DM, Brown JH. Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes. *Circ Res* 2011; 109(12):1354–62. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.248401.
99. White RR, Kwon YG, Taing M, Lawrence DS, Edelman AM. Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. *J Biol Chem* 1998; 273(6):3166–72. doi: 10.1074/jbc.273.6.3166.
100. Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS et al. A β (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(10):3508–19. doi: 10.1172/JCI43621.
101. Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L et al. Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 2015; 132(7):567–77. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015218.

6. Literaturverzeichnis

102. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T et al. Inhibition of elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 2010; 107(9):1150–61. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.220418.
103. Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation* 2013; 128(9):970–81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001746.
104. Fischer TH, Neef S, Maier LS. The Ca-calmodulin dependent kinase II: a promising target for future antiarrhythmic therapies? *J Mol Cell Cardiol* 2013; 58:182–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.003.
105. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 1991; 266(17):11144–52.
106. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2004; 94(6):e61-70. doi: 10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2.
107. Huke S, Bers DM. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(3):590–9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.12.007.
108. Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV et al. Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* 2009; 105(12):1204–12. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.204172.
109. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T et al. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late INa. *Cardiovasc Res* 2014; 103(1):168–77. doi: 10.1093/cvr/cvu120.
110. Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *Eur Respir J* 2013; 41(6):1439–51. doi: 10.1183/09031936.00128412.

6. Literaturverzeichnis

111. Iwasaki Y, Kato T, Xiong F, Shi Y-F, Naud P, Maguy A et al. Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64(19):2013–23. doi: 10.1016/j.jacc.2014.05.077.
112. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003; 92(8):912–9. doi: 10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5.
113. Yang Y, Zhu W-Z, Joiner M-L, Zhang R, Oddis CV, Hou Y et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(6):H3065-75. doi: 10.1152/ajpheart.00353.2006.
114. Suetomi T, Miyamoto S, Brown JH. Inflammation in nonischemic heart disease: initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 317(5):H877-H890. doi: 10.1152/ajpheart.00223.2019.
115. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):173–7. doi: 10.1038/35004052.
116. Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner M-L, Gao Z, Chen B et al. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(11):4996–5000. doi: 10.1073/pnas.0913760107.
117. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(1):214–22. doi: 10.1124/jpet.106.101832.
118. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev* 2008; 88(4):1491–545. doi: 10.1152/physrev.00030.2007.
119. Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:871–94. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.871.
120. Noble D, Noble PJ. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* 2006; 92 Suppl 4:iv1-iv5. doi: 10.1136/hrt.2005.078782.

6. Literaturverzeichnis

121. Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI. Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* 1998; 98(23):2545–52. doi: 10.1161/01.cir.98.23.2545.
122. Dybkova N, Ahmad S, Pabel S, Tirilomis P, Hartmann N, Fischer TH et al. Differential regulation of sodium channels as a novel proarrhythmic mechanism in the human failing heart. *Cardiovasc Res* 2018; 114(13):1728–37. doi: 10.1093/cvr/cvy152.
123. Antzelevitch C, Nesterenko V, Shryock JC, Rajamani S, Song Y, Belardinelli L. The role of late I_{Na} in development of cardiac arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol* 2014; 221:137–68. doi: 10.1007/978-3-642-41588-3_7.
124. Kornyejev D, El-Bizri N, Hirakawa R, Nguyen S, Viatchenko-Karpinski S, Yao L et al. Contribution of the late sodium current to intracellular sodium and calcium overload in rabbit ventricular myocytes treated by anemone toxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 310(3):H426-35. doi: 10.1152/ajpheart.00520.2015.
125. Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L. The arrhythmogenic consequences of increasing late I_{Na} in the cardiomyocyte. *Cardiovasc Res* 2013; 99(4):600–11. doi: 10.1093/cvr/cvt145.
126. Pieske B, Maier LS, Piacentino V, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate dependence of Na⁺i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* 2002; 106(4):447–53. doi: 10.1161/01.cir.0000023042.50192.f4.
127. Larbig R, Torres N, Bridge JHB, Goldhaber JI, Philipson KD. Activation of reverse Na⁺-Ca²⁺ exchange by the Na⁺ current augments the cardiac Ca²⁺ transient: evidence from NCX knockout mice. *J Physiol* 2010; 588(Pt 17):3267–76. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187708.
128. Sossalla S, Wagner S, Rasenack ECL, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA et al. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(1):32–43. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.006.
129. Kukreja RC, Weaver AB, Hess ML. Sarcolemmal Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase: inactivation by neutrophil-derived free radicals and oxidants. *Am J Physiol* 1990; 259(5 Pt 2):H1330-6. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.5.H1330.

6. Literaturverzeichnis

130. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Böhm M et al. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 2010; 121(14):1606–13. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.914911.
131. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu S-S. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14:1197–218. doi: 10.2741/3303.
132. Lebek S, Hegner P, Hultsch R, Rohde J, Rupprecht L, Schmid C et al. Nav1.8 Dysregulates Na and Ca Leading to Arrhythmias in Patients with Sleep-disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2022. doi: 10.1164/rccm.202205-0981LE.
133. Macri V, Brody JA, Arking DE, Hucker WJ, Yin X, Lin H et al. Common Coding Variants in SCN10A Are Associated With the Nav1.8 Late Current and Cardiac Conduction. *Circ Genom Precis Med* 2018; 11(5):e001663. doi: 10.1161/CIRCGEN.116.001663.
134. Maier LS, Sossalla S, Schulze-Bahr E. SCN10A-Dependent Late INa Current: Never Too Late for Cardiac Conduction? *Circ Genom Precis Med* 2018; 11(5):e002167. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002167.
135. Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 1999; 2(6):541–8. doi: 10.1038/9195.
136. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ Res* 2012; 111(3):322–32. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.265173.
137. Pabel S, Ahmad S, Tirilomis P, Stehle T, Mustroph J, Knierim M et al. Inhibition of NaV1.8 prevents atrial arrhythmogenesis in human and mice. *Basic Res Cardiol* 2020; 115(2):20. doi: 10.1007/s00395-020-0780-8.
138. Facer P, Punjabi PP, Abrari A, Kaba RA, Severs NJ, Chambers J et al. Localisation of SCN10A gene product Na(v)1.8 and novel pain-related ion channels in human heart. *Int Heart J* 2011; 52(3):146–52. doi: 10.1536/ihj.52.146.
139. Ritchie MD, Denny JC, Zuvich RL, Crawford DC, Schildcrout JS, Bastarache L et al. Genome- and phenome-wide analyses of cardiac conduction identifies

6. Literaturverzeichnis

- markers of arrhythmia risk. *Circulation* 2013; 127(13):1377–85. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000604.
140. Chambers JC, Zhao J, Terracciano CMN, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R et al. Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet* 2010; 42(2):149–52. doi: 10.1038/ng.516.
141. Pfeufer A, van Noord C, Marciante KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV et al. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet* 2010; 42(2):153–9. doi: 10.1038/ng.517.
142. Casini S, Marchal GA, Kawasaki M, Nariswari FA, Portero V, van den Berg NWE et al. Absence of Functional Nav1.8 Channels in Non-diseased Atrial and Ventricular Cardiomyocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 2019; 33(6):649–60. doi: 10.1007/s10557-019-06925-6.
143. Jabbari J, Olesen MS, Yuan L, Nielsen JB, Liang B, Macri V et al. Common and rare variants in SCN10A modulate the risk of atrial fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet* 2015; 8(1):64–73. doi: 10.1161/HCG.0000000000000022.
144. Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, Scicluna BP, Wolswinkel R, Jonge B de et al. Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res* 2012; 111(3):333–43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274035.
145. Bengel P, Ahmad S, Tirilomis P, Trum M, Dybkova N, Wagner S et al. Contribution of the neuronal sodium channel NaV1.8 to sodium- and calcium-dependent cellular proarrhythmia. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 144:35–46. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.05.002.
146. Payne CE, Brown AR, Theile JW, Loucif AJC, Alexandrou AJ, Fuller MD et al. A novel selective and orally bioavailable Nav 1.8 channel blocker, PF-01247324, attenuates nociception and sensory neuron excitability. *Br J Pharmacol* 2015; 172(10):2654–70. doi: 10.1111/bph.13092.
147. Bengel P, Dybkova N, Tirilomis P, Ahmad S, Hartmann N, A Mohamed B et al. Detrimental proarrhythmogenic interaction of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and NaV1.8 in heart failure. *Nat Commun* 2021; 12(1):6586. doi: 10.1038/s41467-021-26690-1.

6. Literaturverzeichnis

148. Brennick MJ, Pack AI, Ko K, Kim E, Pickup S, Maislin G et al. Altered upper airway and soft tissue structures in the New Zealand Obese mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(2):158–69. doi: 10.1164/rccm.200809-1435OC.
149. Linz B, Hohl M, Lang L, Wong DWL, Nickel AG, La Torre C de et al. Repeated exposure to transient obstructive sleep apnea-related conditions causes an atrial fibrillation substrate in a chronic rat model. *Heart Rhythm* 2021; 18(3):455–64. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.10.011.
150. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th. Washington (DC); 2011.
151. Lebek S, Hegner P, Schach C, Reuthner K, Tafelmeier M, Maier LS et al. A novel mouse model of obstructive sleep apnea by bulking agent-induced tongue enlargement results in left ventricular contractile dysfunction. *PLoS One* 2020; 15(12):e0243844. doi: 10.1371/journal.pone.0243844.
152. Diamond DA, Mattoo TK. Endoscopic treatment of primary vesicoureteral reflux. *N Engl J Med* 2012; 366(13):1218–26. doi: 10.1056/NEJMct1108922.
153. Crossland RF, Durgan DJ, Lloyd EE, Phillips SC, Reddy AK, Marrelli SP et al. A new rodent model for obstructive sleep apnea: effects on ATP-mediated dilations in cerebral arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 305(4):R334-42. doi: 10.1152/ajpregu.00244.2013.
154. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(6):940–50. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
155. Zeiss. LSM 700 Light Pathways; 2022 23.01.2022. Verfügbar unter: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/spectralimaging/lsm700/indexflash.html>.
156. Thermofisher. Fluorescence Spectraviewer; 2021 16.12.2021. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
157. Webb DJ, Brown CM. Epi-fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 2013; 931:29–59. doi: 10.1007/978-1-62703-056-4_2.
158. Thermofisher. The AM Ester Loading Technique; 2023 04.12.2023. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes->

6. Literaturverzeichnis

the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/loading-and-calibration-of-intracellular-ion-indicators.html.

159. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med* 2016; 375(10):919–31. doi: 10.1056/NEJMoa1606599.
160. Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K, Angermann C, d'Ortho M-P, Erdmann E et al. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med* 2015; 373(12):1095–105. doi: 10.1056/NEJMoa1506459.
161. Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, Mackley A, Hachadoorian R, Arens R et al. Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(5):522–30. doi: 10.1164/rccm.200208-866OC.
162. Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P et al. A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(3):195–202. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.00611.x.
163. Shantha G, Pelosi F, Morady F. Relationship Between Obstructive Sleep Apnoea and AF. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2019; 8(3):180–3. doi: 10.15420/aer.2019.35.2.
164. Purohit A, Rokita AG, Guan X, Chen B, Koval OM, Voigt N et al. Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation* 2013; 128(16):1748–57. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313.
165. Garber L, Joca HC, Coleman AK, Boyman L, Lederer WJ, Greiser M. Camera-based Measurements of Intracellular Na⁺ in Murine Atrial Myocytes. *J Vis Exp* 2022; (183). doi: 10.3791/59600.
166. Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA, Fiolet JWT, Koeman A et al. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia* 2018; 61(3):722–6. doi: 10.1007/s00125-017-4509-7.
167. Rivaud MR, Baartscheer A, Verkerk AO, Beekman L, Rajamani S, Belardinelli L et al. Enhanced late sodium current underlies pro-arrhythmic intracellular sodium

6. Literaturverzeichnis

- and calcium dysregulation in murine sodium channelopathy. *Int J Cardiol* 2018; 263:54–62. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.03.044.
168. Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular Na⁽⁺⁾ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* 2002; 105(21):2543–8. doi: 10.1161/01.cir.0000016701.85760.97.
169. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM et al. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(7):2342–7. doi: 10.1073/pnas.0813013106.
170. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y et al. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(5):1230–40. doi: 10.1172/JCI38022.
171. Stroud DM, Yang T, Bersell K, Kryshnal DO, Nagao S, Shaffer C et al. Contrasting Nav1.8 Activity in Scn10a^{-/-} Ventricular Myocytes and the Intact Heart. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(11). doi: 10.1161/JAHA.115.002946.
172. Xi Y, Wu G, Yang L, Han K, Du Y, Wang T et al. Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(8):749–57. doi: 10.1093/eurjhf/hfp092.
173. Schillinger W, Teucher N, Christians C, Kohlhaas M, Sossalla S, van Nguyen P et al. High intracellular Na⁺ preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. *Eur J Heart Fail* 2006; 8(7):673–80. doi: 10.1016/j.ejheart.2006.01.013.
174. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS et al. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 1999; 99(5):641–8. doi: 10.1161/01.cir.99.5.641.
175. Sipido KR, Volders PGA, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res* 2002; 53(4):782–805. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00470-9.

6. Literaturverzeichnis

176. Wessels A, Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics* 2003; 15(3):165–76. doi: 10.1152/physiolgenomics.00033.2003.
177. Lebek S, Chemello F, Caravia XM, Tan W, Li H, Chen K et al. Ablation of CaMKII δ oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease. *Science* 2023; 379(6628):179–85. doi: 10.1126/science.ade1105.
178. White FC, Roth DM, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci* 1986; 36(4):351–6.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	bovine calf serum
Ca ²⁺	Kalziumion
Ca/CaM	Kalzium/Calmodulin-Komplex
CaMKII δ	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II δ
CaMKII $\delta^{-/-}$	CaMKII δ Knock-out
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CPAP	continous positive airway pressure
DAD	verzögerte Nachdepolarisation (eng. delayed afterdepolarisation)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	frühe Nachdepolarisation (eng. early afterdepolarisation)
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
F/F ₀	Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei zwei Wellenlängen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IFL	inspiratorische Flusslimitation
K ⁺	Kaliumion
KG	Körpergewicht

7. Anhang

Met	Methionin
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natriumion
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Nav	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NCX	Natrium/Kalzium-Austauscher
NOX	NADPH-Oxidase
OSAS	obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PLB	Phospholamban
p-Wert	Signifikanzniveau
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SBAS	schlafbezogene Atemstörung
SBF1	sodium-binding benzofuran isophthalat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
SERCA2a	kardiale sarkoplasmatische Kalzium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Thr	Threonin
TRIS-Base	Trishydroxymethylaminomethan-Base
Veh	Vehikel

7. Anhang

VEK	Kardiomyozyt des Ventrikels
VH	Kardiomyozyt des Vorhofs
WT	Wildtyp-Variante der CaMKII δ

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Partielle bzw. vollständige Verlegung der Atemwege bei Hypopnoe und Apnoe. Modifiziert nach (28).....	9
Abbildung 2 - Aufbau eines Sarkomers	15
Abbildung 3 - Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen. Modifiziert nach (73).....	17
Abbildung 4 - Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies	19
Abbildung 5 - Struktur eines CaMKII-Monomers. Modifiziert nach (93)	20
Abbildung 6 - Ringstruktur der CaMKII. Modifiziert nach (93).....	21
Abbildung 7 - Aktivierung der CaMKII durch Kalzium/Calmodulin-Bindung. Modifiziert nach (93)	22
Abbildung 8 – Kalzium/Calmodulin-unabhängige Aktivierung der CaMKII. Modifiziert nach (93)	24
Abbildung 9 - Auswirkungen einer erhöhten CaMKII-Aktivierung (95).....	28
Abbildung 10 - Strukturformel von PTFE (©Sigma Aldrich)	33
Abbildung 11 - Fixierung und Überwachung der Vitalparameter	34
Abbildung 12 - Mobilisierung der Zunge	34
Abbildung 13 - Injektion eines PTFE-Depots am ventralen Zungengrund	35
Abbildung 14 - Sonographische Messung und Vergleich des sagittalen Zungendurchmessers (151).....	36
Abbildung 15 - Aufbau der Plethysmographie-Vorrichtung (Buxco-Setup)	37
Abbildung 16 - Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. Modifiziert nach (154).....	40
Abbildung 17 - Schematischer Aufbau des Konfokalmikroskops (Zeiss LSM 700). Modifiziert nach (155). Bildquelle: Carl Zeiss.....	44
Abbildung 18 - Relative Absorption/Emission von CellRox™ Orange (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectralviewer (156))	46

7. Anhang

Abbildung 19 - Relative Absorption/Emission von MitoSox™ Red (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectralviewer (156))	46
Abbildung 20 - Schematischer Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops	48
Abbildung 21 - Strukturformel SBFI-AM (©Thermo Fisher Scientific) und Beladung eines Kardiomyozyt. Modifiziert nach (158).....	50
Abbildung 22 - Relative Absorption/Emission von SBFI in Abhängigkeit zur Natriumbindung (Tabellenwerte von Thermofisher Fluorescence Spectraviewer (156))	52
Abbildung 23 - Abhängigkeit der SBFI-Fluoreszenz von der Natriumkonzentration und der Wellenlänge (©Thermofisher Scientific)	53
Abbildung 24 - Strukturformel PF-01247324 (146).....	55
Abbildung 25 - Messung des Fluoreszenzsignals bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen	56
Abbildung 26 - Messprotokoll 1 und 2	57
Abbildung 27 - Analyse der Kontraktionskurve.....	58
Abbildung 28 - Kalibrierungsmessung	61
Abbildung 29 - Originalregistrierung einer inspiratorischen Flusslimitation (IFL)	64
Abbildung 30 - Frequenz der inspiratorischen Flusslimitationen pro Stunde	65
Abbildung 31 - Zunahme des Körpergewichts nach 8 Wochen	66
Abbildung 32 - Körpergewicht (g) normalisiert auf die Tibialänge (mm) der jeweiligen Maus.....	67
Abbildung 33 - Originalregistrierung einer Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien	68
Abbildung 34 - Fluoreszenzanstieg bei den Messungen der mitochondrialen Sauerstoffradikale über 10 Minuten.....	69
Abbildung 35 - Fluoreszenzanstieg der Messungen von mitochondrialen ROS nach 10 Minuten.....	70
Abbildung 36 - Anstieg der Fluoreszenzintensität von MitoSox™ Red pro Minute in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten.....	71

7. Anhang

Abbildung 37 - Originalregistrierung einer Messung von reaktiven Sauerstoffspezies im Zytoplasma	72
Abbildung 38 - Fluoreszenzanstieg bei den Messungen der zellulären Sauerstoffradikale über 10 Minuten.....	73
Abbildung 39 - Fluoreszenzanstieg der Messungen von zellulären ROS nach 10 Minuten.....	74
Abbildung 40 - Anstieg der Fluoreszenzintensität von CellRox™ Orange pro Minute in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten.....	75
Abbildung 41 - Originalregistrierungen der epifluoreszenzmikroskopischen Messungen	76
Abbildung 42 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.....	78
Abbildung 43 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.....	79
Abbildung 44 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz.....	80
Abbildung 45 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz.....	81
Abbildung 46 - SBFI-Ratio in atrialen Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz.....	82
Abbildung 47 - SBFI-Ratio in ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ -Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz.....	83
Abbildung 48 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz	84
Abbildung 49 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ - Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz	85

7. Anhang

Abbildung 50 - Korrelation der inspiratorischen Flusslimitationen (/h) mit der SBFI-Ratio in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz	86
Abbildung 51 - Originalregistrierung einer Kalibrierungsmessung	87
Abbildung 52 - Eichgeraden zur Umrechnung der SBFI-Ratio in eine Natriumkonzentration	88
Abbildung 53 - Natriumkonzentration in atrialen Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Stimulationsfrequenz	89
Abbildung 54 - Natriumkonzentration in ventrikulären Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Stimulationsfrequenz	89
Abbildung 55 - Originalregistrierungen der Messungen der Relaxationszeiten	90
Abbildung 56 - Relaxationszeit von atrialen Kardiomyozyten bei WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.....	91
Abbildung 57 - Relaxationszeit von ventrikulären Kardiomyozyten bei WT- und CaMKII $\delta^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.....	92

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Isolationstyrode, ddH ₂ O = zweifach destilliertes Wasser	40
Tabelle 2 – Enzymlösung	41
Tabelle 3 - Stopplösung 1	41
Tabelle 4 - Kalzium Aufbaulösung	42
Tabelle 5 - Stopplösung 2.....	42
Tabelle 6 – Normaltyrode	54
Tabelle 7 - Beladungslösung SBFI-AM.....	54
Tabelle 8 - Beladungslösung PF-01247324.....	55
Tabelle 9 - Natriumhaltige Kalibrierungslösung	59
Tabelle 10 - Kaliumhaltige Kalibrierungslösung.....	59
Tabelle 11 - Pipettierschema der Kalibrierungslösungen	60

7. Anhang

7.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner bedanken, der mir dieses überaus spannende Dissertationsthema überlassen hat und mir so die Möglichkeit gegeben hat, Teil des experimentellen kardiologischen Forschungsteams zu werden. Durch die Tätigkeit im Labor und seine exzellente Betreuung wurde ich schnell von der Wissenschaft rund um die CaMKII und der kardiologischen Forschung im Allgemeinen begeistert. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Simon Lebek und Dr. Philipp Hegner bedanken, die mir stets unermüdlich und engagiert zur Seite standen und mich bei der Planung sowie Durchführung der Experimente, der Datenauswertung und der schriftlichen Verfassung dieser Dissertation unterstützten.

Zudem gilt mein Dank allen Mitgliedern des kardiologischen Forschungsteams für die große Unterstützung. Dabei möchte ich vor allem Frau Dr. Maria Baier, Frau Andrea Ochsenkühn, Herrn Thomas Sowa und Herrn Sebastian Benkhoff erwähnen, die mir mit ihren Ideen und technischen sowie praktischen Fähigkeiten eine große Hilfe bei der Umsetzung meiner Experimente waren. Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden, insbesondere Benedikt Schaner, Anna-Lena Feder und Elisa Schollmeier bedanken, die mich stets motivierten und durch die ich mich immer gerne an die gemeinsame Zeit im Labor zurückerinnern werde.

Schließlich möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die mich während des gesamten Studiums begleiteten und während der intensiven Forschungszeit enorm unterstützten und motivierten.

Mein herzlicher Dank gilt zudem dem Forschungsrat der Fakultät für Medizin des Universitätsklinikums Regensburg für die Verleihung des Promotionsstipendiums sowie meinen Mentoren Prof. Dr. Lars S. Maier und Prof. Dr. Michael Arzt.

Einige Ergebnisse wurden auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2022 in Mannheim als Postervortrag präsentiert. Zudem wurden Teile dieser Dissertation in den Journals *Antioxidants* (Basel; 2023 Jan 29;12(2):315. doi: 10.3390/antiox12020315) und *Frontiers of Pharmacology* (Lausanne; 2024 Jun 20:15:1411822. doi: 10.3389/fphar.2024.1411822) veröffentlicht.

7. Anhang

7.5 Lebenslauf

7. Anhang

7. Anhang

7.6 Eidesstattliche Erklärung

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

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



Florian Maria Ofner