

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

Die Bedeutung der oxidativ-aktivierten Ca^{2+} /Calmodulin-
abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die
Kalziumhomöostase in einem Mausmodell der
obstruktiven Schlafapnoe

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mathias Gugg

2025

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

Die Bedeutung der oxidativ-aktivierten Ca^{2+} /Calmodulin-
abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) für die
Kalziumhomöostase in einem Mausmodell der
obstruktiven Schlafapnoe

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Mathias Gugg

2025

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter:

PD Dr. Zdenek Provazik

Tag der mündlichen Prüfung:

19.08.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	12
1.1. Das obstruktive Schlafapnoesyndrom	12
1.2. Oxidativer Stress durch OSAS.....	15
1.3. Vorhofflimmern und seine Assoziation mit OSAS	17
1.4. Elektromechanische Kopplung mit Blick auf Kalzium	23
1.5. Nachdepolarisationen und ektope Aktivität	25
1.6. Einfluss von Phospholamban auf die SERCA	27
1.7. Der Ryanodinrezeptor: Aufbau, Funktion und Aktivierung.....	27
1.8. Die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II.....	30
1.8.1. Aktivierungs- und Regulationsmechanismen und die oxidativ-aktivierte CaMKII	31
1.8.2. Die Rolle erhöhter CaMKII-Aktivität in der Arrhythmogenese	33
1.9. Fragestellung.....	37
2 Material und Methoden	39
2.1. Versuchstiere.....	39
2.2. Mausmodell der obstruktiven Schlafapnoe.....	40
2.3. Bestimmung von Apnoen und inspiratorischer Flusslimitierung	42
2.4. Isolation der Kardiomyozyten.....	43
2.4.1. Lösungen	43

2.4.2.	Durchführung der Isolation	46
2.5.	Messung der Ca^{2+} - Ströme mittels Fluoreszenz	50
2.5.1.	Das Phänomen der Fluoreszenz	50
2.5.2.	Die Epifluoreszenzmikroskopie	51
2.5.3.	Messlösungen	53
2.5.4.	Pharmakologische Intervention mit Koffein	55
2.5.5.	Farbstoff Fura-2 AM und zytosolische Beladung.....	55
2.5.6.	Messungen am Epifluoreszenzmikroskop	58
2.5.6.1.	Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme und Sarkomerverkürzungen	59
2.6.	Datenauswertung und Statistik	61
2.6.1.	Auswertung der ganzkörperplethysmographischen Daten	61
2.6.2.	Datengewinnung aus Messungen am Epifluoreszenzmikroskop	62
2.6.2.1.	Bestimmung von Nachdepolarisationen.....	63
2.6.2.2.	Indirekte Quantifizierung des SR Ca^{2+} -Lecks	64
2.6.2.3.	Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehalts	65
2.6.3.	Statistische Datenaufbereitung	66
3	Ergebnisse.....	68

3.1.	Ergebnisse der Ganzkörperplethysmographie	70
3.1.1.	Keine Unterschiede im Auftreten von inspiratorischen Flusslimitierungen zwischen Wildtyp- und MMVV-Tieren nach PTFE-Injektion.....	71
3.2.	Ergebnisse aus Messungen an Kardiomyozyten der Maus am Epifluoreszenzmikroskop	74
3.2.1.	Keine Reduktion der Kalzium- Transientenamplitude und der fraktionellen Verkürzung in ventrikulären Kardiomyozyten nach PTFE-Behandlung	75
3.2.2.	Operierte MMVV-Mäuse sind vor einem erhöhten SR Kalzium-Leck geschützt.....	78
3.2.3.	SR Kalzium-Gehalt bei MMVV-Mäusen nach PTFE-Behandlung nicht reduziert..	83
3.2.4.	MMVV-Mäuse sind vor dem Auftreten spontaner nicht-stimulierter Ereignisse geschützt	87
4	Diskussion	92
4.1.	Zusammenhänge zwischen OSAS und kardialen Erkrankungen	93
4.2.	Die Auswirkungen der oxidativ-aktivierten CaMKII auf den Ca^{2+} -Haushalt des SR	96
4.3.	Pro-arrhythmogene Aktivität im Zusammenhang mit einem ox-CaMKII-vermittelten SR Ca^{2+} -Leck	98

4.4.	Diskussion der Methoden und ihrer Limitationen	100
4.5.	Therapiemöglichkeit für Patienten mit OSAS	102
4.5.1.	Aktueller Stand der Therapie für Patienten mit OSAS	102
4.5.2.	Die CaMKII als Zielstruktur zukünftiger Therapien	104
4.6.	Schlussfolgerung	106
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	110
7	Danksagung	133

Publikationen und Präsentationen

Teile der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit wurden bereits in folgenden Publikationen und Präsentationen veröffentlicht.

Publikationen

Hegner, P.; Lebek, S.; Schaner, B.; Ofner, F.; Gugg, M.; Maier, L.S.; Arzt, M.; Wagner, S. CaMKII-Dependent Contractile Dysfunction and Pro-Arrhythmic Activity in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *Antioxidants* 2023, 12, 315. <https://doi.org/10.3390/antiox12020315>

Hegner P, Ofner F, Schaner B, Gugg M, Trum M, Lauerer A-M, Maier LS, Arzt M, Lebek S and Wagner S (2024), CaMKII δ -dependent dysregulation of atrial Na⁺ homeostasis promotes pro-arrhythmic activity in an obstructive sleep apnea mouse model. *Front. Pharmacol.* 15:1411822. doi: 10.3389/fphar.2024.1411822

Kurzvortrag

M. Gugg, P. Hegner, S. Lebek, L. S. Maier, M. Arzt, S. Wagner; Increased ox-CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity in an obstructive sleep apnea mouse model. *Clin Res Cardiol* 2022. <https://doi.org/10.1007/s00392-022-02002-5>

Posterpräsentation

P. Hegner, M. Gugg, S. Lebek, L. S. Maier, M. Arzt, S. Wagner; Oxidative activation of CaMKII mediates arrhythmias and contractile dysfunction in an obstructive sleep apnea mouse model. European Heart Journal, Volume 43, Issue Supplement_2, October 2022, ehac544.2971, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac544.2971>

Abkürzungsverzeichnis

AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
AM	Azetomethylrest
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Bovine calf serum
BDM	Butanedionmonoxim
CaM	Calmodulin
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
CPAP	Continuous positive airway pressure
CSAS	Zentrales Schlafapnoesyndrom (central sleep apnea syndrome)
DAD	verzögerte Nachdepolarisation (delayed afterdepolarisation)
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	frühe Nachdepolarisation (engl.: early afterdepolarisation)
EKG	Elektrokardiographie
FKBP12.6	12.6 kDa FK506-bindendes-Protein / calstabin2

HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IFL	Inspiratorische Flusslimitierung
KHK	Koronare Herzerkrankung
LTCC	L-Typ-Kalziumkanal
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)
MMVV	Austausch von Methionin 281/282 durch Valin 281/282
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NSE	Nicht-stimuliertes Ereignis (Nachdepolarisation)
OSA	Obstruktive Schlafapnoe
OSAS	obstruktives Schlafapnoesyndrom
ox-CaMKII	oxidierte CaMKII an Methionin 281/282
p-Wert	statistisches Signifikanzniveau
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PTFE	Polytetrafluoroethylen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ca^{2+} -sensitiver Ryanodinrezeptor
RyR2	Ca^{2+} -sensitiver Ryanodinrezeptor Typ 2

SERCA (2a)	Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (2a)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
VHF	Vorhofflimmern
WBP	Ganzkörperplethysmographie (engl.: whole-body plethysmography)

1 Einleitung

1.1. Das obstruktive Schlafapnoesyndrom

Das obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS) zählt neben dem zentralen Schlafapnoesyndrom (CSAS) zu den schlafbezogenen Atemwegsstörungen.

Das OSAS ist eine weit verbreitete Erkrankung und gewinnt unter Betrachtung sozioökonomischer Aspekte an Bedeutung. Weltweit gibt es mehr als eine Milliarde betroffener Patienten (1). Zudem liegt die Prävalenz bei über 65-jährigen bei ca. 25%, mit ansteigender Tendenz über die letzten 20 Jahre (2, 3). Des Weiteren ist zu beobachten, dass das OSAS mit männlichem Geschlecht, Übergewicht und Alter assoziiert ist (2-6). Allerdings wird vermutet, dass bei etwa 93% der Frauen und 82% der Männer mit moderater bis schwerer obstruktiver Schlafapnoe noch keine Diagnosestellung erfolgt ist (7). Obwohl noch kein schlafapnoe-spezifisches Gen gefunden werden konnte (8), steigt für Kinder mit einem an OSAS-betroffenen Elternteil das Risiko auf das bis zu 3-fache im Vergleich zu mit einem nicht betroffenen Elternteil (9).

Das OSAS ist gekennzeichnet durch sich wiederholende Verlegungen der oberen Atemwege während des Schlafs. Diese können sowohl teilweise oder auch vollständig verlegt werden, wodurch es zu einer Verminderung oder Unterbrechung des Atemflusses kommt (siehe Abbildung 1).

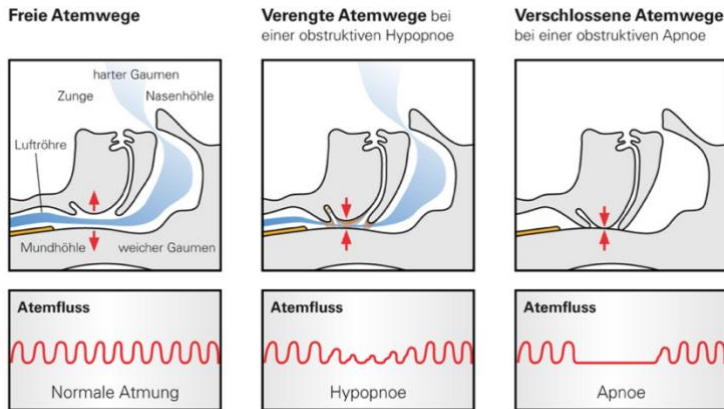


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Atemwege bei obstruktiver Hypopnoe und Apnoe im Vergleich zu freien Atemwegen (modifiziert nach <https://www.uniklinik-ulm.de/hals-nasen-und-ohrenheilkunde/schlafmedizin/obstruktives-schlafapnoesyndrom.html>; Stand 07.09.2023)

Als Folge der wiederkehrenden Obstruktionen sinkt im Blut die Sauerstoffsättigung ab (Hypoxämie) und der Gehalt an Kohlendioxid steigt an (Hyperkapnie). Des Weiteren führen Atembewegungen gegen den obstruktiven Widerstand zu thorakalen Druckschwankungen. Beendet werden diese Phasen von Apnoe und Hypopnoe häufig durch Aufwachreaktionen (Arousals) (5, 10). Symptome wie nächtliches Schnarchen, ausgeprägte Tagesmüdigkeit, Konzentrationstörungen, Erschöpfung und morgendlicher Kopfschmerz können bereits erste Anzeichen für ein vorliegendes OSAS sein (5, 11).

Zur Diagnosestellung des OSAS stellt die Polysomnographie in einem Schlaflabor den Goldstandard dar. Alternativ können auch portable Geräte zur Diagnostik verwendet werden. In Verbindung mit einer ausführlichen klinischen Anamnese und Untersuchung ist so eine hinreichende Diagnostik möglich. Portable Geräte müssen als Mindestanforderung den Atemfluss, die Atmungsanstrengung, die Sauerstoffsättigung, die Pulsfrequenz und die Körperlage erfassen, um obstruktive Phasen von Apnoe und Hypopnoe während des Schlafs ermitteln zu können (12). So kann, auf Grundlage der erhobenen Daten, der Apnoe-Hypopnoe-Index ermittelt werden (13), der die durchschnittlichen Apnoen und Hypopnoen über die Schlafzeit pro Stunde wiedergibt. Der AHI kann zum einen zur Diagnosestellung eines OSAS und zum anderen, in Verbindung mit Begleiterkrankungen und klinischer Symptomatik, zur Einteilung in Schweregrade herangezogen werden. Ab einem AHI $\geq 15/h$ Schlafzeit oder einem AHI $\geq 5/h$ Schlafzeit in Verbindung mit typischen klinischen Symptomen oder relevanten Begleiterkrankungen wird ein OSAS diagnostiziert (14). Als schwer wird das OSAS eingestuft, wenn Patienten einen AHI $\geq 30/h$ Schlafzeit zeigen (5).

Patienten mit OSAS leiden im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung unter einer schlechteren Schlafqualität, mit der Folge eines verminderten

physischen und psychischen Wohlbefindens. Diese Diskrepanz bleibt unabhängig von Faktoren, wie z.B. Rauchen, Übergewicht u.a., erhalten (15, 16). Außerdem zeigt sich in Verbindung mit vermehrter Tagesschläfrigkeit bei OSAS-Patienten eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung an Verkehrsunfälle (17).

Bei Betrachtung der Auswirkungen des OSAS auf die kardiovaskuläre Gesundheit zeigt sich eine Prädisposition für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (18), die Entstehung von Arrhythmien (19, 20), das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung (KHK) (21) und eine erhöhte Gefahr eines plötzlichen Herztods (22). Außerdem wird davon ausgegangen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen OSA und erhöhter kardiovaskulärer Morbidität besteht (23).

Aktuell beschränkt sich, aufgrund fehlender medikamentöser Therapieoptionen, die Behandlung des OSAS auf eine Verringerung von Risikofaktoren (z.B. Gewichtsreduktion) und nächtliche Überdruckbeatmung mittels CPAP (Continuous positive airway pressure) (24).

1.2. Oxidativer Stress durch OSAS

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der daraus resultierende erhöhte oxidative Stress im Rahmen des OSAS.

Grundsätzlich fallen bei aerober Stoffwechsellaage auf Zellebene ständig ROS an, die aber über antioxidative Mechanismen entfernt werden. Wenn allerdings die Eliminationskapazität dieser Systeme aufgrund eines vermehrten Anfalls erschöpft ist, entsteht aufgrund erhöhter ROS-Konzentrationen oxidativer Stress (23, 25). Als Ursachen für erhöhten oxidativen Stress bzw. erhöhte ROS-Konzentrationen beim OSAS werden verschiedene erkrankungsspezifische Mechanismen angesehen. Als einer der entscheidendsten Mechanismen werden wiederkehrende Phasen von Hypoxämien mit anschließender Reoxygenierung angesehen (25, 26). Aufgrund von Aufwachreaktionen im Rahmen von SDB kommt es zu einer gesteigerten Stimulation des sympathischen Nervensystems, wodurch die NADPH-Oxidase aktiviert wird und in Folge ROS entstehen (27-29). Zudem stimuliert die sympathische Aktivierung das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches ebenfalls zur Entstehung von ROS beiträgt (27-30). Die oben beschriebene Verlegung der oberen Atemwege und eine gegen die Obstruktion arbeitende Inspiration führt zu einem negativen Druckgradienten über dem Thorax und so zu einer erhöhten kardialen Nachlast. Aufgrund des dadurch für das Myokard entstehenden Mehrbedarfs an Sauerstoff kommt es zu vermehrtem Anfall von ROS (27, 28, 31, 32).

So konnten u.a. Lebek et al. 2020 (33) in atrialem Herzmuskelgewebe von Patienten mit schlafbezogenen

Atemwegsstörungen eine erhöhte ROS-Konzentration zeigen.

1.3. Vorhofflimmern und seine Assoziation mit OSAS

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen OSAS und Vorhofflimmern (VHF) besteht. Zum einen sind Patienten mit OSAS prädisponiert für das Auftreten von VHF (34), zum anderen ist bei Patienten mit bestehendem VHF eine erhöhte Prävalenz eines OSAS sichtbar (35, 36).

Bestehende Risikofaktoren, wie z.B. das Patientenalter oder Vorerkrankungen, wie arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz oder eine KHK, sind Ausgangspunkte in der Entstehung von VHF (37-39).

Bei VHF findet eine Klassifizierung hinsichtlich der klinischen Verlaufsform statt. So teilt man es in paroxysmales VHF ein, welches nach weniger als sieben Tagen spontan selbst sistiert. Eine weitere Form ist das persistierende VHF, das keine Selbstlimitierung mehr zeigt, allerdings durch therapeutische Maßnahmen noch beendet werden kann. Permanentes VHF zeigt hingegen kein Ansprechen mehr auf eine therapeutische Intervention und manifestiert sich dauerhaft und anhaltend (40).

Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen OSAS und VHF ist allerdings weiterhin ungeklärt. Daher werden die im Folgenden aufgeführten

Mechanismen als mögliche Ursachen diskutiert (siehe Abbildung 2).

Zu diesen Mechanismen zählen intrathorakale Druckschwankungen, vermehrter oxidativer Stress als Folge rezidivierender Hypoxämien und wiederholte Aufwachreaktionen mit konsekutiv erhöhtem Sympathikotonus (41). Ebenso werden thorakale Druckschwankungen (42) und chronische intermittierende Hypoxämien (43) für einen erhöhten Sympathikotonus verantwortlich gemacht. Darüber hinaus wird dem autonomen Nervensystem auch eine Bedeutung in der Entstehung und Erhaltung von VHF zugeschrieben (44).

So wird davon ausgegangen, dass oben genannte Mechanismen zu strukturellen und elektrischen Veränderungen am Herzen führen. Bei Patienten mit OSAS wurden strukturelle und elektrische Veränderungen des Vorhofmyokards festgestellt, welche sich besonders auf das elektrische Reizweiterleitungssystem auswirkten (45). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen dem Vorliegen eines OSAS und einer verminderten systolischen linksventrikulären Pumpfunktion und einer Hypertrophie des linken Ventrikels besteht (46).

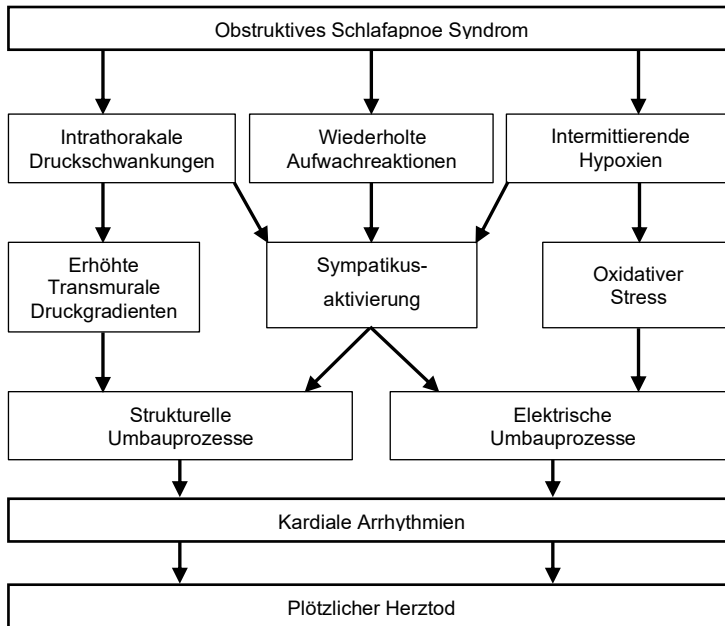


Abbildung 2 Möglicher pathophysiologischer Zusammenhang zwischen OSAS und VHF; modifiziert nach Rossi et al. 2013 (41)

Zunächst bedarf es als Voraussetzung für das Auftreten von VHF passende Bedingungen im Herzgewebe, ein sogenanntes vulnerables Substrat und einen Trigger (47). Zu diesen Triggern zählen unter anderem sympathische Stimulation, eine Dehnung der Vorhöfe, zusätzliche Leitungsbahnen und supraventrikuläre Extrasystolen (37). Aber auch durch spontane fokale ektopische Entladungen kann es zu VHF kommen. Prädilektionsort dieser Trigger ist häufig die Umgebung um die Einmündung der Pulmonalvenen in den linken Vorhof (39, 48). Anfänglich lösen diese Trigger ein paroxysmales

VHF aus. Ob das VHF aufrechterhalten wird oder zur dauerhaften Form konvertiert, hängt vor allem davon ab, ob der Trigger beständig auftritt und ob der Trigger fortan auf ein vulnerables Substrat trifft und so im weiteren Verlauf auch ungetriggert persistieren kann. Durch strukturelle und elektrische Umbauprozesse im atrialen Myokard, sogenanntes atriales Remodelling, entsteht oben genanntes vulnerables Substrat (49). So stellt die Fibrosierung der Atrien eine Form des atrialen Remodellings dar, welche in Folge zu einer lokal verlangsamten Erregungsleitung oder Leitungsblockade führt (50). Dem funktionellen bzw elektrischen Remodelling liegt eine Veränderung der Ionenkanalströme zugrunde, die auf einem veränderten Auftreten und Verhalten von Ionenkanälen beruht. Hierdurch wird neben der Dauer von Aktionspotentialen, auch deren Anpassung an die Herzfrequenz beeinflusst. Strukturelle und elektrische Umbauprozesse werden dafür verantwortlich gemacht, dass es zu einer Progredienz von VHF kommt, d.h. dass es von der paroxysmalen zur persistierenden und weiter zur permanenten Form des VHF übergeht (51). Zudem ist VHF nicht nur Folge eines Remodellings, sondern entsteht auch durch VHF und führt zum Aufrechterhalten von VHF (52, 53). VHF kann auch ohne Umbauprozesse auftreten und wird dann meist durch fokale Aktivitäten ausgelöst. In diesem Fall sistiert das VHF auch in der Regel von selbst. Falls nur elektrisches Remodelling

vorliegt, kann dieses, welches dann als persistierendes VHF auftritt, durch eine Intervention beendet werden. Wenn es hingegen auch schon zu strukturellen Umbauprozessen im Myokard gekommen ist, dann fehlt meist auch ein Ansprechen auf therapeutische Interventionen und es liegt permanentes VHF vor (39).

Für die Aufrechterhaltung von VHF spielt der Reentry-Mechanismus eine entscheidende Rolle. Dieser entsteht, wenn ein Trigger auf zum Teil refraktäres und wiedererregbares Gewebe trifft, welches somit uneinheitlich stimulierbar ist. Dieses Gewebe entspricht dem vulnerablen Substrat. Hier kommt es zu einer Erregungsausbreitung in nur eine Richtung und es entsteht so eine zirkulierende Erregung, wenn sich die Erregung langsam genug ausbreitet und die Kreisstrecke lang genug ist, dass die Erregung wieder auf erregbares Gewebe trifft. Gefördert werden solche kreisenden Erregungen zum einen durch Hindernisse, wie Fibrosierungen des Vorhofmyokards, welche die Erregungsausbreitung beeinflussen und zum anderen auch durch pathologisch verkürzte Refraktärzeiten und verlangsamte Weiterleitung der Erregung (49).

So werden Reentry-Mechanismen und fokale ektope Aktivitäten als wichtige Mechanismen in der Entstehung von VHF angesehen (47).

Unter fokal ektope Aktivitäten werden autonome Erregung verstanden, die außerhalb des physiologischen Erregungsbildungs- und Erregungsweiterleitungssystem

entstehen und vor allem auf Nachdepolarisationen beruhen. Hier findet eine Unterscheidung in frühe (EADs - early afterdepolarizations) und verzögerte (DADs – delayed afterdepolarizations) Nachdepolarisationen statt (siehe Abbildung 5) (47).

Als zeitliche Referenz wird die Repolarisation der Zelle angeführt (DADs: nach der vollständigen Repolarisation; EADs: während der Repolarisation) (54).

Da vor allem Veränderungen der intrazellulären Kalziumströmen für die Entstehung von Nachdepolarisationen angesehen werden, soll im Folgenden ein Überblick über die elektromechanische Kopplung der Herzmuskelzelle und die Rolle des Kalziums gegeben werden.

1.4. Elektromechanische Kopplung mit Blick auf Kalzium

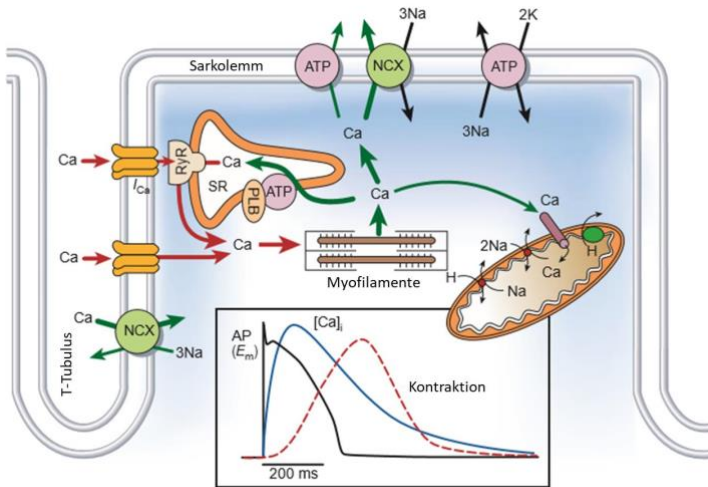


Abbildung 3: Kalziumtransport im Myozyten. Die eingefügten Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf von Aktionspotential (AP), Kalziumtransient und mechanischer Kontraktion. NCX: Na⁺-Ca²⁺-Austauscher, ATP: ATPase, RyR: Ryanodinrezeptor, PLB: Phospholamban, SR: sarkoplasmatisches Retikulum; modifiziert nach Bers 2002 (55)

Zu Beginn eines kardialen Aktionspotentials steht eine elektrische Erregung, die bei Eintreffen zur Öffnung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle führt. Durch den Natriumeinstrom (I_{Na}) in die Zelle kommt es zur Depolarisation, wodurch membranständige, spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle (LTCC) öffnen und Ca^{2+} von extrazellulär in die Zelle einströmt

(I_{Ca}). Das einströmende Ca^{2+} führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Öffnung der Ca^{2+} -sensitiven Ryanodinrezeptor-Typ2 Kanäle (RyR2), die sich in enger Nachbarschaft zu den LTCC befinden. Zur Repolarisation öffnen sich auswärtsgerichtete, spannungsabhängige K^+ -Kanäle, wodurch die Zelle zum Ruhepotential zurückkehrt (siehe Abbildung 3) (55, 56).

Das sich nun frei im Zytosol in hoher Konzentration befindliche Ca^{2+} bindet an Troponin C und aufgrund einer darauffolgenden Konformationsänderung wird die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin freigegeben. Durch die anschließende Hydrolyse eines ATP-Moleküls an den Myosinköpfchen kippen diese um 45° ab. In Folge kommt es zu einer Annäherung der Aktinfilamente und somit zur Kontraktion der Muskulatur (siehe Abbildung 4) (55, 57, 58).

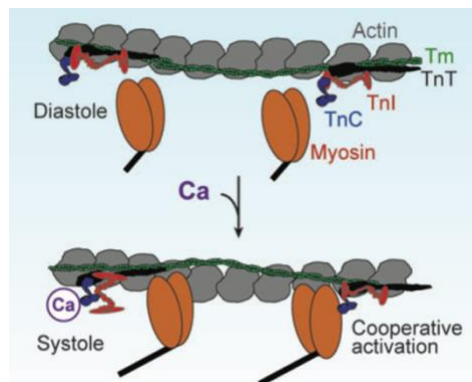


Abbildung 4 Durch Bindung von Kalzium an Troponin C ändert der Troponinkomplex seine Konformation und das Myosinköpfchen kann am Aktinfilament binden. Anschließend

kommt es zum Abkippen des Myosinköpfchen; modifiziert nach Bers 2008 (59)

Um die Kontraktion zu beenden und das Myokard zu relaxieren, wird das zytosolische Ca^{2+} anschließend zum Großteil über die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2A (SERCA2A) zurück ins SR und durch den zellmembranständigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach extrazellulär befördert (55).

1.5. Nachdepolarisationen und ektope Aktivität

Wie bereits erwähnt werden frühe (EADs) von verzögerten (DADs) Nachdepolarisationen unterschieden (siehe Abbildung 5).

Maßgeblich für die Entstehung von EADs ist die Verlängerung der Aktionspotentialdauer (54, 60). Kommt es nun innerhalb dieser zu einer Reaktivierung des LTCC mit Ca^{2+} -Einstrom, wird eine ektope Aktivität durch Depolarisation des angrenzenden Gewebes ausgelöst (54). Ein Mechanismus, der die Öffnungswahrscheinlichkeit des LTCC erhöht, ist die Phosphorylierung an Thr₄₉₈ der β_{2a} -Untereinheit (61), die zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom führt und so wiederum EADs auslösen kann (62).

Verzögerte Nachdepolarisationen weisen als Grundlage ihrer Entstehung eine erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol und/oder gesteigerte Aktivität

des NCX auf und werden induziert durch den elektrogenen Austausch von Ca^{2+} nach extrazellulär und Na^+ nach intrazellulär durch den NCX (39, 54, 63). Dies führt, wenn die Depolarisationsschwelle erreicht wird, zu einem Aktionspotential und so zu einer ektopen Aktivität (39, 54). Als eine bedeutende Ursache für eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration in der Diastole wird eine vermehrte diastolische Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR durch den RyR2 angesehen, auch als SR Ca^{2+} -Leck bezeichnet (39, 54). Zum einen haben die Kalziumfreisetzungen selbst eine elektrogene Wirkung und zum anderen führt dies in Folge zu einer Aktivierung des NCX mit anschließender Depolarisation (64).

In atrialen Myozyten von Patienten mit schlafbezogenen Atemwegsstörungen wurde zum einen ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck, direkt (65) und indirekt (33), gemessen und zum anderen auch ein vermehrtes Auftreten von EADs und DADs beobachtet (33). Interessanterweise auch in Verbindung mit einem erhöhten Vorkommen oxidierter Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (65).

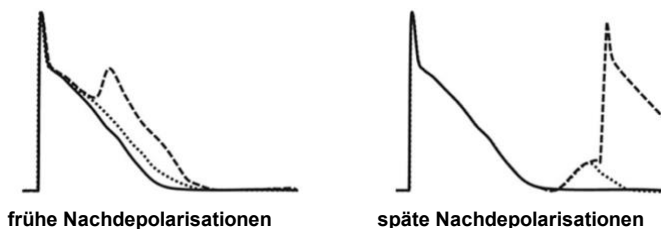


Abbildung 5 schematische Darstellung einer frühen (EADs) und verzögerten (DADs) Nachdepolarisation; modifiziert nach Heijman et al. 2014 (47)

1.6. Einfluss von Phospholamban auf die SERCA

Wie bereits erwähnt, pumpt die SERCA2a, die kardiale Unterform der SR Ca^{2+} -ATPasen, unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} aus dem Zytosol zurück ins SR und leistet somit einen essenziellen Beitrag zur Relaxation (66).

Phospholamban (PLB) moduliert die Aktivität der SERCA2a und inhibiert diese im unphosphorylierten Zustand, indem sie ihre Ca^{2+} -Sensitivität herabsetzt. Durch Phosphorylierung wird die hemmende Wirkung von PLB verringert. PLB wird zum einen durch β -adrenerge Stimulation an Serin 16 durch die PKA und zum anderen frequenzabhängig durch die CaMKII an Threonin 17 phosphoryliert. Dadurch kommt es zu einer Aktivitätssteigerung der SERCA2a, woraus eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme ins SR resultiert (66-69). Hieraus ergibt sich eine schnellere Relaxationsfähigkeit in der Diastole bei hohen Herzfrequenzen (69).

1.7. Der Ryanodinrezeptor: Aufbau, Funktion und Aktivierung

Ryanodinrezeptoren (RyR) sind in Skelett- und Herzmuskelzellen vorkommende Kalziumkanäle, die für die elektromechanische Kopplung unerlässlich sind und Ca^{2+} aus dem SR freisetzen. Die kardiale Unterform ist der RyR2.

Der RyR2 ist homotetramерisch zu einem Kanal aufgebaut, mit seinem C-Terminus in der Membran des SR verankert und reicht mit seinem N-terminalen Ende ins Zytosol. Die Öffnung und Kalziumfreisetzung aus dem RyR2 erfolgt Ca^{2+} -induziert durch Einstrom von Ca^{2+} durch den LTCC, wenn eine lokale Ca^{2+} -Konzentration $>10\mu\text{M}$ erreicht wird (55, 70).

Die Sensitivität gegenüber zytosolischem Ca^{2+} kann durch regulatorische Bindungsproteine und posttranslatorische Veränderungen (z.B. durch Phosphorylierung) geändert werden. Dies kann die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 ändern (71).

Hier dient der zytosolische N-Terminus als Bindungsort regulatorischer Proteine. Dazu zählen Calmodulin (CaM), FKBP12.6, Proteinkinase A (72), Proteinphosphatase 1 (PP1), Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die CaMKII (71).

Ein Aktivierungsweg, der ein besonderes Interesse für diese Arbeit darstellt und die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht, ist die Phosphorylierung von Serin 2814/2815 (abhängig von der Spezies) (73, 74). Da die Aktivierung durch CaMKII-Phosphorylierung unabhängig von FKBP12.6 ist, löst sich das Bindungsprotein nicht vom RyR2 (74). Auf die Auswirkungen dieses Aktivierungsweges wird im Verlauf noch näher eingegangen.

Neben den genannten Mechanismen, kann auch Koffein (siehe Kapitel 2.5.4) zu einer Kalziumfreisetzung durch

den RyR2 aus dem SR führen (75). Dies kann aus wissenschaftlicher Sicht genutzt werden und kam im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz um den SR Ca^{2+} -Gehalt zu bestimmen. Hierbei gilt es eine zügige Infusion von Koffein, in einer Konzentration von mindestens 1 mM (76), zu den isolierten Kardiomyozyten zu beachten, da ansonsten eine biphasische Kontraktion oder ein langsamer und niedriger (gedämpfter) Ca^{2+} -Transient induziert wird (siehe Abbildung 6) (66).

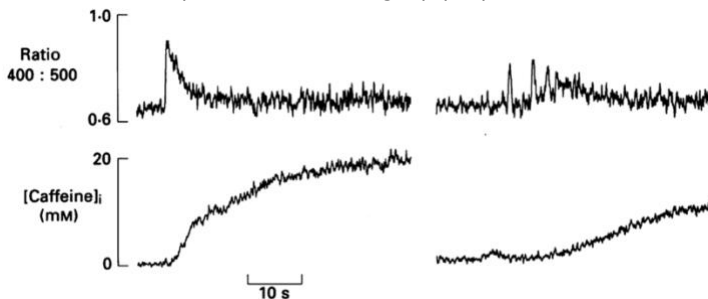


Abbildung 6: Unterschied einer schnellen (links) und langsamen (rechts) Applikation von Koffein. obere Graphiken: intrazelluläre Kalziumkonzentration, untere Graphiken: Koffeinkonzentration; modifiziert nach O'Neill et al. 1990 (76)

1.8. Die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II

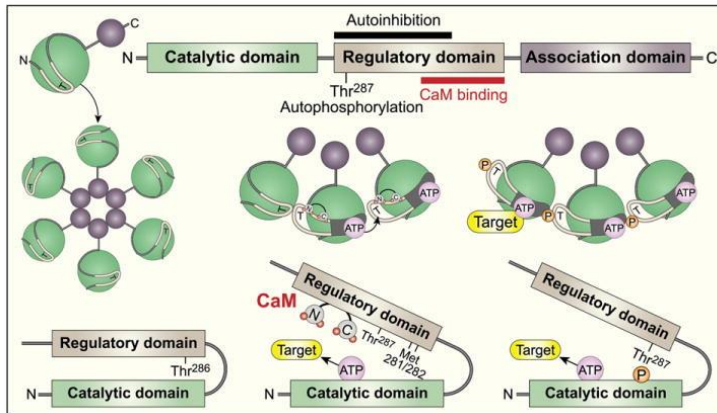


Abbildung 7: strukturelle Organisation und Regulationsmechanismen der CaMKII; oben: Monomer der CaMKII, in räumlicher und linearer Darstellung, mit regulatorischer Domäne zwischen einer N-terminalen katalytischen und C-terminalen assoziativen Einheit; Mitte: über den C-Terminus sind die einzelnen Monomere zum Holoenzym verbunden; unten links: inaktiver Zustand; unten Mitte: Aktivierung durch Ca^{2+} /Calmodulin, außerdem zu erkennen Met 281/282 der Ort zur oxidativen Aktivierung; unten rechts: Aktivierung durch Autophosphorylierung; modifiziert nach Anderson et al. 2011 (77)

Bei der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase. Das Enzym ist multimerisch aus 6-12 Monomeren aufgebaut. Jedes Monomer besteht seinerseits aus einer katalytischen Domäne am N-Terminus, aus einer mittig gelegenen regulatorischen Einheit und einer C-terminalen assoziativen Domäne. Die CaMKII ist omnipräsent in allen

Körperzellen zu finden (78, 79). Die kardiale Unterform ist die CaMK Typ II (siehe Abbildung 7) (80). Bei der CaMKII kann wieder zwischen vier Isoformen, α , β , γ und δ unterschieden werden. Während die Isoformen α und β im Nervengewebe vorherrschen, finden sich die γ und δ Isoformen in Kardiomyozyten (81). Im Zytosol der Kardiomyozyten findet sich die spezifische δ Unterform CaMKII δ c (82).

1.8.1. Aktivierungs- und Regulationsmechanismen und die oxidativ-aktivierte CaMKII

Wie oben bereits ausgeführt, steigt im Zuge der elektromechanischen Kopplung die intrazelluläre Kalziumkonzentration stark an (55). Calmodulin (CaM) formt durch Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen einen Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex. Dieser aktiviert, neben anderen Ca^{2+} -abhängigen Proteinen, auch die CaMKII (78, 83).

Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex bindet an die regulatorische Untereinheit der CaMKII. Aufgrund dieser Bindung vollzieht die CaMKII eine Konformationsänderung und die im inaktiven Zustand an die regulatorische Domäne gebundene, katalytische Einheit wird zugänglich. Diese Konformation erlaubt nun der CaMKII die Phosphorylierung von Zielproteinen. Außerdem können innerhalb des Enzyms benachbarte Monomere autophosphoryliert werden (siehe Abbildung

7) (84, 85). Die Autophosphorylierung von Threonin 287 (siehe Abbildung 7, siehe unten rechts) führt neben einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit auch zu einer stärkeren und längeren Bindung des $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplexes an die CaMKII. Zudem kommt es durch die Autophosphorylierung zu einer $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -unabhängigen Aktivität der CaMKII. Die Autophosphorylierung an sich findet allerdings nur bei vorhandenem Ca^{2+} und CaM und unter ATP-Verbrauch statt. (84, 86, 87).

Ein weiterer Mechanismus, der von besonderem Interesse für diese Arbeit ist, ist die $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -unabhängige Aktivierung der CaMKII durch Oxidation von Methionin 281/282 innerhalb des Holoenzym (30). An Herzmuskelzellen von Mäusen konnte beobachtet werden, dass unter oxidativen Bedingungen eine Aktivitätssteigerung der CaMKII resultierte und, im Vergleich zu Herzmuskelzellen ohne CaMKII, konsekutiv vermehrt EADs/DADs und Arrhythmien auftraten (88).

Zudem zeigten Arzt et al. (65) an atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit OSAS ein, im Verhältnis zur gesamten CaMKII Expression, erhöhtes Vorkommen oxidierter CaMKII und eine gesteigerte Aktivität der CaMKII im Vergleich zu Patienten ohne OSAS.

Auch Lebek et al. (33) kamen zu dem Ergebnis, dass in Vorhofzellen von Patienten mit SDB eine erhöhte Oxidation der CaMKII und eine gesteigerte CaMKII-Aktivität vorlagen.

1.8.2. Die Rolle erhöhter CaMKII-Aktivität in der Arrhythmogenese

Wie bereits oben aufgeführt, reguliert die CaMKII Proteine durch Phosphorylierung und trägt so zur Entstehung von Arrhythmien bei. Von besonderem Interesse ist für die Entstehung von fokalen Erregungen die Phosphorylierung des PLB und RyR2 anzusehen (39). Dass unter Hemmung der CaMKII signifikant weniger Arrhythmien auftreten, verdeutlicht den Einfluss der CaMKII auf die Arrhythmogenese (89, 90).

Bei Patienten mit VHF konnten neben einer verstärkten Phosphorylierung des RyR2, auch vermehrt spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR gezeigt werden (63, 73). Neef et al. (73) beobachteten zudem eine erhöhte diastolische Konzentration an Ca^{2+} -Ionen im Zytosol und eine Abnahme des Ca^{2+} -Gehalts im SR. Diese Auswirkungen waren unter Inhibition der CaMKII oder des RyR2 rückläufig (73).

Zusätzlich kamen Voigt et al. (63) zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 mit vermehrter Anzahl DADs und getriggelter Aktivität einhergehen. Durch Inhibition der CaMKII verringerten sich zum einen oben genannte Ca^{2+} -Freisetzungen und zum anderen sank die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 ab (63).

Ebenso zeigten Ai et al (91) an Herzmuskelzellen von Ratten mit Herzinsuffizienz, dass diese eine vermehrte Autophosphorylierung der CaMKII und Phosphorylierung

des RyR2 besaßen. Hierunter kam es zu spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen in der Diastole, einem erniedrigten SR Ca^{2+} -Gehalt, welches sich beides unter Inhibition der CaMKII aufhob, und zu einem erhöhten Auftreten von arrhythmischen Ereignissen (91).

Transgenen Mäusen, die eine Überexpression der CaMKII zeigten und eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, kam es ebenso zu einer erhöhten Frequenz von Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR und einem erniedrigten SR Ca^{2+} -Gehalt (92). Diese Resultate erhärten die Vermutung, dass die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII zu einer gesteigerten RyR2-Aktivität führt (92).

Daneben phosphoryliert die CaMKII auch den spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ an Serin 571 (siehe Abbildung 8), woraus zum einen ein erhöhter später Natriumeinstrom und zum anderen auch ein reduzierter Na^+ -Spitzenstrom resultiert (93, 94).

Physiologisch kommt es durch ein Aktionspotential zur Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle, welche allerdings innerhalb von Millisekunden wieder inaktiv sind, wodurch es zu einem raschen Na^+ -Anstieg (Na^+ -Spitzenstrom) kommt. Dieser Na^+ -Strom spielt eine entscheidende Rolle in der Weiterleitung der Erregung an benachbarte Myokardzellen. Falls es zu einer Verringerung des Na^+ -Spitzenstrom kommt, treten in Folge Arrhythmien auf (72, 93).

Wagner et al. (93) zeigten, dass es durch den Einfluss der CaMKII auf den $\text{Na}_v1.5$ zu einem erhöhten späten Natriumeinstrom kommt, aber auch der Na^+ -Spitzenstrom verringert wird, woraus ein proarrhythmogenes Potential entsteht. Der späte Natriumeinstrom ist das Resultat einer verlangsamten Inaktivierung oder einer verfrühten Aktivierung des spannungsabhängigen Natriumkanals (93).

So konnten Lebek et al. (33) an atrialen Myozyten von Patienten mit SDB nicht nur eine vermehrte CaMKII-anhängige Phosphorylierung des $\text{Na}_v1.5$ nachweisen, sondern auch einen erhöhten späten Natriumeinstrom und einen reduzierten Na^+ -Spitzenstrom. Durch den späten Natriumeinstrom erhöht sich die intrazelluläre Natriumkonzentration, welche zu einer Transportumkehr des Natrium-Kalzium-Antiporters führt und dadurch Ca^{2+} -Ionen intrazellulär akkumulieren (88). So wird nicht nur angenommen, dass eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einem erhöhten Kalziumleck aus dem SR und Nachdepolarisationen führt (95), sondern es konnte gezeigt werden, dass es aufgrund des späten Natriumeinstrom zu spontanen, arrhythmisch wirksamen Kalziumfreisetzungen aus dem SR in der Diastole kommt (96, 97)

Besonders interessant für diese Arbeit ist der Zusammenhang zwischen einer oxidativ-aktivierten CaMKII und dem Auftreten von Vorhofflimmern und Arrhythmien.

Die Untersuchungen an einem Mausmodell von Purohit et al. 2013 (98) lassen den Schluss zu, dass ein erhöhtes oxidativ-aktiviertes-CaMKII- (ox-CaMKII) Level zur Entwicklung von VHF beiträgt, da transgene Mäuse, bei denen eine Oxidation der CaMKII nicht möglich ist, vor dieser Entwicklung geschützt waren. Zudem blieben bei diesen Knock-In Mäusen unter oxidativen Bedingungen eine Erhöhung der CaMKII-Aktivität und vermehrte spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aus (98).

Untersuchung an einem transgenen Mausmodell (erhöhte Expression des Transkriptionsrepressors CREM-IbC-X), welches eine altersabhängige Progredienz von fokalen Erregungen bis zu persistierendem Vorhofflimmern aufwies, zeigten im Fortschreiten der Erkrankungen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR und eine Größenzunahme der Vorhöfe. Diese Entwicklung zum permanenten VHF und pathologischen Modifikationen konnten durch eine genetische Blockierung der Phosphorylierung durch die CaMKII am RyR2 unterbunden werden (99, 100).

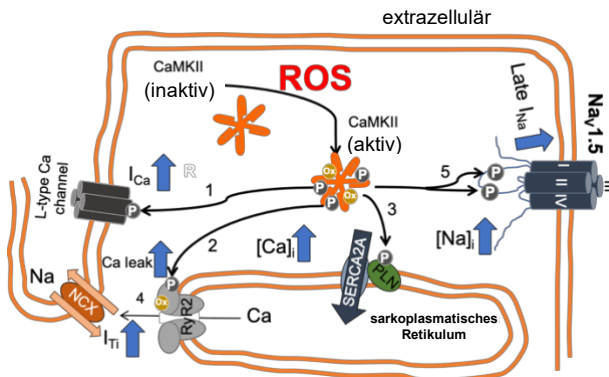


Abbildung 8 Aktivierung der CaMKII durch ROS führt aufgrund CaMKII-abhängiger Phosphorylierung von Proteinen (1-5) zum Auftreten von ektopen Erregungen; u.a. kommt es durch die Phosphorylierung des RyR2 (2) zu einem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck in der diastolischen Phase des Myozyten; die Phosphorylierung von PLB (3) führt zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom ins SR, der daraus resultierende erhöhte Ca^{2+} -Gehalt intraluminal erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR, mit der Folge spontaner Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR während der Diastole; ein erhöhter Einwärtsstrom ($I_{\text{Ti},4}$) und DADs sind das Resultat eines diastolischen Ca^{2+} -Leck aus dem SR; modifiziert nach Wagner et al. 2015 (95)

Die aufgeführten Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts und eine atriale Größenzunahme sind als Hinweise auf das atriale Remodelling zu werten (100), welches zur Entstehung und Persistenz von VHF beizutragen scheint. Die CaMKII scheint in diesem Zusammenhang verstärkend auf das atriale Remodelling einzuwirken (101).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt sich, dass ein CaMKII-abhängiges Ca^{2+} -Leck aus dem SR zur Entstehung von ektopen Potentialen und VHF und dessen Persistenz führt (102).

1.9. Fragestellung

Nach Darlegung des Sachverhaltes stellt sich nun die Frage, inwieweit die durch Oxidation aktivierte CaMKII im Rahmen des OSAS Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase nimmt und welche Bedeutung dies für die Entstehung von Arrhythmien hat.

Im Rahmen des OSAS entstehen vermehrt ROS (siehe Kapitel 1.2), die die CaMKII oxidieren und so zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung der CaMKII führen können (siehe Kapitel 1.8.1). Um eine isolierte Betrachtung der Auswirkungen des OSAS, ohne Einfluss weiterer Komorbiditäten, durchführen zu können, wurden für die Versuche ein neuartiges Mausmodells der obstruktiven Schlafapnoe, bei dem durch die Injektion von Polytetrafluoroethylen (PTFE) in den Zugengrund eine Dickenzunahme der Zunge erreicht wurde, und genetisch modifizierte Mäuse verwendet (siehe Kapitel 2.2). Bei zu Letztgenannten ist, aufgrund des Austausches von Methionin 281/282 durch Valin (MMVV-Tiere), eine oxidative Aktivierung der CaMKII nicht mehr möglich (103, 104).

Daher sollen mit dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Zeigen Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen mit PTFE-Injektion ein vermehrtes Auftreten spontaner diastolischer Ca^{2+} -Freisetzungen?
2. Zeigen Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen mit PTFE-Injektion ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck?
3. Liegt in Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen mit PTFE-Injektion ein verminderter SR Ca^{2+} -Gehalt, aufgrund eines erhöhten Ca^{2+} -Lecks aus dem SR vor?

4. Verhalten sich MMVV-Mäuse mit PTFE-Injektion wie nicht PTFE-behandelte Wildtyp-Mäuse?

2 Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche genetisch nicht veränderte Wildtyp-Mäuse und genetisch veränderte CaMKII MMVV homozygote Mäuse mit genetischem Hintergrund

BL/6 J aus dem Tierzuchtlabor der Universität Regensburg. Die CaMKII der Knock-In Mäuse wurde durch den Austausch von Methionin 281/282 durch Valin so verändert, dass eine oxidative Aktivierung nicht möglich ist (103, 104).

Die Versuche sind auf Grundlage der Richtlinien 2010/63/EU des Europäischen Parlaments, der „Care and Use of Laboratory Animals“ der nationalen amerikanischen Gesundheitsinstitute (NIH Publication No. 85–23, revised 1985) und nationaler Vorgaben durchgeführt worden. Die Tierversuche wurden nach §8 Abs. 1 TierSchG durch die Regierung Unterfranken, Bayern als zuständige Behörde genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2532-2-512).

2.2. Mausmodell der obstruktiven Schlafapnoe

Brennick et al. 2009 (105) zeigten an übergewichtigen Mäusen mit spontaner OSA ein um 33 μ l signifikant erhöhtes Zungenvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch beim Menschen konnte ein erhöhtes Zungenvolumen als ein Risikofaktor des OSAS identifiziert werden (106). Auf Grundlage dieser Untersuchungen entwickelten Lebek et al. 2020 (107) ein Mausmodell, bei dem durch die Injektion von Polytetrafluoroethylen (PTFE) in den Zungengrund eine Volumenzunahme der Zunge zu beobachten ist und es zu OSAS-charakteristischem Auftreten von Apnoen und inspiratorischen Flusslimitierungen in der Schlafphase kommt.

Für die Injektion werden 50mg PTFE (Dichte 2,1g/ml) auf 100 μ l (50% w/v) mit Glycerol (Sigma Aldrich) verdünnt. Somit enthalten 100 μ l dieser Lösung 24 μ l PTFE (Tabelle 1). Eine Stunde vor dem Eingriff wurde die Maus mit Buprenorphin (intraperitoneal) analgesiert. Im Anschluss erfolgte die Anästhesie durch intraperitoneale Gabe von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (siehe Tabelle 2). Der weitere Eingriff fand unter Überwachung von Atmung, Herzfrequenz und Temperatur statt.

In Rückenlage auf einer beheizten Platte gelagert, wurde die Zunge manuell so weit aus dem Mund gezogen, dass insgesamt 100 μ l PTFE-Lösung in mehreren Injektionen ventral und dorsal am Zungengrund appliziert wurden.

Nach dem Eingriff wurde die Narkose durch Atipamezol, Flumazenil und Buprenorphin antagonisiert (Tabelle 2) und die Mäuse in den folgenden Tagen engmaschig hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes beobachtet.

Substanz	molare Masse g/mol	Menge	bei Dichte von 2,1 g/ml für PTFE 50% w/v
PTFE	100,02	50 mg = 24µl	
Glycerol	92,09	76µl	

Tabelle 1 PTFE-Lösung zur Injektion

Medikament	Dosierung	Anmerkung
Buprenorphin	0,1 mg/kg Körpergewicht (KG)	Opioid
Medetomidin	0,5 mg/kg KG	α -Adrenorezeptor-Agonist
Midazolam	5 mg/kg KG	GABA _A -Rezeptor Agonist
Fentanyl	0,05 mg/kg KG	Opioid
Atipamezol	2,5 mg/kg KG	α -Adrenorezeptor-Antagonist
Flumazenil	0,5 mg/kg KG	kompetitiver GABA _A - Rezeptor Antagonist

Tabelle 2 Medikamente bei PTFE-Injektion

2.3. Bestimmung von Apnoen und inspiratorischer Flusslimitierung

Um die Spontanatmung der Mäuse aufzuzeichnen und zu analysieren, wurde die whole-body plethysmography von Buxco Electronics (WBP; Buxco Electronics, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA) und die FinePointe Software (FinePointe Software, Version 2.4.6.9414) verwendet.

Die Kammer der WBP mit einem Durchmesser von 9 cm und einer Höhe von 8cm, in die die Maus zur Messung platziert wurde, ist ausgestattet mit einer Aufnahme für eine Trinkflasche, einem Anschluss für den Druckabnehmer/-wandler, einem Anschluss für eine Luftleitung (Buxco Bias Flow) und einer Pneumotach-Membran (DSI Halcony Pneumotach). Zusätzlich wird der FinePointe WBP Controller (DSI Buxco Bias Flow, Buxco Electronics) benötigt, der über die Luftleitung mit der Messkammer verbunden ist und den Luftabzug/-austausch (0,2 Liter pro Minute) regelt.

Die Einstellungen der Geräte zur Messung wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Messungen wurden zwei Wochen nach der PTFE-Injektion, sowohl an operierten und nicht-operierten Mäusen, über acht Stunden tagsüber durchgeführt. Dies ist, angepasst an den Schlafrhythmus der Tiere, die Zeitspanne in der sie am häufigsten und längsten schliefen.

Apnoen, definiert als ein Aussetzen der Atmung über mindestens eine Sekunde (107, 108), werden mit Hilfe des Moduls zur Analyse von Apnoe („Apnea Analysis“) durch die FinePointe Software detektiert. Die Anzahl der Apnoen innerhalb der Aufzeichnungszeit ergab eine Frequenz an Apnoen pro Stunde (Apnoen/h).

Im Zuge einer inspiratorischen Flusslimitierung (IFL), als Folge einer Obstruktion der oberen Atemwege, kommt es entweder zu einer Verlängerung der Inspirationszeit oder zu einem Abfall des Zugvolumens/Tidalvolumens. Aber auch ein gleichzeitiges Auftreten dieser zwei Sachverhalte ist möglich (mehr siehe Kapitel 2.6.1).

2.4. Isolation der Kardiomyozyten

2.4.1. Lösungen

Substanz	Konzentration in mmol/l	molare Masse in g/mol	Masse in g	Gesamtvolumen in ml
NaCl	113,0	58,40	6,599	1000 gelöst in ddH ₂ O pH 7,40 bei 37°C mit NaOH
KCl	4,7	74,60	0,3506	
KH ₂ PO ₄	0,6	136,10	0,0817	
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6	177,99	0,1068	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2	246,50	0,2958	

Phenol-red	0,032	376,40	0,0120	
NaHCO ₃	12,0	84,00	1,008	
KHCO ₃	10,0	101,00	1,010	
HEPES	10,0	238,31	2,383	
Taurin	30,0	125,10	3,753	

Tabelle 3 Stammlösung/Stock Perfusion Buffer

Substanz	Konzentration in mmol/l	molare Masse in g/mol	Masse in g	Gesamtvolumen in ml
BDM	500,0	101,0	50,50	1000 gelöst in ddH ₂ O

Tabelle 4 2,3 Butanedionmonoxim (BDM)

Substanz	Konzentration in mmol/l	molare Masse in g/mol	Menge	Gesamtvolumen in ml
Stammlösung			980 ml	1000 pH 7,46 bei 37°C mit NaOH
BDM			20 ml	
Glucose	5,5	180,2	0,991 g	

Tabelle 5 Isolationstyrode/Perfusion buffer (pH 7,46 bei 37°C)

Substanz	molare Masse in g/mol	Volumen	Masse	Konzentration in mmol/l	%
Isolationstyrode		20 ml			
Liberase TM		150 µl	0,75 mg		
Trypsin 10-fach, 2,5 %		100 µl			0,0139
10 mM CaCl ₂	110,98	25 µl		0,0125	

Tabelle 6 Enzymlösung

Substanz	molare Masse in g/mol	Volumen	Konzentration in mmol/l	%
Isolationstyrode		2,250 ml		
Bovine calf serum (BCS)		0,250 ml		etwa 10
10 mM CaCl ₂	110,98	3,125 µl	0,0125	

Tabelle 7 Stopplösung 1

Substanz	Anteil in % am Gesamtvolumen
Isolationstyrode	
BCS	5

Tabelle 8 Stopplösung 2

Substanz	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5
Stopplösung 2					
CaCl ₂ Konzentration in mmol/l	0,1	0,2	0,4	0,8	1,4

Tabelle 9 Calciumaufbau Ventrikelzellen; bis Schritt 2
Calciumaufbau Vorhofzellen

Schritt	Ca ²⁺ - Konzentration in mmol/l	Erhöhung der Konzentration durch Zugabe einer 100mM CaCl ₂ Lösung
3	0,4	
4	0,8	
5	1,4	

Tabelle 10 Calciumaufbau Vorhofzellen ab Schritt 3; Aufbau
erfolgt ohne Entfernung des Überstands ab Schritt 2

2.4.2. Durchführung der Isolation

Die Isolation der Mäusemyozyten erfolgte frühestens acht Wochen nach der PTFE-Injektion, auch der nicht operierten Tiere, an einer Perfusionsanlage nach Langendorff (Langendorff 1895, siehe Abbildung 9).

Zu Beginn wurde die Perfusionsanlage mit Enzymlösung durchgespült. Anschließend, um keine Luftblasen im System zu haben, entgegen der eigentlichen

Flussrichtung durch den Wärmetauscher bis zur Blasenfalle mit Isolationstyrode gespült.

Nachdem das Körpergewicht bestimmt wurde, wird das Tier durch einen zügigen Genickbruch getötet. In Rückenlage und an den Extremitäten fixiert, wurde durch einen V-förmigen Schnitt mit einer Schere das Abdomen und der Thorax eröffnet. Das Herz wurde mit einem kurzen Aortenstumpf explantiert und das in den Herzhöhlen verbliebene Blut durch vorsichtige Kompression mit dem Finger ausgedrückt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Herzgewichts.

Unter mikroskopischer Sicht wurde nun der Aortenstumpf kanüliert und die Kanüle mittels eines Klipps und dünnen Fadens fixiert. Zu beachten war hierbei, dass sich die Kanülenspitze oberhalb der Abgänge der Koronararterien aus der Aorta befindet, um eine suffiziente, retrograde Perfusion während dem Verdau des Herzens zu gewährleisten. Um die Lage der Kanüle zu überprüfen, wurde eine mit Isolationstyrode gefüllte Spritze auf die Kanüle gesetzt und, während die Flüssigkeit infundiert wurde, auf eine sichtbare Perfusion der Koronargefäße geachtet.

Im Anschluss wurde das an der Kanüle fixierte Herz in die durchgespülte Perfusionsanlage eingesetzt und im folgenden Verdau über circa 8 1/2 Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min mit Enzymlösung durchgespült.

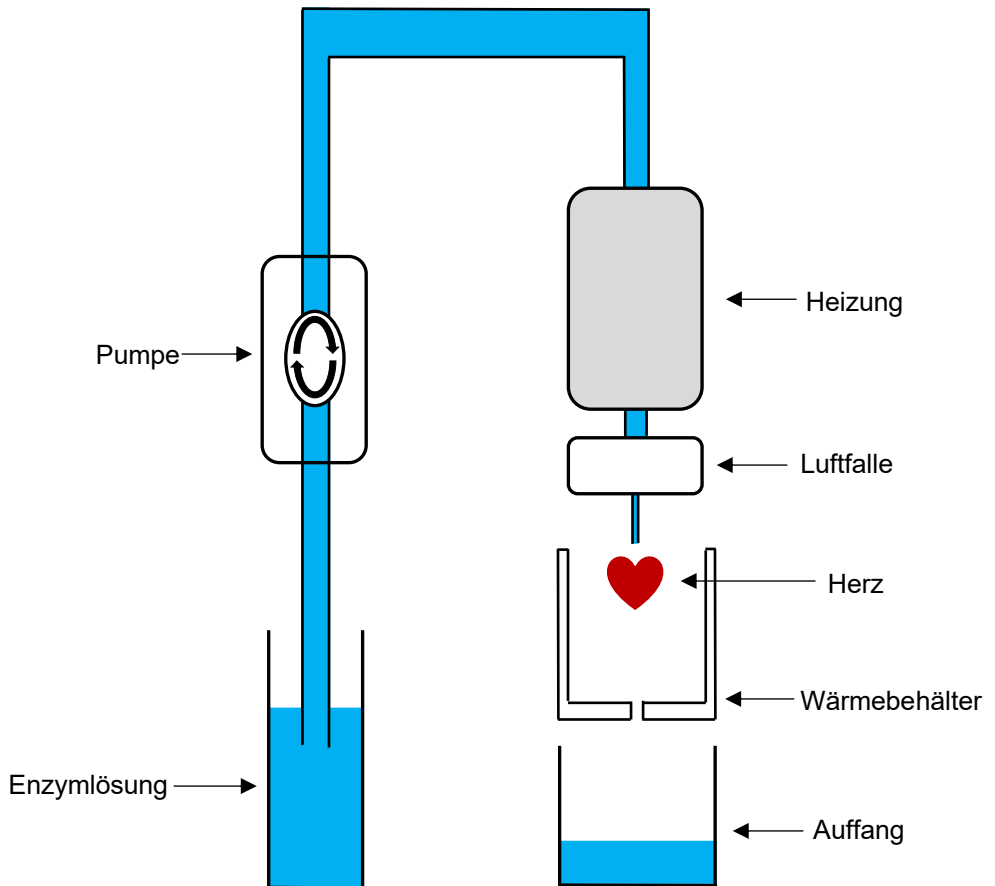


Abbildung 9-Schematische Darstellung einer Langendorff-Perfusionsanlage

Nach Ablauf der Zeit wurde das Herz von der Kanüle abgeschnitten und unter dem Mikroskop auf Höhe der Klappenebene in Vorhöfe und Ventrikel geteilt. In zwei mit

Stopplösung 1 vorbereiteten Petrischalen wurden die Herzanteile vorsichtig zuerst mit Pinzetten und anschließend mit einer Pipette durch auf- und abpipettieren mechanisch zerkleinert.

Die Lösung mit den Ventrikelzellen wurde durch eine Nylongaze (Filtergröße 200µm) gefiltert um Myozyten von größeren und unverdauten Gewebeteilen zu trennen und das Filtrat in ein Falconröhrchen zur siebenminütigen Sedimentation überführt.

Die Lösung mit den Vorhofzellen kam ungefiltert in ein Falconröhrchen und nach siebenminütiger Sedimentation wurde vorsichtig der Überstand mit toten Zellen entfernt.

In den folgenden Schritten wurde die Kalziumkonzentration der Zellsuspensionen alle sieben Minuten bis zu der für die Messungen gewünschten Kalziumkonzentration erhöht. Den Überstand der Lösung mit Ventrikelzellen verwarf man zwischen den Schritten (Tabelle 9). Mit der Zellsuspension des Vorhofs wurde bis zum Schritt 2 analog zum Ventrikel verfahren. Die folgenden Erhöhungen der Kalziumkonzentration für Vorhofzellen wurden durch Zugabe einer 100mM CaCl_2 Lösung ohne Entfernen des Überstandes erreicht (Tabelle 10).

Für die anschließenden Messungen wurden Myozyten in 0,8 mmol/l Kalziumlösung verwendet. Hierfür wurden jeweils 400µl der Zellsuspension auf eine zuvor mit 4-6 µl Laminin ausgestrichene Zellkammer gegeben und für 20 min inkubiert.

2.5. Messung der Ca^{2+} - Ströme mittels Fluoreszenz

Die Messungen des Ca^{2+} -Ströme der Herzmuskelzellen erfolgte mit einem Mikroskop nach dem Epifluoreszenz-Setup der Firma Ion-Optix (Milton/USA). Als Fluoreszenzfarbstoff kam Fura-2 AM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zum Einsatz.

Zur besseren Nachvollziehbarkeit der Messungen werden im Folgenden das Phänomen der Fluoreszenz, die Epifluoreszenzmikroskopie und der verwendete Farbstoff beschrieben.

2.5.1. Das Phänomen der Fluoreszenz

Durch Zufall entdeckte August Köhler im Jahre 1904, dass Strukturen bei der Betrachtung unter dem Mikroskop nach Bestrahlung mit UV-Licht zu einer Leuchterscheinung führten (Köhler 1904). Die Leuchterscheinung eines Moleküls ist durch das Phänomen der Fluoreszenz zu erklären. Elektronen eines Moleküls werden durch die Absorption von Photonen eines Lichts bestimmter Wellenlänge in einen energiereicheren, aber instabilen Zustand überführt (Exzitation). Da Moleküle stets den energieärmeren, stabilen Zustand anstreben, wechseln die Elektronen nach nur kurzer Zeit auf ein niedrigeres Energieniveau. Bei diesem Übergang wird Energie in Form von Licht frei

(Emission) Da während des energiereicheren Zustands Energie in Form von Wärme und Schwingungsenergie verloren geht, ist das emittierte Licht langwelliger und energieärmer als das zur Exzitation verwendete Licht (siehe Abbildung 10).

Veranschaulicht werden können diese Vorgänge anhand des Jabłoński-Diagramms. Die Differenz zwischen den Wellenlängen des absorbierten und des emittierten Lichts wird als Stokes'sche Verschiebung bezeichnet (Stokes 1852).

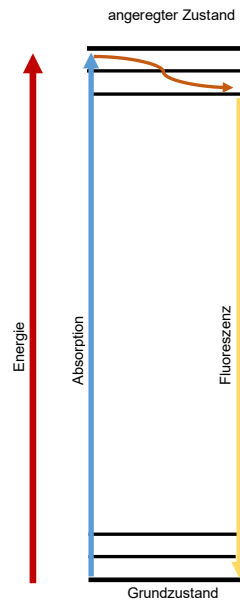


Abbildung 10 Jablonski-Diagramm

2.5.2. Die Epifluoreszenzmikroskopie

Als eine spezielle Form der Lichtmikroskopie kommen bei der Epifluoreszenzmikroskopie Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Die Grundstruktur stimmt mit der eines Lichtmikroskops überein, allerdings wird eine Lichtquelle eingesetzt, die hochenergetisches Licht erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um eine Xenon-Lampe.

Das durch die Lampe erzeugte Licht passiert einen Anregungsfilter, der nur Licht der Wellenlänge hindurchlässt, durch das der Farbstoff angeregt wird. Im Anschluss reflektiert ein dichroitischer Spiegel dieses Licht auf den Objektträger. Dichroitische Spiegel reflektieren selektiv bestimmte Wellenlängen und lassen Licht anderer Wellenlänge passieren. So wird das Anregungslicht über den Spiegel durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt, von dem aus das Fluoreszenzlicht, ohne Reflektion, den Spiegel passiert und zu einem Photomultiplier weitergeleitet wird, der das Signal des Fluoreszenzlichts verstärkt. Das verstärkte Fluoreszenzsignal wird in Spannung konvertiert und mittels des Fluoreszenz-System-Interfaces in eine digitale Datei umgewandelt und so im Programm Ion Wizard optisch dargestellt (siehe Abbildung 11).

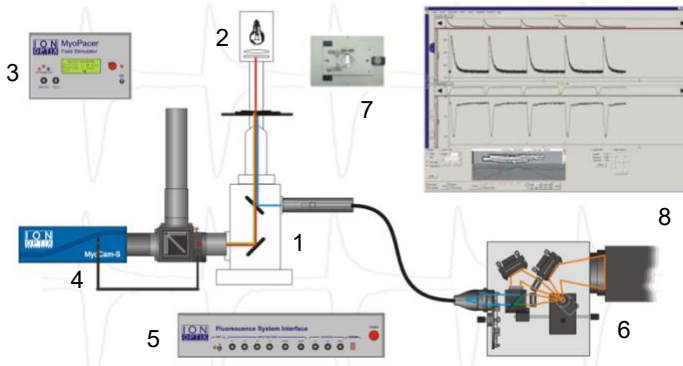


Abbildung 11 Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops mit Epifluoreszenz-Setup der Firma Ion-Optix (Milton/USA) zur Messung von Ca^{2+} -Strömen und Sarkomerlänge unter elektrischer Stimulation; Mikroskop (1),

Lichtquelle (2), MyoPacer (3), Myozytenkamera und Photomultiplier (4), Fluorescence System Interface (5), HyperSwitch mit Lichtpfad und Xenon-Lampe (6), Objektträger (7), Bildschirm von IonWizard mit Ca^{2+} -Transienten und Sarkomerkontraktionen einer Muskelzelle (unten abgebildet, 8); modifiziert nach <https://www.ionoptix.com/resource/myocyte-calcium-contractility-recording-system-hyperswitch/> (Stand 04.09.2023)

2.5.3. Messlösungen

Substanz	molare Masse in g/mol	Volumen in μl	Masse in g	Konzentration in mmol/l	Gesamtvolumen in ml
NaCl	58,44		8,1816	140	1000 gelöst in ddH ₂ O pH 7,4 bei 37°C
KCl	74,56		0,29824	4	
MgCl ₂	95,21		0.09521	1	
HEPES	238,31		1,19155	5	
Glukose	180,16		1,8016	10	
CaCl ₂	1	1000		1	

Tabelle 11 Normaltyrode (NT) 1mM Ca^{2+}

Substanz	molare Masse in g/mol	Volumen in μl	Masse in g	Konzentration in mmol/l	Gesamtvolumen in ml
NaCl	58,44		0,81816	140	100 gelöst in ddH ₂ O pH 7,4 bei 37°C
KCl	74,56		0,029824	4	
MgCl ₂	95,21		0.009521	1	
HEPES	238,31		0,119155	5	
Glukose	180,16		0,18016	10	
CaCl ₂	1	100		1	
Caffein	194,2		0,1942	10	

Tabelle 12 Koffein-Tyrode

Substanz	Molare Masse in g/mol	Volumen
fura-2,AM		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	78,13	44 μl

Tabelle 13 Farbstoffansatz fura-2,AM; Firma Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA ;Vortexen nach Zugabe von DMSO; lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20°C

2.5.4. Pharmakologische Intervention mit Koffein

Koffein verursacht, über eine komplette und reversible Öffnung des RyR2, eine vollständige Freisetzung des im SR gespeicherten Ca^{2+} in das Cytoplasma.

Über die Amplitude des koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten kann so ein Rückschluss auf den Ca^{2+} -Gehalt des SR gezogen werden.

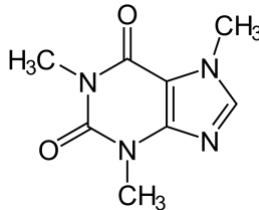


Abbildung 12 Strukturformel Koffein
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koffein_-_Caffeine.svg#/media/Datei:Koffein_-_Caffeine.svg
 (16.08.2024)

2.5.5. Farbstoff Fura-2 AM und zytosolische Beladung

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde von Tsien und Kollegen im Jahre 1985 entwickelt und ermöglicht es maßgeblich die Rolle des Calciums an zellulären Prozessen zu untersuchen. Fura-2 ist ein Derivat von BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-

tetraacetic acid) (109) mit einer Dissoziationskonstante (K_d) in Kardiomyozyten von 312 nmol/l (110).

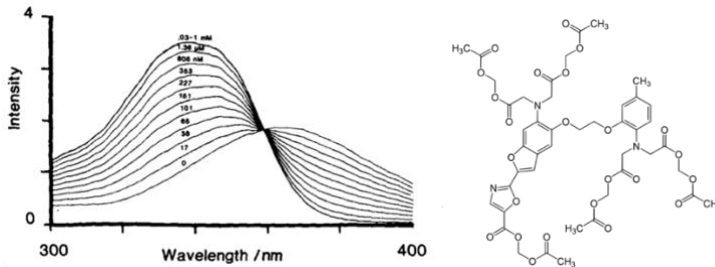


Abbildung 13 links: Erregungsspektrum von Fura-2 (1 µM) bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 0 - >10 µM bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm, modifiziert nach Grynkiewicz et al. 1985 (111); rechts: Strukturformel von Fura-2 AM

Wie die meisten Fluoreszenzfarbstoffe zählt Fura-2 zu den Chelatbildnern und bildet mit freien Ca^{2+} -Ionen Chelatkomplexe. Im Vergleich zum freien Farbstoff ändert sich durch die Komplexbildung die Anregungswellenlänge, die Emissionswellenlänge und die Emissionsintensität. Somit ist eine Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von freiem Fura-2 und komplexgebundenem Fura-2 möglich.

Da es sich bei Fura-2 um einen ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff handelt, ist es möglich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration quantitativ zu bestimmen. Durch die Ionenbindung verschieben sich bei

rationometrischen Farbstoffen die Absorptions- und Emmisionsmaxima im kurzwelligen Lichtspektrum. Diese Verschiebung wird als „Spektralshift“ bezeichnet. Bei einem gleichbleibenden Emissionsmaximum von 510nm verschieben sich bei ansteigender Ca^{2+} -Konzentration die Absorptionsmaxima.

Der Schnittpunkt aller Kurven ist der isobestische Punkt, an dem die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist (siehe

Abbildung 13, links)

Da die Absorptionsmaxima in einem festen Verhältnis zueinanderstehen, ist auf Grundlage der genannten Eigenschaften eine quantitative Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration möglich. Bei Fura-2 werden die Messwerte bei den Wellenlänge 340nm, für Ca^{2+} -gebundenen Farbstoff, und 380nm, hier wird freies Fura-2 angeregt, ins Verhältnis gesetzt. Die Relation zwischen den ermittelten Verhältnissen der Absorptionsmaxima und der Ca^{2+} -Konzentration konnte Gryniewicz et al. 1985 (111) erstmals in folgender Formel beschreiben:

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

Formel 1 – Relation zwischen den ermittelten Verhältnissen der Absorptionsmaxima und der Ca^{2+} -Konzentration

R	berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (z.B. bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340/380 \text{ nm}$)
$R_{\min}$	Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ Ca^{2+} -freien“ Eichpräparat ($[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-9} \text{ M}$)
$R_{\max}$	Ratiowert der Fluoreszenzintensität im „ Ca^{2+} -gesättigten“ Eichpräparat ($[\text{Ca}^{2+}] \geq 10^{-4} \text{ M}$)

K_d	Dissoziationskonstante der Reaktion zwischen Ca^{2+} und ratiometrischem Farbstoff
S_{r2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im „ Ca^{2+} -freien“ Eichpräparat
S_{b2}	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im „ Ca^{2+} -gesättigten“ Eichpräparat

Da der Farbstoff Fura-2 in freier Form aufgrund seiner polaren Eigenschaften nicht durch Membranen diffundieren kann, wird dieser mit einem Azetomethylrest (AM) verestert (siehe Abbildung 13, rechts).

Dank der lipophilen Eigenschaft des Esters ist Fura-2 AM membranpermeabel. Zytosolische Esterasen setzen durch Abspaltung des AM-Rests den Farbstoff wieder frei. Als freier Farbstoff kann Fura-2 Ca^{2+} -Ionen binden, allerdings ist es ihm nicht möglich durch Membranen zu permeieren. So kann er weder die Zelle wieder verlassen, noch in andere Zellkompartimente mit Lipiddoppelschicht übertreten.

Für die Messungen wurde der Farbstoff Fura-2 AM der Firma Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA verwendet.

2.5.6. Messungen am Epifluoreszenzmikroskop

Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubationszeit der Zellsuspension, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, wurde der Objektträger in der Dunkelkammer durch vorsichtiges Ausgießen geleert. Um ein Austrocknen der auf dem

Objektträger zurückgebliebenen Zellen zu vermeiden, wurden unverzüglich 250 µl einer 5 µmol/l Farbstofflösung (1mM; siehe Tabelle 13) draufgegeben. Anschließend inkubierten die Zellen lichtgeschützt um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Für alle durchgeführten Messungen wurde der MyoPacer (Firma IonOptix, MA, USA) zur Stimulation auf eine Spannung von 20 Volt und eine Stimulationsdauer von 4ms eingestellt.

2.5.6.1. Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Ströme und Sarkomerverkürzungen

Nach der Inkubationszeit und Montage des Objektträgers auf dem Objektisch des Mikroskops wurden die Zellen unter Spülung mit Messtyrode (1mM Ca^{2+} NT, siehe Tabelle 11; Fluss 60 ml/min) mit einer Frequenz von 0,5Hz über 5 min stimuliert. Dadurch soll eine Anpassung der Zellen an die Stimulation gewährleistet und überschüssiger, extrazellulärer Farbstoff und Zellreste bzw. bereits abgestorbene Zellen ausgewaschen werden. Nachdem im nächsten Schritt ein Kardiomyozyt unter dem Mikroskop eingestellt war, wurde der Koffein-Zulauf (siehe Tabelle 12; Flussrate 60 ml/min; manuelle Auslösung am Ende des Messprotokolls) knapp neben bzw. über der Zelle positioniert. Es folgt eine Stimulation mit einer Frequenz von 1Hz bis sich beim Ca^{2+} -

Fluoreszenzsignal (Ratio aus Emission bei 340 und 380 nm Anregungswellenlänge) eine stabile Grundlinie („steady-state“) einstellt, mit anschließender Stimulationspause von 30 Sekunden. Nach der Pause folgten Stimulationen mit Frequenzen über zuerst 2Hz und danach über 4Hz, jeweils so lange bis sich ein „steady-state“ eingestellt hat. Nach der Stimulation über 4Hz wird die Zelle für eine Minute mit einer Frequenz von 1Hz stimuliert. Die Stimulation wird beendet und durch manuelle Auslösung des Koffein-Zulaufs wurde ein Transient ausgelöst, der dem gleichen zeitlichen Abstand der Stimulation über 1Hz folgt.

Zum Ende des Messprotokolls wurde die Hintergrundfluoreszenz, die für die Auswertung subtrahiert werden muss, in der Umgebung der Zelle gemessen.

Es wurde versucht mit jeweils 2 Zellen pro Objektträger die oben beschriebenen Messungen durchzuführen, wobei dazwischen eine Pause unter Spülung mit Messlösung eingelegt wurde, um sicherzustellen, dass das Koffein die anschließende Messung nicht verfälscht. Die Kalzium-Transientenamplitude („peak h“) ist die Differenz zwischen dem höchst gemessenen Wert und der Grundlinie vor dem jeweiligen Transienten in μM $[\text{Ca}^{2+}]$.

Bei den Messungen der Ca^{2+} -Ströme wurde parallel auch die Sarkomerverkürzung in μm aufgezeichnet. Die Sarkomerverkürzung, angegeben als fraktionelle

Verkürzung (fractional shortening), entspricht der prozentualen Änderung der vor dem Transienten gemessenen Grundlinie zur absoluten Verkürzung der Sarkomere.

2.6. Datenauswertung und Statistik

2.6.1. Auswertung der ganzkörperplethysmographischen Daten

Die erhobenen numerischen Daten der Messungen der Ganzkörperplethysmographie (siehe Kapitel 2.3) wurden in eine konfigurierte Excel-Datei eingefügt, mit Hilfe derer eine Aussage über die Anzahl aufgetretener Apnoen und IFLs innerhalb der Aufzeichnungszeit getroffen werden konnte. Angegeben werden die Ereignisse in Apnoen bzw IFLs pro Stunde.

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.3) zeichnet sich eine IFL (siehe * in Abbildung 14) entweder durch eine Erhöhung der Inspirationszeit oder durch ein erniedrigtes Tidalvolumen (auch eine Kombination beider Umstände ist möglich) aus. So wurde für jeden Atemzug das Verhältnis von Inspirationszeit zu Tidalvolumen berechnet. Wenn dieses Verhältnis bei einem Atemzug um das 2,576-fache der Standardabweichung im Vergleich zum Mittelwert über die letzten 100 Atemzüge erhöht ist, kann dies als eine inspiratorische Flusslimitierung gewertet werden (107).

Eine Unterbrechung des Atemflusses über mindestens eine Sekunde entspricht einer Apnoe (siehe # in Abbildung 14) (107).

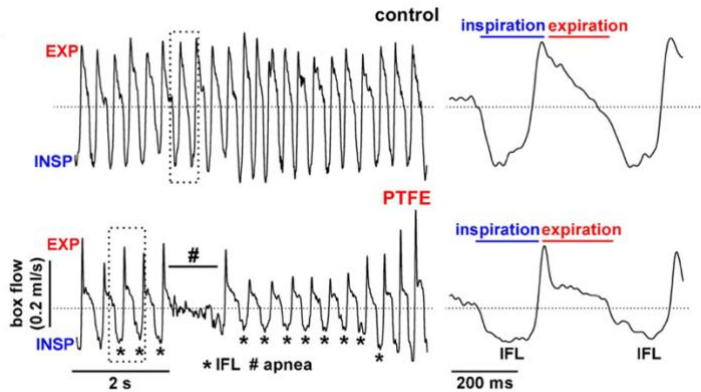


Abbildung 14 Ausschnitte von Originalaufzeichnungen von Atemflüssen einer nicht-operierten (oben) und einer operierten (unten) Maus; zu sehen sind inspiratorische Flusslimitierungen (mit einem Stern * markiert; rechts unten) und eine apnoeische Phase (mit Raute # im Graph unten markiert), welche aufgrund einer Verlegung der oberen Atemwege auftreten; modifiziert nach Lebek et al. 2020 (107)

2.6.2. Datengewinnung aus Messungen am Epifluoreszenzmikroskop

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden mit dem Programm IonWizard 6 (IonOptix, Westwood, MA / USA), das auch zur Aufzeichnung diente, ausgewertet. Zu Beginn der Auswertung einer Messung wurden die individuell gemessenen Hintergrundwerte (Nominator und Denominator) bestimmt und abgezogen. Dies ist

notwendig um die Daten der Ca^{2+} -Transienten der verschiedenen Myokardzellen miteinander vergleichen zu können.

2.6.2.1. Bestimmung von Nachdepolarisationen

Um nun die Anzahl von Nachdepolarisationen bei 1, 2 und 4Hz zu quantifizieren, wurden die Ca^{2+} -Transienten wie unten abgebildet eingestellt und sichtbare Nachdepolarisationen (siehe Abbildung 15, rote Pfeile) ausgezählt.

Nachdepolarisationen sind definiert als positive Abweichungen von der Grundlinie, die zwischen zwei Stimulationen auftreten. Als Einheit wurde Nachdepolarisationen pro Sekunde festgesetzt (NSE/sec).

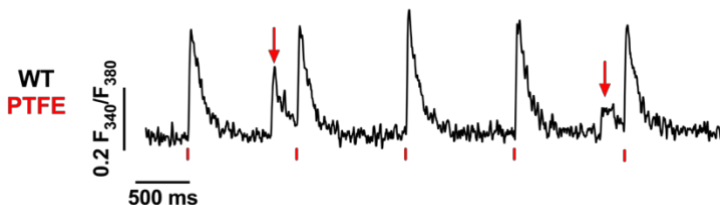


Abbildung 15: Originalaufzeichnung eines Ca^{2+} -Transienten einer atrialen Myokardzelle von einer operierten Wildtyp-Maus unter Stimulation mit 1Hz; die roten Striche unterhalb des Kalziumtransienten entsprechen den elektrischen Stimulationen; die roten Pfeile oberhalb markieren Nachdepolarisationen

2.6.2.2. Indirekte Quantifizierung des SR Ca^{2+} -Lecks

Die indirekte Bestimmung eines Ca^{2+} -Verlust aus dem SR erfolgte durch eine eingefügte Pause von 30 Sekunden zwischen den Stimulationen mit 1 und 2 Hz (siehe Kapitel 2.5.6.1). Zur Quantifizierung des Ca^{2+} -Verlustes wurde die absolute Höhe (positive Abweichung von der Grundlinie, „peak h“, siehe Abbildung 16) des Transienten nach der Pause mit einem Mittelwert der absoluten positiven Abweichung der zehn Ca^{2+} -Transienten vor der Pause ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 16). Je größer das Verhältnis, desto geringer war der Kalziumverlust aus dem SR.

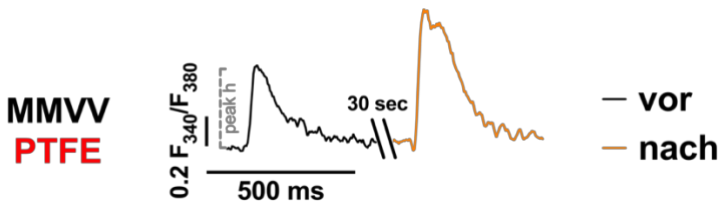


Abbildung 16 Originalaufzeichnung von Ca -Transienten einer ventrikulären Myokardzelle einer operierten Knock-In-Maus; beispielhaft in schwarz dargestellt ein Ca -Transient vor der Pause; farbig dargestellt der Transient nach der Pause; die Querstriche entsprechen einer Pause von 30 Sekunden; hellgrau dargestellt „peak h“ als Maß für die Ca^{2+} -Transientenamplitude

Identisch ausgewertet, wie oben beschrieben, wurden auch die gemessenen fraktionellen Verkürzungen ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 17).

Ausgeschlossen wurden Messungen, bei denen innerhalb der 30 Sekunden nicht-stimulierte Transienten auftraten.

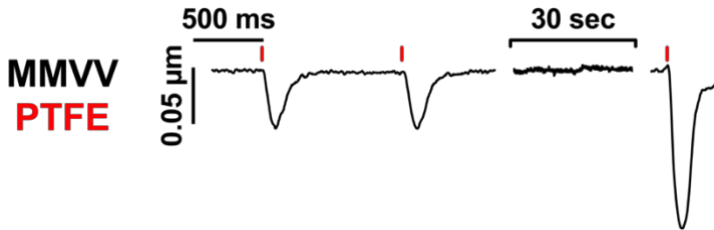


Abbildung 17 Originalaufzeichnung der Kontraktionsstrecke einer ventrikulären Mykardzelle einer operierten Knock-In-Maus; links: zwei Kontraktionen vor der Pause; Mitte: verkürzt dargestellt die Pause von 30 Sekunden; rechts: Kontraktion nach der Pause

2.6.2.3. Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehalts

Um eine Aussage über den Ca^{2+} -Gehalt des SR treffen zu können, wurde die positive Abweichung von der Grundlinie („peak h“) eines koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten (siehe Kapitel 1.7, 2.5.4 und 2.5.6.1) bestimmt (siehe Abbildung 18).

Zu beachten galt es, dass der koffein-induzierte Transient in etwa eine Sekunde nach dem letzten stimulierten Transient lag.

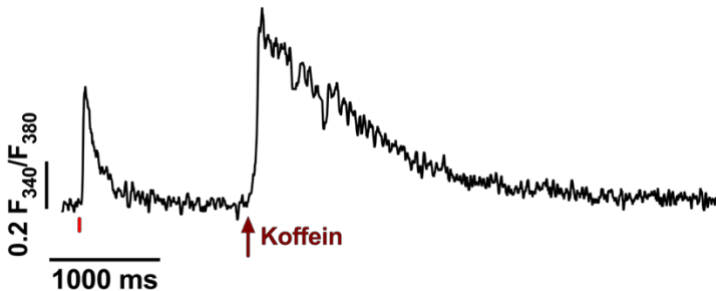


Abbildung 18 Originalaufzeichnung eines koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten einer Ventrikelzelle einer nicht operierten Wildtyp-Maus

2.6.3. Statistische Datenaufbereitung

Nach der Auswertung der Messungen wurden die gewonnenen Daten in das Programm GraphPad Prism™ 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla / USA) übertragen, das die statistische Auswertung und graphische Darstellung ermöglichte.

In der folgenden Darstellung der Ergebnisse werden die erhobenen Messwerte als arithmetisches Mittel $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM = „standard error of the mean“; Formel 2) präsentiert.

Als statistisches Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

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

Formel 2 - Formel zur Berechnung des Standardfehlers der Mittelwerte

n Anzahl/Stichprobenanzahl
 σ Standardabweichung

In GraphPad Prism™ 9 erfolgte die statistische Auswertung mittels multifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA). Dabei wurde bei der Analyse der Ca^{2+} -Transientenamplitude, der Kontraktionsverkürzung und dem Auftreten nicht-stimulierter Nachdepolarisationen eine dreifaktorielle Varianzanalyse (3-Wege-ANOVA) durchgeführt, da die Stimulationsfrequenzen, die Genotypen (Wildtyp- und MMVV CaMKII Knock-In-Mäuse) und die Intervention (PTFE-Injektion in den Zungengrund) als beeinflussende Faktoren identifiziert wurden. Dies ermöglichte auch eine Betrachtung, ob eine Interaktion zwischen den Faktoren vorlag.

Falls Daten, z.B. aufgrund von Fehlern in der Aufzeichnung, für ein Versuchstier fehlten oder unvollständig waren und die Durchführung eines 3-Wege ANOVAs daher nicht möglich, wurde eine mixed-effect Analyse durchgeführt.

Bei der statistischen Auswertung inspiratorischer Flusslimitationen pro Stunde, der Amplituden von koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten und dem Verhältnis der

Ca²⁺-Transientenamplituden vor und nach der dreißigsekündigen Pause wurde eine zweifaktorielle Variananalyse (2-Wege-ANOVA) angewendet. Hier flossen die Genotypen und die Intervention als zu analysierende Faktoren mit ein, auch sollte eine Interaktion der Faktoren untersucht werden.

Bei allen Varianzanalysen wurde außerdem die Mehrfachvergleichsmethode nach Holm-Šidák durchgeführt, mit Ausnahme bei der Analyse der frequenzabhängigen Betrachtung der Ca²⁺-Transientenamplituden.

Zur Testung von Korrelationen erfolgte eine einfache lineare Regressionsanalyse.

3 Ergebnisse

Diese Forschungsarbeit untersucht, welche Auswirkungen eine durch Oxidation aktivierte CaMKII im Rahmen des OSAS auf den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten in einem Mausmodell hat. Die ausführlichen pathophysiologischen Zusammenhänge sind der Einleitung dieser Dissertation zu entnehmen.

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich vor allem auf das SR Ca²⁺-Leck in der diastolischen Phase und den Kalziumgehalt des SR der Kardiomyozyten, sowie dem Auftreten nicht-stimulierter Ereignisse.

Ein vergrößertes Kalziumleck des SR steht im direkten Zusammenhang mit einer erhöhten CaMKII-Aktivität, u.a.

möglich aufgrund einer kalziumunabhängigen Aktivierung durch Oxidation. Die CaMKII erhöht durch Phosphorylierung des RyR2 dessen Öffnungswahrscheinlichkeit. Daraus ergibt sich ein erhöhtes Kalziumleck aus dem SR, welches zu ektopen Erregungen in der Diastole führt, und folglich ein verminderter SR Ca^{2+} -Gehalt resultiert.

Die epifluoreszenzmikroskopischen Messungen fanden an Kardiomyozyten des Mausmodells mit OSA statt. Neben Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen wurden Kardiomyozyten genetisch veränderter Tiere (MMVV Mäuse) verwendet, bei denen durch eine genetische Modifikation die Oxidation der CaMKII nicht möglich ist. Dies ermöglicht im Vergleich eine isolierte Untersuchung der Auswirkungen einer oxidativen Aktivierung der CaMKII.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zeigen zuerst die Wirkung der PTFE-Injektionen auf das Auftreten inspiratorischer Flusslimitierungen in der Schlafphase der Tiere. Danach werden die Ergebnisse der Messungen der kontraktile Eigenschaften, des SR Kalziumlecks und des SR Kalziumgehalts präsentiert und letztendlich das Auftreten nicht-stimulierter pro-arrhythmogener Ereignisse.

3.1. Ergebnisse der Ganzkörperplethysmographie

Zunächst werden die Effekte der Injektion von PTFE in den Zungengrund der Tiere dargestellt. Hierfür wurden die Atemzüge der Mäuse tagsüber (während der Schlafphase der Tiere) für acht Stunden mittels Ganzkörperplethysmographie aufgezeichnet.

Diese operative Intervention soll, um das Vorliegen eines OSAS zu simulieren, zu einer Zunahme von inspiratorischer Flusslimitierungen und Apnoen in der Schlafphase der Tiere führen.

Abbildung 19 zeigt eine Originalaufzeichnung des von Lebek et al. 2020 (107) entwickelten Tiermodells unserer Arbeitsgruppe von Atemzügen einer Maus nach Injektion von PTFE mit IFLs (Beschreibung siehe Kapitel 2.6.1).

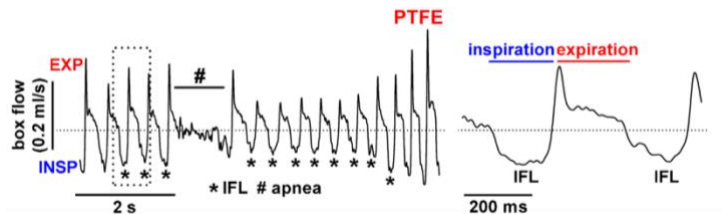


Abbildung 19 **Originalaufzeichnung von Atemzügen mit IFLs einer Maus nach PTFE-Injektion**; IFLs sind entweder gekennzeichnet durch eine verlängerte Inspirationsdauer oder ein erniedrigtes Tidalvolumen oder einer Kombination von Beidem; eine Apnoe entspricht einem Aussetzen des Atemflusses über mindestens eine Sekunde; zum Vergleich von Atemzügen einer nicht-operierten Maus siehe 2.6.1; modifiziert nach Lebek et al. 2020 (107)

3.1.1. Keine Unterschiede im Auftreten von inspiratorischen Flusslimitierungen zwischen Wildtyp- und MMVV-Tieren nach PTFE-Injektion

Abbildung 20 zeigt die Mittelwerte der IFL-Frequenz pro Stunde (/h) der Kontrollgruppe (CTRL, schwarz) ohne PTFE-Injektion und der Gruppe mit PTFE-Injektion (PTFE, rot), jeweils mit zwei Untergruppen bestehend aus Wildtyp (WT, blau) - und CaMKII-modifizierten (MMVV, grün) -Tieren. Zusätzlich eine Betrachtung aller Mäuse der Kontroll- und der MMVV-Gruppe (grau).

Bei der gesammelten Betrachtung aller Mäuse ist zu erkennen, dass es durch die PTFE-Injektion zu einem signifikanten Anstieg in der Häufigkeit inspiratorischer Flusslimitierungen um ca. 46 % ($p = 0,0016$) im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt.

Entscheidend für die weiteren Untersuchungen ist, dass sowohl die Häufigkeit von IFL bei WT-Tieren (von $31,408 \pm 10,878$ auf $60,735 \pm 10,879$; $p = 0,0446$) als auch bei MMVV-Tieren (von $24,792 \pm 7,193$ auf $59,044 \pm 8,054$; $p = 0,0065$) durch die Intervention signifikant anstieg. Der Genotyp (Wildtyp- oder MMVV-Maus) hat hingegen keinen Einfluss auf das Auftreten von IFLs gezeigt ($p = 0,8997$).

Alle Gruppen erfüllen die Anforderungen des ANOVA ($\alpha = 0,05$) und des Holm-Sidak's multiple comparison test ($\alpha = 0,05$).

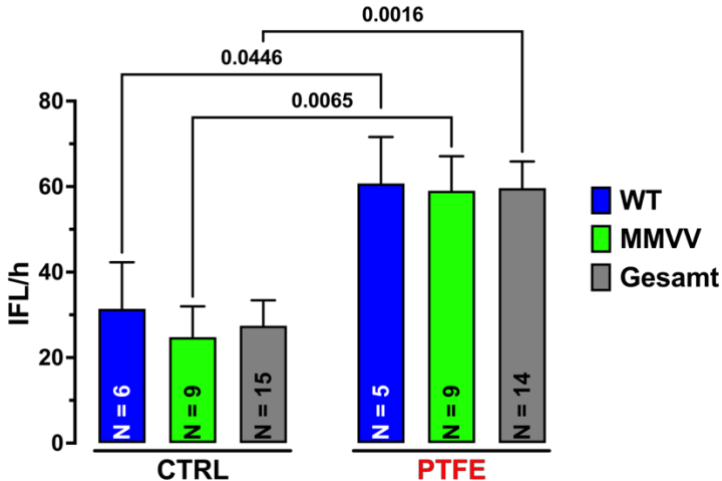


Abbildung 20 **Signifikante Zunahme der IFLs pro Stunde durch PTFE Injektion, sowohl bei WT- als auch bei MMVV-Tieren**; Anzahl der IFLs in IFL/h; Mittelwert mit SEM; Mäuse ohne PTFE-Injektion (CTRL; Wildtyp-Mäuse, blau; MMVV-Mäuse, grün; gepoolt, grau) werden mit Mäusen nach PTFE-Injektion (PTFE, rot; Wildtyp-Mäuse, blau; MMVV-Mäuse, grün; gepoolt, grau) verglichen. Durch die Injektion von PTFE (rot) ist eine signifikante Zunahme der IFL/h zu erkennen (2-Way-ANOVA, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$).

Überraschenderweise zeigten sowohl nicht-operierte und operierte Tiere ein in etwa identisches Auftreten von Apnoen pro Stunde (siehe Abbildung 21). So traten bei Tieren ohne PTFE-Injektion $11,429 \pm 1,074$ und bei Tieren mit PTFE-Injektion $12,775 \pm 1,249$ Apnoen pro

Stunde auf. Bei Betrachtung der Genotypen-Gruppen ergaben sich hier auch keine Unterschiede (WT CTRL vs WT PTFE: $11,250 \pm 2,191$ vs $12,500 \pm 2,311$; MMVV CTRL vs MMVV PTFE: $11,563 \pm 1,084$ vs $12,958 \pm 1,521$). Als Erklärung sei hier bereits erwähnt, dass aufgrund fehlender EEG-Aufzeichnungen keine Unterscheidung zwischen zentralen und obstruktiven Apnoen getroffen werden kann.

Bei den in die statistische Analyse einbezogenen Daten wurden jene exkludiert, die Fehler in der Aufzeichnung aufzeigten. Zu diesen Fehlern zählen u.a. eine IFL- oder Apnoe-Detektion bei deutlich zu hoher Atemfrequenz, einhergehend mit fehlender Schlafphase.

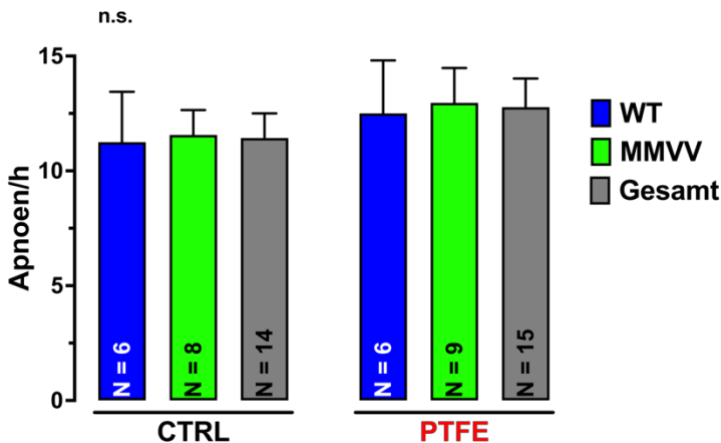


Abbildung 21 In etwa gleich häufiges Auftreten von Apnoen in der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe; Anzahl der Apnoen in Apnoen/h; Mittelwert mit SEM; Mäuse ohne

PTFE-Injektion (CTRL; Wildtyp-Mäuse, blau; MMVV-Mäuse, grün; gepoolt, grau) werden mit Mäusen nach PTFE-Injektion (PTFE, rot; Wildtyp-Mäuse, blau; MMVV-Mäuse, grün; gepoolt, grau) verglichen (2-Way-ANOVA, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$).

3.2. Ergebnisse aus Messungen an Kardiomyozyten der Maus am Epifluoreszenzmikroskop

Nach der Isolation der Herzmuskelzellen und Trennung in ventrikuläre und atriale Myozyten, wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM beladen.

Wie bereits oben erklärt, erfolgten anhand des Messprotokolls am Epifluoreszenzmikroskop die Aufzeichnungen von Ca^{2+} -Transienten und Kontraktionen der Kardiomyozyten (siehe Kapitel 2.5.6.1).

Ziel dieser Messungen war es eine, von Störfaktoren unabhängige, Aussage treffen zu können, inwieweit die durch Oxidation aktivierte CaMKII Einfluss auf den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten nimmt. Dafür wurde ein Tiermodell der OSA verwendet, welches unsere Arbeitsgruppe entwickelt hatte. Dieses Tiermodell der OSA wurde auf Wildtyp-Mäuse und auf genetisch modifizierte Mäuse, bei denen eine Oxidation der CaMKII nicht möglich ist, angewendet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Messungen präsentiert.

3.2.1. Keine Reduktion der Kalzium-Transientenamplitude und der fraktionellen Verkürzung in ventrikulären Kardiomyozyten nach PTFE-Behandlung

Die Ca^{2+} -Transientenamplitude und die fraktionelle Verkürzung der ventrikulären Kardiomyozyten wurden jeweils bei einer Stimulation mit 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz gemessen (siehe 2.5.6.1).

Die Ca^{2+} -Transientenamplitude wurde für alle verwendeten Gruppen (Wildtyp- und MMVV-Tiere jeweils mit und ohne PTFE-Behandlung) gegen die Stimulationsfrequenz aufgetragen (Abbildung 23).

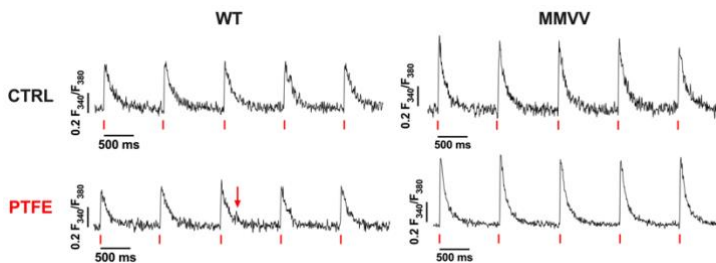


Abbildung 22 **Originalaufzeichnungen von Ca^{2+} -Transienten** ventrikulärer mit Fura-2 AM beladener Myozyten bei Stimulation (rote Striche unterhalb) mit 1 Hz; bei WT PTFE mit einem roten Pfeil markiert, ist ein nicht-stimuliertes Ereignis dokumentiert

Bei allen betrachteten Gruppen kommt es zu einem Anstieg der Kalzium-Transientenamplitude, die sich

abhängig von der Frequenz als signifikant darstellt (siehe Abbildung 23; $p = 0,0002$, Geisser-Greenhouse's epsilon 0,7471). Die frequenzabhängige Steigerung der Transientenamplitude zeigt sich zudem unabhängig von der Injektion von PTFE ($p = 0,3376$) und vom vorliegenden Genotyp ($p = 0,4400$).

Die Anforderungen des Drei-Wege-ANOVA ($\alpha = 0,05$) wurden erfüllt.

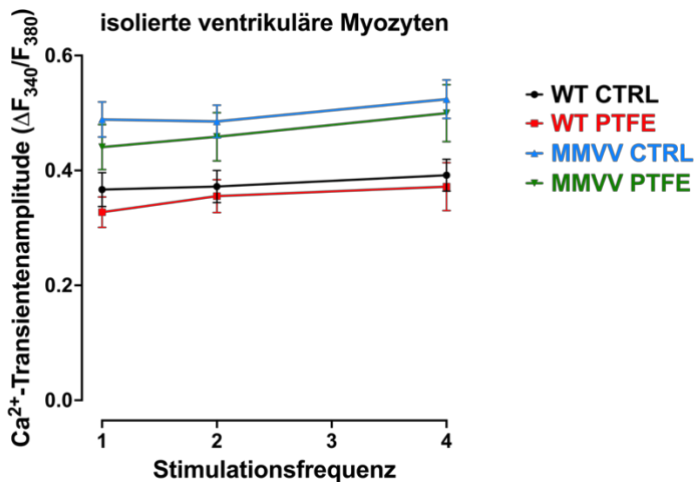


Abbildung 23 **Keine Reduktion der ventrikulären Kalzium-Transientenamplitude durch die Injektion von PTFE**; Ca^{2+} -Transientenamplitude ($\Delta F_{340}/F_{380}$) in μM $[\text{Ca}^{2+}]$; Mittelwerte mit SEM; Frequenz in Hertz (Hz); Wildtyp-Mäuse ohne PTFE-Injektion (schwarz) und mit PTFE-Injektion (rot); MMVV-Mäuse ohne PTFE-Injektion (blau) und mit PTFE-Injektion (21); bei allen betrachteten Gruppen kommt es zu einem signifikanten frequenzabhängigen Anstieg der Ca^{2+} -Transientenamplitude (3-way ANOVA, $\alpha = 0,05$, matching by factor: Frequenz)

Ein vergleichbares Resultat zeigt sich auch bei den ermittelten fraktionellen Verkürzungen von Kardiomyozyten des Ventrikels.

In Abbildung 24 sind die bei den Stimulationsfrequenzen gemessenen fraktionellen Verkürzungen von Wildtyp- und MMVV-Mäusen mit und ohne Operation (Wildtyp-Tiere ohne PTFE-Injektion, schwarz; Wildtyp-Tiere mit PTFE-Injektion, rot; MMVV-Tiere ohne PTFE-Injektion, blau; MMVV-Tiere mit PTFE-Injektion, grün) zu sehen.

Auch hier zeigt sich, dass es zu einem signifikanten frequenzabhängigen Anstieg ($p < 0,0001$, Geisser-Greenhouse's epsilon 0,8137) der fraktionellen Verkürzung kommt. Dies ist, betrachtet über die Stimulationsfrequenzen, ebenso unabhängig von den Genotypen ($p = 0,6248$) und von der Intervention mit PTFE-Injektion ($p = 0,6312$).

Aufgrund fehlender Daten musste hier eine mixed-effect Analyse ($\alpha = 0,05$) angewendet werden.

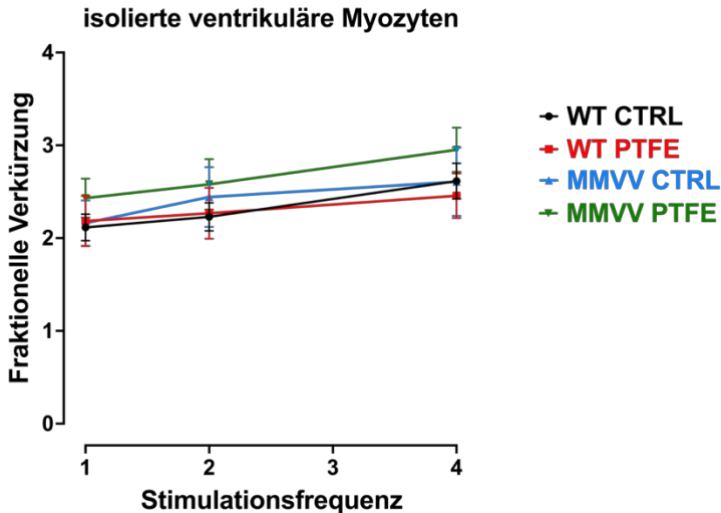


Abbildung 24 **Keine Reduktion der ventrikulären Fraktionellen Verkürzung durch PTFE-Injektion;** Fraktionelle Verkürzung (siehe 2.5.6.1); Mittelwerte mit SEM; Frequenz in Hz; Wildtyp-Mäuse ohne PTFE-Injektion (schwarz) und mit PTFE-Injektion (rot); MMVV-Mäuse ohne PTFE-Injektion (blau) und mit PTFE-Injektion (21); die fraktionelle Verkürzung steigt frequenzabhängig über die angelegten Stimulationsfrequenzen von 1, 2 und 4 Hz signifikant an (mixed-effects analysis, $\alpha = 0,05$, matching by factor: Frequenz)

3.2.2. Operierte MMVV-Mäuse sind vor einem erhöhten SR Kalzium-Leck geschützt

Durch den Vergleich der Ca^{2+} -Transientenamplituden vor und nach der Pause von 30 Sekunden zwischen den Stimulationen mit 1 Hz und 2 Hz (siehe Abbildung 25) lässt sich ein indirekter Rückschluss auf ein diastolisches

Kalzium-Leck aus dem SR ziehen. Demzufolge steht für die Kontraktion nach der Pause weniger Ca^{2+} zur Verfügung, da der Kalzium-Gehalt des SR aufgrund eines erhöhten Kalzium-Lecks aus dem SR sinkt (33, 72). Dafür wird ein Verhältnis aus der Ca^{2+} -Transientenamplitude nach der Pause durch den Mittelwert der Amplituden von zehn Transienten vor der Pause berechnet.

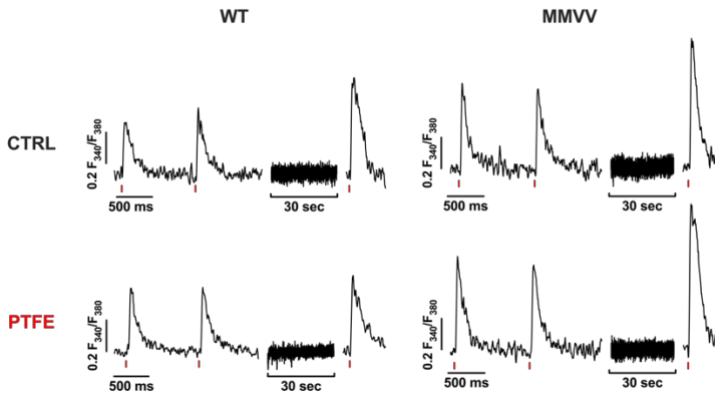


Abbildung 25 Originalaufzeichnungen zum Post-Pause-Test von ventrikulären Myozyten;

mit Fura-2 AM beladen; jeweils abgebildet sind beispielhaft zwei Transienten vor der Pause, die Pause von 30 Sekunden komprimiert dargestellt und der Ca^{2+} -Transient nach der Pause; die roten Striche unterhalb der Graphen spiegeln die elektrische Stimulation wieder; in dieser Abbildung ist zu erkennen, dass die Ca^{2+} -Transientenamplitude der Wildtyp-Maus mit PTFE-Injektion (unten links) im Vergleich v.a. mit der Wildtyp-Maus ohne PTFE-Injektion (oben links) und der operierten MMVV-Maus (unten rechts) geringer ausfällt

Bei der statistischen Analyse (siehe Abbildung 26) oben genannter Verhältnisse zeigt sich, dass durch die PTFE-Injektion eine signifikante Reduktion ($p = 0,0179$) bei WT PTFE ($1,330 \pm 0,055$) im Vergleich zu MMVV PTFE ($1,610 \pm 0,109$) resultiert. Dies spricht für eine Erhöhung des Kalzium-Lecks aus dem SR bei operierten WT-Mäusen.

Zudem gab es eine statistisch signifikante Interaktion zwischen dem vorliegenden Genotyp und der PTFE-Injektion mit einem p-Wert von 0,0139.

Die Anforderung des 2-Wege ANOVA ($\alpha = 0,05$) und für multiple comparisons des Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli ($Q = 0,05$) wurden erfüllt.

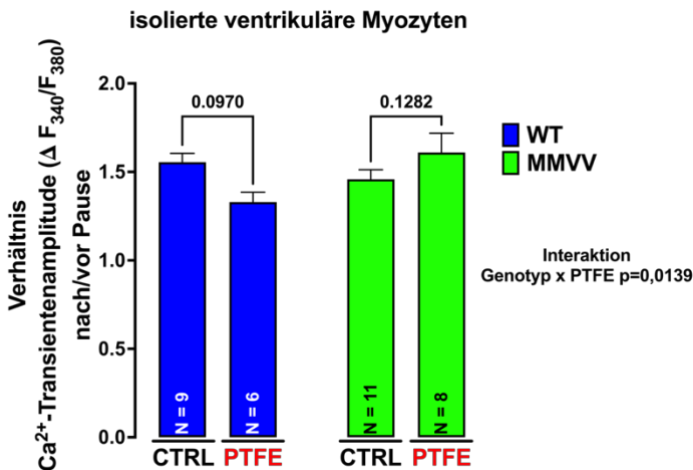


Abbildung 26 **MMVV PTFE-Mäuse sind vor einem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck geschützt;**

Verhältnis aus Ca^{2+} -Transientenamplitude ($\Delta F_{340}/F_{380}$) nach/vor der Pause; Mittelwerte mit SEM; Wildtyp-Mäuse, blau; MMVV-Mäuse, grün; CTRL: keine PTFE-Intervention, schwarz; PTFE: mit PTFE-Intervention, rot; es zeigt sich eine statistisch signifikante Reduktion des errechneten Verhältnisses bei WT PTFE im Vergleich zu MMVV PTFE Tieren; zudem gab es eine statistisch signifikante Interaktion dem Genotyp und der PTFE-Behandlung (2-Wege Anova, $\alpha = 0,05$; multiple comparison test, two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli, $Q = 0,05$)

Ein vergleichbares Ergebnis ist auch bei der Betrachtung der errechneten Verhältnisse für die fraktionelle Verkürzung zu sehen.

In Abbildung 27, an den Originalaufzeichnungen der Myozytenkontraktionen von Ventrikelzellen, ist besonders im Vergleich mit der Kontraktion der operierten MMVV-Maus eine deutliche Reduktion der Kontraktion bei dem operierten Wildtyp-Tier nach der Pause zu erkennen.

In der statistischen Datenauswertung (siehe Abbildung 28) präsentiert sich ein statistisch signifikant ($p = 0,0078$) reduziertes Verhältnis bei PTFE-behandelten Wildtyp-Mäusen ($1,789 \pm 0,167$) gegenüber dem Verhältnis bei operierten MMVV-Mäusen ($3,154 \pm 0,440$). Auch bei der fraktionellen Verkürzung zeigt sich die Interaktion zwischen Genotyp und PTFE-Behandlung als statistisch signifikant ($p = 0,0038$).

Es wurden Messungen ausgeschlossen bei denen es innerhalb der Pause zu nicht-stimulierten Ereignissen gekommen ist, da diese zu einer Verfälschung der Daten geführt hätten.

Die Bedingungen des 2-Wege ANOVAs ($\alpha = 0,05$) und des Holm-Sidak's multiple comparisons test ($\alpha = 0,05$) werden erfüllt.

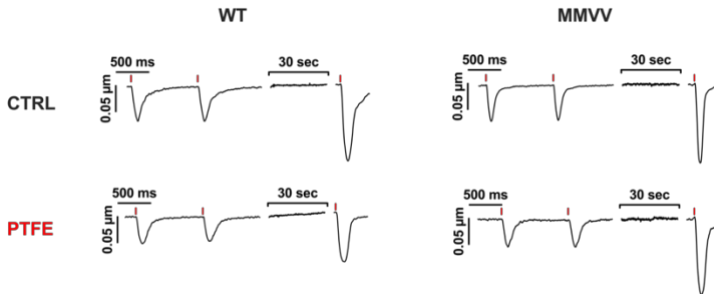


Abbildung 27 **Originalaufzeichnungen von Kontraktionen (in μm) ventrikulärer Myozyten**; jeweils links zwei Kontraktionen vor der Pause, komprimiert Darstellung der Pause von 30 Sekunden, rechts eine Kontraktion nach der Pause; die roten Striche oberhalb der Graphen entsprechen der elektrischen Stimulation; bei der Aufzeichnung der WT PTFE-Maus (unten links) fällt eine im v.a. im Vergleich zu den Aufzeichnungen einer WT CTRL- (oben links) und MMVV PTFE-Maus (unten rechts) deutlich geringer ausfallende Verkürzung nach der Pause auf

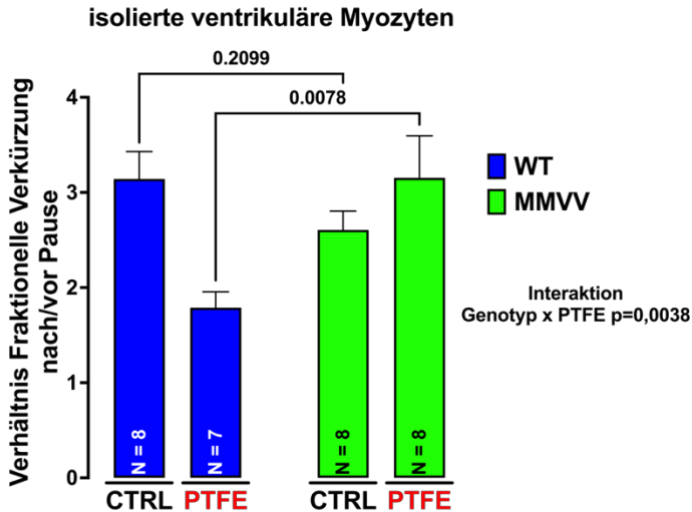


Abbildung 28 **MMVV PTFE Tiere zeigen keine Reduktion des Verhältnisses im Post-Pause-Test in der Fraktionellen Verkürzung**; Verhältnis der fraktionellen Verkürzung nach/vor der Pause; Mittelwerte mit SEM; Wildtyp Mäuse, blau; MMVV Mäuse, grün; CTRL: keine PTFE-Intervention, schwarz; PTFE: mit PTFE-Intervention, rot; das Verhältnis der Fraktionellen Verkürzung ist bei WT PTFE-Mäusen im Vergleich zu MMVV PTFE-Tieren signifikant reduziert; (2-Wege Anova, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparisons test, $\alpha = 0,05$)

3.2.3. SR Kalzium-Gehalt bei MMVV-Mäusen nach PTFE-Behandlung nicht reduziert

Um zu untersuchen, ob das erhöhte SR Kalzium-Leck zu einem vermindert SR Kalzium-Gehalt führt, wurde durch Koffein-Zufuhr ein Ca^{2+} -Transient ausgelöst. Die Amplitude dieses koffein-induzierten Kalzium-

Transienten lässt einen Rückschluss auf den SR Kalzium-Gehalt zu (siehe Abbildung 29).

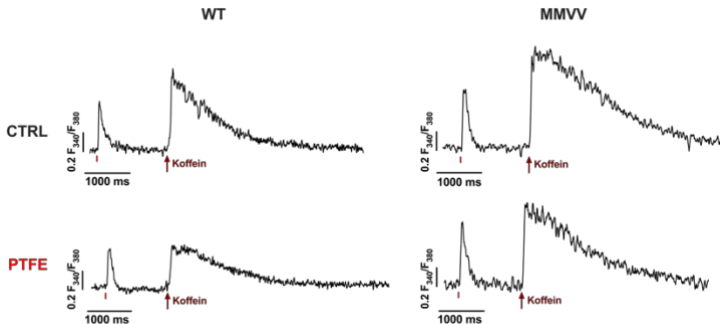


Abbildung 29 **Originalaufzeichnungen koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten von ventrikulären Myozyten**; jeweils links in den Graphiken zu sehen der letzte elektrisch stimulierte (roter Strich) Ca^{2+} -Transient; ungefähr eine Sekunde nach diesem kommt der koffein-induzierte Kalzium-Transient; im Vergleich der Amplituden (v.a. mit oben links und unten rechts) ist eine Reduktion besonders bei WT PTFE (unten links) zu erkennen; dies spricht für einen im Vergleich reduzierten SR Kalzium-Gehalt

Bei der statistischen Auswertung von Mittelwerten der koffein-induzierten Kalzium-Transientenamplituden ließ sich bei WT PTFE-Tieren ($0,437 \pm 0,061$) eine signifikante Reduktion im Vergleich zu MMVV PTFE-Tieren ($0,788 \pm 0,057$), mit einem p-Wert von 0,0004, nachweisen (siehe Abbildung 30). Somit geht ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck mit einem reduzierten SR Ca^{2+} -Gehalt einher.

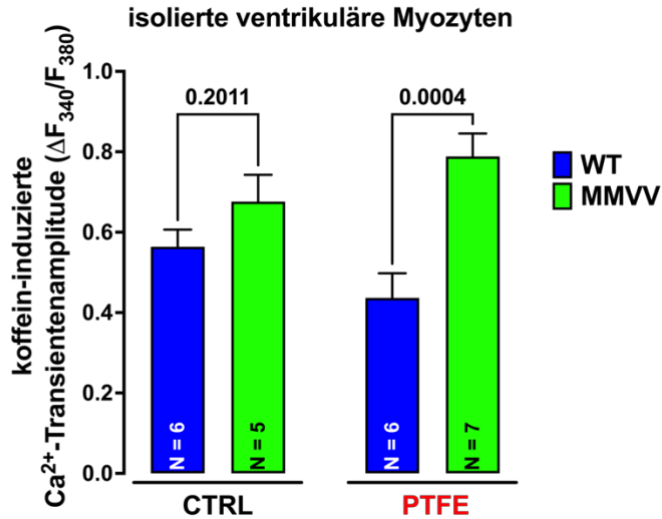


Abbildung 30 **MMVV PTFE-Tiere sind vor einer Reduktion des SR Ca²⁺-Gehalts geschützt**; koffein-induzierte Ca²⁺-Transientenamplitude ($\Delta F_{340}/F_{380}$); Mittelwerte mit SEM; Kontrollgruppe ohne PTFE-Injektion (CTRL, schwarz), Gruppe mit PTFE-Injektion (PTFE, rot); Wildtyp-Tiere (WT, blau), MMVV-Tiere (MMVV, grün); bei der Betrachtung der Mittelwerte zeigt sich eine signifikante Reduktion des SR Kalzium-Gehalts bei WT PTFE-Mäusen im Vergleich zu MMVV PTFE-Tieren (2-Wege Anova, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparisons test, $\alpha = 0,05$)

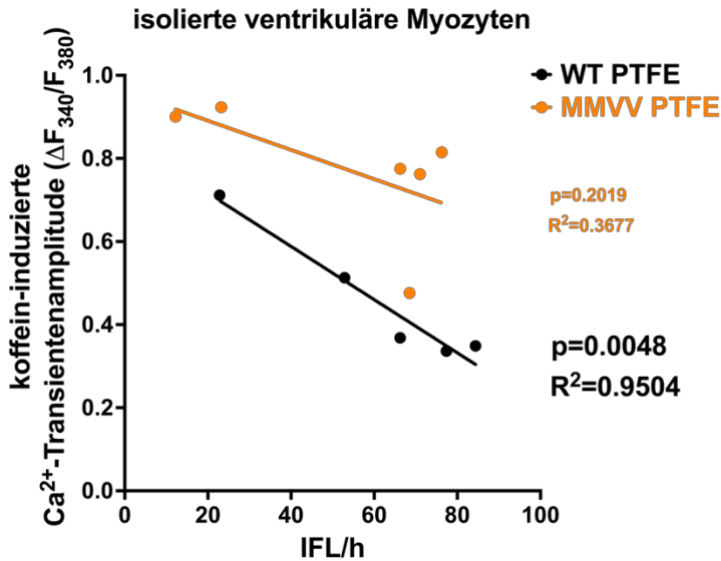


Abbildung 31 **Je ausgeprägter die IFL/h bei WT PTFE-Tieren, desto niedriger die kaffein-induzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude;** kaffein-induzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude ($\Delta F_{340}/F_{380}$); Mittelwerte (Punkte); lineare Regression (Linie); der Kalzium-Gehalt des SR zeigt sich umso niedriger, je höher die Anzahl an IFLs pro Stunde sind (einfache lineare Regressionsanalyse)

Interessanterweise zeigte sich bei WT PTFE-Mäusen in der linearen Regressionsanalyse zudem, dass je ausgeprägter die IFL-Rate (IFL/h) war, desto niedriger der Kalzium-Gehalt des SR. Diese negative Korrelation ist mit einem p-Wert von 0,0048 ($R^2 = 0,9504$) signifikant. Bei MMVV-Tieren mit PTFE-Injektion präsentiert sich diese Korrelation ($p = 0,2019$, $R^2 = 0,3677$) abgeflachter (siehe Abbildung 31).

Es erfolgte der Ausschluss von Daten, bei denen in der Messung Fehler auftraten, z.B. aufgrund eines zu großen zeitlichen Abstandes zwischen dem letzten stimulierten und koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten oder eines flachen Anstiegs des koffein-induzierten Transienten (Fehler bei der Applikation).

3.2.4. MMVV-Mäuse sind vor dem Auftreten spontaner nicht-stimulierter Ereignisse geschützt

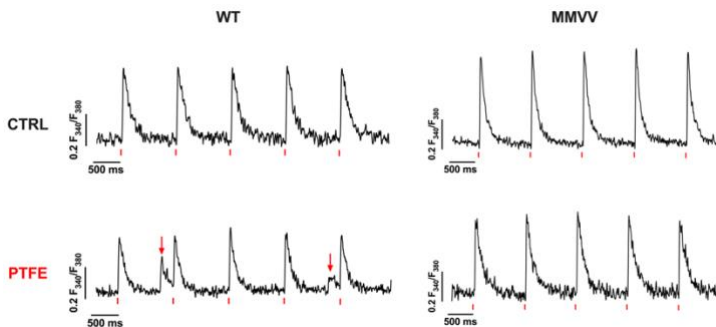


Abbildung 32 **Originalaufzeichnungen isolierter Vorhofzellen bei Stimulation mit 1 Hz**; unten links bei WT PTFE sind beispielhaft zwei solcher pro-arrhythmogener Ereignisse markiert (rote Pfeile)

Bei spontanen nicht-stimulierten Ereignissen (NSE), die pro-arrhythmogenes Potenzial besitzen, handelt es sich um Abweichungen von der diastolischen Ca^{2+} -Grundlinie zwischen zwei stimulierten Kalzium-Transienten (siehe rote Pfeile in Abbildung 32 und Abbildung 22). Um

herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der oxidativ-aktivierten CaMKII und dem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck gibt, wurde die Anzahl an NSEs pro Sekunde bei Stimulationen mit 1, 2 und 4 Hz ausgewertet.

Bei isolierten Vorhofzellen wurde im Vergleich zu WT CTRL- und MMVV PTFE- Mäusen ein meist mehr als zweifach erhöhtes Auftreten von NSEs s^{-1} bei WT PTFE-Mäusen bei allen Stimulationsfrequenzen beobachtet (siehe Tabelle 14 und Abbildung 33).

Interessanterweise zeigte sich die Interaktion zwischen Genotyp (WT oder MMVV) und PTFE-Behandlung ($p = 0,0005$) und zwischen Genotyp, PTFE-Behandlung und Stimulationsfrequenz ($p = 0,0421$) als statistisch signifikant (3-Wege ANOVA, $\alpha = 0,05$, mit Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$).

Frequenz	WT CTRL NSE s^{-1}	WT PTFE NSE s^{-1}	MMVV PTFE NSE s^{-1}
1 Hz	0,018 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,005	0,020 $\pm$ 0,004
2 Hz	0,030 $\pm$ 0,005	0,082 $\pm$ 0,006	0,045 $\pm$ 0,011
3 Hz	0,061 $\pm$ 0,007	0,128 $\pm$ 0,020	0,064 $\pm$ 0,008

Tabelle 14 **NSE s^{-1} in atrialen Myozyten**; Mittelwerte mit SEM; Stimulationsfrequenz von 1, 2 und 4 Hz (links); NSE s^{-1} in Vorhofzellen von nicht-operierten WT-Tieren (WT CTRL), operierten WT-Tieren (WT PTFE) und operierten MMVV-Tieren (MMVV PTFE)

Frequenz	WT CTRL NSE s ⁻¹	WT PTFE NSE s ⁻¹	MMVV PTFE NSE s ⁻¹
1 Hz	0,029 ± 0,006	0,061 ± 0,008	0,031 ± 0,006
2 Hz	0,048 ± 0,019	0,139 ± 0,027	0,056 ± 0,012
3 Hz	0,076 ± 0,015	0,164 ± 0,030	0,066 ± 0,016

Tabelle 15 **NSE s⁻¹ ventrikulärer Myozyten**; Mittelwerte mit SEM; Stimulationsfrequenz von 1, 2 und 4 Hz (links); NSE s⁻¹ in Vorhofzellen von nicht-operierten WT-Tieren (WT CTRL), operierten WT-Tieren (WT PTFE) und operierten MMVV-Tieren (MMVV PTFE)

Ebenso zeigen isolierte ventrikuläre Myozyten von WT PTFE-Mäusen ein doppelt so häufiges Auftreten von NSEs⁻¹ bei den angelegten Stimulationsfrequenzen im Vergleich zu WT CTRL- und MMVV PTFE-Mäusen (siehe Tabelle 15 und Abbildung 34).

In der statistischen Analyse zeigt sich auch an ventrikulären Myozyten die Interaktion zwischen Genotyp und PTFE-Behandlung mit einem p-Wert von 0,0241 und zwischen Genotyp, PTFE-Behandlung und der Stimulationsfrequenz ($p = 0,0290$) als statistisch signifikant (3-Wege ANOVA, $\alpha = 0,05$, mit Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$).

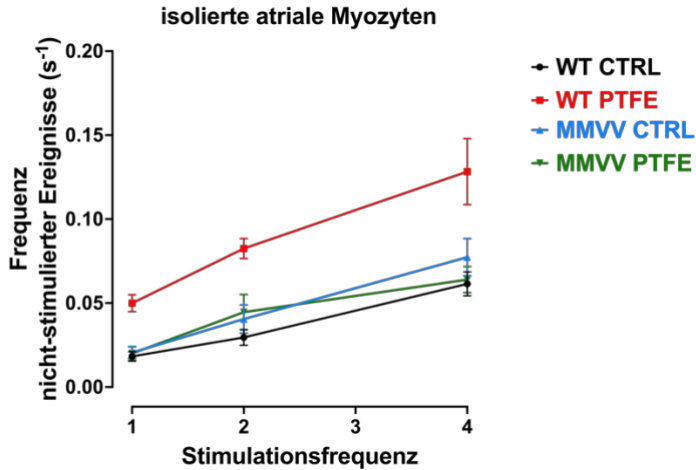


Abbildung 33 **vermehrtes Auftreten von NSE s⁻¹ in atrialen Myozyten bei WT PTFE-Mäusen**; Auftreten von NSEs pro Sekunde; Stimulationsfrequenz von 1, 2 und 4 Hz; WT CTRL (N = 9), WT PTFE (N = 9), MMVV CTRL (N = 10), MMVV PTFE (N = 8); 3-way ANOVA, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$

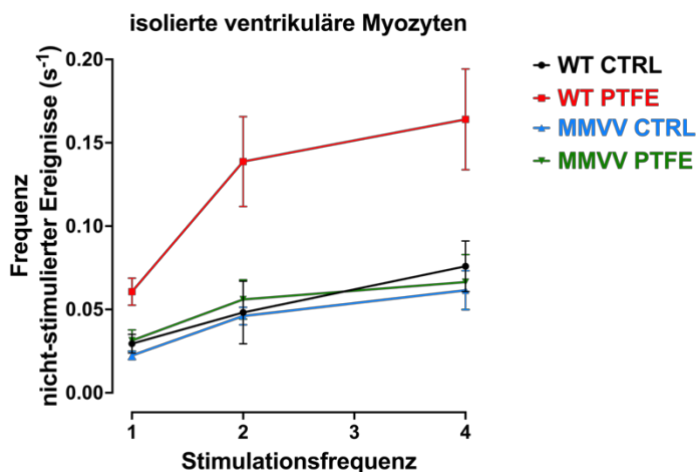


Abbildung 34 **MMVV PTFE-Mäuse sind vor vermehrtem Auftreten von NSE s^{-1} in Ventrikelzellen geschützt;** Auftreten von NSEs pro Sekunde; Stimulationsfrequenz von 1, 2 und 4 Hz; WT CTRL (N = 9), WT PTFE (N = 8), MMVV CTRL (N = 10), MMVV PTFE (N = 8); 3-way ANOVA, $\alpha = 0,05$; Holm-Sidak's multiple comparison test, $\alpha = 0,05$

4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersucht mit Hilfe eines Mausmodells der OSA die Auswirkungen der oxidativ-aktivierten CaMKII auf den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten. In besonderem Fokus standen hierbei das Kalzium-Handling des SR und das Auftreten nicht-stimulierter pro-arrhythmogener Ereignisse.

Um eine isolierte Betrachtung der Auswirkungen des OSAS, d.h. frei von möglichen Störfaktoren, wie zum Beispiel Diabetes, arteriellem Hypertonus und Weiteren, zu ermöglichen, wurde ein neuartiges Mausmodell der OSA verwendet, welches von Lebek et al. (107) entworfen wurde. Hierfür wurden neben Wildtyp-Mäusen auch genetisch modifizierte Mäuse genutzt, bei denen aufgrund einer Punktmutation, die zu einem Austausch von Methionin 281/282 durch Valin führt, eine Oxidation der CaMKII nicht mehr möglich ist.

Mit Hilfe dieses Modell wurde zum ersten Mal mittels eines Post-Pause-Tests ein diastolisches SR Kalzium-Leck in Verbindung mit einer oxidativ-aktivierten CaMKII im Rahmen des OSAS indirekt ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass CaMKII MMVV-Mäuse vor einem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck und einer Reduktion des SR Kalzium-Gehalts geschützt sind. Desweiteren zeigte sich, dass die fehlende Oxidationsmöglichkeit der CaMKII vor vermehrtem Auftreten nicht-stimulierter Ergebnisse protektiv wirkt.

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass es durch das OSAS und die darunter entstehenden oxidativen Bedingungen zu einer Aktivitätssteigerung der CaMKII kommt, die den Kalzium-Haushalt der Kardiomyozyten beeinflusst, mit der Folge erhöhten Auftretens pro-arrhythmogener Ereignisse.

4.1. Zusammenhänge zwischen OSAS und kardialen Erkrankungen

Dem OSAS muss aufgrund steigender Prävalenz in den letzten Jahren und mit Blick auf die sozialen und wirtschaftlichen Folgen eine zunehmende Bedeutung als Erkrankungen beigemessen werden (1-3).

Das OSAS zeichnet sich durch eine nächtliche Verlegung der oberen Atemwege aus, mit den Folgen einer Verminderung oder Unterbrechung des Atemflusses (siehe .

Abbildung 1). IFLs gelten hier als kennzeichnend für eine Obstruktion in den oberen Atemwegen (112). Das vermehrte Auftreten von IFLs in der Schlafphase lässt sich bei den in die Versuche eingeschlossenen Tieren nach PTFE-Injektion zeigen und lässt somit den Schluss zu, dass diese Tiere von einer OSA betroffen sind (siehe 3.1.1, Abbildung 19, Abbildung 20).

Betroffene OSA-Patienten leiden häufig an weiteren Erkrankungen, besonders auch an kardialen Erkrankungen wie Vorhofflimmern, und diese Kombination der Erkrankungen geht mit einer

nachgewiesenen erhöhten Sterblichkeit einher (1, 34, 36, 113). Zudem wurde das OSAS neben vielen Weiteren, wie zum Beispiel Übergewicht, als Risikofaktor für das Entstehen von Vorhofflimmern identifiziert (34, 114, 115). Neben oben genanntem Vorhofflimmern zeigte sich auch, dass Patienten mit OSAS häufiger an einer Herzinsuffizienz leiden (116, 117). Diese Verknüpfung zwischen OSAS und Herzinsuffizienz erhärtet sich, da herzinsuffiziente Patienten gegenüber der Allgemeinbevölkerung häufiger von einer SDB betroffen sind und die Schweregrade beider Erkrankungen positiv miteinander korrelieren (118-120).

Rossi et al 2013 (41) beschreiben hierzu einen Pathomechanismus, in dem es aufgrund des OSAS zu strukturellen Umbauten im Myokard und zu Veränderungen im Reizweiterleitungssystem kommt. Zu den Ursachen zählen oxidativer Stress mit einer vermehrten Produktion von ROS, aufgrund intermittierender Hypoxämien, ein erhöhter transmuraler Druckgradient über dem Myokard, als Folge einer Obstruktion der oberen Atemwege und ein erhöhter sympathomimetischer Stress, aufgrund wiederkehrender Aufwachreaktionen (41).

Dass auch der CaMKII eine entscheidende Bedeutung zukommt, zeigen Untersuchungen an Kardiomyozyten von Patienten, die an Vorhofflimmern oder Herzinsuffizienz leiden, da sowohl eine gesteigerte

Aktivität, als auch eine Überexpression der CaMKII vorlagen (72, 121-123).

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die von Rossi et al (41) beschriebenen Ursachen (s.o.) für sich zu einer Aktivitätssteigerung der CaMKII führen (30, 88, 124-126). Dies bestätigen auch die Untersuchungen von Lebek et al. 2020 (33) an Vorhofzellen von Patienten mit SDB, bei denen eine gesteigerte Aktivität der CaMKII gemessen wurde.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Aktivierung der CaMKII durch Oxidation. Dies geschieht durch die Oxidation von Methionin 281/282 und führt zu einer Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängigen Aktivierung der CaMKII (30).

Beim OSAS entstehen ROS, die als Vermittler oxidativen Stresses zu werten sind, aufgrund wiederkehrender Phasen von Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung (23, 32). ROS werden in der Entstehung kardialer Erkrankungen als ausschlaggebende Beteiligte angesehen (127).

Eine vermehrte Produktion von ROS konnte sowohl in Kardiomyozyten im Tiermodell der OSA, als auch von Patienten mit SDB nachgewiesen werden (33, 128).

Dass es nun unter dem OSAS zu einer vermehrten Oxidation der CaMKII kommt, stützen u.a. die Ergebnisse von Arzt et al. 2022 (65), da Kardiomyozyten von

Patienten mit SDB eine erhöhte Rate an oxidiertem CaMKII aufwiesen.

Welchen entscheidenden Einfluss die Aktivierung der CaMKII durch Oxidation auf die kardiale Pumpfunktion hat, zeigen die Versuche von Hegner et al. 2023 (128). Im Tiermodell der OSA wiesen CaMKII Knock-out Mäuse und vor allem Mäuse, bei denen die CaMKII vor einer Oxidation (CaMKII MMVV) geschützt waren, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) auf. Somit folgerten sie, dass die oxidative Aktivierung der CaMKII einen entscheidenden Schlüsselmechanismus darstellt (128).

Welche pathologischen Auswirkungen die CaMKII auf den intrazellulären Kalzium-Haushalt von Kardiomyozyten hat, wird im Folgenden genauer beleuchtet.

4.2. Die Auswirkungen der oxidativ-aktivierten CaMKII auf den Ca^{2+} -Haushalt des SR

Der Einleitung ist zu entnehmen, dass diverse Aktivierungsmechanismen Einfluss auf die Aktivität der CaMKII ausüben und zu einer gesteigerten Aktivierung führen können, mit Folgen für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Wie bereits erläutert, steht die Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängige Aktivierung der CaMKII

durch Oxidation in dieser Arbeit unter besonderem Augenmerk (30).

Durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine nimmt die CaMKII Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zellen. Wie auch in der Einleitung schon genauer beschrieben, zählen hierzu L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, der RyR2, Phospholamban und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (55, 121).

Die CaMKII phosphoryliert den RyR2 an Serin 2814, wodurch es zu vermehrten spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR (SR Ca^{2+} -Leck) kommt, da die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht ist (55, 73, 121). Auch im Zusammenhang mit einer oxidativ-aktivierten CaMKII zeigt sich das SR Ca^{2+} -Leck erhöht (65, 104, 129). Diese Beobachtungen bestätigen die hier durchgeführten Messungen an Kardiomyozyten von Mäusen mit OSAS durch Interpretation der Ca^{2+} -Transientenamplituden vor und nach einer Pause von 30 Sekunden, als indirekter Nachweis eines SR Ca^{2+} -Lecks. So zeigte sich, dass OSA MMVV-Mäuse vor einer Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude geschützt waren, wohingegen die Amplitude bei WT PTFE Tieren signifikant geringer ausfiel (siehe Abbildung 26).

Die Folge eines erhöhten Kalzium-Lecks aus dem SR ist eine Reduktion des SR Ca^{2+} -Gehalts mit negativem Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit des Myokards, wie es im Rahmen der Herzinsuffizienz Erkrankung zu beobachten ist (72, 92, 121). Auch ist bekannt, dass Patienten mit SDB sowohl ein erhöhtes SR-Kalziumleck,

als auch einen erniedrigten Kalzium-Gehalt des SR zeigen (33, 130). Arzt et al. (65) zeigten zudem, dass bei vermehrtem Vorkommen einer oxidierten CaMKII ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck zu finden ist. Allerdings gilt es zu Bedenken, dass das untersuchte Patientenkollektiv eine multiple vorerkrankte Gruppe darstellt.

Zur Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehalts wurde die Amplitude von koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten ausgemessen, wobei WT-Mäuse mit OSA im Vergleich zu MMVV-Mäusen mit OSA einen signifikant geringeren SR Ca^{2+} -Gehalt aufwiesen (Abbildung 30). Zudem ist der SR Kalzium-Gehalt bei WT-Mäusen mit OSA signifikant niedriger, je mehr IFL/h auftraten. Diese negative Korrelation ist bei OSA MMVV-Mäusen abgeflacht (siehe Abbildung 31).

Dass dies auch eine kontraktile Dysfunktion nach sich zieht, bestätigt sich durch die von Hegner et al. 2023 (128) gezeigte signifikante Reduktion der LVEF bei OSA WT-Mäusen, wobei sowohl CaMKII Knock out-Mäuse, als auch, und dies unterstreicht die Wichtigkeit der ox-CaMKII, OSA MMVV-Mäusen post-interventionell keine Reduktion der LVEF aufwiesen.

4.3. Pro-arrhythmogene Aktivität im Zusammenhang mit einem ox-CaMKII-vermittelten SR Ca^{2+} -Leck

Das beobachtete SR Ca^{2+} -Leck führt in Folge zu erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol, woraus eine

Aktivitätssteigerung der CaMKII resultiert (73, 131). Nach den Ausführungen von Guo et al. 2012 (131) birgt dieser Kreislauf die Gefahr einer sich verstärkenden Abwärtsspirale („Circulus vitiosus“).

Aufgrund eines erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels transportiert der NCX Ca^{2+} aus der Zelle raus (132), wodurch es zu Veränderungen des Membranpotentials kommt und DADs entstehen können, welche als Auslöser von Arrhythmien bekannt sind (siehe 1.5) (33, 72, 73). Im Tiermodell an atrialen Myozyten von Mäusen mit OSA konnte bereits gezeigt werden, dass CaMKII Knock-out-Mäuse kein erhöhtes Auftreten pro-arrhythmogener Ereignisse aufwiesen (133).

Neben der Assoziation von OSAS und Vorhofflimmern, wie bereits oben erläutert, besteht auch eine Verbindung mit plötzlichem Herztod und ventrikulären Arrhythmien (22, 134).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein vermehrtes Auftreten von nicht-stimulierten Ereignissen bei WT OSA-Mäusen gemessen werden, wobei OSA MMVV-Tiere vor diesem Auftreten geschützt waren. Diese Beobachtung ließ sich sowohl in Ventrikel- als auch in Vorhofzellen machen (Abbildung 33, Abbildung 34). So könnte auf Grundlage dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass ein verminderter Anfall von ROS oder eine Vermeidung der Oxidation der CaMKII auch bei Patienten mit OSAS das Auftreten kardialer Arrhythmien verhindert oder zumindest deutlich reduziert werden könnte.

4.4. Diskussion der Methoden und ihrer Limitationen

Im Folgenden sollen Einschränkungen und Grenzen der verwendeten Methoden dargelegt werden.

Für diese Arbeit wurde das von Lebek et al. 2020 (107) entwickelte Tiermodell der OSA, durch Injektion von PTFE in den Zungengrund, verwendet. So konnte gezeigt werden, dass es durch eine Dickenzunahme der Zunge zu einer Zunahme von Apnoen und OSA-spezifischen inspiratorischen Flusslimitierungen kommt (107). Um allerdings sicher gehen zu können, dass die detektierten IFL/h während der Schlafphase auftraten, müsste parallel zur plethysmographischen Messung eine EEG-Ableitung stattfinden. Des Weiteren wäre es erstrebenswert zu erfahren, wie ausgeprägt die Hypoxämie nach IFLs war. Auf diese Schwierigkeiten verwiesen auch bereits Lebek et al. 2020 (107).

Auch wäre eine EEG-Aufzeichnung von Nöten gewesen, um zwischen obstruktiven und zentralen Apnoen unterscheiden zu können. Dies könnte die Erklärung für die beinahe gleiche Anzahl an Apnoen bei sowohl operierten, als auch nicht operierten Tieren sein. Es ist bekannt, dass obstruktive Apnoen beinahe ausschließlich in REM-Schlafphasen auftreten, welche allerdings nur etwa 5% der Schlafdauer ausmachen (135).

Da für die Versuche ausschließlich männliche Tiere verwendet wurden, es allerdings bekannt ist, dass es geschlechterspezifische Unterschiede bei OSA-Patienten gibt (117, 136), muss in Zukunft das Augenmerk explizit auch auf das weibliche Geschlecht gerichtet werden und die zugrundeliegenden, geschlechterspezifischen Pathomechanismen untersucht werden.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Auswirkungen der oxidativ-aktivierten CaMKII im Rahmen des OSAS.

Wie in der Einleitung erwähnt, kann die CaMKII allerdings über eine Vielzahl an Mechanismen aktiviert werden, die keineswegs außer Acht gelassen werden dürfen. Zudem ist auch bekannt, dass nicht nur die CaMKII, sondern auch der RyR oxidativ aktiviert werden kann (137). Daher wäre sowohl die Bestimmung der Phosphorylierung, als auch die Ausprägung der Oxidation des RyR interessant. Da auch der NCX eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Arrhythmien spielt, sollte auch dieser im Hinblick auf oxidative Aktivierung weiter Gegenstand zukünftiger Forschung sein (137).

Zudem blieb im Zuge dieser Arbeit die Messung der ROS-Konzentration aus. Dass es allerdings zu einer vermehrten Produktion von ROS im Tiermodell der OSA, auch bei MMVV OSA-Mäusen kommt, konnten Hegner et al. 2023 zeigen (128).

4.5. Therapiemöglichkeit für Patienten mit OSAS

Das OSAS führt, wie bereits eingehend beschrieben, für Patienten zu beträchtlichen alltäglichen Einschränkungen, fördert das Entstehen von Erkrankungen oder führt auch zu einer Progression bereits bestehender Erkrankungen, insbesondere auch kardialer Erkrankungen.

So birgt, als Beispiele, VHF neben einem erhöhten Schlaganfallrisiko, auch ein erhöhtes Sterberisiko (138) und bei Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz liegt die 5-Jahres-Mortalitätsrate bereits bei über 50% (139).

Daher sollte es erstrebenswert sein, neben den aktuellen Therapiemöglichkeiten, weitere Therapieoptionen für Patienten mit SDB in Zukunft zu etablieren.

4.5.1. Aktueller Stand der Therapie für Patienten mit OSAS

Zuvorderst beinahe einer jeden Therapie steht die Reduktion von beeinflussbaren Risikofaktoren. So stellen für das OSAS zum Beispiel die Gewichtsreduktion und der Einsatz einer nächtlichen Atemunterstützung mit positivem Atemwegdruck (PAP, positive airway pressure) die aktuelle Therapie der Wahl dar. Für das OSAS werden vor allem Verfahren wie die CPAP- (contiuous positive airway pressure) oder die BiPAP- (bilevel positive airway pressure) Therapie eingesetzt (140).

Unter CPAP zeigt sich zwar der AHI signifikant reduziert, die Tagesmüdigkeit und die gesundheitsbezogene Lebensqualität verbessert, allerdings führte die CPAP-Therapie prospektiv zu keiner Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse, wie Krankenhauseinweisung aufgrund einer dekompensierten Herzinsuffizienz oder auch eines akuten Koronarsyndroms (21).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass zwar unter CPAP-Therapie die Wiederauftretenswahrscheinlichkeit von VHF nach einer interventionellen Therapie (wie Kardioversion, Ablation oder Pulmonalvenenisolation) sank (141, 142), allerdings bringt eine Intervention, wie die Pulmonalvenenisolation, ein hohes Komplikationsrisiko mit sich (143). Außerdem ist bei Patienten mit SDB keine Reduktion von paroxysmalen Vorhofflimmerepisoden durch eine CPAP-Therapie eingetreten (144). Bei Patienten mit CSA und Herzinsuffizienz konnte zudem unter adaptiver druckunterstützender Beatmung eine erhöhte Mortalitätsrate beobachtet werden (145).

Erschwerend kommt noch hinzu, dass sich die Patienten-Compliance gegenüber einer CPAP-Therapie sehr gering (21) zeigte und laut Schoch et al. (146) setzten nach 5-jähriger Behandlungsdauer nur etwa 55% der OSAS-Patienten die CPAP-Therapie fort.

Wie u.a. Hegner et al. 2023 (128) feststellten, mangelt es aktuell an einer spezifischen (medikamentösen) Therapie für Patienten mit OSAS. Derzeit orientiert sich die

(medikamentöse) Therapie an den Leitlinien, wie für Herzinsuffizienz oder VHF, der europäischen Fachgesellschaft ESC (Stand 2021), ohne explizite Therapievorschläge für SDB-Patienten (128, 147, 148). Daher ist es notwendig die zugrundeliegenden pathomechanistischen Zusammenhänge zu untersuchen, um so spezifische Therapiemöglichkeiten für Patienten mit OSAS zu entwickeln.

4.5.2. Die CaMKII als Zielstruktur zukünftiger Therapien

Ein möglicher erfolgsversprechender Therapieansatz stellt die Einflussnahme auf den Kalzium-Haushalt dar, mit der CaMKII als Zielsubstrat (102). So werden zwar bereits CaMKII-Inhibitoren in der präklinischen Forschung untersucht, allerdings ist noch keiner für eine Therapie am Patienten verfügbar (72, 149, 150). Hier ergeben sich aktuelle die Probleme, dass zum einen eine ungenügende Spezifität gegenüber den CaMKII-Subtypen, eine begrenzte Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit vorliegt (123, 151, 152).

Trotz der geschilderten Probleme liegen bereits vielversprechende Ergebnisse von Versuchen mit CaMKII-Inhibitoren vor.

So konnten Neef et al. 2017 (149) zeigen, dass es durch den CaMKII-Inhibitor SMP-114 in Vorhofzellen und Zellen des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz zu einer Reduktion spontaner Kalzium-Freisetzungen aus

dem SR kommt. Zudem blieb eine negative Auswirkung auf die elektromechanische Kopplung und die systolische Funktion aus (149). Zum klinischen Einsatz kommt SMP-114 bereits für Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Auch zeigten Neef et al. 2018 (150) mit dem CaMKII-Inhibitor AS105 an humanen Vorhofzellen und Ventrikelzellen von Mäusen mit Herzinsuffizienz, die eine Überexpression der CaMKII aufwiesen, ein vermindertes SR Ca^{2+} -Leck. Zudem traten unter AS105 weniger pro-arrhythmogene Ereignisse auf und auch der Ca^{2+} -Gehalt des SR zeigte sich unter AS105 erhöht (150).

Mit GS-680 zeigt sich ein weiterer CaMKII-Inhibitor mit hoffnungsvollen Ergebnissen. GS-680, ein ATP-kompetitiver und selektiver CaMKII-Inhibitor, reduzierte an menschlichen Vorhofzellen, in den Versuchen von Lebek et al. 2018 (72), nicht nur das SR Ca^{2+} -Leck und das Auftreten pro-arrhythmogener Ereignisse, sondern verbesserte auch die systolische Kontraktilität von Ventrikelzellen.

Jüngst ließ sich mit zwei weiteren, oral verfügbaren ATP-kompetitiven CaMKII-Inhibitoren, RA306 und RA608, ein positiver Einfluss auf die kardiale Funktion zeigen.

So verbesserte sich durch den Einsatz von RA306 und RA608 die LVEF bei Mäusen mit dilatativer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz (induziert durch eine Verengung der Aorta mit konsekutiver Nachlasterrhöhung) (153, 154).

Ein sehr interessanter Therapieansatz, besonders im Hinblick auf die hier untersuchte oxidative Aktivierung der CaMKII, ist der Austausch von Methionin 281/282 durch Valin über Genom-Editierung mittels CRISPR-Cas9, wodurch die Aktivierung der CaMKII durch Oxidation ausbliebe (155).

In Zusammenschau könnte der Einsatz von CaMKII-Inhibitoren ein vielversprechender Therapieansatz für Patienten mit OSAS und dessen Folgeerkrankungen sein. Allerdings bedarf es zukünftige Forschungsanstrengungen um Probleme, wie Arzneimittelnebenwirkungen, selektive Subtypenspezifität und klinische Wirksamkeit, zu lösen.

4.6. Schlussfolgerung

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Anhaltspunkt, welche Rolle die oxidativ-aktivierte CaMKII im Rahmen des OSAS für den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten und die Entstehung von kardialen Arrhythmien spielt. Allerdings bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen um die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen OSAS und Folgeerkrankungen, wie z.B. VHF oder Herzinsuffizienz, genauer zu verstehen und in Zukunft therapeutische Konsequenzen ziehen zu können. Von besonderem Interesse sollte es sein, herauszufinden, ob Patienten mit OSAS von einem frühzeitigen Therapiebeginn mit

Medikamenten, die z.B. die Aktivität der CaMKII beeinflussen, profitieren um pathologische Veränderungen des Myokards abzumildern oder gar zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Aufgrund steigender Prävalenz und assoziierter Folgeerkrankungen gewinnt das OSAS als Erkrankungen aus wirtschaftlichen und sozialen Gesichtspunkten in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Eine unumstrittene Assoziation zu kardialen Erkrankungen, wie VHF oder Herzinsuffizienz, ist auf vorliegender Studienlage nicht von der Hand zu weisen, ebenso wenig wie die Rolle der CaMKII. So konnte bei Patienten mit OSAS generell eine vermehrte Expression und Aktivität der CaMKII gezeigt werden und zudem scheint die oxidative Aktivierung der CaMKII durch ROS eine entscheidende Schlüsselrolle zu spielen. So wurde in Kardiomyozyten von Patienten eine erhöhte Konzentration von ROS gemessen und eine vermehrte Oxidation der CaMKII nachgewiesen, mit Folgen für den zellulären Ca^{2+} -Haushalt. Hierzu zählen ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck und ein verminderter SR Ca^{2+} -Gehalt, welche negative Auswirkungen auf die Kontraktilität haben und pro-arrhythmogene Aktivitäten triggern.

Allerdings leiden Patienten meist an weiteren Erkrankungen, die eine isolierte Betrachtung der

Auswirkungen des OSAS erschweren und somit als Störfaktoren zu werten sind.

Da aktuell medikamentöse Therapiemöglichkeiten fehlen, bedarf es eines genaueren Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge. Ziel dieser Arbeit war es, die zugrundeliegenden Pathomechanismen weiter aufzuklären. Hierfür wurde das von Lebek et al. 2020 (107) entwickelte Mausmodell der OSA verwendet, welches frei von etwaigen Störfaktoren ist, um die Auswirkungen einer oxidativ-aktivierten CaMKII mit Blick auf pro-arrhythmogene Ereignisse und den Ca^{2+} -Haushalt zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu neben WT Mäusen auch MMVV Mäuse verwendet, bei denen die CaMKII genetisch so verändert vorlag (Austausch von Methionin 281/282 durch Valin), dass eine Aktivierung der CaMKII durch Oxidation nicht möglich war. Am Epifluoreszenzmikroskop wurden Ca^{2+} -Transienten und Kontraktionen von atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten gemessen und das Auftreten nicht-stimulierter pro-arrhythmogener Ereignisse bestimmt.

So konnte mittels eines Vergleiches der Ca^{2+} -Transientenamplituden nach einer Pause von 30 Sekunden ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck und über die Bestimmung der Ca^{2+} -Transientenamplitude nach Koffein-Infusion ein erniedrigter SR Ca^{2+} -Gehalt bei WT Mäusen mit OSA gezeigt werden. Zudem lies sich bei WT

Mäusen mit OSA feststellen, dass ein erniedrigter SR Ca^{2+} -Gehalt mit der auftretenden Frequenz von IFL/h negativ korrelierte. Desweiteren führt ein erhöhtes SR Ca^{2+} -Leck zu einer Reduktion der Kontraktionsfähigkeit in ventrikulären Kardiomyozyten von WT Mäusen mit OSA. Sowohl in atrialen, als auch in ventrikulären Kardiomyozyten von WT OSA-Mäusen kam es zu einem vermehrten Auftreten pro-arrhythmogener Ereignisse. Spannenderweise waren MMVV OSA-Mäusen, bei denen die Oxidationsmöglichkeit der CaMKII fehlt, vor all den oben genannten negativen Auswirkungen auf den Ca^{2+} -Haushalt und vor gesteigerter pro-arrhythmogener Aktivität geschützt.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Aktivitätssteigerung der CaMKII durch Oxidation im Rahmen des OSAS einen erheblichen Einfluss auf kardiale Pathologien nimmt und sich die medikamentöse CaMKII-Inhibition als vielversprechende Therapiemöglichkeit für Patienten mit OSAS eröffnet.

6 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Abe H, Takahashi M, Yaegashi H, Eda S, Tsunemoto H, Kamikozawa M, et al. Efficacy of continuous positive airway pressure on arrhythmias in obstructive sleep apnea patients. *Heart Vessels*. 2010;25(1):63-9.
5. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, Jr., Friedman N, Malhotra A, Patil SP, et al. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med*. 2009;5(3):263-76.
6. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, Marti-Soler H, Andries D, Tobback N, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir Med*. 2015;3(4):310-8.

7. Young T, Evans L, Finn L, Palta M. Estimation of the Clinically Diagnosed Proportion of Sleep Apnea Syndrome in Middle-aged Men and Women. *Sleep*. 1997;20(9):705-6.
8. Varvarigou V, Dahabreh IJ, Malhotra A, Kales SN. A review of genetic association studies of obstructive sleep apnea: field synopsis and meta-analysis. *Sleep*. 2011;34(11):1461-8.
9. Gislason T, Johannsson JH, Haraldsson A, Olafsdottir BR, Jonsdottir H, Kong A, et al. Familial Predisposition and Cosegregation Analysis of Adult Obstructive Sleep Apnea and the Sudden Infant Death Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;166(6):833-8.
10. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;44(6):931-8.
11. Chervin RD. Sleepiness, fatigue, tiredness, and lack of energy in obstructive sleep apnea. *Chest*. 2000;118(2):372-9.
12. Collop NA, Tracy SL, Kapur V, Mehra R, Kuhlmann D, Fleishman SA, et al. Obstructive sleep apnea devices for out-of-center (OOC) testing: technology evaluation. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2011;7(5):531-48.
13. Zhi YX, Vena D, Popovic MR, Bradley TD, Yadollahi A. Detecting inspiratory flow limitation with

temporal features of nasal airflow. *Sleep Med.* 2018;48:70-8.

14. Sateia MJ. International Classification of Sleep Disorders-Third Edition. *CHEST.* 2014;146(5):1387-94.

15. Bjornsdottir E, Keenan BT, Eysteinsdottir B, Arnardottir ES, Janson C, Gislason T, et al. Quality of life among untreated sleep apnea patients compared with the general population and changes after treatment with positive airway pressure. *J Sleep Res.* 2015;24(3):328-38.

16. Isidoro SI, Salvaggio A, Lo Bue A, Romano S, Marrone O, Insalaco G. Effect of obstructive sleep apnea diagnosis on health related quality of life. *Health and Quality of Life Outcomes.* 2015;13(1):68.

17. 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.

18. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation.* 2010;122(4):352-60.

19. 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.

20. Roche F, Xuong AN, Court-Fortune I, Costes F, Pichot V, Duverney D, et al. Relationship among the severity of sleep apnea syndrome, cardiac arrhythmias, and autonomic imbalance. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26(3):669-77.
21. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(10):919-31.
22. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2005;352(12):1206-14.
23. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003;7(1):35-51.
24. Qaseem A, Holty JE, Owens DK, Dallas P, Starkey M, Shekelle P. Management of obstructive sleep apnea in adults: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2013;159(7):471-83.
25. 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.
26. 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 Sleep Apnea. *Hypertension*. 2013;62(4):767-74.

27. Costanzo MR, Khayat R, Ponikowski P, Augostini R, Stellbrink C, Mianulli M, et al. Mechanisms and Clinical Consequences of Untreated Central Sleep Apnea in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(1):72-84.
28. Cowie MR, Linz D, Redline S, Somers VK, Simonds AK. Sleep Disordered Breathing and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2021;78(6):608-24.
29. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, et al. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Frontiers in Physiology*. 2013;4.
30. Erickson JR, Joiner M-IA, 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.
31. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(6):H2181-H90.
32. Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *European Respiratory Journal*. 2009;33(6):1467-84.
33. Lebek S, Pichler K, Reuthner K, Trum M, Tafelmeier M, Mustroph J, et al. Enhanced CaMKII-Dependent Late I_{Na} Induces Atrial Proarrhythmic Activity in Patients With Sleep-Disordered Breathing. *Circulation Research*. 2020;126(5):603-15.

34. 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.
35. Bitter T, Langer C, Vogt J, Lange M, Horstkotte D, Oldenburg O. Sleep-disordered breathing in patients with atrial fibrillation and normal systolic left ventricular function. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(10):164-70.
36. 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.
37. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103(5):769-77.
38. Dobrev D, Voigt N, Wehrens XH. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):734-43.
39. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011;121(8):2955-68.
40. Herold G. *Innere Medizin 2020*: De Gruyter; 2020.
41. Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *European Respiratory Journal*. 2013;41(6):1439-51.
42. Morgan BJ, Denahan T, Ebert TJ. Neurocirculatory consequences of negative intrathoracic

pressure vs. asphyxia during voluntary apnea. *Journal of Applied Physiology*. 1993;74(6):2969-75.

43. Cutler MJ, Swift NM, Keller DM, Wasmund WL, Smith ML. Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J Appl Physiol* (1985). 2004;96(2):754-61.

44. Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 2014;114(9):1500-15.

45. Dimitri H, Ng M, Brooks AG, Kuklik P, Stiles MK, Lau DH, et al. Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2012;9(3):321-7.

46. Chami HA, Devereux RB, Gottdiener JS, Mehra R, Roman MJ, Benjamin EJ, et al. Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation*. 2008;117(20):2599-607.

47. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and Molecular Electrophysiology of Atrial Fibrillation Initiation, Maintenance, and Progression. *Circulation Research*. 2014;114(9):1483-99.

48. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J*. 2012;33(15):1870-7.

49. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;1(1):62-73.
50. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2011;89(4):744-53.
51. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011;91(1):265-325.
52. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 1999;44(1):121-31.
53. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 1997;81(4):512-25.
54. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *European Heart Journal.* 2012;33(15):1870-7.
55. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205.
56. Brandes R LF, Schmidt RF. *Physiologie des Menschen.* 32 ed: Springer Berlin, Heidelberg; 2019.
57. Haselgrove JC, Huxley HE. X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament

model in actively contracting skeletal muscle. *J Mol Biol.* 1973;77(4):549-68.

58. Huxley HE. Muscular contraction and cell motility. *Nature.* 1973;243(5408):445-9.

59. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology.* 2008;70(1):23-49.

60. January CT, Moscucci A. Cellular mechanisms of early afterdepolarizations. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;644:23-32.

61. Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner M-I, Gao Z, Chen B, et al. Cav1.2 β -subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(11):4996-5000.

62. Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, et al. Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25560-7.

63. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak and Increased Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2012;125(17):2059-70.

64. Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release causes myocyte depolarization.

Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res.* 2000;87(9):774-80.

65. 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.* 2022;11(2):331.

66. Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*: Springer Netherlands; 2001.

67. Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(1):H249-55.

68. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(12):2131-9.

69. Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(29):22532-6.

70. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245(1):C1-14.

71. Wehrens XHT, Lehnart SE, Marks AR. INTRACELLULAR CALCIUM RELEASE AND CARDIAC DISEASE. *Annual Review of Physiology.* 2005;67(1):69-98.

72. Lebek S, Plöchl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lücht CM, et al. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;118:159-68.
73. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2010;106(6):1134-44.
74. Wehrens XH, 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.
75. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol.* 1985;85(2):247-89.
76. O'Neill SC, Eisner DA. A mechanism for the effects of caffeine on Ca²⁺ release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1990;430:519-36.
77. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(4):468-73.
78. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:417-45.

79. 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.
80. Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol.* 2003;17(2):183-92.
81. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 1989;264(30):17907-12.
82. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1221(1):89-101.
83. Schulman H, Greengard P. Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1978;75(11):5432-6.
84. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 2002;364(Pt 3):593-611.
85. Rokita AG, Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation.* 2012;126(17):2125-39.

86. Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H. Activation of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9497-501.
87. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Science*. 1992;256(5060):1199-202.
88. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, et al. Reactive Oxygen Species-Activated Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II δ ; Is Required for Late I_{Na} Augmentation Leading to Cellular Na and Ca Overload. *Circulation Research*. 2011;108(5):555-65.
89. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):664-75.
90. Khoo MS, Li J, Singh MV, Yang Y, Kannankeril P, Wu Y, et al. Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase II in calcineurin cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;114(13):1352-9.
91. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res*. 2005;97(12):1314-22.
92. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ Overexpression

Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca^{2+} Handling. *Circulation Research*. 2003;92(8):904-11.

93. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^+ channels. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3127-38.

94. 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.

95. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;116(12):1956-70.

96. Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, et al. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;61:111-22.

97. Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, et al. Enhanced late I_{Na} induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII -dependent manner. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;76:94-105.

98. 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.

99. Heijman J, Voigt N, Wehrens XH, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front Pharmacol*. 2014;5:30.
100. Li N, Chiang DY, Wang S, Wang Q, Sun L, Voigt N, et al. Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation*. 2014;129(12):1276-85.
101. Mesubi OO, Anderson ME. Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovasc Res*. 2016;109(4):542-57.
102. Dobrev D, Wehrens XH. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med*. 2010;20(1):30-4.
103. Luo M, Guan X, Luczak ED, Lang D, Kutschke W, Gao Z, et al. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1262-74.
104. Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME. CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev*. 2011;91(3):889-915.
105. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;179(2):158-69.
106. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;168(5):522-30.

107. 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.

108. Simeone KA, Hallgren J, Bockman CS, Aggarwal A, Kansal V, Netzel L, et al. Respiratory dysfunction progresses with age in *Kcna1*-null mice, a model of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia*. 2018;59(2):345-57.

109. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*. 1982;94(2):325-34.

110. Ladilov YV, Siegmund B, Balser C, Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res*. 1997;80(1):69-75.

111. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.

112. Bartolucci ML, Berteotti C, Alvente S, Bastianini S, Guidi S, Lo Martire V, et al. Obstructive sleep apneas naturally occur in mice during REM sleep and are highly prevalent in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis*. 2021;159:105508.

113. Mehra R, Chung MK, Olshansky B, Dobrev D, Jackson CL, Kundel V, et al. Sleep-Disordered Breathing and Cardiac Arrhythmias in Adults: Mechanistic Insights and Clinical Implications: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;146(9):e119-e36.
114. Frost L, Hune LJ, Vestergaard P. Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Med*. 2005;118(5):489-95.
115. Schoonderwoerd BA, Smit MD, Pen L, Van Gelder IC. New risk factors for atrial fibrillation: causes of 'not-so-lone atrial fibrillation'. *Europace*. 2008;10(6):668-73.
116. Schmidleitner C, Arzt M, Tafelmeier M, Ripfel S, Fauser M, Weizenegger T, et al. Sleep-disordered breathing is associated with disturbed cardiac repolarization in patients with a coronary artery bypass graft surgery. *Sleep Med*. 2018;42:13-20.
117. Lebek S, Hegner P, Tafelmeier M, Rupprecht L, Schmid C, Maier LS, et al. Female Patients With Sleep-Disordered Breathing Display More Frequently Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Frontiers in Medicine*. 2021;8.
118. Parati G, Lombardi C, Castagna F, Mattaliano P, Filardi PP, Agostoni P. Heart failure and sleep disorders. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(7):389-403.
119. Oldenburg O, Lamp B, Faber L, Teschler H, Horstkotte D, Töpfer V. Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure: a contemporary

study of prevalence in and characteristics of 700 patients. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(3):251-7.

120. Arzt M, Woehrle H, Oldenburg O, Graml A, Suling A, Erdmann E, et al. Prevalence and Predictors of Sleep-Disordered Breathing in Patients With Stable Chronic Heart Failure: The SchlaHF Registry. *JACC Heart Fail.* 2016;4(2):116-25.

121. 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.

122. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, et al. CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca^{2+} Leak and Elevated Diastolic Ca^{2+} Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation. *Circulation Research.* 2010;106(6):1134-44.

123. Nassal D, Gratz D, Hund TJ. Challenges and Opportunities for Therapeutic Targeting of Calmodulin Kinase II in Heart. *Front Pharmacol.* 2020;11:35.

124. 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.

125. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, et al. Differential Cardiac Remodeling in Preload Versus Afterload. *Circulation.* 2010;122(10):993-1003.

126. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, et al. Tubulin polymerization disrupts cardiac

β -adrenergic regulation of late I_{Na} . *Cardiovasc Res*. 2014;103(1):168-77.

127. Köhler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:92-102.

128. Hegner P, Lebek S, Schaner B, Ofner F, Gugg M, Maier LS, et al. CaMKII-Dependent Contractile Dysfunction and Pro-Arrhythmic Activity in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(2).

129. Anderson ME. Oxidant stress promotes disease by activating CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;89(Pt B):160-7.

130. Hegner P, Lebek S, Tafelmeier M, Camboni D, Schopka S, Schmid C, et al. Sleep-disordered breathing is independently associated with reduced atrial connexin 43 expression. *Heart Rhythm*. 2021;18(12):2187-94.

131. Guo T, Zhang T, Ginsburg KS, Mishra S, Brown JH, Bers DM. CaMKII δ C slows $[Ca]_i$ decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks. *Biophys J*. 2012;102(11):2461-70.

132. Hegner P, Drzymalski M, Biedermann A, Memmel B, Durczok M, Wester M, et al. SAR296968, a Novel Selective Na^+/Ca^{2+} Exchanger Inhibitor, Improves Ca^{2+} Handling and Contractile Function in Human Atrial Cardiomyocytes. *Biomedicines*. 2022;10(8):1932.

133. Schaner B, Lebek S, Hegner P, Maier LS, Arzt M, Wagner S. Increased CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity in a novel mouse model of obstructive sleep

apnoea. European Heart Journal. 2021;42(Supplement_1).

134. Marinheiro R, Parreira L, Amador P, Mesquita D, Farinha J, Fonseca M, et al. Ventricular Arrhythmias in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Curr Cardiol Rev.* 2019;15(1):64-74.

135. Mitler MM, Lund R, Sokolove PG, Pittendrigh CS, Dement WC. Sleep and activity rhythms in mice: A description of circadian patterns and unexpected disruptions in sleep. *Brain Research.* 1977;131(1):129-45.

136. Hegner P, Lebek S, Maier LS, Arzt M, Wagner S. The Effect of Gender and Sex Hormones on Cardiovascular Disease, Heart Failure, Diabetes, and Atrial Fibrillation in Sleep Apnea. *Frontiers in Physiology.* 2021;12.

137. Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(9):1063-77.

138. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2010;31(19):2369-429.

139. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A Contemporary Appraisal of the Heart Failure Epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Internal Medicine.* 2015;175(6):996-1004.

140. Culebras A. Sleep apnea and stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15(1):503.
141. Fein AS, Shvilkin A, Shah D, Haffajee CI, Das S, Kumar K, et al. Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(4):300-5.
142. Neilan TG, Farhad H, Dodson JA, Shah RV, Abbasi SA, Bakker JP, et al. Effect of sleep apnea and continuous positive airway pressure on cardiac structure and recurrence of atrial fibrillation. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000421.
143. De Greef Y, Ströker E, Schwagten B, Kupics K, De Cocker J, Chierchia GB, et al. Complications of pulmonary vein isolation in atrial fibrillation: predictors and comparison between four different ablation techniques: Results from the Middelheim PVI-registry. *Europace.* 2018;20(8):1279-86.
144. Traaen GM, Aakerøy L, Hunt TE, Øverland B, Bendz C, Sande L, 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.
145. 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. *New England Journal of Medicine.* 2015;373(12):1095-105.
146. Schoch OD, Baty F, Niedermann J, Rüdiger JJ, Brutsche MH. Baseline predictors of adherence to positive airway pressure therapy for sleep apnea: a 10-year

single-center observational cohort study. *Respiration*. 2014;87(2):121-8.

147. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2020;42(5):373-498.

148. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2021;42(36):3599-726.

149. Neef S, Mann C, Zwenger A, Dybkova N, Maier LS. Reduction of SR Ca(2+) leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(4):45.

150. Neef S, Steffens A, Pellicena P, Mustroph J, Lebek S, Ort KR, et al. Improvement of cardiomyocyte function by a novel pyrimidine-based CaMKII-inhibitor. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;115:73-81.

151. Grandi E, Dobrev D. Non-ion channel therapeutics for heart failure and atrial fibrillation: Are CaMKII inhibitors

ready for clinical use? *J Mol Cell Cardiol.* 2018;121:300-3.

152. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol.* 2014;5:21.

153. Beauverger P, Ozoux M-L, Bégis G, Glénat V, Briand V, Philippo M-C, et al. Reversion of cardiac dysfunction by a novel orally available calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, RA306, in a genetic model of dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research.* 2019;116(2):329-38.

154. Mustroph J, Drzymalski M, Baier M, Pabel S, Biedermann A, Memmel B, et al. The oral Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor RA608 improves contractile function and prevents arrhythmias in heart failure. *ESC Heart Failure.* 2020;7(5):2871-83.

155. 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.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich über die Jahre bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Wagner für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und für die fachliche Betreuung, der sich für mich viel Zeit zur Besprechung, Entwicklung und Ausarbeitung der Versuche, Ergebnisse und Graphiken nahm.

Auch möchte ich Prof. Dr. Lars Maier, Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Regensburg, für die Möglichkeit diese Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl zu beginnen danken, in dessen Labor ich Ausstattung und Materialien gestellt bekam.

Ebenso möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer Dr. Philipp Hegner für seine Unterstützung und offenen Ohren während der gesamten Zeit bedanken.

Mein großer Dank gilt auch dem Team des Labors, meinen Mitdoktoranten und Studenten für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, die mir allzeit bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders möchte ich mich bei Thomas Sowa und Sebastian Benkhoff bedanken, die mich während des

experimentellen Teils unterstützt haben und mir bei jeglichen technischen Fragestellungen und Problemen Hilfe leisteten.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Zdenek Provaznik für die Bereitstellung des Gutachtens und die mündliche Prüfung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich auch meiner Familie, vor allem meiner Frau und meinen Töchtern, und meinen Freunden danken, die mich während des Studiums und der Zeit der Doktorarbeit bedingungslos unterstützt haben.

In besonderer Dankbarkeit gedenke ich meines Vaters. Auch wenn er den Abschluss dieser Dissertation nicht mehr erleben durfte, ist er in meinen Gedanken immer an meiner Seite gewesen.

Vielen Dank!