

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II

PROF. DR. LARS MAIER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Wirkweise des GLP-1-Agonisten Liraglutid auf die intrazelluläre
Natrium- und Kalziumhomöostase in murinen Kardiomyozyten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Benedikt Zisterer

2026

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Wirkweise des GLP-1-Agonisten Liraglutid auf die intrazelluläre
Natrium- und Kalziumhomöostase in murinen Kardiomyozyten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Zisterer

2026

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

I. Berichterstatter: Prof. Dr. Julian Mustroph

II. Berichterstatter: PD Dr. Zdenek Provaznik

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2026

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Die physiologische, intrazelluläre Herzaktion	7
1.1.1.	Das kardiale Aktionspotenzial	8
1.1.2.	Die elektromechanische Kopplung	10
1.1.3.	Der Querbrückenzyklus	13
1.2.	Herzinsuffizienz	13
1.3.	Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII)	15
1.3.1.	Effekte der CaMKII auf den intrazellulären Kalziumhaushalt	17
1.3.2.	Effekte der CaMKII auf den intrazellulären Natriumhaushalt	18
1.3.3.	Proarrhythmogene Effekte der CaMKII	18
1.4.	Inhibitoren der CaMKII	19
1.5.	CASK	21
1.5.1.	Charakterisierung von CASK	21
1.5.2.	Effekte von CASK	22
1.6.	GLP-1 Rezeptoragonisten	24
1.6.1.	Charakterisierung und Verwendung von Liraglutid	25
1.6.2.	Klinische und experimentelle Studien	26
1.7.	Hypothesen und Zielsetzung dieser Arbeit	30
2.	Material und Methoden	32
2.1.	Mausmodelle und Zellisolation	32
2.1.1.	Mausmodelle	32
2.1.2.	Isolation	34
2.2.	Patch-Clamp-Technik	36
2.2.1.	Methode	36
2.2.2.	Aufbau und Ablauf der Messung	38
2.2.3.	Auswertung der Patch-Clamp Messungen	43
2.3.	Epifluoreszenzmikroskopie	44
2.3.1.	Ablauf und Messprotokoll bei murinen Kardiomyozyten	46
2.3.2.	Auswertung der Epifluoreszenzmessungen	49
2.4.	Statistik	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Liraglutid inhibiert den durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten proarrhythmogenen späten Natriumstrom	50

3.2.	Liraglutid inhibiert den durch beta-adrenerger Stimulation induzierten proarrhythmogenen späten Natriumstrom.....	51
3.3.	Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird über CASK vermittelt.....	53
3.4.	Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird nicht über die Proteinkinase A vermittelt.....	56
3.5.	Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird über den GLP-1 Rezeptor vermittelt.....	60
3.6.	Liraglutid zeigt keinen Effekt auf das Kalzium-Handling sowie die Sarkomerlängenverkürzung unter β -adrenerger-Stimulation in murinen Kardiomyozyten.....	61
3.7.	CASK hat keinen Effekt auf das Kalzium-Handling der murinen Kardiomyozyten.....	64
4.	Diskussion.....	70
4.1.	Klinische Konzentration von Liraglutid.....	70
4.2.	Liraglutid hat einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten späten Natriumstrom.....	71
4.3.	CASK vermittelt einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten späten Natriumstrom.....	73
4.4.	Liraglutid fördert die Erholung des gestörten Kalzium-Handlings in gestressten Kardiomyozyten	74
4.5.	Die Wirkung von CASK auf das intrazelluläre Kalzium-Handling bleibt Gegenstand weiterer Forschung	76
4.6.	Ausblick.....	78
5.	Zusammenfassung	79
6.	Formelverzeichnis	80
7.	Tabellenverzeichnis.....	80
8.	Abbildungsverzeichnis.....	80
9.	Literaturverzeichnis.....	83
10.	Eidesstattliche Erklärung	93

1. Einleitung

Mit einer Prävalenz von 1,7% in Europa gehört die Herzinsuffizienz nach wie vor zu den bedeutendsten Krankheiten Europas und Nordamerikas (Seferović et al. 2021). Trotz stagnierender Inzidenz über die letzten Jahre wächst die Prävalenz aufgrund von besseren Behandlungsmöglichkeiten und einer höheren Lebenserwartung (Savarese et al. 2023). Jedoch bildet die Herzinsuffizienz mit 1-2% aller Einweisungen nach wie vor den Haupteinweisungsgrund der über 65-jährigen Patienten in Krankenhäuser der westlichen Welt (Savarese et al. 2023). Auch die 1-Jahres Mortalität in Europa und Nordamerika verbleibt mit 23,6% für die akute Herzinsuffizienz und 6,4% für die chronische Herzinsuffizienz sehr hoch (Savarese et al. 2023).

Aufgrund der hohen Belastung für die Gesundheitssysteme war in den letzten Jahren ein hohes Innovationspotential bei der Erforschung von Pathophysiologie und Therapie der Herzinsuffizienz zu beobachten. Dies zeigte sich zuletzt auch durch die Anpassung der Leitlinie der chronischen Herzinsuffizienz durch Hinzunehmen eines SGLT2-Inhibitors bei persistierenden Beschwerden (McDonagh et al. 2021).

Eine neue Substanzklasse mit therapeutischem Potential bei Herzinsuffizienz bilden zudem die Inkretinmimetika oder GLP-1 Analoga wie Semaglutid, Exenatid oder das in dieser Arbeit untersuchte Liraglutid. Klinische Studien wie die LEADER Studie (Marso et al. 2016b) oder die SUSTAIN-6 Studie (Marso et al. 2016a) konnten ein vermindertes Auftreten von kardiovaskulärem Tod, nicht tödlichen Herzinfarkten, sowie nicht tödlichen Schlaganfällen bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus unter Gabe von Inkretinmimetika zeigen. Ebenfalls bemerkenswert ist die nachgewiesene Reduktion von klinischer Symptomatik und verbesserter Lebensqualität durch Semaglutid bei Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion mit und ohne der Begleitdiagnose Diabetes mellitus Typ 2 durch die STEP HFpEF (Kosiborod et al. 2023) bzw. die STEP HFpEF DM Studie (Kosiborod et al. 2024). Zu beachten ist jedoch, dass vorausgegangene Studien keinen Effekt der GLP-1 Analoga auf die Hospitalisierungsrate und die klinischen Symptome (Margulies et al. 2016) sowie die systolische Funktion bei Patienten mit bereits eingeschränkter Ejektionsfraktion aufweisen konnten (Jorsal et al. 2017). Die genaue Wirkweise dieser Substanzklasse auf die kardiovaskuläre Funktion bei Herzinsuffizienzpatienten bleibt somit weiterhin unklar.

Jedoch konnten grundlagenwissenschaftliche Studien bereits mögliche pathophysiologischen Wege der Herzinsuffizienzentstehung, sowie Wirkmechanismen der GLP-1 Analoga in Kardiomyozyten aufzeigen.

Die Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) scheint hierbei eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz zu spielen. Dabei phosphoryliert die CaMKII verschiedene Ionenkanäle und intrazelluläre Proteine und greift somit maßgeblich in die Ionen-Homöostase der Kardiomyozyten ein (Rokita et al. 2011). Die Inhibition der CaMKII steht somit im Fokus der Herzinsuffizienzforschung. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die im humanen Kardiomyozyten physiologisch vorkommende Kinase CASK („Calcium/Calmodulin dependent serine protein kinase“) eine inhibitorische Wirkung auf die CaMKII aufweisen kann (Mustroph et al. 2021). Somit gilt CASK als mögliches neuartiges Target für zukünftige Herzinsuffizienz Medikamente. Zhu et al. konnten 2014 zeigen, dass sich durch GLP-1 Analoga wie Exenatid die CASK-Expression in Pankreaszellen steigern lässt (Zhu et al. 2014). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte durch Exenatid eine gesteigerte CASK Expression in murinen Kardiomyozyten nachweisen (Mustroph et al. 2021). Zudem konnte ein positiver Effekt von Exenatid auf das diastolische Kalzium-Leck aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und eine gesteigerte Kalzium-Konzentration im SR in murinen Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Mustroph et al. 2021). Neuste Daten zeigen einen ebenfalls positiven Effekt von Semaglutid auf den späten Natriumstrom, das diastolische Kalzium-Leck und die Kalzium-Transienten-Amplitude auch in humanem kardialen Gewebe (Krammer et al. 2025). Diese Daten bieten einen Erklärungsansatz der klinischen Studien wie der LEADER Studie (Marso et al. 2016b) oder der STEP HFpEF Studien (Kosiborod et al. 2023) auf intrazellulärer Ebene.

Inwiefern Liraglutid ähnliche Effekte wie Semaglutid (Krammer et al. 2025) auf die intrazelluläre Natrium- und Kalziumhomöostase in murinen Kardiomyozyten aufzeigt und wie dieser Effekt vermittelt ist, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1. Die physiologische, intrazelluläre Herzaktion

Zum Verständnis pathologischer Veränderungen sind Kenntnisse über die Morphologie der Kardiomyozyten und die physiologischen intrazellulären Abläufe unabdingbar.

Der Herzmuskel zählt wie die Skelettmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Für die Namensgebung typisch ist die durch unterschiedliche Lichtbrechung entstehende Querstreifung in der lichtmikroskopischen Aufsicht, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die klassische Morphologie ergibt sich durch eine wechselnde Abfolge von isotropen („I“) und anisotropen („A“) Banden, welche ein sichtbares Korrelat von solitären Aktinfilamenten (I-Bande) und Überlagerung mit Myosinfilamenten (A-Bande) darstellt (Bowden 1966).

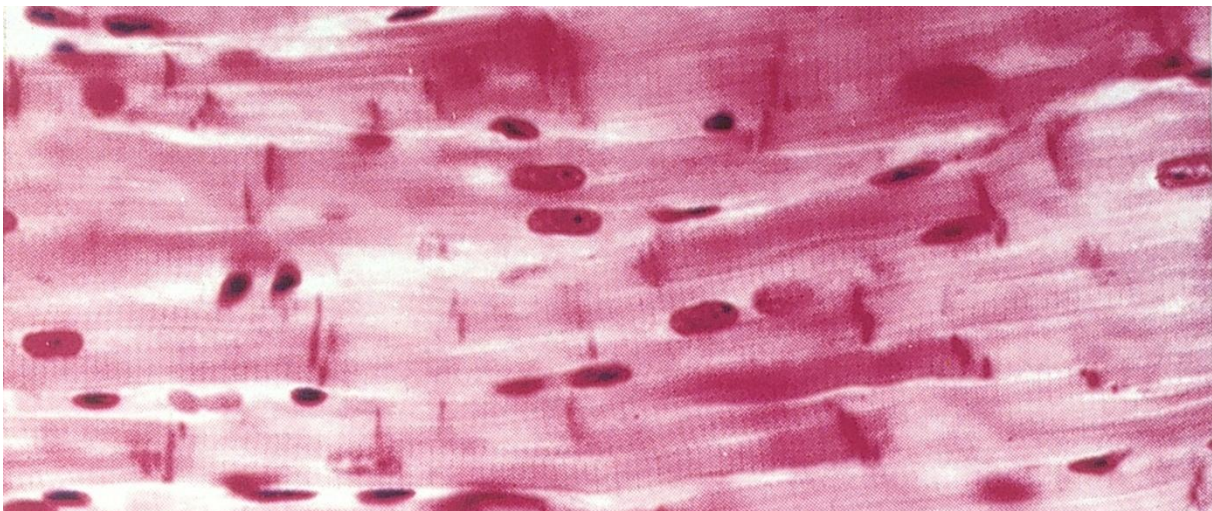


Abbildung 1: Quergestreifte Herzmuskulatur; Mit freundlicher Genehmigung aus HistologyGuide.org, T. Clark Brelje and Robert L. Sorenson, University of Minnesota, Minneapolis, MN

Die Anordnung wird auf beiden Seiten über Z-Scheiben begrenzt, wodurch sich die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften Muskulatur ergibt: das Sarkomer. Die durch A.F. Huxley postulierte Gleitfilamenttheorie beschreibt ein Entlangwandern der Myosinköpfchen entlang der Aktinfilamente während einer Kontraktion (Huxley 2004). Der beschriebene Prozess kann nur unter Anwesenheit von Kalzium stattfinden und ist sehr energieaufwändig (Bers 2002). Die genaue Funktion des Kalziums wird im Kapitel „Der Querbrückenzyklus“ genauer beschrieben.

Die morphologische Grundeinheit der Herzaktion bildet ein Kardiomyozyt. Kardiomyozyten sind über Glanzstreifen mechanisch und elektrisch miteinander

verbunden und bilden funktionale Synzytien (Nielsen et al. 2023). Glanzstreifen zeichnen sich vor allem über Desmosomen und Gap junctions aus. Desmosomen bilden dabei einen mechanischen Zusammenhalt, wohingegen Gap junctions eine chemische und elektrische Kommunikation gewährleisten (Nielsen et al. 2023). Über die Gap junctions können Aktionspotenziale schnell übertragen werden, wodurch eine synchrone Herzaktion gewährleistet wird (Nielsen et al. 2023). Kardiomyozyten werden von einer Zellmembran, dem Sarkolemm, umschlossen. Das Sarkolemm bildet dabei Einstülpungen in definierten Abständen, die so genannten T-Tubuli (Fawcett und McNutt 1969). Die T-Tubuli bilden Diaden mit den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches sich als longitudinales System im Herzen präsentiert (Bass und McGuigan 1975). Das SR speichert bei Säugetieren mit einem Anteil von 60%-95% den Großteil des intrazellulär gespeicherten Kalziums (Haverinen und Vornanen 2009). Die räumliche Nähe zwischen T-Tubuli und terminalen Zisternen bildet die Grundlage für die erforderliche massive Kalzium Freisetzung aus dem SR, welche für eine Kontraktion benötigt wird. Durch die gegebene Nähe kann ein an der motorischen Endplatte eintreffendes Aktionspotenzial innerhalb kürzester Zeit zu einem erheblichen Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration führen. Die motorische Endplatte beschreibt hierbei eine Synapse zwischen Axon eines Motorneurons und dem Sarkolemm eines Myozyten (Rudolf et al. 2019).

1.1.1. Das kardiale Aktionspotenzial

Das kardiale Aktionspotenzial dient der Freisetzung von Kalzium aus dem SR in das Zytosol. Es unterscheidet sich von Aktionspotenzialen in Nervenzellen oder Skelettmuskelzellen durch die sogenannte Plateauphase. Diese Phase führt einerseits zu einer größeren Kalziumfreisetzung in das Zytosol, andererseits verhindert die verlängerte absolute Refraktärzeit eine Tetanie des Herzmuskels. Eine Tetanie des Herzmuskels hätte einen Stillstand des Blutflusses zur Folge (Varró et al. 2021). Das kardiale Aktionspotenzial zeichnet sich über den in Abbildung 2 dargestellten Verlauf mit typischer Dauer zwischen 250-400 ms aus. Das Ruhemembranpotenzial im Arbeitsmyokard wird maßgeblich durch die hohe Permeabilität des Sarkolemm für Kalium bestimmt (Whalley et al. 1995).

Das Ruhemembranpotenzial für Kalium lässt sich mit der intrazellulären Kalium-Konzentration von 4,5 mM und der extrazellulären Kalium-Konzentration von 135 mM mithilfe der Nernst-Gleichung (Formel 1) berechnen (Whalley et al. 1995). Somit ergibt sich ein Ruhemembranpotenzial für Kalium von -91 mV.

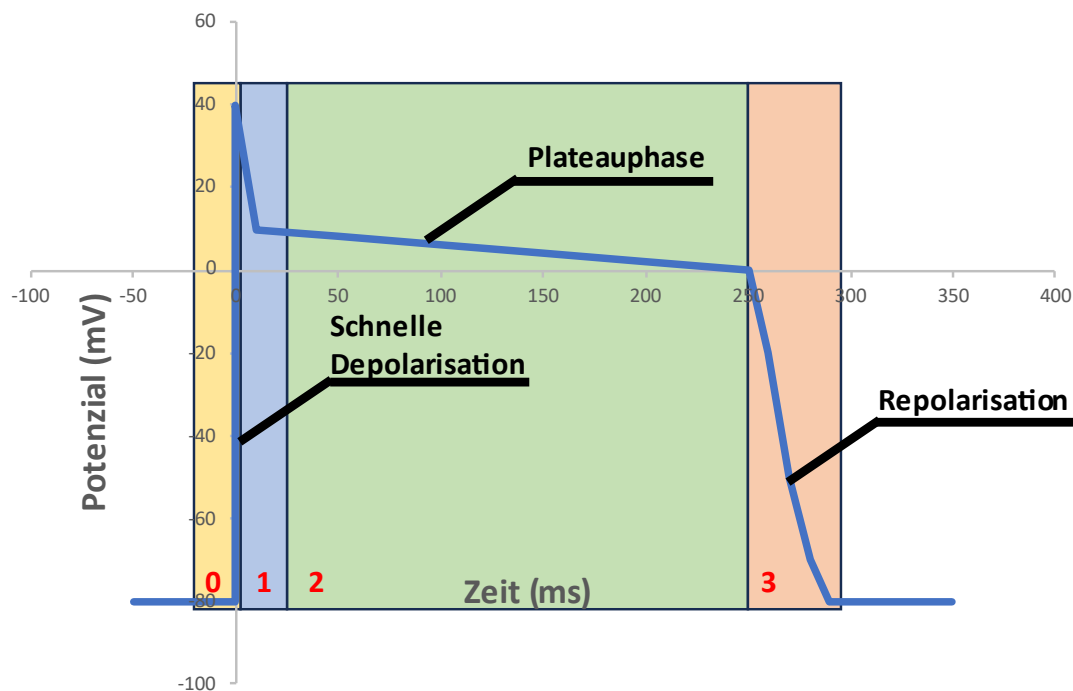


Abbildung 2: Schematische Darstellung des kardialen Aktionspotenzials, untergliedert in 4 Phasen. Eigene Abbildung nach (Kurtz et al. 2014).

Durch kleinere Leck-Ströme sowie durch den Natrium-Kalzium-Austauscher am Sarkolemm (NCX) kommt es zu einer minimalen Depolarisation des Ruhemembranpotenzials des Arbeitsmyokards auf ca. -80 mV. Der Ionengradient wird hierbei größtenteils durch die Natrium/Kalium-ATPase aufrechterhalten (Whalley et al. 1995).

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

Formel 1: Nernst-Gleichung; E_K : Ruhemembranpotenzial Kalium; R : universelle Gaskonstante; T : absolute Temperatur; z : Äquivalentzahl; F : Faraday Konstante; $[K^+]_o$: extrazelluläre Kalium-Konzentration; $[K^+]_i$: intrazelluläre Kalium-Konzentration

Das Ruhemembranpotenzial wird zudem von gleichrichtenden Kalium-Kanälen stabilisiert. Diese Kanäle gehören der Kir2 Familie an (Kir=K⁺-inward-rectifier) (Reilly und Eckhardt 2021). Bei leichter Depolarisation leiten diese Kanäle Kalium

kompensatorisch nach extrazellulär und stabilisieren so das negative Membranpotenzial (Reilly und Eckhardt 2021).

Das kardiale Aktionspotenzial lässt sich in 4 Phasen gliedern. Phase 0 ist die schnelle Depolarisation durch einen Natrium-Einstrom mit einer Verschiebung des Membranpotenzials auf +30 bis +40mV (Varró et al. 2021). Der Natrium-Einstrom wird durch spannungsgesteuerte schnelle Natrium-Kanäle wie dem $\text{Nav}1.5$ vermittelt (Varró et al. 2021). Phase 1 ist anschließend durch eine kurze, schnelle Repolarisation charakterisiert. Vermittelt wird diese Phase vor allem über einen Kalium-Ausstrom über $\text{K}_v4.3$ und $\text{K}_v4.2$. Phase 2 zeigt die Plateauphase, welche charakteristisch für das kardiale Aktionspotenzial ist. Dargestellt wird das Plateau über die spannungsgesteuerten L-Typ-Kalzium-Kanäle (LTCC). Der langsame Kalzium-Einstrom wirkt der unter Phase 1 beschriebenen Repolarisation entgegen, sodass das Membranpotenzial auf etwa 0 mV konstant gehalten wird (Varró et al. 2021). Die abschließende Phase 3 bildet die große Repolarisation in Richtung diastolisches Ruhemembranpotenzial, welche über einen vermehrten Kalium-Efflux und einen verminderten Kalzium-Influx vermittelt wird (Varró et al. 2021).

1.1.2. Die elektromechanische Kopplung

Das kardiale Aktionspotenzial löst eine Reihe von intrazellulären Mechanismen aus, die zu einer massiven Freisetzung von Kalzium führen und somit zur Kontraktion des Myokards. Diese Verbindung zwischen eintreffendem Aktionspotenzial und anschließender Freisetzung von Kalzium aus dem SR, welches dann eine Kontraktion auslöst, wird elektromechanische Kopplung genannt. Die Kalzium-Ionen spielen hierbei eine Schlüsselrolle der Myokardkontraktion. Es konnte gezeigt werden, dass in Kalzium-freien Nährmedien zwar Aktionspotenziale ausgelöst werden können, diese aber zu keiner Kontraktion führen (Mines 1913). Dabei kommt es während eines Kontraktionszyklus zu wechselhaften intrazellulären Kalzium-Konzentrationen. In ruhenden Kardiomyozyten beträgt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration lediglich etwa 10^{-7} mol/L und steigt bei Erregung kurzzeitig bis auf das 15-fache an (Bers 2002). Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Mechanismen für die zyklischen Veränderungen der zytosolischen Kalzium-Konzentration. Ein eintreffendes Aktionspotenzial führt zur Depolarisation des Sarkolemm und dadurch zu einer Öffnung von L-Typ-Kalzium-

Kanälen (Dihydropyridinrezeptoren, DHPR; LTCC) (Bers 2002). Die Öffnung führt zu einem Einstrom von Kalzium entlang des Konzentrationsgefälles in das Zellinnere. Die L-Typ-Kalzium-Kanäle sind in den T-Tubuli lokalisiert. Durch die räumliche Nähe zu den terminalen Zisternen des SR kommt es anschließend zu einer Kalzium-abhängigen Kalzium-Freisetzung aus dem SR. Vermittelt wird dies über Ryanodinrezeptoren (RyR2) (Bers 2002). Durch die große Menge an gespeichertem Kalzium im SR kommt es zu einer massiven Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration. Das Kalzium bindet an Troponin C und löst so den Querbrückenzyklus aus (s.1.1.3).

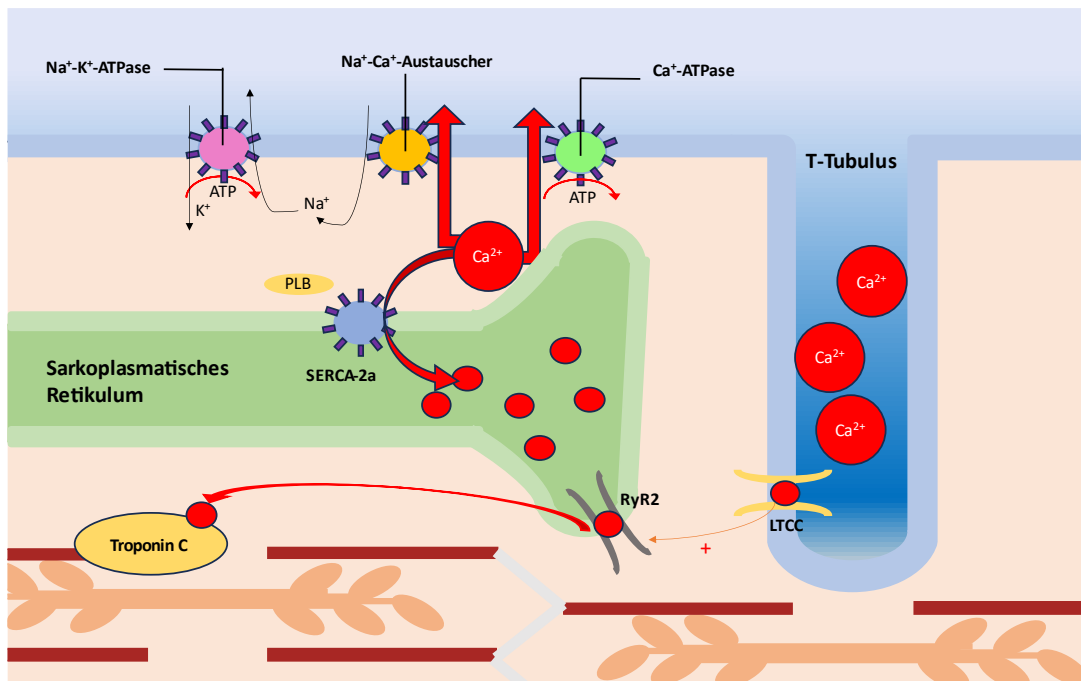


Abbildung 3: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung. Eigene Abbildung nach (Behrends 2012)

Die Senkung des zytosolischen Kalziums geschieht anschließend vor allem über drei verschiedene Mechanismen. Etwa 70% der zytosolischen Kalziumionen werden über die SERCA2a (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calciumtransporting ATPase) aktiv zurück in das SR gepumpt (Rokita et al. 2011). Die Aktivität der SERCA2a wird dabei über das Protein Phospholamban reguliert (Rokita et al. 2011). Phospholamban liegt wie die SERCA2a in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulus. In seiner nicht phosphorylierten Form senkt Phospholamban die Affinität der SERCA2a zu Kalzium. Hierbei fungiert Phospholamban als allosterischer Inhibitor. Die SERCA2a liegt in zwei unterschiedlichen Konformitäten vor. Die E1 Konformität hat eine hohe Affinität zu Kalzium-Ionen und dient der Bindung von Kalzium auf der Zytosolseite

(MacLennan und Kranias 2003). Die E2 Konformität hat eine niedrige Affinität zu Kalzium-Ionen und dient der Freisetzung von Kalzium in das Lumen des SR. Phospholamban destabilisiert die E1-Konformation und führt somit zu einem häufigeren Vorliegen der E2-Konformation, welche eine geringere Affinität zu Kalzium aufweist. Phospholamban wird selbst über Phosphorylierung an den Stellen Ser16 und Thr17 reguliert (MacLennan und Kranias 2003). Ser16 wird dabei durch die Proteinkinase A und Thr17 durch die Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinase (CAMK) phosphoryliert (Frank und Kranias 2000). Die Aktivität beider Kinasen gilt als typische Antwort auf ein benötigtes erhöhtes Herzzeitvolumen im Sinne einer „fight or flight“ Reaktion. Sowohl die Phosphorylierung an Ser16, als auch an Thr17 führen zu einer Aufhebung der Bindung zwischen Phospholamban und der SERCA2a und somit zu einer Aufhebung der Inhibition der SERCA2a durch Phospholamban (MacLennan und Kranias 2003). Die Phosphorylierung von Phospholamban wirkt somit positiv lusitrop und über die folgende erhöhte Kalzium-Konzentration im SR auch positiv inotrop für den folgenden Herzzyklus.

Der zweitbedeutsamste Transportprozess der Elimination von Kalzium verläuft über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Dieser eliminiert etwa 28% des zytosolischen Kalziums (Rokita et al. 2011). Der Transporter benutzt dabei den über die Natrium/Kalium-ATPase aufgebauten Natriumgradienten als Transporttreiber (Conway und Koushik 2001). Im Physiologischen kommt es so zu einem Natrium-Influx und einem Kalzium-Efflux (Conway und Koushik 2001). Der NCX arbeitet dabei elektrogen, indem er 3 Natriumionen nach intrazellulär und ein Kalziumion nach extrazellulär pumpt. Die verbliebenen 2% des zytosolischen Kalziums werden über langsame Wege, wie die Aufnahme in Mitochondrien oder über den aktiven Transport der sarkolemmalen Kalzium Pumpe, eliminiert (Rokita et al. 2011).

Die beschriebenen Mechanismen zwischen eintreffendem Aktionspotenzial und anschließender massiver Kalzium-Freisetzung aus dem SR in das Zytosol führen abschließend über den Querbrückenzyklus zu einer Kontraktion der Herzmuskelzelle.

1.1.3. Der Querbrückenzyklus

Der Querbrückenzyklus, als Grundlage der von Huxley postulierten Gleitfilamenttheorie, beschreibt den intrazellulären Mechanismus, der zu einer Verkürzung der Sarkomere und so zur Kontraktion eines Muskels führt. Das aus dem SR freigesetzte Kalzium bindet an Troponin-C, was zu einer Konformationsänderung des Troponins führt (Squire 2019). Die Konformationsänderung des Troponins führt anschließend zu einer Verdrängung des Tropomyosins von der Myosin-Bindungsstelle am Aktinfilament. Durch die Bindung des Myosinköpfchens an das Aktinfilament entsteht das Aktomyosin. Das Abkippen des Myosinköpfchens wird durch Hydrolyse des am Myosin gebundenen ATPs gewährleistet (Squire 2019). Der funktionelle Kraftschlag wird dabei einerseits durch die Freigabe vom abgespaltenen Phosphat (1. größerer Teil des Kraftschlags) und andererseits durch Lösen des verbliebenen ADP (2. kleinerer Teil des Kraftschlags) initiiert. Ohne erneute ATP-Bindung verbleibt das Aktomyosin im sogenannten Rigor-Status (Squire 2019). Bei ausreichender Verfügbarkeit von ATP löst die Bindung von ATP an Myosin die Myosin-Aktinfilament-Verbindung auf und der Querbrückenzyklus kann erneut durchlaufen werden.

Die beschriebenen Abläufe führen zu einer Kontraktion des Herzmuskels. Die Kontraktionskraft des Herzmuskels kann dabei durch Mechanismen, wie den Frank-Starling Mechanismus oder durch sympathikotone Stimulation beeinflusst werden. Die sympathikotone Anpassung wird dabei intrazellulär maßgeblich durch die Proteinkinase A und Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinasen (CAMK) vermittelt. Die CAMKII spielt dabei auch eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz.

1.2. Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz beschreibt einen Zustand des Herzens, bei dem das Herz aufgrund unterschiedlicher Ursachen kein ausreichend hohes Herzzeitvolumen mehr erzeugen kann, um den Körper mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Liu et al. 2015). Hauptursache ist in Industrienationen meist eine koronare Herzkrankheit, sowie arterieller Hypertonus, jedoch können auch

Herzklappenerkrankungen, akute Ischämien oder Infektionen zu einer Schwäche des Herzmuskels führen (McDonagh et al. 2021). Neben der ursächlichen Klassifikation lässt sich die Herzinsuffizienz auch nach linksventrikulärer Ejektionsfraktion, nach subjektiven Beschwerden mithilfe der NYHA-Klassifikation oder nach Verlauf (akut vs. chronisch) unterteilen. Bei einer Unterteilung nach Ejektionsfraktion wird die Herzinsuffizienz in eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (Heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF), bei der noch eine Ejektionsfraktion über 50% besteht, und eine Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (Heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF) unterschieden, wobei bei letzterem eine Ejektionsfraktion von unter 40% besteht (McDonagh et al. 2021). Die HFpEF zeichnet sich dabei durch ähnliche Symptome der Herzinsuffizienz sowie objektivierbare Zeichen der funktionalen oder strukturellen Herzschwäche aus. Unter den objektivierbaren Zeichen zählen dabei eine diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels oder ein erhöhter linksventrikulärer Füllungsdruck sowie eine Erhöhung des NT-proBNP. Die Therapien dieser beiden Entitäten unterscheiden sich dabei maßgeblich. Die dritte Entität bildet die HFmrEF (Heart failure with mildly reduced ejection fraction) mit einer geringgradig reduzierten Ejektionsfraktion zwischen 41% und 49%. Retrospektive Studien deuten darauf hin, dass Patienten mit HFmrEF in ähnlicher Weise von den für HFrEF etablierten Therapien profitieren (McDonagh et al. 2021).

Durch die bereits beschriebenen Ursachen können Volumen- oder Druckbelastungen für das Herz entstehen. Durch eine anhaltende Volumenbelastung (Vorlast) kommt es zu einer Dehnung des Myokards mit schlechterer Überlagerung der Aktin- und Myosinfilamente, was folgend zu einer Abnahme der Kontraktilität führt. Eine anhaltende Druckbelastung (Nachlast), wie bei einer arteriellen Hypertonie, führt ebenfalls zu einer Verminderung des Schlagvolumens. Eine initiale Veränderung der Vor- oder Nachlast kann über den Frank-Starling Mechanismus des Myokards zunächst kompensiert werden (Sequeira und van der Velden 2015). Auch eine länger anhaltende Veränderung führt meist zunächst lediglich zu einer asymptomatischen, kompensierten Herzinsuffizienz (NYHA I) (Rokita et al. 2011). Die Kompensation ist v.a. durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), sowie einer verstärkten sympathoadrenergen Stimulation zu erklären (Swedberg et al. 1990). Noch während des Kompensationsstadiums kommt es jedoch zu einem

linksventrikulären Remodeling des Myokards. Durch zelluläre Hypertrophiekaskaden kommt es zu einem progredienten Verlust von Kardiomyozyten durch Nekrose und Apoptose. Der Defekt wird anschließend durch eine zunehmende Fibrosierung und Dilatation des Herzens gedeckt (Rokita et al. 2011). Außerdem konnte eine Abnahme der β -Adrenozeptoren beobachtet werden, was wiederum im Sinne eines Circulus vitiosus die neurohumorale Kompensationskaskade aktiviert und zu einer progredienten Herzinsuffizienz leitet (Fowler et al. 1986). Durch die nicht mehr aufrecht zu erhaltende Kompensation wird die Herzinsuffizienz symptomatisch mit den typischen Symptomen der Luftnot, verminderter Belastbarkeit sowie Lungen- und/ oder Beinödeme.

Die beschriebenen Anpassungen zeigen auch auf zellulärer Ebene ein pathophysiologisches Korrelat. Die Veränderungen schlagen sich hierbei vor allem in der elektromechanischen Kopplung sowie im Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten nieder (Luo und Anderson 2013). Insbesondere der Kalzium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II δ (CaMKII δ) wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zugesprochen (Zhang und Brown 2004).

1.3. Kalzium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII)

Die CaMKII ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, welche in verschiedenen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert wird (Maier und Bers 2007). CaMKII δ ist dabei die relevanteste Isoform im kardialen Gewebe (Maier et al. 2003). Die Delta-Variante kann zudem in eine CaMKII δ_c Isoform unterteilt werden, welche im Zytosol verbleibt, und eine CaMKII δ_B , welche in den Nucleus wandern kann (Maier et al. 2003). CaMKII-Monomere lagern sich zu zwölfteligen Holoenzymen, bestehend aus zwei Sechsringen zusammen (Rellos et al. 2010). Ein Monomer besteht dabei aus 3 Untereinheiten: einer N-terminalen katalytischen Untereinheit, welche ATP und Substrate binden und phosphorylieren kann, einer autoinhibitorischen/regulatorischen Untereinheit, an welcher auch der Kalzium/Calmodulin-Komplex bindet, und einer C-terminalen Untereinheit, welche die Verbindung zu den anderen Monomeren zum Holoenzym initiiert (Rellos et al. 2010).

Im nativen Zustand ist die CaMKII durch die autoregulatorische Untereinheit inhibiert (Rellos et al. 2010). Nach Bindung vom Kalzium/Calmodulin-Komplex an Threonin 206/207 wechselt die CaMKII in den aktivierten Zustand (Hudmon und Schulman 2002). Zudem führt die Bindung von Kalzium/Calmodulin an einem Monomer auch zu einer höheren Bindungsaffinität der anderen Monomere zum Kalzium/Calmodulin-Komplex (Johnson et al. 2014). Die Bindung von Kalzium/Calmodulin führt außerdem zu einem „stretch“ der CaMKII zwischen der regulatorischen und der katalytischen Untereinheit (Rellos et al. 2010) (Abbildung 4). Dies führt einerseits dazu, dass an der katalytischen Untereinheit Substrate gebunden werden können und unter Verfügbarkeit von ATP phosphoryliert werden (Hudmon und Schulman 2002). Andererseits führt das Auseinanderziehen der Untereinheiten zu einer Autophosphorylierung zwischen den einzelnen Monomeren an Threonin 287 der regulatorischen Domäne (Rellos et al. 2010). Die Autophosphorylierung führt dann erneut zu einer um den Faktor 1000 erhöhten Bindungsaffinität für den Kalzium/Calmodulin-Komplex (Hudmon und Schulman 2002). Solange Threonin 287 phosphoryliert bleibt, führt dies zu einer autonomen Aktivierung der CaMKII, auch in Abwesenheit von Kalzium/Calmodulin (Maier und Bers 2002). Die Phosphorylierung von Threonin 287 führt sogar zur Verhinderung einer erneuten Kalzium/Calmodulin Bindung über eine Phosphorylierung von Threonin 305/306 und schützt so vor einer exzessiven CaMKII Aktivierung (Rellos et al. 2010).

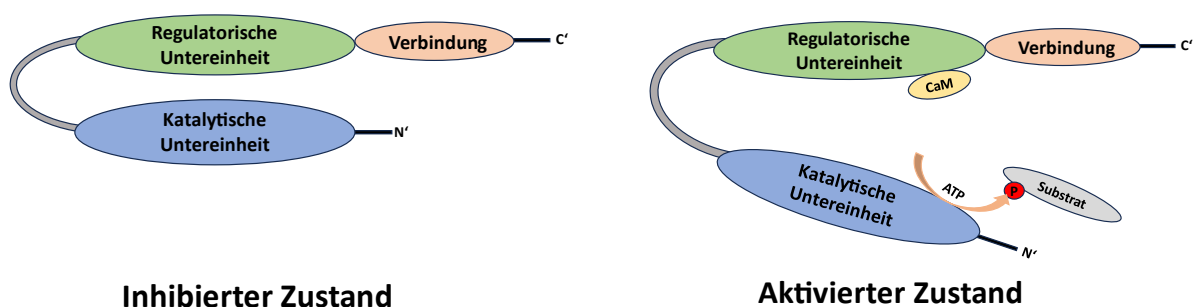


Abbildung 4: Schematische Darstellung der CaMKII. Links: Inaktiver Zustand; Rechts: Aktivierter Zustand mit der Fähigkeit andere Substrate zu phosphorylieren. Eigene Abbildung nach Erickson 2014.

Nach initialer Aktivierung der CaMKII durch Kalzium/Calmodulin kann die CaMKII auch über verschiedene andere Wege in einen autonomen Aktivitätszustand gebracht werden. Dies kann durch O-Glykosylierung an Serin 279 (Erickson et al. 2013) und

durch Oxidation an Methionin 281/282 geschehen (Erickson et al. 2008). Ein weiterer Weg der Aktivierung der CaMKII scheint über eine Erhöhung von cAMP und einer damit einhergehenden Aktivierung von sogenannten Epac („exchange protein directly activated by cAMP“) abzulaufen (Ruiz-Hurtado et al. 2013).

Die aktivierte CaMKII phosphoryliert verschiedene Kanäle und Transporter des Kardiomyozyten und greift so intensiv in die intrazelluläre Ionen-Homöostase ein (s. 1.3.1 und 1.3.2). Im gesunden Myokard scheinen diese Anpassungen eine physiologische Adaption des Myokards an Belastung im Sinne einer „fight or flight“ Reaktion darzustellen. Im pathologischen Myokard ist die CaMKII jedoch chronisch im aktivierten Zustand und zeigt dabei einen massiven Einfluss auf den intrazellulären Kalzium- und Natriumhaushalt, welches sich negativ inotrop und proarrhythmogen auf die kardiale Leistung auswirkt (Bers und Morotti 2014).

1.3.1. Effekte der CaMKII auf den intrazellulären Kalziumhaushalt

Die größten Effekte der CaMKII auf den intrazellulären Kalziumhaushalt werden über Phosphorylierungen des L-Typ-Kalzium-Kanals (LTCC), des Ryanodinrezeptors 2 (RyR2) und Phospholamban (PLB) vermittelt. Diese Effekte führen langfristig zu einer Depletion des Kalziums aus dem SR und somit zu einer systolischen Kontraktionsstörung.

Durch Phosphorylierung des LTCC durch die CaMKII kommt es zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und somit zu einem erhöhten Kalzium-Einstrom in die Zelle (Lee et al. 2006). Dieser Effekt scheint jedoch eher gering ausgeprägt zu sein und besitzt dadurch auch eine untergeordnete Rolle in der vermehrten Kalzium Freisetzung aus dem SR (Maier et al. 2003).

Die Phosphorylierung des RyR2 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Dobrev und Wehrens 2014). Zudem kann die übermäßige Phosphorylierung zu einem sogenannten diastolischen Kalzium-Leck führen, was einen Verlust von Kalzium aus dem SR zur Folge hat (Maier et al. 2003).

Über die Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17 kommt es zu einer Abnahme der Hemmung der SERCA2a, also zu einer vermehrten SERCA2a-Aktivität (Bluhm et al. 2000). Dies führt zu einem positiven lusitropen Effekt im Myokard.

Die Aktivitätszunahme der SERCA2a sollte theoretisch das verloren gegangene Kalzium wieder zurück in das SR transportieren. Im pathologischen Zustand der Herzinsuffizienz werden jedoch diverse Proteine wie die SERCA2a oder der RyR2 vermindert exprimiert (Maier et al. 2003). Zudem kommt es zu einer vermehrten Expression des NCX (Maier et al. 2003). Die beschriebenen Effekte führen so zu einem Kalzium-Verlust des Kardiomyozyten aus dem SR nach extrazellulär, was folgend in einer systolischen Kontraktionsminderung mündet.

1.3.2. Effekte der CaMKII auf den intrazellulären Natriumhaushalt

Pieske et al. beschrieben bereits 2002 eine intrazelluläre Erhöhung des Natriums im insuffizienten Gewebe (Pieske et al. 2002). Die CaMKII phosphoryliert dabei den spannungsabhängigen Natriumkanal Nav1.5 und führt so zu einer Erhöhung des sogenannten späten Natriumstroms (late I_{Na}). Der späte Natriumstrom ist ein persistierender Natrium-Einstrom während der gesamten Aktionspotenzialdauer. Während der late I_{Na} im gesunden Myokard nur lediglich 1% des gesamten Natriumstroms ausmacht, kann dieser im erkrankten Myokard bis auf einen Anteil von etwa 5% gesteigert werden und so zu einer erheblichen intrazellulären Natrium-Akkumulation führen (Rokita et al. 2011). Durch die erhöhte zytosolische Natrium-Konzentration kommt es zu einer Umkehr der Transportrichtung des NCX. In diesem reverse mode transportiert der NCX Kalzium-Ionen im Austausch von Natrium-Ionen von extrazellulär nach intrazellulär. Dies führt erneut zu einer Erhöhung der diastolischen Kalzium-Konzentration (Conway und Koushik 2001).

1.3.3. Proarrhythmogene Effekte der CaMKII

Der bereits oben beschriebene Effekt des Kalzium-Verlusts über den NCX führt ebenfalls zu einem vermehrten Influx von Natriumionen. Da der NCX nur elektrogen transportiert und somit bei jedem Transport eine positive Ladung nach intrazellulär

verschiebt, kann es in der späten Phase des Aktionspotenzials zu sogenannten späten Nachdepolarisationen kommen („delayed afterdepolarisations“, DADs) (Mustroph et al. 2017). Es wird zudem vermutet, dass der bereits oben beschriebene Effekt des late I_{Na} über ein gesteigertes diastolisches Kalzium ebenfalls zu einer verstärkten Aktivität des NCX führt (Mason und Sossalla 2017).

Zudem führen der late I_{Na} sowie eine verminderte Aktivität von Kalium-Kanälen zu einer verlängerten Membranrepolarisation (Mustroph et al. 2014). Durch die verlängerte Repolarisationszeit können Depolarisationskanäle wie der spannungsabhängige $Na_v1.5$ die Refraktärzeit verlassen und sogenannte frühe Nachdepolarisationen („early afterdepolarisations“, EADs) auslösen (Mustroph et al. 2017).

Sowohl DADs als auch EADs sind bekannte Trigger für atriale oder ventrikuläre Arrhythmien (Fink et al. 2011).

1.4. Inhibitoren der CaMKII

Aufgrund der klaren Bedeutung der CaMKII in der Entstehung der Herzinsuffizienz und von Arrhythmien ist die Suche nach potenten Inhibitoren unabdingbar. Obwohl Proteinkinase-Inhibitoren in anderen Fachbereichen, wie zum Beispiel in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen, große Anerkennung finden, haben jene Medikamente noch keinen Weg in die klinische Therapie der Herzinsuffizienz gefunden (Bhullar et al. 2018). Grund dafür sind meist größere Sicherheitsbedenken sowie historisch gewachsene Fokussierung auf Ionen-Kanal-Blocker wie z.B. ein Großteil der Klasse der Antiarrhythmika (Fordyce et al. 2015).

Zudem gilt es die Herausforderung der ubiquitären Expression der CaMKII im menschlichen Organismus zu lösen. So wird die am stärksten exprimierte Isoform am Herzen CaMKII δ nicht nur im Herzen, sondern auch in diversen anderen Geweben exprimiert. Dabei lässt sich sogar eine ähnlich starke Expression im Gehirn beobachten. Aufgrund dieser generellen Expression ist es von besonderer Bedeutung auch auf etwaige Nebenwirkungen in anderen Geweben zu achten.

In der wissenschaftlichen Grundlagenforschung kamen jedoch bereits verschiedene Inhibitoren der CaMKII zum Einsatz. Dabei bildete KN-93 einen der ersten einsetzbaren Inhibitoren und wird auch nach wie vor breit in den wissenschaftlichen Laboratorien verwendet (Sumi et al. 1991). KN-93 hemmt dabei allosterisch die Bindung von Calmodulin und stabilisiert so die Verbindung der katalytischen mit der regulatorischen Domäne der CaMKII (Nassal et al. 2020). Jedoch ist KN-93 deutlich weniger effektiv, die CaMKII im autonomen aktivierten Zustand (durch Phosphorylierung an Threonin 287 oder durch Oxidation) zu inhibieren (Vest et al. 2010). Zudem inhibiert KN-93 nicht nur die Isoform CaMKII δ , sondern auch andere Isoformen und außerdem verschiedene Ionen-Kanäle wie den spannungsabhängigen Kalium-Kanal oder den L-Typ-Kalzium-Kanal (Nassal et al. 2020). Außerdem ist KN-93 nicht oral bioverfügbar und somit schlecht als klinisches Arzneimittel einsetzbar (Nassal et al. 2020).

Neuerdings rücken auch ATP-kompetitive Inhibitoren der CaMKII zunehmend in den Fokus der Herzinsuffizienz Forschung. Dabei scheinen die erst kürzlich entwickelten RA608 und RA306 besonders vielversprechende Wirkung zu erzeugen (Beauverger et al. 2020; Mustroph et al. 2020). ATP kompetitive Inhibitoren können die CaMKII auch im aktivierten Zustand hemmen, was einen deutlichen Vorteil gegenüber allosterischen Inhibitoren darstellt. Beide Inhibitoren hemmen vorwiegend die CaMKII γ und CaMKII δ , die zwei kardialen Hauptisoformen (Nassal et al. 2020). Zudem scheinen sie nur einen geringen Effekt auf andere Proteinkinasen zu besitzen. Lediglich eine Hemmung von MLK1, SIK und Pyk 2 ist in der Literatur beschrieben, wobei jene Kinasen ebenfalls einen Effekt auf das kardiale Remodeling in der Herzinsuffizienz zu besitzen scheinen (Nassal et al. 2020). Ebenfalls positiv hervorzuheben ist die orale Verfügbarkeit von RA608 und RA306, welche eine klinische Nutzung deutlich erleichtern würde (Nassal et al. 2020; Mustroph et al. 2020). Negativ zu betrachten ist der Effekt der beschriebenen ATP-kompetitiven Inhibitoren auf andere nicht kardiale Gewebearten. So konnte bereits ein geringerer Effekt auf CaMKII im Hirngewebe festgestellt werden (Nassal et al. 2020; Mustroph et al. 2020). Dabei scheint RA306 eine höhere inhibitorische Potenz auf die CaMKII δ als RA608 zu besitzen (IC_{50} : 11nM (RA306) vs. 22nM (RA608)) und eine geringere Anflutung im Gehirn aufzuweisen (Brain/Plasma-Ratio: 0,2 (RA306) vs. 1,5 (RA608)) (Mustroph et al. 2020). Inwiefern ATP-kompetitive Inhibitoren der CaMKII auch eine Option für den

klinischen Alltag bilden, ist durch weitere Untersuchungen zu erforschen. Die Suche nach alternativen Möglichkeiten die CaMKII-Aktivität zu limitieren ist daher weiterhin im wissenschaftlichen Fokus. In den letzten Jahren konnten hier auch einige klinische verfügbare Pharmaka untersucht werden, die in erkrankten Kardiomyozyten und multizellulären Präparaten die CaMKII-Aktivität limitieren können (Krammer et al. 2025; Mustroph et al. 2023; Mustroph et al. 2022). Eine weitere Möglichkeit, die auch im Fokus dieser Promotionsarbeit steht, ist die Modulation von Regulationsproteinen der CaMKII, z.B. die Calcium/Calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK).

1.5. CASK

Die Calcium/Calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) zählt zu der Gruppe der membrane-associated guanylate kinase (MAGUK). Als erster beschriebener Negativregulator der CaMKII besitzt CASK ein großes therapeutisches Potenzial in der Herzinsuffizienz-Therapie. CASK scheint im Gegensatz zu anderen MAGUK Proteinen, welche vor allem eine Scaffolding Funktion besitzen, eine Kinase Aktivität am N-terminalen Ende auszuüben (Mukherjee et al. 2008). Dabei scheint derselbe Bereich auch eine Verbindung mit der CaMKII schließen zu können (Mukherjee et al. 2008). Interessanterweise konnte in Drosophila Neuronen eine vermehrte Threonin 286 Phosphorylierung, der autonom aktivierenden Region, und eine verminderte Phosphorylierung an Threonin 305/306, der inhibitorischen Stelle der CaMKII, bei vermindertem CASK beobachtet werden. Dies spricht für eine vermehrte CaMKII Aktivität bei Abwesenheit von CASK (Hodge et al. 2006).

1.5.1. Charakterisierung von CASK

CASK wird nicht nur im kardialen Gewebe, sondern auch im Hirn exprimiert. Dort scheint CASK einen Effekt auf das Gedächtnis, sowie auf das Verhindern von geistigen Behinderungen zu haben (Mukherjee et al. 2008). Die genaue Funktion im Hirngewebe muss jedoch auch hier noch weiter erforscht werden.

Im kardialen Gewebe scheint CASK mit vielen verschiedenen Proteinen zu interagieren. So lässt sich eine Interaktion mit Ionen-Kanälen, Rezeptoren, aber auch

diversen Zell-Adhäsionsproteinen nachweisen (Eichel et al. 2016). Eichel et al. konnten zeigen, dass CASK stark mit Dystrophin am lateralen Sarkolemm der Kardiomyozyten vergesellschaftet ist (Eichel et al. 2016). Dabei ist CASK weniger in den T-Tubuli zu finden als vornehmlich an Stellen des Sarkolemm, die mit anderen Zellen oder dem Extrazellularraum verankert sind. Diese Entdeckung ist bemerkenswert, da CASK als einziges bekanntes kardiales MAGUK Protein nicht vornehmlich an den Glanzstreifen fixiert ist. Zudem wird CASK nun als Bestandteil der sogenannten Dystrophin-assoziierten Proteine des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes gezählt. Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Verbindung von Sarkomeren mit dem Sarkolemm (Alpern und Seldin 2012). Der spannungsabhängige Natriumkanal Nav1.5 scheint ebenfalls mit CASK zu interagieren. Dabei hat CASK keinen Effekt auf die gesamte Expressionsmenge von Nav1.5, jedoch auf dessen Transport zur Zellmembran. Am C-Terminus von Nav1.5 besitzt der Kanal das sogenannte SIV-Motiv (Shy et al. 2014). Das SIV-Motiv ist essenziell für den Transport des Kanals an die laterale Membran, nicht jedoch für die Lokalisation an den Glanzstreifen oder in den T-Tubuli. CASK scheint ebenfalls mit dem C-Terminus von Nav1.5 zu interagieren, wobei es dadurch eher zu einer Herabregulierung von Nav1.5 an der lateralen Membran kommt. Der genaue Einfluss von CASK auf den Transport von Nav1.5 ist Bestandteil aktueller Forschung. Nichts desto trotz bildet CASK auch hier ein Alleinstellungsmerkmal unter den kardialen MAGUKs, da diese eher eine Positionierung an der Zellmembran stabilisieren, statt sie wie CASK zu inhibieren (Eichel et al. 2016). Ob die im nächsten Abschnitt besprochenen positiven Effekte auf das Ionen Handling der Zelle allein durch einen veränderten Transport von Proteinen durch CASK zu erklären ist, bleibt ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.

1.5.2. Effekte von CASK

Zur Untersuchung von CASK im humanen Myokard sammelte unsere Arbeitsgruppe Proben des linken Ventrikels von explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, von Transplantationsherzen von Patienten ohne Herzinsuffizienz, welche nicht zur Transplantation zugelassen wurden, sowie Proben von Patienten mit Aortenklappenstenose, die sich einer Klappenersatz-Operation unterzogen (Mustroph

et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass CASK auch im humanen Gewebe sowohl mit CaMKII interagiert als auch mit dem Natriumkanal Nav1.5. Interessanterweise sah man zudem eine erhöhte Expression von CASK in der Gruppe mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels aufgrund einer Aortenklappenstenose, ohne jedoch schon eine Verminderung in der Ejektionsfraktion aufzuweisen. Im Vergleich zur Gruppe der endständigen Herzinsuffizienz ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Expression von CASK mit der nicht-insuffizienten Kontrollgruppe nachweisen (Mustroph et al. 2021). Ähnliche Daten konnten auch am murinen Modell wiederholt werden. Hier konnte mit der im Abschnitt „Material und Methoden“ beschriebenen Technik ein Knock-out von CASK erzeugt werden. In Versuchen mit Mäusen, die einer „transverse aortic constriction“ (TAC) Operation unterzogen wurden, zeigten CASK-KO Mäuse eine deutlich verminderte Ejektionsfraktion sowie eine erhöhte Mortalität nach zwei Wochen verglichen mit der Wildtyp Gruppe (Mustroph et al. 2021). Bei der TAC wird die transversale Aorta durch eine Ligatur in ihrem Durchmesser stark vermindert, um eine künstlich erzeugte Erhöhung der Nachlast zu generieren. Die Wildtyp Gruppe zeigte nach 2 Wochen lediglich eine kompensatorische Hypertrophie als Antwort auf die TAC. Zudem zeigte sich eine um das 2-fache gesteigerte Expression von CASK in der Wildtyp Gruppe nach der TAC-Operation im Vergleich zur sham-Operationsgruppe. CASK scheint sowohl in den murinen als auch den humanen Daten vor allem einen positiven Effekt auf die beginnende Herzinsuffizienz bzw. die Adaptation auf eine erhöhte Nachlast zu haben (Mustroph et al. 2021).

Auch auf intrazellulärer Ebene ließen sich die positiven Effekte von CASK nachweisen. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Knock-out von CASK im Mausmodell zu einer gesteigerten Phosphorylierung der CaMKII an seiner autonom-aktivierenden Region Threonin 286 führt sowie eine reduzierte Phosphorylierung von Threonin 305, der inhibitorischen Domäne der CaMKII, zur Folge hat (Mustroph et al. 2021). In Ruhe zeigten CASK-KO Kardiomyozyten eine physiologische Morphologie und Funktion. Dies lässt sich auch durch eine bereits beschriebene geringere CaMKII Aktivität in Ruhe erklären (Bucks et al. 2009). Interessanterweise konnte jedoch unter β -adrenerger Stimulation gezeigt werden, dass sowohl die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors am SR, als auch das diastolische Kalzium-Leck aus dem SR in der CASK-KO Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Mustroph et al. 2021). Das erhöhte Kalzium-Leck aus dem SR spiegelt sich auch in der

Induzierbarkeit von ventrikulären Tachykardien wider. Diese konnten lediglich in der Abwesenheit von CASK ausgelöst werden. Nach Gabe des CaMKII Inhibitors RA608 traten die Arrhythmien nicht mehr auf, was erneut für eine Inhibition der CaMKII durch CASK spricht (Mustroph et al. 2021).

2014 konnten Zhu et al. zeigen, dass sich die CASK Expression im Pankreas durch GLP-1 Rezeptor Agonisten wie Exenatid steigern ließ (Zhu et al. 2014). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte ähnliche Ergebnisse im murinen Myokard nachweisen. Nach 24-stündiger Inkubation der Kardiomyozyten mit Exenatid ließ sich eine gesteigerte Expression von CASK und zudem eine verminderte Phosphorylierung an Threonin 286 der CaMKII nachweisen (Mustroph et al. 2021). Passend zu diesen Ergebnissen konnte auch eine vermehrte Phosphorylierung an Threonin 305 der CaMKII in ihrer inhibitorischen Domäne festgestellt werden. Diese Beobachtungen wurden nur unter Vorhandensein von CASK gemacht. In der CASK-defizienten Gruppe fehlte der Effekt, was auf eine Modulation der CaMKII von Exenatid über CASK schließen lässt. Anschließend zu den zuvor beschriebenen Experimenten konnte die Exenatid Inkubation auch einen Rückgang des Kalziumlecks aus dem SR sowie eine vermehrte Kalzium-Konzentration im SR herbeiführen. Auch diese Ergebnisse ließen sich nur unter Vorhandensein von CASK beobachten (Mustroph et al. 2021). Inwiefern GLP-1 Rezeptoragonisten auch andere positive intrazelluläre Wirkungen wie z.B. auf den späten Natriumstrom entfalten und inwiefern diese über CASK vermittelt sind, ist Gegenstand dieser Arbeit. Weiterhin gilt es zu klären, ob GLP-1 Rezeptoragonisten direkt über CASK wirken, oder ob die Abwesenheit von CASK eine schlechtere Verfügbarkeit der CaMKII gegenüber GLP-1 Rezeptoragonisten darstellt.

1.6. GLP-1 Rezeptoragonisten

GLP-1 Rezeptoragonisten oder Inkretinmimetika wirken über eine Stimulation der Insulinsekretion, mit entgegengesetzter Wirkung auf die Glucagon Ausschüttung. Exenatid wurde 2005 als erster Wirkstoff dieser Klasse zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 in den USA durch die FDA („Food and Drug Administration“) zugelassen, ein Jahr später auch in Europa durch die EMA („European Medicines Agency“) (Drucker und Nauck 2006). Das in dieser Arbeit verwendete Liraglutid wurde 2009 durch die EMA für die Behandlung des Diabetes Typ 2 zugelassen (Montanya und Sesti 2009). Die Medikamentenklasse hat zuletzt auch durch den

gewichtsreduzierenden Effekt, wie z.B. Semaglutid in den Ozempic-Spritzen, starke mediale Aufmerksamkeit genossen.

1.6.1. Charakterisierung und Verwendung von Liraglutid

Liraglutid ist zur Therapie von unzureichend eingestellten Typ-2 Diabetes mellitus ab 10 Jahren zugelassen. Es kann dabei ergänzend zu anderen oralen Antidiabetika sowie Basal- und Langzeitinsulin verwendet werden. Bei Unverträglichkeit von Metformin kann es auch als Einzeltherapie eingesetzt werden. Zudem ist Liraglutid als medikamentöse Therapie von Adipositas und Übergewicht mit zusätzlicher gewichtsbedingter Begleiterkrankung ab 12 Jahren zugelassen. Liraglutid wird dabei anfänglich mit 0,6 mg täglich subkutan gespritzt. Nach einer Woche wird die Dosis auf 1,2 mg und im weiteren Verlauf je nach Behandlungserfolg auf maximal 1,8 mg gesteigert. Zur Behandlung von Adipositas wird abweichend eine Dosis von 3 mg pro Tag angestrebt. Die langsame Steigerung dient der besseren gastrointestinalen Verträglichkeit. Liraglutid besitzt eine Masse von 3750 Dalton und ist zu 97% homolog zum körpereigenen Inkretin GLP-1. Dabei besitzt Liraglutid im Gegensatz zu GLP-1 eine Palmitinfettsäure. Dies führt zu einem verminderten Abbau durch die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) und damit zu einer deutlich längeren Halbwertszeit als GLP-1 (Knudsen und Lau 2019). Liraglutid besitzt so eine Halbwertszeit von ca. 13 h, wohingegen GLP-1 lediglich eine Halbwertszeit von 1,5 h bei subkutaner Applikation aufweisen kann. Dies führt zu einer deutlich verbesserten therapeutischen Verfügbarkeit.

GLP-1 als auch Liraglutid wirken über ein G-Protein gekoppelten Signalweg. Dieser führt im Pankreas zu einer vermehrten Insulinsynthese als auch -sekretion in den β -Zellen. Zugleich kommt es zu einer Hemmung der Glukagonsekretion aus den α -Zellen. Beide Effekte sind dabei glukoseabhängig. So kommt es während hypoglykämischen Phasen sogar zu einer Verringerung der Insulinausschüttung. Somit werden gefährliche Hypoglykämien vermieden (Knudsen und Lau 2019).

Liraglutid wirkt zudem verlangsamen auf die Magenentleerung. Zudem führt es zentral zu einer Erniedrigung des Hungergefühls sowie zu einer Steigerung des Sättigungsgefühls (Knudsen und Lau 2019).

1.6.2. Klinische und experimentelle Studien

GLP-1 Agonisten wie Liraglutid oder Semaglutid konnten außerhalb der Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2 und der medikamentösen Adipositas-Therapie auch einen positiven kardiovaskulären Effekt in klinischen und experimentellen Studien zeigen. Vor allem die LEADER-Studie (Marso et al. 2016b) sowie die SUSTAIN-6 Studie (Marso et al. 2016a) konnten ein signifikant besseres kardiovaskuläres Outcome für Typ-2-Diabetes mellitus Patienten nachweisen. Neuere Studien wie die STEP-HFpEF (Kosiborod et al. 2023) und die STEP-HFpEF DM (Kosiborod et al. 2024) konnten zudem eine Verbesserung der klinischen Symptomatik und der Lebensqualität von Patienten mit Herzinsuffizienz und Übergewicht bzw. Adipositas unter Semaglutid Therapie aufzeigen.

Die LEADER Studie ist eine doppel-verblindete randomisierte, kontrollierte Studie, welche das kardiovaskuläre Outcome von Typ-2-Diabetes mellitus Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko während der Therapie mit Liraglutid in therapeutischer Dosis mit der Gabe von Placebo vergleicht. Einschlusskriterien für die Patienten war ein Typ-2 Diabetes mellitus mit einem HbA1c von mindestens 7,0%. Die Patienten durften noch nicht mit einem GLP-1 Agonisten oder einem Dipeptidyl-Peptidase-4 Inhibitor (DPP-4 Inhibitor) vorbehandelt sein. Zudem mussten die Patienten mindestens 50 Jahre alt und mindestens eine kardiovaskuläre Begleiterkrankung oder mindestens 60 Jahre alt mit mindestens einem kardiovaskulären Risikofaktor aufweisen können. Als kardiovaskuläre Begleiterkrankung zählten dabei eine KHK, zerebrovaskuläre Erkrankungen wie der ischämische Schlaganfall, periphere vaskuläre Erkrankungen, eine chronische Nephropathie Grad 3 oder höher, sowie eine chronische Herzinsuffizienz NYHA II oder III. Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren zählten eine Mikroalbumin- oder Proteinurie, arterieller Hypertonus mit linksventrikulärer Hypertrophie, systolische oder diastolische linksventrikuläre Dysfunktion, sowie einen Ankle-Brachial-Index kleiner als 0,9. Der primäre Endpunkt war definiert als das Auftreten von einem nicht-tödlichen Schlaganfall oder Myokardinfarkt oder der Tod durch eine kardiovaskuläre Ursache.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in der Liraglutid-Gruppe, im Vergleich zur Placebo-Gruppe, signifikant weniger Patienten den primären Endpunkt erreichten (13% vs. 14,9%). Die Tode durch kardiovaskuläre Ursachen waren zudem in der

Liraglutid-Gruppe geringer als in der Vergleichsgruppe (4,7% vs. 6,0%). Auch die komplette Anzahl der Tode war signifikant niedriger in der Liraglutid-Gruppe (8,2% vs. 9,6%).

Die SUSTAIN-6 Studie bildet einen fast identischen Versuchsaufbau wie die LEADER-Studie, untersucht jedoch die kardiovaskulären Auswirkungen einer Semaglutid Therapie. Die Ein- und Ausschlusskriterien der beiden Studien sind nahezu identisch und auch der primäre Endpunkt der SUSTAIN-6 Studie ist kongruent zur LEADER Studie. Auch unter Semaglutid konnte ein signifikantes Defizit im Erreichen des primären Endpunktes gegenüber der Placebo-Gruppe festgestellt werden (6,6% vs. 8,9%). Der signifikante Unterschied zeigte sich dabei vor allem in der verminderten Anzahl von nicht-tödlichen Myokardinfarkten (2,9% vs. 3,9%) und nicht-tödlichen Schlaganfällen (1,6% vs. 2,7%). Die Tode durch kardiovaskuläre Ursachen waren dabei ähnlich hoch und nicht signifikant (2,7% vs. 2,8%).

Eine weitere post-hoc Analyse der LEADER Studie von Verma et al. *„Liraglutide Reduces Cardiovascular Events and Mortality in Type 2 Diabetes Mellitus Independently of Baseline Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Statin Use“* (Verma et al. 2018) untersucht den Effekt von Liraglutid auf das kardiovaskuläre Outcome abhängig von der LDL-Cholesterin Konzentration (Low-density Lipoprotein Cholesterin). Der Zusammenhang zwischen einem hohen LDL-Cholesterin und atherosklerotischen, kardiovaskulären Ereignissen ist sehr gut erforscht (Baigent et al. 2010). Aufgrund der starken atherosklerotischen Wirkung von LDL-Cholesterin ist eine Senkung je nach kardiovaskulärem Risiko auf teilweise unter 55 mg/dl indiziert. Die post-hoc Analyse untersucht, ob der positive kardiovaskuläre Effekt von Liraglutid nur bei Patienten mit hohem LDL-Cholesterin zu beobachten ist oder ob sich ähnliche Effekte auch bei niedrigeren LDL-Werten beobachten lassen. Die Patienten wurden dabei in 3 Gruppen, abhängig des LDL-Cholesterins, unterteilt. Dadurch ergab sich eine Gruppe mit LDL-Cholesterin-Werten <50 mg/dl, eine Gruppe mit Werten zwischen 50-70 mg/dl und eine Gruppe mit Werten >70 mg/dl. Beachtlich war, dass die Hazard Ratio für den primären Endpunkt in allen 3 Gruppen <1 lag (0,72/ 0,82/ 0,9).

Diese Daten suggerieren einen positiven Effekt von Liraglutid auf das kardiovaskuläre Outcome unabhängig vom LDL-Cholesterin, wobei der positive Effekt auch noch bei maximal niedrigen LDL-Cholesterin Werten zu beobachten ist. Eine zusätzliche

Liraglutid-Therapie könnte also das kardiovaskuläre Risiko auch bei optimal eingestellter Therapie senken.

Weder die LEADER-Studie noch die SUSTAIN-6 Studie gliedern die positiven Effekte der Inkretinmimetika auf das kardiovaskuläre Outcome jedoch nach erhaltener Ejektionsfraktion, also in einer Unterscheidung zwischen HFpEF und HFrEF. Diese Unterscheidung erscheint jedoch als äußerst notwendig, da sich Mortalität und auch Therapie deutlich zwischen diesen beiden Krankheitsentitäten unterscheidet. Metaanalysen zeigen hierbei eine signifikant niedrigere Mortalität der HFpEF im Vergleich zur HFrEF (Somaratne et al. 2009). Dabei erreicht die HFpEF in Deutschland einen Anteil von ca. 50% (Wenzel et al. 2022).

Interessanterweise konnten die FIGHT- und die LIVE-Studie keinen positiven Effekt von Liraglutid in therapeutischer Dosis im Patientenkollektiv der HFrEF zeigen. Die FIGHT-Studie (Margulies et al. 2016) untersuchte Patienten mit einer Ejektionsfraktion von 40% oder weniger. Einschlusskriterien waren zudem eine Hospitalisierung aufgrund eines akuten Koronarsyndroms innerhalb der letzten 14 Tage trotz adäquater Therapie sowie eine orale Diuretika-Therapie mit mindestens 40 mg Furosemid oder einer Äquivalenzdosis. Die Studie verglich die verstrichene Zeit bis zum Tode, die verstrichene Zeit bis zur erneuten Krankenhauseinweisung sowie die Veränderung des NT-proBNP unter Therapie mit Liraglutid, welches von 0,6 mg über 1,2 mg auf 1,8 mg gesteigert wurde, mit Placebo. Die FIGHT-Studie zeigt keine verbesserte klinische Stabilität bei Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion nach kürzlicher Hospitalisierung (Margulies et al. 2016) durch Liraglutid. Auch die untersuchten sekundären Endpunkte wie der 6 Minuten Gehtest oder der Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) zeigten keine Verbesserung der Herzinsuffizienz Symptomatik durch Liraglutidgabe. Der KCCQ ist ein Fragebogen zur Erfassung der physischen und psychischen Belastung der Patienten durch ihre Herzinsuffizienzerkrankung. Die LIVE-Studie untersuchte ebenfalls gezielt Patienten mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (Jorsal et al. 2017). Dabei inkludiert die Studie nur Patienten mit einer Ejektionsfraktion von maximal 45%, dies entspricht der Patientenpopulation HFrEF sowie die untere Hälfte der HFmrEF nach der Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) (McDonagh et al. 2023). Die LIVE-Studie verglich dabei die Veränderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion innerhalb von 24 Wochen unter Gabe von 1,8 mg Liraglutid, welches ebenfalls über 0,6 mg und 1,2

mg gesteigert wurde, gegenüber Placebo. Die Ergebnisse der LIVE-Studie zeigen konkordant zur FIGHT-Studie keine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion durch Liraglutid in einem Patientenkollektiv mit eingeschränkter Pumpfunktion (Jorsal et al. 2017).

Interessanterweise konnte jedoch durch die STEP-HFpEF (Kosiborod et al. 2023) und die STEP-HFpEF DM Studie (Kosiborod et al. 2024) eine deutliche Symptomverbesserung der Herzinsuffizienz unter Gabe von 2,4 mg Semaglutid im Patientenkollektiv der Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion nachgewiesen werden. Die Studien unterscheiden sich durch das Fehlen bzw. Vorhandensein der Begleitdiagnose Diabetes mellitus Typ 2. Beide Studien inkludierten dabei Patienten mit einer Ejektionsfraktion von mindestens 45%, was nach ESC-Leitlinie der Patientenpopulation von HFpEF und die obere Hälfte der HFmrEF entspricht. Zudem mussten die Patienten einen Body-Mass Index von mindestens 30 kg/m² aufweisen, um an der Studie partizipieren zu können. Dies entspricht mindestens einer Adipositas Grad I. Primäre Endpunkte beider Studien waren die Veränderung des KCCQ-CSS und die Veränderung des Körpergewichts unter 2,4 mg Semaglutid Gabe nach 52 Wochen im Vergleich zu Placebo. Der KCCQ-CSS bildet einen Teil des KCCQ-Fragebogens, wobei ein Schwerpunkt auf die körperlichen und sozialen Funktionen des Patienten gelegt wird. Beide Studien zeigen eine Reduktion der Herzinsuffizienz bezogenen Symptome und eine Reduktion des Körpergewichts durch Semaglutid in therapeutischer Dosis im Vergleich zu Placebo bei Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion (Kosiborod et al. 2023; Kosiborod et al. 2024).

Neuste Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten einen möglichen Erklärungsansatz der klinischen Studien über die Wirkung von Semaglutid auf zellulärer Ebene. Dabei führte eine Präinkubation mit 50 nM Semaglutid zu einem Rückgang des diastolischen Kalziumlecks aus dem SR in humanem und murinen Herzmuskelzellen (Krammer et al. 2025). Semaglutid bewirkte zudem auch eine Inhibition des späten Natriumstroms sowie eine Steigerung des Kalziumtransienten und des Kalziumgehalts im SR in humanem und murinen Gewebe. Bemerkenswert war hierbei, dass im humanen Gewebe diese Effekte nur bei HFpEF ähnlichem Phänotyp durch Aortenklappenstenose und HFrEF Patienten beobachtet werden konnte. Im nicht-insuffizientem Gewebe blieben die Effekte auf den späten Natriumstrom und auf das Kalzium-Handling der humanen Kardiomyozyten aus. Durch Inhibition des GLP-1

Rezeptors über Ex-9-39 konnte der Effekt auf den späten Natriumstrom und das diastolische Kalzium-Leck jedoch nicht mehr beobachtet werden (Krammer et al. 2025). Dies lässt eine Wirkung über den GLP-1 Rezeptor vermuten. Die Erhöhung des späten Natriumstroms sowie des diastolischen Kalziumlecks führen zum erhöhten Auftreten von zellulären Arrhythmien wie frühe und späte Nachdepolarisationen (EAD und DAD). Die Inkubation mit Semaglutid zeigte einen Rückgang der durch Wasserstoffperoxid ausgelösten Arrhythmien in murinen Kardiomyozyten (Krammer et al. 2025).

Die Ergebnisse der FIGHT- und LIVE-Studie in Zusammenschau mit den Ergebnissen der STEP-HFpEF bzw. STEP-HFpEF DM Studie lassen einen positiven Effekt auf die klinischen Symptome der Herzinsuffizienz durch Inkretinmimetika bei Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion vermuten, wohingegen Patienten mit bereits reduzierter Ejektionsfraktion nicht mehr profitieren. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit murinen Kardiomyozyten zeigten ebenfalls einen positiven Effekt von CASK und von Semaglutid auf die beginnende Herzinsuffizienz (Mustroph et al. 2021; Krammer et al. 2025). Inwiefern die kardioprotektive Wirkung von Inkretinmimetika über CASK vermittelt werden könnte, bildet Gegenstand dieser Arbeit. Durch die wenigen therapeutischen Möglichkeiten in der Therapie der HFpEF bilden die Inkretinmimetika hierbei zudem ein großes klinisches Interesse.

1.7. Hypothesen und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die intrazelluläre Wirkweise des GLP-1 Agonisten Liraglutid in murinen Kardiomyozyten genauer zu beschreiben. Dabei sollen vor allem Effekte auf proarrhythmogene und Herzinsuffizienz beschleunigende Natrium- und Kalziumströme untersucht werden. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Modulierung von CASK durch Liraglutid und dessen Wirkung auf die CaMKII. Die beschriebenen Untersuchungen könnten so einen Einfluss auf die weitere Therapie sowie Entwicklung neuer Medikamente der Herzinsuffizienz ausüben.

Analog zum Forschungsstand zu Beginn der Arbeit wurden folgende Hypothesen zur Überprüfung formuliert:

1. In isolierten murinen ventrikulären Kardiomyozyten kann eine Inkubation mit Liraglutid den induzierten späten Natriumstrom absenken
2. Die Inhibition des späten Natriumstroms durch Liraglutid wird über CASK vermittelt
3. Die Inhibition des späten Natriumstroms durch Liraglutid wird über die Proteinkinase A und über den GLP-1 Rezeptor vermittelt
4. In isolierten murinen ventrikulären Kardiomyozyten kann eine Inkubation mit Liraglutid die Kalziumtransientenamplitude, die Sarkomerlängenverkürzung und den Rücktransport von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum beeinflussen
5. Die Wirkung von Liraglutid auf das Kalzium-Handling muriner Kardiomyozyten wird über CASK vermittelt

2. Material und Methoden

2.1. Mausmodelle und Zellisolation

2.1.1. Mausmodelle

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden isolierte, ventrikuläre Kardiomyozyten aus murinen Herzen verwendet. Zur Verwendung kamen hier einerseits Wildtyp Mäuse, in denen CASK physiologisch exprimiert wird, und andererseits speziell gezüchtete CASK-Knock-out Mäuse ohne Expression von CASK (siehe 2.1.1.2)

2.1.1.1. Wildtypen

Die isolierten Wildtyp-Kardiomyozyten stammen von C57BL6/J-Mäusen (Fa. Janvier, Frankreich) im Alter von 10-14 Wochen. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse für die Messungen verwendet, da Messungen mit beiden Geschlechtern die Messungen und auch die Isolation aufgrund von gewichts- und hormonellen Unterschieden deutlich variabler und somit ungenauer gemacht hätten. Zudem führt die X-chromosomale Vererbung von CASK dazu, dass sich die Expression von CASK bei weiblichen und männlichen Tieren unterscheiden kann. Während männliche Tiere CASK hemizygot exprimieren, können weibliche Tiere CASK auch heterozygot exprimieren. Dies gestaltet den Nachweis der CASK-Expression sowie die Differenzierung CASK-abhängiger Effekte schwierig. Die Mäuse stammen einerseits von der Firma Janvier, andererseits wurden sie unter artgerechter Haltung und Versorgung im zentralen Tierlaboratorium der Universität Regensburg gezüchtet. Die gezüchtete Kontrollgruppe besaß den Genotyp Wildtyp/heterozygot (CASK-CTRL) (Erklärung in 2.1.1.2).

2.1.1.2. CASK-Knock-out Modell

Die transgenen CASK-Knock-out Mäuse wurden mithilfe der Cre/loxP-Rekombinationsmethode mit dem α -Myosin-heavy-chain-promotor verändert (Orban et al. 1992; Sauer 1987; Subramaniam et al. 1991). Die Cre-Rekombinase („cyclization recombination“) ist ein Enzym, welches die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Basensequenzen katalysiert. LoxP („locus of X-over P1“) stellt eine DNA-Sequenz dar, welche von dem Bakteriophagen P1 entstammt. Erkennt die Cre-Rekombinase die loxP-Sequenz, schneidet das Enzym den zwischen den loxP-Sequenzen liegenden DNA-Bereich aus. Wir verwendeten Mäuse, bei denen das erste codierende Exon von CASK durch loxP-Sequenzen flankiert wurde (CASK-FLOX) (Mustroph et al. 2021). Atasoy et al. konnten zeigen, dass sich durch die Flankierung von CASK mit der loxP-Sequenz die CASK-Expression in Homogenaten mit Hirngewebe von Neugeborenen Mäuse auf 33% senken ließ (Atasoy et al. 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten CASK-FLOX Mäuse wurden vom Labor Thomas Südhof bereitgestellt. Zur Züchtung der transgenen CASK-Knock-out Mäuse wurden homozygote CASK-FLOX Mäuse mit heterozygoten Mäusen mit Cre-Rekombinase gepaart (Mustroph et al. 2021). Die Cre-Rekombinase war dabei abhängig vom α -Myosin-heavy-chain-Promotor (Subramaniam et al. 1991). Das α -Myosin-heavy-chain-Protein ist ein Herzmuskel-spezifisches Protein (Molkentin et al. 1996). Durch Verknüpfen des α -Myosin-heavy-chain-Promoters mit der Cre-Rekombinase wird diese ebenfalls nur in Herzmuskelzellen exprimiert und führt so nur in diesem spezifischen Gewebe zum CASK-Knock-out. Aus den Züchtungen für vorherige Untersuchungen über die Expression von CASK ergaben sich somit 3 Gruppen: Die CASK-Kontrollgruppe (CASK-CTRL), in denen das CASK-Wildtyp Gen vorlag sowie die Cre-Rekombinase heterozygot (WT/het) und die CASK-Flox Gruppe, bei denen das CASK-Gen durch loxP-Sequenzen auf beiden Allelen flankiert wurde, also homozygot vorlag und zudem die Cre-Rekombinase als Wildtyp Allel (homo/WT). Zum Knock-out wurden die homozygoten loxP-Sequenz flankierten Allele und die heterozygote Cre-Rekombinase benötigt (homo/het). Abbildung 5 zeigt die Expression von CASK in allen 3 Gruppen. Man erkennt hierbei deutlich den Rückgang der CASK-Expression im Knock-out Modell im Vergleich zur CASK-CTRL- und CASK-Flox-Gruppe durch die Western-Blot Analyse.

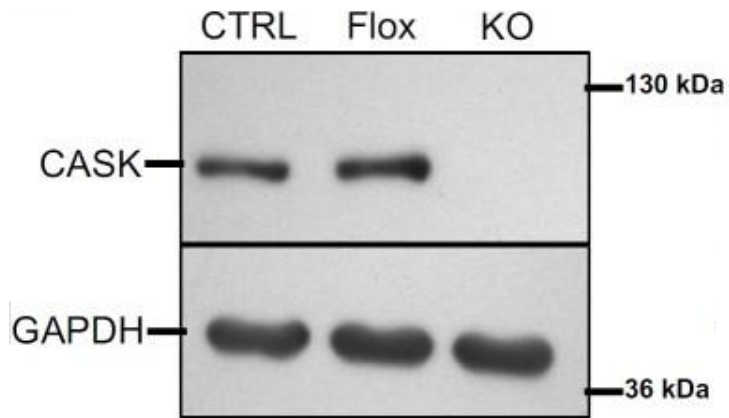


Abbildung 5: Western-Blot der CASK-Expression in isolierten Kardiomyozyten (linker Ventrikel) der Kontrollgruppe (CTRL), der CASK-FLOX Gruppe (Flox) und der Knock-out Gruppe (KO). Man erkennt die fehlende CASK-Expression in der KO-Gruppe. Abbildung aus Mustroph et al. 2021

2.1.2. Isolation

Die Isolation einzelner muriner Kardiomyozyten erfolgte nach einem festen Laborprotokoll der Arbeitsgruppe Prof. Maier, welches die institutionellen Richtlinien und das Tierschutzrecht beachteten. Zunächst erfolgte die Sedierung der Mäuse über 800 µl Isofluran Inhalation in einem dafür vorgesehenen Narkosekäfig. Nach vollkommener Sedierung erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Anschließend wurde der Thorax v-förmig eröffnet und das Herz auf Höhe der Aorta ascendens abgetrennt und dem Thorax entnommen. Das Herz wurde darauffolgend in einer Isolationstyrode (Tab. 1) sanft ausgedrückt, um Blut aus dem Herzen zu entfernen und Thromben vorzubeugen. Hierauf wurde das Herz gewogen. Tab. 2 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung der Herzgewichte der Kontrollgruppe sowie der CASK-KO Gruppe über alle Versuchsreihen kumuliert. Durch Anbringen einer 10G-Kanüle an die Aorta konnte das Herz retrograd über die Koronargefäße mit Isolationstyrode (Tab. 1) gespült werden. Anschließend erfolgte die Fixierung an einem Langendorff-Apparat. Zur Verdauung und Lösung einzelner Zellen wurde die unter Tab. 3 beschriebene Enzymlösung 7,5 min perfundiert. Die Lösung lief dabei retrograd über die Koronararterien durch das Myokard in die Ventrikel und wurde unter optimalen Druckverhältnissen mit Sauerstoff angereichert (Oscar Langendorff 1895).

Isolationstyrode (pH 7,46 bei 37°C)		
NaCl (VWR Chemicals)	113	mmol/L
KCl (Carl Roth GmbH)	4,7	mmol/L
Kaliumdihydrogenphosphat (SIGMA-Aldrich)	0,6	mmol/L
Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH)	0,6	mmol/L
Magnesiumsulfat (SIGMA-Aldrich)	1,2	mmol/L
HEPES (Carl Roth GmbH)	10	mmol/L
Phenol-red (SIGMA-Aldrich)	32	µmol/L
Natriumhydrogencarbonat (SIGMA-Aldrich)	12	mmol/L
Kaliumhydrogencarbonat (SIGMA-Aldrich)	10	mmol/L
Taurin (Carl Roth GmbH)	30	mmol/L
BDM (Carl Roth GmbH)	10	mmol/L
Glucose (SIGMA-Aldrich)	5,5	mmol/L

Tab. 1: Isolationstyrode

	Wildtypen	CASK-KO
Mittelwert+SEM	182,5±30,39mg	182,0±19,64 mg

Tab. 2: Mittelwerte der Herzgewichte, kumuliert über alle Versuchsreihen

Nach dem Durchlaufen der Isolationslösung wurde das Herz vom Langendorff-Apparat entfernt und zum Beenden der Isolation in eine Stopp-Lösung mit bovinem Kalbserum (BCS) (Tab. 4) gegeben.

Das BCS wirkt dabei kompetitiv an den Bindungsstellen der Verdauungsenzyme und stoppt somit die Verdauung am Myokard. Durch leichte mechanische Manipulation wurden die Zellen aus ihrem Verband gelöst. Danach folgte das Filtern der Zell-Lösung durch ein Filterpapier, wodurch größere Zellverbände aus der Suspension entfernt wurden.

Enzymlösung		
	Isolationstyrode	20 mL
	Liberase blendzyme (SIGMA-Aldrich)	5 mg
	Trypsin (SIGMA-Aldrich)	111,2 µL
	10 mM CaCl ₂ (SIGMA-Aldrich)	25 µL

Tab. 3: Enzymlösung

Stopp-Lösung		
	Isolationstyrode	2,25 mL
	Bovine calf serum (BCS) (SIGMA-Aldrich)	0,25 mL
	10 mM CaCl ₂ (SIGMA-Aldrich)	3,125 µL

Tab. 4: Stopp-Lösung

2.2. Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp Methode wurde 1976 vorgestellt (Neher und Sakmann 1976) und ist seitdem für die moderne Wissenschaft unentbehrlich. Bereits 1991 erhielten Erwin Neher und Bert Sakmann den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für das Beschreiben der Funktion einzelner Ionen-Kanäle mithilfe der Patch-Clamp Technik. Die Patch-Clamp Technik ermöglichte erstmals das Untersuchen einzelner Ionen-Kanäle, deren Wirkung auf elektrophysiologische Reize und die Hemmung und Aktivierung einzelner Kanäle durch externe Stimuli.

2.2.1. Methode

Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine mit elektrisch leitender Flüssigkeit gefüllte Mikropipette aus Glas auf einen kleinen Bereich („patch“) der Zellmembran gesetzt (Neher und Sakmann 1992). Durch Erzeugen eines minimalen Unterdrucks wird

zunächst die Zellmembran sehr nah an die Öffnung der Glaspipette gebracht, sodass diese möglichst gut abschließt. Dadurch wird sichergestellt, dass es während der Messung nur zu einem geringen Leckstrom zwischen dem Inneren der Glaspipette und der extrazellulären Lösung kommt. Um diese optimale Abdichtung zu quantifizieren, erzeugt man so lange einen Unterdruck, bis sich der eingestellte Membran-Widerstand im Giga-Ohm Bereich befindet, der sogenannte „Giga-Seal“ (Neher und Sakmann 1992). Über zwei Elektroden, welche sich einerseits in der aufgesetzten Glaspipette und andererseits in der extrazellulären Flüssigkeit befinden, lässt sich nun eine Spannung ableiten. Durch den ermittelten Widerstand der Zellmembran lässt sich der geflossene Strom ableiten. Dieser befindet sich meist im Piko-Ampere Bereich, weshalb dieser auch leicht durch Leck-Ströme überlagert und verzerrt werden kann (Neher und Sakmann 1992). Neher und Sakmann beschreiben in ihrem Paper verschiedene Techniken der Patch-Clamp-Methode (Neher und Sakmann 1992). Wir benötigten zum Einbringen verschiedener pharmakologischer Inhibitoren einen direkten Zugang zum Intrazellulärraum der Zelle. Deswegen erzeugten wir unter weiterem Unterdruck ein Riss der Zellmembran im Patch, wie in Abbildung 6 dargestellt.

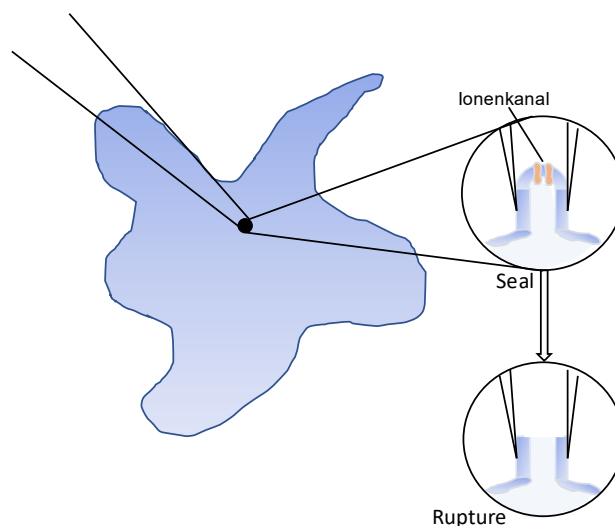


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Patch-Clamp Methode. Zunächst wird durch Unterdruck die Membran an die Pipette gesaugt, der sogenannte Seal. Durch weitere Unterdruck-Applikation kommt es zum Rupture. Eigene Abbildung nach Neher und Sakmann 1992

2.2.2. Aufbau und Ablauf der Messung

Die isolierten Kardiomyozyten wurden zunächst in Stopp-Lösung (Tab. 4) 7 min zum Setteln stehen gelassen, um die toten Zellen und Zelltrümmer im Überstand von den lebenden Zellen zu trennen. Nach Abnahme des Überstandes wurde das entstandene Pellet mit Stopplösung erneut aufgewirbelt und für weitere 7 min setteln gelassen. Nach erneutem Abnehmen des Überstandes wurde je nach Pellet-Größe 5-10 ml Badlösung (Tab. 5) auf die Zellen gegeben.

Badlösung [Na ⁺] 135 mM		
NaCl (VWR Chemicals)	13	mmol/L
Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) (Carl Roth GmbH)	5	mmol/L
CsCl (SIGMA-Aldrich)	4	mmol/L
MgCl ₂ (Carl Roth GmbH)	2	mmol/L
Glucose (Carl Roth GmbH)	10	mmol/L
HEPES (Carl Roth GmbH)	10	mmol/L

Tab. 5: Badlösung

Im Anschluss wurden je 400 µl der Zellsuspension auf die Glasböden der Messkammer pipettiert. Die Messkammern wurden zuvor mit Seife gereinigt und mit 1,5 µl Laminin der Firma SIGMA-Aldrich beschichtet. Laminin ist ein kollagenähnliches Glykoprotein mit Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren und dient somit der Zellhaftung an den Glasböden (Timpl et al. 1978).

Nach 20 min setteln der Zellen wird der Überstand verworfen und 30 Minuten mit 400 µl Lösung der jeweiligen Messgruppe inkubiert. Insgesamt ergeben sich für den Versuchsaufbau der Patch-Clamp Messreihe 9 verschiedene Gruppen (Tab. 6). H-89 (10 µM) ist dabei ein Proteinkinase-Inhibitor, mit größter Wirkung auf die Proteinkinase A. H89 wurde zur weiteren Untersuchung des Signalwegs von Liraglutid und dessen Wirkung auf CASK benutzt.

Messlösungen	1 ml Badlösung +		
Vehicle	DMSO (Carl Roth GmbH)	14,1	nmol/L
Isoprenalin	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100	nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+ 14,1	nmol/L
Isoprenalin + Liraglutid	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100	nmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+ 50	nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+ 14,1	nmol/L
Isoprenalin + H89	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100	nmol/L
	+H89 (LKT Laboratories)	+10	µmol/L
Isoprenalin + Liraglutid + H89	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100	nmol/L
	+Liraglutide (Hycultec)	+50	nmol/L
	+H89 (LKT Laboratories)	+10	µmol/L
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+DMSO (Carl Roth GmbH)	+ 14,1	nmol/L
H ₂ O ₂ + Liraglutid	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+50	nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+14,1	nmol/L
H ₂ O ₂ + H89	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ H89 (LKT Laboratories)	+ 10	µmol/L
H ₂ O ₂ + Liraglutid + H89	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+ 50	nmol/L
	+ H89 (LKT Laboratories)	+10	µmol/L

Tab. 6: Messlösungen der Patch-Clamp Messungen

Nach Inkubation wurde die Lösung vorsichtig verworfen und die Messkammer erneut durch 400 µl der entsprechenden Lösung befüllt. Durch die schnelle Wirksamkeit von Isoprenalin (100 nM), einem nicht selektiven β -Sympathomimetikum, sowie H₂O₂, welches zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Aktivierung der CaMKII genutzt wurde, wurden beide Substanzen erst unmittelbar vor der Messung zur Inkubation gegeben. Die Messkammer wurde drauffolgend in eine entsprechende

Vorrichtung unter das Mikroskop gelegt und die Badelektrode in eine Ecke der Messkammer platziert. Die Badelektrode lag somit im Extrazellulärraum. Unter mikroskopischer Sicht wurde nun eine Zelle mit guten morphologischen Gütekriterien ausgewählt. Dabei ist auf eine scharf begrenzte Zellmembran und geringe intrazelluläre Vakuolisierung zu achten, um eine möglichst vitale Kardiomyozyte zu identifizieren. Durch Auswaschen des Kalziums während der Zellisolation kontrahieren die Zellen unter dem Mikroskop nicht. Abbildung 7 zeigt eine typische Aufsicht in 40-facher Vergrößerung.

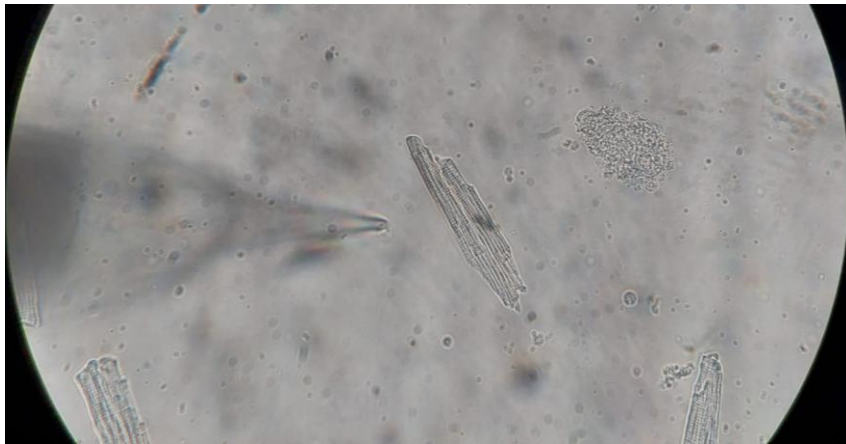


Abbildung 7: Aufsicht auf Kardiomyozyte mit Patchpipette bei 40-facher Vergrößerung. Eigene Abbildung.

Zur Herstellung der Patchpipette wurde eine Glaskapillare aus Borsilikatglas (Firma World Precision Instruments) verwendet. Die Glaskapillare wurde in einen Pipettenpuller der Firma DMZ Zeitz eingespannt. Über ein Hitzefilament und Zug an beiden Seiten der Kapillare „zieht“ der Puller aus der Kapillare zwei Pipetten. Am Puller kann die applizierte Hitze, die Zugkraft, die Dauer der Wärmeeinwirkung und viele weitere Variablen eingestellt werden, um die gewünschte Pipettenöffnung und damit einen optimalen Pipettenwiderstand zwischen 2 und 4 M Ω zu erreichen (Roberts 1987). Zu kleine bzw. zu große Widerstände erschweren den Giga-Seal der Zelle sowie das Einreißen. Zudem führen hohe Zugangswiderstände zur Verfälschung der gemessenen intrazellulären Spannungen und damit auch zu verfälschten abgeleiteten Strömen (Armstrong und Gilly 1992). Die Pipette wurde mittels Einfüllhilfe der Firma World Precision Instruments und vorgeschalteten Filter (Firma Millex) mit Pipettenlösung (Tab. 7) befüllt und über der Patchelektrode am Mikromanipulator (InjectMan NI 2, eppendorf) fixiert.

Pipettenlösung 100 nmol/L Ca^{2+}		
CsCl (SIGMA-Aldrich)	95	mmol/L
Cs-Glutamate (SIGMA-Aldrich)	40	mmol/L
NaCl (VWR Chemicals)	10	mmol/L
MgCl_2 (Carl Roth GmbH)	0,92	mmol/L
EGTA (Carl Roth gmbH)	1	mmol/L
Mg-ATP (SIGMA-Aldrich)	5	mmol/L
Li-GTP (SIGMA-Aldrich)	0,3	mmol/L
CaCl_2 (SERAG-Wiessner gmbH)	0,36	mmol/L
Nifluminsäure (SIGMA-Aldrich)	0,03	mmol/L
Nifedipin (SIGMA-Aldrich)	0,02	mmol/L
Strophanthidin (SIGMA-Aldrich)	0,004	mmol/L
HEPES (Carl Roth GmbH)	5	mmol/L

Tab. 7 Pipettenlösung

Die Pipettenlösung enthält verschiedene Inhibitoren, um andere Ströme neben dem zu messendem Natriumstrom zu unterdrücken. So bildet EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 1 mM) Komplexe mit Kalzium und bindet diese somit. Nifluminsäure (0,03 mM) inhibiert Chlorid-Kanäle sowie T-Typ Kalzium-Kanäle, wobei Nifedipin (0,02 mM) vor allen L-Typ Kalzium-Kanäle hemmt. Beide Substanzen stören so die Überlagerung der Natriummessung mit ungewollten Kalziumströmen. Strophanthidin (0,004 mM) ist ein Cardenolid-Glykosid und hemmt die Na^+/K^+ -ATPase und trägt so ebenfalls zur Messung eines alleinigen Natrium-Signals bei. Anschließend wurde die Pipette in die Badlösung gefahren und der initiale Pipettenwiderstand abgelesen. Es wurden nur Pipetten mit Widerständen zwischen 2 und 4 $\text{M}\Omega$ verwendet. Zur Beobachtung des Pipettenwiderstandes und später der Messung wurde das Programm PatchMaster v2x90.5 der Firma HEKA Elektronik verwendet. Die Pipette wurde dann unter Sicht mithilfe des Mikromanipulators auf die zu messende Zelle gefahren. Ein Anstieg des initialen Pipettenwiderstandes gilt als Zeichen des Kontaktes mit dem Sarkolemm. Durch Anbringen eines Unterdrucks über eine 5 ml Spritze wird die Zelle in den Giga Seal gebracht. Aufbringen eines größeren Unterdruckes führt anschließend zum Einreißen der Zelle unter der Pipettenöffnung. Nach 3-minütiger Inkubation des Intrazellularraums mit den Inhibitoren in der

Pipettenlösung wurde das Messprotokoll im whole cell Modus des Programms PatchMaster gestartet. Das Messprotokoll beinhaltet 10 Durchgänge, sogenannte „sweeps“. Jeder sweep dauert 1,098 s. Dabei wird am Anfang jedes sweeps eine Spannung von -120 mV über die Elektroden angelegt. Nach 49 ms erfolgt eine Depolarisation für 1,005 s mit -20 mV. Abschließend folgte eine Repolarisierung erneut bei -120 mV für 44 ms. Nach der Messung wurde die Patchpipette von der Zelle gefahren und eine neue mit Pipettenlösung befüllte Pipette über der Elektrode platziert, sodass eine weitere Zelle gemessen werden kann. Jede Kammer wurde für 45 min gemessen.

2.2.2.1. Messung der Wirkung über den GLP-1 Rezeptor

Zur Beurteilung der Abhängigkeit der beobachteten Effekte vom GLP-1 Rezeptor wurde der GLP-1 Rezeptor Antagonist Exendin 9-39 (100 nM) verwendet. Dieser bindet ebenfalls am GLP-1 Rezeptor, unterbindet so aber eine Wirkung von Liraglutid über den gleichen Rezeptor. Aus labortechnischen Gründen wurde diese Messreihe erst nach den vorherigen Untersuchungen durchgeführt und sind somit nicht

Messlösungen Exendin- 1 ml Badlösung + 9-39 Versuchsreihe			
WT _e -Vehicle	DMSO (Carl Roth GmbH)	14,1	nmol/L
WT _e -H ₂ O ₂	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+14,1	nmol/L
WT _e -H ₂ O ₂ +Liraglutide	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+50	nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+14,1	nmol/L
WT _e -H ₂ O ₂ +Liraglutide+Exendin 9-39	Hydrogenperoxide (Carl Roth GmbH)	100	µmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+50	nmol/L
	+ Exendin 9-39 (SIGMA-Aldrich)	+100	nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+14,1	nmol/L

Tab. 8: Messlösungen der Exendin 9-39 Versuchsreihe

vergleichbar. Die entsprechenden Ergebnisse sind unter Ergebnisse als WT_e gekennzeichnet. In der beschriebenen Versuchsreihe ergaben sich somit abweichend die unter Tab. 8 dargestellten Messlösungen.

2.2.3. Auswertung der Patch-Clamp Messungen

Die erzeugten Messungen wurden durch das Programm PatchMaster in eine ASC-Datei umgewandelt. Dabei wurde die gemessene Stromstärke für die jeweilige Messung alle 0,2 ms abgelesen und die Werte in eine Excel Tabelle überschrieben. Somit ergibt sich eine Excel-Datei mit 54.650 Messpunkten, wobei ein sweep 5.465 Messpunkte enthält. Zur Auswertung wurde lediglich der erste sweep, in Ausnahmefällen auch der zweite sweep, verwendet, da hier die Zelle noch am wenigsten depolarisiert und damit gestresst wurde. Zur Berechnung des leaks über die Elektrode wurde der Mittelwert der Stromstärken zwischen 1,0412 s und 1,0492 s verwendet. Das leak ist somit eine Darstellung der Stromstärke gegen Ende des sweeps, als Zeichen der Entfernung der gemessenen Stromstärke von der 0-Linie. Messungen mit einem leak von über 1,0 fA wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen. Von jedem der 5.465 Messpunkte wurde der leak abgezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu schaffen.

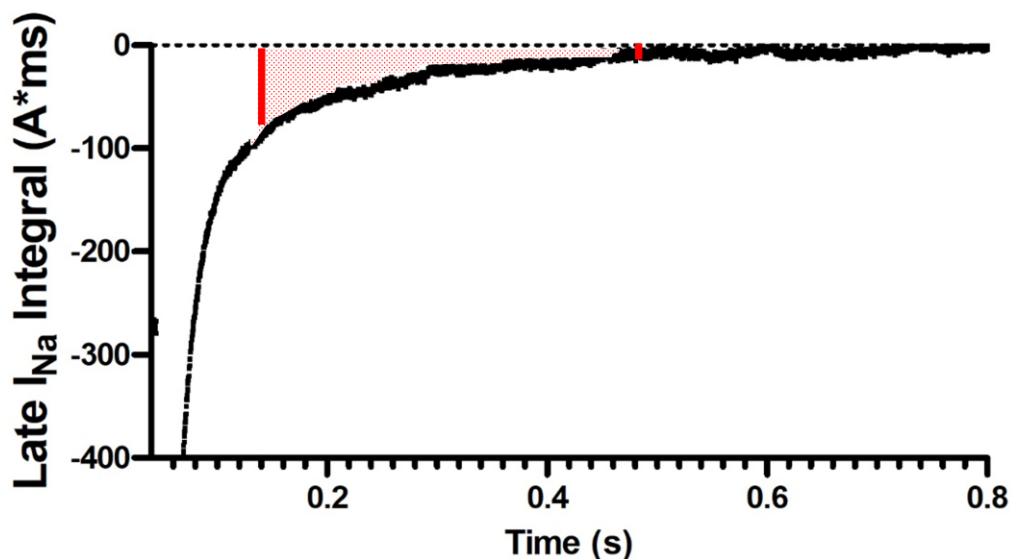


Abbildung 8: Originalaufnahme einer Patch-Clamp-Messung mithilfe des Programms PatchMaster. Zu erkennen ist der initiale Natrium-Einstrom und der mit Isoprenalin (100 nM) induzierte, späte Natriumstrom als Integral der Stromstärke über den Zeitraum von 100-500ms.

Nach dieser leak-Korrektur wurde das Integral der Stromstärken über den Zeitraum von 100-500ms gebildet und durch die Membran-Kapazität, ermittelt durch das Messprogramm PatchMaster, geteilt (Abbildung 8). Da der späte Natriumstrom abhängig von der Zellgröße ist, wird der späte Natriumstrom mithilfe der Membran-Kapazität auf die Zellgröße normiert. Der Messbereich 100-500 ms dient der Ermittlung des späten Natriumstroms, nach der Öffnung der schnell öffnenden Natriumkanäle Nav1.5, welche meist zwischen 40-60 ms nach Depolarisation öffnen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde pro Messtag der Mittelwert pro Maus gebildet.

2.3. Epifluoreszenzmikroskopie

Bereits 1904 entdeckte August Köhler, beim Versuch das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie zu steigern, die Möglichkeiten der emittierten Fluoreszenz von Objekten, welche mit UV-Licht angeregt wurden (Gerlach 2009).

Das grundlegende Prinzip der Fluoreszenz und somit auch der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass sich Elektronen fluoreszierender Moleküle durch Absorption eines Photons von einem energiearmen Grundzustand S_0 in einen energiereicheren Zustand S_1 übertragen lassen (Cox 2012). Wenige Nanosekunden nach der Anregung fällt das Elektron unter Aussenden eines Photons wieder in seinen Grundzustand S_0 zurück. Das emittierte Photon kann dann, als Fluoreszenz detektiert werden. Dabei sind die emittierten Photonen deutlich energieärmer und somit langwelliger als die Photonen, die zur Anregung des Moleküls verwendet werden, der sogenannte Stokes-Shift (Cox 2012).

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie werden Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff beladen, welcher unter Anregung mit hoch energetischem Licht langwellige Photonen emittiert. Zur Messung des intrazellulären Kalzium-Gehaltes wurde der Farbstoff FURA2-AM der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. FURA2 ist ein Chelatbildner mit freien, zweiwertigen Kationen (Gryniewicz et al. 1985). Zur Bildung eines Chelat-Komplexes mit Kationen sind Anionen im Farbstoff unabdingbar. Durch die negative Ladung im Farbstoff ist eine Passage der Zellmembran jedoch massiv erschwert, weshalb der Farbstoff mit Acetoxymethylester (-AM) verestert ist und so seine negative Ladung verliert. Nach Diffusion des Farbstoffes durch die Zellmembran

wird die Estergruppe durch unspezifische, zelleigene Esterasen vom Farbstoff abgespalten und der Farbstoff liegt in seiner aktiven Form vor. Ein Wiederaustreten des Farbstoffes ist nun mit negativer Ladung deutlich erschwert.

Durch Auswaschen des Farbstoffes im Extrazellulärraum können die intrazellulären Kalzium-Konzentrationen isoliert untersucht werden.

FURA2-AM zählt zu den ratiometrischen Farbstoffen. Ratiometrische Farbstoffe emittieren sowohl in freier Form als auch in Komplex-gebundener Form Photonen einer ähnlichen Wellenlänge. FURA2-AM emittiert Photonen mit einer Wellenlänge um 510 nm. Jedoch unterscheiden sich bei ratiometrischen Farbstoffen die Absorptionsmaxima bei Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge. Der nicht komplexierte Farbstoff besitzt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge um 360 nm. Im Gegensatz dazu besitzt der komplexierte Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 340 nm Wellenlänge. Zur Untersuchung der wechselnden intrazellulären Kalziumgehalte bei Kontraktion der Kardiomyozyten wählten wir eine Anregung mit 380 nm zum Erfassen des nicht beladenen Farbstoffs.

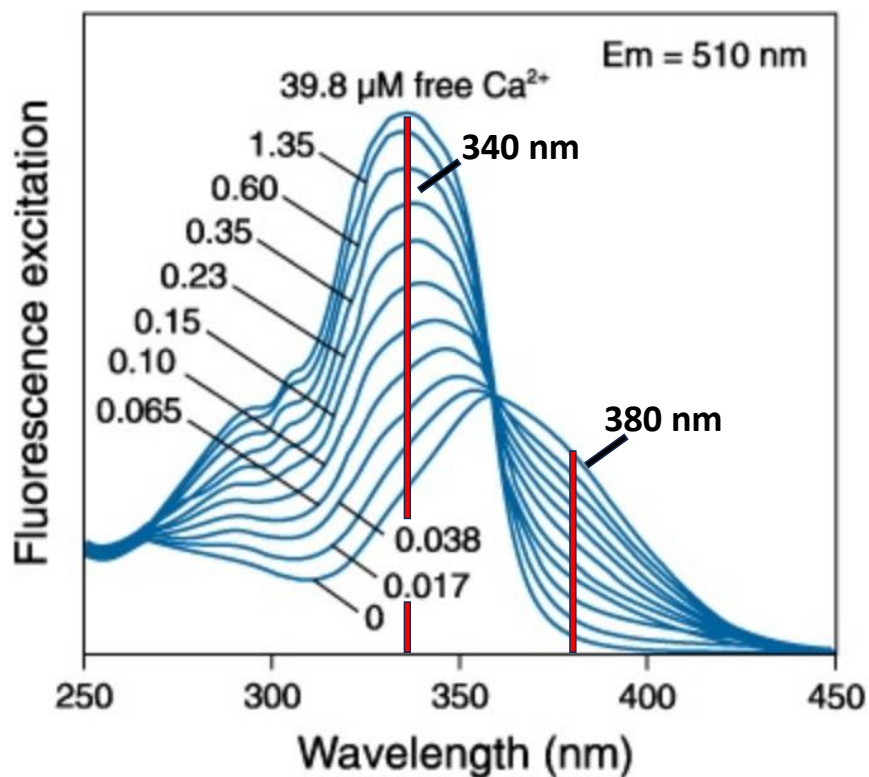


Abbildung 9: Abhängige Fluoreszenz von FURA2 in unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen bei 510 nm. Modifizierte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific aus Thermo Fisher Scientific 2010a.

In Abbildung 9 wird deutlich, dass FURA2-AM bei 380 nm eine deutlich bessere Dynamik aufweist. Bei 380 nm emittiert die Kalzium-freie Kontrolllösung immer noch ausreichend viele Photonen zur Erfassung, wohingegen die gesättigte Kalzium-Lösung nahezu keine Photonen mehr emittiert.

Durch eine alternierende Anregung der Zellsuspension mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm und der anschließenden Erfassung der Fluoreszenz lässt sich eine Ratio zwischen gebundenem („Nominator“) und ungebundenem („Denominator“) Farbstoff darstellen. Die Ratio lässt sich so als Kalziumtransient während einer Kontraktion interpretieren.

2.3.1. Ablauf und Messprotokoll bei murinen Kardiomyozyten

Da durch die Zellisolation ein Großteil des Kalziums aus der Zelle herausgewaschen wurde, erfolgte anschließend ein über mehrere Schritte dauernder Kalzium-Aufbau (0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM) bis hin zur physiologischen Kalzium-Konzentration von 1 mM (Allen et al. 1984). Die Zellsuspension wurde für jeweils 7 min in der genannten Lösung belassen, der Überstand abschließend verworfen und das Zellpellet durch die höhere Kalzium-Lösung aufgewirbelt.

400 µL der Zellsuspension aus der 0,8 mM Kalzium-Lösung wurden direkt auf geputzte und mit 2 µL Laminin beschichtete Messkammern gegeben. Nach 20 min hafteten die Zellen ausreichend gut an der Messkammer, sodass die Inkubation mit dem Farbstoff erfolgen konnte. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, da der Farbstoff unter Beleuchtung zerfällt. Die Zellsuspension wurde zunächst 15 min mit 250 µL Farbstoff-Lösung inkubiert. Die Bestandteile der Farbstoff-Lösung waren einerseits 5 µM Farbstoff FURA2-AM, 0,5 µL Pluronic-Säure (life technologies) und 500 µL der jeweiligen Messlösung (Tab. 9+Tab. 10), wobei Isoprenalin aufgrund der schnellen Wirksamkeit erst unmittelbar vor der Messung hinzugegeben wurde. Die Pluronic-Säure ist ein nicht-ionisches Tensid-Polyol, welches die Auflösung von wasserunlöslichen Farbstoffen in physiologischen Medien erleichtert. Es hilft dabei den unspezifischen Esterasen bei der Ablösung der Acetoxymethyl-Ester.

Normaltyrode		
	KCl (Carl Roth GmbH)	4 mmol/L
	NaCl (VWR Chemicals)	140 mmol/L
	MgCl ₂ (Carl Roth GmbH)	1 mmol/L
	CaCl ₂ (SIGMA-Aldrich)	1 mmol/L
	HEPES (Carl Roth GmbH)	5 mmol/L
	Glucose (Carl Roth GmbH)	10 mmol/L

Tab. 9: Normaltyrode

Messlösungen	50ml Normaltyrode +	
Epifluoreszenz		
Vehicle	DMSO (Carl Roth GmbH)	1 µmol/L
Isoprenalin	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100 nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+ 1 µmol/L
Isoprenalin + Liraglutid	Isoprenaline hydrochloride (SIGMA-Aldrich)	100 nmol/L
	+ Liraglutide (Hycultec)	+ 50 nmol/L
	+ DMSO (Carl Roth GmbH)	+ 1 nmol/L

Tab. 10: Messlösungen Epifluoreszenz

Anschließend folgte eine weitere Inkubation für 15 min mit der reinen jeweiligen Messlösung. Einerseits zum Auswaschen des Farbstoffes aus dem Extrazellarraum, andererseits um den Esterasen Gelegenheit zur Entfaltung ihrer Wirkung zu bieten. Nach dem Fixieren der Messkammer unter dem Mikroskop wurde ein Perfusionssystem bestehend aus Infusionssystem, welches mit 62 ml/h Messlösung der Messkammer zugab, und einer Absaugung an der Messkammer angebracht. Vor der Messung erfolgte eine 10-minütige Perfusion zum Einbringen von Isoprenalin. Zudem wurden zwei Elektroden an der Messkammer platziert, welche die Zellen stimulierten. Das Messprotokoll umfasste eine klare Abfolge von verschiedenen Stimuli und Messungen der einzelnen Kardiomyozyten. Nach optimaler Einstellung der Myocam über einem Kardiomyozyten erfolgte die Messung der Kalziumtransienten sowie der Sarkomer-Länge für 30 s bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz (Abbildung 10).

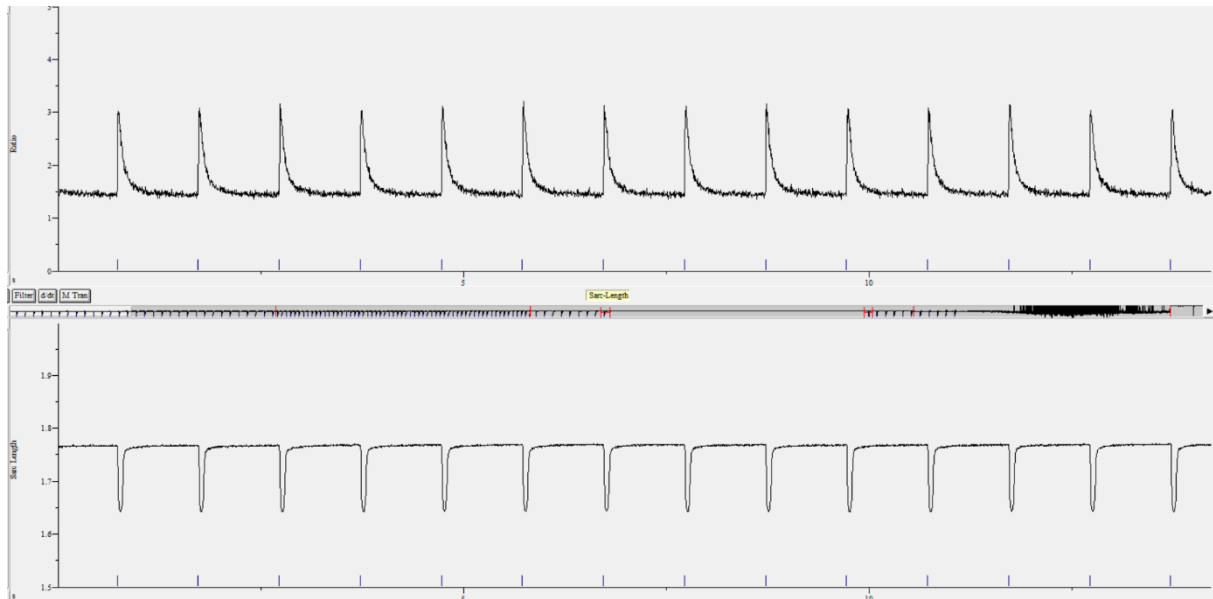


Abbildung 10: Originalaufnahme einer Epifluoreszenzmessung bei 1 Hz mithilfe von IonWizard. Oben Kalzium-Transient, dargestellt als Ratio aus Nominator und Denominator; Unten Sarkomer-Länge

Anschließend erfolgten die Messungen ebenfalls für 30 s bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Nachdem Zurückstellen der Stimulation auf eine Geschwindigkeit von 1 Hz erfolgte eine Stimulationspause von 30 s. Dies diente dem Vergleich von Kalziumtransient und Sarkomer-Länge vor und nach der Pause, zum Quantifizieren einer Auffüllung des SR während der Stimulationspause. Abschließend erfolgte die Messung während Zugabe von Koffein-Lösung (10 mM) und Pausieren der Stimulation. Koffein steigert die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2-Rezeptors, sodass sich ein Großteil des im SR sequestrierten Kalziums in das Zytosol entleert. Die Messung dient der Abschätzung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes, welcher ein Maß für das Maximum der für den Ca^{2+} -Transienten zur Verfügung stehenden Ca^{2+} -Konzentration darstellen kann. Da die Koffein-Lösung über eine Kanüle oberhalb der Messkammer eingebracht wurde, wirkt diese auch auf Kardiomyozyten in der Umgebung der zu messenden Zelle. Um diesen Effekt entgegenzuwirken, wurden in den folgenden Messungen ausschließlich weit entfernte Zellen zur Messung herangezogen und die maximale Zellzahl pro Messkammer auf $n=4$ begrenzt.

2.3.2. Auswertung der Epifluoreszenzmessungen

Die Auswertung sowie die Messung der emittierten FURA2-Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm IonWizard der Firma IonOptix. Dabei konnte über das Programm sowohl für die Kalziumtransienten als auch für die Sarkomer-Länge ein Durchschnitt über 30 s ermittelt und dieser graphisch dargestellt werden. Die Analyse der kumulativen Transienten bzw. Sarkomerlängenverkürzung ergab dann Werte für Baseline, Amplitude und Rückbildungszeiten. Dabei gilt die Baseline als Maß für die Ratio des diastolischen Kalziumgehalts aus der folgend die Amplitudenhöhe bzw. der Peak der systolischen Kalziumfreisetzung berechnet werden kann. Die Rückbildungszeit beschreibt die Kinetik der Kalziumaufnahme zurück in das SR. Auch hier wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Mittelwert pro Maus gebildet.

2.4. Statistik

Die in dieser Arbeit verwendete statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism erstellt. Die Anzahl n jeder Messung entspricht der Anzahl der Mittelwerte, die pro Maus berechnet wurden. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz zweier Gruppen wurde der ungepaarte T-Test und zum Vergleich mehrerer Gruppen der one-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test für multiple Vergleiche verwendet, da dadurch Unterschiede von mehreren Gruppen gut vergleichbar sind, ohne den α -Fehler zu stark zu erhöhen. Zur Prüfung mehrerer unabhängiger Variablen, wie bei der Epifluoreszenzmessung mit Messungen bei 1 Hz und 2 Hz, wurde der 2-way ANOVA mit Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche verwendet. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet, gekennzeichnet als ein Sternchen. Außerdem wurden p-Werte unter 0,01 mit zwei Sternchen, p-Werte unter 0,001 mit drei Sternchen und p-Werte unter 0,0001 mit vier Sternchen besonders gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Liraglutid inhibiert den durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten proarrhythmogenen späten Natriumstrom

Zur Untersuchung des späten Natriumstroms in isolierten murinen Kardiomyozyten verwendeten wir das Modell der H_2O_2 -induzierten CaMKII-Aktivierung. Dies hat den Hintergrund, dass der späte Natriumstrom physiologisch nicht oder nur gering ausgeprägt ist und somit eine mögliche Inhibition auch nicht detektierbar wäre. Eine CaMKII-Aktivierung durch Induktion reaktiver Sauerstoffspezies mittels H_2O_2 -Exposition simuliert hierbei die auch in der Herzinsuffizienz z.T. über Oxidation erhöhte Aktivität der CaMKII. Die CaMKII-Aktivierung führt hierbei zu einer vermehrten Phosphorylierung des Nav1.5 und somit zu einer Erhöhung des späten Natriumstroms. Eine Verminderung des späten Natriumstroms würde somit indirekt für eine verminderte CaMKII-Aktivität sprechen. Die WT-Ctrl Gruppe diente hierbei als die Kontrollgruppe und wurde nicht mit Liraglutid oder H_2O_2 präinkubiert (aber dennoch

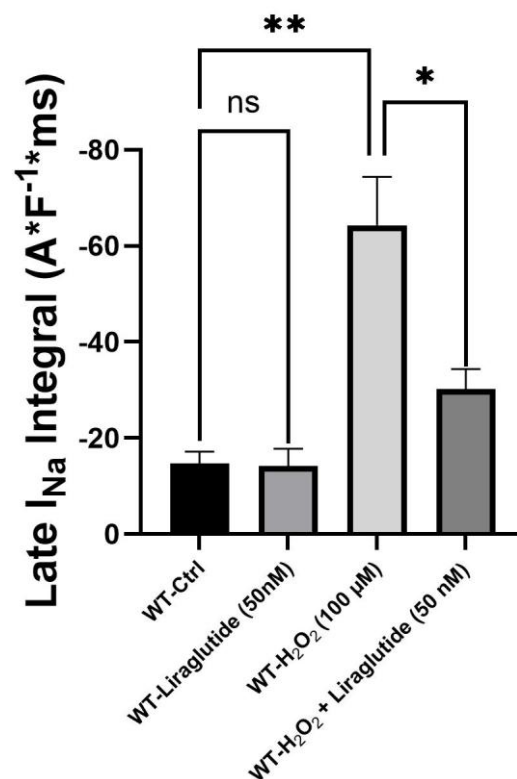


Abbildung 11: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter Liraglutid Präinkubation, mit Stimulation mit H_2O_2 und Präinkubation mit Liraglutid und anschließender oxidativer H_2O_2 -Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe

zeitlich gleichbehandelt). Bei der WT-Liraglutid und der WT-H₂O₂ + Liraglutid wurden die murinen Kardiomyozyten entsprechend 30 min mit 50 nM Liraglutid vorinkubiert. Die Gruppen WT-H₂O₂ und WT-H₂O₂ + Liraglutid wurden zur Induktion des späten Natriumstroms unmittelbar vor der Messung mit 100 µM Wasserstoffperoxid inkubiert. Eine exakte Übersicht über die verwendeten Messgruppen ist im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben. Die Messung des späten Natriumstroms erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp Methode. Hierbei wurde nach initialer Depolarisation das Integral der Stromstärke zwischen 100-500ms nach Depolarisation gebildet. Die Untersuchung des späten Natriumstroms in Wildtyp-Kardiomyozyten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe mit H₂O₂ (100 µM) (**WT-Ctrl**: $-14,73 \pm 4,901$ Ams/F, $n=4$ vs. **WT-H₂O₂**: $-64,32 \pm 28,48$ Ams/F, $n=6$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche). Interessanterweise zeigte eine Präinkubation mit Liraglutid (50 nM) vor der Zugabe von H₂O₂ ein signifikantes Ausbleiben des Anstiegs des späten Natriumstroms, ohne dabei einen signifikanten Einfluss auf den basalen späten Natriumstrom ohne H₂O₂ auszuüben (**WT-H₂O₂**: $-64,32 \pm 28,48$ Ams/F, $n=6$ vs. **WT-H₂O₂ + Liraglutide**: $-30,17 \pm 9,407$ Ams/F, $n=5$, $p<0,05$; **WT-Ctrl**: $-14,73 \pm 4,901$ Ams/F, $n=4$ vs. **WT-Liraglutide**: $-14,18 \pm 8,089$ Ams/F, $n=5$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 11).

3.2. Liraglutid inhibiert den durch beta-adrenerger Stimulation induzierten proarrhythmogenen späten Natriumstrom

Ein weiterer Weg der Induktion des späten Natriumstroms über Aktivierung der CaMKII lässt sich über beta-adrenerge Stimulation der CaMKII mittels Isoprenalin erreichen. Als Überprüfung des im vorherigen Experiment beobachteten inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom untersuchten wir daher eine weitere, nicht primär oxidative Aktivierung der CaMKII. Die beta-adrenerge Stimulation der CaMKII erfolgt hierbei über eine Erhöhung von cAMP durch Aktivierung der Proteinkinase A durch Isoprenalin. Die cAMP-Erhöhung führt über eine Aktivierung von Epac zu einer gesteigerten CaMKII-Aktivität, welche zu einer Erhöhung des späten Natriumstroms führt. Durch die Stimulation lassen sich Unterschiede des späten Natriumstroms deutlich besser detektieren und geben somit indirekt Aufschluss über die CaMKII-

Aktivität. Die Gruppen WT-Isoprenalin und WT-Isoprenalin + Liraglutid wurden, analog zur vorherigen Untersuchung, anstatt mittels H_2O_2 zur oxidativen Aktivierung nun mit 100 nM Isoprenalin unmittelbar vor der Messung inkubiert. Der späte Natriumstrom wurde hierbei ebenfalls mit Hilfe der Patch-Clamp Technik erfasst. Die Beobachtungen des späten Natriumstroms unter beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (100 nM) zeigten eine signifikante Induzierbarkeit des späten Natriumstroms im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Wildtyp-Versuchsreihe (**WT-Ctrl**: $-21,62 \pm 10,34 \text{ Ams/F}$, $n=4$ vs. **WT-Isoprenalin**: $-62,56 \pm 16,44 \text{ Ams/F}$, $n=9$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 12).

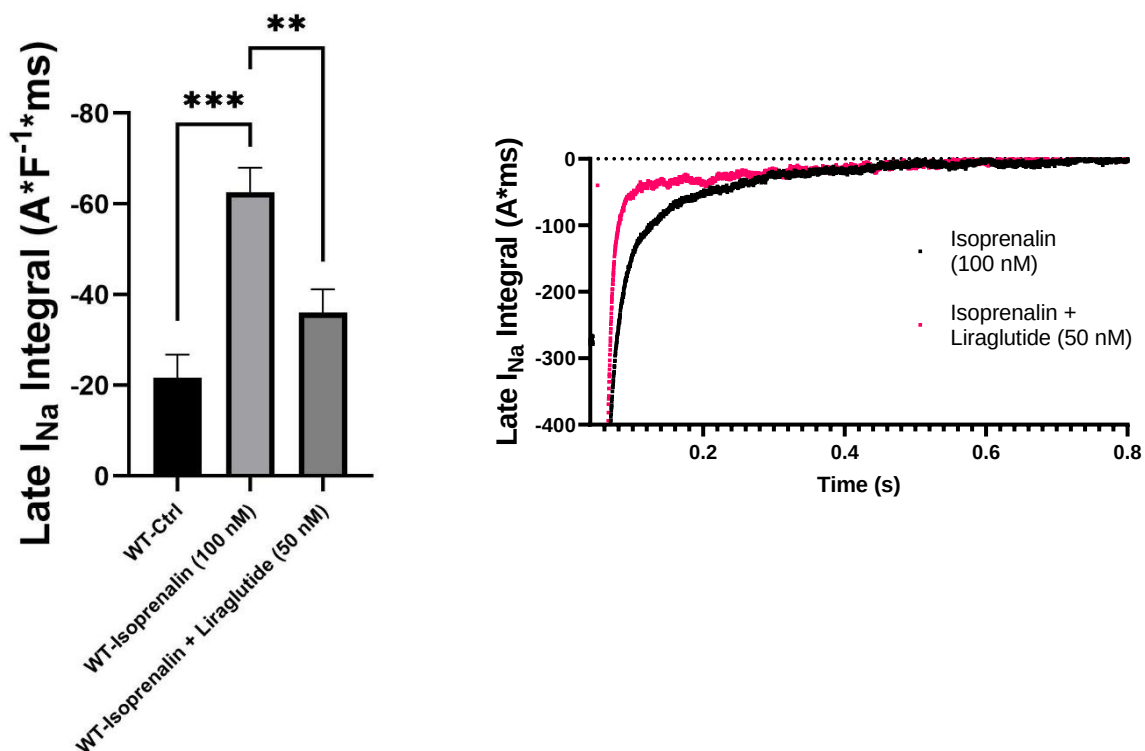


Abbildung 12: Der späte Natriumstrom im Wildtypen mit Stimulation mit Isoprenalin

Links: Der späte Natriumstrom im Wildtypen mit Stimulation mit Isoprenalin oder Präinkubation mit Liraglutid und anschließender β -adrenerger Isoprenalin-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe

Rechts: Exemplarische Originalaufnahme des späten Natriumstroms im zeitlichen Verlauf. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation mit Isoprenalin und vorheriger Präinkubation mit Liraglutid

Auch hier konnte der späte Natriumstrom durch Präinkubation mit Liraglutid (50 nM) vor der Isoprenalin-Stimulation signifikant gesenkt werden (**WT-Isoprenalin**: $-62,56 \pm 16,44 \text{ Ams/F}$, $n=9$ vs. **WT-Isoprenalin + Liraglutide**: $-36,05 \pm 13,81 \text{ Ams/F}$, $n=7$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche).

Die beiden Wildtyp-Versuchsreihen mit H_2O_2 sowie Isoprenalin lassen einen inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom vermuten. Dieser Effekt scheint dabei über eine verminderte Aktivität der CaMKII zu fungieren, da sich der Effekt über zwei verschiedene Stimulationswege der CaMKII wiederholen ließ.

3.3. Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird über CASK vermittelt

Zur Untersuchung, inwiefern der inhibitorische Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom über CASK vermittelt werden könnte, wiederholten wir die Messungen der ersten beiden Versuchsreihen im transgenen CASK-Modell ohne kardiale CASK-Expression (hier als CASK-KO beschrieben). Im Vergleich der Wildtyp-Kontrollgruppe mit der Kontrollgruppe der Knock-out Gruppe zeigte sich bereits basal ein signifikant höherer später Natriumstrom in der CASK-defizienten Gruppe (**WT-Ctrl**: $-14,73 \pm 4,901$ Ams/F, $n=4$ vs. **CASK-KO Ctrl**: $-58,89 \pm 17,55$ Ams/F, $n=13$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 13).

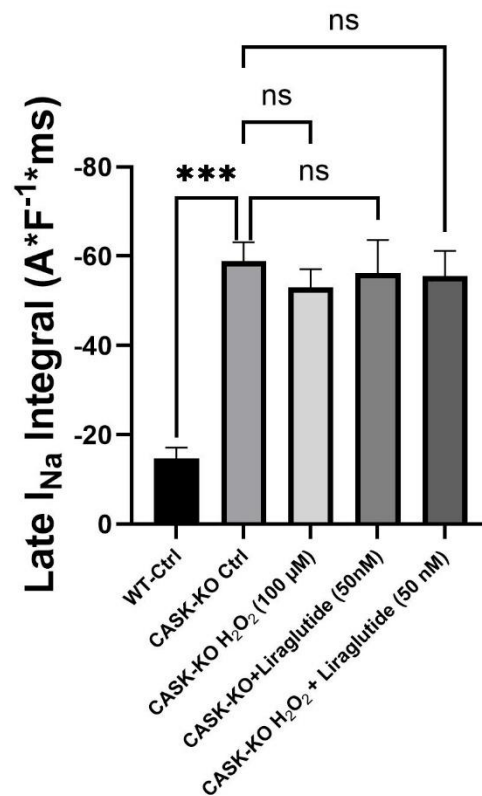


Abbildung 13: Der späte Natriumstrom im Vergleich zwischen Wildtyp und CASK-Knock-out. Stimulation der Knock-out Gruppe mit H_2O_2 und Präinkubation mit Liraglutid

Auch die Stimulation der CaMKII mittels H_2O_2 führte zu keiner weiteren Steigerung des späten Natriumstroms in der CASK-defizienten Gruppe im Vergleich zur Kontrollsubstanz (**CASK-KO Ctrl**: $-58,89 \pm 17,55$ Ams/F, $n=13$ vs. **CASK-KO H_2O_2** : $-53,03 \pm 9,932$ Ams/F, $n=6$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 13).

Diese Ergebnisse lassen eine bereits basal erhöhte CaMKII-Aktivität in CASK-defizienten Kardiomyozyten mit nachfolgend gesteigertem CaMKII-abhängigen späten Natriumstrom vermuten. Die inhibitorische Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom, welche in der Wildtyp-Gruppe beobachtet werden konnte, konnte interessanterweise in der CASK-defizienten Gruppe weder mit noch ohne Induktion mit H_2O_2 im Vergleich zur CASK-defizienten Gruppe mit Kontrollsubstanz-Exposition bestätigt werden (**CASK-KO Ctrl**: $-58,89 \pm 17,55$ Ams/F, $n=13$ vs. **CASK-KO + Liraglutide**: $-56,17 \pm 23,52$ Ams/F, $n=4$, $p=ns$; **CASK-KO Ctrl**: $-58,89 \pm 17,55$ Ams/F, $n=13$ vs. **CASK-KO H_2O_2 + Liraglutide**: $-55,6 \pm 12,44$ Ams/F, $n=5$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 13).

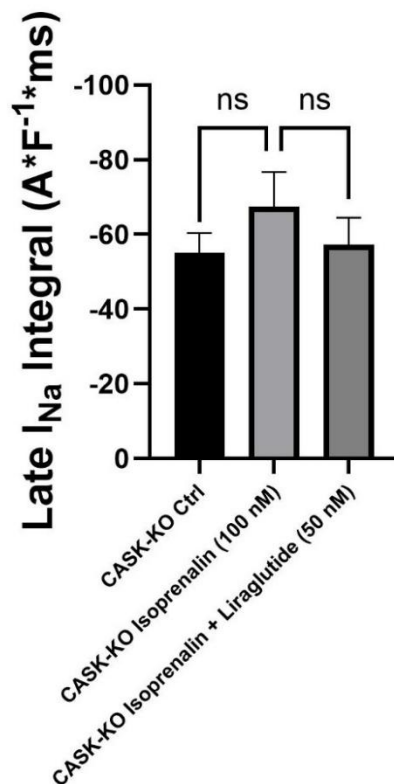


Abbildung 14: Der späte Natriumstrom unter Knock-out von CASK. Stimulation mit Isoprenalin und unter Präinkubation mit Liraglutid

Auch unter Stimulation mit Isoprenalin in der CASK-defizienten Gruppe zeigte sich keine signifikante Steigerung des späten Natriumstroms im Vergleich zur CASK-defizienten Kontrollgruppe (**CASK-KO Ctrl**: $-55,04 \pm 19,19$ Ams/F, $n=13$ vs. **CASK-KO Isoprenalin**: $-67,34 \pm 26,43$ Ams/F, $n=7$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 14).

Ebenfalls zu beobachten war der ausbleibende Effekt unter Liraglutid Präinkubation mit nachfolgender Stimulation mit Isoprenalin auf den späten Natriumstrom im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Isoprenalin (**CASK-KO Isoprenalin**: $-67,34 \pm 26,43$ Ams/F, $n=7$ vs. **CASK-KO Isoprenalin + Liraglutide**: $-57,25 \pm 18,96$ Ams/F, $n=7$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 14).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit CASK-defizienten Kardiomyozyten deuten auf einen CASK abhängigen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom hin. Zudem scheint CASK bereits basal einen inhibitorischen Effekt auf den späten Natriumstrom zu besitzen, da in CASK-defizienten Kardiomyozyten bereits basal ähnlich hohe Werte wie unter Stimulation mit Isoprenalin oder H_2O_2 im Wildtyp erreicht werden konnten

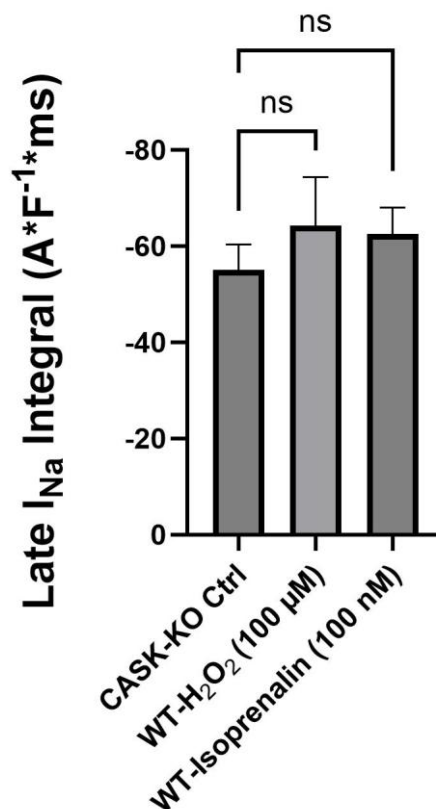


Abbildung 15: Der späte Natriumstrom ohne Stimulation im CASK-Knock-out im Vergleich zum Wildtyp mit H_2O_2 - bzw. Isoprenalin-Stimulation

(**CASK-KO Ctrl**: $-55,04 \pm 19,19$ Ams/F, $n=13$ vs. **WT-Isoprenalin**: $-62,56 \pm 16,44$ Ams/F, $n=9$, $p=ns$; **CASK-KO Ctrl**: $-55,04 \pm 19,19$ Ams/F, $n=13$ vs. **WT-H₂O₂**: $-64,32 \pm 28,48$ Ams/F, $n=6$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 15).

3.4. Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird nicht über die Proteinkinase A vermittelt

Zur weiteren Untersuchung der intrazellulären Wirkweise von Liraglutid auf den späten Natriumstrom beobachteten wir den späten Natriumstrom unter Inhibition der Proteinkinase A (PKA) durch Präinkubation mit 10 μ M H89. Sollte sich die Hemmung des späten Natriumstroms auch unter Inhibition der Proteinkinase A bestätigen, würde dies auf einen PKA-unabhängigen Wirkmechanismus von Liraglutid hindeuten. Eine erhöhte PKA-Aktivität führt zu einer Erhöhung von cAMP und damit einer vermehrten Epac-Aktivierung. Diese gesteigerte Epac-Aktivität führt zu Stimulation der CaMKII und damit zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Nav1.5. Kanälen, welches zu einer Erhöhung des späten Natriumstroms führt. Die nachfolgenden Untersuchungen gaben somit auch Aufschluss darüber, ob die inhibitorische Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom primär über die PKA oder die CaMKII vermittelt wird. Die Inhibition der Proteinkinase A mittels H89 (10 μ M) führte unter Stimulation mit H₂O₂ zu einer nicht signifikanten Senkung des späten Natriumstroms in der Wildtyp-Versuchsreihe im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit H₂O₂ (**WT-H₂O₂**: $-64,32 \pm 28,48$ Ams/F, $n=6$ vs. **WT-H₂O₂ + H89**: $-48,81 \pm 14,76$ Ams/F, $n=3$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 16). Interessanterweise wurde die Reduktion des späten Natriumstroms durch gleichzeitige Präinkubation von H89 und Liraglutid verstärkt und zeigte somit eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Stimulationsgruppe mit H₂O₂ (**WT-H₂O₂**: $-64,32 \pm 28,48$ Ams/F, $n=6$ vs. **WT-H₂O₂ + H89 + Liraglutid**: $-20,35 \pm 7,962$ Ams/F, $n=2$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 16). Die Inhibition der Proteinkinase A scheint somit zu einer Inhibition des späten Natriumstroms zu führen, ohne dabei die Wirkung von Liraglutid zu hemmen. Dies lässt einen Proteinkinase A unabhängigen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom vermuten. Die Ergebnisse deuten somit auf einen inhibitorischen Effekt

von Liraglutid auf den späten Natriumstrom, welcher über eine Hemmung der CaMKII vermittelt wird.

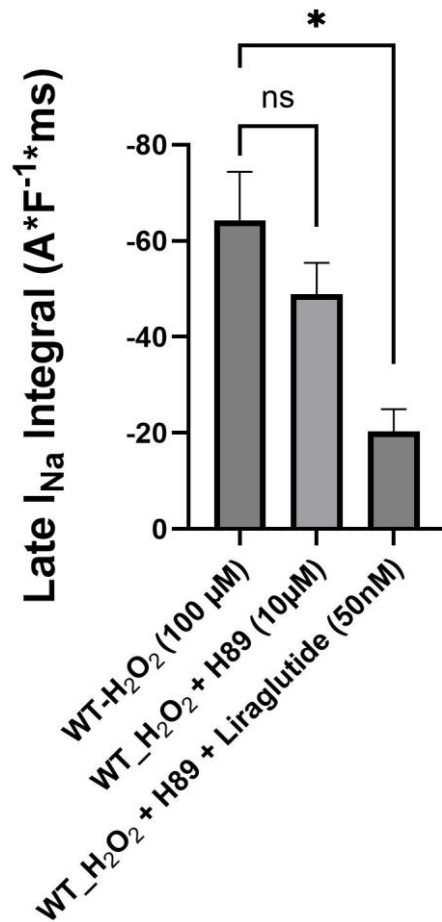


Abbildung 16: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter oxidativer H₂O₂-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit H89 bzw. mit H89 und Liraglutid

Die signifikante Reduktion des späten Natriumstroms unter H89 ließ sich ebenfalls bei beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin in der Wildtyp-Versuchsreihe beobachten (**WT-Isoprenalin**: $-62,56 \pm 16,44$ Ams/F, $n=9$ vs. **WT-Isoprenalin + H89**: $-34,0 \pm 20,05$ Ams/F, $n=4$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 17). Eine weitere Reduktion des late I_{Na} durch zeitgleiche Präinkubation von H89 und Liraglutid war unter Isoprenalin-Stimulation nur minimal, aber nicht signifikant, möglich (**WT-Isoprenalin + H89**: $-34,0 \pm 20,05$ Ams/F, $n=4$ vs.

WT-Isoprenalin + H89 + Liraglutid: $-30,95 \pm 15,1 \text{ Ams/F}$, $n=6$, $p=ns$, one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 17).

Die nur geringere Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom bei zeitgleicher Inkubation mit H89 unter Isoprenalin-Stimulation lässt sich über eine primär effektivere Wirkung von H89 bei cAMP-abhängiger Proteinkinase A Aktivierung unter beta-adrenerger Stimulation erklären. Der späte Natriumstrom wird dabei offenbar überwiegend durch eine Aktivierung der PKA vermittelt. Die Inhibition der PKA über H89 führt so zu einer Reduktion des späten Natriumstroms auf nahezu basale Werte. Eine weitere Inhibition über Liraglutid und eine mögliche CaMKII Inhibition lassen sich somit nicht beobachten.

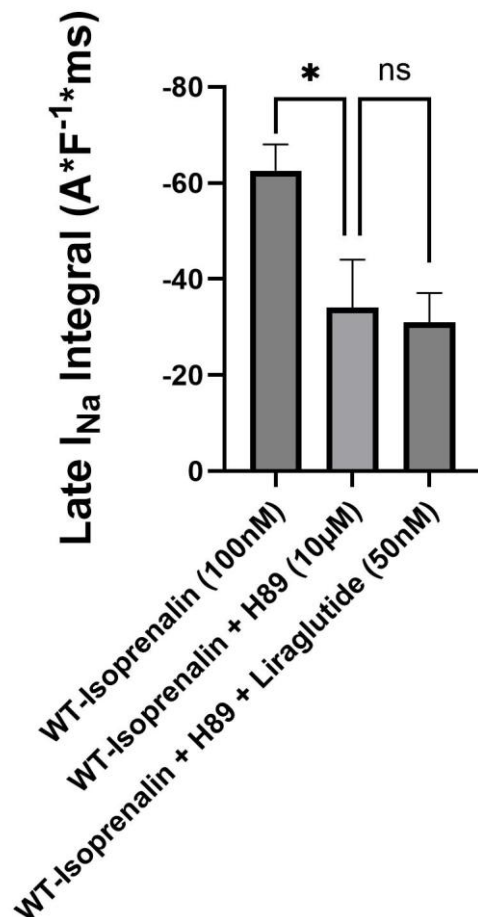


Abbildung 17: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter Isoprenalin-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit H89 bzw. mit H89 und Liraglutid

Ebenfalls bemerkenswert ist, dass der Effekt von H89 auf den späten Natriumstrom unter Isoprenalin-Stimulation auch in der CASK-defizienten Gruppe beobachtet werden konnte (**CASK-KO Isoprenalin**: $-67,34 \pm 26,43$ Ams/F, $n=7$ vs. **CASK-KO Isoprenalin + H89**: $-26,56 \pm 16,58$ Ams/F, $n=6$, $p<0,05$, Ungepaarter T-Test) (Abbildung 18).

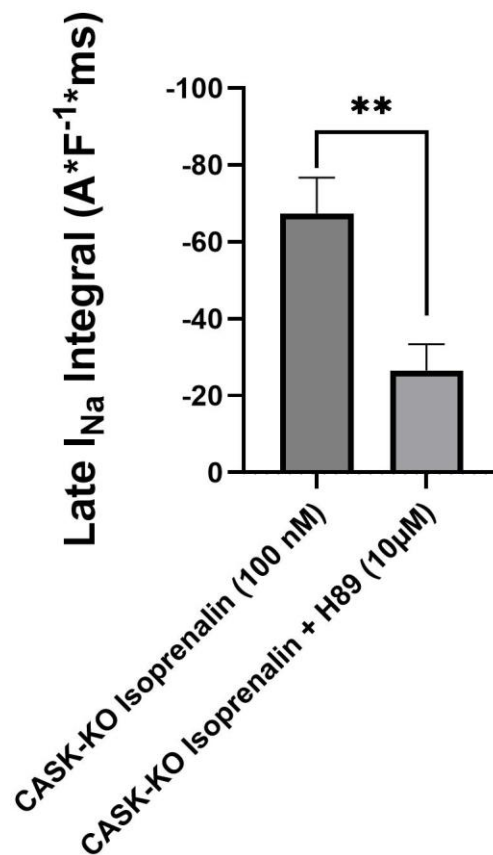


Abbildung 18: Der späte Natriumstrom unter Knock-out von CASK. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation mit Isoprenalin und Präinkubation mit H89

Dies unterstreicht die vorangegangene Vermutung, dass H89 die Proteinkinase A Aktivität und damit auch die Induktion des späten Natriumstroms auf annähernd basale Werte reduziert. Inwiefern eine zeitgleiche Inhibition des späten Natriumstroms durch Inkubation mit Liraglutid in CASK-defizienten Kardiomyozyten ausbleibt lässt sich so nicht sicher beurteilen.

3.5. Die Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wird über den GLP-1 Rezeptor vermittelt

Um die Wirkungsweise von Liraglutid genauer zu untersuchen, beobachteten wir die zuvor gemessene Inhibition des späten Natriumstroms unter Blockade des GLP-1 Rezeptors. Dies ermöglichte eine Differenzierung, ob die zuvor beobachteten Effekte wie vermutet über eine Aktivierung des GLP-1 Rezeptors vermittelt werden, oder ob diese über einen alternativen Weg durch Liraglutid entstanden sind. Die Präinkubation mit Exendin 9-39 (100 nM), einem Antagonisten des GLP-1 Rezeptors, zeitgleich mit Liraglutid (50 nM) vor Aktivierung der CaMKII mit H_2O_2 führte zu einem signifikanten Anstieg des späten Natriumstroms im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Liraglutid vor oxidativer Stimulation (**$WT_e-H_2O_2 + Liraglutide$** : $-31,60 \pm 9,96$ Ams/F, $n=5$ vs. **$WT_e-H_2O_2 + Liraglutide + Exendin 9-39$** : $-64,54 \pm 10,12$ Ams/F, $n=5$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 19). Die parallele Inkubation mit Liraglutid und Exendin 9-39 zeigte keinen signifikanten Unterschied des late I_{Na} im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit H_2O_2 , obwohl dieser bei alleiniger Inkubation mit Liraglutid signifikant gesenkt werden konnte (**$WT_e-H_2O_2$** : $-63,88 \pm 6,881$ Ams/F, $n=5$ vs. **$WT_e-H_2O_2 + Liraglutide + Exendin 9-39$** : $-64,54 \pm 10,12$ Ams/F, $n=5$, $p=ns$; **$WT_e-H_2O_2$** : $-63,88 \pm 6,881$ Ams/F, $n=5$ vs. **$WT_e-H_2O_2 + Liraglutide$** : $-31,60 \pm 9,96$ Ams/F, $n=5$, $p<0,05$, one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 19). Dies lässt auf eine inhibitorische Wirkung von Liraglutid auf den späten Natriumstrom vermittelt über den GLP-1 Rezeptor schlussfolgern.

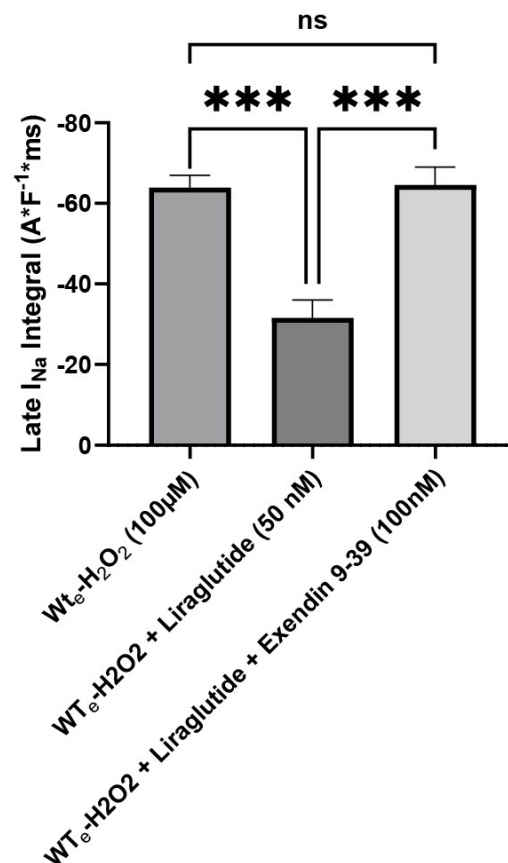


Abbildung 19: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter H₂O₂-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid bzw. mit Liraglutid und dem GLP-1 Rezeptor Antagonisten Exendin 9-39

3.6. Liraglutid zeigt keinen Effekt auf das Kalzium-Handling sowie die Sarkomerlängenverkürzung unter β -adrenerger-Stimulation in murinen Kardiomyozyten

Zur Untersuchung des Einflusses von Liraglutid auf das Kalzium-Handling der murinen Kardiomyozyten beobachteten wir die diastolische Kalzium-Konzentration, die Kalziumtransientenamplitude, die benötigte Zeit zur Kalzium-Elimination sowie die Sarkomerlängenverkürzung. Um hier mögliche Effekte beobachten zu können, stimulierten wir die Kardiomyozyten erneut mit 100 nM Isoprenalin. Die somit erreichte Aktivierung der CaMKII ermöglicht das Messen von potenziellen inhibitorischen Effekten von Liraglutid auf die CaMKII. Die diastolische Kalzium-Konzentration im murinen Wildtypen zeigte keinen signifikanten Unterschied durch beta-adrenerge

Stimulation mit Isoprenalin (100 nM) (**Veh**: $n=7$ vs. **Isoprenalin**: $n=6$, $p=ns$; 1 Hz: $1,452 \pm 0,183$, vs. $1,421 \pm 0,169$; 2 Hz: $1,513 \pm 0,202$ vs. $1,474 \pm 0,183$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 20). Präinkubation mit Liraglutid (50 nM) vor CaMKII-Aktivierung über Isoprenalin zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der diastolischen Kalzium-Konzentration (**Veh**: $n=7$ vs. **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$, $p=ns$; 1 Hz: $1,452 \pm 0,183$ vs. $1,438 \pm 0,29$; 2 Hz: $1,513 \pm 0,202$ vs. $1,483 \pm 0,281$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 20).

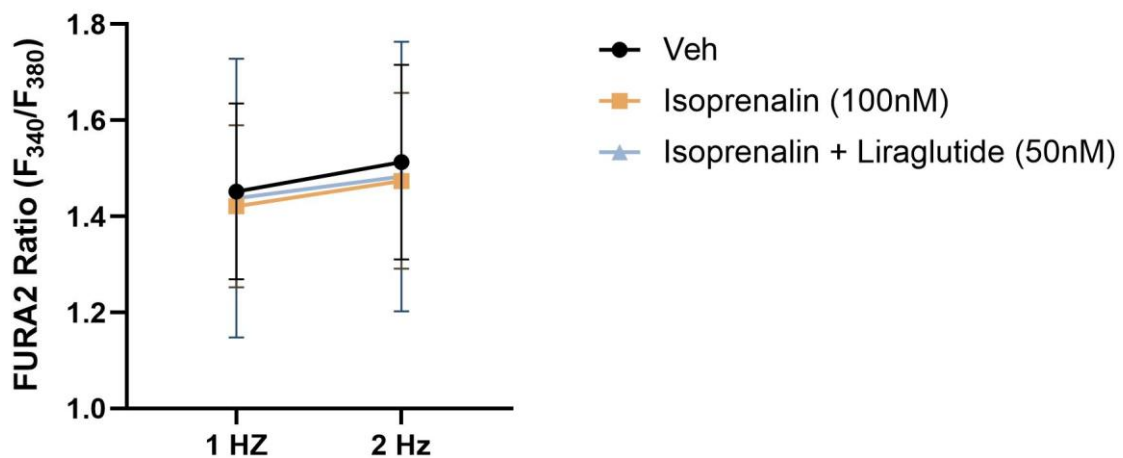


Abbildung 20: Mittlerer zytosolischer, diastolischer Kalziumgehalt unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β -adrenerger Stimulation

Die Stimulation mit Isoprenalin zeigte einen signifikanten Anstieg der systolischen Kalziumtransientenamplitude im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Veh**: $n=7$ vs. **Isoprenalin**: $n=6$, $p<0,05$; 1 Hz: $0,796 \pm 0,332$ vs. $1,938 \pm 0,252$; 2 Hz: $0,834 \pm 0,35$ vs. $2,041 \pm 0,267$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 21). Die Präinkubation mit Liraglutid vor Stimulation mit Isoprenalin zeigte keine signifikante Reduktion der systolischen Kalziumtransientenamplitude im Vergleich zur alleinigen Stimulation (**Isoprenalin**: $n=6$ vs. **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$, $p=ns$; 1 Hz: $1,938 \pm 0,252$ vs. $1,587 \pm 0,625$; 2 Hz: $2,041 \pm 0,267$ vs. $1,653 \pm 0,662$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 21).

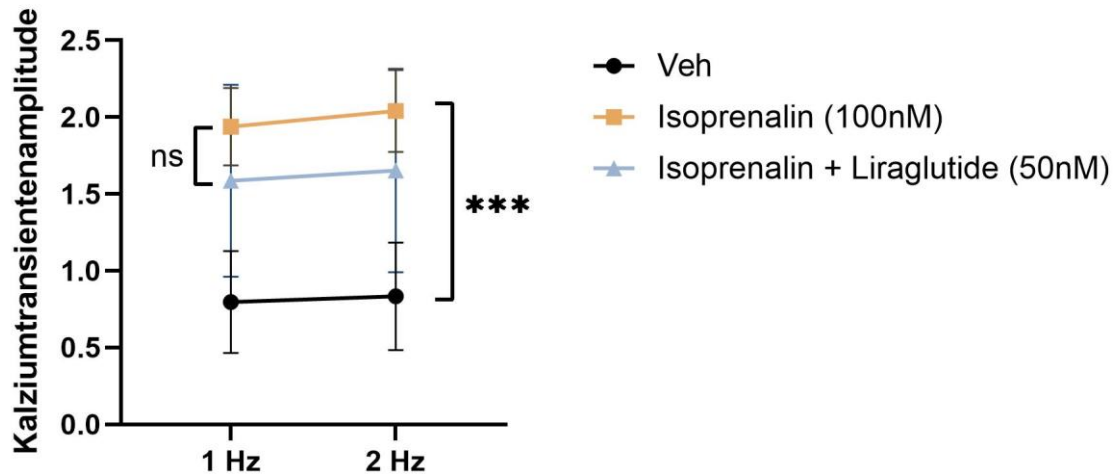


Abbildung 21: Kalziumtransientenamplitude unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β -adrenerger Stimulation

Die RT80, welche ein Maß für die benötigte Zeit, bis die Zelle 80% des Kalziums eliminiert hat, darstellt, zeigte nur unter einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz einen signifikanten Unterschied bei beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. Die frequenzabhängige Beschleunigung der RT80 führte bei einer Frequenz von 2 Hz zu einem nicht signifikanten Unterschied beider Gruppen (**Veh**: $n=7$ vs. **Isoprenalin**: $n=6$; 1 Hz: $0,267 \pm 0,096$ vs. $0,136 \pm 0,017$, $p < 0,05$; 2 Hz: $0,184 \pm 0,049$ vs. $0,116 \pm 0,01$, $p = ns$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 22). Im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Isoprenalin zeigte die Präinkubation mit Liraglutid keinen signifikanten Unterschied der RT80 (**Isoprenalin**: $n=6$ vs. **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$, $p = ns$; 1 Hz: $0,136 \pm 0,017$ vs. $0,142 \pm 0,05$; 2 Hz: $0,116 \pm 0,01$ vs. $0,119 \pm 0,031$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 22).

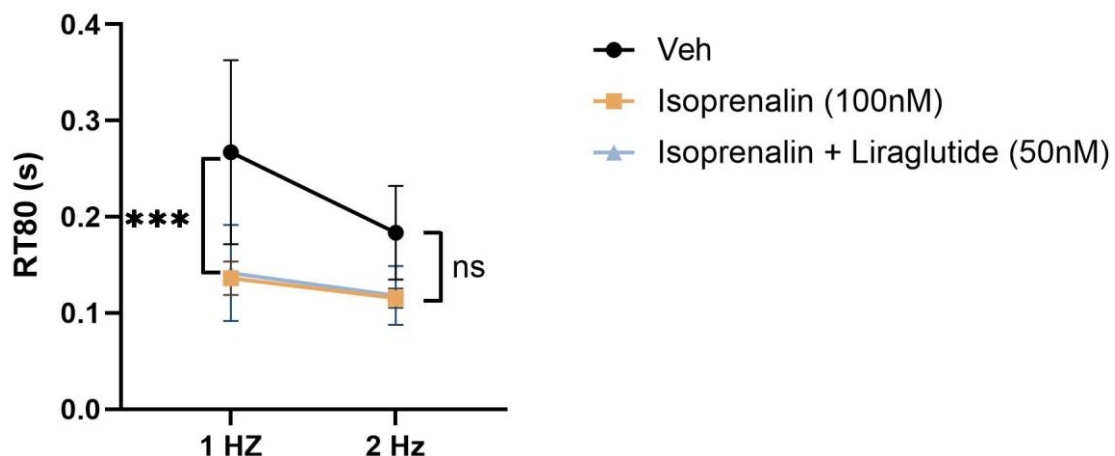


Abbildung 22: RT80 unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β -adrenerger Stimulation

Die Sarkomerlängenverkürzung zeigte einen signifikanten Anstieg der Isoprenalin Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Veh**: $n=6$ vs. **Isoprenalin**: $n=5$, $p<0,05$; 1 Hz: $2,712 \pm 2,792$ vs. $8,828 \pm 2,878$; 2 Hz: $3,042 \pm 2,497$ vs. $9,554 \pm 2,826$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 23). Durch Präinkubation mit Liraglutid vor Isoprenalin-Stimulation ließ sich die Sarkomerlängenverkürzung sichtbar, jedoch nicht signifikant im Vergleich zur alleinigen Stimulation senken (**Isoprenalin**: $n=5$ vs. **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=6$, $p=ns$; 1 Hz: $8,828 \pm 2,878$ vs. $6,127 \pm 3,324$; 2 Hz: $9,554 \pm 2,826$ vs. $6,145 \pm 3,086$; 2way Anova Holm-Sidaks Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 23).

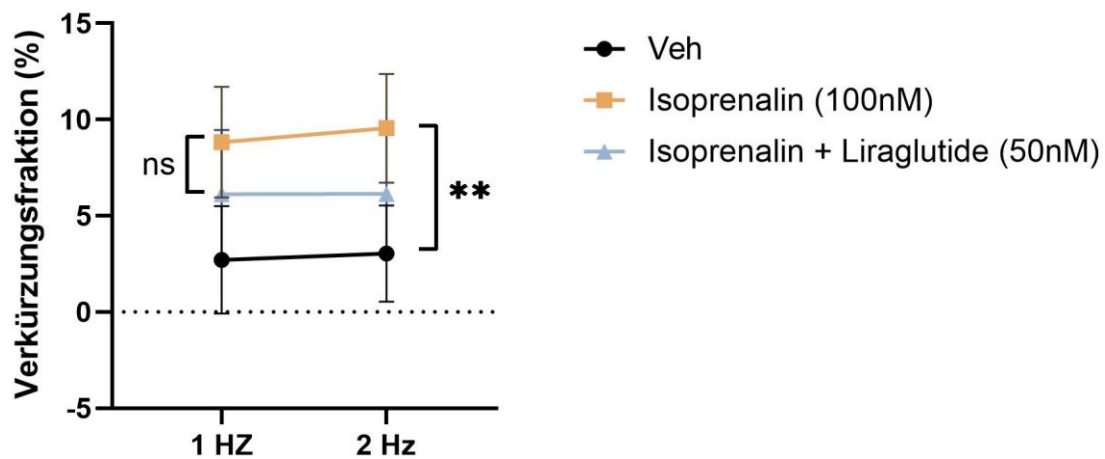


Abbildung 23: Sarkomerlängenverkürzungsfraction unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β -adrenerger Stimulation

3.7. CASK hat keinen Effekt auf das Kalzium-Handling der murinen Kardiomyozyten

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Wirkweise von Liraglutid untersuchten wir auch den Einfluss von CASK auf das intrazelluläre Kalzium-Handling der murinen Kardiomyozyten. Dies diente der Abklärung, ob ähnlich wie beim Einfluss von CASK auf den späten Natriumstrom, auch konkordante Effekte von CASK auf Kalziumströme wie die Kalziumtransientenamplitude beobachtet werden können. Die Defizienz von CASK zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die diastolische Kalzium-Konzentration. Dies zeigte sich sowohl im Vergleich beider Kontrollgruppen als auch beider Isoprenalin Gruppen. Auch die Präinkubation mit Liraglutid vor Isoprenalin-Stimulation

zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die diastolische Kalzium-Konzentration durch die Defizienz von CASK. Die beschriebenen Ergebnisse waren für eine Stimulation mit 1 Hz und mit 2 Hz kongruent (**Veh**: $n=7$ vs. **KO-Veh**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,452 \pm 0,183$ vs. $1,404 \pm 0,172$; 2 Hz: $1,513 \pm 0,202$ vs. $1,47 \pm 0,157$; **Isoprenalin**: $n=6$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,421 \pm 0,169$ vs. $1,517 \pm 0,22$; 2 Hz: $1,474 \pm 0,183$ vs. $1,564 \pm 0,228$; **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutide**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,438 \pm 0,29$ vs. $1,382 \pm 0,226$; 2 Hz: $1,483 \pm 0,281$ vs. $1,424 \pm 0,231$; one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 24).

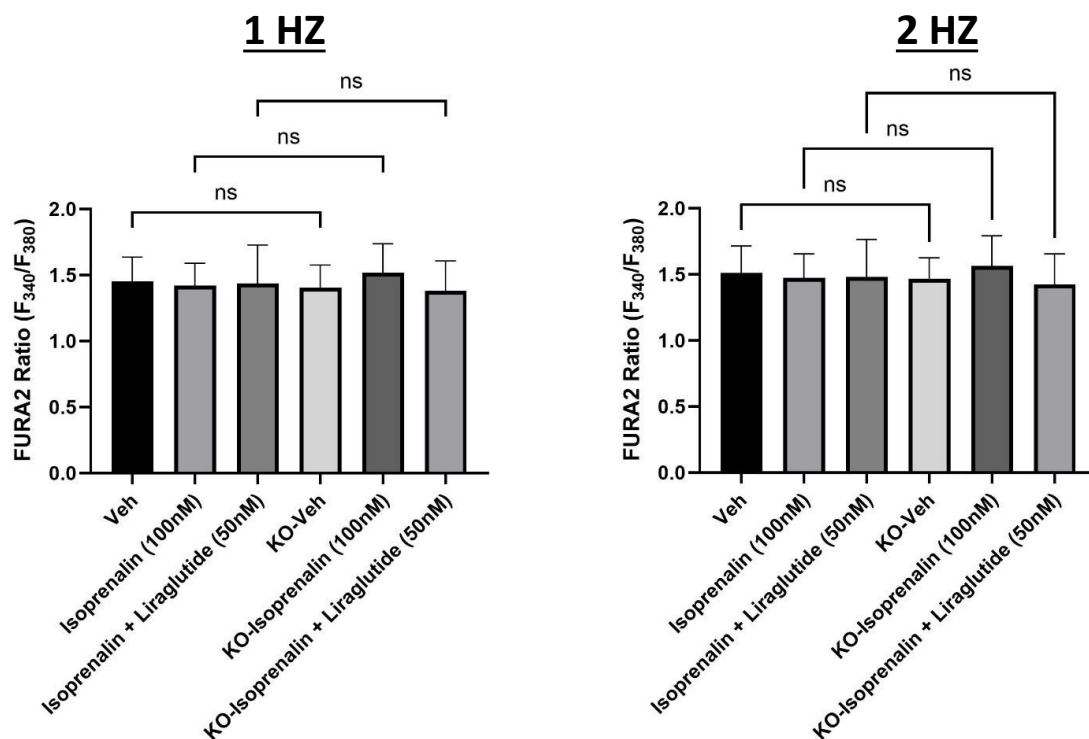


Abbildung 24: Mittlerer zytosolischer, diastolischer Kalziumgehalt im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation

Der Einfluss von CASK auf die systolische Kalziumtransientenamplitude zeigte keine Signifikanz im Vergleich zu den Wildtyp Gruppen. Dies war sowohl unter einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz als auch unter 2 Hz zu beobachten (**Veh**: $n=7$ vs. **KO-Veh**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $0,796 \pm 0,332$ vs. $0,996 \pm 0,394$; 2 Hz: $0,834 \pm 0,35$ vs. $0,993 \pm 0,392$; **Isoprenalin**: $n=6$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,938 \pm 0,252$ vs. $1,753 \pm 0,298$; 2 Hz: $2,041 \pm 0,267$ vs. $1,81 \pm 0,322$; **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutide**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,587 \pm 0,625$ vs. $1,684 \pm 0,331$; 2 Hz:

$1,653 \pm 0,662$ vs. $1,727 \pm 0,34$; one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 25).

In CASK-defizienten Kardiomyozyten konnte der signifikante Anstieg der systolischen Transientenamplitude unter Stimulation mit Isoprenalin wiederholt werden. Ein inhibitorischer Effekt durch Präinkubation mit Liraglutid vor Isoprenalin Stimulation blieb jedoch auch in CASK-defizienten Kardiomyozyten aus. Beide Effekte konnten sowohl bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz als auch bei 2 Hz beobachtet werden (**KO-Veh**: $n=9$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p<0,05$; 1 Hz: $0,996 \pm 0,394$ vs. $1,753 \pm 0,298$; 2 Hz: $0,993 \pm 0,392$ vs. $1,81 \pm 0,322$; **KO-Isoprenalin**: $n=9$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutid**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $1,753 \pm 0,298$ vs. $1,684 \pm 0,331$; 2 Hz: $1,81 \pm 0,322$ vs. $1,727 \pm 0,34$; one-way ANOVA Holm-Sidaks post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 25).

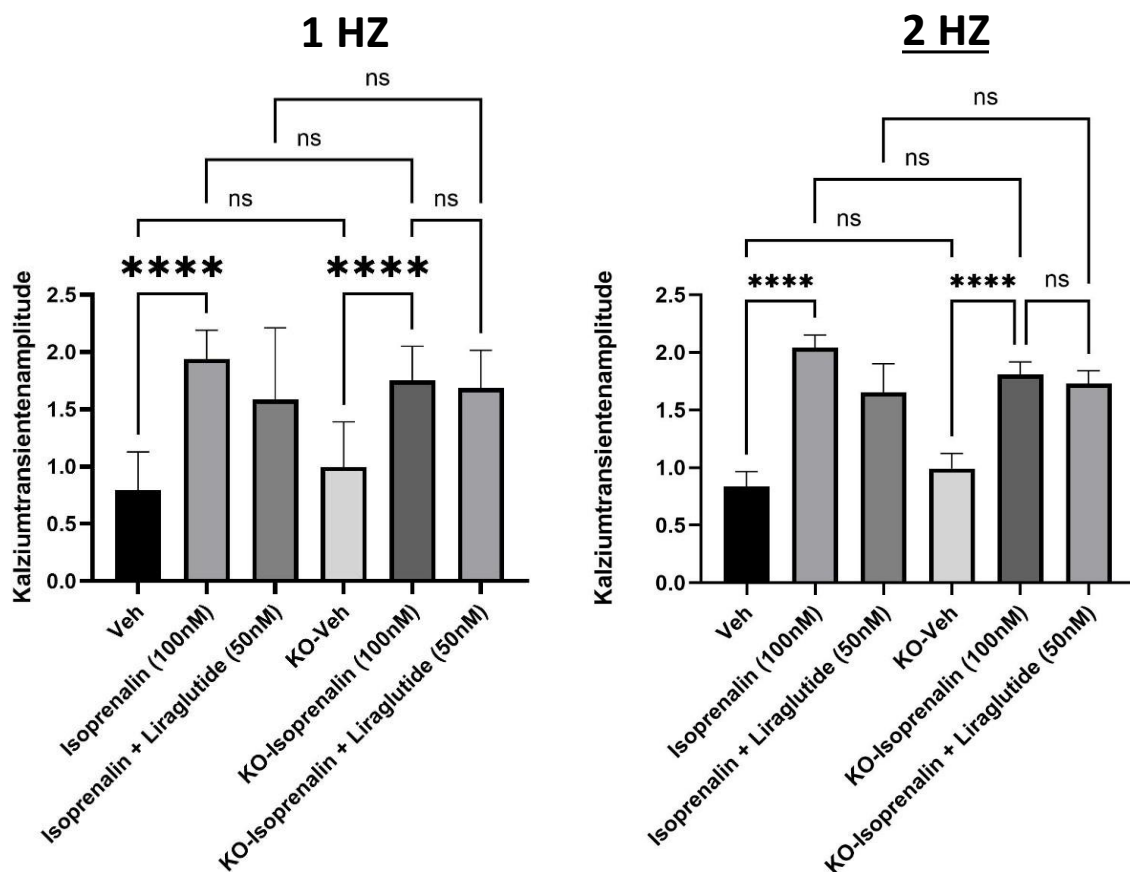


Abbildung 25: Kalziumtransientenamplitude im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation

Der Einfluss von CASK auf die RT80 war im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe nicht signifikant, unabhängig davon, ob die Stimulation bei 1 Hz oder 2 Hz erfolgte (**Veh**: $n=7$ vs. **KO-Veh**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $0,267 \pm 0,096$ vs. $0,253 \pm 0,1$; 2 Hz: $0,184 \pm 0,049$ vs. $0,18 \pm 0,055$; **Isoprenalin**: $n=6$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $0,136 \pm 0,017$ vs. $0,124 \pm 0,01$; 2 Hz: $0,116 \pm 0,01$ vs. $0,11 \pm 0,007$; **Isoprenalin + Liraglutide**: $n=7$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutide**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $0,142 \pm 0,05$ vs. $0,136 \pm 0,015$; 2 Hz: $0,118 \pm 0,031$ vs. $0,115 \pm 0,01$; one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 26).

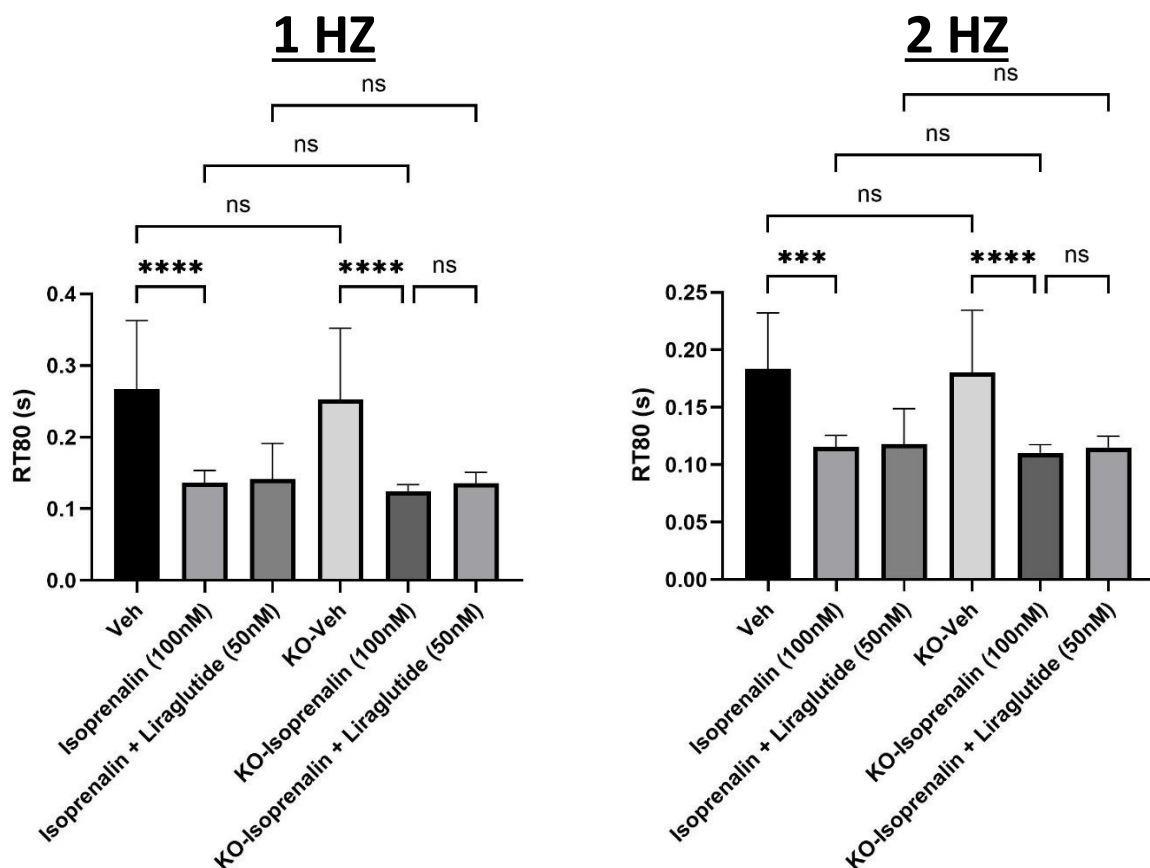


Abbildung 26: RT80 im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation.

In CASK-defizienten Kardiomyozyten führte die Stimulation mit Isoprenalin erneut zu einem signifikanten Abfall der RT80. Eine hemmende Wirkung durch eine Vorinkubation mit Liraglutid vor der Isoprenalin-Stimulation blieb jedoch auch in CASK-defizienten Kardiomyozyten aus. Beide Effekte traten bei Stimulationsfrequenzen von 1 Hz und 2 Hz auf (**KO-Veh**: $n=9$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p<0,05$; 1 Hz: $0,253 \pm 0,1$ vs. $0,124 \pm 0,01$; 2 Hz: $0,18 \pm 0,055$ vs. $0,11 \pm 0,007$; **KO-Isoprenalin**: $n=9$ vs. **KO-**

Isoprenalin + Liraglutide: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $0,124 \pm 0,01$ vs. $0,136 \pm 0,015$; 2 Hz: $0,11 \pm 0,007$ vs. $0,115 \pm 0,01$; one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 26).

Die Defizienz von CASK führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Verkürzungszeit der Sarkomerlänge. Dies galt sowohl bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz als auch bei 2 Hz, was darauf hindeutet, dass die Modifikation durch CASK in Bezug auf die Sarkomerlängenverkürzung unter diesen Bedingungen keine messbaren Effekte hervorruft (**Veh:** $n=6$ vs. **KO-Veh:** $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $2,712 \pm 2,792$ vs. $3,508 \pm 2,354$; 2 Hz: $3,042 \pm 2,497$ vs. $3,189 \pm 2,325$; **Isoprenalin:** $n=5$ vs. **KO-Isoprenalin:** $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $8,828 \pm 2,878$ vs. $9,707 \pm 2,621$; 2 Hz: $9,554 \pm 2,826$ vs. $9,388 \pm 2,696$; **Isoprenalin + Liraglutide:** $n=6$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutide:** $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $6,127 \pm 3,324$ vs. $8,04 \pm 2,216$; 2 Hz: $6,145 \pm 3,086$ vs. $8,019 \pm 2,123$; one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hoc Test für multiple Vergleiche) (Abbildung 27).

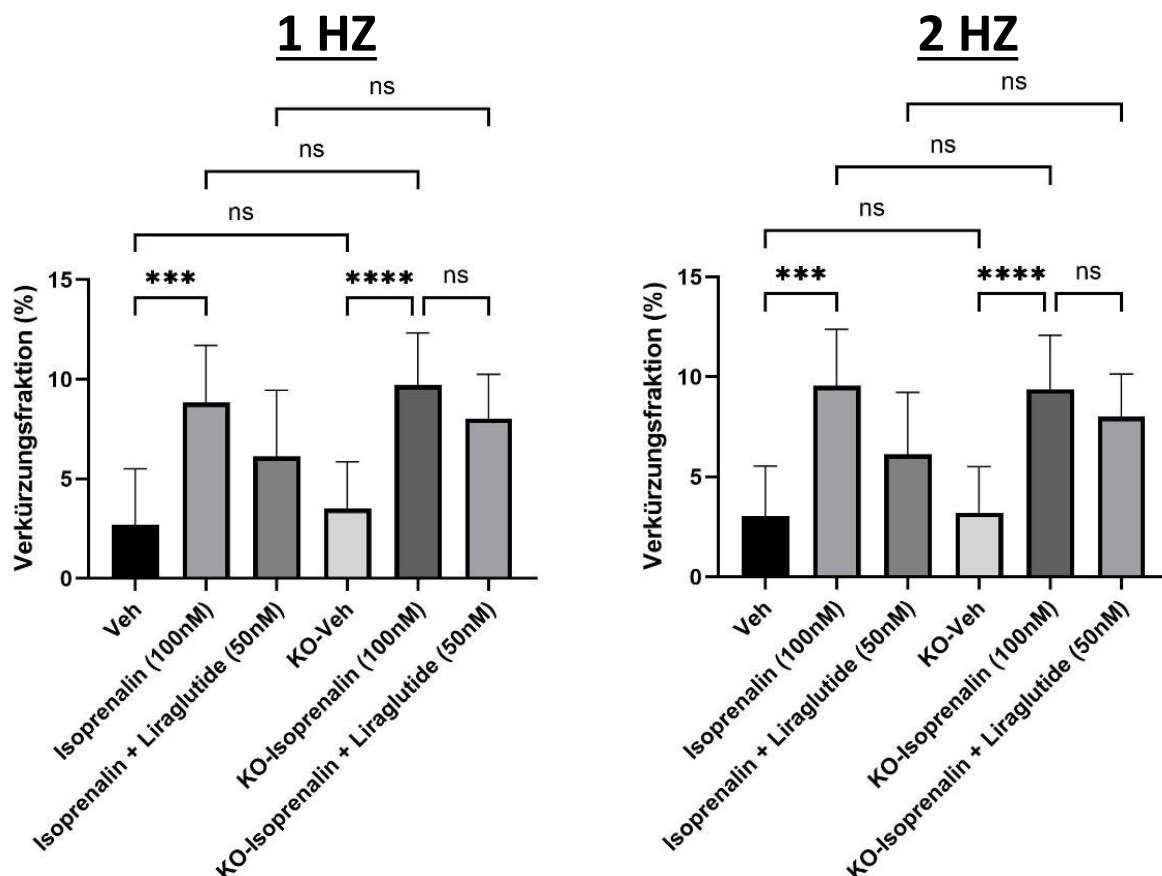


Abbildung 27: Sarkomerlängenverkürzungsfraction im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation

In CASK-defizienten Kardiomyozyten führte die Isoprenalin-Stimulation wiederholt zu einem signifikanten Anstieg der Sarkomerlängenverkürzungsfraction. Eine Präinkubation mit Liraglutid konnte diesen Effekt jedoch auch in CASK-defizienten Kardiomyozyten nicht abschwächen. Beide Phänomene wurden sowohl bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz als auch bei 2 Hz beobachtet (**KO-Veh**: $n=9$ vs. **KO-Isoprenalin**: $n=9$, $p<0,05$; 1 Hz: $3,508 \pm 2,354$ vs. $9,707 \pm 2,621$; 2 Hz: $3,189 \pm 2,325$ vs. $9,388 \pm 2,696$; **KO-Isoprenalin**: $n=9$ vs. **KO-Isoprenalin + Liraglutide**: $n=9$, $p=ns$; 1 Hz: $9,707 \pm 2,621$ vs. $8,04 \pm 2,216$; 2 Hz: $9,388 \pm 2,696$ vs. $8,019 \pm 2,123$; one-way ANOVA Holm-Sidak's post-hocTest für multiple Vergleiche) (Abbildung 27).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Liraglutid in klinisch verwendeter therapeutischer Dosis auf die intrazelluläre Natrium- und Kalziumhomöostase in murinen Kardiomyozyten untersucht. Unsere Untersuchungen zeigen dabei einen inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf den durch oxidativen Stress oder beta-adrenerge Stimulation induzierten späten Natriumstrom. Diese Inhibition des späten Natriumstroms lässt sich dabei nur unter Vorhandensein von CASK beobachten (und nicht in CASK-defizienten Kardiomyozyten) und scheint unabhängig von der Proteinkinase A zu fungieren. Unsere Daten suggerieren zudem eine Wirkweise, welche über den GLP-1 Rezeptor vermittelt wird. Ein signifikanter Effekt von Liraglutid auf das Kalzium-Handling der murinen Kardiomyozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Auch das Fehlen von CASK in den Kardiomyozyten zeigte keine messbaren Veränderungen der Kalziumhomöostase.

4.1. Klinische Konzentration von Liraglutid

Liraglutid wird im klinischen Kontext zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 meist über 0,6 mg und 1,2 mg auf 1,8 mg gesteigert und einmal täglich subkutan gespritzt. Bei der Therapie der Adipositas ist eine Steigerung bis 3 mg/d möglich (Montanya und Sesti 2009; Davies et al. 2015). Die in vitro verwendete Konzentration von Liraglutid von 50 nM orientiert sich an der von Jacobsen et al. veröffentlichten Dosis-Wirkungskurve in gesunden chinesischen Männern (Jacobsen et al. 2016). Die untersuchte Relation zeigte eine maximale Durchschnittsplasma-Dosis von 40 nM bei subkutan gespritzter Dosis von 1,8 mg Liraglutid. Zur Sicherstellung eines messbaren Effekts sowie aus labortechnischer Praktikabilität wurde in dieser Arbeit eine Dosis von 50 nM gewählt. Die in anderen in-vitro Studien verwendeten Konzentrationen von 200 nM (Hu et al. 2017) bzw. auch 10 µM (Palee et al. 2017) zeigten ebenfalls signifikante Ergebnisse. Aufgrund der höheren klinischen Relevanz und auch der besseren Möglichkeit zur klinischen Translation orientierten wir uns in dieser Arbeit an der von Jacobsen et al. ermittelten Dosis von 50 nM (Jacobsen et al. 2016). Eine weitere Untersuchung einer Dosis-Wirkungs-Kurve der in vitro verwendeten Konzentration gilt ebenfalls unter dem Hintergrund zur klinischen Translation als äußerst wichtig und angebracht.

4.2. Liraglutid hat einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten späten Natriumstrom

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Liraglutid in therapeutischer Dosis einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten späten Natriumstrom in murinen Kardiomyozyten aufweist. Dieser Effekt konnte sowohl unter oxidativer Stimulation des späten Natriumstroms mit H_2O_2 als auch unter sympathomimetischer Induktion mittels Isoprenalin nachgewiesen werden. Krassner et al. konnten ebenfalls zeigen, dass Liraglutid einen inhibitorischen Effekt auf oxidative intrazelluläre Prozesse in Endothelzellen der humanen Aorta aufweist (Krasner et al. 2014). Dabei scheint Liraglutid eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels sowie des cyclischen AMP (cAMP) zu bewirken. Dieser Effekt ähnelt dabei der physiologischen Reaktion von GLP-1 in β -Zellen des Pankreas, welcher abschließend zu einer Depolarisation und somit zu einer Glucose-abhängigen Insulinsekretion führt. Jedoch konnten Krassner et al. ebenfalls nachweisen, dass die gestiegene intrazelluläre Kalzium-Konzentration in humanen Endothelzellen zu einer Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Protein Kinase Kinase- β (CAMKK β) führt (Krasner et al. 2014). Die CAMKK β steigert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) Aktivität. Wang et al. konnten zeigen, dass die AMPK α 2 eine suppressive Wirkung auf die murinen endothelialen NAD(P)H-Oxidase aufweist, was zu einem Abfall des über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelten oxidativen Stress führt (Wang et al. 2010). Zudem konnten Wang et al. zeigen, dass Liraglutid eine Reduktion der durch Hyperglykämie induzierten Apoptoserate in murinen Kardiomyozyten bewirkt. Dieser Effekt scheint hierbei auch über den GLP-1 Rezeptor vermittelt zu werden. Die Steigerung von reaktiven Sauerstoffspezies kann wie unter 1.3 bereits beschrieben zu einem Erhalt der Aktivität der CaMKII führen und somit zu einer Steigerung des späten Natriumstroms (Erickson et al. 2008).

Diese Ergebnisse lassen einen inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf den durch H_2O_2 induzierten späten Natriumstrom vermuten, welcher über Aktivierung der AMPK vermittelt wird. Auch unter Isoprenalin Inkubation konnte ein signifikanter oxidativer Schaden an kardialen Rattenzellen nachgewiesen werden (Khalil et al. 2015). Bajic et al. konnten zeigen, dass Liraglutid die durch Isoprenalin induzierte Apoptose in Ratten-Kardiomyozyten signifikant reduziert (Bajic et al. 2024).

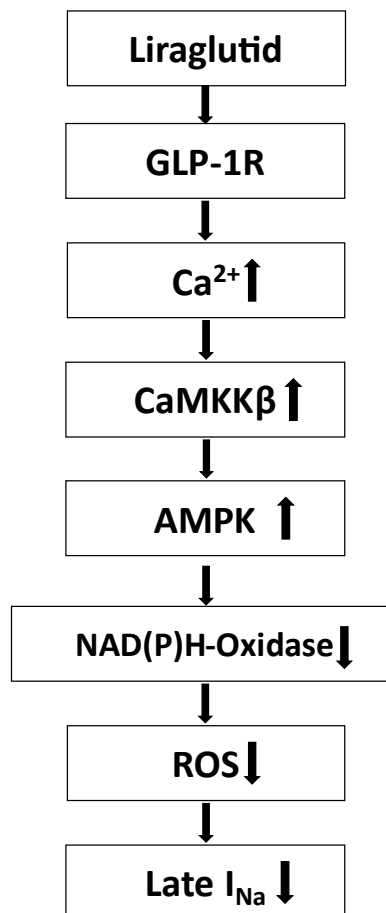


Abbildung 28: Mögliche Wirkweise von Liraglutid auf den späten Natriumstrom über Inhibition von oxidativem Stress. Eigene Abbildung, modifiziert nach Krasner et al. 2014 und Wang et al. 2010.

Da diese Effekte jedoch nicht unmittelbar gemessen wurden, sondern nach einer 2-tägigen Inkubation mit Liraglutid, scheinen sie den in dieser Arbeit beobachteten inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom nur partiell erklären zu können.

Weiterführende Untersuchungen, wie etwa eine zeitgleiche Inkubation von Kardiomyozyten mit Liraglutid und Inhibitoren der AMPK oder der NAD(P)H-Oxidase, könnten Aufklärung über den unter Abbildung 28 beschriebenen antioxidativen Wirkmechanismus geben. Der Umfang dieser Untersuchungen würde den Rahmen dieser Promotion überschreiten, stellen jedoch einen interessanten Ansatz für weiterführende Experimente dar. Die Untersuchungen dieser Arbeit legen einen Effekt über inhibitorische Effekte von Liraglutid auf die CaMKII vermittelt über CASK nahe.

4.3. CASK vermittelt einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten späten Natriumstrom

Die in dieser Arbeit erstmals untersuchten Effekte von Liraglutid auf den late I_{Na} scheinen über die MAGUK CASK vermittelt zu sein. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen von Eichel et al. (Eichel et al. 2016). Hierbei konnte gezeigt werden, dass CASK in vitro den über Nav1.5. vermittelten Natriumstrom über das Sarkolemm hemmt. Unter Unterdrückung von CASK konnten Eichel et al. zeigen, dass es zu einem Anstieg des vermittelten Natriumstroms kam (Eichel et al. 2016). Interessanterweise scheint dieser Effekt nicht über eine direkte Inhibition von CASK am Nav1.5. abzulaufen, sondern in einer veränderten Oberflächen-Expression von Nav1.5. So beobachtete man einen Anstieg der Expression von Nav1.5. unter Unterdrückung von CASK. Jedoch ließ sich die Expression an der Zelloberfläche durch Vorinkubation mit Brefeldin-A (BFA) erneut reduzieren. BFA hemmt den antegraden Transport von Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. CASK scheint dabei nur den Transport von Nav1.5. zu beeinflussen und nicht die Gesamtexpression.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheint der beobachtete Anstieg des späten Natriumstroms in der CASK-defizienten Gruppe auch mit einer vermehrten Expression des vermittelnden Kanals Nav1.5. am Sarkolemm zusammenhängen zu können. Da die beobachteten inhibitorischen Effekte von Liraglutid auf einen induzierten späten Natriumstrom nur unter Vorhandensein von CASK erfasst werden konnten, müssen weitere Untersuchungen klarstellen, ob der Effekt auch über eine verminderte Expression von Nav1.5. an der Oberfläche zu erklären ist. Dies würde für einen verstärkenden Effekt von Liraglutid auf die Inhibition des antegraden Transports durch CASK sprechen.

Da die Effekte bereits nach 30 min Inkubation mit Liraglutid beobachtet werden konnten, scheint die Wirkung nicht über eine gesteigerte Expression von CASK durch Liraglutid erklärbar zu sein. Zwar zeigen vorangegangene Untersuchungen eine gesteigerte Expression von CASK durch Exenatid, einem weiteren GLP-1 Agonisten, jedoch handelte es sich hierbei um eine Inkubation über 24h (Mustroph et al. 2021). Williams konnte zeigen, dass eine Reduktion der Expression von CaMKII in murinen Muskelzellen signifikant erst 3 Tage nach Denervation messbar war (Williams 2012).

Da ähnliche Untersuchungen für die Zeit-abhängige Expression von CASK noch unerforscht sind, müssen nachfolgende Experimente den möglichen CASK-Expressions-abhängigen Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom aufklären.

Auch ein direkter Effekt von Liraglutid auf den späten Natriumstrom wäre denkbar. Durch den Knock-out von CASK und die damit einhergehende Überexpression von Nav1.5. am Sarkolemm wäre der Effekt aber nicht mehr beobachtbar. Eine Dosis-Wirkungskurve könnte in nachfolgenden Beobachtungen sicherstellen, ob ein solcher direkter Effekt bei deutlich höherer Dosierung von Liraglutid auch in CASK-defizienten Kardiomyozyten zu beobachten wäre.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen zudem die Resultate von Wagner et al. und Mustroph et al. (Mustroph et al. 2021; Wagner et al. 2006). Dabei zeigte Wagner et al. einen Anstieg des späten Natriumstroms bei Überexpression von CaMKII δ_c . Der Effekt scheint dabei von einer vermehrten Phosphorylierung der Natriumkanäle auszugehen. Mustroph et al. konnten zeigen, dass ein Knock-out von CASK zu einer gesteigerten Phosphorylierung der CaMKII an Threonin 286 führt sowie zu einer reduzierten Phosphorylierung von Threonin 305, also zu einer Förderung der Aktivität der CaMKII. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun erneut einen Anstieg des späten Natriumstroms in CASK-defizienten Kardiomyozyten, welcher in der Gesamtschau aller Ergebnisse am ehesten durch eine verstärkte Aktivität der CaMKII zu erklären ist.

4.4. Liraglutid fördert die Erholung des gestörten Kalzium-Handlings in gestressten Kardiomyozyten

Bajic et al. konnten zeigen, dass Liraglutid einen protektiven Effekt auf eine durch Isoprenalin induzierte kardiale Dysfunktion in Ratten-Kardiomyozyten aufweist (Bajic et al. 2023). Dabei konnte Liraglutid den durch Isoprenalin verursachten Anstieg von Serum-Markern für Myokardschäden wie high-sensitive Troponin I abmildern. Zudem zeigte Liraglutid einen Aktivitätsanstieg von antioxidativen Enzymen wie der Superoxid-Dismutase. Diese Ergebnisse deuten auf eine antioxidative und protektive Wirkung von Liraglutid in durch Isoprenalin gestressten Kardiomyozyten hin.

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen von Abdel-Reheim et al. Die Beobachtungen zeigten einen Anstieg von oxidativem Stress und

Entzündungsmediatoren wie NADPH-Oxidase oder Tumornekrosefaktor- α durch Isoprenalin-induzierten Myokardschaden in Ratten-Kardiomyozyten (Abdel-Reheim et al. 2024). Interessanterweise scheint Liraglutid auch hier eine signifikante Normalisierung der untersuchten pro-oxidativen Proteine zu bewirken.

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten, welche durch Hypoxie und anschließender Re-Oxygenierung (H/R) eine kardiale Dysfunktion aufwiesen, zeigten ebenfalls einen protektiven Effekt von Liraglutid (200 nM), sowohl auf die Apoptoserate, als auch auf das intrazelluläre Kalzium-Handling (Hu et al. 2017). Die mithilfe des kolorimetrischen TUNEL Assay erfasste Apoptoserate zeigte sich signifikant höher in der durch H/R gestressten Gruppe. Durch Präinkubation mit Liraglutid konnte die Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen H/R Gruppe signifikant gesenkt werden. Auch die durch FURA-2/AM messbare Kalziumtransienten zeigten eine signifikante Veränderung zwischen Kontrollgruppe, H/R-Gruppe und Präinkubation mit Liraglutid vor H/R. Dabei zeigte die H/R-Gruppe einen signifikanten Abfall der Kalziumtransienten-Amplitude im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt konnte durch Präinkubation mit Liraglutid signifikant abgeschwächt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Effekte zeigen einen unterschiedlichen Effekt von Isoprenalin und Liraglutid auf das Kalzium-Handling der Kardiomyozyten. Dabei scheint Isoprenalin die Kalziumtransienten-Amplitude und die Sarkomerlängenverkürzungsfraktion zu erhöhen sowie den diastolischen Kalziumrücktransport zu beschleunigen. Die Präinkubation mit Liraglutid zeigte dabei keinen inhibitorischen Effekt auf die zu beobachtenden Variablen.

Ein Erklärungsansatz für die divergierenden Ergebnisse könnte die deutlich unterschiedliche Inkubationszeit mit Isoprenalin darstellen. In den bereits beschriebenen Untersuchungen von Bajic et al. bzw. Abdel-Reheim et al. wurden deutlich längere Inkubationszeiten von 2 Tagen verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Inkubationszeit betrug dabei lediglich wenige Minuten. Die dadurch unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich durch eine einerseits myokardiale Schädigung durch anhaltende adrenerge Stimulation über mehrere Tage und die damit verbundenen oxidativen und entzündlichen Folgen und andererseits durch eine physiologische kurzfristige adrenerge Stimulation über wenige Minuten erklären.

Dieser Erklärungsansatz könnte durch die Arbeit von Palee et al. unterstützt werden (Palee et al. 2017). Die veröffentlichten Ergebnisse zeigen einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Kalziumtransientenamplitude in Ratten-Kardiomyozyten durch Inkubation mit H_2O_2 (50 μM) sowie eine signifikante Verminderung des diastolischen Kalziumabfalls, ohne dabei die diastolische, basale Kalzium-Konzentration zu beeinflussen. Diese Effekte konnten durch Präinkubation mit Liraglutid rückgängig gemacht werden. Der beobachtete Effekt von Liraglutid wird dabei von Palee et al. als von cAMP und der Proteinkinase A abhängig beschrieben (Palee et al. 2017). Durch die gesteigerte Aktivität der Proteinkinase A scheint es zu einer vermehrten Phosphorylierung von Kalzium-Kanälen und der SERCA2a zu kommen. Dies führt anschließend zu einem erhöhten Kalzium-Einstrom während der Systole bzw. einem beschleunigten Kalzium-Rücktransport während der Diastole.

Da die in dieser Arbeit verwendete Stimulation von Isoprenalin ebenfalls über eine gesteigerte Aktivität der Proteinkinase A abzulaufen scheint, erklärt dies den ausbleibenden Effekt von Liraglutid. Isoprenalin scheint dabei nicht wie das durch Palee et al. verwendete H_2O_2 zu einer verminderten Kalziumtransientenamplitude zu führen, sondern zu einem gegenteiligen Effekt (Palee et al. 2017). Der bereits durch Isoprenalin gesteigerte systolische Kalzium-Einstrom ließ sich folgend nicht durch Liraglutid weiter steigern. Ähnliche Überlegungen wären auch für die beobachteten Effekte des diastolischen Kalzium-Rücktransports möglich.

Inwiefern Liraglutid einen möglichen kardioprotektiven Effekt auf das intrazelluläre Kalzium-Handling von Kardiomyozyten aufweist, müssten nachfolgende Untersuchungen, auch unter längerer Inkubation mit Isoprenalin, nachweisen.

4.5. Die Wirkung von CASK auf das intrazelluläre Kalzium-Handling bleibt Gegenstand weiterer Forschung

Die in dieser Arbeit erstmals untersuchten Auswirkungen von Liraglutid in therapeutischer Dosis auf den Kalziumstrom in murinen CASK-defizienten Kardiomyozyten zeigte keinen signifikanten Effekt von CASK auf die Kalziumtransientenamplitude, die diastolische Kalziumelimination sowie die Sarkomerlängenverkürzung. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der 3

Messgrößen zwischen der Kontrollgruppe und der CASK-defizienten Gruppe festgestellt werden. Ähnlich wie im Wildtyp zeigte sich unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin auch im Knock-out ein signifikanter Anstieg der Kalziumtransientenamplitude. Dieser Effekt konnte auch in vorherigen Messungen durch Mustroph et al. gezeigt werden (Mustroph et al. 2021). Interessanterweise zeigte sich hier jedoch bereits basal, ohne vorheriger Stimulation mit Isoprenalin, ein signifikanter Abfall der Kalziumtransientenamplitude in CASK-defizienten Kardiomyozyten. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls bei β -adrenerger Stimulation.

Da diesen Ergebnissen eine identische Messmethodik, jedoch eine deutlich größere Fallzahl zugrunde liegt, scheinen die Beobachtungen für eine reduzierende Wirkung auf die Kalziumtransientenamplitude durch den Knock-out von CASK zu sprechen. Interessanterweise konnten Mustroph et al. zudem einen deutlich geringeren Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums in CASK-defizienten Kardiomyozyten aufzeigen, als auch ein signifikant höheres diastolisches Kalzium-Leck unter Fehlen von CASK (Mustroph et al. 2021). Weitere Untersuchungen von Mustroph et al. deuten auf eine erhöhte CaMKII-Aktivität durch Knock-out von CASK hin (Mustroph et al. 2021). Die damit einhergehende vermehrte Phosphorylierung des RyR2 scheint zu einem größeren Kalzium-Leck und dadurch permanenter Depletion des Sarkoplasmatischen Retikulums zu führen.

Bemerkenswert sind zudem die beobachteten Effekte des GLP-1 Agonisten Exenatid (100 nM). Hierbei scheint Exenatid zu einer Steigerung des Kalziumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums sowie zu einem verminderten diastolischen Kalzium-Leck im Wildtypen unter Stimulation mit Isoprenalin zu führen. Unter Knock-out von CASK ließ sich dieser Effekt jedoch nicht wiederholen, was auf eine CASK-abhängige Wirkung von Exenatid deutet.

Ein Effekt von Liraglutid auf das Kalzium-Handling der Kardiomyozyten konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Somit bleibt weiterhin unklar, ob die beobachteten Effekte von Mustroph et al. einen Substanz- oder Klasseneffekt der GLP-1 Agonisten darstellen (Mustroph et al. 2021).

4.6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Beobachtungen vorangegangener Untersuchungen deuten auf einen direkten Effekt von GLP-1 Agonisten auf Kardiomyozyten hin. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den klinischen Ergebnissen der LEADER-Studie (Marso et al. 2016b) und der SUSTAIN-6 Studie (Marso et al. 2016a), welche ein verbessertes kardiovaskuläres Outcome von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten unter Liraglutid bzw. Semaglutid Therapie aufzeigten. Ähnlich wie bei Studien rund um die Substanzklasse der SGLT-2 Inhibitoren bleibt auch bei der Untersuchung der GLP-1 Agonisten Unklarheit über das genaue Wirkprinzip beider Substanzklassen. Sowohl ein rein systemischer Effekt über Senkung der Blutglukose oder einer Gewichtsreduktion als auch ein direkter kardialer Effekt scheinen dabei mögliche Erklärungsansätze zu bilden.

Die auch in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten jedoch auf eine direkte kardiale Wirkung von GLP-1 Agonisten hin. Inwiefern GLP-1 Agonisten, analog der SGLT-2 Inhibitoren, auch zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz unabhängig von einer Diabetes-Erkrankung zugelassen werden, bleibt abzuwarten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die genauere Untersuchung von Effekten von Liraglutid in therapeutischer Dosis (50 nM) auf das intrazelluläre Natrium- und Kalzium-Handling in murinen Kardiomyozyten. Dabei sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, die in der LEADER-Studie von Marso et al. gezeigten senkenden Effekte von Liraglutid auf die Inzidenz von nicht-tödlichen Myokardinfarkten, nicht-tödlichen Schlaganfällen und kardiovaskulären Toden bei Diabetes-mellitus Typ 2 auf zellulärer Grundlage besser zu verstehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dabei erstmals einen inhibitorischen Effekt auf den induzierten, proarrhythmogenen späten Natriumstrom. Dabei scheint dieser Effekt über den GLP-1 Rezeptor vermittelt zu sein und seine Wirkung über die Guanylat-Kinase CASK auszuüben. Der inhibitorische Effekt auf den späten Natriumstrom blieb unter Knock-out von CASK aus. Dabei könnte CASK sowohl als Inhibitor der maßgeblich für Entstehung und Erhalt der Herzinsuffizienz verantwortlichen Proteinkinase CaMKII fungieren, als auch direkte inhibitorische Effekte auf reaktive Sauerstoffspezies besitzen. Einen inhibitorischen Effekt von Liraglutid auf die induzierte erhöhte Kalziumtransientenamplitude und auf die verstärkte Sarkomerverkürzung konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Auch ein signifikanter Effekt von CASK auf das Kalzium-Handling von murinen Kardiomyozyten konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Alle Ergebnisse sind unabhängig einer diabetischen Stoffwechsellage und unter kurzzeitiger Stimulation und Inkubation mit Liraglutid entstanden. Inwiefern sich auch positive Effekte von Liraglutid auf das Kalzium-Handling von murinen Kardiomyozyten bei längerer Inkubation zeigen, müssen fortführende Untersuchungen zeigen. Zudem müssen weitere Experimente zeigen, inwiefern sich die beschriebenen Beobachtungen in murinen Kardiomyozyten auch auf humane Herzmuskelzellen übertragen lassen. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Untersuchungen anderer Grundlagenforschung gut zusammenfügen, welches auf einen direkten kardioprotektiven Effekt am Kardiomyozyten von Liraglutid schließen lässt und somit die Ergebnisse der LEADER-Studie auf zellulärer Grundlage unterstreichen kann.

6. Formelverzeichnis

<i>Formel 1: Nernst-Gleichung;</i>	9
--	---

7. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Isolationstyrode</i>	35
<i>Tab. 2: Mittelwerte der Herzgewichte, kumuliert über alle Versuchsreihen</i>	35
<i>Tab. 3: Enzymlösung</i>	36
<i>Tab. 4: Stopp-Lösung</i>	36
<i>Tab. 5: Badlösung</i>	38
<i>Tab. 6: Messlösungen der Patch-Clamp Messungen</i>	39
<i>Tab. 7 Pipettenlösung</i>	41
<i>Tab. 8: Messlösungen der Exendin 9-39 Versuchsreihe</i>	42
<i>Tab. 9: Normaltyrode</i>	47
<i>Tab. 10: Messlösungen Epifluoreszenz</i>	47

8. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Quergestreifte Herzmuskulatur; Mit freundlicher Genehmigung aus HistologyGuide.org, T. Clark Brelje and Robert L. Sorenson, University of Minnesota, Minneapolis, MN</i>	7
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung des kardialen Aktionspotenzials, untergliedert in 4 Phasen. Eigene Abbildung nach (Kurtz et al. 2014).</i>	9

<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung. Eigene Abbildung nach (Behrends 2012).....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der CaMKII. Links: Inaktivierter Zustand; Rechts: Aktivierter Zustand mit der Fähigkeit andere Substrate zu phosphorylieren. Eigene Abbildung nach Erickson 2014.</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 5: Western-Blot der CASK-Expression in isolierten Kardiomyozyten (linker Ventrikel) der Kontrollgruppe (CTRL), der CASK-FLOX Gruppe (FloX) und der Knock-out Gruppe (KO). Man erkennt die fehlende CASK-Expression in der KO-Gruppe. Abbildung aus Mustroph et al. 2021</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung der Patch-Clamp Methode. Zunächst wird durch Unterdruck die Membran an die Pipette gesaugt, der sogenannte Seal. Durch weitere Unterdruck-Applikation kommt es zum Rupture. Eigene Abbildung nach Neher und Sakmann 1992.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 7: Aufsicht auf Kardiomyozyte mit Patchpipette bei 40-facher Vergrößerung. Eigene Abbildung.</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 8: Originalaufnahme einer Patch-Clamp-Messung mithilfe des Programms PatchMaster. Zu erkennen ist der initiale Natrium-Einstrom und der mit Isoprenalin (100 nM) induzierte, späte Natriumstrom als Integral der Stromstärke über den Zeitraum von 100-500ms.</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 9: Abhängige Fluoreszenz von FURA2 in unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen bei 510 nm. Modifizierte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific aus Thermo Fisher Scientific 2010a.</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 10: Originalaufnahme einer Epifluoreszenzmessung bei 1 Hz mithilfe von IonWizard. Oben Kalzium-Transient, dargestellt als Ratio aus Nominator und Denominator; Unten Sarkomer-Länge</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 11: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter Liraglutid Präinkubation, mit Stimulation mit H₂O₂ und Präinkubation mit Liraglutid und anschließender oxidativer H₂O₂-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 12: Der späte Natriumstrom im Wildtypen mit Stimulation mit Isoprenalin</i>	<i>52</i>

<i>Abbildung 13: Der späte Natriumstrom im Vergleich zwischen Wildtyp und CASK-Knock-out. Stimulation der Knock-out Gruppe mit H₂O₂ und Präinkubation mit Liraglutid</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 14: Der späte Natriumstrom unter Knock-out von CASK. Stimulation mit Isoprenalin und unter Präinkubation mit Liraglutid</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 15: Der späte Natriumstrom ohne Stimulation im CASK-Knock-out im Vergleich zum Wildtyp mit H₂O₂- bzw. Isoprenalin-Stimulation.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 16: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter oxidativer H₂O₂-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit H89 bzw. mit H89 und Liraglutid</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 17: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter Isoprenalin-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit H89 bzw. mit H89 und Liraglutid.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 18: Der späte Natriumstrom unter Knock-out von CASK. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation mit Isoprenalin und Präinkubation mit H89 ...</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 19: Der späte Natriumstrom im Wildtypen unter H₂O₂-Stimulation. Vergleich zwischen alleiniger Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid bzw. mit Liraglutid und dem GLP-1 Rezeptor Antagonisten Exendin 9-39.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 20: Mittlerer zytosolischer, diastolischer Kalziumgehalt unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β-adrenerger Stimulation.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 21: Kalziumtransientenamplitude unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β-adrenerger Stimulation</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 22: RT80 unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β-adrenerger Stimulation.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 23: Sarkomerlängenverkürzungsfraction unter 1 bzw. 2 Hz Stimulation. Vergleich der Kontrollgruppe mit alleiniger Isoprenalin-Stimulation und Präinkubation mit Liraglutid vor β-adrenerger Stimulation</i>	<i>64</i>

<i>Abbildung 24: Mittlerer zytosolischer, diastolischer Kalziumgehalt im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation.....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 25: Kalziumtransientenamplitude im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 26: RT80 im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation.</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 27: Sarkomerlängenverkürzungsfraction im Wildtypen sowie im CASK-Knock-out, jeweils unter Isoprenalin-Stimulation und unter Liraglutid-Präinkubation. Links 1 Hz Stimulation; Rechts 2 Hz Stimulation.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 28: Mögliche Wirkweise von Liraglutid auf den späten Natriumstrom über Inhibition von oxidativem Stress. Eigene Abbildung, modifiziert nach Krasner et al. 2014 und Wang et al. 2010.</i>	<i>72</i>

9. Literaturverzeichnis

- Abdel-Reheim, Mustafa Ahmed; Zaafer, Dalia; El-Shoura, Ehab A. M.; Abdelaal, Nashwa; Atwa, Ahmed M.; Bazeed, Shefaa M.; Mahmoud, Heba M. (2024): Unlocking the miRNA-34a-5p/TGF- β and HMGB1/PI3K/Akt/mTOR crosstalk participate in the enhanced cardiac protection of liraglutide against isoproterenol-induced acute myocardial injury rat model. In: *International immunopharmacology* 127, S. 111369. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.111369.
- Allen, D. G.; Eisner, D. A.; Orchard, C. H. (1984): Factors influencing free intracellular calcium concentration in quiescent ferret ventricular muscle. In: *The Journal of physiology* 350, S. 615–630. DOI: 10.1113/jphysiol.1984.sp015221.
- Alpern, Robert J.; Seldin, Donald W. (2012): Seldin and Giebisch's The kidney. Physiology and pathophysiology. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press.
- Armstrong, C. M.; Gilly, W. F. (1992): Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. In: *Methods in enzymology* 207, S. 100–122. DOI: 10.1016/0076-6879(92)07007-B.
- Atasoy, Deniz; Schoch, Susanne; Ho, Angela; Nadasy, Krisztina A.; Liu, Xinran; Zhang, Weiqi et al. (2007): Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7), S. 2525–2530. DOI: 10.1073/pnas.0611003104.

- Backs, Johannes; Backs, Thea; Neef, Stefan; Kreusser, Michael M.; Lehmann, Lorenz H.; Patrick, David M. et al. (2009): The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7), S. 2342–2347. DOI: 10.1073/pnas.0813013106.
- Baigent, C.; Blackwell, L.; Emberson, J.; Holland, L. E.; Reith, C.; Bhala, N. et al. (2010): Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. In: *Lancet (London, England)* 376 (9753), S. 1670–1681. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5.
- Bajic, Zorislava; Sobot, Tanja; Amidzic, Ljiljana; Vojinovic, Natasa; Jovicic, Sanja; Gajic Bojic, Milica et al. (2024): Liraglutide Protects Cardiomyocytes against Isoprenaline-Induced Apoptosis in Experimental Takotsubo Syndrome. In: *Biomedicines* 12 (6). DOI: 10.3390/biomedicines12061207.
- Bajic, Zorislava; Sobot, Tanja; Uletilovic, Snezana; Mandic-Kovacevic, Nebojsa; Cvjetkovic, Tanja; Malicevic, Ugljesa et al. (2023): Cardioprotective effects of liraglutide pretreatment on isoprenaline-induced myocardial injury in rats. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 101 (5), S. 258–267. DOI: 10.1139/cjpp-2022-0534.
- Bass, O.; McGuigan, J. A. (1975): Editorial: Electrical activity and excitation-contraction coupling in mammalian ventricular muscle. In: *Basic research in cardiology* 70 (6), S. 585–595. DOI: 10.1007/BF01906469.
- Beauverger, Philippe; Ozoux, Marie-Laure; Bégis, Guillaume; Glénat, Valérie; Briand, Véronique; Philippo, Marie-Claire et al. (2020): Reversion of cardiac dysfunction by a novel orally available calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, RA306, in a genetic model of dilated cardiomyopathy. In: *Cardiovascular research* 116 (2), S. 329–338. DOI: 10.1093/cvr/cvz097.
- Bers, Donald M. (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. In: *Nature* 415 (6868), S. 198–205. DOI: 10.1038/415198a.
- Bers, Donald M.; Morotti, Stefano (2014): Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. In: *Frontiers in pharmacology* 5, S. 144. DOI: 10.3389/fphar.2014.00144.
- Bhullar, Khushwant S.; Lagarón, Naiara Orrego; McGowan, Eileen M.; Parmar, Indu; Jha, Amitabh; Hubbard, Basil P.; Rupasinghe, H. P. Vasantha (2018): Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. In: *Molecular cancer* 17 (1), S. 48. DOI: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- Bluhm, W. F.; Kranias, E. G.; Dillmann, W. H.; Meyer, M. (2000): Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (1), H249-55. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.278.1.H249.
- Bowden, R. E. (1966): The functional anatomy of striated muscle. In: *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 38 (1), S. 41–59.

- Conway, S. J.; Koushik, S. V. (2001): Cardiac sodium-calcium exchanger: a double-edged sword. In: *Cardiovascular research* 51 (2), S. 194–197. DOI: 10.1016/s0008-6363(01)00356-x.
- Cox, Guy Christopher (2012): Optical imaging techniques in cell biology. Second edition. Boca Raton [Florida]: CRC Press.
- Davies, Melanie J.; Bergenstal, Richard; Bode, Bruce; Kushner, Robert F.; Lewin, Andrew; Skjøth, Trine Vang et al. (2015): Efficacy of Liraglutide for Weight Loss Among Patients With Type 2 Diabetes: The SCALE Diabetes Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 314 (7), S. 687–699. DOI: 10.1001/jama.2015.9676.
- Dobrev, Dobromir; Wehrens, Xander H. T. (2014): Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. In: *Circulation research* 114 (8), 1311-9; discussion 1319. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300568.
- Drucker, Daniel J.; Nauck, Michael A. (2006): The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. In: *Lancet (London, England)* 368 (9548), S. 1696–1705. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69705-5.
- Eichel, Catherine A.; Beuriot, Adeline; Chevalier, Morgan Y. E.; Rougier, Jean-Sébastien; Louault, Florent; Dilanian, Gilles et al. (2016): Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates Nav1.5 Channel in Cardiac Myocytes. In: *Circulation research* 119 (4), S. 544–556. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309254.
- Erickson, Jeffrey R.; Joiner, Mei-ling A.; Guan, Xiaoqun; Kutschke, William; Yang, Jinying; Oddis, Carmine V. et al. (2008): A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. In: *Cell* 133 (3), S. 462–474. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
- Erickson, Jeffrey R.; Pereira, Laetitia; Wang, Lianguo; Han, Guanghui; Ferguson, Amanda; Dao, Khanh et al. (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. In: *Nature* 502 (7471), S. 372–376. DOI: 10.1038/nature12537.
- Fawcett, D. W.; McNutt, N. S. (1969): The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. In: *The Journal of cell biology* 42 (1), S. 1–45. DOI: 10.1083/jcb.42.1.1.
- Fink, Martin; Noble, Penelope J.; Noble, Denis (2011): Ca²⁺-induced delayed afterdepolarizations are triggered by dyadic subspace Ca²⁺ affirming that increasing SERCA reduces aftercontractions. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301 (3), H921-35. DOI: 10.1152/ajpheart.01055.2010.
- Fordyce, Christopher B.; Roe, Matthew T.; Ahmad, Tariq; Libby, Peter; Borer, Jeffrey S.; Hiatt, William R. et al. (2015): Cardiovascular drug development: is it dead or just hibernating? In: *Journal of the American College of Cardiology* 65 (15), S. 1567–1582. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.03.016.

- Fowler, M. B.; Laser, J. A.; Hopkins, G. L.; Minobe, W.; Bristow, M. R. (1986): Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. In: *Circulation* 74 (6), S. 1290–1302. DOI: 10.1161/01.cir.74.6.1290.
- Frank, K.; Kranias, E. G. (2000): Phospholamban and cardiac contractility. In: *Annals of medicine* 32 (8), S. 572–578. DOI: 10.3109/07853890008998837.
- Gerlach, Dieter (2009): Geschichte der Mikroskopie. 1. Aufl. Frankfurt am Main: Harri Deutsch.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- Haverinen, Jaakko; Vornanen, Matti (2009): Comparison of sarcoplasmic reticulum calcium content in atrial and ventricular myocytes of three fish species. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297 (4), R1180-7. DOI: 10.1152/ajpregu.00022.2009.
- Hodge, James J. L.; Mullasseril, Praseeda; Griffith, Leslie C. (2006): Activity-dependent gating of CaMKII autonomous activity by Drosophila CASK. In: *Neuron* 51 (3), S. 327–337. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.06.020.
- Hu, Shun-Ying; Zhang, Ying; Zhu, Ping-Jun; Zhou, Hao; Chen, Yun-Dai (2017): Liraglutide directly protects cardiomyocytes against reperfusion injury possibly via modulation of intracellular calcium homeostasis. In: *Journal of geriatric cardiology : JGC* 14 (1), S. 57–66. DOI: 10.11909/j.issn.1671-5411.2017.01.008.
- Hudmon, Andy; Schulman, Howard (2002): Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. In: *The Biochemical journal* 364 (Pt 3), S. 593–611. DOI: 10.1042/BJ20020228.
- Huxley, Hugh E. (2004): Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. In: *European journal of biochemistry* 271 (8), S. 1403–1415. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04044.x.
- Jacobsen, Lisbeth V.; Flint, Anne; Olsen, Anette K.; Ingwersen, Steen H. (2016): Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. In: *Clinical pharmacokinetics* 55 (6), S. 657–672. DOI: 10.1007/s40262-015-0343-6.
- Johnson, Derrick E.; Meng, Jingwei; Hudmon, Andy (2014): Mechanisms Underlying Cooperativity in CaMKII Autophosphorylation and Substrate Phosphorylation. In: *Biophysical Journal* 106 (2), 528a. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.11.2946.
- Jorsal, Anders; Kistorp, Caroline; Holmager, Pernille; Tougaard, Rasmus Stilling; Nielsen, Roni; Hänselmann, Anja et al. (2017): Effect of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analogue, on left ventricular function in stable chronic heart failure patients with and without diabetes (LIVE)-a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. In: *European journal of heart failure* 19 (1), S. 69–77. DOI: 10.1002/ejhf.657.

- Khalil, Md Ibrahim; Ahmmed, Istiyak; Ahmed, Romana; Tanvir, E. M.; Afroz, Rizwana; Paul, Sudip et al. (2015): Amelioration of Isoproterenol-Induced Oxidative Damage in Rat Myocardium by Withania somnifera Leaf Extract. In: *BioMed research international* 2015, S. 624159. DOI: 10.1155/2015/624159.
- Knudsen, Lotte Bjerre; Lau, Jesper (2019): The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. In: *Frontiers in endocrinology* 10, S. 155. DOI: 10.3389/fendo.2019.00155.
- Kosiborod, Mikhail N.; Abildstrøm, Steen Z.; Borlaug, Barry A.; Butler, Javed; Rasmussen, Søren; Davies, Melanie et al. (2023): Semaglutide in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Obesity. In: *The New England journal of medicine* 389 (12), S. 1069–1084. DOI: 10.1056/NEJMoa2306963.
- Kosiborod, Mikhail N.; Petrie, Mark C.; Borlaug, Barry A.; Butler, Javed; Davies, Melanie J.; Hovingh, G. Kees et al. (2024): Semaglutide in Patients with Obesity-Related Heart Failure and Type 2 Diabetes. In: *The New England journal of medicine* 390 (15), S. 1394–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa2313917.
- Krammer, Thomas; Baier, Maria J.; Hegner, Philipp; Zschiedrich, Tilman; Lukas, David; Wolf, Matthias et al. (2025): Cardioprotective effects of semaglutide on isolated human ventricular myocardium. In: *European journal of heart failure* 27 (7), S. 1315–1325. DOI: 10.1002/ehf.3644.
- Krasner, Nadia M.; Ido, Yasuo; Ruderman, Neil B.; Cacicedo, Jose M. (2014): Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. In: *PloS one* 9 (5), e97554. DOI: 10.1371/journal.pone.0097554.
- Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Pape, Hans-Christian (Hg.) (2014): Physiologie. Unter Mitarbeit von Gerhard Burckhardt, Andreas Draguhn, Heimo Ehmke und Bernhard Brenner. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Lee, Tae-Seong; Karl, Rosi; Moosmang, Sven; Lenhardt, Peter; Klugbauer, Norbert; Hofmann, Franz et al. (2006): Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (35), S. 25560–25567. DOI: 10.1074/jbc.M508661200.
- Liu, Min; Li, You; Chen, Ruichuan (2015): CaMKII: do not work too hard in the failing heart. In: *The Journal of pathology* 235 (5), S. 669–671. DOI: 10.1002/path.4507.
- Luo, Min; Anderson, Mark E. (2013): Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. In: *Circulation research* 113 (6), S. 690–708. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301651.
- MacLennan, David H.; Kranias, Evangelia G. (2003): Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (7), S. 566–577. DOI: 10.1038/nrm1151.

- Maier, Lars S.; Bers, Donald M. (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 34 (8), S. 919–939. DOI: 10.1006/jmcc.2002.2038.
- Maier, Lars S.; Bers, Donald M. (2007): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. In: *Cardiovascular research* 73 (4), S. 631–640. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.005.
- Maier, Lars S.; Zhang, Tong; Chen, Lu; DeSantiago, Jaime; Brown, Joan Heller; Bers, Donald M. (2003): Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. In: *Circulation research* 92 (8), S. 904–911. DOI: 10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1.
- Margulies, Kenneth B.; Hernandez, Adrian F.; Redfield, Margaret M.; Givertz, Michael M.; Oliveira, Guilherme H.; Cole, Robert et al. (2016): Effects of Liraglutide on Clinical Stability Among Patients With Advanced Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 316 (5), S. 500–508. DOI: 10.1001/jama.2016.10260.
- Marso, Steven P.; Bain, Stephen C.; Consoli, Agostino; Eliaschewitz, Freddy G.; Jódar, Esteban; Leiter, Lawrence A. et al. (2016a): Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. In: *The New England journal of medicine* 375 (19), S. 1834–1844. DOI: 10.1056/NEJMoa1607141.
- Marso, Steven P.; Daniels, Gilbert H.; Brown-Frandsen, Kirstine; Kristensen, Peter; Mann, Johannes F. E.; Nauck, Michael A. et al. (2016b): Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. In: *The New England journal of medicine* 375 (4), S. 311–322. DOI: 10.1056/NEJMoa1603827.
- Mason, Fleur E.; Sossalla, Samuel (2017): The Significance of the Late Na⁺ Current for Arrhythmia Induction and the Therapeutic Antiarrhythmic Potential of Ranolazine. In: *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 22 (1), S. 40–50. DOI: 10.1177/1074248416644989.
- McDonagh, Theresa A.; Metra, Marco; Adamo, Marianna; Gardner, Roy S.; Baumbach, Andreas; Böhm, Michael et al. (2021): 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. In: *European heart journal* 42 (36), S. 3599–3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368.
- McDonagh, Theresa A.; Metra, Marco; Adamo, Marianna; Gardner, Roy S.; Baumbach, Andreas; Böhm, Michael et al. (2023): 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. In: *European heart journal* 44 (37), S. 3627–3639. DOI: 10.1093/eurheartj/ehad195.
- Mines, G. R. (1913): On functional analysis by the action of electrolytes. In: *The Journal of physiology* 46 (3), S. 188–235. DOI: 10.1113/jphysiol.1913.sp001588.
- Molkentin, J. D.; Jobe, S. M.; Markham, B. E. (1996): Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 28 (6), S. 1211–1225. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0112.

- Montanya, Eduard; Sesti, Giorgio (2009): A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. In: *Clinical therapeutics* 31 (11), S. 2472–2488. DOI: 10.1016/j.clinthera.2009.11.034.
- Mukherjee, Konark; Sharma, Manu; Urlaub, Henning; Bourenkov, Gleb P.; Jahn, Reinhard; Südhof, Thomas C.; Wahl, Markus C. (2008): CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. In: *Cell* 133 (2), S. 328–339. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.036.
- Mustroph, Julian; Baier, Maria J.; Pabel, Steffen; Stehle, Thea; Trum, Maximilian; Provaznik, Zdenek et al. (2022): Empagliflozin Inhibits Cardiac Late Sodium Current by Ca/Calmodulin-Dependent Kinase II. In: *Circulation* 146 (16), S. 1259–1261. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.057364.
- Mustroph, Julian; Baier, Maria J.; Unsin, Denise; Provaznik, Zdenek; Kozakov, Kostiantyn; Lebek, Simon et al. (2023): Ethanol-Induced Atrial Fibrillation Results From Late INa and Can Be Prevented by Ranolazine. In: *Circulation* 148 (8), S. 698–700. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064561.
- Mustroph, Julian; Drzymalski, Marzena; Baier, Maria; Pabel, Steffen; Biedermann, Alexander; Memmel, Bernadette et al. (2020): The oral Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor RA608 improves contractile function and prevents arrhythmias in heart failure. In: *ESC heart failure* 7 (5), S. 2871–2883. DOI: 10.1002/ehf2.12895.
- Mustroph, Julian; Maier, Lars S.; Wagner, Stefan (2014): CaMKII regulation of cardiac K channels. In: *Frontiers in pharmacology* 5, S. 20. DOI: 10.3389/fphar.2014.00020.
- Mustroph, Julian; Neef, Stefan; Maier, Lars S. (2017): CaMKII as a target for arrhythmia suppression. In: *Pharmacology & therapeutics* 176, S. 22–31. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.006.
- Mustroph, Julian; Sag, Can M.; Bähr, Felix; Schmidtman, Anna-Lena; Gupta, Shamindra N.; Dietz, Alexander et al. (2021): Loss of CASK Accelerates Heart Failure Development. In: *Circulation research* 128 (8), S. 1139–1155. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.318170.
- Nassal, Drew; Gratz, Daniel; Hund, Thomas J. (2020): Challenges and Opportunities for Therapeutic Targeting of Calmodulin Kinase II in Heart. In: *Frontiers in pharmacology* 11, S. 35. DOI: 10.3389/fphar.2020.00035.
- Neher, E.; Sakmann, B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (5554), S. 799–802. DOI: 10.1038/260799a0.
- Neher, E.; Sakmann, B. (1992): The patch clamp technique. In: *Scientific American* 266 (3), S. 44–51. DOI: 10.1038/scientificamerican0392-44.
- Nielsen, Morten S.; van Opbergen, Chantal J. M.; van Veen, Toon A. B.; Delmar, Mario (2023): The intercalated disc: a unique organelle for electromechanical

- synchrony in cardiomyocytes. In: *Physiological reviews* 103 (3), S. 2271–2319. DOI: 10.1152/physrev.00021.2022.
- Orban, P. C.; Chui, D.; Marth, J. D. (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (15), S. 6861–6865. DOI: 10.1073/pnas.89.15.6861.
- Oscar Langendorff (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.
- Palee, S.; Chattipakorn, S. C.; Chattipakorn, N. (2017): Liraglutide preserves intracellular calcium handling in isolated murine myocytes exposed to oxidative stress. In: *Physiological research* 66 (5), S. 889–895. DOI: 10.33549/physiolres.933558.
- Pieske, Burkert; Maier, Lars S.; Piacentino, Valentino; Weisser, Jutta; Hasenfuss, Gerd; Houser, Steven (2002): Rate dependence of Na⁺i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. In: *Circulation* 106 (4), S. 447–453. DOI: 10.1161/01.cir.0000023042.50192.f4.
- Reilly, Louise; Eckhardt, Lee L. (2021): Cardiac potassium inward rectifier Kir2: Review of structure, regulation, pharmacology, and arrhythmogenesis. In: *Heart rhythm* 18 (8), S. 1423–1434. DOI: 10.1016/j.hrthm.2021.04.008.
- Rellos, Peter; Pike, Ashley C. W.; Niesen, Frank H.; Salah, Eidarus; Lee, Wen Hwa; Delft, Frank von; Knapp, Stefan (2010): Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. In: *PLoS biology* 8 (7), e1000426. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000426.
- Roberts, M. H. T. (1987): Advanced Micropipette Techniques For Cell Physiology. In: *Journal of Anatomy* 153, S. 260–261.
- Rokita, A. G.; Sag, C-M; Maier, L. S. (2011): Herzinsuffizienz. Elektromechanische Kopplung bei Herzinsuffizienz und neue Therapieoptionen. In: *Herz* 36 (2), S. 94–101. DOI: 10.1007/s00059-010-3415-2.
- Rudolf, Rüdiger; Khan, Muzamil Majid; Witzemann, Veit (2019): Motor Endplate- Anatomical, Functional, and Molecular Concepts in the Historical Perspective. In: *Cells* 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050387.
- Ruiz-Hurtado, Gema; Morel, Eric; Domínguez-Rodríguez, Alejandro; Llach, Anna; Lezoualc'h, Frank; Benitah, Jean-Pierre; Gomez, Ana M. (2013): Epac in cardiac calcium signaling. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 58, S. 162–171. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.021.
- Sauer, B. (1987): Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol. Cell. Biol.* 7 (6), S. 2087–2096. DOI: 10.1128/mcb.7.6.2087.
- Savarese, Gianluigi; Becher, Peter Moritz; Lund, Lars H.; Seferovic, Petar; Rosano, Giuseppe M. C.; Coats, Andrew J. S. (2023): Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. In: *Cardiovascular research* 118 (17), S. 3272–3287. DOI: 10.1093/cvr/cvac013.

- Seferović, Petar M.; Vardas, Panagiotis; Jankowska, Ewa A.; Maggioni, Aldo P.; Timmis, Adam; Milinković, Ivan et al. (2021): The Heart Failure Association Atlas: Heart Failure Epidemiology and Management Statistics 2019. In: *European journal of heart failure* 23 (6), S. 906–914. DOI: 10.1002/ehhf.2143.
- Sequeira, Vasco; van der Velden, Jolanda (2015): Historical perspective on heart function: the Frank-Starling Law. In: *Biophysical reviews* 7 (4), S. 421–447. DOI: 10.1007/s12551-015-0184-4.
- Shy, Diana; Gillet, Ludovic; Ogrodnik, Jakob; Albesa, Maxime; Verkerk, Arie O.; Wolswinkel, Rianne et al. (2014): PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. In: *Circulation* 130 (2), S. 147–160. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007852.
- Somaratne, Jithendra B.; Berry, Colin; McMurray, John J. V.; Poppe, Katrina K.; Doughty, Robert N.; Whalley, Gillian A. (2009): The prognostic significance of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction: a literature-based meta-analysis. In: *European journal of heart failure* 11 (9), S. 855–862. DOI: 10.1093/eurjhf/hfp103.
- Squire, John (2019): Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. In: *International journal of molecular sciences* 20 (22). DOI: 10.3390/ijms20225715.
- Subramaniam, A.; Jones, W. K.; Gulick, J.; Wert, S.; Neumann, J.; Robbins, J. (1991): Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (36), S. 24613–24620.
- Sumi, M.; Kiuchi, K.; Ishikawa, T.; Ishii, A.; Hagiwara, M.; Nagatsu, T.; Hidaka, H. (1991): The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 181 (3), S. 968–975. DOI: 10.1016/0006-291X(91)92031-E.
- Swedberg, K.; Eneroth, P.; Kjeksus, J.; Wilhelmsen, L. (1990): Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. In: *Circulation* 82 (5), S. 1730–1736. DOI: 10.1161/01.cir.82.5.1730.
- Timpl, R.; Martin, G. R.; Bruckner, P.; Wick, G.; Wiedemann, H. (1978): Nature of the collagenous protein in a tumor basement membrane. In: *European journal of biochemistry* 84 (1), S. 43–52. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12139.x.
- Varró, András; Tomek, Jakub; Nagy, Norbert; Virág, László; Passini, Elisa; Rodriguez, Blanca; Baczkó, István (2021): Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. In: *Physiological reviews* 101 (3), S. 1083–1176. DOI: 10.1152/physrev.00024.2019.
- Verma, Subodh; Leiter, Lawrence A.; Mazer, C. David; Bain, Stephen C.; Buse, John; Marso, Steve et al. (2018): Liraglutide Reduces Cardiovascular Events and Mortality in Type 2 Diabetes Mellitus Independently of Baseline Low-Density

- Lipoprotein Cholesterol Levels and Statin Use. In: *Circulation* 138 (15), S. 1605–1607. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036862.
- Vest, Rebekah S.; O'Leary, Heather; Coultrap, Steven J.; Kindy, Mark S.; Bayer, K. Ulrich (2010): Effective post-insult neuroprotection by a novel Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (27), S. 20675–20682. DOI: 10.1074/jbc.M109.088617.
- Wagner, Stefan; Dybkova, Nataliya; Rasenack, Eva C. L.; Jacobshagen, Claudius; Fabritz, Larissa; Kirchhof, Paulus et al. (2006): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (12), S. 3127–3138. DOI: 10.1172/JCI26620.
- Wang, Shuangxi; Zhang, Miao; Liang, Bin; Xu, Jian; Xie, Zhonglin; Liu, Chao et al. (2010): AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. In: *Circulation research* 106 (6), S. 1117–1128. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212530.
- Wenzel, Jan-Per; Nikorowitsch, Julius; Bei der Kellen, Ramona; Magnussen, Christina; Bonin-Schnabel, Renate; Westermann, Dirk et al. (2022): Heart failure in the general population and impact of the 2021 European Society of Cardiology Heart Failure Guidelines. In: *ESC heart failure* 9 (4), S. 2157–2169. DOI: 10.1002/ehf2.13948.
- Whalley, D. W.; Wendt, D. J.; Grant, A. O. (1995): Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: Part I: Ion channels, membrane currents, and the action potential. In: *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 18 (8), S. 1556–1574. DOI: 10.1111/j.1540-8159.1995.tb06742.x.
- Williams, B. (2012): CaMKII Protein Expression and Phosphorylation in Mouse Skeletal Muscle Following Atrophy and Hypertrophy. Master Thesis, East Carolina University.
- Zhang, Tong; Brown, Joan Heller (2004): Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Cardiovascular research* 63 (3), S. 476–486. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.04.026.
- Zhu, Zheng-Qiu; Wang, Dong; Xiang, Dan; Yuan, Yue-Xing; Wang, Yao (2014): Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase is involved in exendin-4-induced insulin secretion in INS-1 cells. In: *Metabolism: clinical and experimental* 63 (1), S. 120–126. DOI: 10.1016/j.metabol.2013.09.009.

10. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Benedikt Zisterer