

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Die Rolle des späten Natrium-Stroms  
bei der Kalzium-Calmodulin-abhängigen  
Proteinkinase $\delta_c$  (CaMKII $\delta_c$ )-induzierten Herzinsuffizienz  
und beim chronischen Vorhofflimmern**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Ulrike Kerstin Maurer  
aus Karlsruhe

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. El-Armouche

3. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2012

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Herzmuskelzelle.....	2
1.1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle.....	2
1.1.2 Elektromechanische Kopplung.....	4
1.1.2.1 Kontraktion.....	4
1.1.2.2 Relaxation.....	6
1.2 Regulation der Kontraktilität des Myokards.....	6
1.2.1 Post-Pausen-Potenzierung.....	7
1.3 Die Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII).....	7
1.3.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII.....	8
1.4 Der sarkolemmale Na <sup>+</sup> -Kanal.....	9
1.4.1 Aufbau und Funktion des Na <sup>+</sup> -Kanals.....	9
1.5 Kardiale Arrhythmien.....	11
1.5.1 Störungen der Erregungsbildung und -leitung.....	11
1.6 Pathophysiologische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz.....	12
1.7 Die CaMKII und ihr Einfluss auf Herzinsuffizienz, Arrhythmien und den Na <sup>+</sup> -Kanal.....	13
1.8 Pathophysiologische Veränderungen beim Vorhofflimmern auf Zellebene: Der späte Na <sup>+</sup> -Strom.....	15
1.9 Ranolazin.....	16
1.10 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Lösungen für Muskelstreifenexperimente.....	19
2.1.1 Krebs-Henseleit-Lösung.....	19
2.1.2 Dissektionslösung.....	19
2.1.3 Ranolazininlösung.....	20
2.1.4 Ouabainlösung.....	20
2.1.5 Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) - Lösung .....	20
2.2 Versuchstiere.....	21
2.3 Versuchsaufbau.....	21
2.3.1 Organbad.....	21
2.3.1.1 Lösungszirkulation.....	21
2.3.1.2 Kraftaufnahme und Übertragung.....	22
2.3.1.3 Datenerfassung und Auswertung.....	22
2.3.2 Probengewinnung.....	23
2.3.2.1 Humane Vorhöfe.....	23
2.3.2.2 Herzentnahme der Maus.....	25
2.3.3 Präparation.....	25
2.3.3.1 Muskelstreifen des humanen Vorhofs.....	25
2.3.3.2 Rechtsventrikuläre Papillarmuskeln der Maus.....	26
2.3.4 Einhängen.....	26
2.3.5 Allgemeiner Versuchsablauf.....	26
2.3.6 Versuche an humanen Muskelstreifen.....	28
2.3.6.1 Induktion von Stress durch Herzglykoside und Sauerstoffradikale.....	28
2.4 Western Blot .....	29
2.5 Statistische Datenauswertung.....	31

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.1 Die Effekte von Ranolazin beim Vorhofflimmern.....	32
3.1.1 Beeinflussung der Inotropie durch Ranolazin in humanem Vorhofmyokard.....	32
3.1.2 Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin.....	33
3.1.3 Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität bei steigenden Stimulationsfrequenzen...	34
3.1.4 Der Einfluss von Ranolazin auf die Ca <sup>2+</sup> -Überladung durch Glykoside.....	37
3.2 Die Effekte von Ranolazin bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression.....	39
3.2.1 Einfluss der chronischen CaMKII $\delta_c$ -Überexpression auf das Herzgewicht.....	39
3.2.2 Der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität.....	39
3.2.3 Der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität bei steigenden Frequenzen .....	40
3.2.4 Der Einfluss der CaMKII $\delta_c$ auf die Arrhythmogenese.....	43
3.2.5 Der Ca <sup>2+</sup> -Haushalt bei Überexpression der CaMKII $\delta_c$ .....	44
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>47</b>
4.1 Ranolazin wirkt am Vorhofmyokard negativ inotrop.....	48
4.2 Die Inhibition des späten Na <sup>+</sup> -Stroms verbessert die diastolische Funktion.....	49
4.3 Die kardiale Überexpression der CaMKII $\delta_c$ induziert Herzinsuffizienz.....	52
4.4 Ranolazin hemmt Arrhythmien in transgenen CaMKII $\delta_c$ -Mäusen.....	54
4.5 Klinischer Ausblick und Relevanz der vorliegenden Arbeit.....	56
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>59</b>
<b>7. Publikationen zum Thema dieser Promotionsarbeit</b> .....	<b>70</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>71</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>72</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Ultrastruktur der Herzmuskulatur.....	3
Abbildung 1-2: Elektromechanische Kopplung.....	5
Abbildung 1-3: Struktur und Aktivierung der CaMKII.....	9
Abbildung 1-4: Aufbau des kardialen Na <sup>+</sup> -Kanals.....	10
Abbildung 1-5: Vergleich von WT- und TG-Herzen mit CaMKII $\delta_C$ -Überexpression.....	14
Abbildung 1-6: Strukturformel von Ranolazin.....	16
Abbildung 1-7: Reduktion von ventrikulären Tachykardien unter Ranolazin.....	17
Abbildung 2-1: Versuchsaufbau der Muskelstreifenexperimente.....	22
Abbildung 2-2: Originalregistrierung des Versuchsablaufs eines humanen Muskelstreifens. ....	27
Abbildung 3-1: Negativ inotrope Wirkung von Ranolazin beim Vorhofflimmern.....	32
Abbildung 3-2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin.....	33
Abbildung 3-3: Die entwickelte Kraft unter Ranolazin bei steigenden Frequenzen.....	34
Abbildung 3-4: Die diastolische Spannung unter Ranolazin bei steigenden Frequenzen.....	35
Abbildung 3-5: Originalregistrierung der Post-Pausen-Potenzierung bei VHF-Muskelstreifen.....	36
Abbildung 3-6: Post-Pausen-Potenzierung bei VHF-Muskelstreifen.....	36
Abbildung 3-7: Originalregistrierung eines Versuchs mit 0,25 $\mu$ M Ouabain.....	37
Abbildung 3-8: Darstellung der durchschnittlichen Zeit bis zur Kontraktur unter Ouabain.....	37
Abbildung 3-9: Originalregistrierung zur Exposition mit 200 $\mu$ M Wasserstoffperoxid.....	38
Abbildung 3-10: Darstellung der durchschnittlichen Zeit bis zur Kontraktur unter Wasserstoffperoxid.....	38
Abbildung 3-11: Herzgewicht, Körpergewicht und der HG/KG-Quotient der Mäuse.....	39
Abbildung 3-12: Darstellung der normalisierten diastolischen Spannung in TG-Papillarmuskeln..	40
Abbildung 3-13: Repräsentative Originalregistrierung einer Kraft-Frequenz-Beziehung bei der Maus.....	41
Abbildung 3-14: Darstellung der entwickelten Kraft der Papillarmuskeln bei steigenden Frequenzen.....	42
Abbildung 3-15: Darstellung der diastolischen Spannung der Papillarmuskeln bei steigenden Frequenzen.....	42
Abbildung 3-16: Registrierung der Amplituden während der Arrhythmie.....	43
Abbildung 3-17: Registrierung der Amplituden nach Gabe von 5 $\mu$ M Ranolazin.....	43
Abbildung 3-18: Anzahl der aufgetretenen Arrhythmien in WT und TG.....	44
Abbildung 3-19: Beenden der aufgetretenen Arrhythmien mit Ranolazin.....	44
Abbildung 3-20: Originalregistrierung der Post-Pausen-Potenzierung von Papillarmuskeln.....	45
Abbildung 3-21: Post-Pausen-Potenzierung der Papillarmuskeln.....	45
Abbildung 3-22: SERCA-Expression in transgenen Mäusen.....	46
Abbildung 3-23: Expression des NCX in transgenen Mäusen.....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Anzahl der aufgetretenen supraventrikulären Tachyarrhythmien nach NSTEMI. ....	17
Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung.....	19
Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Dissektionslösung.....	20
Tabelle 2-3: Anonymisierte Daten der Patienten mit Vorhofflimmern.....	24
Tabelle 2-4: Anonymisierte Daten der Patienten mit Sinusrhythmus.....	24
Tabelle 2-5: Schema zur Ouabain-Konzentrationsfindung.....	28
Tabelle 2-6: Bestandteile des Homogenisierungspuffers.....	29
Tabelle 2-7: Bestandteile des Trenngels. ....	29
Tabelle 2-8: Bestandteile des Sammelgels.....	29
Tabelle 2-9: Bestandteile des Laufpuffers.....	30
Tabelle 2-10: Bestandteile des Transferpuffers.....	30
Tabelle 3-1: Angabe der Kräfte der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin.....	34
Tabelle 3-2: Angabe der entwickelten Kräfte bei steigenden Frequenzen.....	35
Tabelle 3-3: Mittelwerte der diastolischen Spannung bei steigenden Frequenzen.....	36
Tabelle 3-4: Exakte Angabe der entwickelten Kräfte während steigender Frequenzen.....	42
Tabelle 3-5: Exakte Angabe der Werte für die diastolische Spannung.....	43

## Abkürzungsverzeichnis

ACB	Arteriokoronarer Bypass
ACE-I	Engl.: Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AKE	Aortenklappenersatz
ANOVA	Engl.: Analysis Of Variance (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATXII	Anemonia sulcata toxin II
$\beta$ -B	$\beta$ -Blocker
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
Ca-A	Ca <sup>2+</sup> -Antagonist
CaM	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
DAD	Engl.: Delayed Afterdepolarization
DHP-Rezeptoren	Dihydropyridin-Rezeptoren
Diu	Diuretika
EAD	Engl.: Early Afterdepolarization
EF	Ejektionsfraktion
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G <sub>s</sub>	Guaninnukleotidbindendes Protein
HFpEF	Engl.: Heart Failure with preserved Ejection Fraction
HFrEF	Engl.: Heart Failure with reduced Ejection Fraction
HG	Herzgewicht
HRP	Engl.: Horseradish Peroxidase
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IE	Internationale Einheit
I <sub>Kr</sub>	Engl.: Rapid delayed rectified potassium current
I <sub>Tl</sub>	Engl.: Transient inward current
KG	Körpergewicht
KHS	Krebs-Henseleit-Lösung
L <sub>max</sub>	Länge bei maximal entwickelter Kraft
LQT3 Syndrom	Long-QT-3-Syndrom
LVSD	Linksventrikulärer systolischer Druck
Maze	Maze-Verfahren
MI	Mitralklappeninsuffizienz
MKE	Mitralklappenersatz
MKR	Mitralklappenrekonstruktion
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NHE	Natrium-Wasserstoff-Austauscher
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Infarkt
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
P	Signifikanzniveau
PKA	Proteinkinase A
PR	Engl.: Post-Rest (Post-Pausen-Potenzierung)
Ran	Ranolazin
ROS	Engl.: Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RM-ANOVA	Engl.: Repeated-Measures Analysis Of Variance
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2



SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SS	Engl.: Steady-State
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
TKE	Trikuspidalklappenersatz
TKR	Trikuspidalklappenrekonstruktion
WT	Wildtyp
TG	Transgen
VHF	Vorhofflimmern

# 1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das ein Ungleichgewicht zwischen der Auswurfleistung des Herzens und dem Sauerstoffbedarf der Peripherie zugrunde liegt. Sie war in Deutschland 2006 der häufigste Grund für die Hospitalisierung von Patienten (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2008) und gehört derzeit zu den häufigsten und kostenintensivsten Erkrankungen (Dickstein et al. 2008). Die Framingham-Studie, die mittlerweile seit 1948 läuft, zeigte, dass ungefähr 0,5-1% der Bevölkerung in den Industrienationen an Herzinsuffizienz leiden, dabei steigt die Prävalenz bei über 75-Jährigen auf etwa 10% an (Office for National Statistics, 2000). Die Prognose der Herzinsuffizienz ist schlecht: Fünf Jahre nach Hospitalisierung beträgt die Sterblichkeit etwa 74% (Lee DS et al. 2009). Da die Bevölkerung immer älter wird, wird es in den nächsten Jahren zu einer überproportionalen Zunahme der Erkrankung kommen und so auch ein zunehmendes gesundheitsökonomisches Problem darstellen.

Heute ist bekannt, dass etwa die Hälfte der herzinsuffizienten Patienten unter einer Störung der diastolischen Funktion („heart failure with preserved ejection fraction“ [HFpEF], Synonym: diastolische Herzinsuffizienz) leidet. Im Gegensatz zur Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion („heart failure with reduced ejection fraction“ [HFrEF], Synonym: systolische Herzinsuffizienz) sind für die Behandlung der HFpEF keine evidenzbasierten Therapien etabliert (Hoppe und Erdmann 2010). Vielmehr konzentriert man sich bei der Behandlung auf zugrundeliegende Erkrankungen (Hypertrophie, Fibrose) und behandelt die Auswirkungen der HFpEF symptomorientiert (Gaasch und Zile 2004). Der Bedarf nach neuen therapeutischen Strategien ist daher groß.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die Komorbidität von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern, die etwa 15-19% der herzinsuffizienten Patienten betrifft (Deedwania et al. 1998, Carson et al. 1993, Middlekauff et al. 1991). So spielt die Herzinsuffizienz neben anderen Erkrankungen wie Bluthochdruck, Klappenvitien und Ischämien eine entscheidende Rolle für das Auftreten von Vorhofflimmern. Eine Studie ergab eine Komorbidität von Vorhofflimmern bei etwa 40% der Patienten im NYHA-Stadium IV (Middlekauff et al. 1991).

Vorhofflimmern ist die häufigste Form von behandlungsbedürftigen Herzrhythmusstörungen in Europa, derzeit sind etwa 4,5 Millionen Menschen von Vorhofflimmern betroffen (Fuster et al. 2006). Die Häufigkeit der Erkrankung steigt mit zunehmendem Lebensalter, wobei über 40-Jährige zu 2,3% betroffen sind, die Prävalenz jedoch ab einem Alter über 65 Jahren schon bei 5,9% liegt (Feinberg et al. 1995). Neben der eingeschränkten Lebensqualität der Patienten durch subjektive Beschwerden wie verminderte Belastbarkeit, Palpitationen, Angst- und Schwindelgefühl ist von besonderer

## 1. Einleitung

klinischer Bedeutung die Bildung von Vorhoffohrthromben mit einhergehendem Risiko eines Apoplexes. Vorhofflimmern ist demnach ein Risikofaktor, der mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergeht (Benjamin et al. 1998).

Neben der interventionellen Therapie des Vorhofflimmerns existiert auch eine medikamentöse Behandlung. Diese ist jedoch nebenwirkungsreich, da z.B. Antiarrhythmika der Klassen I und III ein ventrikulär proarrhythmogenes (Hohnloser und Singh 1995) und negativ inotropes Potential besitzen und daher, mit Ausnahme von Dronedaron und Amiodaron, bei strukturellen Herzerkrankungen kontraindiziert sind. Amiodaron, ein potenter Vertreter der Klasse-III-Antiarrhythmika, ist bekannt für erhebliche extrakardiale Nebenwirkungen wie Sehstörungen, Schilddrüsenfunktionsstörungen und Induktion einer irreversiblen Lungenfibrose. Dem Einsatz der aktuellen Antiarrhythmika sind damit Grenzen gesetzt. Trotz der Markteinführung von Dronedaron 2009 ist daher der Bedarf für neue Wirkstoffe groß, auch weil die Zahl der Patienten mit Vorhofflimmern in den nächsten 50 Jahren, durch einen größeren Anteil älterer Menschen, wahrscheinlich um das 2,3-Fache ansteigen wird. Vorhofflimmern und Begleiterkrankungen stellen eine signifikante sozioökonomische Belastung dar, an die derzeit etwa 0,9 – 2,4% der Gesamtausgaben des „National Healthsystem“ (NHS) in Großbritannien entfallen (Stewart et al. 2004). Wegen des breiten Spektrums an systemischen Nebenwirkungen stehen in der Arzneimittelentwicklung nun vorhofspezifische Ionenkanäle als medikamentöser Angriffspunkt im Fokus.

### 1.1 Die Herzmuskelzelle

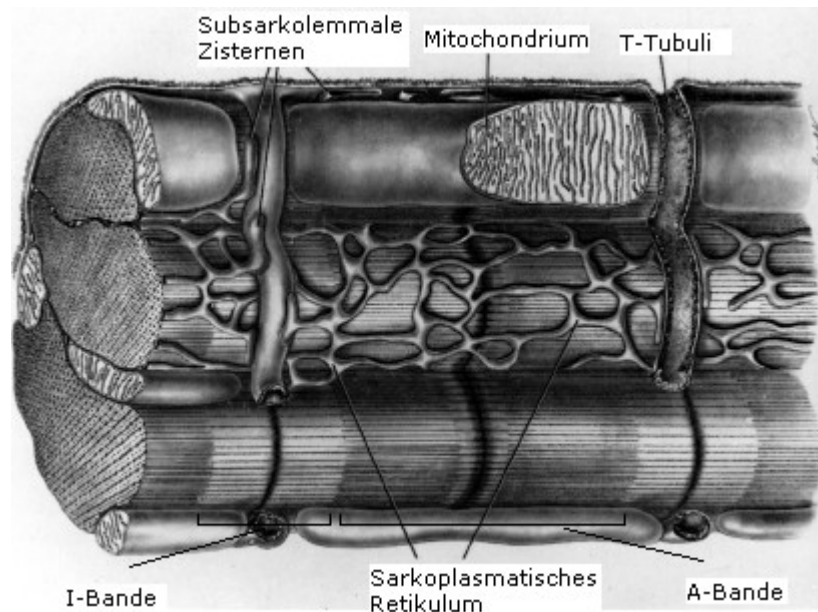
Das Myokard besteht aus verzweigten, quergestreiften und einkernigen Herzmuskelzellen, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die einzelne Zelle ist ein zylindrisches Gebilde von ca. 100 µm Länge und einem Durchmesser von 15-20 µm, das von einer Zellmembran, dem Sarkolemm, umgeben ist. Über die Glanzstreifen, *Disci intercalares*, sind zwei Herzmuskelzellen an ihren Enden miteinander verbunden. Diese dienen einerseits als Verankerung der Zellen untereinander, andererseits ermöglichen sie die Erregungsübertragung. Die rasche Ausbreitung der Erregung über die Zellen wird durch „gap junctions“ ermöglicht, die einen Austausch von Ionen und second-Messenger-Molekülen erlauben. So wird eine rasche Erregungsausbreitung auf den Zellverband („single-unit-typ“) ermöglicht, der in einer nahezu synchronen Kontraktion des Zellverbandes (funktionelles Synzytium) resultiert.

#### 1.1.1 Die Ultrastruktur der Herzmuskelzelle

Das Sarkolemm, das jede einzelne Herzmuskelzelle umgibt, besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und Cholesterin, in der integrale Proteine liegen. Diese Proteine stellen wichtige

## 1. Einleitung

Kanäle und Pumpen dar, über die Transportvorgänge zur Signalübertragung zwischen intra- und extrazellulärem Raum erfolgen. Die ionalen Transportvorgänge können dabei passiv, entlang eines Konzentrationsgradienten, oder aktiv unter Energieverbrauch ablaufen. Abbildung 1-1 zeigt einen schematischen Überblick über die Ultrastruktur der humanen Herzmuskulatur. Die Oberfläche des Sarkolemmms ist durch fingerförmige Einstülpungen, die sogenannten transversalen (T-)Tubuli, stark vergrößert und steht mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) im Zellinneren eng in Verbindung.



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung der Ultrastruktur der Herzmuskulatur.

Sarkomere, Myofilamente sowie Mitochondrien und T-Tubuli sind schematisch dargestellt. (Bild modifiziert nach Bers 2001, Seite 3)

Die Querstreifung der Zellen ergibt sich durch die regelmäßige Anordnung der kontraktilen Filamente, den Myofibrillen, die hintereinander in Form von Sarkomeren arrangiert sind.

Das Sarkomer, als kleinste Untereinheit der Myofibrillen, wird an seinen Enden durch die Z-Banden begrenzt und erreicht eine Länge von etwa 1,5-2,2  $\mu\text{m}$ . Innerhalb eines Sarkomers lassen sich helle und dunklere Banden unterscheiden – jedes Sarkomer besitzt zwei halbe I-Banden (isotrop = hell) und zwei A-Banden (anisotrop = dunkel). Hauptbestandteil der A-Bande ist das „dicke“ Myosinfilament, das die „dünnen“ Aktinfilamente der I-Bande umfasst. Darüber hinaus enthält die A-Bande einen H-Streifen, der ausschließlich Myosinfilamente enthält und einen M-Streifen, in dem die Myosinfilamente verankert sind. Im Bereich der I-Bande verlaufen Aktinfilamente, die in der Z-Linie verankert sind. Die parallel zueinander verlaufenden Myofilamente können das Sarkomer durch Kontraktion verkürzen bzw. durch Relaxation verlängern.

Außerdem enthält die Herzmuskelzelle weitere, für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion unerlässliche Zellorganellen und Proteine wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lipofuszin-Granula, Lysosomen,

## 1. Einleitung

Peroxisomen, Glykogen sowie das Zytoskelett (Bers 2001).

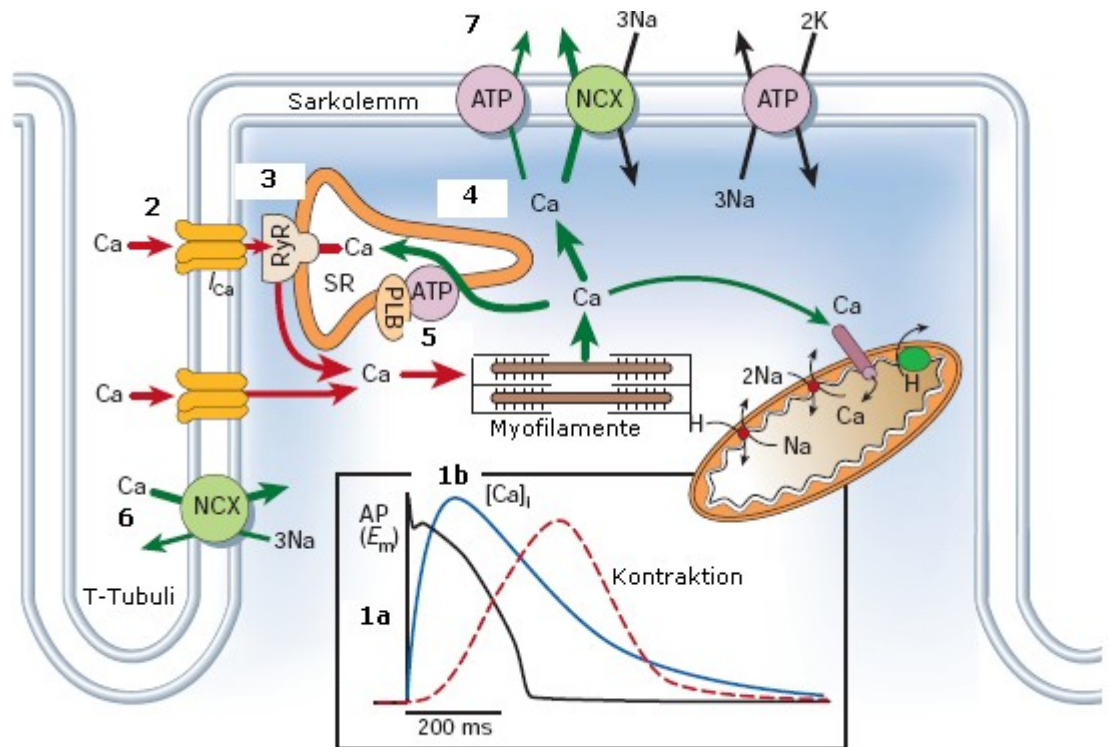
### **1.1.2 Elektromechanische Kopplung**

#### **1.1.2.1 Kontraktion**

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den Vorgang von der elektrischen Erregung im Herzen zur Kontraktion und anschließenden Relaxation des Myokards. Durch die Kontraktion des Myokards kommt es zu einem Druckanstieg im Ventrikel. Übersteigt dieser den systemischen Druck in der Aorta, kommt es zur Öffnung der Aortenklappe und zum Auswurf des Blutes in den Körperkreislauf. Kalzium spielt hierbei als Second Messenger und auch als direkter Aktivator der Myofilamente eine Schlüsselrolle. Folglich spielen Fehlregulationen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien (Pogwizd et al. 2001).

Die Kontraktion des Kardiomyozyten wird durch die elektrische Erregung, das Aktionspotential, eingeleitet. Es beginnt mit der Depolarisationsphase und führt durch die Öffnung schneller spannungsgesteuerter  $\text{Na}^+$ -Kanäle (Abbildung 1-2, 1a) entlang des Sarkolemms zu einem steilen Aufstrich. In der sich anschließenden Plateauphase (1b) werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (sog. Dihydropyridin (DHP)-Rezeptoren) (2) der sarkolemmalen T-Tubuli geöffnet. Es erfolgt ein Einstrom von Kalzium ins Zellinnere. Durch die enge Nachbarschaft der DHP-Rezeptoren zum SR (4), dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, triggert das von extrazellulär eingeströmte Kalzium die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR über  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle (sog. Ryanodin-Rezeptoren, RyR2) (3). Das von extrazellulär eingeströmte Kalzium stellt unter physiologischen Bedingungen einen kleineren Anteil (etwa 30%) der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dar. Der weit größere Anteil wird durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR erzielt. Dieser Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde erstmals 1975 von Fabiato und Fabiato beschrieben (Fabiatio A und Fabiatio F 1975).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1-2: Elektromechanische Kopplung.**

**1a:** Aufstich des Aktionspotentials durch Öffnung schneller spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle, **1b:** Plateauphase durch Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des Sarkolemm (DHP-Rezeptoren) (2), die die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch Ryanodinrezeptoren (3) des SR (4) triggern. Die Wiederaufnahme von Kalzium erfolgt zum Großteil über die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des SR (SERCA2) (5) und zum kleineren Teil über den Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) (6) und der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Sarkolemm (7). (Bild modifiziert nach Bers 2002, Seite 198)

In Abwesenheit von Kalzium verhindert Tropomyosin die Bindung des Myosinköpfchens an Aktin. Die Bindung des freigesetzten Kalziums an Troponin C bewirkt eine Konformationsänderung des Tropomyosins, die eine Freigabe der Myosinbindungsstelle am Aktinfilament bewirkt und so den Kontraktionszyklus zwischen den beiden Filamenten einleitet. Des Weiteren bewirkt der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine Aktivierung der Myosin-gebundenen Adenosin-5'-Triphosphatase (ATPase), die an das Myosinköpfchen gebundenes Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Der entstandene Myosin-ADP-Komplex kann nun an Aktin binden. Unter Abgabe des ADP-Moleküls knickt der Myosinkopf von 90° auf 45° ab, so dass es zur Verschiebung der Filamente gegeneinander kommt, wodurch eine Kontraktion entsteht. Da das Volumen der Kardiomyozyten zu einem großen Anteil aus Myofilamenten besteht, addieren sich die Verkürzungen zur gemeinsamen Kontraktion der Herzmuskelzelle. Nach erneuter Bindung von ATP an das Myosinköpfchen löst sich dieses unter Freigabe der Bindungsstelle von Aktin (Gleitfilamenttheorie von Huxley 1969).

## 1. Einleitung

### 1.1.2.2 Relaxation

Zur Relaxation des Herzmuskels kommt es durch Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Zytosol werden mehrere Wege unterschieden, die einen unterschiedlichen Beitrag dazu leisten. Den Hauptmechanismus beim Menschen stellt die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (sog. SERCA) (Abbildung 1-2, 5) dar (Inesi 1985), die 70% des Kalziums aktiv zurück in das SR pumpt. Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) (6) entfernt weitere 28% des Kalziums (Bers 2001), indem er den physiologischen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradienten über der Zellmembran nutzt, um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen in den Extrazellulärraum zu transportieren. Unter physiologischen Bedingungen eliminiert der NCX das von extrazellulär eingeströmte Kalzium. In geringem Maße wird Kalzium auch durch sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen (7) und einen mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter entfernt. Durch Absenken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol auf  $10^{-7}$  M löst sich Kalzium aus seiner Bindung mit Troponin C. Als Folge blockiert Tropomyosin erneut die Bindungsstellen zwischen Aktin und Myosin und der Myofibrillenapparat relaxiert.

## 1.2 Regulation der Kontraktilität des Myokards

Aus den oben beschriebenen Vorgängen lassen sich für die Regulation der myokardialen Kontraktilität drei Hauptmechanismen ableiten. Zum einen kann die Sensitivität der kontraktilen Proteine für Kalzium modifiziert werden, zum anderen ermöglicht eine vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung eine zunehmende Querbrückenaktivierung.

Seit langem ist bekannt, dass ein erhöhter enddiastolischer Füllungsdruck eine Steigerung der myokardialen Kontraktilität und so der Auswurfleistung zur Folge hat (Frank-Starling-Mechanismus) (Starling 1918, Frank 1895). Die Dehnung bewirkt eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente (Allen und Kurihara 1982) und eine Verlängerung der Sarkomere, die wiederum eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR bewirkt (Fabiato A 1980). Die Verlängerung der Sarkomere optimiert die Überlappung der Myofilamente und bedingt eine verstärkte Aktivierung.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Kontraktilität ist die sympathoadrenerge Stimulation. Sie erfolgt durch die Freisetzung von Katecholaminen und führt über eine Aktivierung von  $\alpha$ - sowie  $\beta$ -Rezeptoren auf zellulärer Ebene zur Steigerung der Kontraktionskraft. Der positiv inotrope Effekt ist über  $\beta$ -Adrenorezeptoren stärker ausgeprägt (Brodde 1991) als über  $\alpha$ -Adrenorezeptoren (Endoh und Blinks 1988).  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren koppeln über ein Guaninnukleotid-bindendes Protein ( $G_s$ ) an die Adenylatzyklase, die die Bildung von cAMP aus ATP bewirkt. cAMP bewirkt als intrazellulärer Botenstoff („second messenger“), über eine Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen, eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude und damit eine Steigerung der Kontraktionskraft.

## 1. Einleitung

Bereits 1871 beschrieb Bowditch am Froschherzen den positiv inotropen Effekt bei Steigerung der Stimulationsfrequenzen (sog. „Treppen-Phänomen“), der später als Bowditch-Effekt bezeichnet werden sollte (Bowditch 1871). Eine Erklärung dieser positiven Kraft-Frequenz-Beziehung sind die bei höheren Stimulationsfrequenzen häufigeren Depolarisationen. Sie verursachen einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über DHP-Rezeptoren mit konsekutiver Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude (Piot et al. 1996). Die Steigerung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Frequenz stellt einen wichtigen positiv inotropen Mechanismus in humanem Myokard und im Myokard vieler Säugetierarten dar (Bowditch 1871, Blinks und Koch-Weser 1961). Diese direkte Frequenzinotropie unterstützt den erhöhten kardialen Blutausswurf bei körperlichen Belastungen. Die Zunahme der ventrikulären Kontraktionskraft kommt durch eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente zustande, der für die systolische Aktivierung der kontraktilen Proteine verantwortlich ist (Allen und Blinks 1978, Wier und Yue 1986, Lee KS 1987). Weiterhin führt der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer vermehrten Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Diese positive Kraft-Frequenz-Beziehung lässt sich nicht in allen Spezies nachweisen, so ist sie im ventrikulären Rattenmyokard, aber auch in Vorhofpräparaten verschiedener Spezies nicht nachweisbar. Im humanen Vorhofpräparat von gesunden Herzen konnte sie jedoch gezeigt werden.

### **1.2.1 Post-Pausen-Potenzierung**

Die Post-Pausen-Potenzierung bezeichnet den Kraftzuwachs der ersten Kontraktion nach einer bestimmten Stimulationspause (Koch-Weser und Blinks 1963). Der Potenzierung unterliegt eine vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR und stellt somit einen Indikator für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR dar (Allen et al. 1976, Bers 1985, Pieske et al. 1996). Die Pausenlänge kann abhängig von der Spezies variiert werden und beträgt in der Regel wenige Sekunden bis Minuten. Veränderungen der Kontraktilität beruhen auf einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Bei einigen Tierarten, z.B. beim Frosch, findet sich keine Post-Pausen-Potenzierung, da Kalzium eine weniger wichtige Rolle in der elektromechanischen Kopplung einnimmt. Auch im insuffizienten humanen Myokard ist die Potenzierung vermindert (Rossman et al. 2004, Pieske et al. 1996).

### **1.3 Die $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)**

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK) sind eine Gruppe von Kinasen, die von  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Calmodulin (CaM) aktiviert werden und verschiedene intrazelluläre Proteine phosphorylieren. Es werden verschiedene Isoformen unterschieden –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die in unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert werden. So kommen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen nur im Nervensystem vor. Die CaMKII $\delta$  ist die dominierende Isoform im Herzen (Hoch et al. 1999), von ihr



## 1. Einleitung

werden zwei Splicevarianten unterschieden – die CaMKII $\delta_C$  befindet sich im Zytosol und die CaMKII $\delta_B$ , die ausschließlich im Kern anzutreffen ist (Edman und Schulman 1994). Die CaMKII hat durch Phosphorylierung von zytosolischen Proteinen, wie beispielsweise der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Ryanodin-Rezeptoren und Phospholamban einen starken Einfluss auf die elektromechanische Kopplung des Myokards.

### **1.3.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII**

Das CaMKII-Holoenzym besteht aus 6-12 Monomeren, die ihm eine radförmige Struktur verleihen. Jedes dieser Monomere besteht aus drei Bereichen: Eine katalytische Region am aminoterminalen Ende, eine regulatorische Region, die sowohl autoinhibitorische als auch eine Bindungsregion für CaM besitzt, und einen carboxyterminalen Verbindungsbereich zur Oligomerisierung der Holoenzyme (Braun und Schulmann 1995). Die autoinhibitorische Region, die nahe an der aktiven katalytischen Domäne sitzt, blockiert den Zugang zu Substraten.

Bei ansteigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Zelle, beispielsweise während der Systole, kommt es zur Bindung von CaM und vier Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die die Verlagerung der autoinhibitorischen Region der CaMKII bewirkt. Auf diesem Weg wird die CaMKII aktiviert und kann durch Autophosphorylierung an der Aminosäureposition Threonin-287 den aktivierten Zustand beibehalten. Diese Autophosphorylierung bewirkt eine Affinitätssteigerung der Kinase für CaM (ca. 700-fach höhere Affinität) (Braun und Schulman 1995), so dass CaM auch bei sinkender intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration für einige Sekunden an der Kinase gebunden bleibt, und diese ihre Aktivität beibehält. Die Phosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne ermöglicht der CaMKII, selbst nach Abdissoziation von CaM, teilweise (zu 20-80%) aktiv zu bleiben (Lai et al. 1986, Lou et al. 1986, Schworer et al. 1986).

## 1. Einleitung

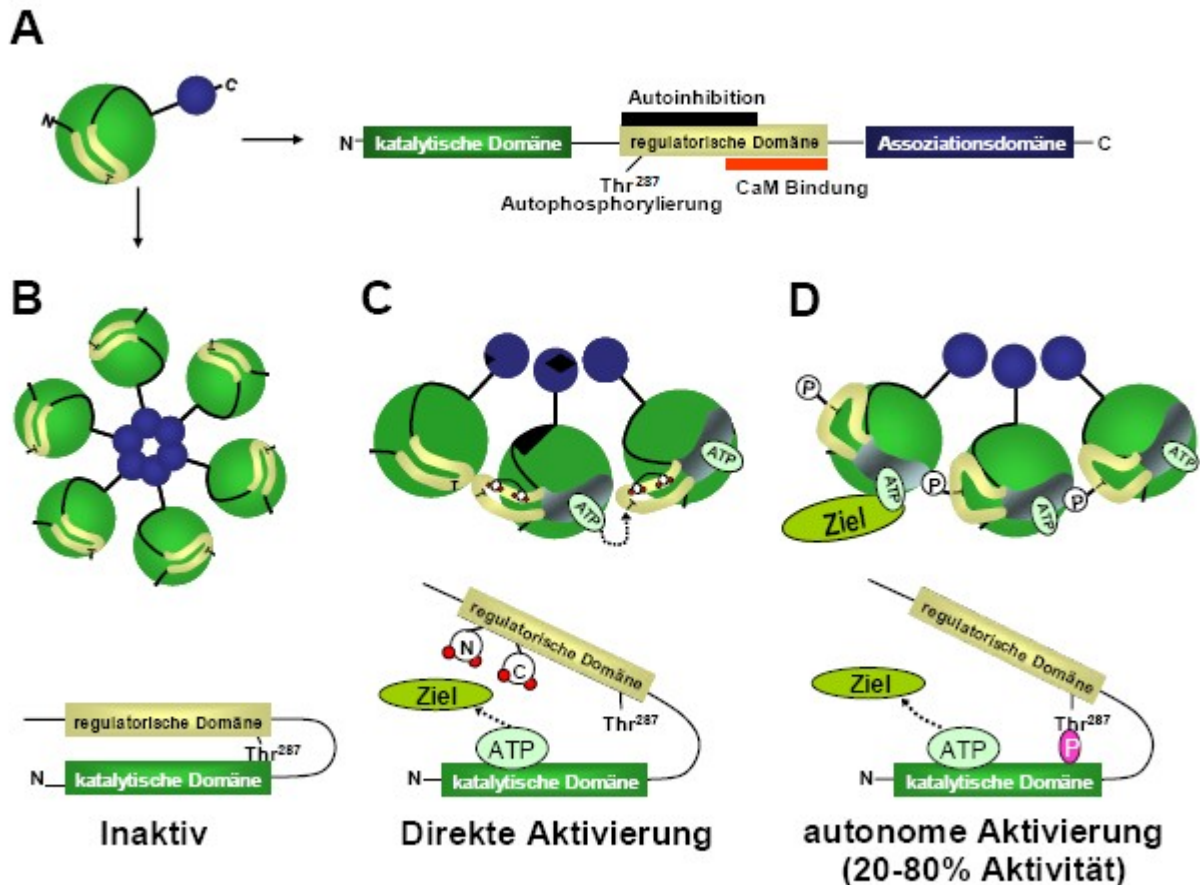


Abbildung 1-3: Struktur und Aktivierung der CaMKII.

**A:** Aufbau eines Monomers, bestehend aus drei Domänen. **B:** Anordnung der Monomere (6-12) zu einer radartigen Struktur. **C:** Aktivierung der CaMKII durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die regulatorische Domäne. **D:** Die nachfolgende Autophosphorylierung an Threonin-287 bewirkt, dass die CaMKII auch nach Abdissoziation von Calmodulin (CaM) zu 20-80% in einem aktiven Zustand verbleibt. (Bild modifiziert aus Maier und Bers 2002, Seite 924)

## 1.4 Der sarkolemmale $\text{Na}^+$ -Kanal

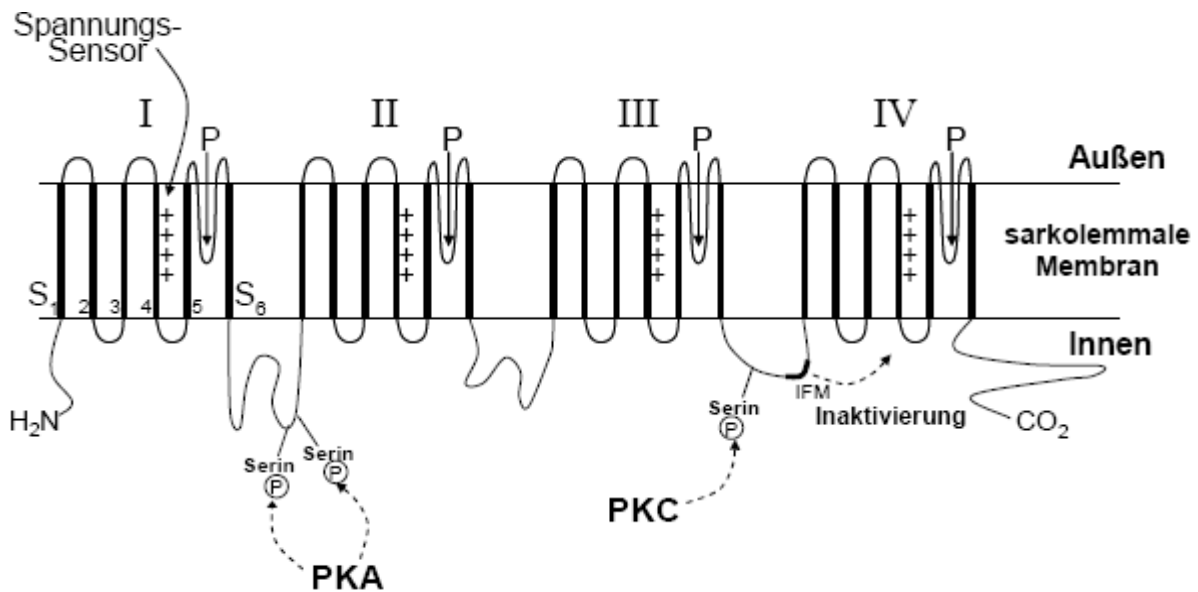
$\text{Na}^+$ -Kanäle spielen für die Physiologie des Myokards eine entscheidende Rolle. Sie ermöglichen die Depolarisation und tragen so wesentlich zur Erregungsbildung und -leitung im Herzen, im Gehirn und im Skelettmuskel bei.

### 1.4.1 Aufbau und Funktion des $\text{Na}^+$ -Kanals

$\text{Na}^+$ -Kanäle bestehen aus verschiedenen Untereinheiten: Die  $\alpha$ -Untereinheit ist von wesentlicher funktioneller Relevanz, des Weiteren gibt es 1-3  $\beta$ -Untereinheiten, die die Kanalfunktion regulieren. Zusammen bilden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten einen aktiven Kanal. Für die  $\beta$ -Untereinheiten der  $\text{Na}^+$ -

## 1. Einleitung

Kanäle in Gehirn und Skelettmuskel konnte gezeigt werden, dass sie zu einer verstärkten Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit beitragen (Isom et al. 1995). Im Herzen scheinen sie unter anderem von Bedeutung bei der Inaktivierung des  $\text{Na}^+$ -Stroms zu sein und spielen so wahrscheinlich eine Rolle bei einer Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms (Maltsev et al. 2009). Die eigentliche Durchtrittsstelle für  $\text{Na}^+$ -Ionen ist die  $\alpha$ -Untereinheit. Sie besteht aus vier homologen Domänen (I-IV) von denen jede sechs transmembranäre Segmente besitzt. Die Domänen sind so angeordnet, dass sie zentral jeweils eine Pore formen, die für die Funktion und die  $\text{Na}^+$ -Selektivität von Bedeutung ist (siehe Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4:** Aufbau des kardialen  $\text{Na}^+$ -Kanals.

Schema der  $\alpha$ -Untereinheit mit vier (I-IV) homologen Domänen, die jeweils aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6) bestehen. S4 ist elektrisch geladen und fungiert als Ladungssensor für die Kanalaktivierung. Die Verbindung zwischen S5 und S6 bildet eine zentrale Pore (sog. P-Segment) und ist für die Ionenselektivität verantwortlich. Des Weiteren dient S6 als Bindungsstelle für Lokalanästhetika. (Modifiziert nach Bers 2001, Seite 69)

Am  $\text{Na}^+$ -Kanal unterscheidet man unterschiedliche Zustände der transmembranären Kanäle. Im inaktivierten Zustand nach der Depolarisation ist der Kanal geschlossen und nicht reaktivierbar. Der Kanal kann durch Hyperpolarisation der Zellmembran wieder in einen geschlossenen, aber aktivierbaren Zustand versetzt werden. Erst die Repolarisation nach einem Aktionspotential versetzt den Kanal wieder in einen aktivierbaren Zustand.

Der Großteil der kardialen  $\text{Na}^+$ -Kanäle öffnet sich nur im Rahmen der Depolarisation für wenige Millisekunden. Einige Kanäle öffnen jedoch wieder oder bleiben direkt für einige 100 Millisekunden geöffnet und ermöglichen den sogenannten persistierenden oder späten  $\text{Na}^+$ -Strom während des gesamten Aktionspotentials (Belardinelli et al. 2006a). Auch wenn der späte  $\text{Na}^+$ -Strom nur etwa 1-2% der Amplitude des maximalen  $\text{Na}^+$ -Spitzenstroms ausmacht, kann er durch seine lange Persistenz einen bedeutenden Beitrag zur intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration leisten (Noble D und

## 1. Einleitung

Noble PJ 2006). Während pathologischer Zustände, wie Hypoxie, Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern oder in Gegenwart verschiedener Metaboliten, steigt die Amplitude dieses Stroms abnormal an (Ju et al. 1996, Maltsev et al. 2007, Sossalla et al. 2010b, Undrovinas et al. 1992, Wu J und Corr 1994) und kann auf diesem Weg zu einer Na<sup>+</sup>-Überladung in den Kardiomyozyten führen (Makielski und Farley 2006, Sossalla et al. 2008). Eine pharmakologische Reduktion des gesteigerten späten Na<sup>+</sup>-Stroms kann die Na<sup>+</sup>-Beladung der Zelle signifikant senken (Sossalla et al. 2008).

## 1.5 Kardiale Arrhythmien

Unter Herzrhythmusstörungen versteht man eine Störung der normalen Herzschlagfolge, deren Ursache in einem nicht regelrechten Ablauf von Erregungsbildung und -leitung im Myokard liegt. Sie können sowohl kardialer als auch extrakardialer Genese sein und sind durch eine Störung des zeitlichen Ablaufs der einzelnen Herzaktionen oder auch durch eine Abweichung der normalen Herzfrequenz (50-100 Schläge/Min.) gekennzeichnet.

### 1.5.1 Störungen der Erregungsbildung und -leitung

Die normale Erregungsbildung erfolgt in spezifischen Schrittmacherzellen des Sinusknotens im rechten Vorhof. Die Schrittmacherzellen besitzen die Fähigkeit, bei Erreichen des Schwellenpotentials spontan ein Aktionspotential auszulösen, das sich innerhalb kürzester Zeit über das Myokard ausbreiten kann (funktionelles Synzytium) und dadurch die geordnete Kontraktion des Herzens ermöglicht. Unter pathologischen Bedingungen können neben den zum Erregungsbildungs- und -leitungssystem gehörenden Zellen auch andere myokardiale Zellen die Fähigkeit zur Erregungsbildung erlangen. Bei Elektrolytverschiebungen, Ischämie oder Hypoxie sind die Zellmembranen nicht mehr in der Lage, die Ionengradienten aufrechtzuerhalten. Zusätzlich nimmt die Öffnungswahrscheinlichkeit für repolarisierende K<sup>+</sup>-Kanäle ab. Als Folge dieser Veränderung wird das Membranruhepotential auf weniger negative Werte angehoben und so das Auftreten vorzeitiger Aktionspotentiale erleichtert.

Ein Mechanismus mit deutlich proarrhythmischem Potential ist die getriggerte Aktivität. Als Auslöser der Extraerregungen wirken depolarisierende Nachpotentiale. Zwei Formen werden unterschieden: Frühe Nachdepolarisationen („early afterdepolarizations“, EADs) treten in der Repolarisationsphase eines Aktionspotentials auf, wohingegen späte Nachdepolarisationen („delayed afterdepolarizations“, DADs) auf ein Aktionspotential folgen. Als Ursache für EADs gilt vor allem eine Verlängerung des Aktionspotentials (Bers 2001), wobei als Ursache ein verminderter repolarisierender K<sup>+</sup>-Ausstrom und bzw. oder ein persistierender depolarisierender Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Einstrom diskutiert werden (Tomaselli und Zipes 2004). Aber auch Medikamente wie Klasse-III-Antiarrhythmika (Sotalol, Amiodaron) können

## 1. Einleitung

das Aktionspotential über die Inhibition des  $K^+$ -Kanals verlängern und EADs auslösen. Daher erfolgen bei Patienten, die auf Amiodaron oder Sotalol eingestellt werden, regelmäßige elektrokardiographische Kontrollen der QT-Zeit. Außerdem treten EADs eher bei niedrigen Frequenzen auf, wohingegen die DADs bei höheren Herzfrequenzen beobachtet werden. Letztere können durch erhöhte diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bedingt sein, z.B. bei der Herzinsuffizienz, Katecholamineinnahme oder Überdosierung von Digitalispräparaten. Bei der Initiierung einer DAD kommt es zur spontanen  $Ca^{2+}$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Das freigesetzte Kalzium kann durch den NCX über die Zellmembran aus der Zelle transportiert werden und verursacht durch die elektrogene Transporteigenschaft (ein  $Ca^{2+}$ -Ion für drei  $Na^+$ -Ionen) einen depolarisierenden  $Na^+$ -Einstrom. Dieser Strom wird auch transienter Einwärtsstrom ( $I_{Ti}$ ) genannt. Bei Überschreiten des Schwellenpotentials kann es zu einem zusätzlich getriggerten Aktionspotential kommen (Zipes 2003).

### 1.6 Pathophysiologische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz geht mit Symptomen wie Leistungseinschränkung, Dyspnoe und prätibialen Beinödemen einher. Zur Diagnose müssen zusätzlich Anzeichen auf eine diastolische oder systolische Funktionsstörung bestehen, so wird pathophysiologisch die HFpEF von der HFrEF unterschieden.

Die HFrEF ist die Folge einer Kontraktionsstörung des Myokards und ist durch ein vermindertes Herzzeitvolumen gekennzeichnet. Sie tritt häufig sekundär nach Myokardischämie, arterieller Hypertonie oder im Rahmen von Kardiomyopathien auf. Am vorgeschädigten Herzen treten Regulationsmechanismen (Kapitel 1.2) zur Kompensation der eingeschränkten Pumpleistung ein, die aber auf lange Sicht zu einer Verschlechterung der Auswurfleistung führen und mit einem elektrophysiologischen Umbau des Gewebes („Remodeling“) einhergehen.

Die HFpEF ist durch einen erhöhten Füllungsdruck bei erhaltener, normaler Kontraktilität gekennzeichnet. Eine frühdiastolische Verlangsamung der Relaxation und eine spätdiastolische Störung der Dehnbarkeit („Compliance“) führen zu einer erhöhten Steifigkeit der Ventrikel (Zile et al. 2004). Ein typisches Beispiel ist das alternde Herz, das vermehrt interstitielles Bindegewebe einlagert und häufig eine relative Myokardhypertrophie aufweist.

Die Veränderungen im herzinsuffizienten Myokard umfassen auch die intrinsische Kontraktilität. An herzinsuffizienten Hunden konnte eine Erschöpfung des Frank-Starling-Mechanismus gezeigt werden (Komamura et al. 1993). Schwinger et al. fanden an humanem insuffizienten Myokard, dass das Schlagvolumen durch Erhöhung der Vorlast nicht mehr steigerbar war (Schwinger et al. 1994). Diese Arbeiten wurden jedoch von Holubarsch et al. 1996 weitgehend in Frage gestellt, indem die Arbeitsgruppe einen erhaltenen Frank-Starling-Mechanismus in humanen herzinsuffizienten Herzen

## 1. Einleitung

nachweisen konnte (Holubarsch et al. 1996). Untersuchungen der Kraft-Frequenz-Beziehung an Präparaten des herzinsuffizienten menschlichen Myokards zeigten keine Kraftsteigerung (Mulieri et al. 1992) bzw. eine inverse Kraft-Frequenz-Beziehung (Pieske et al. 1992, 1995).

Gwathmey und Morgan zeigten als Erste einen verlängerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im herzinsuffizienten Myokard des Menschen (Gwathmey et al. 1987, Morgan et al. 1990). Weitere Untersuchungen am insuffizienten Muskelstreifenpräparat von Pieske et al. fanden eine eingeschränkte Funktion des SR zur Aufnahme und Freisetzung von Kalzium (Pieske et al. 2002a). Analog zu diesen Beobachtungen konnte eine verminderte Expression der SERCA am terminal insuffizienten Myokard nachgewiesen werden (Mercadier et al. 1990, Takahashi et al. 1992). Die reduzierte Aktivität und Expression der SERCA führt zu einer geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation im SR. Ihre Aktivität wird durch Phospholamban reguliert. Unphosphoryliertes Phospholamban hemmt die SERCA-Aktivität, eine Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) oder die CaMKII verstärkt die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme. Gleichzeitig ist die Aktivität des sarkolemmlen NCX am terminal insuffizienten Myokard gesteigert. Möglicherweise steht sie in Zusammenhang mit der verminderten Aktivität der SERCA und führt kompensatorisch zu einer vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus der Zelle (Studer et al. 1994).

### **1.7 Die CaMKII und ihr Einfluss auf Herzinsuffizienz, Arrhythmien und den $\text{Na}^+$ -Kanal**

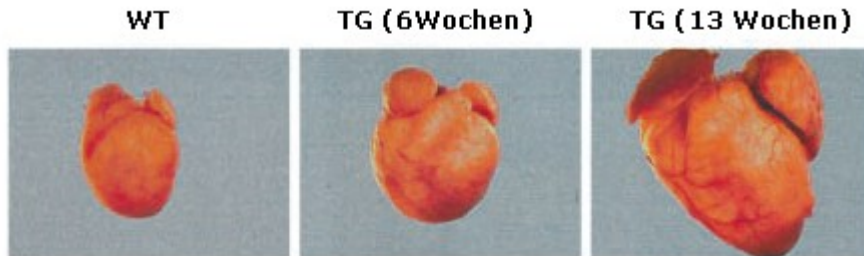
Vor über zehn Jahren wurde das erste Mal der Zusammenhang von Herzinsuffizienz und der Überexpression der CaMK beschrieben. Damals vermutete man, dass es sich um einen Kompensationsmechanismus handelt, da die Expression und Aktivität der CaMK positiv mit der verschlechterten Kontraktionskraft des terminal herzinsuffizienten Gewebes zu korrelieren und als Hauptmechanismus die Regulation der SERCA über Phospholamban im Vordergrund zu stehen schien (Kirchhefer et al. 1999, Hoch et al. 1999).

Zhang et al. konnten 2003 jedoch zeigen, dass die Überexpression der CaMKII $\delta_c$  in transgenen Mäusen zur Entwicklung von kardialer Dilatation mit einhergehender kontraktile Dysfunktion und Herzinsuffizienz führt. Auch makroskopisch lassen sich diese Effekte der Herzinsuffizienz bei CaMKII-Überexpression zeigen. So kommt es zu einer Zunahme des Herzgewicht zu Körpergewicht-Quotienten bei transgenen Mäusen (siehe Abbildung 1-5) (Zhang et al. 2003).

Bei der Entstehung der kontraktile Dysfunktion ist neben der verstärkten Funktion des NCX und einem reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR auch die Hyperphosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors von Bedeutung. Diese erhöhte RyR2-Öffnungswahrscheinlichkeit trägt wesentlich zum spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust aus dem SR bei (Maier et al. 2003) und kann weiter zu Schwankungen im Membranpotential und zu Nachdepolarisationen führen, die in Arrhythmien übergehen können (Xie und Weiss 2009). Der Zusammenhang zwischen der Überexpression der CaMKII $\delta_c$  und einem

## 1. Einleitung

vermehrten Auftreten von Arrhythmien konnte im Tiermodell im Vergleich von transgenen Mäusen zu den Wildtypen gezeigt werden (Wagner et al. 2006). Die Hemmung der CaMKII $\delta_c$  verringerte das Auftreten von Arrhythmien (Sag et al. 2009).



**Abbildung 1-5:** Vergleich von WT- und TG-Herzen mit CaMKII $\delta_c$ -Überexpression.

Fotos von Mäuseherzen des WT und des TG im Alter von 6 und 13 Wochen. Man erkennt eine deutliche Zunahme der Herzgröße, die später Korrelat zu einer massiven Herzinsuffizienz und Hypertrophie ist. (Bild modifiziert nach Zhang et al. 2003, Seite 915)

Bis heute wurden mehrere Zusammenhänge zwischen der Arrhythmieentstehung und der CaMKII $\delta_c$ -Überexpression beschrieben. Neben dem oben beschriebenen Mechanismus der erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2, kann ein vermehrter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über (sarkolemmale) DHP-Rezeptoren (Anderson 2007) und Verlängerungen des Aktionspotentials zu nachfolgenden Arrhythmien führen. Diese Effekte konnten bereits direkt mit der CaMKII $\delta_c$ -Überexpression in Verbindung gebracht werden (Maier et al. 2003).

Bereits 1998 berichteten Maltsev et al. in einer Arbeit an humanen ventrikulären Kardiomyozyten von einem langsam inaktivierenden Na<sup>+</sup>-Strom, der zur Ausbildung des Aktionspotentialplateaus beiträgt (Maltsev et al. 1998). Dieser sogenannte späte Na<sup>+</sup>-Strom war in Kardiomyozyten von herzinsuffizienten Hunden und humanen Herzen noch deutlich stärker ausgeprägt (Undrovinas et al. 1999, Valdivia et al. 2005). Wagner et al. zeigten 2006 in Myozyten aus herzinsuffizientem Myokard erstmals, dass die CaMKII den späten Na<sup>+</sup>-Strom reguliert (Wagner et al. 2006). So verzögert die chronische Überexpression der CaMKII $\delta_c$  in transgenen Mäusen die schnelle Inaktivierung des Na<sup>+</sup>-Stroms, verlangsamt die Erholung nach Inaktivierung und verschiebt den stabilen Zustand der Na<sup>+</sup>-Kanal-Inaktivierung zu negativeren Spannungswerten. Aufgrund des Beitrags des späten Na<sup>+</sup>-Stroms zum Gesamtbetrag des Na<sup>+</sup>-Einstroms bei der Ausbildung des Aktionspotentialplateaus kann der verstärkte späte Na<sup>+</sup>-Strom zu Veränderungen in der Repolarisationsphase führen und somit entscheidend zu potentiell lebensbedrohlichen Rhythmusstörungen bei herzinsuffizienten Patienten prädisponieren (Tomaselli und Zipes 2004). Daher nimmt der späte Na<sup>+</sup>-Strom bei Kontrolle der kardialen Erregbarkeit eine zentrale Rolle ein. Die CaMKII-abhängige Modulierung des Na<sup>+</sup>-Kanals (Wagner et al. 2006) könnte als erworbener Pathomechanismus Ursache für Arrhythmien bei der Herzinsuffizienz sein, die zu den häufigsten Komplikationen bzw. Todesursachen dieser Erkrankung

## 1. Einleitung

zählen. So sterben 50-80% der Patienten mit einer moderaten Herzinsuffizienz am plötzlichen Herztod (Ellison et al. 2003).

### **1.8 Pathophysiologische Veränderungen beim Vorhofflimmern auf Zellebene: Der späte Na<sup>+</sup>-Strom**

Chronisches Vorhofflimmern führt neben einem strukturellen auch zu einem elektrophysiologischen Umbau in den Kardiomyozyten. Wesentliche Veränderungen sind dabei eine verkürzte Aktionspotentialdauer, in erster Linie bedingt durch eine verminderte Amplitude des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Stroms, sowie veränderte K<sup>+</sup>-Ströme (Van Wagoner 2003). Inwieweit Veränderungen in den Na<sup>+</sup>-Strömen ebenfalls eine Rolle spielen, war bisher unklar. Yagi et al. postulierten 2002 neben einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Stromdichte auch eine Verminderung der Na<sup>+</sup>-Stromdichte in atrialen Myozyten von Hunden mit chronischem Vorhofflimmern (im Vergleich zur Kontrollgruppe) und zeigten damit, dass Na<sup>+</sup>-Ströme in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns ebenfalls eine Rolle spielen könnten (Yagi et al. 2002).

An Beachtung hat bisher eine Komponente des Na<sup>+</sup>-Stroms gewonnen – der späte Na<sup>+</sup>-Strom (siehe Kapitel 1.4.1). Dieser späte Na<sup>+</sup>-Strom beträgt zwar im gesunden Myokard nur etwa 1% der Amplitude des Na<sup>+</sup>-Spitzenstroms, doch kann er unter pathologischen Bedingungen auf das etwa 5-Fache ansteigen (Undrovinas et al. 1992, Ju et al. 1996, Ward und Giles 1997, Wu J und Corr 1994) und so dessen Einstrommenge übertreffen. Der späte Na<sup>+</sup>-Strom kann somit wesentlich zu einer Na<sup>+</sup>-Überladung der Zelle beitragen und in der Folge zu kontraktile Dysfunktion, Verlängerungen des Aktionspotentials und elektrischer Instabilität (siehe Kapitel 1.5.1) führen. Sossalla et al. konnten 2010 erstmals an humanen Kardiomyozyten zeigen, dass der späte Na<sup>+</sup>-Strom beim chronischen Vorhofflimmern verstärkt ist (Sossalla et al. 2010b). Eine mögliche Ursache ist die verstärkte Expression der CaMKII beim Vorhofflimmern (Tessier et al. 1999), die auch direkt den späten Na<sup>+</sup>-Strom reguliert (Wagner et al. 2006). Die Inhibition dieses späten Na<sup>+</sup>-Stroms ergibt möglicherweise einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des Vorhofflimmerns.



## 1.9 Ranolazin

Ranolazin ist ein Piperazinderivat, das in Deutschland seit 2008 zur Ergänzungstherapie bei Patienten mit stabiler Angina pectoris klinische Anwendung findet.

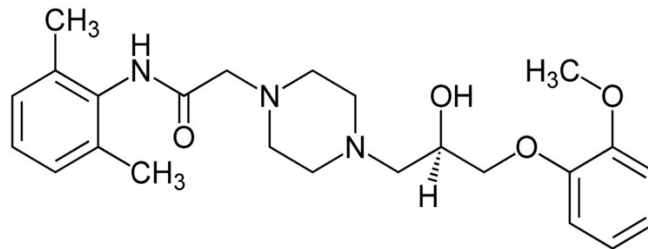
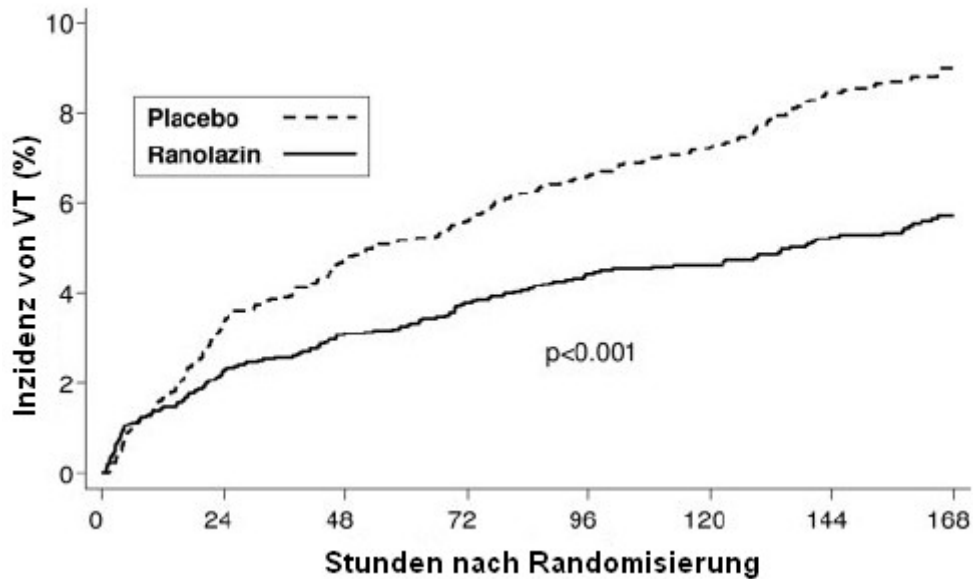


Abbildung 1-6: Strukturformel von Ranolazin.

Es stellt eine neue Substanz mit antianginöser Wirkung dar, ohne jedoch dabei die Herzfrequenz oder den Blutdruck zu beeinflussen (Chaitman et al. 2004, Louis et al. 2002, Pepine und Wolff 1999). Initial wurde als wahrscheinlichster Wirkmechanismus die Beeinflussung des myokardialen Metabolismus vorgeschlagen, der teilweise durch Reduktion der Fettsäureoxidation (pFOX-Inhibition) bei myokardialen Stress und gleichzeitig vermehrtem Ablauf der Glykolyse bedingt ist und so eine vermehrte ATP-Synthese bewirkt (Clarke et al. 1996, McCormack et al. 1996). Dieser Effekt trat jedoch bei Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Bereichs ( $>10 \mu\text{M}$ ) auf. Spätere Untersuchungen der elektrophysiologischen Wirkung von Ranolazin bei einer Konzentration im therapeutischen Bereich ( $\sim 6 \mu\text{M}$ ) fanden in Kardiomyozyten vom Hund und vom Meerschwein eine Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms im Herzen (Antzelevitch et al. 2004). Das bedeutet, dass der späte  $\text{Na}^+$ -Strom in Ventrikulomyozyten von herzinsuffizienten Hunden 38-mal stärker gehemmt wird als der  $\text{Na}^+$ -Spitzenstrom (Undrovins et al. 2006) und Ranolazin den späten  $\text{Na}^+$ -Strom selektiv inhibiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Ranolazin EADs und Arrhythmien beim Meerschwein und Kaninchen mit Long-QT-3-Syndrom (LQT3) unterdrückt (Wu L et al. 2004, Wu L et al. 2006). An Muskelstreifenpräparaten von herzinsuffizienten menschlichen Explantaten konnte Ranolazin die diastolische Dysfunktion reduzieren, ohne dabei negativ inotrop auf die Kontraktilität zu wirken. Darüber hinaus verringerte Ranolazin in isolierten ventrikulären Kaninchenmyozyten mittels ATX induzierte Effekte, wie eine Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms und einen zytosolischen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Sossalla et al. 2008). Beim Menschen ist die antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin bisher noch nicht ausreichend evaluiert. Eine große klinische Studie (MERLIN-TIMI 36) ermittelte jedoch vielversprechende Daten, die zeigten, dass Ranolazin bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom das Auftreten von ventrikulären und supraventrikulären Tachykardien signifikant reduzierte, sowie neue Episoden von Vorhofflimmern eindrücklich verminderte, siehe Abbildung 1-8 und Tabelle 1-1 (Scirica et al. 2007). Diese Sicherheitsendpunkte aus der MERLIN-Studie sind neben

## 1. Einleitung

experimentellen Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen Grundlage für die vorliegende Arbeit.



**Abbildung 1-7:** Reduktion von ventrikulären Tachykardien unter Ranolazin.

Ranolazin reduziert das Auftreten von ventrikulären Tachykardien bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant gegenüber dem Placebo (Bild modifiziert nach Scirica et al. 2007, Seite 1650).

	Ranolazin in n (%)	Placebo in n (%)	RR (95% KI)	p
<b>Neu- aufgetretenes Vorhofflimmern</b>	55 (1,7)	75 (2,4)	0,74 (0,52, 1,05)	0,08
<b>Andere supraventrikuläre Tachykardien</b>	1413 (44,7)	1752 (55,0)	0,81 (0,77, 0,85)	<0,001

**Tabelle 1-1:** Anzahl der aufgetretenen supraventrikulären Tachyarrhythmien nach NSTEMI.

Tabellarische Darstellung der absoluten und der relativen Anzahl von echokardiographisch detektiertem, neu-aufgetretenen Vorhofflimmern sowie supraventrikulären Tachykardien  $\geq 120/\text{min}$  (für mindestens vier Herzschläge) unter Ranolazin im Vergleich zur Placebogabe. Ranolazin reduzierte das Auftreten von supraventrikulären Tachykardien signifikant. (Daten übernommen aus Scirica et al. 2007)

## 1.10 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die antiarrhythmische Wirkung und den Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität an atrialen Muskelstreifen von Patienten mit Vorhofflimmern sowie an ventrikulären Papillarmuskeln CaMKII $\delta_c$ -überexprimierender Mäuse.

**Haupthypothese:** Die Inhibition des späten Na<sup>+</sup>-Stroms verbessert die Kontraktilität bei Vorhofflimmern und bei der CaMKII $\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz und wirkt antiarrhythmisch.

Bei positiver Haupthypothese sind folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Ist der Ranolazineffekt dosisabhängig?
2. Beeinflusst Ranolazin die Inotropie?
3. Kann Ranolazin die diastolische Dysfunktion beim Vorhofflimmern und bei der Herzinsuffizienz sowie unter Exposition mit Ouabain und Wasserstoffperoxid verbessern?
4. Hat Ranolazin einen Einfluss auf die CaMKII $\delta_c$ -induzierte Arrhythmieentstehung?
5. Welche Auswirkung hat die Überexpression der CaMKII $\delta_c$  auf den Ca<sup>2+</sup>-Haushalt?
6. Zeigt die frühe Form der CaMKII $\delta_c$ -Überexpression (8 ± 1 Wochen) bereits Zeichen der Herzinsuffizienz?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Lösungen für Muskelstreifenexperimente

#### 2.1.1 Krebs-Henseleit-Lösung

Diese Lösung zirkulierte während des Experimentes über einen Kreislauf in der Versuchsanordnung, so dass die Muskelstreifen kontinuierlich perfundiert wurden.

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl	116,0 mM
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,0 mM
Kaliumchlorid	KCl	5,0 mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mM
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,0 mM
Kalziumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1,25 mM

**Tabelle 2-1:** Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung.

Um eine Irritation des Muskelstreifens durch zu schnelle Erhöhung des Kalziums in der Lösung zu verhindern, erfolgte ein stufenweiser Ca<sup>2+</sup>-Aufbau. Die Anfangskonzentration von 0,25 mM wurde alle zwei Minuten um weitere 0,25 mM Kalzium erhöht, bis zu einer Endkonzentration von 1,25 mM (diese entspricht der physiologischen freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Plasma). Um eine adäquate Sauerstoffversorgung und einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten, wurde die Lösung kontinuierlich mit Carbogen begast, das aus 95% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) besteht. Kohlenstoffdioxid bildet mit dem Hydrogencarbonat der Lösung ein offenes Puffersystem und hält somit den pH-Wert der Lösung konstant.

#### 2.1.2 Dissektionslösung

Direkt nach der Entnahme der Präparate wurden sie zum Schutz des Myokards in eine 2,3-Butandion-Monoxim (BDM)-haltige Lösung gegeben (Mulieri et al. 1989). BDM ist ein Inhibitor der an Myosin gebundenen ATPase und führt zur Blockierung der Bindungsstelle für Kalzium am Troponin C und der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Damit wird die elektromechanische Kopplung blockiert, weitere mögliche

## 2. Material und Methoden

Kontraktionen verhindert und so der Sauerstoffbedarf des Myokards vermindert. Auch zur Präparation wurde Dissektionslösung verwendet. Auch hier wurde der pH-Wert der Lösung durch kontinuierliche Begasung mit Carbogen konstant gehalten.

Bezeichnung	Konzentration	Menge
Natriumchlorid	NaCl	116,0 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,0 mM
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,0 mM
Kaliumchlorid	KCl	5,0 mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mM
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 mM
Kalziumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	20,0 mM

**Tabelle 2-2:** Zusammensetzung der Dissektionslösung.

### 2.1.3 Ranolazinlösung

Ranolazin, ein Wirkstoff aus der Gruppe der Piperazinderivate, wurde von CV Therapeutics (Palo Alto, California/USA) zur Verfügung gestellt (ist aber auch kommerziell z.B. über Sigma erhältlich).

Für die Experimente mit Ranolazin wurde eine Stammlösung von 10 mM Ranolazin angesetzt.

Für die Versuche mit humanen Muskelstreifen wurde eine Konzentration von 10 µM verwendet, für die Experimente an Papillarmuskeln der Maus wurde eine Konzentration von 5 µM Ranolazin eingesetzt.

### 2.1.4 Ouabainlösung

Für die Experimente mit Ouabain wurde eine Stammlösung mit einer Endkonzentration von 5 mM angesetzt. Diese wurde anschließend auf die gewünschte Konzentration verdünnt. In den Experimenten wurde eine Konzentration von 0,25 µM Ouabain verwendet.

### 2.1.5 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - Lösung

Für den Ansatz der Radikallösung wurde ein fertiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stock (Firma Calbiochem) von 9,73 M verwendet. Zwei Perfusorspritzen wurden so eingestellt, dass eine Endkonzentration im Becken von 200 µM erreicht wurde.

### 2.2 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung wurden Mäuse der Delta-C-Reihe untersucht: Die Gruppe umfasste Mäuse im Alter von  $8 \pm 1$  Wochen und enthielt Wildtypen als auch transgene Mäuse, die eine Überexpression der CaMKII $\delta_c$  aufwiesen. Insgesamt wurden 25 Mäuse für die Experimente verwendet, davon 15 Transgene und 10 Wildtypen. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet.

### 2.3 Versuchsaufbau

#### 2.3.1 Organbad

Die Experimente erfolgten in einem geschlossenen Flüssigkeitskreislauf, in den eine Rollenpumpe, eine Heizung, ein Flüssigkeitsreservoir und ein Organbad zwischengeschaltet waren. Über einen Zu- und Ablauf fand im Organbad ein ständiger Austausch der Lösung statt. Das Organbad bestand aus einer in Kunststoff gefrästen Nut. Zur Aufhängung des Muskelstreifens diente auf der einen Seite ein Haken, der an einer Mikrometerschraube befestigt war und auf der gegenüberliegenden Seite eine Öse, die mit einem Kraftaufnehmer verbunden war. Zwei in der länglichen Seite der Nut eingelassene Kontaktdrähte übertrugen den elektrischen Impuls des Stimulators (Firma Scientific Instruments, Heidelberg) über die Lösung auf die Muskelstreifen, die durch Feldstimulation zur Kontraktion gebracht wurden.

##### 2.3.1.1 Lösungszirkulation

Im Flüssigkeitsreservoir befanden sich 50 ml Krebs-Henseleit-Lösung. Die Doppelwand des Gefäßes wurde über eine Heizung mit warmem Wasser perfundiert, so dass die Wärme auf die Lösung übertragen werden konnte. Über einen Zulaufschlauch, der durch eine Rollenpumpe (Reglo, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld) verlief, erfolgte der Transport der Lösung aus dem Reservoir in das Organbecken. Auch dieser Schlauch wurde in seiner Ummantelung mit warmem Heizungswasser erwärmt. So wurde gewährleistet, dass die den Muskelstreifen umspülende Lösung eine konstante Temperatur von 37°C hatte. Aus dem Organbad führte ein Ablaufschlauch durch eine zweite Pumpe zurück zum Gefäß. Beim Ausspülen der Lösung von BDM oder beim Ablassen der Lösung wurde der Ablaufschlauch aus dem Gefäß genommen, so wurde der Kreislauf geöffnet und Lösung trat aus.

## 2. Material und Methoden

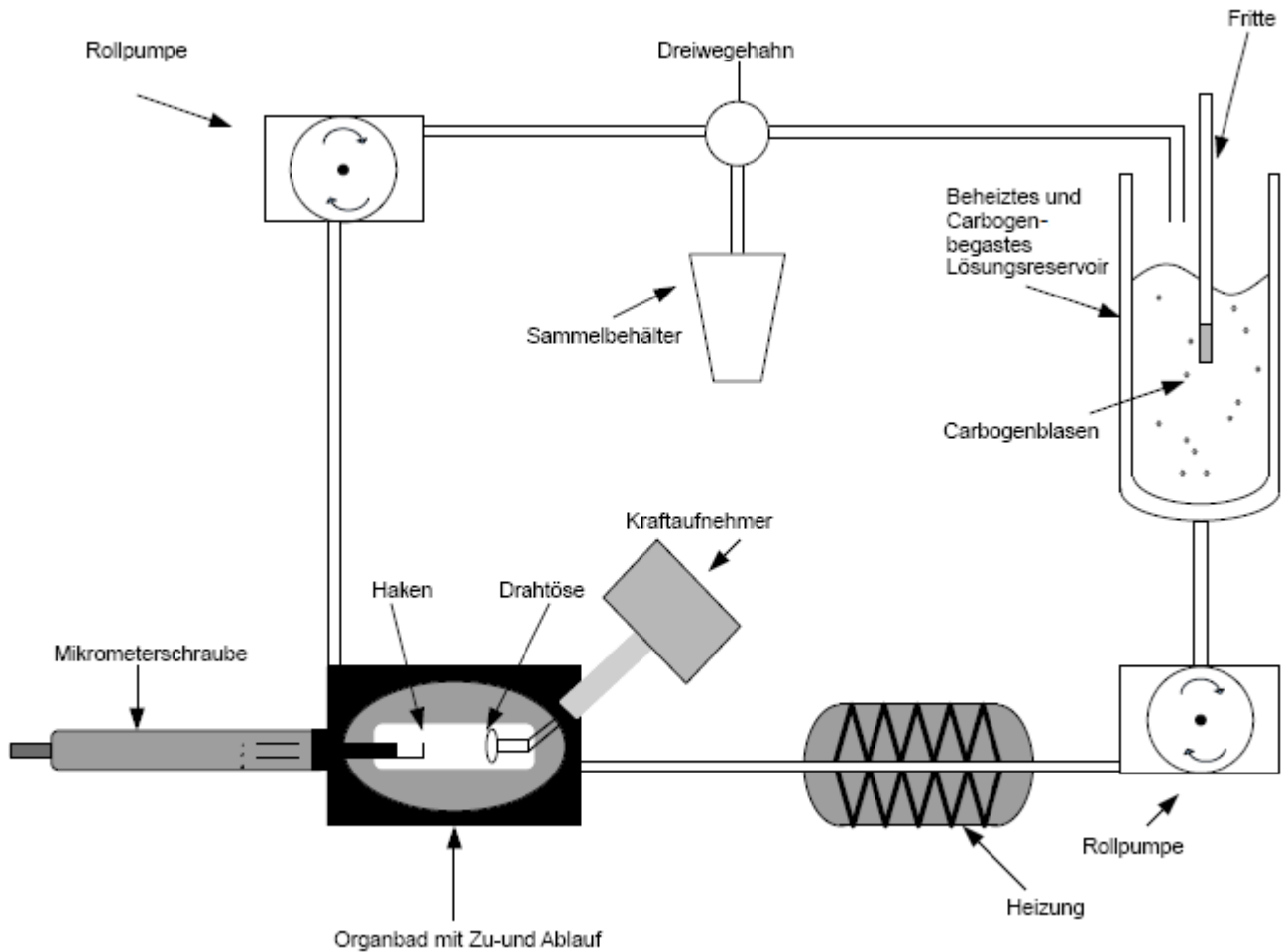


Abbildung 2-1: Versuchsaufbau der Muskelstreifenexperimente.

### 2.3.1.2 Kraftaufnahme und Übertragung

Die Drahtöse, die zur Befestigung des Muskelstreifens diente, war direkt mit einem Kraftaufnehmer (Typ KG3, Firma Scientific Instruments, Heidelberg) verbunden, so dass eine Kontraktion des Muskelstreifens eine minimale Auslenkung des Kraftaufnehmers zur Folge hatte. Die Zugspannung wurde durch einen Brückenverstärker (Firma Scientific Instruments) in ein proportionales analoges Spannungssignal umgewandelt und an die analog/ digitale Wandlerkarte (Typ Pcl 1200, Firma National Instruments, Austin/USA) des Messcomputers weitergeleitet.

### 2.3.1.3 Datenerfassung und Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe der Software „LabView“ (Firma National Instruments, Austin/USA) gewonnen. Während des gesamten Experimentes wurde der registrierte Minimalwert (diastolische Kraft) und der Maximalwert (systolische Kraft) gespeichert und gegeneinander verbunden aufgetragen. Die „Chart“-Datei diente der Übersicht über den Ablauf des Experimentes. Zur genauen

## 2. Material und Methoden

Auswertung der Messparameter wurde zum anderen eine „Average“-Datei angelegt, in der gemittelte Werte von fünf Einzelzuckungen gespeichert wurden. In einem Textfeld konnte man die abgespeicherten Ereignisse benennen. Von dem Programm automatisch ermittelt wurden folgende Parameter: Entwickelte Kraft ( $\text{mN/mm}^2$ ), Zeit bis zum Erreichen des Kraftmaximums (ms), diastolische Kraft ( $\text{mN/mm}^2$ ), maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ( $\text{mN/mm}^2\cdot\text{s}$ ), beide ebenfalls normalisiert angegeben, und die Zeit für 50% bzw. 90% der Relaxation (ms). Die aus der Auswertung von „LabView“ erhaltenen Daten wurden zur Archivierung und weiteren statistischen Verarbeitung in der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel® überführt.

### **2.3.2 Probengewinnung**

#### **2.3.2.1 Humane Vorhöfe**

Bei vielen Operationen in der Herzchirurgie muss das Herz mittels Kardioplegie zum Stillstand gebracht werden. Zur Kompensation der fehlenden Pumpfunktion von Herz und folglich auch der Lunge kommt die Herz-Lungen-Maschine zum Einsatz. Über eine extrakorporale Zirkulation gewährleistet sie den äußeren Gasaustausch und eine ausreichende Blutperfusion.

Diese Maschine wird unter anderem bei koronaren Bypassoperationen, Herzklappenersatz und Herzklappenrekonstruktionen eingesetzt. Um eine Konvergenz des Blutflusses mit der Herz-Lungen-Maschine zu erreichen, wird im arteriellen System die Aorta ascendens kanüliert, das venöse System wird über die Kanülierung des rechten Vorhofes erreicht. Dabei wird die Kanüle über das rechte Herzohr in den Vorhof geschoben. Diese zweite, venöse Kanülierung ermöglicht die humane Materialentnahme. Durch Abklemmen des auslaufenden Teils des Herzohres, kann dieser vom Chirurgen reseziert werden und anschließend direkt in ein Gefäß mit Dissektionslösung überführt werden. Die Zeit bis zur Freilegung des Herzens wurde genutzt, um die vorliegenden Daten aus Patientenakte, Pflegeberichten, dem Anästhesieprotokoll und OP-Plan anonymisiert in einem Protokoll zusammenzutragen. Das Protokoll unterteilte sich in acht Themen:

1. OP-Daten: Diese enthalten die Patienteninitialen, Alter, Geschlecht, Zeiten, Art der OP und Namen der Operateure.
2. Versuchsdaten: Zeiten zum Versuchsablauf, Dateiname etc.
3. Kardiale Diagnosen
4. Sonstige Diagnosen
5. Aktuelles EKG, Ausschlusskriterium für Experimente: Tachyarrhythmia absoluta
6. Letzter Bericht eines Herzechokardiogramms
7. Aktueller Herzkatheterbericht
8. Medikationen.



## 2. Material und Methoden

<b>Patienten mit Vorhofflimmern</b>							
<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>OP</b>	<b>EF (%)</b>	<b>ACE-I</b>	<b>β-B</b>	<b>Diu</b>	<b>Ca-A</b>
w	75	ACB	45	+	+	+	+
m	68	ACB	60	+	+	-	+
w	78	AKE	70	-	+	+	-
w	76	AKE	k.A.	-	-	+	-
m	78	AKE, ACB	k.A.	+	+	+	-
m	82	ACB, Maze	60	+	+	+	+
m	72	AKE	30	-	+	+	-
m	73	ACB, Maze	68	+	+	+	+
w	70	ACB, Maze	52	+	+	-	-
w	79	ACB	30	+	+	+	-
m	64	ACB	50	-	+	+	+
w	73	MKE	60	-	-	-	-
m	72	ACB	60	+	+	+	-

**Tabelle 2-3:** Anonymisierte Daten der Patienten mit Vorhofflimmern.

<b>Patienten mit Sinusrhythmus</b>							
<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>OP</b>	<b>EF (%)</b>	<b>ACE-I</b>	<b>β-B</b>	<b>Diu</b>	<b>Ca-A</b>
m	76	AKE, MKR	50	-	-	-	+
w	78	AKE, ACB	50	+	-	-	+
w	59	AKE, TKR	60	-	+	-	-
m	55	ACB	k.A.	+	+	-	-
m	72	AKE	k.A.	-	-	+	-
m	78	ACB	65	-	+	+	-
m	66	AKE	k.A.	-	+	+	+
m	80	ACB	59	+	+	+	+
m	61	ACB	55	+	+	+	-

**Tabelle 2-4:** Anonymisierte Daten der Patienten mit Sinusrhythmus.

(OP=Operation, EF= Ejektionsfraktion, ACE-I= ACE-Inhibitoren, β-B= β-Blocker, Diu= Diuretika, Ca-A= Kalzium-Antagonisten, m= männlich, w= weiblich, ACB= Arteriokoronarer Bypass, AKE= Aortenklappenersatz, HOcm= Hypertroph-Obstruktive Kardiomyopathie, Maze=Maze-Verfahren, MKE= Mitralklappenersatz, MKR= Mitralklappenrekonstruktion, TKE= Trikuspidalklappenersatz, TKR= Trikuspidalklappenrekonstruktion, MI= Mitralsuffizienz, TI= Trikuspidalsuffizienz, k.A.= keine Angabe).

Für die Experimente wurden insgesamt 22 Herzohren verwendet, davon neun von Patienten mit einem Sinusrhythmus und 13 von Patienten, die an chronischem Vorhofflimmern erkrankt waren. Die meisten Patienten waren medikamentös vorbehandelt und setzten die Medikamente teilweise 24 Stunden vor der Operation ab.

Die Patienten wurden vor der Operation von den Herzchirurgen über die Probenentnahme aufgeklärt

## 2. Material und Methoden

und ihre Einwilligung wurde schriftlich festgehalten. Ebenfalls lag zu den Probenentnahmen ein positives Votum der Ethikkommission vor (AZ 21/10/00).

### **2.3.2.2 Herzentnahme der Maus**

Das Versuchstier wurde in einem geschlossenen Glasbehälter mit Isofluran-Gas (Forene<sup>®</sup>, Firma Abbott, Illinois/USA) betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Nach Ermittlung des Körpergewichts wurde das Abdomen durch einen V-förmigen Schnitt eröffnet und das Herz durch eine rippenbogennahe Durchtrennung des Zwerchfells dargestellt. Um einen besseren Zugang zum Herzen zu bekommen, wurden die Rippen beidseits medioklavikulär bis zur Klavikula durchtrennt und das Sternum mit Hilfe einer Klemmschere nach kranial geklappt. Um eine intrakardiale Thrombenbildung vor der Perfusion zu verhindern, wurde Heparin (2 IE Heparin, Firma Rotexmedica, Trittau) in den linken Vorhof injiziert. Nach Durchtrennung der Gefäße kurz nach Austritt aus dem Herzen wurde das Herz explantiert und in die Dissektionslösung der Präparationsschale überführt. Über den Aortenstumpf wurden die Koronarien anterograd mit Dissektionslösung gespült und anschließend das Herzgewicht ermittelt.

Die Tötung der Tiere zur Entnahme von Gewebe für wissenschaftliche Zwecke wurde gemäß § 4 Abs. 3 TierSchG unter Aktenzeichen T14.06 der Bezirksregierung in Braunschweig angezeigt.

### **2.3.3 Präparation**

Um die Muskelstreifen möglichst schonend zu behandeln, waren von der Entnahme bis zum Einspannen einige Maßnahmen zu beachten. Auch die Präparation erfolgte in Dissektionslösung. Jede Dehnung sollte vermieden werden, daher wurde das Präparat zur Vorbeugung in der Schale mit einer Nadel fixiert, so dass es sich durch die Rotationsmöglichkeit frei bewegen konnte. Ein Stereo-Mikroskop ermöglichte die optische Vergrößerung des Präparates. Die Präparation der Muskelstreifen erfolgte mit Hilfe einer feinen Pinzette und Schere.

#### **2.3.3.1 Muskelstreifen des humanen Vorhofs**

Zur besseren Übersicht über die Architektur der Trabekel im Herzohr, die von Präparat zu Präparat variierten, wurde das Epikard eingeschnitten. Für die Wahl der Trabekel galt es einen möglichst unverzweigten zu finden, da angeschnittene Präparate zu unerwünschten Reaktionen wie Arrhythmien neigen. Ebenfalls war auf eine rosige Farbe zu achten, da diese den Fibrillen- und Myoglobingehalt widerspiegelt und somit einen indirekten Hinweis für die Kontraktilität geben konnte. Des Weiteren sollten die Trabekel nicht von folgenden Maßen abweichen: Länge: 1,5-4 mm, Breite und Tiefe: 0,25-0,8 mm.

Die Trabekel sollten nach Möglichkeit so präpariert werden, dass das eine Ende einen rechteckigen

## 2. Material und Methoden

Muskelblock enthält, um den Halt in der Drahtöse zu gewährleisten. Am anderen Ende wurde eine Verlängerung stehen gelassen, die idealerweise eine runde Form hatte und somit eine gute Befestigung für den Haken darstellte. Durch diese Formen wurde eine direkte Traumatisierung des Muskels verhindert.

### **2.3.3.2 Rechtsventrikuläre Papillarmuskeln der Maus**

Nach Fixierung des Herzens wurde der rechte Ventrikel vom Austritt der Pulmonalarterie bis zur Herzspitze mit einer Schere eröffnet. Damit wurde die Sicht auf die Papillarmuskeln frei. Um sie frei zu präparieren, wurde als Erstes der Ansatz der Sehnenfäden durchtrennt und anschließend der Papillarmuskel in einem rechteckigen Block aus dem Ventrikelmyokard entfernt. In der Regel konnten aus einem Herz ein bis zwei Papillarmuskeln gewonnen werden.

### **2.3.4 Einhängen**

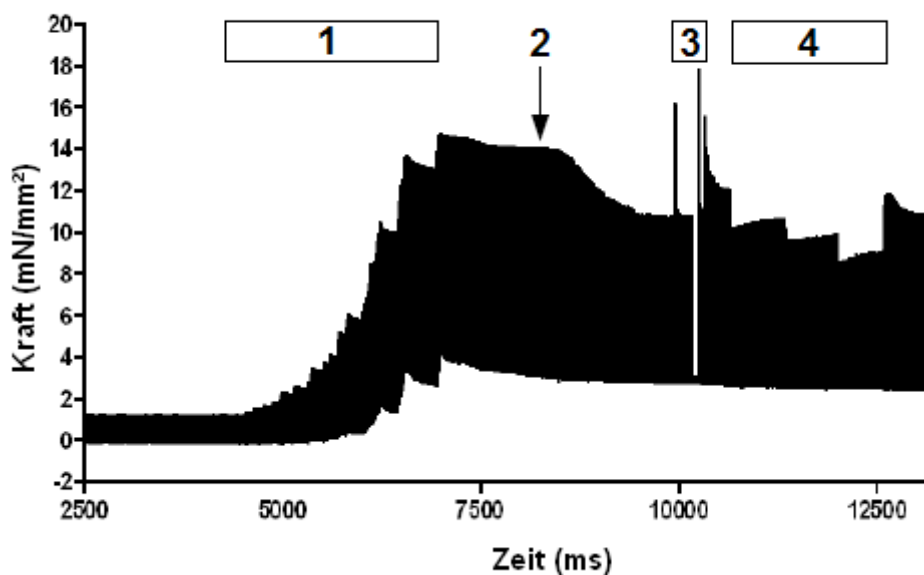
Nach Vermessung der Muskelpräparate wurden sie mit Hilfe einer Plastikpipette, die mit einigen Millilitern Dissektionslösung gefüllt war, in das Organbad überführt. Das runde Ende des Muskelstreifens bzw. das sehnenfadige Ende des Papillarmuskels wurden durch die Drahtöse geführt, um es anschließend an dem Haken fixieren zu können. Der Muskel wurde schlaff, ohne jegliche Dehnung zwischen Mikrometerschraube und Kraftaufnehmer eingespannt. Nach Starten des Programmes „LabView“ zur Versuchsaufzeichnung erfolgte die Eingabe der Dimensionen Länge, Breite und Tiefe des Muskels. Dem Programm war es anhand dieser Parameter möglich, die entwickelte Kraft des Muskels auf seinen Querschnitt zu berechnen. Um BDM-Reste im Organbad zu eliminieren, wurden 50 ml der KHS-Versuchslösung ausgespült und verworfen.

### **2.3.5 Allgemeiner Versuchsablauf**

Nach dem Entfernen rückständiger Dissektionslösung zirkulierten während des Versuchs 50 ml Krebs-Henseleit-Lösung kontinuierlich im System. Die Feldstimulation im Organbad wurde mit einer Frequenz von 1 Hz bei humanen Muskelstreifen bzw. 4 Hz bei den Papillarmuskeln der Maus eingestellt.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde in vier Schritten, alle zwei Minuten um 0,25 mM, bis zu einer Endkonzentration von 1,25 mM Kalzium erhöht. Es folgte die Phase des Einschlagens. Um eine Adaptation des Muskels an die Versuchsbedingungen zu erreichen, war eine Zeit von mindestens 30 Minuten beim humanen Muskelstreifen bzw. 15 Minuten beim Papillarmuskel der Maus vorgesehen.

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 2-2:** Originalregistrierung des Versuchsablaufs eines humanen Muskelstreifens.

Die durchschnittliche Dauer des Versuchs betrug etwa zwei Stunden, hier wird er zusammengerafft nach erfolgtem Kalziumaufbau (nicht abgebildet) dargestellt. 1= Vordehnen des Muskelstreifens auf  $L_{\max}$ , 2= Ranolazinzugabe, 3= Post-Pausen-Potenzierung, 4= Kraft-Frequenz-Beziehung.

Nach dem Einstellen der Nulllinie im Programm wurde der Muskel durch langsames Drehen der Mikrometerschraube gedehnt. Im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus antwortete der Muskel auf die Dehnung mit einer Zunahme der Kraft. Ziel war das Erreichen der Länge, bei der der Muskel die maximale Kraft entwickelte ( $L_{\max}$ ). In der Regel wurde  $L_{\max}$  bei einer diastolischen Spannung von ca. 1,5 bis 5,5 mN/mm<sup>2</sup> beim humanen Muskelstreifen bzw. ca. 1,0 bis 2,5 mN/mm<sup>2</sup> beim Papillarmuskel der Maus erreicht. Vor Beginn der Experimente wurde nochmals 10 Minuten gewartet, da die Muskeln durch die Dehnung etwas Zeit benötigten ihre Kontraktionskraft zu stabilisieren. Nach dem Erreichen dieses „steady state“ wurde der Basiswert im Programm gespeichert.

Zu jeder verabreichten Substanz in den Experimenten gab es eine entsprechende Kontrollgruppe, die keine Substanz erhielt. Nach erneutem Erreichen eines „steady state“ wurde das Ereignis wieder gespeichert.

Zur Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehung („Force-Frequency-Relationship“, FFR) wurden im Experiment die Frequenzen verändert. Um zu zeigen, dass das Verhalten der Muskelstreifen auch nach dem Verändern der Frequenz reversibel und die Muskelstreifen intakt sind, wurde nach der höchsten Frequenz stets wieder die Grundfrequenz eingestellt. So betrug die Grundfrequenz bei Versuchen mit humanen Muskelstreifen 1 Hz, bei der Kraft-Frequenz-Beziehung wurde die Frequenz

## 2. Material und Methoden

auf 0,5 Hz reduziert und anschließend auf 1, 2, 3 Hz erhöht. Bei den Papillarmuskeln der Maus betrug die Grundfrequenz 4 Hz, anschließend erfolgte die Einstellung auf 2, 4, 6, 8 sowie 10 Hz. Bei der Post-Pausen-Potenzierung („Post-Rest“, PR) wird die Stimulation der Muskelstreifen für eine definierte Zeit unterbrochen. Die Pausenlänge kann abhängig von der Spezies variiert werden. Für humane Muskelstreifen wurden Stimulationspausen von 10 und 30 Sekunden durchgeführt, bei den Papillarmuskeln der Maus wurde die Frequenz für jeweils 5 und 10 Sekunden pausiert.

### 2.3.6 Versuche an humanen Muskelstreifen

#### 2.3.6.1 Induktion von Stress durch Herzglykoside und Sauerstoffradikale

Bevor man mit dem Protokoll beginnen konnte, dienten sieben Pilot-Experimente mit vier unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen zum Finden der Konzentration, bei der es zum Anstieg der diastolischen Spannung und ggf. zu Arrhythmien kam. Nach Erreichen eines „steady state“ wurde die nächst höhere Konzentration hinzugegeben.

Schritt	Konzentration ( $\mu\text{M}$ )
1	0,25
2	0,5
3	1
4	2
5	4

**Tabelle 2-5:** Schema zur Ouabain-Konzentrationsfindung.

Als optimale Konzentration zur Beobachtung der diastolischen Spannung stellte sich eine Ouabainkonzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  heraus. Um die stabilisierende Wirkung von Ranolazin auf die Diastole näher zu evaluieren, wurde der Muskelstreifen vor der Ouabaingabe mit 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin inkubiert. Als Vergleich diente eine Kontrollgruppe, der kein Ranolazin vor Ouabaingabe verabreicht wurde. Anschließend wurde die Zeit von der Ouabaingabe bis zum Auftreten der Kontraktur gemessen.

Unter der Einwirkung von Wärmeenergie fungiert Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Quelle für Hydroxylradikale ( $\text{OH}$ ). Da die Radikalfreisetzung aus Wasserstoffperoxid auch durch Photolyse geschieht, wurde dieser Versuch in Dunkelheit durchgeführt. Im Experiment wurde der Einfluss der Radikale auf die Kontraktionskraft des Muskelstreifens gemessen, die Konzentration der Radikale betrug 200  $\mu\text{M}$ . Die gemessenen Werte wurden alle fünf Minuten gespeichert, gleichzeitig wurde die Zeit gemessen bis der Muskelstreifen in Kontraktur ging.

## 2. Material und Methoden

### 2.4 Western Blot

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Homogenate von linksventrikulärem Herzgewebe der Delta-C-Mauslinie angefertigt, jeweils von Wildtyp und transgenen Mäusen im Alter von  $8 \pm 1$  Wochen. Der Western Blot sollte die Expression des NCX und der SERCA im Zusammenhang mit der CaMKII $\delta_c$ -Überexpression zeigen.

Das gewonnene Gewebe wurde mit Hilfe des Trispuffers (Bestandteile siehe Tabelle 2-6), der mit einem Phosphatase- und Protease-Inhibitor vervollständigt wurde, homogenisiert.

Bezeichnung	Menge ( $\mu$ l)
Tris-HCl Puffer (pH 7,4), 2 M	100 $\mu$ l
NaCl, 4 M	500 $\mu$ l
NaF, 200 mM	1000 $\mu$ l
Triton X-100 Puffer, 1%ig	100 $\mu$ l
NaVO <sub>3</sub> , 100 mM	100 $\mu$ l
DTT, 100 mM	100 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	8 ml

**Tabelle 2-6:** Bestandteile des Homogenisierungspuffers.

Die Proteinkonzentration im Überstand der Probe wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce BCA, Illinois/USA) bestimmt. Dabei wurde eine kleine Menge des Überstandes mit Protein (25  $\mu$ l), die zuvor 1:20 verdünnt wurde, mit einem Gemisch der Reagenzien A (enthält Bicinchonische Säure (BCA)) und B (enthält Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Kurz vor Verwendung erfolgte die Herstellung der Gele für die Elektrophorese.

Trenngel 7,5%	Menge
Polyacrylamid 7,5%	2,5 ml
4xTris-Base/SDS, pH 8,8	2,5 ml
TEMED	10 $\mu$ l
APS 10%	100 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	4,9 ml

**Tabelle 2-7:** Bestandteile des Trenngels.

Sammelgel	Menge
Polyacrylamid 4 %	1,66 ml
4xTris-Base/SDS, pH 6,8	2,5 ml
TEMED	10 $\mu$ l
APS 10%	100 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5,72 ml

**Tabelle 2-8:** Bestandteile des Sammelgels.

Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion und die Bestimmung der Proteinkonzentration. Um die Proteinlösung auf dem Gel sichtbar zu machen, diente Bromophenolblau, ein Bestandteil des mit der Probe versetzten Probenpuffers (2% Beta-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 60mM Tris-Base).

## 2. Material und Methoden

<b>Laufpuffer 5x Stock</b>	<b>Menge</b>
Tris-Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O pH 8,3	Auffüllen auf 2l
<b>Arbeitslösung</b>	<b>Menge</b>
5xStock	400 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 2l

**Tabelle 2-9:** Bestandteile des Laufpuffers.

<b>Transferpuffer 5x Stock</b>	<b>Menge</b>
Tris-Base	39,4 g
Glycin	144 g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 2l
<b>Arbeitslösung</b>	<b>Menge</b>
5xStock	400 ml
Methanol 20%	400 ml
SDS 10%	2 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 2l

**Tabelle 2-10:** Bestandteile des Transferpuffers.

Die Kammer wurde mit Laufpuffer (siehe Tabelle 2-9) gefüllt, anschließend wurde die Probenlösung in die Kammern des Ladegels überführt und pro Gel eine Spannung von 30 mA bei 100 V für circa 120 Minuten angelegt. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Proteintransfer von dem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran. Hierfür wurde ein Transferpuffer hergestellt (siehe Tabelle 2-10) und erneut eine Spannung von 400 mA für circa 120 Minuten bei 0°C angelegt.

Als primärer Antikörper, zum Nachweis des in den Zellen überexprimierten NCX, diente ein polyklonaler NCX-Antikörper des Kaninchens (IgM, 1:5000, Firma Swant, Schweiz). Für die Überexpression der SERCA2 fungierte ein polyklonaler SERCA2-Antikörper des Kaninchens (IgM, 1:20000, Affinity BioReagents, Colorado/USA). Zur Ladekontrolle wurde für beide Antikörper der primäre GAPDH-Antikörper (1:40000, Biotrend Chemikalien, Köln) verwendet.

Als Sekundärantikörper, der zum Sichtbarwerden des Proteins spezifisch an den Primärantikörper band, diente HRP („horseradish peroxidase“)-konjugierter Antikörper (Anti-Kaninchen, Esel, IgG, 1:10000, Amersham Biosciences, Freiburg) als auch ein weiterer Detektionsantikörper (Anti-Maus, Schaf, IgG, 1:10000, Amersham Biosciences, Freiburg).

Um den Sekundärantikörper sichtbar zu machen, wurde das Western-Chemilumineszenz-HRP-Substrat (Millipore, Eschborn) verwendet. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz entsteht. Das Substrat wurde fünf Minuten mit der Membran in Verbindung gebracht, anschließend wurde die Membran wenige Sekunden in einer Dunkelkammer mit einem lichtempfindlichen Film bedeckt. Die Bandenintensität des Films wurde daraufhin mit einem Imaging-Densitometer (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotec Corporation, California/USA) untersucht.

## 2.5 Statistische Datenauswertung

In der vorliegenden Arbeit sind die Daten als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts („Standard Error of the Mean“, SEM) angegeben. Prüfungen auf Signifikanz wurden mit dem Student's t-Test je nach Art der Daten gepaart oder ungepaart durchgeführt. Im Falle von multiplem Testen kam der t-Test nach Bonferoni zum Einsatz.

Statistische Analysen von Longitudinaldaten wurden mittels Zwei-Wege-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) durchgeführt. Auch dieses System sieht die Halbierung des p-Wertes (alpha Halbe Niveau) im Falle multipler Testung vor.

Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  festgelegt.

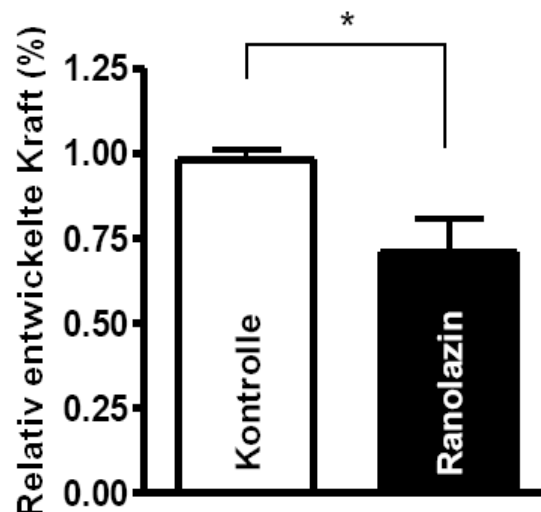


## 3. Ergebnisse

### 3.1 Die Effekte von Ranolazin beim Vorhofflimmern

#### 3.1.1 Beeinflussung der Inotropie durch Ranolazin in humanem Vorhofmyokard

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität des Myokards untersucht. Hierfür wurden präparierte Muskelstreifen aus menschlichem Vorhofmyokard verwendet. Der erste Teil dieser Arbeit beinhaltet die Versuche an Gewebe von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern. Um den grundlegenden Effekt von Ranolazin auf die Kontraktilität zu untersuchen, wurde bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz eine Gruppe mit 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin behandelt. Die entwickelte Kraft ist normalisiert angegeben. Nach 10 Minuten reduzierte Ranolazin (n=10) die entwickelte Kraft auf  $71,1 \pm 9,6 \%$  und zeigte gegenüber der Kontrolle (n=11) mit  $98,3 \pm 2,9\%$  einen signifikanten negativ inotropen Effekt ( $P < 0,05$ ).

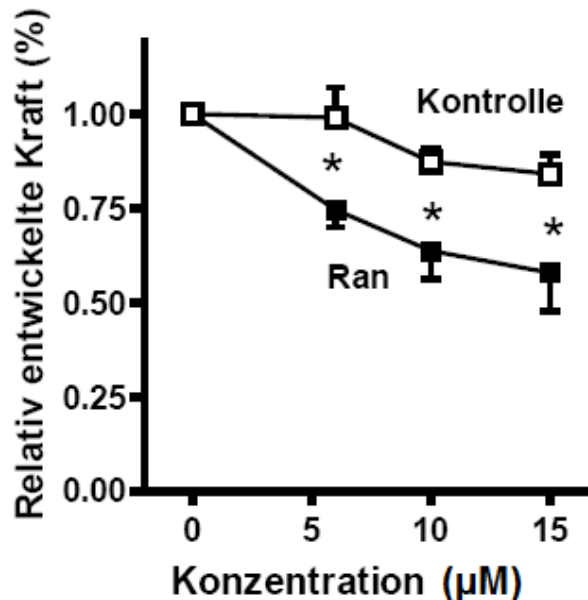


**Abbildung 3-1:** *Negativ inotrope Wirkung von Ranolazin beim Vorhofflimmern.*

Die Werte sind normalisiert angegeben. 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin reduzierte die entwickelte Kraft signifikant (\*) (t-test,  $P < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle.

### 3.1.2 Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin

Unter klinisch-therapeutischem Aspekt interessiert insbesondere der Zusammenhang zwischen der zugeführten Dosis und ihrer Wirkung. Daher wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin im Bereich klinisch relevanter Plasmakonzentrationen ermittelt.



**Abbildung 3-2:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin.

Dosisabhängiger Einfluss steigender Konzentrationen von Ranolazin (6, 10, 15 µM) auf die normalisierte entwickelte Kraft im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern (VHF). Ranolazin zeigte gegenüber der Kontrolle einen signifikanten (\*) negativ inotropen Effekt (RM ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Eine Konzentration von 6 µM Ranolazin entspricht der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ), die den späten  $Na^+$ -Strom signifikant reduzieren kann (Antzelevitch et al. 2004, Undrovinas et al. 2006). Der Abbildung 3-2 ist zu entnehmen, dass Ranolazin ( $n=6$ ) bereits bei dieser Konzentration die Kraft signifikant ( $P < 0,05$ ) auf  $74,6 \pm 4,5$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=5$ ) reduzierte, bei der sich die Kraft mit  $99,0 \pm 8,1$  % nicht veränderte. Dies entspricht einem Kraftabfall von durchschnittlich 25,4 %. Weiter zeigen die Kurven, dass unter Erhöhung der Ranolazinkonzentration auf 10 und 15 µM die entwickelte Kraft signifikant ( $P < 0,05$ ) weiter abfiel (siehe auch Tabelle 3-1). Die aus den steigenden Ranolazinkonzentrationen resultierende Kurve steht statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ) gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Daher muss von einem dosisabhängigen negativ inotropen Effekt von Ranolazin gesprochen werden.

### 3. Ergebnisse

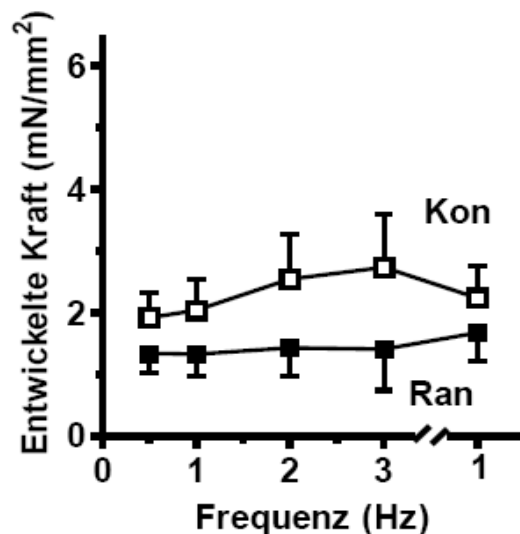
Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	0	5	10	15
<b>Kontroll-Gruppe Kraft (<math>\text{mN}/\text{mm}^2</math>)</b>	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,1$
<b>Ranolazin-Gruppe Kraft (<math>\text{mN}/\text{mm}^2</math>)</b>	$1,0 \pm 0,0$	$0,8^* \pm 0,1$	$0,6^* \pm 0,1$	$0,6^* \pm 0,1$

**Tabelle 3-1:** Angabe der Kräfte der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ranolazin.

Angabe der normalisierten entwickelten Kräfte und des SEM humaner Vorhofmuskelstreifen unter Ranolazinexposition (n=6) im Vergleich zur Kontrolle (n=5). Signifikant (RM ANOVA,  $P < 0,05$ ) reduzierte Kräfte nach Ranolazinexposition im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet.

#### 3.1.3 Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität bei steigenden Stimulationsfrequenzen

Um den weiteren Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität des humanen Vorhofmyokards von Patienten mit Vorhofflimmern zu untersuchen, wurde im Experiment eine Kraft-Frequenz-Beziehung durchgeführt, bei der die Frequenz von 0,5 Hz schrittweise auf 3 Hz erhöht wurde.



**Abbildung 3-3:** Die entwickelte Kraft unter Ranolazin bei steigenden Frequenzen.

Der Einfluss von Ranolazin auf das kontraktile Verhalten in Muskelstreifen von Patienten mit Vorhofflimmern. Der negativ inotrope Effekt von  $10 \mu\text{M}$  Ranolazin war bei höheren Frequenzen nicht ausgeprägt.

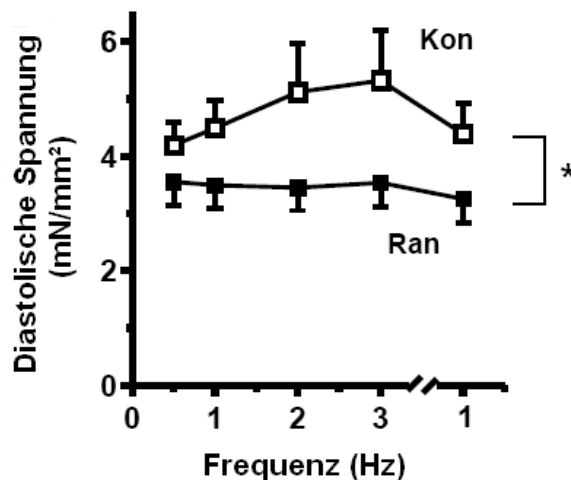
Die Abbildung 3-3 zeigt die Mittelwerte der entwickelten Kraft der Muskelstreifen. Bei höheren Frequenzen zeigte die entwickelte Kraft keinen Unterschied zwischen Muskelstreifen, die mit  $10 \mu\text{M}$  Ranolazin (n=12) behandelt wurden und der Kontrollgruppe (n=11). Die Mittelwerte können der Tabelle 3-2 entnommen werden.

### 3. Ergebnisse

Frequenz (Hz)	0,5	1	2	3	1
<b>Kontroll-Gruppe Kraft (mN/mm<sup>2</sup>)</b>	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,5	2,5 ± 0,7	2,7 ± 0,9	2,2 ± 0,5
<b>Ranolazin-Gruppe Kraft (mN/mm<sup>2</sup>)</b>	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,7	1,7 ± 0,5

**Tabelle 3-2:** Angabe der entwickelten Kräfte bei steigenden Frequenzen.

Darstellung der Mittelwerte mit SEM für die Kraft-Frequenz-Beziehung. Die Ranolazingruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in der entwickelten Kraft bei steigenden Frequenzen.



**Abbildung 3-4:** Die diastolische Spannung unter Ranolazin bei steigenden Frequenzen.

Diese erhöhte sich bei Steigerung der Frequenz in der Kontrollgruppe signifikant gegenüber der Ranolazingruppe, die über alle Stimulationsfrequenzen eine konstante diastolische Spannung aufwies. Signifikant (RM ANOVA,  $P < 0,05$ ) reduzierte Werte der Ranolazingruppe im Vergleich zur Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet.

Mit der Kraft-Frequenz-Beziehung konnte neben der entwickelten Kraft auch der Effekt von Ranolazin auf die diastolische Spannung näher evaluiert werden. In der Ranolazin-Gruppe konnte die diastolische Spannung gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert werden (RM ANOVA,  $P < 0,05$ ). Bei 0,5 und 3 Hz betragen die Werte in der Kontrollgruppe ( $n=10$ )  $4,4 \pm 0,4$  bzw.  $5,7 \pm 0,9$  mN/mm<sup>2</sup>, wohingegen die mit 10  $\mu$ M Ranolazin behandelten Muskelstreifen ( $n=11$ ) mit  $3,6 \pm 0,4$  bzw.  $3,5 \pm 0,4$  mN/mm<sup>2</sup> keinen Anstieg der diastolischen Spannung zeigten. Genauere Angaben zur diastolischen Spannung können aus der Tabelle 3-3 entnommen werden.

### 3. Ergebnisse

Frequenz (Hz)	0,5	1	2	3	1
Kontroll-Gruppe Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )	4,4 ± 0,4	4,7 ± 0,5	5,4 ± 0,9	5,7 ± 0,9	4,6 ± 0,5
Ranolazin-Gruppe Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,3 ± 0,4

Tabelle 3-3: Mittelwerte der diastolischen Spannung bei steigenden Frequenzen.

Um herauszufinden, ob der negativ inotrope Effekt von Ranolazin das Ergebnis einer veränderten Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme und -Freisetzung des SR ist, wurde eine Post-Pausen-Potenzierung durchgeführt. Diese lässt indirekt Rückschlüsse auf den Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR zu (Bers 1985). Die Abbildung 3-5 zeigt eine Originalregistrierung zur Post-Pausen-Potenzierung.

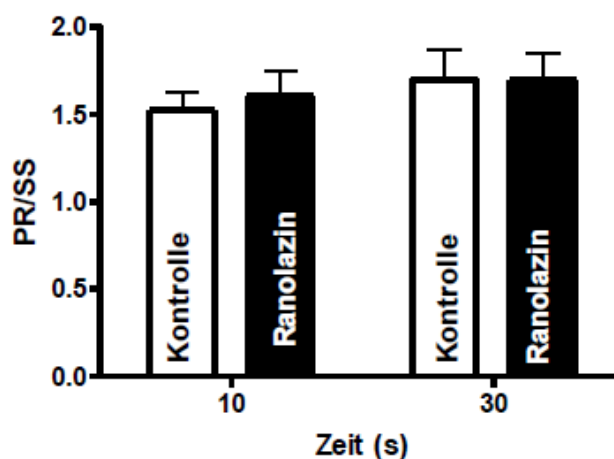
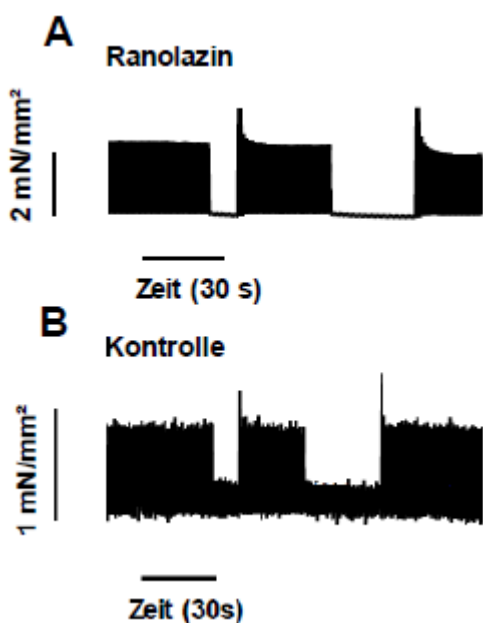


Abbildung 3-6: Post-Pausen-Potenzierung bei VHF-Muskelstreifen.

Abbildung 3-5: Originalregistrierung der Post-Pausen-Potenzierung bei VHF-Muskelstreifen.

A zeigt den Ranolazin-inkubierten Muskelstreifen, B den Kontrollstreifen. Die Stimulation wurde für 10 bzw. 30 Sekunden unterbrochen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontraktilitätsmessung des Quotienten vor (SS) und nach (PR) der Pause. Die Stimulationspausen betragen 10 und 30 Sekunden, dabei ergab sich kein Unterschied im Verhältnis PR/SS der beiden Gruppen.

Zur Bestimmung der Post-Pausen-Potenzierung wurde die Stimulation bei einer Frequenz von 1 Hz für eine bestimmte Zeit (10 und 30 Sekunden) ausgesetzt.

Die Abbildung 3-6 zeigt, dass die Exposition mit 10 µM Ranolazin keinen Unterschied im Kraftverhalten nach der Stimulationspause erbrachte. Nach der Stimulationspause von 10 Sekunden betrug das Verhältnis PR/SS (erster Schlag nach der Pause/ letzter Schlag vor der Pause) 1,5 ± 0,1 bei der Kontrollgruppe (n=7) und 1,7 ± 0,2 in der Ranolazingruppe (n=9). Nach 30 Sekunden ergab das Verhältnis bei der Kontrollgruppe 1,7 ± 0,2 und wies verglichen mit der Ranolazingruppe 1,7 ± 0,1 ebenso keinen Unterschied auf. Das deutet darauf hin, dass es während der Pause bei beiden

### 3. Ergebnisse

Gruppen zu keiner Reduktion im SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt kam.

#### 3.1.4 Der Einfluss von Ranolazin auf die Ca<sup>2+</sup>-Überladung durch Glykoside

In den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ranolazin einen positiven Effekt auf die diastolische Spannung in Muskelstreifen von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern hat. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde unter der Exposition mit 0,25 µM Ouabain eine diastolische Dysfunktion durch Na<sup>+</sup>- und damit einhergehender Ca<sup>2+</sup>-Überladung induziert. Für diesen Versuch wurden präparierte Muskelstreifen aus Vorhofmyokard von Patienten im Sinusrhythmus verwendet. Eine Gruppe wurde vor der Exposition mit Ouabain zusätzlich mit 10 µM Ranolazin behandelt. Ouabain wird als Herzglykosid eingesetzt und hemmt die myozytäre Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Die Originalregistrierungen in Abbildung 3-7 zeigt einen Muskelstreifen der Kontrollgruppe, der initial den bekannten positiv inotropen Effekt und schließlich eine diastolische Dysfunktion mit ausgeprägter Kontraktur entwickelte. Unter diesen Bedingungen zeigte Ranolazin einen ausgeprägten kardioprotektiven Effekt auf die diastolische Funktion. Die Gruppe von Muskelstreifen, die vor Ouabainexposition mit 10 µM Ranolazin versetzt wurde (n=6), ging nach 111,3 ± 8 Minuten signifikant (P<0,05) später in Kontraktur als die Kontrollgruppe (n=5), die bereits nach 75,0 ± 7 Minuten, (P<0,05) in Kontraktur ging, siehe Abbildung 3-8. Als Kriterium zur Bestimmung der Kontraktur wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem der Anstieg der diastolischen Spannung die maximale Geschwindigkeit erreichte.

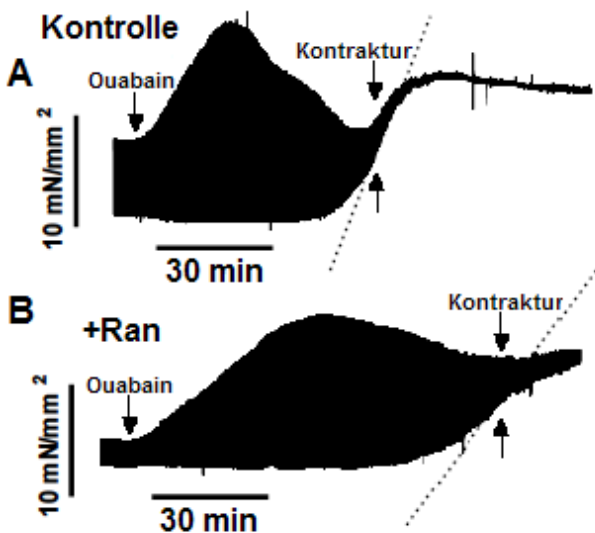


Abbildung 3-7: Originalregistrierung eines Versuchs mit 0,25 µM Ouabain.

Der Muskelstreifen in Abbildung B wurde vor Beginn der Ouabainexposition mit 10 µM Ranolazin inkubiert. Dieser Muskelstreifen geht deutlich später in Kontraktur als der Muskelstreifen, der nicht mit Ranolazin behandelt wurde (A). Die gestrichelte Linie zeigt die maximale Geschwindigkeit des diastolischen Anstiegs - den Zeitpunkt der Kontraktur.

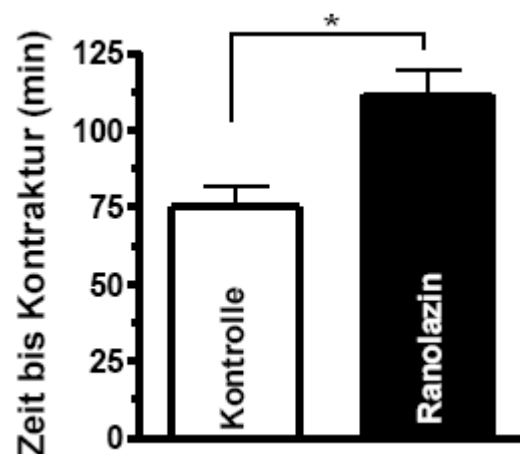
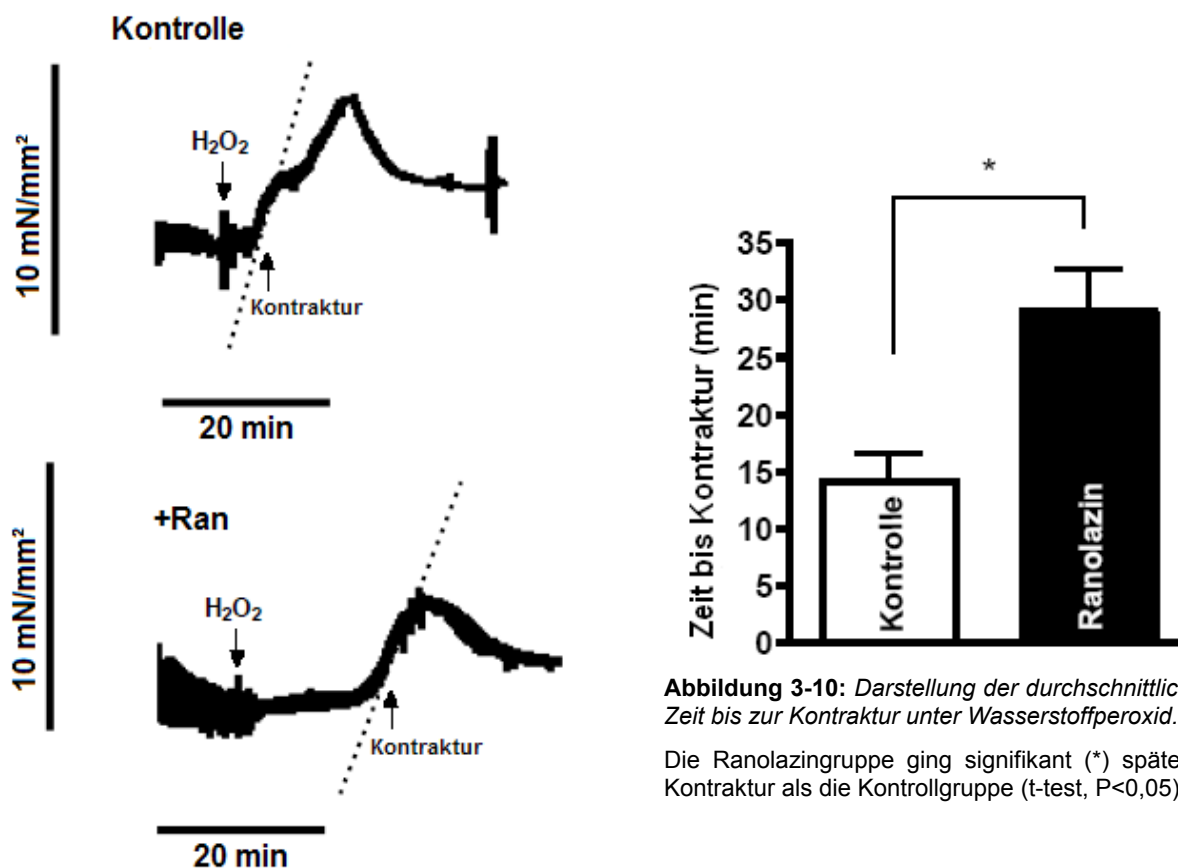


Abbildung 3-8: Darstellung der durchschnittlichen Zeit bis zur Kontraktur unter Ouabain.

Die Ranolazingruppe (n=6) ging signifikant (\*) später in Kontraktur als die Kontrollgruppe (n=5) (t-test, P<0,05).

### 3. Ergebnisse

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Ranolazin auf oxidativen Stress durch Exposition der atrialen Muskelstreifen mit 200  $\mu\text{M}$  des Radikaldonators Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) untersucht. Wasserstoffperoxid induziert über eine Erhöhung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms eine kontraktile Dysfunktion, die Ranolazin, als Inhibitor des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms, wieder abschwächen kann (Song et al. 2006).



**Abbildung 3-9:** Originalregistrierung zur Exposition mit 200  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid.

Der zuvor mit 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin versetzte Muskelstreifen geht deutlich später in Kontraktur als der Kontrollstreifen. Die gestrichelte Linie zeigt die maximale Geschwindigkeit des diastolischen Anstiegs - den Zeitpunkt der Kontraktur.

**Abbildung 3-10:** Darstellung der durchschnittlichen Zeit bis zur Kontraktur unter Wasserstoffperoxid.

Die Ranolazingruppe ging signifikant (\*) später in Kontraktur als die Kontrollgruppe (t-test,  $P < 0,05$ ).

In der Originalregistrierung in Abbildung 3-9 geht der mit 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin exponierte Muskelstreifen deutlich später in Kontraktur als der Kontrollstreifen. Im Balkendiagramm von Abbildung 3-10 geht die Kontrollgruppe ( $n=6$ ) mit  $14,9 \pm 2,5$  Minuten signifikant ( $P < 0,05$ ) früher in Kontraktion als die Gruppe, die vor Radikalexposition mit 10  $\mu\text{M}$  Ranolazin exponiert wurde ( $n=5$ ) und bei  $29,0 \pm 4,0$  Minuten in Kontraktur ging. Als Kriterium zur Bestimmung der Kontraktur wurde in diesem Experiment ebenfalls der Zeitpunkt ausgewählt, bei dem der Anstieg der diastolischen Spannung die maximale Geschwindigkeit erreichte. Die vorliegenden Experimente sind aufgrund der geringeren Ausgangskontraktilität der Muskelstreifen, im Vergleich zu denen der Ouabainexperimente, mit Einschränkung zu bewerten. Sie verdeutlichen jedoch die Ergebnisse der Ouabainexperimente, die

### 3. Ergebnisse

eine signifikante Verzögerung der Kontraktur unter Ranolazinexposition zeigten.

## 3.2 Die Effekte von Ranolazin bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression

### 3.2.1 Einfluss der chronischen CaMKII $\delta_c$ -Überexpression auf das Herzgewicht

In der vorliegenden Arbeit wurden junge CaMKII $\delta_c$ -transgene Mäuse im Alter von  $8 \pm 1$  Wochen, und damit erstmalig auch das frühe Stadium der Herzinsuffizienz in dieser Mauslinie, untersucht. Die transgenen Mäuse wiesen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen makroskopisch bereits eine Herzhypertrophie auf. Das durchschnittliche Herzgewicht des transgenen Tieres ( $n=14$ ) war mit  $255 \pm 13$  mg im Vergleich zum Wildtyp ( $n=13$ ) mit  $182 \pm 11$  mg signifikant erhöht; ( $P<0,05$ ). Demgegenüber blieb das Körpergewicht der transgenen Mäuse mit  $27,2 \pm 1,4$  g verglichen mit den Wildtypen  $25,4 \pm 1,4$  g jedoch konstant.

Dieser Zusammenhang konnte mit Hilfe des Quotienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG-Quotient) noch eindeutiger gezeigt werden. Das Verhältnis betrug bei der transgenen Maus  $11,1 \pm 0,5$  mg/g verglichen zu  $8,0 \pm 0,5$  mg/g des Wildtyps und war damit signifikant erhöht ( $P<0,05$ ). Die Abbildung 3-11 verdeutlicht, dass bereits bei jungen Mäusen im Alter von 8 Wochen, die Überexpression der CaMKII $\delta_c$  ein erhöhtes Herzgewicht induziert.

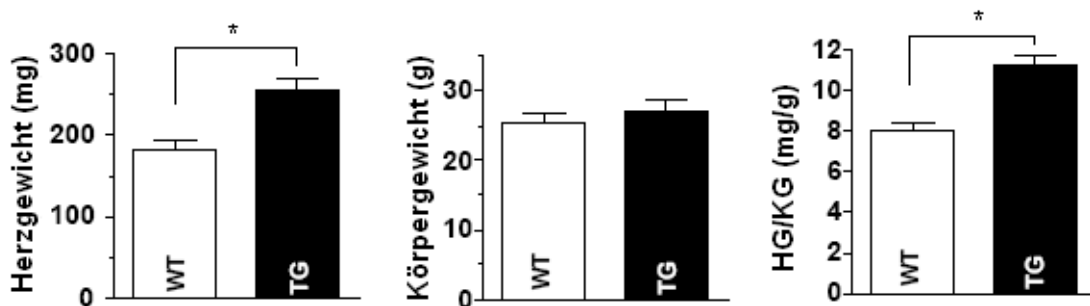


Abbildung 3-11: Herzgewicht, Körpergewicht und der HG/KG-Quotient der Mäuse.

Verglichen wurden transgene Mäuse (TG) ( $n=14$ ), die die CaMKII $\delta_c$  überexprimierten, mit Wildtyp-Mäusen (WT) ( $n=13$ ). Der Herzgewicht/Körpergewicht-Quotient (HG/KG Quotient) war bei den TG signifikant erhöht. Herzgewicht sowie HG/KG-Quotient waren bei den transgenen Mäusen gegenüber dem Wildtyp signifikant (\*) erhöht (t-test,  $P<0,05$ ).

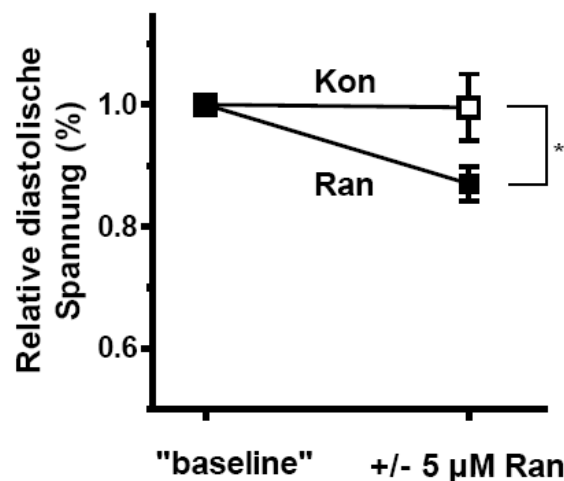
### 3.2.2 Der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin, die grundlegende Wirkung von Ranolazin auf die Kontraktilität bei der CaMKII $\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz zu untersuchen. Hierfür wurden ebenfalls rechtsventrikuläre Papillarmuskeln von transgenen Mäusen präpariert, die mit  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin



### 3. Ergebnisse

inkubiert wurden. Bei einer Frequenz von 4 Hz wurde die entwickelte Kraft vor der Behandlung mit Ranolazin mit der Kraft nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten verglichen. Die Kraft wurde normalisiert zur „baseline“ angegeben. Bei Papillarmuskeln der Kontrollgruppe (n=9) betrug die entwickelte Kraft nach 15 Minuten  $81,1 \pm 6,3 \%$ , in Anwesenheit von Ranolazin (n=9) kam es zu einer Kraftabnahme auf  $69,3 \pm 6,7\%$  ( $P=0,22$ ). Während sich die entwickelte Kraft 15 Minuten nach Ranolazingabe im Vergleich zur Kontrolllösung annähernd gleich verhielt, zeigte sich auch in diesem Versuch eine deutliche Verbesserung der diastolischen Spannung durch die Inkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin. Die Abbildung 3-12 zeigt, dass Papillarmuskeln der Kontrollgruppe nach 15 Minuten eine diastolische Spannung von  $99,6 \pm 5,5\%$  aufwiesen, wohingegen bei Papillarmuskeln nach Inkubation mit  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin die diastolische Spannung signifikant auf  $87,0 \pm 2,8\%$  reduziert wurde ( $P<0,05$ ).



**Abbildung 3-12:** Darstellung der normalisierten diastolischen Spannung in TG-Papillarmuskeln.

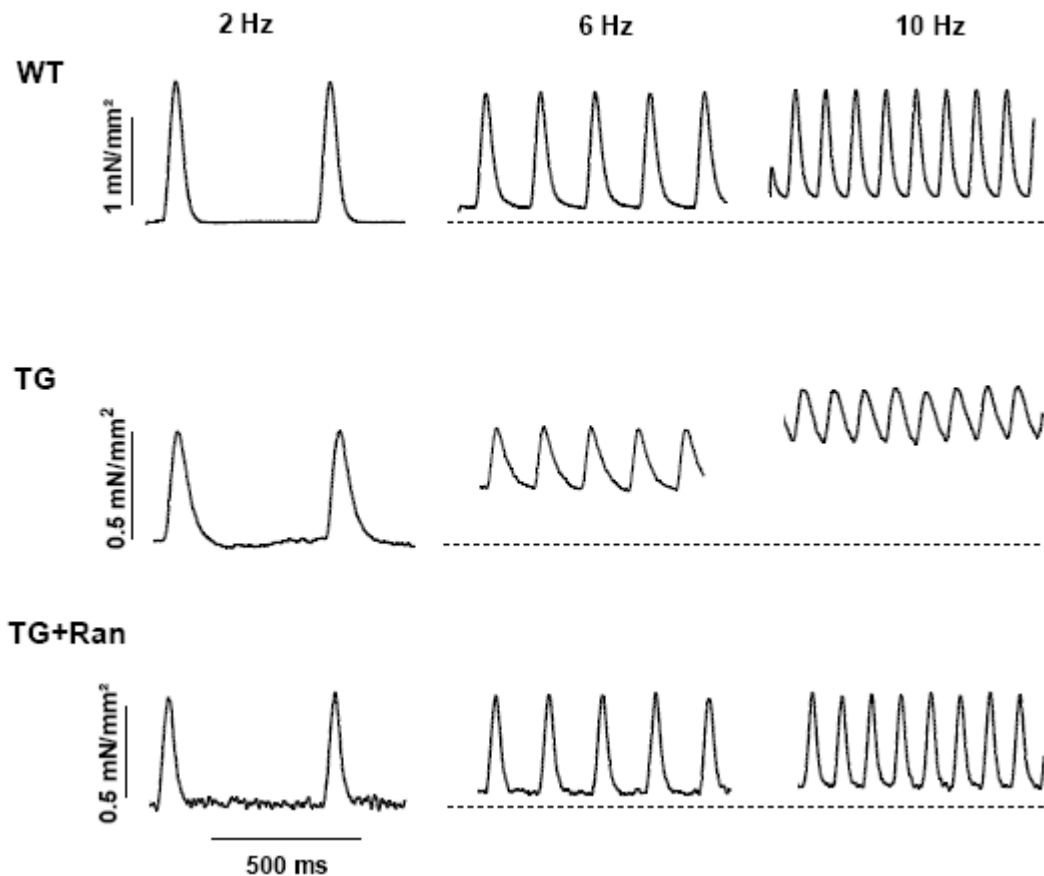
Nach 15 Minuten Inkubationszeit mit  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin (n=9) kam es zu einer signifikanten (\*) Reduktion der diastolischen Spannung gegenüber der Kontrollgruppe (n=9) ( $P<0,05$ ).

#### **3.2.3 Der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität bei steigenden Frequenzen**

Um den Einfluss der  $\text{CaMKII}\delta_c$  und zusätzlich den Ranolazineffekt auf die Kontraktilität näher zu beurteilen, wurde eine Kraft-Frequenz-Beziehung durchgeführt, bei der die Muskelstreifen mit einer Frequenz von 2 bis 10 Hz stimuliert wurden.

Die Abbildung 3-13 zeigt repräsentative Originalamplituden bei 2, 6 und 10 Hz der durchgeführten Kraft-Frequenz-Beziehung. Unter Ranolazinexposition des transgenen Muskelstreifens verbesserte sich die diastolische Spannung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3. Ergebnisse



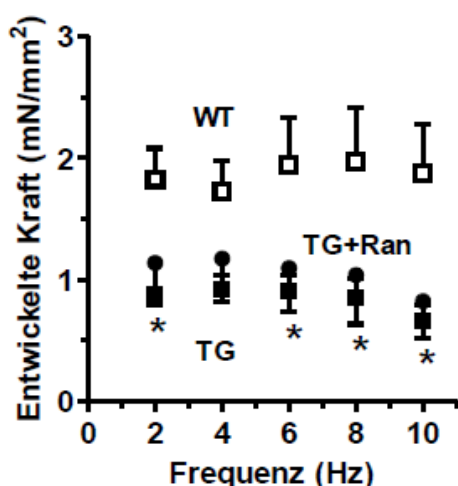
**Abbildung 3-13:** Repräsentative Originalregistrierung einer Kraft-Frequenz-Beziehung bei der Maus.

Verglichen werden die Amplituden der Papillarmuskeln von Wildtyp und transgener Maus (mit und ohne 5  $\mu$ M Ranolazin) bei 2, 6 und 10 Hz.

Die mittlere Kraftentwicklung im Papillarmuskel in Abbildung 3-14 zeigt eine signifikante Reduktion in transgenen Muskelstreifen (n=10) während aller Frequenzen gegenüber dem Wildtyp (n=10), der eine signifikant höhere Kraft entwickelte ( $P < 0,05$ ). Dieser Zusammenhang unterstreicht die insuffiziente systolische Pumpfunktion in den transgenen Mäusen. Die Exposition mit Ranolazin bei transgenen Papillarmuskeln (n=11) zeigte keine Unterschiede zu transgenen, unbehandelten Papillarmuskeln.

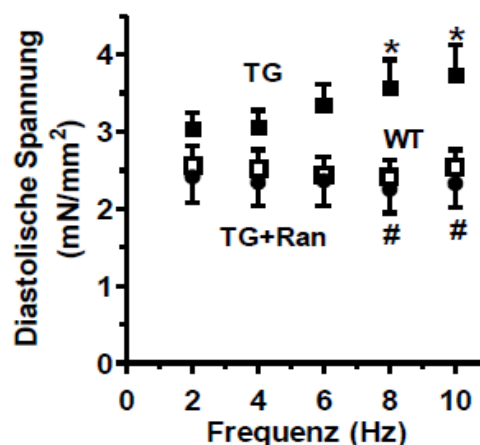
Mit der Steigerung der Frequenzen von 2 bis 10 Hz wurde auch die diastolische Spannung untersucht. In Papillarmuskeln der transgenen Maus (n=10) war diese im Vergleich zum Wildtyp (n=10) signifikant erhöht ( $P < 0,05$ ), des Weiteren stieg sie mit steigender Frequenz, zwischen 6 und 10 Hz, weiter an. Die Abbildung 3-15 veranschaulicht die signifikante Verbesserung der diastolischen Spannung im Papillarmuskel der transgenen Maus bei Exposition mit 5  $\mu$ M Ranolazin (n=11),  $P < 0,05$ . Genaue Mittelwerte können der Tabelle 3-5 entnommen werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3-14:** Darstellung der entwickelten Kraft der Papillarmuskeln bei steigenden Frequenzen.

Transgene Papillarmuskeln (n=10) entwickelten signifikant (\*) weniger Kraft als Wildtyp-Muskelstreifen (n=10) (RM ANOVA, P<0,05). Die entwickelte Kraft wurde in der TG-Gruppe durch die Exposition mit Ranolazin (n=11) nicht verändert.



**Abbildung 3-15:** Darstellung der diastolischen Spannung der Papillarmuskeln bei steigenden Frequenzen.

Wildtyp (n=10), transgene Papillarmuskeln (n=10) und transgene Papillarmuskeln nach Exposition mit 5  $\mu$ M Ranolazin (n=11) werden gegeneinander aufgetragen. Ranolazin verminderte die diastolische Spannung der transgenen Papillarmuskeln signifikant (#). Des Weiteren stieg die diastolische Spannung der unbehandelten, transgenen Muskelstreifen signifikant (\*) stärker an als bei den Wildtypen (RM ANOVA, P<0,05).

Frequenz (Hz)	2	4	6	8	10
<b>WT-Gruppe Kraft (mN/mm<sup>2</sup>)</b>	1,8 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,4
<b>TG-Gruppe Kraft (mN/mm<sup>2</sup>)</b>	0,8* $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,9* $\pm$ 0,1	0,9* $\pm$ 0,2	0,7* $\pm$ 0,1
<b>TG+Ran-Gruppe Kraft (mN/mm<sup>2</sup>)</b>	1,1 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,3

**Tabelle 3-4:** Exakte Angabe der entwickelten Kräfte während steigender Frequenzen.

Zusätzlich ist der SEM angegeben, die Gruppen teilen sich auf in Wildtyp (n=10), Transgen (n=10) und transgene Papillarmuskeln nach Ranolazinexposition (n=11). Signifikant reduzierte Werte sind mit \* markiert (RM ANOVA, P<0,05).

### 3. Ergebnisse

Frequenz (Hz)	2	4	6	8	10
<b>WT-Gruppe</b> Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2
<b>TG-Gruppe</b> Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,6* ± 0,4	3,7* ± 0,4
<b>TG+Ran-Gruppe</b> Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,3# ± 0,3	2,3# ± 0,3

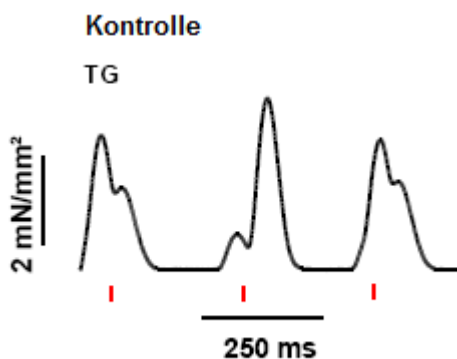
**Tabelle 3-5:** Exakte Angabe der Werte für die diastolische Spannung.

Zusätzlich ist der SEM angegeben. Die Versuche wurden an Papillarmuskeln der Maus durchgeführt, davon Wildtyp (n=7), Transgene (n=9) und transgene Muskelstreifen nach 5 µM Ranolazinexposition (n=10). Signifikant erhöhte bzw. reduzierte Werte sind mit \* bzw. # markiert (RM ANOVA, P<0,05).

#### 3.2.4 Der Einfluss der CaMKIIδ<sub>c</sub> auf die Arrhythmogenese

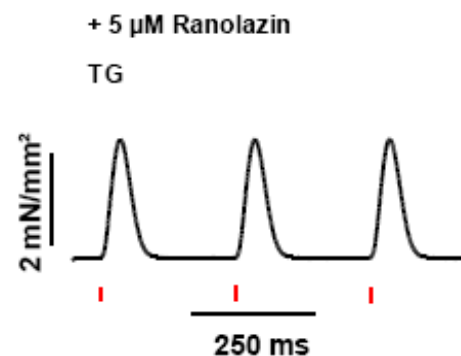
Während des Versuchsablaufs mit transgenen rechtsventrikulären Papillarmuskeln der Maus (n=5) traten gehäuft spontane Arrhythmien auf, wohingegen bei den Papillarmuskeln der Wildtyp-Mäuse keine Arrhythmien auftraten (P<0.05), siehe auch Abbildung 3-18. Aufgetretene Arrhythmien, die über fünf Minuten anhielten, wurden mit 5 µM Ranolazin behandelt.

Die Abbildung 3-19 verdeutlicht, dass sich alle aufgetretenen Arrhythmien durch die Gabe von Ranolazin innerhalb weniger Minuten terminieren ließen. Die Abbildungen 3-16 und 3-17 zeigen die Amplituden der Originalregistrierung nach Stimulation. Ohne Zugabe von Ranolazin blieb die Arrhythmie bestehen. Abbildung 3-17 entstand nach Hinzugabe von 5 µM Ranolazin, das die Arrhythmie beendete.



**Abbildung 3-16:** Registrierung der Amplituden während der Arrhythmie.

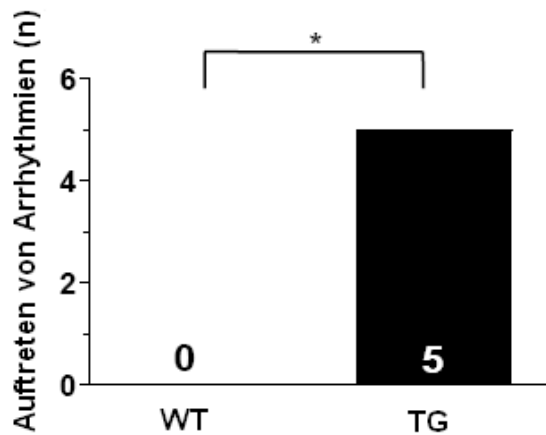
Ohne Hinzugabe von Ranolazin konnte die Arrhythmie nicht beendet werden. Die roten Striche markieren die reguläre Stimulation.



**Abbildung 3-17:** Registrierung der Amplituden nach Gabe von 5 µM Ranolazin.

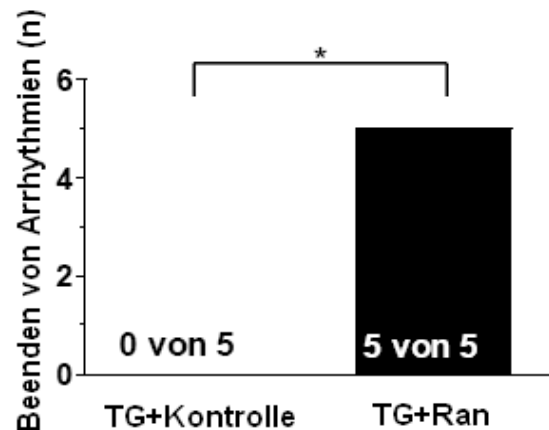
Der Muskelstreifen kontrahierte nach Ranolazingabe wieder rhythmisch. Die roten Striche markieren die reguläre Stimulation.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3-18:** Anzahl der aufgetretenen Arrhythmien in WT und TG.

In Papillarmuskeln der Wildtypen traten im Vergleich zu den Transgenen keine Arrhythmien auf. Die Anzahl der aufgetretenen Arrhythmien ist in der transgenen Gruppe signifikant (\*) erhöht ( $P < 0,05$ ).



**Abbildung 3-19:** Beenden der aufgetretenen Arrhythmien mit Ranolazin.

Alle aufgetretenen Arrhythmien konnten mit einer einmaligen Gabe von  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin beendet werden, Ranolazin terminierte in diesem Experiment aufgetretene Arrhythmien signifikant (\*) ( $P < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Arrhythmien signifikant gehäuft in transgenen Mäusen auftraten. Durch Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms mittels Ranolazin ließen sich alle aufgetretenen Arrhythmien beenden ( $P < 0,05$ ). Ranolazin stellte sich in diesem Experiment als potentes Antiarrhythmikum dar.

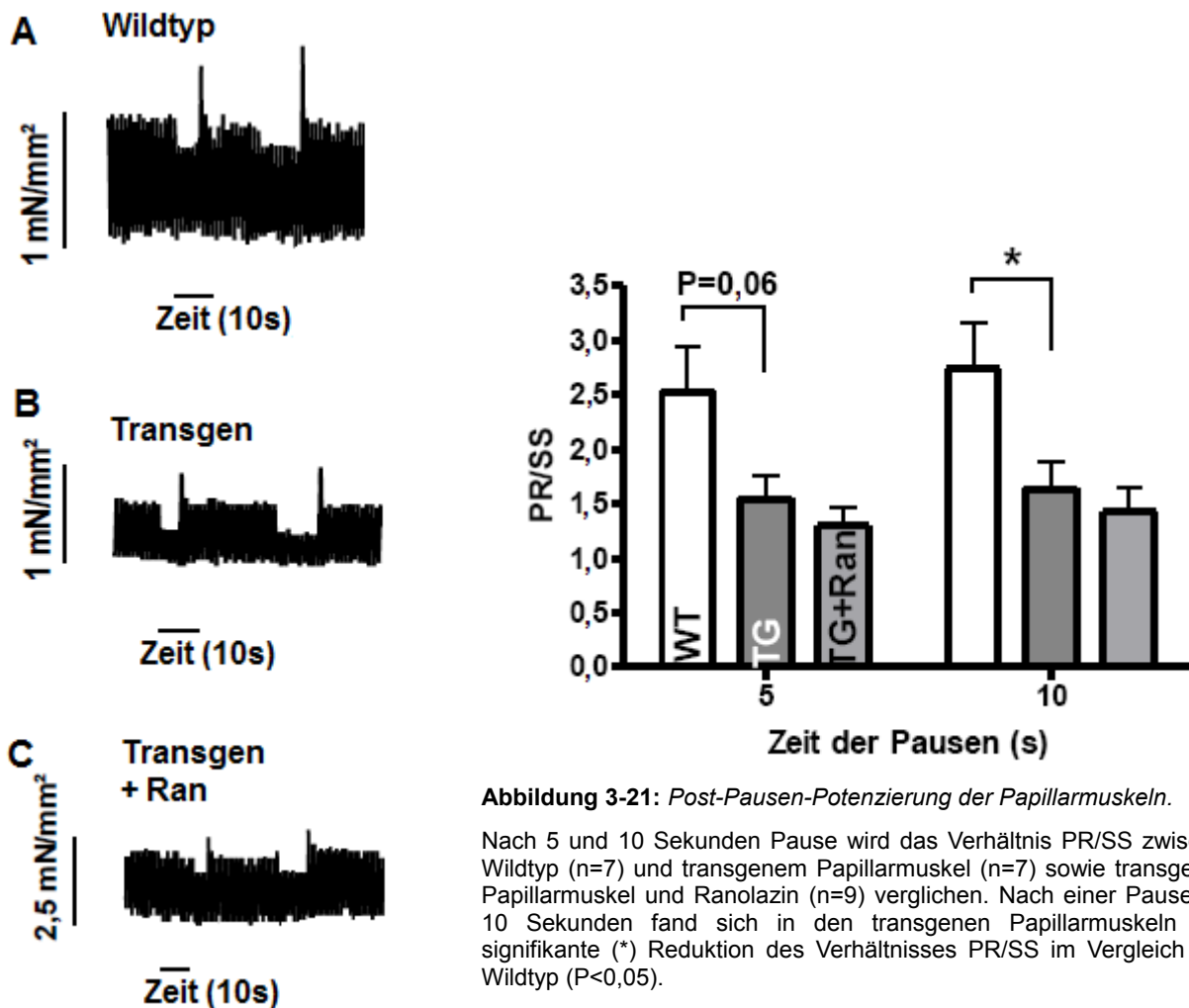
#### 3.2.5 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt bei Überexpression der $\text{CaMKII}\delta_c$

Um herauszufinden, ob die entwickelte Kraft in den transgenen Papillarmuskeln und der Einfluss von Ranolazin auf die diastolische Spannung auf einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und -Freisetzung des SR beruht, wurde, wie bereits unter Kapitel 3.1.3 beschrieben, eine Post-Pausen-Potenzierung durchgeführt. In diesem Versuch wurden zwei Stimulationspausen von jeweils 5 und 10 Sekunden durchgeführt. Der erste Ausschlag nach der Pause wurde durch den ersten Ausschlag vor der Pause geteilt (PR/SS).

Nach einer Pause von 10 Sekunden war das Verhältnis (PR/SS) in der transgenen Maus ( $n=7$ )  $1,6 \pm 0,3$  im Vergleich zum Wildtyp ( $n=7$ )  $2,7 \pm 0,4$  signifikant reduziert ( $P < 0,05$ ). Bei beiden Stimulationspausen ergab die Zugabe von  $5 \mu\text{M}$  Ranolazin im transgenen Muskelstreifen ( $n=9$ ) keinen Unterschied zum nicht behandelten, transgenen Muskelstreifen. Nach 5 Sekunden betrug das Verhältnis  $1,3 \pm 0,2$  und  $1,4 \pm 0,2$  nach der Pause von 10 Sekunden.

Die Abbildung 3-20 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung. Die Abbildung 3-21 fasst die Versuchsergebnisse der Post-Pausen-Potenzierung zusammen und zeigt, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR in den transgenen Mäusen reduziert war.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3-21:** Post-Pausen-Potenzierung der Papillarmuskeln.

Nach 5 und 10 Sekunden Pause wird das Verhältnis PR/SS zwischen Wildtyp (n=7) und transgenem Papillarmuskel (n=7) sowie transgenem Papillarmuskel und Ranolazin (n=9) verglichen. Nach einer Pause von 10 Sekunden fand sich in den transgenen Papillarmuskeln eine signifikante (\*) Reduktion des Verhältnisses PR/SS im Vergleich zum Wildtyp (P<0,05).

**Abbildung 3-20:** Originalregistrierung der Post-Pausen-Potenzierung von Papillarmuskeln.

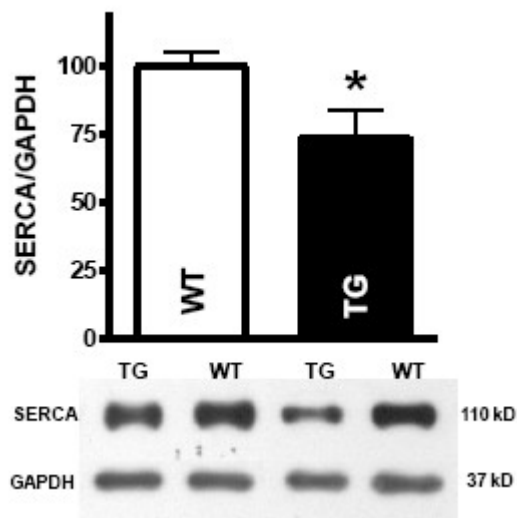
Abbildung A zeigt einen Papillarmuskelstreifen des Wildtyps, B und C zeigen Registrierungen von transgenen Papillarmuskelstreifen, wobei B einen Kontrollstreifen darstellt und C zuvor mit 5  $\mu$ M Ranolazin inkubiert wurde. Die Stimulation wurde für 5 bzw. 10 Sekunden unterbrochen.

Um die klassischen Veränderungen in der  $Ca^{2+}$ -Homöostase bei der Herzinsuffizienz (Reduzierung der SERCA und Steigerung des NCX) als Ursache für die veränderte Post-Pausen-Potenzierung zu untersuchen, wurden Western Blots mit linksventrikulärem Myokardgewebe der transgenen Mäuse durchgeführt.

In dem vorliegenden Modell der frühen Herzinsuffizienz zeigt die Abbildung 3-22, dass die SERCA-

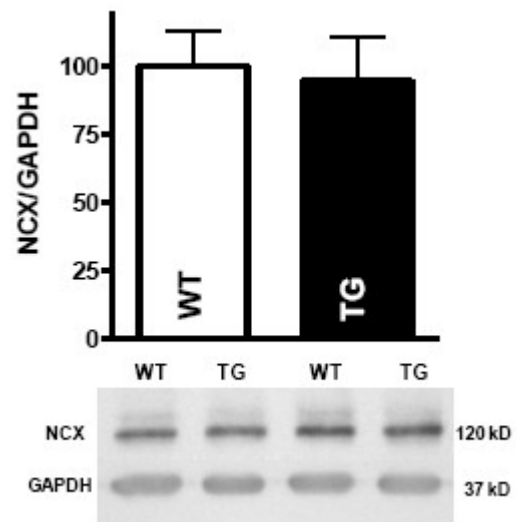
### 3. Ergebnisse

Expression in den transgenen Mäusen (n=7) signifikant auf  $74,2 \pm 9,8\%$  ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zum Wildtyp (n=6) reduziert war. Während Vorarbeiten einen drastischen Anstieg der NCX-Expression bei transgenen Mäusen im Alter von 12 Wochen gezeigt haben (Maier et al. 2003), fanden sich bei der NCX-Expression der 8 Wochen alten transgenen Mäuse (n=7) mit  $94,7 \pm 16,2\%$  im Vergleich zum Wildtyp (n=6) keine erhöhten Werte.



**Abbildung 3-22:** SERCA-Expression in transgenen Mäusen.

Die Mittelwerte der SERCA-Expression (normalisiert zur GAPDH-Expression) zeigen eine signifikante (\*) Reduktion in transgenen Mäusen (n=7) ( $P < 0,05$ ); (Wildtyp n=6).



**Abbildung 3-23:** Expression des NCX in transgenen Mäusen.

Die Expression des NCX ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp (n=6) und transgenen Mäusen (n=7).

# 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität und die diastolische Funktion an atrialen Muskelstreifen von Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Ranolazin reduzierte dosisabhängig die entwickelte Kraft am isolierten Vorhofmyokard und führte zu einer Verbesserung der diastolischen Spannung, die bei Steigerung der Stimulationsfrequenzen signifikant reduziert werden konnte. Die Wirkung von Ranolazin auf die diastolische Spannung wurde in weiteren Experimenten durch Erzeugung von Stress näher untersucht. So konnte Ranolazin mittels Ouabain, einem Herzglykosid, die Zeit bis zum Übergang des Muskelstreifens in die Kontraktur signifikant verzögern. Auch unter dem Radikaldonator Wasserstoffperoxid bewirkte die vorherige Inkubation mit Ranolazin eine signifikante Verzögerung der Kontraktur.

Da das Vorhofflimmern eine häufige Komorbidität im Rahmen der Herzinsuffizienz ist, wurde in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ranolazin auf die CaMKII $\delta_c$ -induzierte Herzinsuffizienz an transgenen Mäusen untersucht als auch ein Vergleich zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen gezogen.

Der Einfluss der CaMKII $\delta_c$ -Überexpression auf das frühe Stadium der Herzinsuffizienz (8  $\pm$  1 Wochen) wurde näher untersucht und es konnte erstmals ein erhöhtes Herz- und Körpergewicht in diesen transgenen Mäusen gezeigt werden. Bei der durchgeführten Kraft-Frequenz-Beziehung entwickelten transgene Papillarmuskeln signifikant weniger Kraft als die Wildtypen. Die diastolische Spannung hingegen war in transgenen Papillarmuskeln im Vergleich zu den Wildtypen erhöht. Eine durchgeführte Post-Pausen-Potenzierung ergab Hinweise auf einen verminderten Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR in transgenem Gewebe. Western Blots wurden zur Proteinexpression durchgeführt und zeigten als typisches Korrelat der Herzinsuffizienz eine signifikante Reduktion der SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Als weitere Zeichen der CaMKII $\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz zeigten sich während des Versuchsablaufs spontan auftretende Arrhythmien, die alle mit 5  $\mu$ M Ranolazin beendet werden konnten.

Des Weiteren wurde der demonstrierte Einfluss von Ranolazin auf die diastolische Spannung am Vorhof in weiteren Experimenten am Ventrikel bei der CaMKII $\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz bestätigt: Ranolazin reduzierte die diastolische Spannung bereits unter basalen Bedingungen signifikant, dieser Effekt konnte bei höheren Frequenzen noch stärker verdeutlicht werden.



### 4.1 Ranolazin wirkt am Vorhofmyokard negativ inotrop

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben erstmals den Einfluss von Ranolazin auf die Kontraktilität am Myokard von Patienten mit Vorhofflimmern und zeigen, dass Ranolazin die entwickelte Kraft dosisabhängig reduziert.

Diese leicht negativ inotrope Wirkung von Ranolazin konnte auch an atrialen Muskelstreifen von Patienten im Sinusrhythmus gezeigt werden (Sossalla et al. 2010b). Hingegen wirkte Ranolazin in den Experimenten mit Papillarmuskeln CaMKII $\delta_c$ -überexprimierender Mäuse nicht negativ inotrop. Gleiches beobachteten auch Sossalla et al. an herzinsuffizientem humanen Ventrikelmyokard (Sossalla et al. 2008). In einer anderen Arbeit an einem in-vivo-Hundemodell mit chronischer Herzinsuffizienz führte die Infusion von Ranolazin sogar zu einer Verbesserung der systolischen linksventrikulären Funktion (Sabbah et al. 2002). Dem stehen Ergebnisse von Experimenten mit Ouabain an isolierten Herzen des Meerschweins entgegen, in denen Ranolazin eine moderate, konzentrationsabhängige Reduktion des linksventrikulären systolischen Drucks (LVSD) bewirkte, aber dabei nicht die positiv inotrope Wirkung von Ouabain inhibierte. Diesen Effekt von Ranolazin auf den LVSD konnte die Arbeitsgruppe auch in Abwesenheit von Ouabain bestätigen (Hoyer et al. 2011). Möglicherweise führt eine reduzierte diastolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch die Inhibition des späten Na<sup>+</sup>-Stroms zu einem dezenten negativ inotropen Effekt. Andererseits kann auch eine Inhibition des Na<sup>+</sup>-Spitzenstroms, der im Vergleich zum Ventrikelmyokard eine größere Stromdichte am Vorhofmyokard aufweist (Burashnikov et al. 2007), wie auch eine partielle Hemmung des späten Ca<sup>2+</sup>-Stroms, der im therapeutischen Bereich von Ranolazin zu 25-30% signifikant mit inhibiert wird (Antzelevitch et al. 2004), zu dem negativ inotropen Effekt im Vorhofmyokard führen.

Verschiedene Antiarrhythmika, beispielsweise Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker oder  $\beta$ -Blocker, reduzieren die Inotropie am Ventrikel. Vor allem bei Patienten mit bereits bestehender reduzierter linksventrikulärer Funktion ist das ein unerwünschter Effekt. In den vorliegenden Ergebnissen zeigte Ranolazin jedoch keine negativ inotrope Wirkung am Ventrikel. Diese Beobachtung bestätigt Vorarbeiten, die an humanem herzinsuffizienten Gewebe keine Reduktion der ventrikulären Kontraktilität sahen (Sossalla et al. 2008, Sabbah et al. 2002). Auch eine große klinische Studie zur Monotherapie von Ranolazin bei Patienten mit chronischer Angina pectoris zeigte keine Beeinflussung von Blutdruck oder Herzfrequenz durch Ranolazin (Chaitman et al. 2004).

### 4.2 Die Inhibition des späten Na<sup>+</sup>-Stroms verbessert die diastolische Funktion

Ranolazin reduzierte in der vorliegenden Arbeit die diastolische Spannung in atrialem Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern als auch ventrikulär an Papillarmuskeln von Mäusen mit CaMKII $\delta_c$ -induzierter Herzinsuffizienz. Dieser Effekt konnte unter basalen Bedingungen als auch bei steigenden Frequenzen beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der zugrundeliegende Mechanismus zur Entstehung der diastolischen Dysfunktion die Na<sup>+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Überladung des Zytosols ist (Belardinelli et al. 2006b).

Sowohl bei der CaMKII $\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz als auch beim Vorhofflimmern wurde ein verstärkter später Na<sup>+</sup>-Strom beschrieben (Wagner et al. 2006, Sossalla et al. 2010b). Dieser kann wesentlich zur intrazellulären Na<sup>+</sup>-Akkumulation beitragen und bewirkt dadurch die Umkehr des NCX-Transportmechanismus, der normalerweise ein Ca<sup>2+</sup>-Ion im Austausch gegen drei Na<sup>+</sup>-Ionen aus der Zelle transportiert und zur diastolischen Relaxation beiträgt. Der Rückwärtsmodus des NCX, induziert durch den hohen intrazellulären Na<sup>+</sup>-Gehalt, transportiert nun jedoch im Austausch für Natrium, Kalzium in die Zelle hinein (Bers 2001). Folglich akkumuliert Kalzium während der Diastole im Zytosol und bewirkt eine Aktivierung der kontraktilen Filamente, die zur Störung der diastolischen Relaxation (Wagner et al. 2003) und konsekutiv zur Erhöhung der diastolischen Spannung führt. Ranolazin ist ein Inhibitor des späten Na<sup>+</sup>-Stroms (Antzelevitch et al. 2004) und bewirkt durch Reduktion der Na<sup>+</sup>-Akkumulation, und damit auch der Ca<sup>2+</sup>-Überladung, eine Verbesserung der diastolischen Spannung (Sossalla et al. 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen Vorarbeiten zur Wirkung von Ranolazin auf die diastolische Dysfunktion. So zeigte sich unter dem Einfluss von Ranolazin eine Verbesserung der diastolischen Spannung an linksventrikulären Hundekardiomyozyten bei induzierter Herzinsuffizienz sowohl basal als auch bei steigenden Frequenzen (Undrovinas et al. 2006). Die Arbeitsgruppe begründete diese Beobachtung damit, dass Ranolazin seine Wirkung über die Hemmung des späten Na<sup>+</sup>-Stroms entfaltet und dabei die Bindung an inaktivierte Na<sup>+</sup>-Kanäle bevorzugt. So führen steigende Stimulationsfrequenzen, und damit höhere Frequenzen von Aktionspotentialen, zur häufigeren Inaktivierung der Na<sup>+</sup>-Kanäle und so zur stärkeren Wirkungsentfaltung von Ranolazin. Die Tatsache, dass bei steigenden Frequenzen die diastolische Spannung zunimmt, konnte in der vorliegenden Arbeit sowie in vorherigen Studien an herzinsuffizientem menschlichen Myokard gezeigt werden (Feldman et al. 1988, Pieske et al. 2002b). Dies wurde dadurch erklärt, dass der Anstieg der diastolischen Spannung bei höheren Frequenzen ebenfalls durch eine erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration bedingt wird, die mit einer diastolischen Ca<sup>2+</sup>-Überladung und folglich erhöhter diastolischer Spannung einhergeht. Die Ursache für die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Erhöhung war hingegen nicht bekannt. So wurde vermutet, dass eine gestörte Na<sup>+</sup>-Elimination aus der Zelle durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-

#### 4. Diskussion

ATPase vorliegt, deren verminderte Aktivität an humanen herzinsuffizienten Herzen zuvor gezeigt wurde (Schwinger et al. 1999). Als weitere Möglichkeit für die hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei der Herzinsuffizienz wurde die Hochregulierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE) in Betracht gezogen. Durch die selektive Hemmung des NHE durch Cariporid konnte der  $\text{Na}^+$ -Einstrom in einem Herzinsuffizienzmodell am Kaninchen gehemmt werden (Baartscheer et al. 2003). Jedoch hemmt Cariporid bei den von der Arbeitsgruppe verwendeten Konzentrationen zum Teil auch langsam inaktivierende  $\text{Na}^+$ -Kanäle (den späten  $\text{Na}^+$ -Strom) (Chattou et al. 2000). Valdivia et al. zeigten 2005 erstmals einen verstärkten späten  $\text{Na}^+$ -Strom im herzinsuffizienten Myokard vom Menschen und vom Hund (Valdivia et al. 2005), und damit eine weitere mögliche Ursache für eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Die Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms durch Ranolazin verminderte eine nachfolgende diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation sowie spontane SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen und verbesserte auf diesem Weg in einer Arbeit an einem chronisch herzinsuffizienten Hundemodell die diastolische Funktion (Undrovins et al. 2010). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten der vorliegenden Arbeit überein, die eine Verbesserung der diastolischen Spannung unter Ranolazin an Papillarmuskeln von CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Mäusen zeigten und der zugrundeliegende Mechanismus deshalb vergleichbar scheint.

Einen weiteren bedeutenden Mechanismus für die Erhöhung der diastolischen Spannung stellt das CaMKII $\delta_c$ -vermittelte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck dar, wie es beim chronischen Vorhofflimmern (Neef et al. 2010) als auch bei der Herzinsuffizienz (Maier et al. 2003, Sossalla et al. 2010a) gezeigt wurde. Die CaMKII $\delta_c$ , die in Expression und Aktivität beim chronischen Vorhofflimmern (Neef et al. 2010, Tessier et al. 1999) als auch bei der Herzinsuffizienz (Kirchhefer et al. 1999) verstärkt ist, wurde in Verbindung mit einer Phosphorylierung des RyR2 gebracht (Wehrens et al. 2004) und führt auf diesem Weg zu einer verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Dieses freigesetzte Kalzium leistet einen wesentlichen Beitrag zur erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern (Vest et al. 2005) und somit zum Anstieg der diastolischen Spannung. Es gibt jedoch auch Berichte, die im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit eine erhaltene Relaxation und so eine unbeeinträchtigte diastolische Funktion beim Vorhofflimmern beobachteten (Schotten et al. 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen hingegen, dass die Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms mit Ranolazin die diastolische Spannung reduziert und so auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols reduziert sein müsste. Diese Annahme kann durch eine bisher unveröffentlichte Arbeit (aus der AG Maier) bestätigt werden, die die Abnahme der spontanen SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen unter Ranolazinexposition zeigte. Sossalla et al. demonstrierten an isolierten ventrikulären Kaninchenmyozyten, dass Ranolazin den ATXII-induzierten, signifikanten  $\text{Na}^+$ -Anstieg in der Zelle während aller Stimulationsfrequenzen hemmen konnte. Ranolazin reduzierte den späten  $\text{Na}^+$ -Strom, die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration als auch die intrazelluläre diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -

#### 4. Diskussion

Konzentration ohne die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude oder den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR zu vermindern. An humanen Muskelstreifen aus herzinsuffizienten Explantaten zeigten sie eine Verbesserung der diastolischen Spannung durch Ranolazin, ohne dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR signifikant verändert wurde (Sossalla et al. 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Verbesserung der diastolischen Dysfunktion unter Ranolazin und stehen im Einklang mit weiteren Publikationen, die in Ratten- und Hundeherzen zeigten, dass die Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms mittels Ranolazin in der Lage ist, die diastolische Dysfunktion auch während Ischämie (Fraser et al. 2006) und Reperfusion (Gralinski et al. 1994) zu verbessern. Auch klinisch gibt es Hinweise auf die verbesserte diastolische Funktion unter Ranolazin: Bereits 1994 zeigten Hayashida et al. in einer Studie von 15 Patienten mit ischämischer Herzerkrankung, dass die intravenöse Applikation von Ranolazin zur Verbesserung der diastolischen Funktion führte (Hayashida et al. 1994). Darüber hinaus wurden kürzlich 22 Patienten Doppler-echokardiographisch untersucht, die seit durchschnittlich zwei Monaten Ranolazin zur antianginösen Therapie einnahmen. Es zeigte sich eine linksventrikuläre Verbesserung sowohl der diastolischen als auch der systolischen Funktion (Figueredo et al. 2011).

Um die Wirkung von Ranolazin auf die diastolische Funktion näher zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit in weiteren Experimenten mit atrialen Muskelstreifen von Patienten im Sinusrhythmus Stress durch die Gabe von Ouabain und Wasserstoffperoxid erzeugt. Muskelstreifen, die vor Ouabainexposition mit Ranolazin behandelt wurden, gingen später in Kontraktur. Das Herzglykosid Ouabain hemmt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und führt so zur  $\text{Na}^+$ -Überladung der Zelle, die konsekutiv (über den NCX) mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung einhergeht. Ein leichter Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration führt eher zu positiv inotropen Effekten (Bers et al. 2003), ein stärkerer Anstieg, wie er in diesem Experiment beabsichtigt war, führt zu Arrhythmien und kontraktile Dysfunktion. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der späte  $\text{Na}^+$ -Strom einen wesentlichen Beitrag zur  $\text{Na}^+$ -Akkumulation in der Zelle leistet, wie es schon durch Vorarbeiten gezeigt wurde (Makielski und Farley 2006, Noble D 2008). Hoyer et al. bestätigten kürzlich die Beobachtung dieser Arbeit, dass der späte  $\text{Na}^+$ -Strom wesentlich zur intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Akkumulation unter Ouabain beiträgt, an isolierten Myozyten des Meerschweins. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe die  $\text{Na}^+$ -Akkumulation sowohl mit KN-93, einem Inhibitor der CaMKII, als auch einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator abmildern (Hoyer et al. 2011). Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Ouabain-induzierte erhöhte zytosolische  $\text{Na}^+$ -Konzentration eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation bewirkt, welche wiederum direkt die CaMKII aktiviert und so eine Ursache für den Anstieg des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms während der Ouabainexposition sein könnte. Diese Interpretation bestätigen vorherige Studien, die Anstiege der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und eine aktivierte CaMKII in Rattenmyozyten unter Herzglykosiden zeigten (Sapia et al. 2010). Auch die CaMKII selbst kann direkt die Funktion kardialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle dahingehend beeinflussen, den späten  $\text{Na}^+$ -Strom zu verstärken (Aiba et al. 2010, Bers und Grandi

#### 4. Diskussion

2009, Maltsev et al. 2008, Wagner et al. 2006).

In den durchgeführten Experimenten mit Wasserstoffperoxid gingen Ranolazin-inkubierte Muskelstreifen signifikant später in Kontraktur als die Kontrollgruppe. Wasserstoffperoxid gehört zu der Gruppe der ROS („Reactive oxygen species“) und bedingt eine zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, die Folge eines Anstiegs der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration ist und über den Rückwärtsmodus des NCX einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bewirkt (Wagner et al. 2003). Wie die Resultate dieser Arbeit demonstrieren, geht diese Störung im Ionenhaushalt der Zelle mit elektrischer Instabilität (Belardinelli et al. 2006a) und einem deutlichen Anstieg der diastolischen Spannung als Zeichen der kontraktile Dysfunktion einher (Zeitzi et al. 2002). Verschiedene Arbeiten stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein: So reduzierte die Inhibition des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms mit Ranolazin die kontraktile Dysfunktion an isolierten ventrikulären Myozyten des Meerschweins sowie den zytosolischen Anstieg von Natrium und Kalzium, der durch Wasserstoffperoxid verursacht wurde (Song et al. 2006). Weitere Vorarbeiten bestätigten die durch Wasserstoffperoxid-induzierte Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms (Ward und Giles 1997, Ma et al. 2005). Auch am isolierten, perfundierten Rattenherz konnte Ranolazin den durch Wasserstoffperoxid erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck reduzieren (Matsumura et al. 1998). Wagner et al. zeigten kürzlich an ventrikulären Myozyten, dass die Wasserstoffperoxid-induzierte Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms die Aktivierung der CaMKII benötigt. So kam es zu einer Reduktion der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Überladung bei Myozyten von CaMKII $\delta$ -Knockout-Mäusen. Auch die Inhibition der CaMKII verlangsamte die Wasserstoffperoxid-induzierte Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms. Ranolazin verzögerte in der vorliegenden Arbeit die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, was darauf schließen lässt, dass die Wasserstoffperoxid-induzierte  $\text{Na}^+$ -Überladung zumindest teilweise über den späten  $\text{Na}^+$ -Strom erzeugt wird (Wagner et al. 2011).

### **4.3 Die kardiale Überexpression der CaMKII $\delta_c$ induziert Herzinsuffizienz**

Obwohl die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse jünger als in bisherigen Studien waren, entwickelten sie im Vergleich zu den Wildtypen einen signifikant erhöhten Herz-/Körpergewicht-Quotienten. Verglichen mit 12 Wochen alten Mäusen, deren Herz-/Körpergewicht über das 2-Fache anstieg (Maier et al. 2003), zeigten die 8 Wochen alten Mäuse einen moderateren Anstieg um etwa das 1,4-Fache. Bereits vor über 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass die CaMKII eine wesentliche Rolle bei der Herzinsuffizienz- bzw. bei der Hypertrophieentwicklung spielt und dabei sowohl vermehrt exprimiert als auch in ihrer Aktivität verstärkt zu sein scheint (Kirchhefer et al. 1999, Hoch et al. 1999). So ist die CaMKII $\delta_c$  in transgenen Mäusen um das 3-Fache in ihrer Aktivität verstärkt (Zhang et al. 2003) und ist damit in einem ähnlich hohen Maße exprimiert, wie es in humanem Myokard bei

#### 4. Diskussion

der Herzinsuffizienz gezeigt wurde (Hoch et al. 1999, Kirchhefer et al. 1999). Um den Einfluss der komplexen Umbauprozesse bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz möglichst abzumildern, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jüngere Mäuse verwendet, als es in früheren Studien (mit einem Alter zwischen 12 und 20 Wochen) der Fall war (Sag et al. 2007, Wagner et al. 2006, Maier et al. 2003).

Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Daten, dass diese frühe Form der Herzinsuffizienz bereits mit einer kontraktilen Dysfunktion einhergeht, wie sie typischerweise bei der Herzinsuffizienz gezeigt wird. So zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine signifikante Reduktion der systolischen Kraftentwicklung, sowie einen Anstieg der diastolischen Spannung der transgenen Papillarmuskelstreifen. Das bestätigt Beobachtungen von Zhang et al., die an 12 Wochen alten isolierten Myozyten CaMKII $\delta_c$ -überexprimierender Mäuse bereits bei basaler Stimulation mit 0,5 Hz eine Reduktion der systolischen Kraftentwicklung demonstrierten (Zhang et al. 2003). Als typisches Korrelat der Herzinsuffizienz gilt ein Verlust der positiven Kraft-Frequenz-Beziehung, des sogenannten Bowditch-Effekts (Mulieri et al. 1992). Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals an Muskelstreifen von 8 Wochen alten CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Mäusen gezeigt werden. Verschiedene Mechanismen liegen der reduzierten Kontraktilität zugrunde, wobei Veränderungen im Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR im Vordergrund stehen (Maier et al. 2003). Um Hinweise auf solche Veränderungen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Post-Pausen-Potenzierungen durchgeführt. Sie repräsentieren die Funktion des SR zur Aufnahme und Wiederabgabe von Kalzium in einer Pause und ergaben in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Abnahme in der Gruppe der CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Mäuse und damit Hinweise auf einen reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR (Bers et al. 1993, Bassani und Bers 1994). Zur näheren Evaluation eines möglichen Ungleichgewichts zwischen der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme durch die SERCA und dem Ca<sup>2+</sup>-Auswärtstransport über den NCX wurden Western Blots durchgeführt. Sie zeigten eine signifikante Verminderung der SERCA-Expression bei unveränderter Expression des NCX. Die negative Kraft-Frequenz-Beziehung in humanem herzinsuffizienten Myokard korreliert eng mit der verminderten SERCA-Expression (Hasenfuss et al. 1994), die auch den Hauptmechanismus für die myokardiale Relaxation darstellt (Inesi 1985, Schatzmann 1989). Die SERCA-Expression korreliert bei der Herzinsuffizienz mit einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme des SR (Hasenfuss et al. 1994, Hasenfuss et al. 1999, Meyer et al. 1995), so dass der diastolische Ca<sup>2+</sup>-Gehalt ansteigt (Beuckelmann et al. 1992), eine Aktivierung der kontraktilen Elemente bewirkt und so eine mögliche Ursache für die diastolische Dysfunktion in Gegenwart einer unveränderten NCX-Expression darstellt. Insgesamt ist die reduzierte kontraktile Funktion der transgenen Mäuse als Ergebnis einer Kombination aus einer verringerten Aktivität der SERCA, einer verstärkten NCX-Funktion und einem verstärkten SR-Ca<sup>2+</sup>-Leck zu sehen (Bers 2001). In der vorliegenden Arbeit ist die Expression des NCX zwar unverändert, der Quotient NCX/SERCA

#### 4. Diskussion

ist im Verhältnis jedoch erhöht. Geht man davon aus, dass die Proteinexpression mit der Transportfunktion korreliert, ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination über das Sarkolemm, verglichen mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR, gesteigert und durch ein verringertes Angebot an zytosolischem Kalzium wird die systolische Aktivierung gehemmt (Hasenfuss et al. 1999). Interessanterweise ist im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen die NCX-Expression bei CaMKII $\delta_c$ -überexprimierenden Mäusen im Alter von 12 Wochen, einem Alter in dem sie eine ausgeprägte Herzinsuffizienz entwickeln, sogar um das Doppelte erhöht (Maier et al. 2003). Neben den typischen Veränderungen in der Proteinexpression bei CaMKII $\delta_c$ -Überexpression wurde auch eine erhöhte spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR durch ein SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck beschrieben (Maier et al. 2003), das einen weiteren Grund für den reduzierten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt darstellen könnte. Überraschenderweise wurde dieses bereits in transgenen Mäusen im Alter von vier Wochen, also noch vor Entstehung einer Herzinsuffizienz, beobachtet (Zhang et al. 2003). Die Inhibition der überexprimierten CaMKII reduzierte die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR auf eine Menge des Wildtyps. Gleiches wurde auch an ventrikulärem Kaninchenmyokard sowie an humanem herzinsuffizienten Myokard gezeigt (Currie et al. 2004, Sossalla et al. 2010a). Die Mehrzahl der Vorarbeiten interpretieren für diesen Zusammenhang eine zugrundeliegende CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR (Maier et al. 2003, Witcher et al. 1991, Hain et al. 1995), die mit einem verstärkten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Leck und verringertem SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in Verbindung gebracht wurde (Ai et al. 2005). Es gibt jedoch auch Arbeiten, die vorschlugen, die CaMKII würde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR inhibieren (Wu Y et al. 2001). So wurde in der letzten Arbeit jedoch vernachlässigt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR zu bestimmen.

#### 4.4 Ranolazin hemmt Arrhythmien in transgenen CaMKII $\delta_c$ -Mäusen

Während des experimentellen Ablaufs traten nur in den Papillarmuskeln CaMKII $\delta_c$ -überexprimierender Mäuse Arrhythmien auf, die zuvor nicht mit Ranolazin behandelt wurden und die sich alle in kurzer Zeit nach Ranolazinexposition beenden ließen. Bei den Wildtypen kam es hingegen zu keiner Arrhythmieentstehung.

Eine Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms wurde als Trigger für das Auftreten von Arrhythmien beschrieben. So kann dieser zum einen über die Verlängerung der Aktionspotentialdauer zu EADs, aber auch über eine  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols zu DADs führen (Maltsev et al. 2007, Song et al. 2008). Darüber hinaus ist die CaMKII selbst in der Lage über die Phosphorylierung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle ihre Funktion zu beeinflussen (Aiba et al. 2010, Wagner et al. 2006). Die Inhibition der CaMKII $\delta_c$  reduzierte in transgenen Mäusen das Auftreten von Arrhythmien durch eine Reduktion der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR (Sag et al. 2009). Die Regulation der  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch die CaMKII ist auch von klinischer Bedeutung, da Veränderungen in der Steuerung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle ursächlich für auftretende Arrhythmien bei der Herzinsuffizienz sein können, die häufig zum

#### 4. Diskussion

plötzlichen Herztod führen (Tomaselli und Zipes 2004).

Die CaMKII $\delta_c$ -Überexpression in Mäuseherzen geht mit einer schweren Herzinsuffizienz einher (Maier et al. 2003), die gehäuft mit dem Auftreten von Arrhythmien in vivo assoziiert ist (Wagner et al. 2006). Auch wenn die Anzahl der beobachteten Arrhythmien in der vorliegenden Arbeit relativ gering war, können die Ergebnisse durch Vorarbeiten bestätigt werden, die ein gehäuftes Auftreten von CaMKII $\delta_c$ -vermittelten proarrhythmischen Ereignissen, wie EADs und DADs, in Tiermodellen sowohl unter basalen Versuchsbedingungen (Anderson et al. 1998, Wu Y et al. 2002) als auch nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation zeigten (Sag et al. 2009). Dabei wurde dem SR-Ca $^{2+}$ -Leck eine bedeutende Rolle in der Arrhythmieentstehung zugewiesen (Sag et al. 2009, Ai et al. 2005). In Vorarbeiten verminderte die Inhibition der CaMKII das Auftreten von EADs und Arrhythmien in verschiedenen tierexperimentellen Studien bei kardialer Hypertrophie, Kardiomyopathie, nach Azidose und bei der CaMKII-induzierten Herzinsuffizienz (Wu Y et al. 2002, Khoo et al. 2006, Said et al. 2008, Sag et al. 2009). Das ließ Sag et al. vermuten, dass mit der CaMKII-Inhibition auch die Effekte der CaMKII auf das SR-Ca $^{2+}$ -Leck und möglicherweise auch auf den späten Na $^{+}$ -Strom (Wagner et al. 2006) reduziert sein könnten, die beide eine potentielle Grundlage für die Entwicklung von DADs darstellen (Sag et al. 2009). So führt eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 zur verstärkten, spontanen diastolischen Ca $^{2+}$ -Freisetzung ins Zytosol (Wehrens et al. 2004, Ai et al. 2005), die zu einem transienten Einwärtsstrom führen kann. Erhöhte diastolische Ca $^{2+}$ -Konzentrationen im Zytosol können jedoch auch über einen verstärkten späten Na $^{+}$ -Strom induziert werden, der durch die CaMKII reguliert wird (Wagner et al. 2006) und über einen Anstieg der intrazellulären Na $^{+}$ -Konzentration sekundär zu einer Ca $^{2+}$ -Überladung führt. Das scheint der wahrscheinlichste Mechanismus für das Auftreten der Arrhythmien in der vorliegenden Arbeit zu sein, die unter Ranolazinexposition nicht auftraten sowie nach Ranolazingabe sistierten. So bewirkt die Inhibition des späten Na $^{+}$ -Stroms eine Reduktion der Na $^{+}$ -abhängigen diastolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration und verringert dadurch die Wahrscheinlichkeit für spontane Ca $^{2+}$ -Freisetzungen und damit den Wegbereiter für die Entstehung von DADs und getriggelter Arrhythmie (Clusin 2003).

Die antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin kommt mit größter Wahrscheinlichkeit über die Inhibition des späten Na $^{+}$ -Stroms und des I $_{Kr}$  („delayed rectifier potassium current“) zustande, der im therapeutischen Anwendungsbereich von Ranolazin (2-6  $\mu$ M) mit einer IC $_{50}$  von 11,5  $\mu$ M mit inhibiert wird (Antzelevitch et al. 2004). Die alleinige Hemmung des späten Na $^{+}$ -Stroms verkürzt die Dauer des ventrikulären Aktionspotentials, die isolierte I $_{Kr}$ -Hemmung verlängert sie (Song et al. 2004). In Situationen, in denen der späte Na $^{+}$ -Strom verstärkt ist, überwiegt jedoch die hemmende Wirkung von Ranolazin auf den späten Na $^{+}$ -Strom, gleicht eine Reduktion des K $^{+}$ -Stroms aus und verkürzt so das Aktionspotential (Song et al. 2004). Die vorliegenden Ergebnisse sowie weitere experimentelle Arbeiten an Tiermodellen bekräftigen die antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin. So verhinderte



## 4. Diskussion

die Inhibition des späten Na<sup>+</sup>-Stroms in einem chronischen Herzinsuffizienzmodell das Auftreten von EADs in Kardiomyozyten vom Menschen und vom Hund (Maltsev et al. 1998, Maltsev et al. 2007, Undrovinas et al. 1999). Weiter reduzierte Ranolazin ventrikuläre Arrhythmien in einem Rattenmodell, die durch Ischämie und Reperfusion induziert wurden (Dhalla et al. 2009). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit unterdrückte Ranolazin in isolierten, perfundierten Rattenherzen frequenzstimuliertes bzw. EAD-induziertes Kammerflimmern (Morita et al. 2011). Diese experimentellen Beobachtungen können durch eine große klinische Studie bestätigt werden, in der Ranolazin das Auftreten von Arrhythmien bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant reduzieren konnte (Scirica et al. 2007).

### 4.5 Klinischer Ausblick und Relevanz der vorliegenden Arbeit

Seit der Entdeckung des späten Na<sup>+</sup>-Stroms in humanen Kardiomyozyten vor über 10 Jahren (Maltsev et al. 1998) gibt es immer mehr experimentelle und klinische Daten, die Ranolazin, als Inhibitor des späten Na<sup>+</sup>-Stroms, als neue Behandlungsoption bei kardialen und extrakardialen Erkrankungen vorschlagen (Antzelevitch und Burashnikov 2009, Sossalla et al. 2011, Morrow et al. 2009). In der Behandlung der Angina pectoris ist Ranolazin bereits etabliert. Doch welche Krankheitsbilder könnten noch von der Behandlung mit Ranolazin profitieren?

Arrhythmien stellen eine häufige Todesursache bei herzinsuffizienten Patienten dar, daher ist die experimentelle Untersuchung der Arrhythmogenese bei der Herzinsuffizienz von besonderer Bedeutung. Die antiarrhythmischen Effekte von Ranolazin konnten bisher in der vorliegenden Arbeit und in weiteren experimentellen Vorarbeiten sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt werden (siehe Kapitel 4.4). Untersuchungen am Menschen hierzu sind jedoch bisher rar. In der MERLIN-TIMI-36-Studie wurden 6560 Patienten untersucht, die nach stationärer Aufnahme mit akutem Koronarsyndrom zusätzlich zur Standardtherapie randomisiert Ranolazin oder ein Placebo erhielten. Die Behandlung mit Ranolazin resultierte bei diesen Patienten unter anderem in einem signifikant geringeren Auftreten von Arrhythmien (Scirica et al. 2007). Eine ähnliche Reduktion ventrikulärer Tachykardien unter Ranolazin wurde auch in verschiedenen Hochrisikogruppen gesehen, die sowohl Patienten mit einer reduzierten Ejektionsfraktion als auch herzinsuffiziente Patienten umfassten. Auch wenn die MERLIN-TIMI-36-Studie erste Erfolge in der antiarrhythmischen Wirkungsweise von Ranolazin hervorbringt, werden weitere klinische Studien benötigt, die im Besonderen die Rolle von Ranolazin als antiarrhythmisches Mittel evaluieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen Ranolazin darüber hinaus eine bedeutende Wirkung zur Verbesserung der diastolischen Dysfunktion am Ventrikel als auch am Vorhof zu. Die Daten wurden zwar an einem tierexperimentellen Modell der Herzinsuffizienz gewonnen, doch sind sie im

#### 4. Diskussion

Ausblick auf die klinische Situation der diastolischen Herzinsuffizienz von besonderer Bedeutung. Weltweit sind über 23 Millionen Menschen von der Herzinsuffizienz betroffen, mit steigender Tendenz (Bui et al. 2011). Therapeutische Ansätze unterscheiden die beiden Formen der Herzinsuffizienz jedoch nicht. Während sich die Prognose der HFrEF in den letzten drei Jahrzehnten fortschreitend verbesserte, blieb die Prognose der HFpEF über die gleiche Zeitspanne unverändert (Owan et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und andere experimentelle Studien (siehe Kapitel 4.2), sehen Ranolazin als potentiellen Wirkstoff zur Behandlung der HFpEF. Bisher gab es jedoch noch keine klinischen Studien hierzu. Daher wurde kürzlich die RALI-DHF-Studie („Ranolazine in Diastolic Heart Failure“) initiiert, die die Wirkung von Ranolazin nach intravenöser Applikation mit anschließender 13-tägiger oraler Einnahme bei Patienten mit schwerer diastolischer Herzinsuffizienz beleuchten soll. Erste Ergebnisse werden noch im Jahr 2011 erwartet (Jacobshagen et al. 2011). Darüber hinaus werden zur Zeit zwei klinische Studien bei Patienten mit Vorhofflimmern initiiert, die die Effekte von Ranolazin im Vergleich zu einem Placebo beim Vorhofflimmern untersuchen sollen und von Göttingen mit koordiniert werden.

## 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren rückt die Rolle des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms bei der Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen am Herzen immer mehr in den Vordergrund. Daher gewinnt dessen Inhibition im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt bei Erkrankungen, bei denen ein verstärkter später  $\text{Na}^+$ -Strom gezeigt werden konnte, wie der Herzinsuffizienz oder dem Vorhofflimmern, an Bedeutung. Es wird angenommen, dass eine Verstärkung des späten  $\text{Na}^+$ -Stroms zu einer  $\text{Na}^+$ -Akkumulation im Zytosol führt, die eine Umkehr der Transportrichtung des NCX bewirkt und so zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und zur kontraktile Dysfunktion führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Ranolazin bei der  $\text{CaMKII}\delta_c$ -induzierten Herzinsuffizienz im Mausmodell und an humanem Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Durchgeführte Muskelstreifenversuche mit Ranolazin in therapeutischen Konzentrationen ( $\sim 6 \mu\text{M}$ ) zeigten eine deutliche Reduktion der diastolischen Spannung, sowohl an den herzinsuffizienten Papillarmuskeln als auch an humanen Vorhofmuskelstreifen von Vorhofflimmergewebe. Auch bei der Erzeugung von Stress durch Ouabain und Wasserstoffperoxid konnte Ranolazin die diastolische Funktion deutlich verbessern. Dabei zeigte sich auf die systolische Kraftentwicklung am Ventrikel lediglich ein leicht negativ inotroper Effekt. Ein weiterer Teil dieser Arbeit umfasste die Untersuchung der Herzinsuffizienz im frühen Stadium ( $8 \pm 1$  Wochen) an Mäuseherzen, die durch Überexpression der  $\text{CaMKII}\delta_c$  erzeugt wurde. Bereits in diesem Alter zeigte sich ein signifikant erhöhter Herz-/Körpergewicht-Quotient in transgenen Mäusen, wie es zuvor nur bei älteren Mäusen gezeigt wurde. Als typisches Korrelat der Herzinsuffizienz ergaben Western Blots eine signifikante Reduktion der SERCA, die mit einer Störung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase einhergeht und eine Möglichkeit für die aufgetretenen Arrhythmien in transgenen Papillarmuskeln darstellt, die während der Experimente spontan auftraten. Diese konnten nach Ranolazinexposition alle beendet werden und weisen Ranolazin eine antiarrhythmische Wirkung zu.

Im Ausblick auf die aktuellen klinischen Therapiemöglichkeiten bei der HFpEF, für die es keinen empfohlenen Wirkstoff gibt, und dem Vorhofflimmern, dessen Therapie immer noch sehr nebenwirkungsreich ist, scheinen diese Ergebnisse von besonderer Bedeutung. Weitere klinische Studien erfolgen aktuell, um einen potentiellen Einsatz für diese Krankheitsbilder zu evaluieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res* 97, 1314-1322.

Aiba T, Hesketh GG, Liu T, Carlisle R, Villa-Abrille MC, O'Rourke B, Akar FG, Tomaselli GF (2010): Na<sup>+</sup> channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 85, 454-463.

Allen DG, Blinks JR (1978): Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature* 273, 509-513.

Allen DG, Kurihara S (1982): The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 327, 79-94.

Allen DG, Jewell BR, Wood EH (1976): Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. *J Physiol* 254, 1-17.

Anderson ME (2007): Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovasc Res* 73, 657-666.

Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ (1998): KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 996-1006.

Antzelevitch C, Burashnikov A (2009): Atrial-selective sodium channel block as a novel strategy for the management of atrial fibrillation. *J Electrocardiol* 42, 543-548.

Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G (2004): Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110, 904-910.

Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW (2003): Increased Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange activity is the cause of increased [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovasc Res* 57, 1015-1024.

Bassani RA, Bers DM (1994): Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 26, 1335-1347.

Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H (2006a): Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart* 92, Suppl 4, iv6-14.

Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H (2006b): The mechanism of ranolazine action to reduce ischemia-induced diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 8, Suppl A, A10-13.

Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D (1998): Impact of atrial fibrillation on the risk of death: The Framingham Heart Study. *Circulation* 98, 946-952.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bers DM (1985): Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am J Physiol* 248, H366–381.
- Bers DM: *Excitation–Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Boston 2001.
- Bers DM (2002): Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- Bers DM, Grandi E (2009): Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 180-187.
- Bers DM, Barry WH, Despa S (2003): Intracellular Na regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 57, 897-912.
- Bers DM, Bassani RA, Bassani JW, Baudet S, Hryshko LV (1993): Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J Mol Cell Cardiol* 25, 1047-1057.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-1055.
- Blinks JR, Koch-Weser J (1961): Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 134, 373-389.
- Bowditch HP (1871): Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sachs Ges Wiss* 23, 652-689.
- Braun AP, Schulman H (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 57, 417-445.
- Brodde OE (1991): Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43, 203-242.
- Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011): Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8, 30-41.
- Burashnikov A, Di Diego JM, Zygmunt AC, Belardinelli L, Antzelevitch C (2007): Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine. *Circulation* 116, 1449-1457.
- Carson PE, Johnson GR, Dunkman WB, Fletcher RD, Farrell L, Cohn JN (1993): The influence of atrial fibrillation on prognosis in mild to moderate heart failure. The V-HeFT Studies. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 87 (6 Suppl), VI102-VI110.
- Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley F, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA, et al. (2004); MARISA Investigators: Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol* 43, 1375–1382.
- Chattou S, Coulombe A, Diacono J, Le Grand B, John G, Feuvray D (2000): Slowly inactivating component of sodium current in ventricular myocytes is decreased by diabetes and partially inhibited by known Na(+)-H(+)Exchange blockers. *J Mol Cell Cardiol* 32, 1181-1192.
- Clarke B, Wyatt KM, McCormack JG (1996): Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in

## 6. Literaturverzeichnis

perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 28, 341-350.

Clusin WT (2003): Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40, 337-375.

Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL (2004): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II  $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J* 377, 357-366.

Deedwania PC, Singh BN, Ellenbogen K, Fisher S, Fletcher R, Singh SN (1998): Spontaneous conversion and maintenance of sinus rhythm by amiodarone in patients with heart failure and atrial fibrillation: observations from the veterans affairs congestive heart failure survival trial of antiarrhythmic therapy (CHF-STAT). *Circulation* 98, 2574-2579.

Dhalla AK, Wang WQ, Dow J, Shryock JC, Belardinelli L, Bhandari A, Kloner RA (2009): Ranolazine, an antianginal agent, markedly reduces ventricular arrhythmias induced by ischemia and ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1923-1929.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, et al. (2008): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 29, 2388-2442.

Edman CF, Schulman H (1994): Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1221, 89-101.

Ellison KE, Stevenson WG, Sweeney MO, Epstein LM, Maisel WH (2003): Management of arrhythmias in heart failure. *Congest Heart Fail* 9, 91-99.

Endoh M, Blinks JR (1988): Actions of sympathomimetic amines on the Ca<sup>2+</sup> transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca<sup>2+</sup> mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res* 62, 247-265.

Fabiato A (1980): Sarcomere length dependence of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells demonstrated by differential microspectrophotometry with Arsenazo III. *J Gen Physiol* 76, 15a (Abstract).

Fabiato A, Fabiato F (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249, 469-95.

Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG (1995): Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 155, 469-73.

Feldman MD, Gwathmey JK, Phillips P, Schoen F, Morgan JP (1988): Reversal of the force-frequency relationship in working myocardium from patients with end-stage heart failure. *J Appl Cardiol* 3, 273-283.

Figueredo VM, Pressman GS, Romero-Corral A, Murdock E, Holderbach P, Morris DL (2011): Improvement in left ventricular systolic and diastolic performance during ranolazine treatment in patients with stable angina. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16, 168-172.

## 6. Literaturverzeichnis

Frank O (1895): Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32, 370-447.

Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS (2006): Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 41, 1031–1038.

Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, et al. (2006): ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation—executive summary: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the European society of cardiology committee for practice guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation). *J Am Coll Cardiol* 48, 854–906.

Gaasch WH, Zile MR (2004): Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Annu Rev Med* 55, 373–394.

Gralinski MR, Black SC, Kilgore KS, Chou AY, McCormack JG, Lucchesi BR (1994): Cardioprotective effects of ranolazine (RS-43285) in the isolated perfused rabbit heart. *Cardiovasc Res* 28, 1231-1237.

Gwathmey JK, Corpelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldmann MD, Grossman W, Morgan JP (1987): Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70 -76.

Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995): Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem* 270, 2074-2081.

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75, 434-442.

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99, 641-648.

Hayashida W, van Eyll C, Rousseau MF, Pouleur H (1994): Effects of ranolazine on left ventricular regional diastolic function in patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 8, 741-747.

Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P (1999): Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 84, 713-721.

Hohnloser SH, Singh BN. Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs (1995): Definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors and clinical implications. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6, 920–36.

Holubarsch C, Ruf T, Goldstein DJ, Ashton RC, Nickl W, Pieske B, Pioch K, Lüdemann J, Wiesner S, Hasenfuss G, et al. (1996): Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels. *Circulation* 94, 683-689.

Hoppe UC, Erdmann E (2010): [Heart failure update 2010 and current ESC guidelines]. *Herz* 35, 535-540.

Hoyer K, Song Y, Wang D, Phan D, Balschi J, Ingwall JS, Belardinelli L, Shryock J (2011): Reducing

## 6. Literaturverzeichnis

the late sodium current improves cardiac function during sodium pump inhibition by ouabain. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 513-523.

Huxley HE (1969): The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.

Inesi G (1985): Mechanism of calcium transport. *Annu Rev Physiol* 47, 573-601.

Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA (1995): Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433-442.

Jacobshagen C, Belardinelli L, Hasenfuss G, Maier LS (2011): Ranolazine for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction: Background, aims, and design of the RALI-DHF study. *Clin Cardiol* 34, 426-432.

Ju YK, Saint DA, Gage PW (1996): Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 497 (Pt2), 337-347.

Khoo MS, Li J, Singh MV, Yang Y, Kannankeril P, Wu Y, Grueter CE, Guan X, Oddis CV, Zhang R, et al. (2006): Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase II in calcineurin cardiomyopathy. *Circulation* 114, 1352-1359.

Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J (1999): Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 42, 254-261.

Koch-Weser J, Blinks JR (1963): The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacol Rev* 15, 601-652.

Komamura K, Shannon RP, Ihara I, Shen YT, Mirsky I, Bishop S, Vatner ST (1993): Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. *Am J Physiol* 265, H1119-1131.

Lai Y, Nairn AC, Greengard P (1986): Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4253-4257.

Lee DS, Gona P, Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, Tu JV, Levy D (2009): Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. *Circulation* 119, 3070-3077.

Lee KS (1987): Potentiation of the calcium-channel currents if internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3941-3945.

Lou LL, Lloyd SJ, Schulman H (1986): Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 83, 9497-9501.

Louis AA, Manousos IR, Coletta AP, Clark AL, Cleland JG (2002): Clinical trials update: The Heart Protection Study, IONA, CARISA, ENRICHED, ACUTE, ALIVE, MADIT II and REMATCH. Impact Of Nicorandil on Angina. Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina. Enhancing Recovery In Coronary Heart Disease patients. Assessment of Cardioversion Using Transoesophageal Echocardiography. Azimilide post-Infarct survival Evaluation. Randomised Evaluation of Mechanical Assistance for Treatment of Chronic Heart failure. *Eur J Heart Fail* 4, 111-116.



## 6. Literaturverzeichnis

- Ma JH, Luo AT, Zhang PH (2005): Effect of hydrogen peroxide on persistent sodium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 26, 828-834.
- Maier LS, Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939.
- Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 92, 904-911.
- Makielski JC, Farley AL (2006): Na<sup>(+)</sup> current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17, Suppl 1, S15-20.
- Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI (1998): Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* 98, 2545-2552.
- Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI (2007): Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail* 9, 219-227.
- Maltsev VA, Reznikov V, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A (2008): Modulation of late sodium current by Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1597-1608.
- Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A (2009): Late Na<sup>+</sup> current produced by human cardiac Na<sup>+</sup> channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit. *J Physiol Sci* 59, 217-225.
- Matsumura H, Hara A, Hashizume H, Maruyama K, Abiko Y (1998): Protective effects of ranolazine, a novel anti-ischemic drug, on the hydrogen peroxide-induced derangements in isolated, perfused rat heart: comparison with dichloroacetate. *Jpn J Pharmacol* 77, 31-39.
- McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD (1996): Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation* 93, 135-142.
- Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309.
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778-784.
- Middlekauff HR, Stevenson WG, Stevenson LW (1991): Prognostic significance of atrial fibrillation in advanced heart failure. A study of 390 patients. *Circulation* 84, 40-48.
- Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK (1990): Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 81 (2 Suppl) III21-32.
- Morita N, Lee JH, Xie Y, Sovari A, Qu Z, Weiss JN, Karaqueuzian HS (2011): Suppression of re-entrant and multifocal ventricular fibrillation by the late sodium current blocker ranolazine. *J Am Coll Cardiol* 57, 366-375.

## 6. Literaturverzeichnis

Morrow DA, Scirica BM, Chaitman BR, McGuire DK, Murphy SA, Karwatowska-Prokopczuk E, McGabe CH, Braunwald E; MERLIN-TIMI 36 Investigators (2009): Evaluation of the glycometabolic effects of ranolazine in patients with and without diabetes mellitus in the MERLIN-TIMI 36 randomized controlled trial. *Circulation* 119, 2032-2039.

Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR (1989): Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65, 1441-1449.

Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allem PD, Alpert NR (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85, 1743 -1750.

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca<sup>2+</sup> leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 106, 1134-1144.

Noble D (2008): Computational models of the heart and their use in assessing the actions of drugs. *J Pharmacol Sci* 107, 107-117.

Noble D, Noble PJ (2006): Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium–calcium overload. *Heart* 92, Suppl 4, iv1-iv5.

Office for National Statistics. Key health statistics for general practice. The Stationery Office, London 2000.

Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM (2006): Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 355, 251-259.

Pepine CJ, Wolff AA (1999): A controlled trial with a novel anti-ischemic agent, ranolazine, in chronic stable angina pectoris that is responsive to conventional antianginal agents. Ranolazine Study Group. *Am J Cardiol* 84, 46–50.

Pieske B, Hasenfuss G, Holubarsch C, Schwinger R, Böhm N, Just H (1992): Alterations of the force-frequency relationship in the failing human heart depend on the underlying cardiac disease. *Basic Res Cardiol* 87, Suppl 1, 213-212.

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169-1178.

Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G (1996): Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> handling. *J Clin Invest* 98, 764-776.

Pieske B, Maier LS, Schmidt-Schweda S (2002a): Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> load in human heart failure. *Basic Res Cardiol* 97, Suppl 1, I63-71.

Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S (2002b): Rate dependence of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* 106, 447-453.

Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S (1996): High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 93, 120-128.

## 6. Literaturverzeichnis

- Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001): Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res.* 88, 1159-1167.
- Rossmann EI, Petre RE, Chaudhary KW, Piacento V 3<sup>rd</sup>, Janssen PM, Gaughan JP, Houser SR, Marquies KB (2004): Abnormal frequency-dependent responses represent the pathophysiologic signature of contractile failure in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36, 33-42.
- Sabbah HN, Chandler MP, Mishima T, Suzuki G, Chaudhry P, Nass O, Biesiadecki BJ, Blackburn B, Wolff A, Stanley WC (2002): Ranolazine, a partial fatty acid oxidation (pFOX) inhibitor, improves left ventricular function in dogs with chronic heart failure. *J Card Fail* 8, 416-422.
- Sag CM, Dybkova N, Neef S, Maier LS (2007): Effects on recovery during acidosis in cardiac myocytes overexpressing CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 43, 696-709.
- Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, et al. (2009): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail* 2, 664-675.
- Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, et al. (2008): Increased intracellular Ca<sup>2+</sup> and SR Ca<sup>2+</sup> load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1669-1683.
- Sapia L, Palomeque J, Mattiazzi A, Petroff MV (2010): Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49, 459-468.
- Schatzmann HJ (1989): The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Physiol* 51, 473-485.
- Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M (2002): Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 53, 192-201.
- Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E (1994): The failing human heart is unable to use the Frank-Starling-mechanism. *Circ Res* 74, 959-969.
- Schwinger RH, Wang J, Frank K, Müller-Ehmsen J, Brixius K, McDonough AA, Erdmann E (1999): Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity but unchanged Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99, 2105-2112.
- Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR (1986): Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* 261, 8581-8584.
- Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Molhoek P, Verheugt FW, Gersh BJ, McCabe CH, et al. (2007): Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial. *Circulation* 116, 1647-1652.

## 6. Literaturverzeichnis

- Song Y, Shryock JC, Wu L, Belardinelli L (2004): Antagonism by ranolazine of the pro-arrhythmic effects of increasing late INa in guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 44, 192–199.
- Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L (2006): Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 214-222.
- Song Y, Shryock JC, Belardinelli L (2008): An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2031-2039.
- Sossalla S, Wagner S, Rasenack ECL, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L, et al. (2008): Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts – role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45, 32-43.
- Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, et al. (2010a): Inhibition of elevated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res* 107, 1150-1161.
- Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, et al. (2010b): Altered Na<sup>+</sup> currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *J Am Coll Cardiol* 55, 2330-2342.
- Sossalla S, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann WH, Jacobshagen C, Wagner S, Maier LS (2011): Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII $\delta$ (C) can be reversed by inhibition of late Na<sup>(+)</sup> current. *Basic Res Cardiol* 106, 263-272.
- Starling EH: The linacre lecture on the law of the heart. Longmans, Green and Co. London 1918.
- Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 095 vom 06.03.2008: Herzinsuffizienz häufigster Grund für einen Krankenhausaufenthalt in 2006. Fachserie 12, Reihe 6.2.1 und 6.2.2. Wiesbaden 2008.
- Stewart S, Murphy NF, Walker A, McGuire A, McMurray JJ (2004): Cost of an emerging epidemic: an economic analysis of atrial fibrillation in the UK. *Heart* 90, 286-292.
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75, 443-453.
- Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, Marsh JD, Izumo S (1992): Expression of dihydropyridine receptor (Ca<sup>2+</sup> channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 90, 927-935.
- Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN (1999): Regulation of the transient outward K<sup>(+)</sup> current by Ca<sup>(2+)</sup>/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 85, 810-819.
- Tomaselli GF, Zipes DP (2004): What causes sudden death in heart failure? *Circ Res* 95, 754-763.

## 6. Literaturverzeichnis

Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC (1992): Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ Res* 71, 1231-1241.

Undrovinas AI, Maltsev VA, Sabbah HN (1999): Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci* 55, 494-505.

Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN (2006): Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17, Suppl 1, 169-177.

Undrovinas NA, Maltsev VA, Belardinelli L, Sabbah HN, Undrovinas A (2010): Late sodium current contributes to diastolic cell Ca<sup>2+</sup> accumulation in chronic heart failure. *J Physiol Sci* 60, 245-257.

Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, Makielski JC (2005): Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 475– 83.

Van Wagoner DR (2003): Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 26, 7 (Pt2), 1572-1575.

Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR (2005): Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation* 111, 2025–2032.

Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske B, Isenberg G, Hasenfuss G, et al. (2003): Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res* 60, 404-412.

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, et al. (2006): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3128.

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi ME, Bers DM, Backs J, et al. (2011): Reactive oxygen species-activated Ca/Calmodulin Kinase II $\delta$  is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 108, 555-565.

Ward CA, Giles WR (1997): Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 500, 631-642.

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70.

Wier WG, Yue DT (1986): Intracellular calcium transients underlying the short-term force-interval relationship in ferret ventricular myocardium. *J Physiol* 376, 507-530.

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR (1991): Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266, 11144-11152.

Wu J, Corr PB (1994): Palmitoyl carnitine modifies sodium currents and induces transient inward current in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 266, H1034-1046.

Wu L, Shryock JC, Song Y, Li Y, Antzelevitch C, Belardinelli L (2004): Antiarrhythmic effects of

## 6. Literaturverzeichnis

ranolazine in a guinea pig in vitro model of long-QT syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 599-605.

Wu L, Shryock J, Song Y, Belardinelli L (2006): An increase in late sodium current potentiates the proarrhythmic activities of low-risk QT-prolonging drugs in female rabbit hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 718-726.

Wu Y, Colbran RJ, Anderson ME (2001): Calmodulin kinase is a molecular switch for cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2877-2881.

Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, et al. (2002): Calmodulin Kinase II and Arrhythmias in a Mouse Model of Cardiac Hypertrophy. *Circulation* 106, 1288-1293.

Xie LH, Weiss JN (2009): Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H997–1002.

Yagi T, Pu J, Chandra P, Hara M, Danilo P Jr, Rosen MR, Boyden PA (2002): Density and function of inward currents in right atrial cells from chronically fibrillating canine atria. *Cardiovasc Res* 54, 405-415.

Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kögler H, Möller K, Hasenfuss G, Janssen PM (2002): Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res* 90, 988–995.

Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH (2003): The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 92, 912-919.

Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH (2004): Diastolic heart failure – abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350, 1953–1959.

Zipes DP (2003): Mechanisms of clinical arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol* 26, 1778-1792.

## 7. Publikationen zum Thema dieser Promotionsarbeit

Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, **Maurer U**, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS (2010): Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *J Am Coll Cardiol* 55, 2330-2342.

Sossalla S, **Maurer U**, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann WH, Jacobshagen C, Wagner S, Maier LS (2011): Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII $\delta$ (C) can be reversed by inhibition of late Na(+) current. *Basic Res Cardiol* 106, 263-272.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Lars Maier für das Überlassen dieses interessanten und klinisch relevanten Dissertationsthemas sowie seine Bereitschaft, mir einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu ermöglichen und mich zu fördern.

Ganz besonders möchte ich Dr. Samuel Sossalla für die hervorragende Betreuung, seine stets motivierende Art und wissenschaftliche Begeisterung danken, die mich auch in schwierigeren Zeiten anspornte. Auch möchte ich mich für die stetige Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen bedanken.

Dr. Hanna Schotola danke ich ganz herzlich für die Anleitung in der Mäusepräparation, die zu den erfolgreichen Experimenten dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Herrn Timo Schulte danke ich für die mir zur Verfügung gestellten Mäuse und die Organisation der Zucht.

An Thomas Sowa vielen Dank für die Anleitungen im Labor und die Durchsicht des Methodenteils.

Ich bedanke mich auch bei allen nicht genannten Mitgliedern und Doktoranden des Labors, die mich mit ihrer Hilfe unterstützt und stets zur guten Stimmung im Labor beigetragen haben.

Den Ärzten der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen unter Prof. Dr. F. A. Schöndube danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die Förderung meiner Arbeit im Rahmen des „Gö4med“ Stipendienprogramms im Sommersemester 2009.

Vielen Dank an Christian, der mir stets bei Fragen zur Textverarbeitung zur Seite stand und mich wesentlich in der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt hat.



## Lebenslauf

Am 17.05.1985 wurde ich, Ulrike Kerstin Maurer, als zweites Kind meiner Eltern Dr. rer. nat. Helmut Maurer und Sigrid Maurer (geb. Fischer) in Karlsruhe geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Colomiers, Frankreich (1991-1992) und in Karlsruhe (1992-1995), wechselte ich 1995 auf das Gymnasium in Karlsruhe und beendete dieses 2004 erfolgreich mit dem Erlangen der allgemeinen Hochschulreife. Anschließend verbrachte ich sieben Monate als Au-Pair in Auckland, Neuseeland, bevor ich im Sommersemester 2005 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen begann. Im April 2007 schloss ich das vorklinische Studium mit dem Physikum ab. Famulaturen leistete ich in den Bereichen Anästhesie, Gynäkologie, Pädiatrie sowie der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (München; Karlsruhe; Zams, Österreich; Göttingen) und in einem kleinen, allgemeinen Krankenhaus im ländlichen Tansania ab. Das Wintersemester 2008/2009 nutzte ich als Freisemester für den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende und am Shaare Zedek Hospital Jerusalem in Israel (Chirurgie), St. Martini Krankenhaus Duderstadt (Innere Medizin) sowie am Ostschweizer Kinderspital in St. Gallen in der Schweiz (Pädiatrie). Im Oktober 2011 schloss ich mein Studium mit dem erfolgreichen Bestehen des Staatsexamens ab.