

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

**Die Rolle des späten Natriumstroms (late  $I_{Na}$ ) bei  
Druck-induzierter Hypertrophie und bei  
Herzinsuffizienz**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

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

vorgelegt von

Nico Horst Hartmann

aus

Fulda

**Göttingen 2014**

**Dekan:**

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichterstatter:**

PD Dr. med. S. T. Sossalla

**II. Berichterstatterin:**

Prof. Dr. med. D. Katschinski

**III. Berichterstatter:**

Prof. Dr. med. M. Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 31. März 2015

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Kardiomyozyt .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Die Ultrastruktur des Kardiomyozyten .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Elektromechanische Kopplung.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Kontraktion / Systole .....	4
1.3.2 Relaxation / Diastole .....	6
1.3.3 Frank-Starling-Mechanismus.....	7
1.3.4 Kraft-Frequenz-Beziehung .....	7
1.3.5 Adrenerge Stimulation.....	8
<b>1.4 Herzhypertrophie .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Herzrhythmusstörungen.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Der sarkolemmale Natriumkanal .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 Aufbau des Natriumkanals .....	13
1.6.2 Regulation des Natriumkanals.....	14
<b>1.7 Der späte Natriumstrom (late <math>I_{Na}</math>) .....</b>	<b>15</b>
1.7.1 Ranolazin - Inhibitor des late $I_{Na}$ .....	16
<b>1.8 Die <math>Ca^{2+}</math>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II .....</b>	<b>17</b>
1.8.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII .....	18
1.8.2 Funktion der CaMKII .....	19
1.8.3 Inaktivierung und pharmakologische Inhibierung der CaMKII .....	20

<b>1.9 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Generierung der verwendeten Zellen.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Transversale aortale Konstriktion (TAC).....	22
2.1.2 Transthorakale Echokardiographie.....	24
2.1.3 Isolation der Kardiomyozyten .....	24
<b>2.2 Die Patch-Clamp-Technik .....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Elektrophysiologische Grundlagen .....	27
2.2.2 Das <i>Patch-Clamp</i> -Setup.....	29
2.2.3 Versuchsdurchführung .....	31
2.2.4 Messung des späten Natriumstroms (late $I_{Na}$ ) .....	34
2.2.5 Messung von Aktionspotentialen (APs).....	36
2.2.5.1 Auswertung der APs .....	38
2.2.5.2 AP-Kenngrößen .....	38
<b>2.3 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen .....</b>	<b>39</b>
2.3.1 Herstellung des SDS-Polyarylamid-Gels .....	41
2.3.2 SDS-Polyarylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und elektrophoretischer Transfer.....	42
2.3.3 Anfärben der Membran mit Ponceau-S .....	43
2.3.4 Immunovisualisation.....	44
<b>2.4 Pharmakologische Substanzen.....</b>	<b>45</b>
2.4.1 Ranolazin .....	46

---

2.4.2	Tetrodotoxin (TTX) .....	46
2.4.3	Isoproterenol (DL-Isoproterenol-hydrochlorid) .....	46
2.4.4	<i>AIP (Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide)</i> .....	47
<b>2.5</b>	<b>Statistik und Datenauswertung .....</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1	Phänotyp der Mäuseherzen.....	49
3.2	Der späte Natriumstrom (late $I_{Na}$ ) bei kompensierter Hypertrophie und bei Herzinsuffizienz.....	53
3.3	Einfluss des späten Natriumstroms (late $I_{Na}$ ) auf das Aktionspotential .....	57
3.4	Arrhythmogene Trigger in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz.....	60
3.5	Veränderungen in der Natriumkanalexpression und Regulation.....	62
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
4.1	Tiermodell der kardialen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz .....	65
4.2	Elektrophysiologisches Remodelling in der Hypertrophie .....	66
4.3	Elektrophysiologisches Remodelling bei Herzinsuffizienz .....	66
4.4	Late $I_{Na}$ generiert arrhythmogene Trigger.....	68
4.5	Molekulare Mechanismen.....	70
4.6	Limitationen der Arbeit .....	72
4.7	Klinische Relevanz.....	73
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>77</b>
6.1	AP-Parameter .....	77

<b>6.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>6.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>6.4</b>	<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

AD/DA-Wandler	Analog-Digital/Digital-Analog-Umwandler
ADP	Adenosindiphosphat
AIP	<i>autocamtide-2-related inhibitory peptide</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATX-II	<i>anemonia sulcata toxin II</i> (Seeanemontoxin II)
BAPTA	<i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> ; (Ca <sup>2+</sup> - Chelator)
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaM	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin - abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARISA	<i>Combination Assessment of Ranolazin in Stable Angina</i>
DAD	<i>delayed afterdepolarizations</i> (späte Nachdepolarisation)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DHP	Dihydropyridin - Rezeptoren
EAD	<i>early afterdepolarizations</i> (frühe Nachdepolarisation)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HW/BW	<i>heart-weight/body-weight</i> (Herz-/Körpergewicht-Verhältnis)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
I <sub>Ca</sub>	einwärtsgerichteter Ca <sup>2+</sup> -Strom

---

$I_{Ks}$	einwärtsgerichteter langsamer $K^+$ -Strom
$I_{Na}$	Spitzen-Natriumstrom
$K^+$	Kalium
KN-93	aktiver CaMKII-Inhibitor 2-[N-(4-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamin
LA	Lokalanästhetika
LV	linksventrikulär
late $I_{Na}$	später Natriumeinstrom
L-QT3-Syndrom	Long-QT-Syndrom Nr. 3
LVEDD	linksventrikulärer end-diastolischer Diameter
MARISA	<i>Monotherapy Assessment of Ranolazin In Stable Angina</i>
MDP	maximale diastolische Polarisation
MERLIN	<i>Metabolic Efficiency with Ranolazin for Less Ischemia in Non-ST-Elevation</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
$Na^+$	Natrium
$Na_v$ -Kanäle	spannungsabhängige $Na^+$ -Kanäle
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
P	Phosphat
pA	Pikoampere
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase

PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
P-Wert	Signifikanzniveau
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (radikale Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RyR2	Ryanodinrezeptoren vom kardialen Subtyp
SCN5A	Gen des spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> -Kanals
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Sham	„Vortäuschen“; Kontrollgruppe ohne transvesale aortale Konstriktion
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STX	Saxitoxin
TAC	transversale aortale Konstriktion
THR	Threonin, essentielle proteinogene $\alpha$ -Aminosäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
v.a.	vor allem
VHF	Vorhofflimmern
$\mu$ M	Mikromolar

## 1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz bezeichnet ein klinisches Syndrom, bei dem das Herz aus unterschiedlichen Gründen nicht mehr in der Lage ist, bei normalen Füllungsdrücken den Körper ausreichend mit Blut, Sauerstoff und Substraten zu versorgen.

Je nach dem, ob bevorzugt die Systole oder die Diastole betroffen ist, kann man die Herzinsuffizienz pathophysiologisch in eine systolische oder diastolische Herzinsuffizienz einteilen. Sind beide Pumpphasen betroffen, spricht man von einer kombinierten systolischen und diastolischen Ventrikelfunktionsstörung. Ein typisches Kennzeichen einer systolischen Herzinsuffizienz ist eine Reduktion der ventrikulären Ejektionsfraktion. Dagegen ist die diastolische Herzinsuffizienz durch typische klinische Symptome einer chronischen Herzinsuffizienz - bei echokardiographisch erhaltener systolischer Pumpfunktion - gekennzeichnet (Hoppe et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit, die Herzinsuffizienz einzuteilen ist nach der betroffenen Kammer. Dabei unterscheidet man zwischen einer Linksherzinsuffizienz, einer Rechtsherzinsuffizienz oder einer Globalherzinsuffizienz. Dieser Einteilung sind typische klinische Symptome zugeordnet. Ausdruck einer Linksherzinsuffizienz sind klassische Symptome wie Dyspnoe, Orthopnoe und Leistungsminderung, die aufgrund von Flüssigkeitsretention mit Stauungszeichen im Zuge der kardialen Funktionsstörung entstehen. Typische Symptome einer Rechtsherzinsuffizienz sind sichtbare Halsvenenstauungen, Gewichtszunahme, Ödeme, Stauungsleber und Stauungsgastritis. Gemeinsame Symptome bei Links- und Rechtsherzbelastung sind Nykturie, Tachykardien, Herzvergrößerung und Pleuraergüsse.

International erfolgt die Einteilung der Herzinsuffizienz nach der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA). Dabei werden die oben genannten Symptome unter anderem nach subjektivem Leistungsvermögen der Patienten in vier Stadien eingeteilt. Im NYHA-Stadium I ist der Patient beschwerdefrei und beschreibt eine normale körperliche Belastbarkeit. Im NYHA-Stadium IV hingegen, dem Stadium der terminalen Herzinsuffizienz, beschreibt der Patient Beschwerden in Ruhe. Klinisch führt dies meist zu verminderter körperlicher Belastbarkeit und deutlich reduzierter Lebenserwartung. Eine häufige und schwerwiegende Komplikation der Herzinsuffizienz sind kardiale Arrhythmien. In diesem Zusammenhang ist der plötzliche Herztod durch tachykarde Rhythmusstörungen die häufigste Todesursache bei herzinsuffizienten Patienten (Tomaselli und Zipes 2004).

Die vorliegende Arbeit versucht zu erklären, welche Rolle der späte Natriumstrom bei Druck-induzierter Hypertrophie und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz im Mausmodell spielt. Um ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen Herzinsuffizienz, Hypertrophie, Natriumkanälen und Arrhythmien zu bekommen, ist es jedoch zunächst erforderlich,

auf die physiologischen Besonderheiten der Herzmuskelzelle einzugehen und diese zu beschreiben.

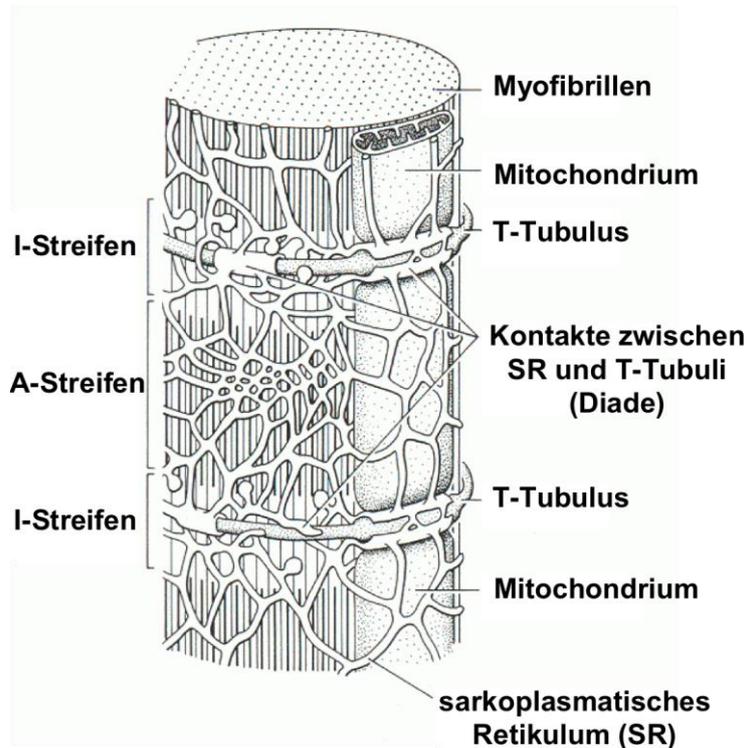
## **1.1 Der Kardiomyozyt**

Die einzelnen Herzmuskelfasern bilden die Grundstruktur des Myokards. Diese Herzmuskelfasern sind ultrastrukturell vergleichbar mit den Skelettmuskelfasern, sind jedoch zehnmal schmäler als diese (Bers 2001). Die Herzmuskelfasern bestehen aus zueinander parallel angeordneten, quergestreiften Herzmuskelzellen, die von Sarkolemm und einer Zellmembran umgeben sind. Sie sind untereinander durch die Disci intercalares verbunden (Sjostrand et al. 1958), die aufgrund ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes auch Glanzstreifen genannt werden (Junqueira und Carneiro 1996). Diese Glanzstreifen haben unterschiedliche Bedeutungen. Zum einen haben die Glanzstreifen mechanische Bedeutung, denn über Desmosomen und Intermediärfilamente des Sarkoplasmas sind sie mit benachbarten Muskelzellen verbunden und dienen der Verankerung der Myozyten untereinander. Zum anderen haben sie durch die Gap junctions, die sich histologisch den Connexonen zuordnen lassen, eine funktionelle Bedeutung. Schließlich stellen Gap junctions (Nexus) die chemische und elektrische Kommunikation der einzelnen Herzmuskelzellen untereinander her (Makowski et al. 1977; Unwin und Zampighi 1980). Somit entsteht eine zusammenhängende Einheit oder auch ein funktionelles Synzytium, welches die Synchronisation der Kontraktion des Myokards durch eine gerichtete Erregungsausbreitung ermöglicht. Den Ursprung der Erregungsbildung des Herzens bilden die sogenannten Schrittmacherzellen, welche die besondere Eigenschaft haben, spontan depolarisieren zu können.

## **1.2 Die Ultrastruktur des Kardiomyozyten**

Der Kardiomyozyt wird nach außen durch eine Zellmembran, das sogenannte Sarkolemm, begrenzt. Dieses Sarkolemm besteht hauptsächlich aus einer Phospholipid-Doppelschicht, verschiedenen Cholesterinbausteinen und einer Vielzahl von Membranproteinen. Diese Membranproteine sind vorwiegend Kanäle und Pumpen, durch die Ionen entlang eines Konzentrationsgefälles, den osmotischen Gesetzen folgend, passiv aber auch aktiv unter Energieverbrauch transportiert werden können. Diese Membranproteine dienen nicht nur dem Transport von Ionen und Molekülen, sondern haben ebenfalls eine wichtige Rolle in der Signalübertragung zwischen Intra- und Extrazellularraum. Eine weitere Besonderheit des kardialen Sarkolemms sind regelmäßig auftretende Einstülpungen. Diese auch transversale T-Tubuli genannten Ausstülpungen stehen mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), dem

internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der Herzmuskelzelle, in engem Kontakt und bilden ein ausgeprägtes Netzwerk zwischen den einzelnen Herzmuskelzellen aus. Das SR wiederum ist ein spezialisiertes glattes endoplasmatisches Retikulum, welches hauptsächlich aus longitudinalen L-Tubuli und terminalen Zisternen besteht (**Abbildung 1.1**).



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung des sarkoplasmatischen Retikulums, der T-Tubuli und der Myofibrillen in der Herzmuskelzelle (modifiziert nach Junqueira und Carneiro 1996, Seite 238).

Die oft schon durch das Lichtmikroskop zu erkennende typische Querstreifung der Muskelfasern lässt sich durch den physiologischen regelmäßigen Aufbau der einzelnen Myofibrillen erklären (Huxley 1961). Dabei erkennt man unter dem Mikroskop das typische Bandenmuster von abwechselnd hellen und dunklen Banden (A-, H-, M-, I-, und Z-Streifen). Der Abstand zwischen zwei Z-Streifen beträgt in der Regel etwa  $2\ \mu\text{m}$  und wird als Sarkomerlänge bezeichnet. Diese Sarkomere können sich verkürzen (Kontraktion) oder verlängern (Relaxation) (Huxley 1961).

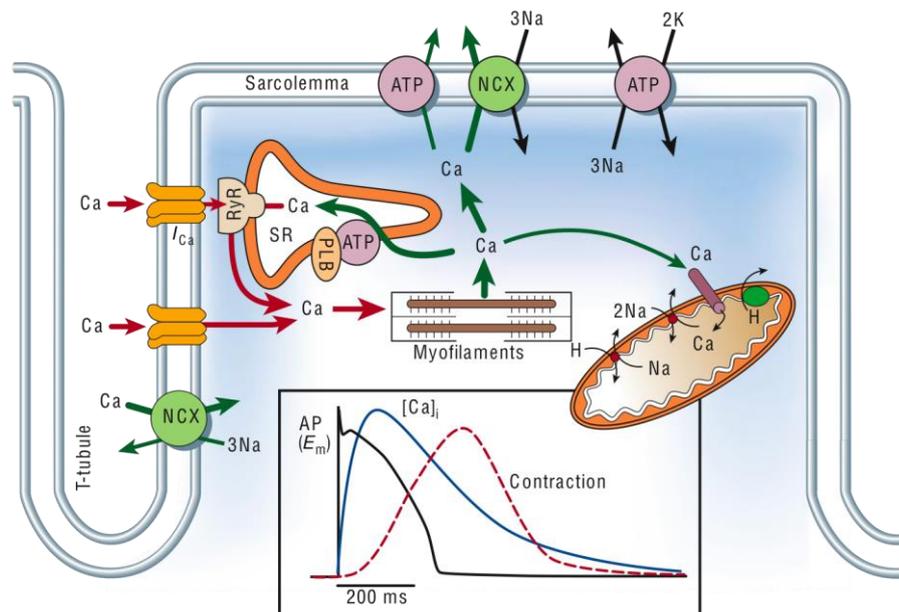
Für die Aufrechterhaltung ihrer normalen physiologischen Funktionen enthält die Herzmuskelzelle weitere Zellorganellen, wie zum Beispiel Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lysosomen, Lipofuszin-Granula, Peroxisomen, Glykogen und das Zytoskelett (Bers 2001).

## 1.3 Elektromechanische Kopplung

### 1.3.1 Kontraktion / Systole

Die elektromechanische Kopplung beschreibt einen Prozess des Kardiomyozyten, ausgehend von der elektrischen Erregung bis hin zur mechanischen Kontraktion (Bers 2002). Bei der Kontraktion steigt der Druck im linken Ventrikel über den systemischen Blutdruck, was dazu führt, dass sich die Aortenklappe öffnet und etwa die Hälfte des im linken Ventrikel befindlichen Blutvolumens (~70 ml) in den Körperkreislauf ausgeworfen wird.

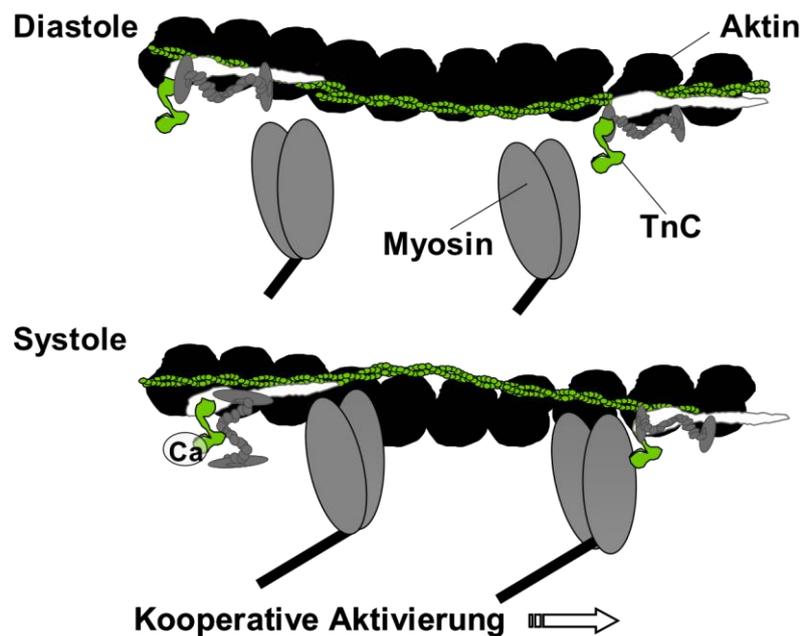
Das Ausmaß und die Stärke der Kontraktion ist im Wesentlichen von der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig.  $\text{Ca}^{2+}$  als Second Messenger, der direkt die kontraktilen Filamente aktivieren kann, nimmt somit eine entscheidende und zentrale Position im Prozess der elektromechanischen Kopplung ein. Ein Ungleichgewicht dieses wichtigen Botenstoffes kann zu Kontraktionsstörungen und im weiteren Verlauf zu Arrhythmien führen (Pogwizd et al. 2001). Wie gelangt das für die Kontraktion so wichtige  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle? Initial erfolgt ein schneller  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle, der durch eine Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanälen zur Depolarisation der Zellmembran führt und das Membranpotential der Zelle auf etwa +30 mV (sog. *overshoot* oder Aufstrich des Aktionspotentials) anhebt (Bers 2001). Nach dem kurzen, schnellen Aufstrich des Aktionspotentials (AP), verursacht durch die eben beschriebenen spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle kommt es im folgenden zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle (sog. Dihydropyridin-Rezeptoren=DHPR) entlang des elektrochemischen Gradienten. Dies führt zu einer 200-400 ms andauernden Plateauphase des APs. Der schnelle Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  macht nur einen kleineren Teil (~30% beim Menschen) des zur Kontraktion benötigten  $\text{Ca}^{2+}$  aus (Bers 1991). Sekundär kommt es, getriggert durch diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speicherorganellen, dem SR (Bassani et al. 1993; Delbridge et al. 1996; Delbridge et al. 1997). Die Grundlage dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Fabiato 1983; Fabiato 1985; Fabiato und Fabiato 1975) ist zum einen die enge räumliche Beziehung zwischen den L-Typ-Kalziumkanälen, den Ryanodinrezeptoren (RyR2) und dem SR und zum anderen die spezifische Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Ryanodinrezeptoren (Bers und Guo 2005; Zalk et al. 2007). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg ist die Voraussetzung für die Aktivierung der Myofilamente und der Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten.



**Abbildung 1.2** Die elektromechanische Kopplung des Kardiomyozyten (modifiziert nach Bers 2002, Seite 198): Nach dem Aufstrich des APs durch den schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom (im Kasten: schwarze Kurve) kommt es zur Plateauphase durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, verursacht durch L-Typ-Kalziumkanäle (im Kasten: blaue Kurve) und zur  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch die Ryanodinrezeptoren (rote Pfeile) aus dem SR. Somit kommt es schließlich zur Aktivierung der Myofilamente. Die grünen Pfeile stellen den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$ , wie er bei der Relaxation auftritt, dar. So kommt es zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Zytosol. Über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in das SR zurück gepumpt und zu einem Teil über den NCX im Austausch mit  $\text{Na}^+$  nach extrazellulär transportiert.

Das freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Troponin C des kontraktiven Apparates. Durch diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Tropomyosins, welches wiederum die Bindungsstelle für Myosin auf dem Aktinfilament freigibt. Parallel dazu kommt es durch die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle zu einer vermehrten Aktivität der Adenosintriphosphatase (ATPase) der Myosinfilamente. Diese ermöglicht eine Hydrolyse des an das Myosin gebundenen ATP-Moleküls in ADP und Phosphat (P). Der dabei entstehende Komplex aus ADP und P verweilt eine kurze Zeit im katalytischen Zentrum des Myosins. Diese Hydrolyse von ATP in ADP und P geht mit einer Ausrichtung des Hebelarms einher. Des Weiteren ist die Hydrolyse eine unerlässliche Voraussetzung für eine erneute Anlagerung des Myosinkopfes. Das Myosinköpfchen lagert sich zunächst nur mit geringer Affinität an das Aktinfilament an, bevor es nach Abspaltung des P-Moleküls eine feste Bindung mit dem Aktinfilament eingeht. Das Myosinköpfchen steht jetzt im  $90^\circ$ -Winkel auf dem Aktinfilament. Das Abknicken des Myosinköpfchens von  $90^\circ$  auf  $45^\circ$  und die daraus resultierende Verschiebung der Filamente gegeneinander erfolgt nach Abgabe des im katalytischen Zentrum verbliebe-

nen ADPs (Huxley 1969). Durch das Gleiten bzw. Verschieben der einzelnen Filamente gegeneinander kommt es zu einer Schrittbewegung von 5-10 nm der Aktinfilamente in Richtung M-Linie. Nachdem das ADP-Molekül das Myosinköpfchen verlassen hat, ist der Ausgangszustand erreicht. Mit erneuter Bindung von ATP in das katalytische Zentrum des Myosins wird die Affinität des Myosins zum Aktin geschwächt und die zuvor entstandene Querbrücke gelöst. Durch zyklische Wiederholung des beschriebenen Vorganges kann es zu größeren Längenänderungen der Myofilamente kommen (Huxley 1969; Huxley 2004).



**Abbildung 1.3** Darstellung des Querbrückenzyklus bzw. Prinzip der Gleitfilamententheorie. Durch die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zur vermehrten Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C und zur Freilegung der Bindungsstelle für Myosin am Aktin. Dadurch kommt es zur Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Anschließend folgt unter Energieverbrauch eine Drehung des Myosinköpfchens und eine Verschiebung der Aktinfilamente gegenüber dem Myosinkopf. Es resultiert eine Verkürzung der Myofibrillen (modifiziert nach Bers 2001, Seite 25).

### 1.3.2 Relaxation / Diastole

Vor Beginn der Repolarisation werden die L-Typ-Kalziumkanäle über eine negative Rückkopplung gehemmt. Somit kann zunächst kein weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmen. Die Elimination des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt über verschiedene Transportproteine. Eines dieser Proteine ist die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), die das  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-abhängig und durch Phospholamban (PLB) reguliert wieder in das SR transportiert. Über die SERCA werden ~70%

des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  beim Menschen wieder in das SR aufgenommen (Bassani et al. 1994). Ein weiteres Protein zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination ist der in der Zellmembran vorhandene  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX). Dabei wird unter Nutzung des  $\text{Na}^+$ -Gradienten ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle befördert. Weitere Möglichkeiten, das  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle zu entfernen, sind zum einen zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in der Zellmembran und zum anderen die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien.

Da die vorliegende Dissertation Beobachtungen und Experimente an Mäuseherzen beschreibt, ist es wichtig zu erwähnen, dass der Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination in murinen Kardiomyozyten eine andere Verteilung aufweist als beim Menschen oder Kaninchen. Bei Ratten- und Mäusemyozyten werden im Gegensatz zum Menschen 92% des  $\text{Ca}^{2+}$  über die SERCA und 7% über den NCX eliminiert (Bers 2001).

### 1.3.3 Frank-Starling-Mechanismus

Erhöht sich der zentralvenöse Druck im Körperkreislauf, nehmen sowohl das diastolische Volumen als auch das Schlagvolumen des linken Ventrikels zu. Dagegen verändert sich der Blutdruck nur geringfügig. So ist das Herz durch autonome Regulation (Inotropie) in der Lage, die Ventrikel in ihrem Schlagvolumen und Rhythmus - bis zu gewissen Grenzen - dem angebotenen Blutvolumen anzupassen. Diesen Mechanismus beschrieben Frank und Starling (Frank 1895, Starling 1918). Sie fanden heraus, dass eine vermehrte Volumenbelastung der Ventrikel, also eine Vorlasterhöhung, dazu führt, dass das Herz mit einer gesteigerten Kontraktionskraft reagiert. Die Ursache für diese Kontraktionskraftsteigerung ist die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der kontraktilen Filamente (Hibberd und Jewell 1982; Kentish et al. 1986). Diese können sich aufgrund einer gesteigerten Vorlasterhöhung vermehrt dehnen. Dadurch kommt es zur einer intensiveren Überlappung der Myofibrillen, was eine verstärkte Querbrückenbindung zu Folge hat (Gordon et al. 1966). Zusätzlich kommt es bei größeren Sarkomerlängen zur verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem SR (Allen und Kurihara 1982; Kentish und Wrzosek 1998). Die sich damit aus dem Frank-Starling-Mechanismus ergebende Möglichkeit zur autonomen Regulation der Inotropie befähigt die Ventrikel, ihr Schlagvolumen in gewissen Bereichen dem angebotenen Blutvolumen regulatorisch anzupassen.

### 1.3.4 Kraft-Frequenz-Beziehung

Bowditch zeigte schon 1871, dass nicht nur die enddiastolische Vordehnung, sondern auch die Schlagfrequenz die vom Myokard generierte Kontraktionskraft beeinflussen kann (Bowditch 1871). In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass es durch eine Erhö-

hung der Stimulationsfrequenz zu einer gesteigerten Zuckungskraft des Myokards kommt (Blinks und Koch-Weser 1961; Schwinger et al. 1993). Dieses Verhältnis wird auch als positive Kraft-Frequenz-Beziehung bezeichnet. Sie ist beim Menschen in einem Bereich von 60 bis  $180 \text{ min}^{-1}$  positiv. Über diese Werte hinaus kommt es zu einer Reduktion der entwickelten Kraft und die Kraft-Frequenz-Beziehung wird negativ. Die positive Kraft-Frequenz-Beziehung erklärt sich aus der frequenzabhängigen Potenzierbarkeit der L-Typ-Kalziumkanäle. So steigt die Menge des einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$  mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz ebenfalls an (Piot et al. 1996). In diesem Zusammenhang wurde weiter gezeigt, dass sich dieser Effekt durch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR und die damit verbundene vermehrte Ausschüttung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR verstärken lässt (Wier und Yue 1986). Daraus resultiert eine Kontraktionskraftzunahme, da die systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigt.

### 1.3.5 Adrenerge Stimulation

Neben dem Frank-Starling-Mechanismus kann das Herz seine Kontraktionskraft füllungsunabhängig steigern. Diese füllungsunabhängige Erhöhung der Kontraktionskraft basiert vor allem auf der Bindung von Katecholaminen an  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. Nach Bindung von Katecholaminen an diese Rezeptoren kommt es über ein stimulierendes G-Protein zur Aktivierung der Adenylcyclase, die wiederum zu einer Erhöhung des cAMPs in der Zelle führt. Diese Kumulation von cAMP führt weiter zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche selbst verschiedene Zielproteine, die zur Steuerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes und der Muskelkontraktilität dienen, phosphoryliert. Des Weiteren kommt es zur Phosphorylierung von Phospholamban, welches die Funktion der SERCA durch hemmende Einflüsse reguliert. Die Phosphorylierung bewirkt eine verminderte Inhibition dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Davis et al. 1990). Somit kommt es zu einer vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das SR und zur schnelleren Relaxation (positiv lusitrop) (Luo et al. 1994). Aus der gesteigerten SERCA-Aktivität resultiert eine schnellere  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das SR und eine damit verbundene gesteigerte Abdissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von Troponin C. Die Relaxationsgeschwindigkeit steigt an (positiv lusitrop) und das Herz ist in der Lage, schneller zu schlagen (positiv chronotrop), wobei letzterer Effekt hauptsächlich durch die schnellere diastolische Depolarisation der Schrittmacherzellen im Sinusknoten gesteuert wird.

Der positiv inotrope Effekt durch die PKA beruht auf einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch phosphorylierte L-Typ-Kalziumkanäle und einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Ryanodinrezeptoren des SR (Valdivia et al. 1995). Obwohl es unter adrenerger Stimulation zur Phosphorylierung von Myofilamenten (Troponin I) und einer damit verbundenen reduzierten Sensitivität der Myofilamente für  $\text{Ca}^{2+}$  kommt (Kentish et al.

2001), überwiegen die positiv inotropen Effekte deutlich. Der vermehrte Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle unter adrenerger Stimulation und die gesteigerte Wiederaufnahmeaktivität der SERCA führen zu einem erhöhten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR, wodurch die Menge an freisetzbarem  $\text{Ca}^{2+}$  pro Schlag erhöht wird (Luo et al. 1994).

## 1.4 Herzhypertrophie

Die Herzhypertrophie beschreibt die Zunahme der Herzmuskelmasse durch Vergrößerung der Zellen und der kontraktilen Elemente. Man unterscheidet bei der Hypertrophie zwei Formen: die konzentrische und die exzentrische Hypertrophie (Khouri et al. 2010).

Die konzentrische Hypertrophie beschreibt eine Hypertrophie mit konstant bleibenden Herzhöhlen. Sie entsteht hauptsächlich durch Druckbelastungen, wie sie zum Beispiel bei Aortenklappenstenose oder bei arterieller Hypertonie im klinischen Alltag zu beobachten sind (Grossman et al. 1975; Ganau et al. 1992). Um diesen Zustand auszugleichen, versucht das durch Dehnung vergrößerte Herz durch Erzeugung einer größeren Wandspannung den gleichen Druck aufrechtzuerhalten. Diesen Prozess beschreibt das Laplace-Gesetz:

$$P = K \times 2d/r \text{ bzw. } K = P \times r/2d$$

**Formel 1.1** Das Laplace-Gesetz. Dabei steht K für die Wandspannung, P für den transmuralen Druck, r für den Gefäßradius und d für die Wanddicke.

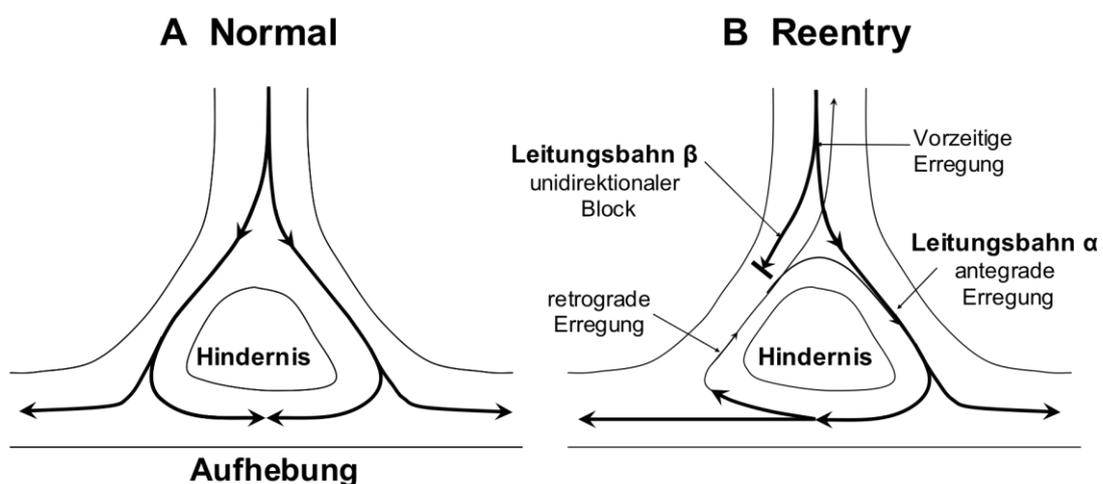
Histologisch definiert man das hypertrophierte Herz als ein Organ mit verdickten Herzmuskelfasern, hyperchromatisch wechselnd großen Zellkernen, Zellkernverdopplungen und Nukleolen (Linzbach 1960). Durch den fortbestehenden Stress des Herzens kommt es nach kurzer Zeit zur Adaptation und zur Kompensation des Herzmuskels, was durch Dickenzunahme der Myofibrillen zu beobachten ist. Kommt es nicht zu einer Druckentlastung oder Dekompensation, nimmt das Herz weiter an Masse zu, bis es eine kritische Masse von etwa 500 g erreicht hat (Linzbach 1960). Es kommt schließlich zur Dilatation des Herzens. Die Folge einer länger bestehenden Dilatation ist die chronische Herzinsuffizienz. Bei fortbestehender Druckbelastung und fehlender Dekompensation des Herzens kommt es zur Bildung einer exzentrischen Hypertrophie (Grossman et al. 1975). Es entsteht eine Muskelhypertrophie mit Zunahme des Herzinnenvolumens. Klinische Beispiele, bei denen eine exzentrische Hypertrophie als Folge einer lang anhaltenden konzentrischen Hypertrophie zu beobachten ist, sind die Aorten- oder Mitralklappeninsuffizienz (Grossman et al. 1975).

## 1.5 Herzrhythmusstörungen

Alle Herzaktionen, die im Gegensatz zur normalen Herzfrequenz von 60 bis 100 Schlägen  $\text{min}^{-1}$ , zu schnell (tachykard), zu langsam (bradykard) oder einen unregelmäßigen Sinusrhythmus zeigen, werden als Arrhythmien bezeichnet. Diese Arrhythmien weisen verschiedene Ursachen auf. Gründe für eine Veränderung der elektrischen Herzfähigkeit sind beispielsweise eine ungleichmäßige Abfolge der Erregungen, eine Abweichung von der normalen Herzfrequenz oder ein Defekt im zeitlichen Ablauf einer Herzaktion. Lokalisationen für Arrhythmien können sowohl supraventrikulär als auch ventrikulär sein.

Die Grundlage der normalen Herzaktion bilden die beschriebenen Schrittmacherzellen, welche die besondere Fähigkeit besitzen, spontan zu depolarisieren. Wird dabei ein Schwellenpotential, welches abhängig vom Ursprungsgewebe unterschiedlich hoch sein kann, überschritten, kommt es zur Entstehung eines APs. Das so entstandene AP breitet sich nun gerichtet über das Myokard aus, wobei eine bestimmte Reihenfolge von erregbaren Strukturen eingehalten wird. Die Erregungsbildung findet unter physiologischen Bedingungen im Sinusknoten (Nodus sinuatrialis) statt und wird dann weiter über den AV-Knoten (Nodus atrioventricularis) in das HIS-Bündel (Tractus fasciculi atrioventricularis) geleitet. Hier erfolgt eine Aufteilung der Erregungsleitung in die Kammerschenkel (Tawara-Schenkel, Crus dextrum, Crus sinistrum), die an der Herzspitze in die Purkinje-Fasern übergehen. Dadurch erfolgt in letzter Konsequenz die geordnete Kontraktion des Herzens.

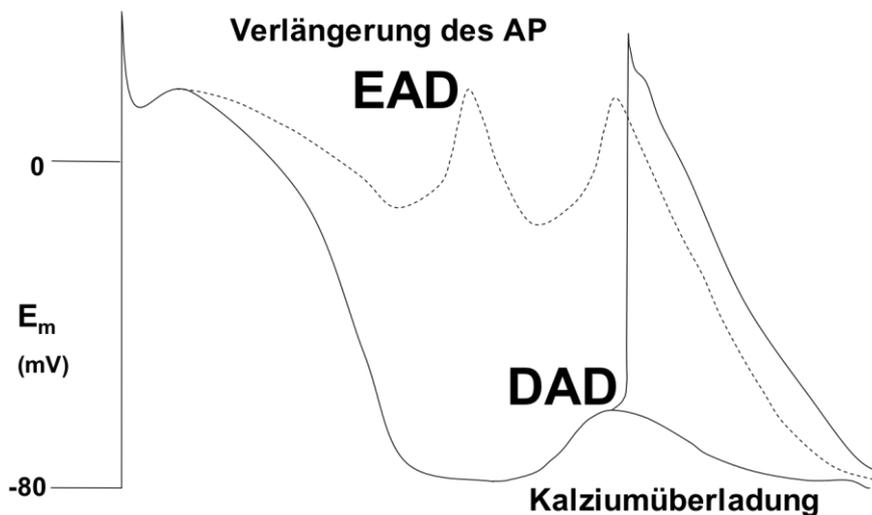
Wird die Erregungsleitung verzögert oder blockiert, können sogenannte kreisende Erregungen (*Reentry-Tachykardien*) entstehen (Zipes 2003).



**Abbildung 1.4** Schematische Darstellung einer kreisenden Erregung (modifiziert nach Bers 2001, Seite 100)

Die Blockierung oder Verzögerung der elektrischen Ausbreitung können verschiedene Ursachen haben: Sarkolemmale  $\text{Na}^+$ -Kanäle sind nicht angelegt, öffnen schlecht oder gar nicht, Fehlfunktionen der Gap junctions oder zumeist narbiges oder fibröses Gewebe versperrt an den betroffenen Stellen die Weiterleitung des elektrischen Signals. Als Folge können Verzögerungen oder Blockierungen in jedem Abschnitt des Erregungsleitungssystems auftreten, was klinisch zu *Reentry*-Tachykardien führen kann (Zipes 2003). **Abbildung 1.4** zeigt die Entstehung einer klassischen kreisenden Erregung durch eine morphologische Veränderung. Dabei wird die Erregung über die noch zur Verfügung stehende Leitungsbahn ( $\alpha$ ) gelenkt. Die Refraktärzeit (Zeitraum eines APs, in dem die auslösende Zelle nicht erneut auf einen Stimulus reagieren kann) ist kurz. Die Erregung gelangt nun retrograd in die andere (normale) Leitungsbahn ( $\beta$ ). Somit schließt sich der Kreis und eine kreisende Erregung entsteht. Diese erregbare Lücke kann solange durchlaufen werden, wie stimulierbares Gewebe vorhanden ist oder bis durch Kardioversion eine Unterbrechung der kreisenden Erregung herbeigeführt wird (Zipes 2003).

Ein weiterer, vor allem für diese Arbeit sehr wichtiger Mechanismus zur Entstehung von Arrhythmien sind spontane Oszillationen, die aus der transmembranären Spannung des vorausgegangenen APs entstehen. Man differenziert dabei zwischen früher Nachdepolarisation (*early afterdepolarisation, EAD*) und später Nachdepolarisation (*delayed afterdepolarisation, DAD*) (Zipes 2003).



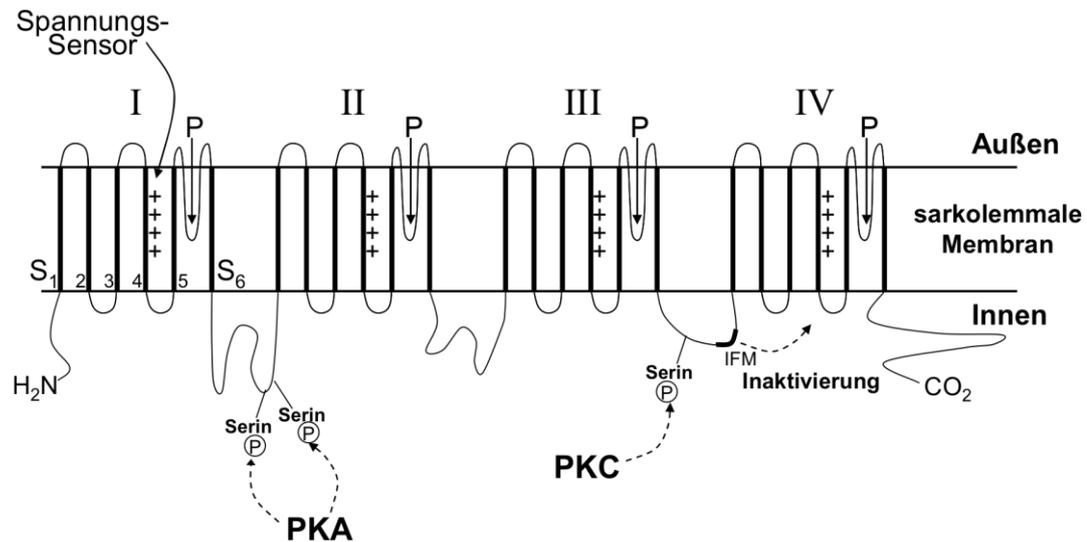
**Abbildung 1.5** Schematische Darstellung einer frühen Nachdepolarisation (*EAD*) und einer späten Nachdepolarisation (*DAD*) (modifiziert nach Bers 2001, Seite 98).

Von frühen Nachdepolarisationen (*EADs*) wird gesprochen, wenn eine transiente Membrandepolarisation vor der Beendigung eines APs in der vom  $K^+$ -Ausstrom getragenen Repolarisationsphase entsteht. Zugrunde liegt diesem Prozess zunächst eine Verlängerung des APs. Dieses kann v.a. durch einen längeren  $Na^+$ - oder  $Ca^{2+}$ -Einstrom oder durch einen verminderten  $K^+$ -Ausstrom verursacht sein. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen lässt das Ruhemembranpotential auf weniger negative Werte in die Nähe des Schwellenwertes ansteigen. In der Folge kann es zur leichteren Auslösung neuer APs kommen (Zipes 2003; Song et al. 2004; Tomaselli und Zipes 2004). Zur Entstehung von *DADs* kommt es durch eine erhöhte Konzentration von  $Ca^{2+}$  in der Zelle. Dabei kommt es durch eine exzessive  $Ca^{2+}$ -Überladung zur oszillierenden  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR in der Diastole. Diese spontane  $Ca^{2+}$ -Entladung aus dem SR führt dazu, dass es zu einem lokalen  $Ca^{2+}$ -Anstieg in der Zelle kommt. Die Konsequenz dieses lokalen  $Ca^{2+}$ -Anstiegs ist, dass  $Ca^{2+}$  hauptsächlich über den membranständigen NCX eliminiert wird. Wird dabei durch das im Antiport für  $Ca^{2+}$  einströmende  $Na^+$  das Schwellenpotential der Zelle überschritten, kommt es zur Depolarisation der Zelle (Zipes 2003). Somit triggert  $Ca^{2+}$  hier die Entstehung von *DADs* (Cheng und Lederer 2008). Schließlich begünstigen sowohl frühe als auch späte Nachdepolarisationen bei ausreichend großer Amplitude im geeigneten Moment die Entstehung einer oder mehrerer zusätzlicher Depolarisationen (Song et al. 2008) und sind der Hauptmechanismus kardialer Arrhythmien (Ferrier 1977; Wit und Boyden 2007).

### **1.6 Der sarkolemmale Natriumkanal**

Natriumkanäle ( $Na^+$ -Kanäle) stellen die Grundlage für Erregungen und Erregungsfortleitungen aller erregbaren Zellen dar und spielen somit eine zentrale Rolle in der Physiologie der Zelle. Besonders in den Kardiomyozyten sind quantitativ mehr als 100.000 spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle vorhanden (Makielski et al. 1987). Im Vergleich dazu sind nur etwa 20.000 L-Typ-Kalziumkanäle und spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle bekannt. Die  $Na^+$ -Kanäle sind hauptsächlich verantwortlich für den Aufstrich des kardialen APs. Sie sind somit essentiell für die Einleitung, Fortleitung und Aufrechterhaltung der Erregung.

## 1.6.1 Aufbau des Natriumkanals

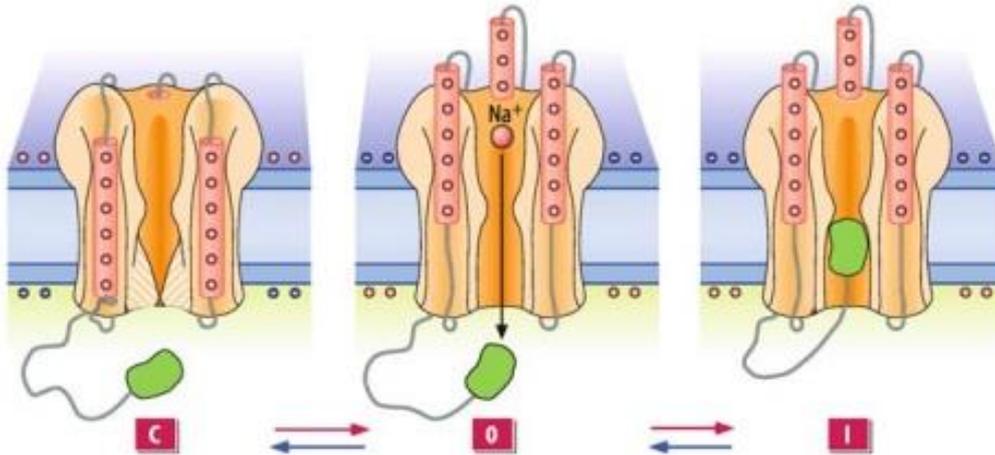


**Abbildung 1.6** Der Na<sup>+</sup>-Kanal besteht aus 4 homologen Domänen (I-IV) mit jeweils 6 homologen Transmembransegmenten (S1-S6). Das mehrfach positiv geladene S4-Segment jeder Domäne dient als Spannungssensor. Weiter sind für Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) die Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet (modifiziert nach Bers 2001, Seite 69).

Der Na<sup>+</sup>-Kanal setzt sich, wie in **Abbildung 1.6** zu sehen, aus mehreren Untereinheiten zusammen. Die  $\alpha$ -Untereinheit mit ihrer Isoform Na<sub>v</sub>1.5 (SCN5A) ist am Herzen die prädominante Isoform. Diese  $\alpha$ -Untereinheit bildet eine Pore für Na<sup>+</sup>-Ionen und wird zusätzlich durch verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ):  $\beta_1$  (SCN1B),  $\beta_2$  (SCN2B),  $\beta_3$  (SCN3B) und  $\beta_4$  (SCN4B) mitreguliert (Meadows und Isom 2005; Nerbonne und Kass 2005). So ist zum Beispiel die  $\beta_1$ -Untereinheit nicht kovalent mit der  $\alpha$ -Untereinheit verbunden, die  $\beta_2$ -Untereinheit hingegen ist über Disulfidbrücken mit der  $\alpha$ -Untereinheit direkt verbunden (Messner und Catterall 1986). Vor allem die  $\beta_1$ -Untereinheit spielt bei abnormalen Na<sup>+</sup>-Kanalaktivitäten, wie zum Beispiel bei einem Long-QT-Syndrom (An et al. 1998) oder beim Brugada-Syndrom (Makita et al. 2000) eine wichtige Rolle.

Die für den Na<sup>+</sup>-Kanal hauptverantwortliche  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (I-IV). Diese Domänen setzen sich wiederum aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6) zusammen (**Abbildung 1.6**). Die homologen Domänen sind so gefaltet, dass zwischen S5 und S6 jeder Domäne (P-Segment) eine Verbindung besteht, deren Struktur es erlaubt, die Selektivität und Leitfähigkeit eines Kanals zu regulieren (Catterall 1992; Marban et al. 1998). Als Spannungssensor reagiert das positiv geladene S4-Segment jeder Domäne auf Depolarisation und Repolarisation und kann somit den Kanal aktivieren oder

inaktivieren (Puglisi und Bers 2001). Auf diese Veränderung reagiert der Kanal innerhalb von wenigen Millisekunden (Chen et al. 1996). Eine Mutation im Segment 4 kann eine Inaktivierung verzögern oder sogar komplett verhindern, was einen persistierenden  $\text{Na}^+$ -Strom zur Folge hat. Einen solchen  $\text{Na}^+$ -Strom kann man klassisch im klinischen Krankheitsbild des Long-QT3-Syndroms beobachten (Bennett et al. 1995).



**Abbildung 1.7** Grundprinzip spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Die Abbildungen zeigen den Kanal in seinen drei Hauptzuständen: im aktivierbaren, geschlossenen Zustand (links), im offenen Zustand (Mitte) und im inaktivierten, geschlossenen Zustand (rechts), in dem der Kanal von der N-terminalen Inaktivierungsdomäne blockiert wird. Bei Depolarisation durchläuft der Kanal die Zustände von links nach rechts (rote Pfeile), bei Hyperpolarisation von rechts nach links (blaue Pfeile) (modifiziert nach Schmidt und Lang, Seite 64).

Die **Abbildung 1.7** veranschaulicht, dass der Kanal im inaktivierten Zustand nicht reaktivierbar ist. Erst durch Hyperpolarisation der Zellmembran ist es möglich, den Kanal in einen geschlossenen, aktivierbaren Zustand zu bringen.

### 1.6.2 Regulation des Natriumkanals

Die Regulation des  $\text{Na}^+$ -Kanals kann auf verschiedene Weise erfolgen:

Kanalaktivierung und -deaktivierung durch Depolarisation und Repolarisation. Dabei kommt es durch Veränderungen in der Membranspannung zu einer Vielzahl von Struktur- und Konformationsänderungen in den Kanalstrukturen. Wie oben beschrieben, fungiert das S4-Segment jeder Domäne als Spannungssensor, weshalb sich hier Veränderungen der Membranspannung zuerst bemerkbar machen (Chen et al. 1996). Da das S4-Transmembransegment eine positive Ladung trägt, kann es sich unter Einfluss eines elektri-

schen Feldes bewegen. Diese Bewegung setzt daraufhin in den benachbarten Segmenten S5 und S6 eine Lageveränderung der Proteine in Gang, die schließlich durch Verkippung der Helices zu einer Aufweitung der Kanalpore führen.

Kanalinaktivierungen erfolgen hauptsächlich durch Regulierungen der intrazellulären Verbindungen (III-IV *Linker*) zwischen Domäne III und IV. Dabei stellt man sich vor, dass der *Linker* in die Pore eindringt, an den Rezeptor bindet und den Kanal verschließt bis es durch Repolarisation zu erneuten Konformationsänderungen und zur Abdissoziation der Inaktivierungsdomäne kommt (**Abbildung 1.7**) (Rohl et al. 1999). Zudem ist bekannt, dass Wechselwirkungen zwischen dem III-IV *Linker* und dem C-Terminus notwendig sind, um den geschlossenen Zustand des Kanals stabil zu halten (Motoike et al. 2004).

Intrazelluläre Botenstoffe wie ATP, zyklische Nukleotide,  $\text{Ca}^{2+}$  und der pH-Wert sind ebenfalls in der Lage, den  $\text{Na}^+$ -Kanal zu regulieren. In **Abbildung 1.6** (Seite 13) sind die zentralen, intrazellulären Phosphorylierungsstellen, an welche Botenstoffe binden können, dargestellt. Je nachdem, in welchem Gewebe sich der  $\text{Na}^+$ -Kanal befindet (Neuronen, Skelett- oder Herzmuskulatur), sind bestimmte Isoformen zu unterscheiden (Marban et al. 1998). Frohnwieser und seine Arbeitsgruppe stellten 1997 dar, dass es bei einer Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige PKA zu einer Leitfähigkeitszunahme und somit zu einem vermehrten  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle kommt (Frohnwieser et al. 1997). Dabei phosphoryliert die cAMP-abhängige PKA den kardialen  $\text{Na}^+$ -Kanal an zwei Serinresten am I-II *Linker* (Murphy et al. 1996). Allerdings bleibt dabei die Spannungsabhängigkeit unverändert. Im Gegensatz dazu wird bei einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) an einem Serinrest der Strom über den Kanal reduziert, und es kommt durch eine beschleunigte Inaktivierung zu einer geringeren Verfügbarkeit des Kanals (Qu et al. 1996).

Physikalische Faktoren, die den  $\text{Na}^+$ -Kanal mit beeinflussen, sind Wärme, Kälte, Osmolarität und mechanische Zugkraft. Chemische Regulatoren des  $\text{Na}^+$ -Kanals sind Kanalblocker, wie zum Beispiel Lokalanästhetika (LA), welche besonders die Inaktivierung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle beschleunigen (Balser et al. 1996). Lipkind und Mitarbeiter zeigten 1994, dass sowohl Tetrodotoxin (TTX) als auch Saxitoxin (STX) sehr effektiv den spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanal zwischen der S5- und S6-Domäne I blockieren (Lipkind und Fozzard 1994).

### **1.7 Der späte Natriumstrom (late $I_{\text{Na}}$ )**

Im Jahr 1979 haben Coraboeuf und Mitarbeiter APs in Purkinje-Fasern von Hundeherzen untersucht (Coraboeuf et al. 1979). Sie fanden heraus, dass TTX im nanomolaren Bereich die Dauer des APs reduziert. Dieses Ergebnis führte sie zu dem Schluss, dass ein positiver einwärtsgerichteter Strom existieren muss, der empfindlicher auf TTX reagiert als der schnell-

le bzw. Spitzen- (oder *Peak*-) Natriumstrom ( $I_{Na}$ ). Dieser Strom unterliegt laut den Beobachtungen von Coraboeuf auch nicht den bisher bekannten Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen des *Peak*- $I_{Na}$ . Unter physiologischen Bedingungen öffnen und schließen sich  $Na^+$ -Kanäle schnell (wenige ms). Weitere Beobachtungen von Coraboeuf zeigen, dass es eine kleine, späte Komponente des  $Na^+$ -Stroms geben muss (late  $I_{Na}$ ), der im Gegensatz zum *Peak*- $I_{Na}$  über das AP aktiv bleibt, eine viel langsamere Kinetik hat und erst sehr spät inaktiviert. Unter physiologischen Bedingungen ist die Amplitude des late  $I_{Na}$  sehr klein und erreicht nicht mehr als 1% der Amplitude des *Peak*- $I_{Na}$ . Im Gegensatz zum *Peak*- $I_{Na}$  kann der late  $I_{Na}$  jedoch für hunderte von Millisekunden persistieren und daher beträchtliche Wirkungen entfalten. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei Ischämie, freien Sauerstoffradikalen oder bei Herzinsuffizienz kann die Amplitude dieses Stroms stark ansteigen (Undrovinas A et al. 1992; Wu J und Corr 1994; Ju et al. 1996; Ward und Giles 1997). Auch für Vorhofflimmern (VHF) wurde ein erhöhter late  $I_{Na}$  beschrieben (Sossalla et al. 2010b). Weitere Induktoren des late  $I_{Na}$  sind Peptide, wie das Seeanemonotoxin II (ATX-II) (Song et al. 2004; Song et al. 2006; Sossalla et al. 2008), und Mutationen im SCN5A-Gen (Fredj et al. 2006). Vor allem am Beispiel der kardialen Ischämie lassen sich die beschriebenen Veränderungen, die zur Erhöhung des late  $I_{Na}$  führen, gut veranschaulichen. Ischämie beschreibt den Zustand einer Minderdurchblutung. Dabei kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot. Hält dieser Zustand der Sauerstoffunterversorgung an, kann es zum Zelluntergang kommen. Ein frühes Ereignis in diesem Zusammenhang ist ein intrazellulärer  $Na^+$ -Anstieg (Imahashi et al. 1999) an dem der late  $I_{Na}$  beteiligt ist. Vor allem die während der Ischämie anfallenden Metabolite wie Palmitoyl-L-Carnitin, Lysophosphatidylcholin, und reaktive Sauerstoff/Stickstoff-Spezies verursachen die Erhöhung des late  $I_{Na}$  (Undrovinas A et al. 1992; Wu J und Corr 1994). Welche Konsequenzen dieser zelluläre  $Na^+$ -Anstieg hat, wird in den Kapiteln 1.3.1, 1.3.2 und 1.5 näher beschrieben.

### 1.7.1 Ranolazin - Inhibitor des late $I_{Na}$

Ranolazin (N-(2,6-Dimethylphenyl)-4(2-Hydroxy-3-[2-methoxy-phenoxy]-propyl)-1-piperazinacetamidhydrochlorid) ist ein potenter Inhibitor des late  $I_{Na}$ . In Kardiomyozyten von Hunden und Meerschweinchen führt Ranolazin zu einer konzentrations- und frequenzabhängigen Inhibition des late  $I_{Na}$  (Antzelevitch et al. 2004). Es hemmt in der klinisch relevanten Plasmakonzentration von 2 bis 8  $\mu M$  den late  $I_{Na}$  38-mal stärker als den *Peak*- $I_{Na}$  (Undrovinas A et al. 2006). In Bezug auf die Bindungsstellen von Ranolazin konnte gezeigt werden, dass Ranolazin eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit Lokalanästhetika (LA), z.B. dem Lidocain, aufweist (Fredj et al. 2006). Somit kann Ranolazin vermutlich an der Bindungsstelle für LA

am Na<sup>+</sup>-Kanal binden. Um diese Theorie zu beweisen, wurden Mutationen an einzelnen Aminosäureresten (F1760A und F1759K) in der LA-Bindungsstelle des kardialen Na<sup>+</sup>-Kanals vorgenommen. Zu beobachten war eine signifikante Reduktion der hemmenden Wirkungen von Ranolazin auf den late I<sub>Na</sub> (Fredj et al. 2006). Weiter wurde in Studien gezeigt, dass Ranolazin durch Inhibition des late I<sub>Na</sub> eine antianginöse Wirkung hat, indem es der Na<sup>+</sup>-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Überladung durch die in der Ischämiephase anfallenden Metabolite und freien Radikale um ein Vielfaches entgegen wirkt (Fraser et al. 2006; Song et al. 2006; Sossalla et al. 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Ranolazin somit den Umkehrmodus des NCX und dadurch eine diastolische Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation verhindert (Fraser et al. 2006; Song et al. 2006; Sossalla et al. 2008). Resultat ist eine Verbesserung der diastolischen Funktion (Rastogi et al. 2008; Sossalla et al. 2008; Hwang et al. 2009) ohne einen Einfluss auf Herzfrequenz oder Blutdruck zu haben. Zusätzlich zu den beschriebenen antianginösen Wirkungen zeigt Ranolazin durch Inhibition des late I<sub>Na</sub> antiarrhythmische Effekte. Diese antiarrhythmischen Wirkungen von Ranolazin beruhen zum einen auf der Verkürzung der APs (Antzelevitch et al. 2004) und zum anderen auf der Prävention einer Na<sup>+</sup>-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Überladung. Dadurch wird ein lokaler Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und die daraus resultierende Depolarisation der Zelle sowie die Entstehung von DADs verhindert (Cheng und Lederer 2008). Die ersten antiarrhythmischen Effekte von Ranolazin wurden in einem In-Vitro-Schweinmodell mit Long-QT-3-Syndrom (Wu L et al. 2004) und in einem ATX-II-Modell (Song et al. 2004) beschrieben. Sowohl die antianginöse als auch die antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin wurden in großen klinischen Studien getestet. In den Studien MARISA (*Monotherapy Assessment of Ranolazin In Stable Angina*), CARISA (*Combination Assessment of Ranolazin in Stable Angina*) und MERLIN (*Metabolic Efficiency with Ranolazin for Less Ischemia in Non-ST elevation*) (Chaitman et al. 2004; Morrow et al. 2007) wird die antiischämische und antianginöse Wirkung von Ranolazin beschrieben. In der MERLIN-TIMI 36 Studie wird ein potenter antiarrhythmischer Effekt von Ranolazin gezeigt.

Nicht nur bei Ischämie, sondern auch bei Herzinsuffizienz konnte Ranolazin, basierend auf den oben beschriebenen Mechanismen, eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären (LV) Ejektionsfraktion (EF) sowie eine Reduktion des enddiastolischen Druckes bewirken (Sabbah et al. 2002).

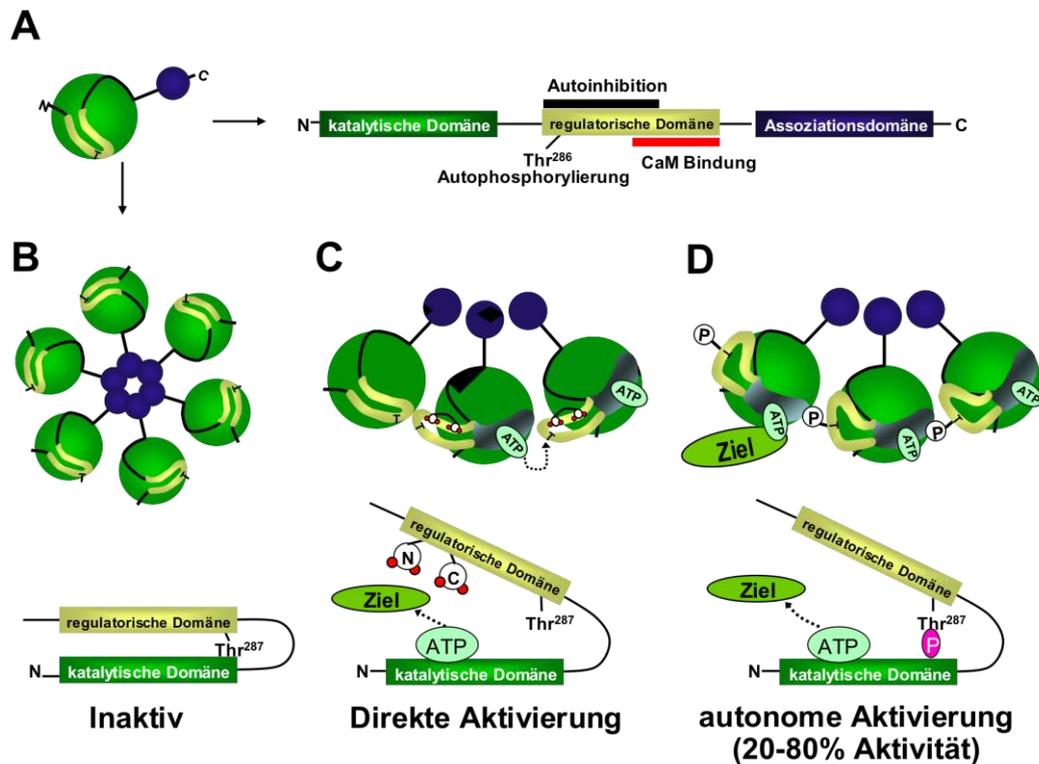
### **1.8 Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II**

Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) gehört zur Gruppe der multifunktionellen Serin/Threonin-Proteinkinasen (Braun und Schulman 1995). Es gibt verschiedene Isoformen der CaMKII, welche durch vier Gene ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) kodiert werden. Im Nervensys-

tem sind vorwiegend die CaMKII $\alpha$  und CaMKII $\beta$  exprimiert, während im Herzen hauptsächlich die CaMKII $\gamma$  sowie die CaMKII $\delta$  die häufigsten Isoformen darstellen (Tobimatsu und Fujisawa 1989; Edman und Schulman 1994; Maier und Bers 2002). Eine weitere Differenzierung der CaMKII $\delta$  erfolgt in zwei Splicevarianten mit jeweils unterschiedlicher zellulärer Lokalisation (Edman und Schulman 1994): die CaMKII $\delta_B$  kommt aufgrund ihrer Kernlokalisierungssequenz hauptsächlich im Nukleus vor, während die CaMKII $\delta_C$  im Zytosol der Kardiomyozyten lokalisiert ist (Srinivasan et al. 1994).

### 1.8.1 Struktur und Aktivierung der CaMKII

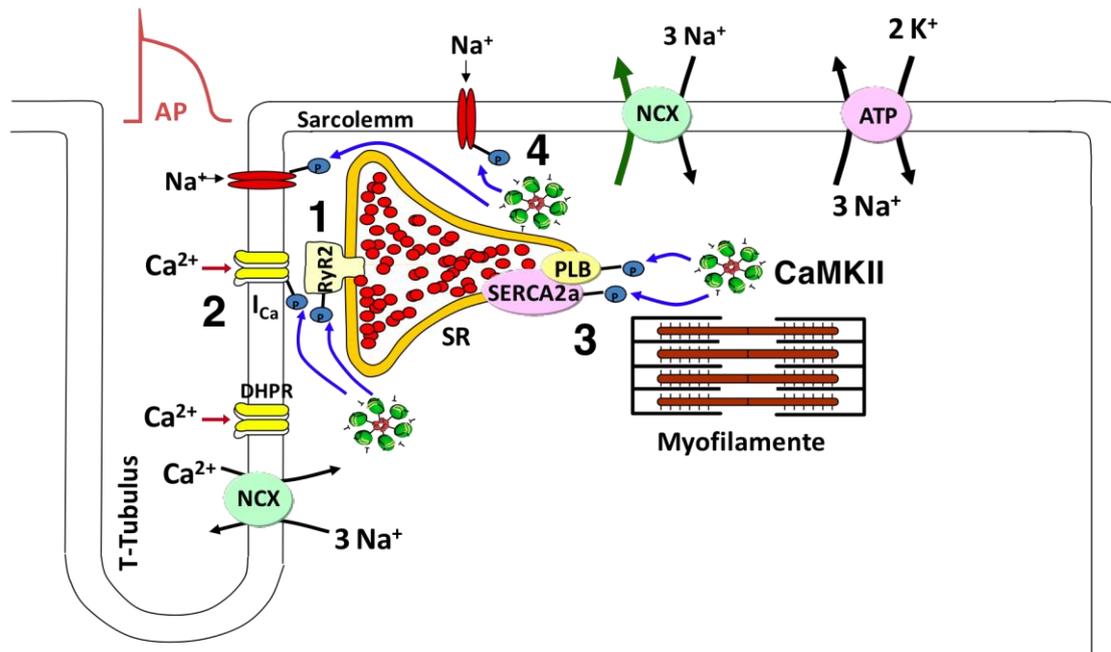
Jedes CaMKII-Monomer besteht aus einer aminoterminalen Domäne mit katalytischer Funktion, einem zentralen regulatorischen Bereich mit einer sich überlappenden Autoinhibitions- und Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindungsregion sowie aus einer carboxyterminalen Domäne, welche für die Oligomerisation des Holoenzym verantwortlich ist (**Abbildung 1.8 A**) (Maier und Bers 2002). Das CaMKII-Holoenzym besteht aus 6-12 Monomeren (Homo- oder Heteromultimeren), die sich zu einer ringförmigen Struktur gruppieren (**Abbildung 1.8 B**). Durch intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsanstieg binden vier Ca<sup>2+</sup>-Ionen an Calmodulin, bilden einen Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Komplex und binden an die zentral regulatorische Domäne der CaMKII. Durch diese Interaktion wird die autoinhibitorische Domäne verdrängt, so dass das aktive Zentrum der katalytischen Domäne nach Spaltung von ATP zur Energiegewinnung mit verschiedenen Substraten in Wechselwirkung treten kann (**Abbildung 1.8 C**). Neben der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-(CaM)-abhängigen Aktivierung kann die CaMKII selbst durch Auto-Phosphorylierung ihrer autoinhibitorischen Domäne an Threonin-286 (Thr-286) bzw. an Threonin-287 (Thr-287) aktiv bleiben (**Abbildung 1.8 D**) (Zhang und Brown 2004), welches eine Aktivitätssteigerung für den CaM-Komplex um das 700-fache bewirkt (Meyer et al. 1992). Aus diesem Grund kann die CaMKII auch nach Absinken der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Diastole über 20-80% ihrer Aktivität (Lai et al. 1986; Lou et al. 1986; Schworer et al. 1986) verfügen.



**Abbildung 1.8** Struktur und Aktivierung der CaMKII. **A:** Darstellung eines CaMKII-Monomeres aus drei Domänen. **B:** Formierung des CaMKII-Holoenzym aus seinen Monomeren mit seiner nach außen ragenden katalytischen Domäne. **C:** Direkte Aktivierung der CaMKII über den CaM-Komplex (rote Punkte). **D:** Autophosphorylierung der regulatorischen Domäne an Thr-286 bzw. Thr-287 kann die CaMKII über einen längeren Zeitraum aktiv bleiben (modifiziert nach Braun und Schulman (1995), Seite 421 sowie nach Maier und Bers 2002, Seite 924)

## 1.8.2 Funktion der CaMKII

Die CaMKII nimmt als Serin/Threoninkinase eine zentrale regulatorische Funktion in der elektromechanischen Kopplung des Kardiomyozyten ein, indem sie als Antwort auf ein erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$  verschiedene intrazelluläre Ziel-Proteine phosphoryliert. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise die SERCA2a (Xu et al. 1993), PLB (Davis et al. 1983), die RyR2 (Witcher et al. 1991; Hain et al. 1995) und Ionenkanäle wie  $\text{Na}^+$ - (Wagner et al. 2006),  $\text{K}^+$ - (Wagner et al. 2009) und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Dzhura et al. 2000) (**Abbildung 1.9**). Als Folge dieser Protein-Phosphorylierungen kann sowohl eine Aktivierung oder Hemmung der entsprechenden Proteine resultieren.



**Abbildung 1.9** Die regulatorische Funktion der CaMKII für die elektromechanische Kopplung. Die CaMKII kann durch Phosphorylierung (blaue Pfeile) unterschiedlicher Proteine, wie z.B. RyR2 (1), die SERCA2a und PLB (3),  $\text{Na}^+$ - (4) und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (2) die elektromechanische Kopplung mit beeinflussen (modifiziert nach Maier und Bers 2007, Seite 632).

### 1.8.3 Inaktivierung und pharmakologische Inhibierung der CaMKII

Verschiedene Substanzen hemmen die katalytische Aktivität der CaMKII durch Hemmung der Bindung von ATP, Blockierung der Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum (kompetitive Hemmung) oder Bindung an CaM bzw. dessen Bindungsstelle und damit Hemmung der Aktivierung des Enzyms. Die pharmakologische Hemmung der CaMKII in Kardiomyozyten kann über zwei etablierte CaMKII-Inhibitoren erfolgen. Zum einen durch das Methoxybenzoesulfonamid KN-93 und zum anderen durch das synthetische Peptid *AIP* (*Autocamtide-2-related inhibitory peptide*). Die wasserlösliche Substanz KN-93 konkurriert um die Bindungsstelle der regulatorischen Domäne der CaMKII mit CaM und hemmt somit selektiv die CaMKII, ohne dabei relevante Effekte auf andere Serin/Threonin-Kinasen, wie z.B. PKA oder PKC, auszuüben (Sumi et al. 1991). Es sind jedoch Nebeneffekte auf die L-Typ-Kalziumkanäle gezeigt worden (Li et al. 1997; Anderson et al. 1998; Gao et al. 2006). Um diesen unspezifischen Effekte auszuschließen, wird in dieser Dissertation eine Hemmung der CaMKII mit *AIP* durchgeführt. *AIP* ist ein synthetisch hergestelltes Peptid, welches eine nicht-kompetitive Inhibition der CaMKII bewirkt und die CaMKII spezifisch und sehr potent (50- bis 500-fach

potenter als KN-93) hemmt. Zusätzlich scheint *AIP* keine Nebeneffekte auf andere multifunktionale Proteinkinasen auszuüben (Ishida et al. 1995).

## **1.9 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Bisher basieren die meisten veröffentlichten Daten des late  $I_{Na}$  auf Beobachtungen und Untersuchungen in ischämischem Myokard oder im Zusammenhang mit pharmakologischen Stimulatoren des late  $I_{Na}$ , beispielsweise dem ATX-II. Im Rahmen dieser Dissertation werden Daten erhoben, die nicht auf einem Myokardischämiemodell, sondern auf einem nicht-ischämischen, Druck-induzierten Nachlastmodell basieren. Ziel der vorliegenden Dissertation ist es deshalb, den late  $I_{Na}$  und seine Bedeutung bei Nachlast-induzierter Hypertrophie und bei Herzinsuffizienz im Mausmodell zu untersuchen. Insbesondere sollen elektrophysiologische Veränderungen im Hinblick auf die Arrhythmieentstehung untersucht werden.

Daraus ergeben sich folgende konkrete Aufgabenstellungen:

1. Evaluation des late  $I_{Na}$  in seiner Ausprägung bei Hypertrophie mit erhaltener Pumpfunktion im Vergleich zur Herzinsuffizienz
2. Untersuchung eines proarrhythmogenen Potentials eines möglicherweise erhöhten late  $I_{Na}$  im Tiermodell der Nachlasterhöhung
3. Molekularbiologische Untersuchungen der zugrunde liegenden Ursachen, bezogen auf die gefundenen Veränderungen bei Hypertrophie mit erhaltener Pumpfunktion und im Vergleich zur Herzinsuffizienz
4. Überprüfung möglicher antiarrhythmogener Effekte durch therapeutische Inhibition des late  $I_{Na}$  mittels TTX, Ranolazin und *AIP*.

## 2. Material und Methoden

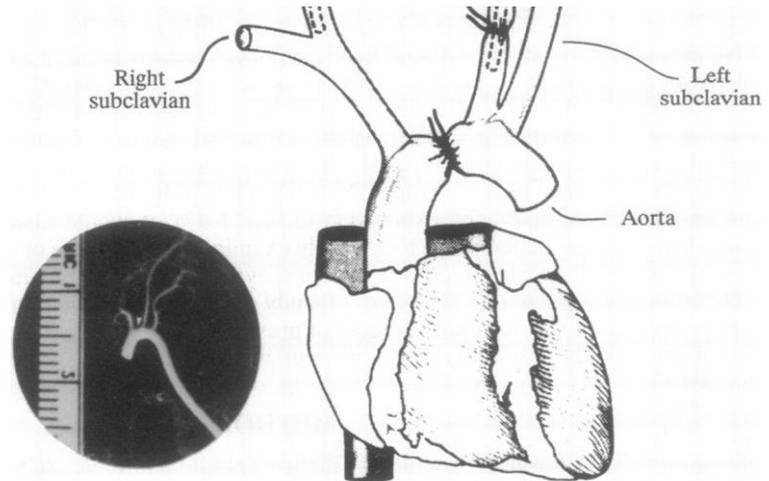
### 2.1 Generierung der verwendeten Zellen

#### 2.1.1 Transversale aortale Konstriktion (TAC)

Alle Tierexperimente wurden der örtlichen Tierschutzbehörde angezeigt (Tieversuchsanzeige 2011 „Später Natriumstrom in der Herzinsuffizienz“, Aktenzeichen G 11/0414) und in Übereinstimmung mit dem „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ (*Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996*) durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit untersucht Veränderungen an hyperthrophierten Mäuseherzen. Dazu müssen die Mäuse zunächst operiert werden. Dies gelingt mit Hilfe der transversalen aortalen Konstriktion (TAC). Diese minimal invasive Interventionstechnik wurde unter anderem von Hu und seiner Arbeitsgruppe 2003 als auch von Rockman und seinen Mitarbeitern 1991 beschrieben (Rockman et al. 1991; Hu et al. 2003). Durch die Nachlasterhöhung kommt es zu einer erhöhten Druckbelastung im linken Ventrikel und schließlich zur Hypertrophie. Für die Operation werden ausschließlich weibliche Charles-River-Mäuse mit der Kennzeichnung C57/BL6J verwendet. Das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse liegt dabei zwischen 15 und 20 g bei einem Alter von acht Wochen.

Initial wird jede Maus mit einer gewichtsadaptierten, intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg Ketanest S (Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland), und 5 mg/kg Xyazin (Bernburg Serumwerk AG, Bernburg, Deutschland) narkotisiert. Die Mäuse befinden sich dabei sowohl vor als auch nach der Operation in einem Käfig, der auf einer auf 37°C temperierten Wärmeplatte steht. Sobald die Narkose wirkt (etwa zwei bis fünf Minuten nach Injektion) wird die Maus in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und das Operationsfeld im Hals-Thorax-Bereich der Maus enthaart. Unter stereomikroskopischer Sicht (bei etwa 10-facher Vergrößerung) wird die Haut suprasternal eröffnet und eine partielle apikale Sternotomie durchgeführt. Anschließend wird der Mediastinalraum präpariert und der Arcus aortae mit dem Truncus brachiocephalicus und den Arteriae carotides dargestellt. Nachdem die Aorta aus dem umliegenden Bindegewebe gelöst und die Carotiden gut dargestellt wurden, wird ein Faden um die Aorta, zwischen Arteria communis und dem Truncus brachiocephalicus, gelegt. Zur Normierung auf einen Durchmesser wird eine 27-G-Kanüle als Platzhalter zwischen Aorta und Faden gelegt. Jetzt wird der Faden angezogen und mehrfach verknötet (**Abbildung 2.1**).



**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der transversalen aortalen Konstriktion (modifiziert nach Rockman et al. 1991, Seite 8278). Darstellung des Knotens bzw. das *banding* am Herzen einer TAC-operierten Maus zwischen dem Arcus aortae mit Truncus brachiocephalicus und den Arteriae carotides.

Nach diesem Prozedere wird der Platzhalter wieder entfernt und der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die so behandelten Tiere werden in den folgenden Untersuchungen und Messungen als TAC-Gruppe bezeichnet. Um die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe vergleichen zu können, wird ein anderer Teil der Mäuse scheinoperiert. Dabei wird ebenfalls das Mediastinum eröffnet und die Aorta mit den entsprechenden Gefäßen freipräpariert, jedoch findet bei der Kontrollgruppe (Sham = scheinoperiert) keine aortale Einengung durch einen Faden statt. Auch die Kontrollmäuse werden, nachdem die Gefäße dargestellt wurden, mit Einzelknopfnähten zugenäht und kommen ebenfalls bis zum Erwachen aus der Narkose in einen Käfig, der auf einer auf 37°C temperierten Wärmeplatte steht. Um nach erfolgtem Eingriff die TAC-Mäuse von der Sham-Kontrollgruppe trennen zu können, bekommen die Kontrolltiere ein Ohrloch geklippt. Alle Tiere bekommen zwei Tage vor der Operation bis eine Woche nach der Operation in ihr Trinkwasser eine analgetische Behandlung mit Metamizol (1,33 mg/ml) beigemischt.

In dieser experimentellen Arbeit werden die Mäuse zunächst sowohl nach sieben Tagen als auch nach 35 Tagen untersucht und gemessen. Um dabei zu kontrollieren, ob wirklich eine Hypertrophie vorliegt, werden vor der Herzisolation und den *Patch-Clamp*-Messungen echokardiologische Untersuchungen an den Mäusen durchgeführt. Somit werden die Hypertrophiekennzeichen sowie die Zunahme des Herz-Körper-Gewichtes standardisiert erfasst und dokumentiert.

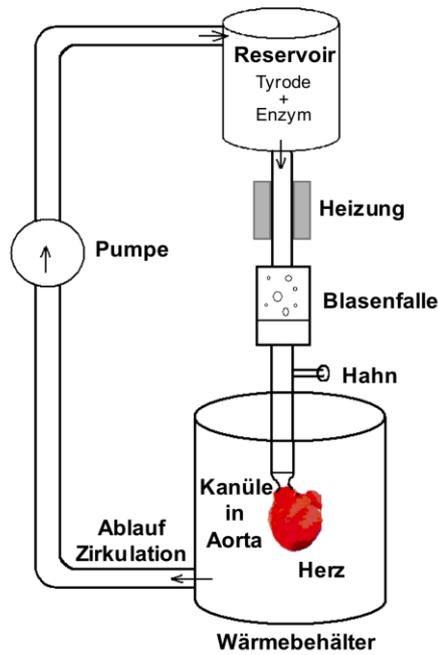
### 2.1.2 Transthorakale Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie wird mit dem Gerätesystem Vevo2100 (VisualSonics, Toronto, Kanada) durchgeführt. Dabei wird ein 30-MHz-Mittelfrequenzumwandler genutzt. Die Tiere bekommen für diese Untersuchung eine Narkoseeinleitung mit 3% Isofluran (Isofluran [1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Im weiteren Verlauf der Untersuchung erhalten die Tiere eine Narkoseerhaltungsdosis mit 1,5% Isofluran und die Atem-, EKG- und Temperaturparameter werden überwacht. Bei den Aufnahmen werden zweidimensionale *cine-loops* (= Bildschleifen) mit Bildraten von >200 Bildern/s mit einer langen Achsenansicht und einer kurzen Achsenansicht in der Mitte der Ebene der Papillarmuskeln sowie dem M-Modus der kurzen Achsenansicht aufgezeichnet. Die Dicken der Myokardvorder- und -hinterwand sowie der Innendurchmesser und die Fläche des linken Ventrikels werden nach einem Standardschema (Collins et al. 2003) in der Systole und Diastole in der kurzen Achsenansicht gemessen. Systolische und diastolische LV-Volumina werden nach der Flächen-Längen-Methode berechnet.

### 2.1.3 Isolation der Kardiomyozyten

Eine Maus wird in einem Exsikkator 500 bis 800  $\mu$ l Isofluran (Isofluran [1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) exponiert. Bei Erreichen einer ausreichenden Anästhesietiefe, welche durch eine reduzierte Atemfrequenz und Atemtiefe eindeutig zu erkennen ist, wird die Maus aus dem Exsikkator aufgenommen. Der narkotisierten Maus wird auf einer vorbereiteten Platte zügig das Genick gebrochen, indem eine Schere in den Nacken der Maus gedrückt und ruckartig am Schwanz des Tieres gezogen wird. Um sicher zu gehen, dass das Genick wirklich gebrochen ist, wird die Maus noch einmal am Schwanz gefasst und mit dem fixierten Nacken werden die Füße Richtung Kopf gerollt. Anschließend wird die Maus auf dem Rücken liegend auf einer vorbereiteten Platte fixiert. Mit einer chirurgischen Pinzette wird die Bauchdecke angehoben und mit einer feinen Schere das Abdomen eröffnet. Nach Fixierung des Sternums auf der vorbereiteten Platte wird das Zwerchfell durchtrennt, das Herz im Thorax freipräpariert, entnommen und in eine Schale mit vorbereitetem Tyrodepuffer (**Tabelle 2.1**, S. 26) überführt. Um einer Thrombenbildung vorzubeugen, wird dort das Herz manuell ausgedrückt. Ziel dabei ist es, möglichst viel Blut aus den Ventrikeln zu entfernen. Nun wird das Herz von Lungen- und Bindegewebsresten befreit, gewogen (Auswertung des Herz-/Körpergewichtsverhältnisses) und schließlich wird unter Nutzung des Binokularmikroskops (bei etwa 10-facher Vergrößerung) die Aorta aufgesucht und kanüliert. Dabei wird die Aorta unterhalb der ersten drei arte-

riellen Abgänge abgetrennt und mit zwei Splitterpinzetten über eine vorbereitete Kanüle gestülpt und mit einem Faden fixiert. Das so fixierte und kanülierte Herz wird erneut mit der oben genannten Pufferlösung gespült. Anschließend wird es für einen Zeitraum von fünf bis zehn Minuten an eine Perfusionsanlage gehängt und retrograd mit einer Enzymlösung (**Tabelle 2.2**, S. 27) bei 37°C perfundiert. Diese Perfusionsmethode, bei der durch die Aorta die Koronarien retrograd perfundiert werden, wurde 1895 erstmals von Oscar Langendorff beschrieben (**Abbildung 2.2**, S. 26) (Zimmer 1998; Bell et al. 2011). Während der retrograden Perfusion werden die interzellulären Verbindungen zerstört. Das Herz wird nach Ablauf der individuellen Perfusionszeit von der Anlage abgenommen und in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Tyrode mit einer Schere zerkleinert. Die dabei noch übrig gebliebenen größeren Stücke werden durch vorsichtiges, mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 1000  $\mu\text{l}$  Pipette zerkleinert. Die in der Tyrode befindlichen Zellen werden nun durch Nylongaze (Porengröße 200  $\mu\text{m}$ ) in einen Myozyten-Stoppuffer (**Tabelle 2.3**, S. 27) filtriert. Daraufhin werden die Zellen nach einem bestimmten Zeitintervall schrittweise vorsichtig steigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ausgesetzt. Um beim Wechsel der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösungen unnötige Scherkräfte zu vermeiden, werden die Zellen nicht zentrifugiert, sondern behutsam mit der Hand in dem Probengefäß geschwenkt und abgestellt, bis sich schließlich ein ausreichendes Sediment gebildet hat. Der Vorgang der Isolation und des anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbaus wird beendet, indem  $\sim 200 \mu\text{l}$  von der  $\text{Ca}^{2+}$ -aufkonzentrierten Zellsuspension auf der Versuchskammer verteilt werden, die zuvor mit 1,5  $\mu\text{l}$  Laminin (Lot: 039K4001 von Sigma Aldrich, München, Deutschland) beschichtet worden ist. Durch das Laminin wird ein Anheften der Kardiomyozyten auf der Versuchskammer erzielt.



**Abbildung 2.2** Schematische Darstellung der zur Isolation von Mäusemyozyten verwendeten Perfusionsanlage nach Langendorff (modifiziert nach Rasenack 2006, Seite 35)

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	113,0
NaHCO <sub>3</sub>	84,0	12,0
KCl	74,6	4,7
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	178,0	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	0,6
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	246,5	1,2
KHCO <sub>3</sub>	100,1	10,0
HEPES	238,3	10,0
Phenol-red	376,4	0,032
Taurine	125,1	30,0
Glukose	180,2	5,5
2,3-Butandion-Monoxime (BDM)	101,1	10,0

**Tabelle 2.1** Stammlösung (ad 1000 ml Aqua bidest) ohne Ca<sup>2+</sup> für die Myozytenisolation (pH-Wert bei 7,54 bei RT)

<b>Substanz</b>	
Liberase TM (100 mg) (Roche)	300,0 $\mu$ l
Trypsin (2.5%) (GIBCO)	111,2 $\mu$ l
Kalziumchlorid (10 mM) (Sigma)	25,0 $\mu$ l

**Tabelle 2.2** Enzymlösung (ad 20 ml Stammlösung)

<b>Substanz</b>	
Bovine calf serum (10%)	0,25 ml
Kalziumchlorid (10 mM)	3,13 $\mu$ l

**Tabelle 2.3** Myozyten-Stoppufferlösung (ad 2,25 ml Stammlösung)

## 2.2 Die Patch-Clamp-Technik

Die Technik der *Patch-Clamp*-Messung wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 entwickelt (Neher und Sakmann 1976). Sie erhielten für diese Methode 1991 den Nobelpreis für Medizin. Das Besondere an dieser Technik ist, dass hier die Möglichkeit besteht, eine sehr kleine Fläche (ca. 1  $\mu$ m) einer Zellmembran zu isolieren (*patch*). Es handelt sich dabei um eine Methode, mit der sich der Strom durch Ionenkanäle in der Membran lebender Zellen messen lässt. Ein Verstärker ermöglicht die Erfassung sehr kleiner Ströme im Picoampere (pA)-Bereich bei guter zeitlicher Auflösung (von 100-300 kHz). Dabei wird eine sehr feine, Elektrolyt-gefüllte Mikropipette aus Glas an die Zelle herangeführt und eng auf die Zellmembran aufgesetzt. Dadurch wird das Stück Membran (*patch*) elektrisch von der Umgebungslösung isoliert. Um eine dichte Verbindung zwischen der Zellmembran und der Glaskapillare zu erreichen, wird ein leichter Unterdruck angelegt. Somit wird die Membran angesaugt. Dabei kommt es zu einem *gigaseal* (engl.: *to seal* = verschließen), wenn der Kriechwiderstand zwischen Glas und Membran einige G $\Omega$  beträgt. Ist der *gigaseal* erreicht, kann sowohl der Strom bei unterschiedlichen Spannungen (*voltage-clamp*) als auch die Spannung bei vorgegebenem Strom (*current-clamp*) gemessen werden.

### 2.2.1 Elektrophysiologische Grundlagen

Der Ionentransport über eine Membran, der sowohl eine elektrische als auch chemische Triebkraft sein kann, stellt eine Potential- bzw. Konzentrationsdifferenz über dieser Membran dar. Da mit Hilfe der Nernst-Gleichung die chemische und elektrische Triebkraft in ein entsprechendes Potential umgerechnet werden kann, kann die Summe der beiden Triebkräfte auch als elektrochemisches Potential  $E_x$  angegeben werden. Somit ist  $E_x$  das Gleichge-

wichts- oder auch Nernstpotential für das entsprechende Ion X, wobei kein Nettostrom über die Membran fließt.

$$E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \ln\left(\frac{c_a}{c_i}\right)$$

**Formel 2.1** Gleichgewichts-/Nernstpotential.  $E_x$  = elektrochemisches Potential, R = allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T = absolute Temperatur, F = Faraday-Konstante ( $96485 \text{ As mol}^{-1}$ ), z = Wertigkeit des entsprechenden Ions

Beispielsweise ergibt sich so ein Gleichgewichtspotential für  $\text{Na}^+$  von 68 mV. Um die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle zu ermitteln (Leitfähigkeit g), benötigt man noch zusätzliche Größen: Zum einen den normalisierte Messstrom I (nach dem Ohm'schen Gesetz),

$$I = \frac{U}{R}$$

**Formel 2.2** Messstrom I (nach dem Ohm'schen Gesetz [A])

den Kehrwert des Widerstandes (Leitfähigkeit g [Siemens]),

$$I = U \cdot g \text{ oder } g = \frac{I}{U}$$

**Formel 2.3** Messstrom I und die Umrechnung auf die Leitfähigkeit (Leitfähigkeit g [Siemens])

und zum anderen die Spannung U, die sich aus der im Messprotokoll gegebenen Spannung  $U_{\text{soll}}$  abzüglich des Gleichgewichtspotentials  $E_x$  ergibt. Daraus folgt:

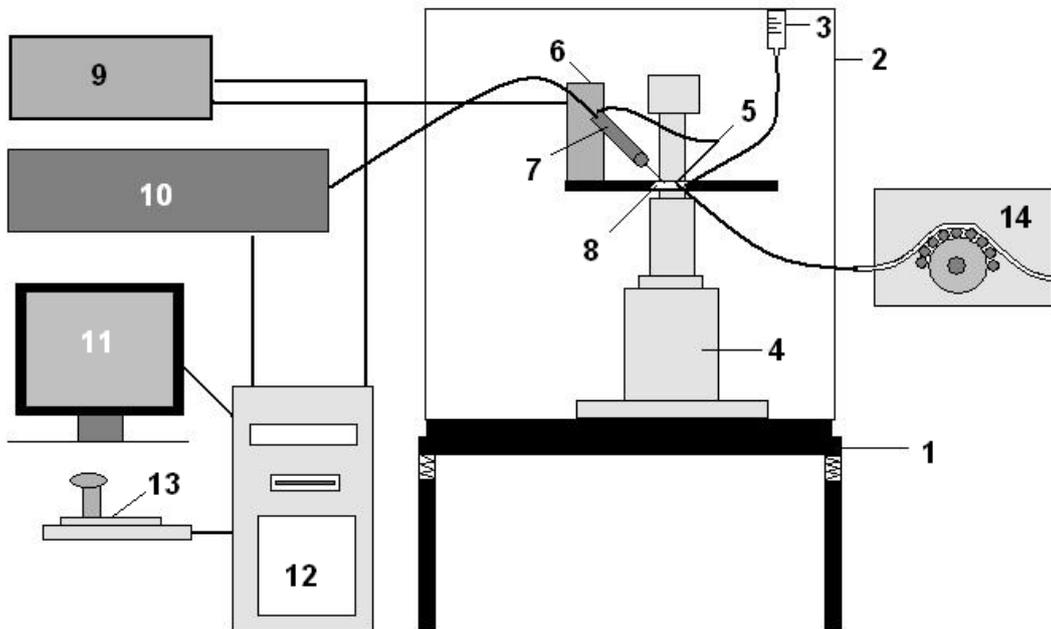
$$g = \frac{I}{U_{\text{soll}} - E_x}$$

**Formel 2.4** Kehrwert des Widerstandes (Leitfähigkeit g [Siemens])

Um Änderungen des Membranpotentials zu verhindern, wird die zu untersuchende Zelle bei der *voltage-clamp*-Messung auf eine bestimmte Spannung „festgeklemmt“. Dies funktioniert mittels eines entgegengesetzten Kompensationsstroms, der genauso groß ist wie der Strom, der über die Membran fließt. Dabei misst der Verstärker (EPC-10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) das aktuelle Membranpotential, vergleicht es mit der Sollspannung und erzeugt daraufhin den Kompensationsstrom. Der tatsächliche Messstrom wird dann nach Abzug des Kompensationsstroms ermittelt und erlaubt Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der zu untersuchenden  $\text{Na}^+$ -Kanäle.

### 2.2.2 Das Patch-Clamp-Setup

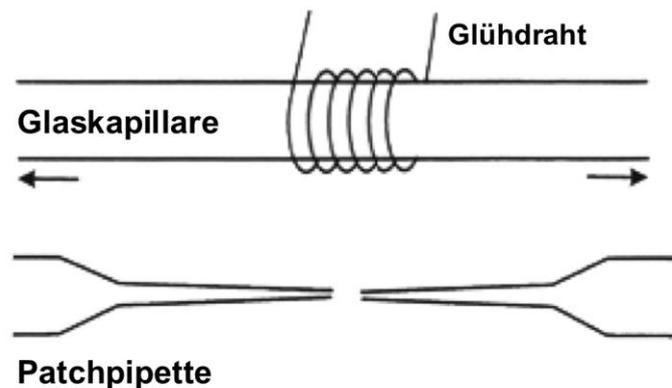
Die Patchanlage steht in einem vom eigentlichen Labor abgetrennten Raum. Dieser Raum besitzt kein Fenster um eventuelle Luftströme zu minimieren. Um die eigentliche Versuchskammer gegen elektrische Ströme abzuschirmen, befindet sich die Anlage innerhalb eines Faraday'schen Käfigs. Um zudem eventuelle Gebäudeschwingungen auszugleichen, ist die Anlage zusätzlich auf einem schwingungsgedämpften Tisch befestigt. Die eigentliche Messkammer liegt in einer Vertiefung eines Inversmikroskops (Aiovert 200/Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die bis zu 400-fache Gesamtvergrößerung des Mikroskops ergibt sich aus einem 40x-Objektiv und einem 10x-Okular. Des Weiteren ist am Arbeitstisch ein Pipettenhalter mit einer Pipettenelektrode befestigt. Diese hat einen Anschluss für Unter- und Überdruck und kann über einen Mikromanipulator (Micromanipulator 5170/Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe eines Steuerungshebels (*Joystick*) in der Kammer bewegt und gesteuert werden (**Abbildung 2.3**). Die Pipetten- und Referenzelektroden sind über einen Vorverstärker (*Probe*) mit einem *Patch-Clamp*-Verstärker (EPC-10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) mit integriertem Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler (AD/DA-Wandler) verbunden. Dieser Verstärker (*Amplifier*) kann das Signal filtern, verstärken und umwandeln, so dass es für den angeschlossenen Computer möglich ist, mittels des Programms Patchmaster 2.0 (Software Patchmaster™, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) die Daten aufzunehmen und darzustellen. Der Computer sowie alle anderen Netzgeräte, Verstärker und Kabel sind außerhalb des Faraday'schen Käfigs positioniert, um die Messkammer so gut wie möglich von eventuellen Strömen zu isolieren. Im Faraday'schen Käfig befindet sich lediglich eine Haltevorrichtung für die unterschiedlichen Perfusionssysteme. Diese stellen den Zulauf für die verschiedenen Badlösungen dar (**Abbildung 2.3**). Die Superfusion erfolgt durch Gravitation mit einem Fluss von etwa 70 ml/h, die kontinuierliche Absaugung des Mediums erfolgt über eine regelbare Walzenpumpe (Modell MV-CA/Ismatec GmbH, Werthheim-Monfeld, Deutschland). Die Temperatur der Badlösung entspricht der Raumtemperatur.



**Abbildung 2.3** Schematische Darstellung des *Patch-Clamp*-Aufbaus: **1)** Schwingungsgedämpfter Tisch, **2)** Faraday'scher Käfig, **3)** Perfusionssystem, **4)** inverses Mikroskop, **5)** Referenzelektrode in der Badlösung, **6)** Motoreinheit des Mikromanipulators, **7)** Vorverstärker (*Probe*) mit Pipettenhalter und Pipette, **8)** Versuchskammer mit Myozyten, **9)** Steuereinheit des Mikromanipulators, **10)** *Patch-Clamp*-Verstärker (*Amplifier*) mit integriertem AD/DA-Wandler, **11)** Bildschirm, **12)** Computer, **13)** Steuerungshebel (*Joystick*), **14)** Walzenpumpe (modifiziert nach Rasenack 2006, Seite 42).

Die zum Messen benötigten Pipetten werden durch ein Ziehgerät (DMZ Universal-Puller, Firma Zeitz-Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) vor jeder Messung neu gezogen und nach Hitze-politur verwendet. Die dabei benutzten Pipetten sind Borosilikatglaskapillaren (TW 150 F-3 World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA). Sie haben einen Außendurchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 1,2 mm und eine Länge von 76 mm. Durch verschiedene Heizschritte entstehen aus einer Kapillare jeweils zwei spitze Pipetten (**Abbildung 2.4**). Durch die Veränderung einzelner Parameter wie beispielsweise Zugkraft, Hitze, Zugintervall etc. können die Spitzen der Pipetten so variiert und optimiert werden, dass der Widerstand nach Befüllen mit der entsprechenden Pipettenlösung zwischen 2-3 M $\Omega$  liegt. Die Befüllung mit Pipettenlösung erfolgt unmittelbar vor Benutzung mit Hilfe einer Einfüllhilfe (Microfil/World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) über einen Filter (0,2  $\mu$ m Porengröße, Filtrapur, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland). Wichtig ist, dass jede Pipette nur einmal verwendet werden darf, da für die *Sealbildung* ihre Öffnung komplett sauber und frei von in der Badlösung schwimmenden Membranresten sein muss.

Der oben genannte Pipettenwiderstand sollte zwischen 2-3 M $\Omega$  liegen, da gezeigt wurde, dass dieser Bereich ein Kompromiss zwischen einem geringen Pipettenwiderstand, der in der Regel die Registrierung von Strömen erleichtert, und dem Pipettendurchmesser ist. Ein zu großer Pipettendurchmesser würde die Bildung eines *gigaseals* dementsprechend negativ beeinflussen (Numberger und Draguhn 1996). Außerdem werden explizit Borosilikatkapillaren zum Herstellen der Pipetten verwendet, da diese das elektrische Hintergrundrauschen, welches auf der gesamten Oberfläche der Zelle bzw. Membran durch Kanäle und Ionentransporter hervorgerufen wird, zusätzlich minimieren. Die Messelektrode sowie die Badelektrode (Erdleiter der Badlösung) bestehen beide aus einem chlorierten Silberdraht (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland).



**Abbildung 2.4** Prinzip des Pipettenziehgerätes (nach INFO PHYS TECH 2005, Nr. 61, Seite 2): Die Glaskapillaren wurden horizontal eingelegt und unter Erhitzen auseinandergezogen. Durch Anpassung von Zugkraft, Hitze und Zugintervall lässt sich die Pipettenform entsprechend der gewünschten Anforderung einsetzen.

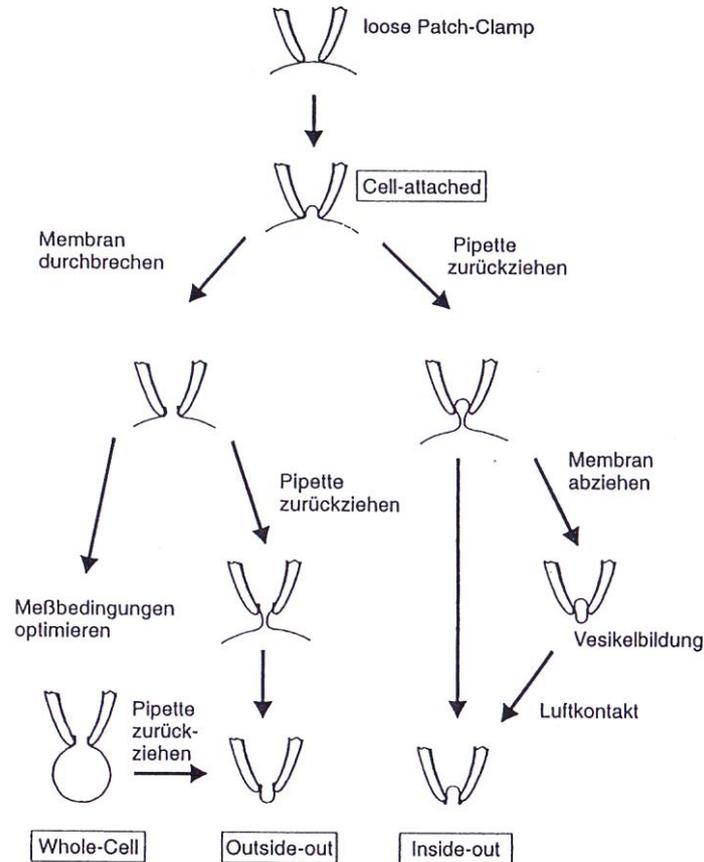
### 2.2.3 Versuchsdurchführung

Die bei den Versuchen verwendete Badlösung entspricht in der Zusammensetzung ihrer Ionen der Zusammensetzung des physiologischen Extrazellularraumes (**Tabelle 2.4 + 2.6**, S 35 + 37). Jedoch sind Kaliumionen ((K<sup>+</sup>)-Ionen) durch Cäsiumionen ((Cs<sup>+</sup>)-Ionen) ersetzt, um keine K<sup>+</sup>-Kanäle passieren zu können und Leckströme zu verhindern. Die in den Versuchen ebenfalls erforderliche Pipettenlösung entspricht in ihrer Zusammensetzung dem physiologischen Intrazellularraum (**Tabelle 2.5 + 2.7**, S. 36 + 37). Auch hier wurden die K<sup>+</sup>-Ionen durch Cs<sup>+</sup>-Ionen ersetzt.

Der kühl (bei 4-8° C) gelagerten Badlösung wird vor jeder Messung noch Glukose und Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) in den entsprechenden Konzentrationen (siehe **Tabelle 2.4 + 2.6**) hinzu

gegeben und die gesamte Lösung auf einen physiologischen pH-Wert von etwa 7,4 mit einem pH-Meter eingestellt. Falls es die Messungen erfordern, wird noch eine Lösung mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin oder 2  $\mu\text{mol/L}$  TTX vorbereitet (Belardinelli et al. 2006; Song et al. 2008). Die so angefertigte Badlösung wird nun in das Perfusionssystem der *Patch-Clamp*-Anlage gefüllt. Die ebenfalls kühl (bei  $-20^\circ\text{C}$ ) gelagerte Pipettenlösung wird aufgetaut und in eine vorbereitete Spritze aufgezogen und anschließend mit einer Einfüllhilfe und einem Filter versehen. Während der Messungen wird diese Spritze auf Eis gelagert. Nachdem die Versuchskammer etwa fünf Minuten mit der in dem Perfusionssystem befindlichen Badlösung durch Gravitation mit einem Fluss von etwa 70 ml/h eingewaschen und durch kontinuierliche Absaugung des Mediums über eine regelbare Walzenpumpe (**Abbildung 2.3**, S. 30) gespült wurde, wird die Glaspipette wie zuvor beschrieben mit dem Pipettenziehgerät gezogen, vorbereitet und in den Pipettenhalter eingespannt. Mit Hilfe einer kleinen Spritze wird nun ein leichter Überdruck im Pipetteninneren erzeugt. Dies soll ein Verstopfen der Spitze mit Schmutz- oder Zellpartikeln verhindern. Zudem erzeugt der Überdruck im Pipetteninneren ein Flüssigkeitspolster vor der Pipettenspitze, welches beim Annähern an die Membran hilfreich sein kann. Mit Hilfe des *Joysticks* wird nun die Pipette vorsichtig in die Versuchskammer abgesenkt. Dabei ist zu beachten, dass die Luft-Flüssigkeitsgrenze nur einmal durchquert wird. Am Computer erscheint nach Durchtritt der Pipette durch die Luft-Flüssigkeitsschranke ein biphasischer, rechteckförmiger Kommandospannungsimpuls (5 mV Amplitude in beide Richtungen). Mit dem Mikromanipulator und dem *Joystick* als Steuerungshebel wird die Pipettenspitze unter Sicht auf die Zelle bewegt. Die letzten Schritte dieser Annäherung an die Zelle erfolgen unter ständiger Beobachtung des angezeigten Stroms auf dem Computerbildschirm. Dieser Strom, der durch den Testpuls verursacht wird, ist ein indirektes Maß für den Widerstand zwischen beiden Elektroden (Ohm'sches Gesetz). Während der Annäherung an die Zellmembran erhöht sich der Widerstand zum Teil bis auf das Doppelte, was an einer Abnahme der Stromamplitude um die Hälfte zu erkennen ist. Jetzt wird der Überdruck von der Pipette genommen und man erzeugt mit Hilfe der Spritze einen leichten Unterdruck, wodurch sich der Widerstand vom Megaohmbereich auf einige Gigaohm (*gigaseal*) erhöht. Nach der Bildung dieses sogenannten *gigaseals* befindet sich die Zelle in der Versuchskammer in der *cell-attached*-Konfiguration (**Abbildung 2.5**). Dabei bleibt die Membran der Zelle intakt. Diese Messkonfiguration hat den Vorteil, dass die intrazellulären Ionenkonzentrationen unbeeinflusst bleiben. Für die Messungen zu dieser Dissertation verwendeten wir allerdings nicht die *cell-attached*-Konfigurationen, sondern die *whole-cell*-Konfiguration (Ganzzelleableitung, **Abbildung 2.5**). Dies ist die am häufigsten verwendete Methode der *Patch-Clamp*-Technik. Dabei wird die gesamte Membran einer Zelle und nicht nur der unter der Pipette befindliche Zellausschnitt erfasst. Das hat den Vorteil, dass die Mes-

sungen schneller und auch einfacher als Einzelkanalmessungen sind, und durch den Austausch von Zytoplasma mit dem Zellinneren kann in kurzer Zeit eine klar definierte, kontrollierte Zusammensetzung des Intrazellularraumes erreicht werden.



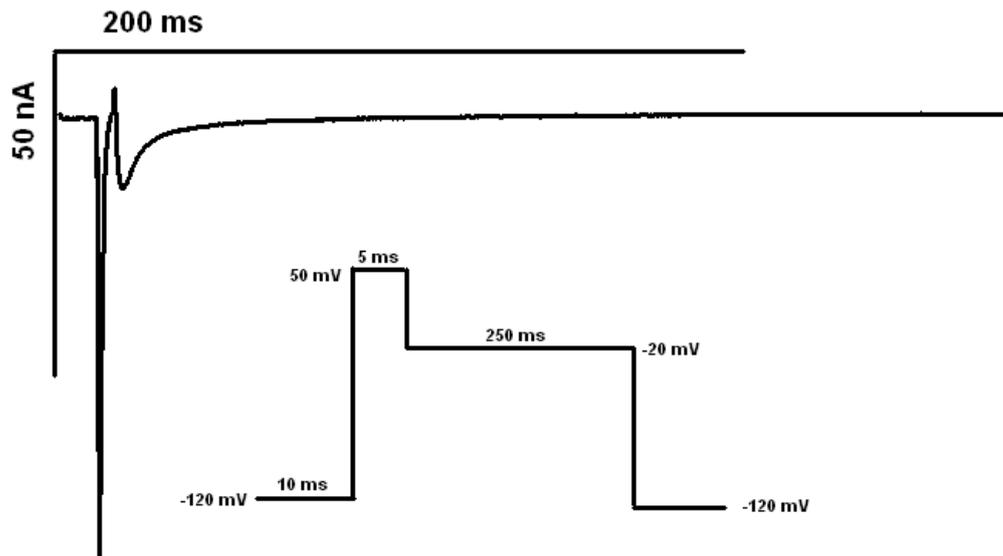
**Abbildung 2.5** Messkonfigurationen und ihre Herstellung (modifiziert nach Numberger und Draguhn, Seite 82)

Ein *gigaseal* erkennt man daran, dass sich die Stromantwort des Kommandospaltungspulses verändert. Dabei bildet sich aus den biphasischen Verläufen eine horizontale Linie. Das bedeutet, dass der Abstand zwischen Pipette und Zellmembran so klein geworden ist, dass kaum noch ein Strom fließen kann und der Widerstand maximal angestiegen ist. Somit besteht ein lückenloser Kontakt zwischen Pipette und Membran. Daraufhin wird im Patchmasterprogramm auf *on-cell*-Modus umgeschaltet. Dabei werden die kapazitiven Ströme, welche durch Umladeprozesse der Pipetten- und Zellmembrankapazität bei Spannungsänderung entstehen und unsere Messsignale stören können, kompensiert. Diese kompensierten Ströme von Pipette und Membran werden als schnelle Transienten am Anfang und am Ende des Spannungspulses wahrgenommen. Durch kurzes Anlegen eines ruckartigen Unterdrucks, dem sogenannten *rupturing*, wird das Membranstück in der Pipette zerstört und es entsteht

ein offener Zugang zum Zytoplasma der Herzmuskelzelle. Die *whole-cell*-Konfiguration ist erreicht (**Abbildung 2.5**). Das bedeutet, dass die Ströme nun nicht mehr über den *patch* sondern über die gesamte Zellmembran gemessen werden. Nun kann das Potential der Zelle durch das Kommandopotential der verschiedenen zu messenden Protokolle vorgegeben werden (Messprinzip der Spannungsklemme oder *voltage-clamp* genannt). Es ist zu beachten, dass das *gain* oder auch Verstärkung genannt, bei jeder Messung an die Stromamplitude angepasst werden muss, um ein einwandfreies und auswertbares Signal erhalten zu können. Nachdem der Zugang zum Zellinneren hergestellt wurde, wird Pipettenlösung und Zellinnerem ein Zeitraum von fünf Minuten gegeben, um einen Ausgleich zwischen Pipettenlösung und Zytoplasma bis zur Ausbildung eines Äquilibrium zu ermöglichen. Ebenfalls muss den eingesetzten Inhibitoren, wie zum Beispiel Ranolazin, TTX oder *AIP* Zeit bis zum Wirkungseintritt gegeben werden. Erst nach Ablauf dieser fünf Minuten wird mit Auslösung der einprogrammierten Protokolle bzw. den eigentlichen Messungen begonnen.

### 2.2.4 Messung des späten Natriumstroms (late $I_{Na}$ )

Bei den Messungen des late  $I_{Na}$  wird ein Standardprotokoll (**Abbildung 2.6**) verwendet. Der dabei ausgelöste late  $I_{Na}$  wird bei vier unterschiedlichen Frequenzen (0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz) untersucht. Das Standardprotokoll des late  $I_{Na}$  ist so eingestellt, dass die Zelle nach Erreichen des *whole-cell*-Modus zunächst auf ein Ruhemembranpotential ( $E_m$ ) von -120 mV eingestellt wird. Dieses Membranpotential von -120 mV wird für eine Dauer von 10 ms gehalten. Anschließend wird es für 5 ms auf 50 mV depolarisiert. Nach Ablauf der 5 ms wird das Membranpotential für 250 ms bei -20 mV gehalten, um dann wieder auf -120 mV normalisiert zu werden. Diese Messungen werden die ganze Zeit in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt (**Abbildung 2.5**).



**Abbildung 2.6** Beispiel einer Originalabbildung mit Standardprotokoll für die *Patch-Clamp*-Experimente des späten Natriumstroms (late  $I_{Na}$ ).

Die für diese Messungen notwendigen Bad- und Pipettenlösungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Der Abfall des late  $I_{Na}$  (die ersten 250 ms) wird bei der Auswertung mit einer Doppelsexponentialfunktion  $y(t)=A_1\exp(-t/\tau_1)+A_2\exp(-t/\tau_2)+y_0$  gemessen bzw. gefittet (engl.: *to fit* = anpassen). Gefittet werden die Messungen wegen unterschiedlicher Zellgrößen von TAC und Sham. Bei Integralen müsste normiert werden auf die Membrankapazität, die, wie beschrieben, unterschiedlich sind.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	130,0
CsCl	168,4	4,0
MgCl <sub>2</sub>	95,2	1,0
CaCl <sub>2</sub>	75,5	1,0
HEPES	238,3	10,0
Glukose	180,2	10,0
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	101,1	10,0

**Tabelle 2.4** Die zur Messung des late  $I_{Na}$  verwendete Badlösung (ad 100 ml Aqua bidest) bei einem pH-Wert 7,40, bei RT und mit TRIS eingestellt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	10,0
MgCl <sub>2</sub>	95,2	0,92
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	147,0	1,49
CsCl	168,4	40,0
Cs-Glutamat	147,1	80,0
BAPTA-tetracesiumsalz	1004,0	5,0
5,5-dibrom-BAPTA-terapotassiumsalz	786,6	1,0
Magnesium-Adenosin-5'-triphosphat	507,2	5,0
Guanosine-5'[γ-thio]-triphosphat-Lithiumsalz	563,0	0,3
Niflummat (Sigma Aldrich)	282,2	0,03
Nifedipin (Sigma Aldrich)	346,3	0,02
Strophanthidin (Sigma Aldrich)	404,5	0,004
HEPES	238,3	10,0

**Tabelle 2.5** Die zur Messung des late  $I_{Na}$  verwendete Pipettenlösung (ad 50 ml Aqua bidest) bei einem pH-Wert 7,20 bei RT mit CsOH eingestellt, aliquotiert (aufgeteilt) und bei -20° C aufbewahrt.

### 2.2.5 Messung von Aktionspotentialen (APs)

Für die Messungen von APs geht man, wie oben beschrieben, bis zum Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration vor. Bei den AP-Messungen wird nach Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration auf die *current-clamp*-Messung (C-Clamp) in der Software Patchmaster™ umgeschaltet. Da das physiologische, elektrische Verhalten von erregbaren Zellen grundsätzlich aus der Summe der offenen Ionenkanäle besteht, resultieren daraus auch dauernde Potentialschwankungen. Bei *voltage-clamp*-Messungen, die dazu geeignet sind, einzelne Ströme getrennt zu analysieren, sind diese Potentialschwankungen bei den Messungen nicht weiter störend. Um aber eine Aussage über das Erregungsmuster einer Zelle zu erhalten, ist es notwendig, diese Potentialschwankungen einzugrenzen. Dies erreicht man durch Umschaltung in der Software Patchmaster™ in den *current-clamp*-Modus oder Stromklemmanordnung genannt. Somit wird der Strom, der durch die Membran fließen soll, fest vorgegeben und das Membranpotential der Zelle bleibt variabel.

Bei den AP-Messungen sind die Ströme so gewählt, dass das physiologische Potential von Herzmuskelzellen von etwa -70 mV eingehalten wird. Es ist darauf zu achten, dass der eingestellte Strom einen Wert von 50-100 pA nicht übersteigt. Im weiteren Verlauf wird mit einer im Messprotokoll vorgegebenen Dauer (*duration*) von 4 ms und einer vorgegebenen Stromspannung (*current*) von 399 pA die Zelle stimuliert. Wird hierbei kein AP ausgelöst, wird durch Veränderung der beiden Parameter versucht, ein AP auszulösen (**Abbildung 2.7**).

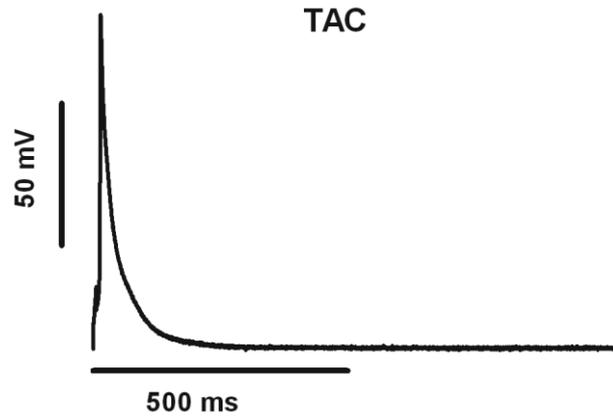


Abbildung 2.7 Originalregistrierung einer AP-Messung.

Die bei den AP-Messungen eingesetzten Lösungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	135,0
KCl	74,6	5,4
MgCl <sub>2</sub>	95,2	1,0
CaCl <sub>2</sub>	75,5	2,0
HEPES	238,3	10,0
Glukose	180,2	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	178,0	0,33

**Tabelle 2.6** Badlösung AP-Messungen (ad 100 ml Aqua bidest) bei einem pH-Wert 7,40 bei RT mit NaOH eingestellt und bei 4° C aufbewahrt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	7,0
KCl	74,6	8,0
MgCl <sub>2</sub>	95,2	1,0
DL-Aspartic-Acid-Potassium	171,2	120,0
HEPES	238,3	10,0
Magnesium-Adenosin-5'-triphosphat	507,2	5,0

**Tabelle 2.7** Pipettenlösung AP-Messungen (ad 25 ml Aqua bidest) bei einem von pH-Wert 7,20, bei RT mit TRIS eingestellt und bei -20° C aufbewahrt.

## 2.2.5.1 Auswertung der APs

Die Rohdaten der registrierten APs wurden aus der „Pulse“-Software exportiert, mittels „ABF-Utility“ (Synaptosoft Inc., Fort Lee, USA) konvertiert und in die „Clampfit“-Software (Clampfit 8/Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) importiert. Hieraus erfolgt der Export eines APs in eine hierfür in MS-Excel (Microsoft Corp., Redmond, USA) geschriebene Auswertungstabelle.

## 2.2.5.2 AP-Kenngrößen

Amplitude (mV):	Die Differenz aus <i>Peak</i> und MDP (maximal diastolische Polarisation).
APD <sub>50/80/90</sub> :	Die Aktionspotentialdauer vom Beginn des APs bis zu einer gewissen (50/80/90%igen) Repolarisation.
<i>Duration</i> (ms)	Dauer des APs.
V <sub>max</sub> (dV/dt)	Die Depolarisationsgeschwindigkeit während des Aufstrichs des APs ergibt sich als Membranpotentialänderung pro Zeit [dV/dt]. Die maximal während des APs erreichte Depolarisationsgeschwindigkeit (V <sub>max</sub> ) ist also die Tangente der Aufstrichkurve an der Stelle ihrer maximalen Steigerung. dV/dt ergibt sich als Quotient der Differenz der Membranpotentiale zweier aufeinanderfolgender Aufzeichnungspunkte durch deren zeitlichen Abstand.

$$dV/dt = \frac{V(t_{n+1}) - V(t_n)}{t_{n+1} - t_n} \quad [dV/dt] = \frac{mV}{ms}$$

**Formel 2.5** Berechnung V<sub>max</sub> (modifiziert nach Neef 2011, S. 50)  
Dieses wird in der Auswertungstabelle für jeden einzelnen Aufzeichnungspunkt berechnet. V<sub>max</sub> ist das positive Maximum der für das AP bestimmten Werte.

*Peak* (mV): Der positive Maximalwert des Membranpotentials im AP.

Membrankapazität (pF): Maß für die Oberfläche der Myozyten. Änderungen der Kapazität werden entsprechend als Änderung der Oberfläche gewertet.

$$C_m = \frac{\tau}{R_s}$$

**Formel 2.6** Berechnung der Membrankapazität.  
 $C_m$ =Zellmembrankapazität,  $R_s$ =Serienwiderstand,  
 $\tau$ =Zeitkonstante

Stimulation *duration* (ms) Stimulationsdauer, die benötigt wird, um ein AP auszulösen.

Stimulation *current* (pA): Stimulationsspannung, welche benötigt wird, um ein AP auszulösen.

### 2.3 Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen

Zur Bestimmung der Proteinexpressions- und Phosphorylierungsanalysen aus Mäusemyokard wurde die Western-Blot-Methode verwendet. Zur Gewinnung der Proteine wurden das Myokard zunächst mit 200-300 µl Homogenisierungspuffer (**Tabelle 2.8**) versetzt und mit Micra D-1, DS-5/K1 (ART Prozess- & Labortechnik GmbH, Mühlheim, Deutschland) bei maximaler Geschwindigkeit viermal für jeweils fünf Sekunden homogenisiert und anschließend für 20 Minuten inkubiert. Dabei erfolgt im Abstand von fünf Minuten jeweils eine Verwirbelung (= Vortexung) der Proben, so dass die Proteine freigesetzt werden konnten. Der beschriebene Ablauf erfolgt auf Eis. Nuclei und der Zelldetritus wurden im Anschluss durch eine Zentrifugation der Homogenate für zehn Minuten bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 3000x g durchgeführt. Der dabei entstehende Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und das Pellet erneut mit 200 µl Homogenisierungspuffer versetzt und mit etwa acht Schlägen eines Handhomogenisators (Art. Nr. 710399, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) weiter homogenisiert. Die so entstandene Suspension wird auf Eis für weitere 30 Minuten inkubiert und im Anschluss, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die Überstände dieser beiden Zentrifugationsschritte werden zusammen gegeben und die Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Verfahrens unter Verwendung eines BCA-Protein-Systems (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt. Dafür wurden je 5 µl des Überstandes mit 95 µl PBS (engl.: *phosphat buffered saline* = phosphathaltige Salzlösung) verdünnt und von dieser Mischung jeweils 25 µl in drei *Wells* (engl.: *well* = Schacht) einer 96-*Well*-Platte pipettiert. Als Kontroll- bzw. Negativprobe wird eine Lösung aus 5 µl Homogenisierungspuffer (**Tabelle 2.8**) und 95 µl PBS hergestellt und ebenfalls auf die 96-*Well*-Platte pipettiert. Im

Anschluss werden 200 µl der Farbstofflösung aus dem BCA-Protein-Systems auf die Proben gegeben, diese auf einem Thermomixer geschüttelt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um genaue Aussagen zur Proteinkonzentration treffen zu können erfolgte schließlich eine Extinktionsmessung mit einem Photometer bei 562 nm. Pro Probe werden somit drei Proteinkonzentrationen erhalten, aus denen ein Mittelwert berechnet und der Wert der Kontroll-/Negativproben abgezogen wurde. Bei einer Abweichung der einzelnen Proben von mehr als 10% untereinander wurden die Experimente erneut durchgeführt.

Zur weiteren Denaturierung und Reduktion der Proteine wurden diese mit Lämmli-Puffer (**Tabelle 2.9**) versetzt und für zehn Minuten bei 70°C inkubiert.

Substanz	10 ml	Endkonzentration
Tris-HCl (pH=7,4) [2 M]	100 µl	20 mM
NaCl [4 M]	500 µl	200 mM
NaF [200 mM]	1000 µl	20 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> [100 mM]	100 µl	1 mM
Dithiothreitol (DTT) [100 mM]	100 µl	1 mM
Triton X-100 1%	100 µl	1%

**Tabelle 2.8** Homogenisierungspuffer. Mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml auffüllen. Vor Gebrauch PhosSTOP (Cat. No. 04906845001, Roche®, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablette hinzugeben (Cat. No. 04693132001, Roche®, Grenzach-Wyhlen, Deutschland).

Substanz	20 ml	Endkonzentration
Tris-HCl	0,79 g	250 mM
SDS	2 g	10%
Glycerol	10 ml	50%

Komponenten in ddH<sub>2</sub>O lösen und den pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen und folgende Substanzen hinzufügen:

Substanz	20 ml	Endkonzentration
Bromphenol Blau	5 mg	250 µg/ml
β-Mercaptoethanol	2 ml	10%

**Tabelle 2.9** Lämmli-Puffer. Die Lösung wird aliquotiert (aufgeteilt) und bei -20° C aufbewahrt. Die Protein Proben werden mit dem Lämmli-Puffer in einem Verhältnis 4:1 vermischt.

### 2.3.1 Herstellung des SDS-Polyarylamid-Gels

Das SDS-Polyarylamid-Gel zur vertikalen Elektrophorese wurde mit Hilfe einer Mini-PROTEAN III™ Elektrophorese-Zell-Anlage (Bio-Rad, München, Deutschland) hergestellt. Die Lösungen für das 5%-ige Sammelgel sowie für das 8%-ige und 12,5%-ige Trenngel sind in **Tabelle 2.11** dargestellt. Das hergestellte Trenngel (7,5 ml für 1,5 mm Geldicke) wurde nun zwischen die innere (7,3 × 10,2 cm) und äußere (8,3 × 10,2 cm) Glasplatte gegossen und die Oberfläche des Gels vorsichtig mit 2-Propanol (etwa 200 µl) überlagert. Diese 2-Propanol Beschichtung ist sehr wichtig, da sie primär die an der Oberfläche entstanden Luftblasen eliminiert und sekundär eine gute Barriere gegen Sauerstoff bildet, welcher die Polymerisation hemmt. Nachdem das Gel etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert wurde, wurde der Propanolüberstand abgegossen und die Oberseite des Trenngels mit destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Sammelgel direkt auf das polymerisierte Trenngel gegeben und die Geltaschen, die zur Beladung des Gels benötigt werden gebildet. Diese Geltaschen entstehen, in dem eine entsprechende Vorlage in das Gel gedrückt wurde. Die Polymerisation des so hergestellten Gels dauerte etwa zehn Minuten.

Tris/SDS-Stock	Substanz	Masse	
4 x Tris/SDS mit pH=6,8 bei RT mit HCl 37%	Tris SDS 10%	6,05 g 0,4 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml
4 x Tris/SDS mit pH=8,8 bei RT mit HCl 37%	Tris SDS 10%	45,5 g 1,0 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 250 ml

**Tabelle 2.10** 4 x Tris/SDS-Stock für Sammel- und Trenngelherstellung

	Sammelgel	Trenngel	
<b>Gelkonzentration</b>	5%	8%	12,5%
<b>Substanzen</b>	10 ml	10 ml	10 ml
Polyacrylamid (Rotiophorese Gel 30) (Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0,83 ml	2,9 ml	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,86 ml	4,5 ml	3,4 ml
4 x Tris/SDS mit pH=8,8 bzw. pH=6,8	1,25 ml pH=6,8	2,5 ml pH=8,8	2,5 ml pH=8,8
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10% (Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	50 µl	100 µl	100 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Merck Millipore, Billerica, USA)	5 µl	10 µl	10 µl

**Tabelle 2.11** Sammel- und Trenngel. APS und TEMED wurden erst kurz vor Gießen des Gels hinzugefügt, da diese beiden Substanzen die Polymerisation des Gels aktivieren.

### 2.3.2 SDS-Polyarylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und elektrophoretischer Transfer

Die zu analysierenden Proben werden auf den Boden der vorbereiteten Geltaschenvertiefungen pipettiert und ein *Dual-Color*-Proteinmarker (PEQGOLD Protein-Marker V, Bestellnr. 27-2210, PEQ-LAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) wurde dabei als Molekulargewichtsstandard eingesetzt und in die äußerste Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt im Laufpuffer (**Tabelle 2.12**) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA und 100 V je Gel. Dabei kommt es zur Auftrennung der gleichmäßig negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Masse.

Bevor das Laufgel gestoppt wurde, wurden zunächst zwei Schwämme (Bio-Rad, München, Deutschland) und vier Nitrocellulosepapierstücke und Nitrocellulosefermembrane (Whatman Protran, 0,45 µm Porengröße, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einem vorbereiteten Gefäß mit Transferpuffer getränkt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auseinander plattiert und ebenfalls in Transferpuffer eingetaucht. Für die elektrophoretische Übertragung der zu analysierenden Proteine vom Gel auf eine Membran wurde eine Mini-Trans-Blot-Zelle<sup>®</sup> (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Die Schichtung der

Transferkartusche ist in der folgenden Reihenfolge ausgehend von der Anodenseite: Schwamm, zwei Lagen Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel, zwei Lagen Filterpapier, Schwamm. Diese so geschichtete Transferkartusche wird in die Transferkammer geschoben und mit Transferpuffer befüllt (**Tabelle 2.13**). Unter konstanter Eiskühlung (Austausch der Eiskühlung spätestens nach einer Stunde) von der Kathodenseite wurde bei 400 mA und 200 V ein etwa zweistündiger Transfer durchgeführt.

Laufpuffer	Substanz		
5 x Stock	Tris	30,2 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml pH=8,3 bei RT mit HCl 37%
	Glyzin	144 g	
	SDS	10 g	
1 x Stock	5 x Stock	400 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml

**Tabelle 2.12** Laufpuffer

Transferpuffer	Substanz		
5 x Stock	Tris	39,4 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml pH=8,3 bei RT mit HCl 37%
	Glyzin	144 g	
1 x Stock	5 x Stock	400 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml
	SDS 10%	2 ml	
	Methanol 20%	400 ml	

**Tabelle 2.13** Transferpuffer

### 2.3.3 Anfärben der Membran mit Ponceau-S

Ponceau-S ist ein roter Farbstoff, der verwendet wurde, um die Qualität des Proteintransfers von SDS-PAGE auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen. Ponceau-S-Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) färbt reversibel Proteinbanden an und wurde in den nachfolgenden Verarbeitungsschritten unter Applikation eines Waschpuffers (**Tabelle 2.14**) aus der Membran ausgewaschen.

Deshalb wurde nach Beendigung des Transfers die Membran in frische Ponceau-S-Lösung eingetaucht und eine Minute bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf einer Schwingplattform inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran für ein bis zwei Minuten mehrmals mit Waschpuffer (**Tabelle 2.14**) gewaschen und der Farbstoff aus der Membran gelöst.

Waschpuffer	Substanz		
10 x Stock TBS	Tris	48,4 g	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml pH=7,5 bei RT mit HCl 37%
	NaCl	58,48 g	
1 x Stock Waschpuffer	10 x Stock TBS	200 ml	mit ddH <sub>2</sub> O auf 2000 ml pH=7,5 bei RT mit HCl 37%
	Tween 20	2 ml	

Tabelle 2.14 Waschpuffer

### 2.3.4 Immunovisualisation

Nach Beendigung des Transfers und Auswaschung des Ponceau-S-Farbstoffes, wurde die Membran auf einer Schwingplattform mit Blockierungspuffer (**Tabelle 2.15**) über Nacht bei 4°C (oder alternativ für 60 Minuten bei Raumtemperatur) inkubiert. Als nächstes wurde die Membran entlang der markierten Schnittstellen zerschnitten und mit primärem Antikörper im Antikörperverdünnungspuffer (**Tabelle 2.16**) verdünnt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese primären Antikörper binden an das gesuchte Protein und werden im Verlauf auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Im Anschluss werden die Membranen drei Mal alle zehn Minuten gewaschen und mit sekundärem Antikörper mit Antikörperverdünnungspuffer (**Tabelle 2.16**) verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären Antikörper binden entsprechend der antikörperproduzierenden Spezies an den Primärantikörper und dienen somit der Detektion der gebundenen Primärantikörper. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde wird die Membran erneut drei Mal gewaschen und mit Luminol- und peroxidhaltiger Chemolumineszenzlösung (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, USA) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Chemolumineszenzlösung kurz vor der Anwendung frisch, durch Mischung von gleichen Volumina der beiden Substratkomponenten hergestellt wurde. Durch Oxidation der beiden Substrate und der Peroxidaseaktivität des sekundären Antikörpers können die markierten Banden sichtbar gemacht werden. Abschließend wurde die Membran auf einer Röntgenfilm/Fotofolie (Fuji medical X-ray film, Fujifilm) in einer Fotokassette gelegt und entwickelt. Bei der Entwicklung ist zu beachten, dass die Belichtungsstärke in mehreren Schritten der Bandenintensität angepasst werden musste. Die Bandenintensität wurde mit dem Imaging Densitometer (Multimage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, Californien, USA) ausgewertet.

Blockierpuffer	Substanz	
	Milchpulver	2,5 g
	PBS/Tween Mix	50 ml

Tabelle 2.15 Blockierpuffer. Endkonzentration 5%.

Substanz	50 ml	Endkonzentration
Blockierpuffer 5%	5 ml	0,5%
1 x Waschpuffer	45 ml	

Tabelle 2.16 Antikörperverdünnungspuffer

Primärer Antikörper	Spezies	Firma/Bestellnummer #	Titer	Proteingröße
Anti-Na <sub>v</sub> 1.1	Kaninchen	Alomone, Jerusalem, Israel/ # ASC-001	1:500	> 250 kD
Anti-Na <sub>v</sub> 1.5	Kaninchen	Alomone, Jerusalem, Israel/ # ASC-13	1:2000	< 250 kD
Anti-Phospho- Na <sub>v</sub> 1.5	Kaninchen	Überlassen von Prof. Dr. Peter Mohler (Ser-571)	1:2000	ca. 220 kD
Anti-Na <sub>v</sub> 1.6	Kaninchen	Alomone, Jerusalem, Israel/ # ASC-009	1:1000	< 250 kD
Anti-SCN1B	Kaninchen	Cell Applications, San Diego, USA/ #CA1705	1:2000	27 kD
Anti-CaMKIIδ	Kaninchen	Überlassen von Dr. Bers	1:1000	56 kD
Anti-Phospho- CaMKIIδ	Maus	Thermo Scientific/Pierce Antibodies, Rockford, USA/ # MA1-047	1:1000	56 kD
Anti-GAPDH	Maus	Biotrend Chemikalien, Köln, Deutschland/ # BT46-9995-55	1:100.000	37 kD

Tabelle 2.17 Primäre Antikörper für Western-Blots

Sekundäre Antikörper	Firma/Bestellnummer #	Titer
Esel-Anti-Kaninchen IG	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland	1:5000
Schaf-Anti-Maus IG	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland	1:20000

Tabelle 2.18 Sekundäre Antikörper für Western-Blots

## 2.4 Pharmakologische Substanzen

Sowohl bei den Messungen des late I<sub>Na</sub> als auch bei den AP-Messungen werden der Badlösung Ranolazin mit einer Konzentration von 10 µmol/L, TTX mit einer Konzentration von 2 µmol/L oder AIP mit einer Konzentration von 1 µmol/L zugesetzt. In weiteren Experimenten wird auch Isoproterenol mit einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> mol/L verwendet, um Nachdepolarisationen und getriggerte Aktivität zu induzieren. Alle *Patch-Clamp*-Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.4.1 Ranolazin

Ranolazin (Bestellnr. R6152 Th. Geyer, 10  $\mu\text{mol/L}$  gelöst in 0,1 N HCl, Molekulargewicht 427,5 g/mol), (*RS*)-*N*-(2,6-Dimethylphenyl)-4(2-hydroxy-3-(2-methoxyphenoxy)-propyl)-1-piperazinacetamid ( $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$ ,  $M_r = 427.54$  g/mol) ist ein Piperazinderivat, das ca. 38-fach selektiver den late  $I_{\text{Na}}$  als den *Peak*- $I_{\text{Na}}$  inhibiert. Ranolazin wird frisch in einer 0,1 mol/L HCl-Lösung gelöst. Wir haben diese Konzentration gewählt, da diese im therapeutischen, klinisch relevanten Bereich liegt (Belardinelli et al. 2006).

### 2.4.2 Tetrodotoxin (TTX)

Tetrodotoxin ( $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$ ) mit dem Molekulargewicht von 319,3 g/mol von der Firma Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland ist ein Nervengift (Alkaloid) aus der Imidazolin- und Pyrimidingruppe. Dieses Gift, welches sich in den Ovarien und Eingeweiden von Kugelfischen befindet, blockiert die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, wodurch es zu einer Paralyse kommt. TTX wurde in einer 10 mmol/L-Einheit mit einer 1%-igen Essigsäurelösung angesetzt. Aus dieser 10er-Einheit wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  (=2  $\mu\text{mol/L}$ ) für die einzelnen Messungen in die 50 ml Badlösungen pipettiert.

### 2.4.3 Isoproterenol (DL-Isoproterenol-hydrochlorid)

Isoproterenol ist ein Noradrenalinderivat, welches als Sympathikomimetikum genutzt wird. Für die Versuche verwendeten wir DL-Isoproterenol-hydrochlorid (Lot: 066K1408, Sigma Aldrich, München, Deutschland) mit dem Molekulargewicht von 247,72 g/mol und der Summenformel  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ .

Für die Messungen wurde eine Tyrode (**Tabelle 2.19**) angesetzt. Zu dieser Tyrode werden 5  $\mu\text{l}$  Salsäure (32%ig) und 50 mg Ascorbinsäure (Lot: 076K0042 von Sigma Aldrich, München, Deutschland) gegeben. Von der nun hergestellten ASC-Lösung werden 100 ml mit 1 mol/L DL-Isoproterenol-hydrochlorid vermischt, um schließlich eine Isoprenalinlösung mit einer Konzentration von  $10^{-8}$  mol/L herzustellen (**Tabelle 2.20 + 2.21**).

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,4	140,0
KCl	74,6	4,0
MgCl <sub>2</sub>	95,2	1,0
HEPES	238,3	5,0
Glukose	180,2	10,0

**Tabelle 2.19** Messtyrode (ad 1000 ml Aqua bidest) bei einem pH-Wert 7,54 bei RT mit NaOH eingestellt und bei 4° C aufbewahrt

Substanz	
HCl (32%)	5 µl
Ascorbinsäure	50 mg

**Tabelle 2.20** ASC-Tyrode (ad 1000 ml Messtyrode) bei 4° C aufbewahrt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [M]
Isoproterenol	247,7	1,0

**Tabelle 2.21** Isoproterenollösung (ad 100 ml ASC-Tyrode) aufbewahrt bei -20° C mit einer Konzentration von ( $10^{-2}$  M).

#### 2.4.4 AIP (Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide)

*AIP* ist ein synthetisch hergestelltes Peptid (Lot: 10031202 von Enzo Life Science GmbH Lörrach, Deutschland), das die CaMKII spezifisch, nicht-kompetitiv und sehr potent inhibiert. In der Konzentration von 1 µmol/L hemmt *AIP* die CaMKII effektiv, ohne dabei andere multifunktionale Proteinkinasen, wie beispielsweise die PKC, die PKA oder die CaMKIV, zu beeinflussen (Ishida et al. 1995).

## 2.5 Statistik und Datenauswertung

Die Datenerfassung erfolgte mit der Software Patchmaster™ (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) auf der Festplatte eines ortsständigen Computers. Diese dort gespeicherten Rohdaten wurden anschließend in Microsoft Excel (MS-Excel, Microsoft Corp., Redmond, USA) importiert und weiterbearbeitet. Die Endauswertung, die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen erfolgten mit dem Programm *GraphPad Prism 5*™ (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Dieser wurde folgendermaßen berechnet:

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

**Formel 2.7** Berechnung des Standardfehlers des Mittelwerts. SEM=Standardfehler des Mittelwertes,  $\sigma^2$ =Varianz,  $\sigma$ =Standardabweichung, n=Anzahl der Beobachtungen.

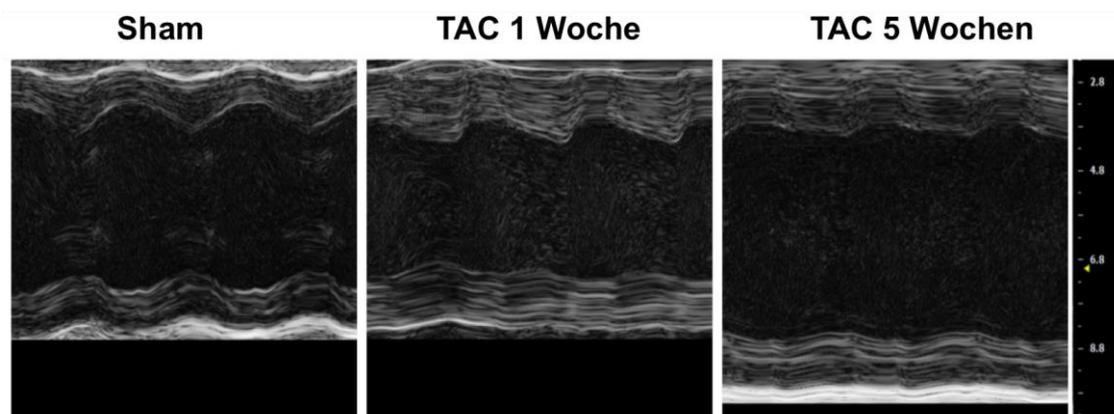
Die statistischen Analysen werden mit dem t-test, je nach Art der Daten gepaart oder ungepaart, durchgeführt. Im Falle von multiplen Testen kam der t-test nach Bonferroni-Korrektur zum Einsatz.

Statistische Analysen von Longitudinaldaten werden mittels Zwei-Wege-Varianzanalyse für wiederholte Messungen 2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test durchgeführt. Auch dieses System sieht die Halbierung des p-Wertes im Falle multipler Testung vor.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phänotyp der Mäuseherzen

Mit Hilfe der transversalen aortalen Konstriktion (TAC) erfolgt im Rahmen dieser Arbeit eine Nachlasterhöhung, welche im weiteren Verlauf zu einer Herzhypertrophie führt (Rockman et al. 1991; Hu et al. 2003) (**Abbildung 3.1**). Die dabei verwendeten Mäuse der Firma Charles-River (Kennzeichnung C57/BL6J) sind ausschließlich weiblich. Das durchschnittliche Körpergewicht liegt zwischen 15-20 g bei einem Alter von acht Wochen. Für die durchgeführten *Patch-Clamp*-Messungen wurden zwei unterschiedliche postoperative Untersuchungszeitpunkte gewählt.



**Abbildung 3.1** Repräsentative Echokardiographie im M-Mode des LV-Durchmessers in mm. Aufnahme von TAC-Mäusen und der Kontrollgruppe eine Woche und fünf Wochen nach Intervention.

Eine Woche nach TAC-Operation zeigen die Herzen der TAC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine konzentrische Hypertrophie und eine leichte Zunahme des Herzgewichtes. Diese Beobachtung bestätigen sowohl die echokardiographischen Daten als auch die Messung der Membrankapazitäten. Dabei lässt sich die Hypertrophie am deutlichsten durch Ausmessung der Septumdicke darstellen (**Abbildung 3.2 A**). Diese zeigt bei TAC (n=10) eine Dicke von  $0,87 \pm 0,05$  mm vs. Kontrollgruppe (n=6) mit  $0,76 \pm 0,04$  mm ( $p < 0,001$ ). Das entspricht einer Zunahme der Septumdicke der TAC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 14%.

Das *heart-weight/body-weight*-Verhältnis (HW/BW) zeigt bei der TAC-Gruppe ein Verhältnis von  $9,4 \pm 0,4$  vs. Kontrollgruppe mit einem Verhältnis von  $8,0 \pm 0,3$  ( $p < 0,001$ ). Das entspricht einer Zunahme des HW/BW-Verhältnisses in der TAC-Gruppe von +18% (**Abbildung 3.2 B**).

Zu diesem Zeitpunkt ist die EF der TAC-Gruppe  $53\pm 7\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $49\pm 3\%$  ( $p=0,16$ ; **Abbildung 3.2 C**) statistisch unverändert geblieben.

Die Herzgewichtsmessungen bestätigen die zuvor nicht-invasiv gemessenen echokardiographischen Daten. Dabei zeigen die Herzen der TAC-Gruppe ( $n=19$ ) ein Herzgewicht von  $169,8\pm 5,8$  mg ( $p<0,0001$ , **Abbildung 3.2 E**) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=14$ ) mit einem Herzgewicht von  $142,5\pm 4,5$  mg ( $p<0,0001$ ) (**Abbildung 3.2 E**). Um herauszufinden, ob sich die Myozyten hinsichtlich ihrer Zellgröße unterscheiden, wurde in den *Patch-Clamp*-Messungen die Membrankapazität der Zellen ( $C_m$ ) bestimmt. Die Membrankapazität liefert indirekt eine Aussage über die Zellgröße, da sie proportional zur Fläche der Zellmembran ist ( $1\text{pF} \approx 1\mu\text{m}^2$ ). Die Membrankapazitäten (in pF) der TAC-Gruppe ( $n=44$ ) zeigen eine Woche nach TAC-Intervention mit  $164,7\pm 7,2$  einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=49$ ) mit  $132,7\pm 4,6$  ( $p<0,0005$ , **Abbildung 3.2 F**).

Abbildung 3.2 A

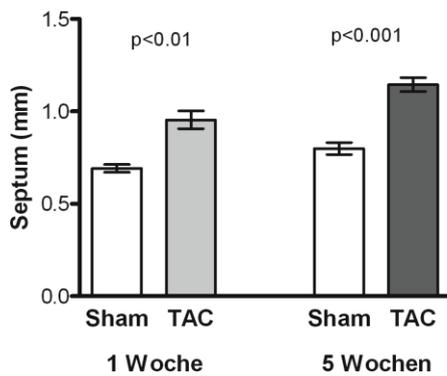


Abbildung 3.2 B

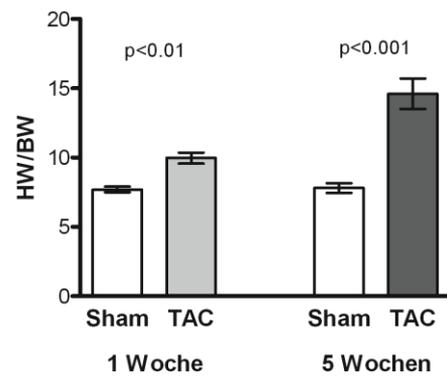


Abbildung 3.2 C

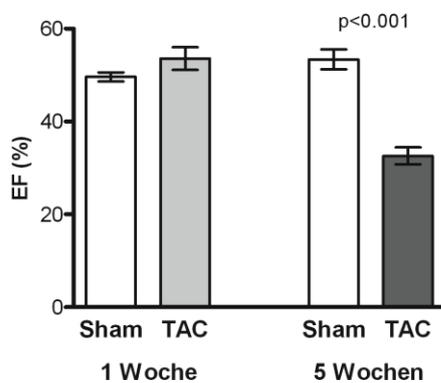


Abbildung 3.2 D

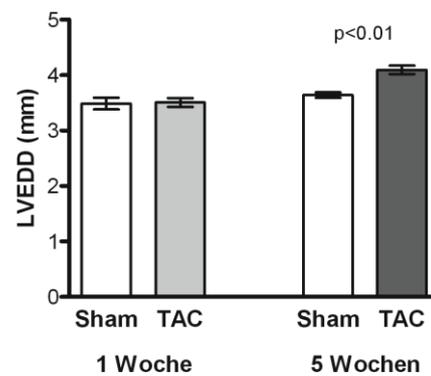


Abbildung 3.2 E

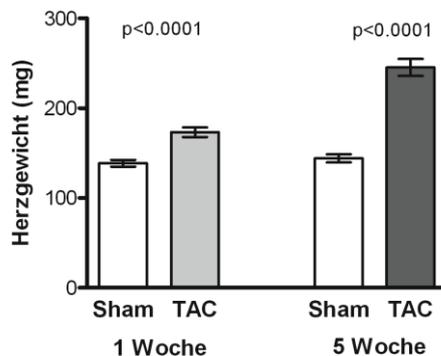
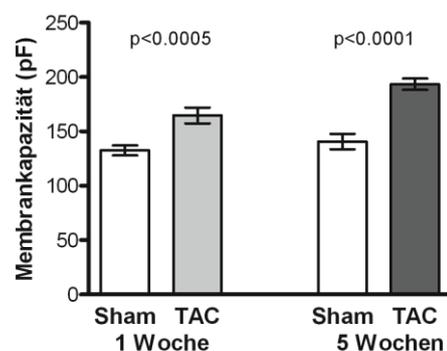


Abbildung 3.2 F



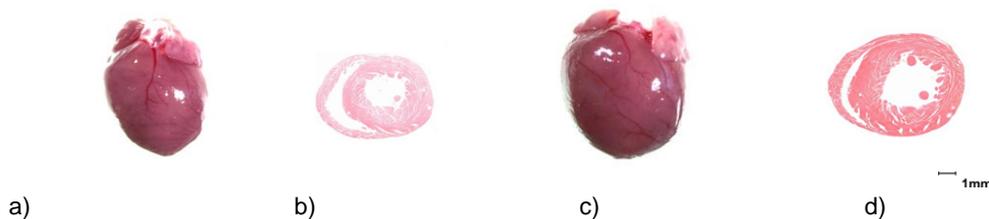
**Abbildung 3.2** **A:** Mittelwerte der durch Echokardiographie ermittelten Septumdicken (mm) bei Kontroll- (n=6) und TAC-Tieren (n=10) eine Woche und fünf Wochen nach Intervention. **B:** Mittelwerte des *heart-weight/body-weight*-Verhältnisses bei Kontroll- und TAC-Tieren. **C:** Mittelwerte der durch Echokardiographie ermittelten Ejektionsfraktion (EF in %) bei Kontroll- und TAC-Tieren. **D:** Mittelwerte des durch Echokardiographie ermittelten linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD in mm) bei Kontroll- und TAC-Tieren. **E:** Mittelwerte der Herzgewichte in mg von Kontroll- (n=14) und TAC-Tieren (n=19) eine bzw. fünf Wochen Kontrolle (n=22) vs. TAC (n=36) nach Intervention. **F:** Mittelwerte der Membrankapazität in pF von Kontroll- (n=49) und TAC-Tieren (n=44) eine bzw. fünf Wochen Kontrolle (n=31) vs. TAC (n=101) nach Intervention.

Fünf Wochen nach der TAC-Operation zeigt sich eine deutliche Progression der Herzmasse, und die Tiere weisen offensichtliche Merkmale einer Herzinsuffizienz auf. Das HW/BW-Verhältnis der TAC-Gruppe steigt deutlich auf  $14,6 \pm 3,1$  an, während die Kontrollgruppe mit einem HW/BW-Verhältnis von  $7,8 \pm 0,9$  weitgehend konstant bleibt ( $p < 0,001$ ). Das entspricht einer Zunahme des HW/BW-Verhältnisses der TAC-Gruppe um 87% (**Abbildung 3.2 B**). Die echokardiographische Messung zeigt ebenfalls einen erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) in der TAC-Gruppe ( $n=15$ ) mit  $4,1 \pm 0,3$  mm im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=10$ ) mit  $3,6 \pm 0,2$  mm ( $p < 0,001$ ). Das bedeutet eine Zunahme des LVEDD in der TAC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um +12% (**Abbildung 3.2 D**).

Die systolische LV-Funktion ist in der TAC-Gruppe mit einer EF von  $33 \pm 7\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer EF von  $53 \pm 6\%$  um 40% gesunken ( $p < 0,001$ ; **Abbildung 3.2 C**).

Während der Isolation zeigt sich optisch eine Vergrößerung der Herzen fünf Wochen nach TAC-Intervention. In der TAC-Gruppe liegt das durchschnittliche Herzgewicht bei  $212,4 \pm 3,6$  mg ( $n=36$ ,  $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Herzgewicht von  $142,5 \pm 4,5$  mg ( $n=22$ ,  $p < 0,0001$ , **Abbildung 3.2 E**, **Abbildung 3.3**).

Die Membrankapazitäten (in pF) der TAC-Gruppe ( $n=101$ ) zeigen fünf Wochen nach TAC-Intervention mit einer Membrankapazität von  $193,5 \pm 5,2$  einen noch deutlicheren Unterschied zur Kontrollgruppe ( $n=31$ ) mit  $140,7 \pm 7,1$  ( $p < 0,0001$ , **Abbildung 3.2 F**).

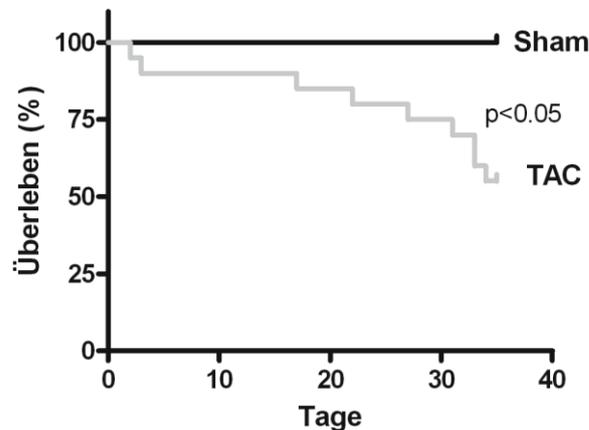


**Abbildung 3.3** Darstellung von Mäuseherzen fünf Wochen nach TAC-Operation (Fotos aus dem Labor Prof. Maier, Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen).  
a) Kontrollherz b) histologischer Schnitt eines Kontrollherzens c) TAC-Herz d) histologischer Schnitt eines TAC-Herzens.

Die Kaplan-Meier-Kurve der verstorbenen Tiere zeigt in den ersten Tagen nach TAC-Operation eine erhöhte Mortalität. Diese erhöhte Mortalität wird durch perioperative Komplikationen sowie durch eine akute Dekompensation des TAC-Eingriffes erklärt. Es folgt eine stabile Phase, in der die Mortalität weitgehend konstant bleibt. Erst drei bis fünf Wochen nach TAC-Intervention steigt die Mortalität weiter an. Dieser erneute Anstieg der Mortalität erklärt sich zum einen durch das Überschreiten der physiologischen Kompensationsmecha-

nismen und der sich daraus entwickelnden Herzinsuffizienz mit deutlich reduzierter kardialer Funktion, zum anderen durch letale Arrhythmien.

Für die Experimente wurde daher der late  $I_{Na}$  sowohl zu einem frühen Zeitpunkt (eine Woche) als auch zu einem weiter fortgeschrittenen Zeitpunkt (fünf Wochen) nach Intervention untersucht.



**Abbildung 3.4** Kaplan-Meier-Kurve von Kontroll- und TAC-Tieren. Eine Woche nach Intervention befinden sich die Mäuse in der Phase einer stabilen kompensierten Hypertrophie ohne erhöhte Mortalität. Fünf Wochen nach TAC-Intervention sind die Mäuse herzinsuffizient mit deutlich eingeschränkter kardialer Funktion und erhöhter Mortalität.

### 3.2 Der späte Natriumstrom (late $I_{Na}$ ) bei kompensierter Hypertrophie und bei Herzinsuffizienz

Eine Woche nach TAC-Operation zeigen die Mäuse eine isolierte Hypertrophie mit typischen Hypertrophiezeichen, jedoch einer erhaltenen LV-EF (**Abbildung 3.2 C**).

Die untersuchten Kardiomyozyten der TAC-Gruppe zeigen in dieser frühen Phase keinen signifikanten Unterschied in der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit gegenüber der Kontrollgruppe (**Abbildung 3.5 A+B**).

Bei einer Frequenz von 2 Hz zeigt sich eine late  $I_{Na}$ -Abfallszeit von  $41,6 \pm 6,5$  ms in den TAC-Myozyten ( $n=17$ ). Im Vergleich dazu die Kontrollgruppe ( $n=11$ ) mit einer late  $I_{Na}$ -Abfallszeit von  $26,7 \pm 1,8$  ms ( $p=n.s.$ , **Abbildung 3.5 B**).

Die beobachteten Veränderungen der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit zum frühen Untersuchungszeitpunkt (eine Woche nach TAC-Intervention) sind nicht nur bei 2 Hz, sondern über alle gemessenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz) nicht signifikant unterschiedlich (**Abbildung 3.5 B**). Auch Ranolazin [ $10 \mu\text{mol/L}$ ] hatte keinen signifikanten Effekt auf die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit (TAC+Ran  $29,8 \pm 2,7$  ms ( $n=8$ ); **Abbildung 3.5 A+B**).

Im Unterschied zum frühen Untersuchungszeitpunkt eine Woche nach Intervention sind zum späten Untersuchungszeitpunkt (fünf Wochen nach TAC-Operation), im Stadium der Druck-induzierten Herzinsuffizienz, deutliche Unterschiede in der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit zu beobachten (**Abbildung 3.6 A**). Die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit zeigt in den TAC-Myozyten signifikante Unterschiede. Bei einer Frequenz von 2 Hz mit  $96,4 \pm 12,6$  ms ist die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit in TAC-Myozyten länger im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer late  $I_{Na}$ -Abfallszeit von  $35,4 \pm 4,1$  ms ( $p < 0,05$ ,  $n = 26$  vs. 7, 2-way RM-ANOVA, **Abbildung 3.6 B**). Die Superfusion mit Ranolazin [ $10 \mu\text{mol/L}$ ], TTX [ $2 \mu\text{mol/L}$ ] oder *AIP* [ $1 \mu\text{mol/L}$ ] zeigt hier eine signifikante Verkürzung des TAC-Effektes auf die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit. Im Detail bedeutet das eine verkürzte late  $I_{Na}$ -Abfallszeit durch Zugabe von Ranolazin auf  $51,8 \pm 5,3$  ms, durch TTX auf  $47,1 \pm 6,3$  ms ( $p < 0,05$ ,  $n = 17$  vs. 15, 2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test) sowie durch den CaMKII-Inhibitor *AIP* auf  $29,3 \pm 2,7$  ms ( $n = 18$ ,  $p < 0,05$  vs. TAC, 2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test). Ranolazin zeigt auch im späten Untersuchungszeitraum keinen signifikanten Effekt auf die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit der Kontrollgruppe ( $35,4 \pm 5,0$  ms vs.  $35,4 \pm 4,1$  ms,  $n = 8$  vs. 7).

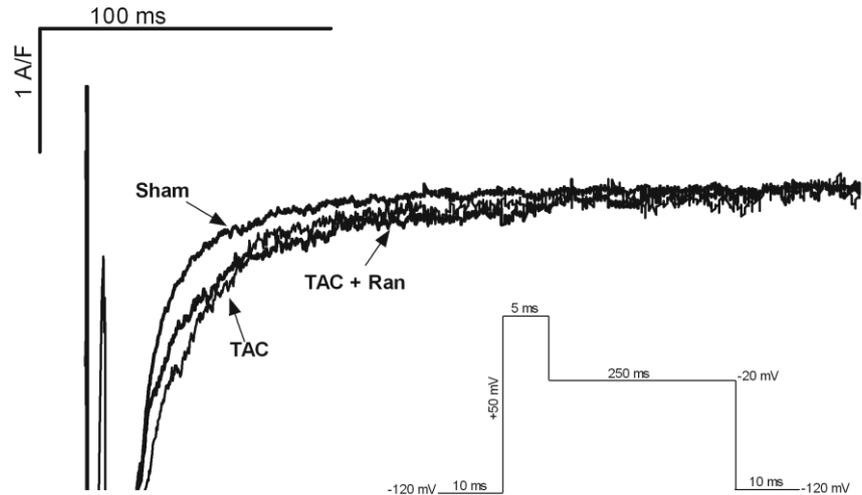


Abbildung 3.5 A

Originalabbildung der late  $I_{Na}$ -Messungen eine Woche nach TAC-Intervention. Diese Originalabbildungen zeigen die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit in Sham- und TAC-Zellen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und nach Zugabe von 10  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin (=Ran).

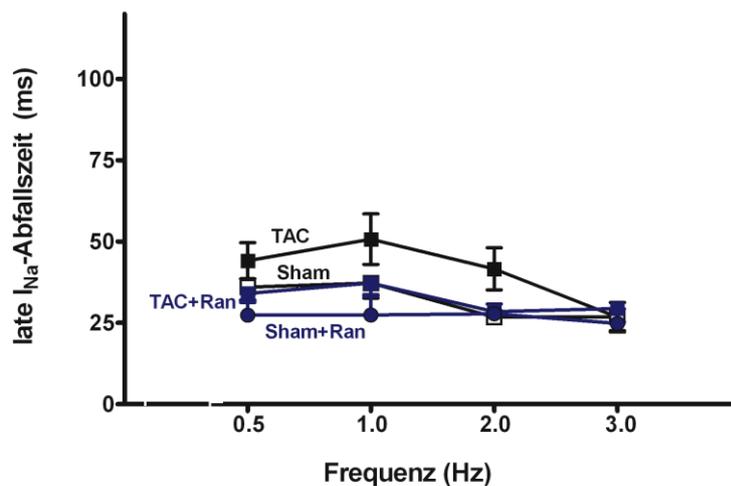


Abbildung 3.5 B

Darstellung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit eine Woche nach TAC-Intervention. Die Mittelwerte zeigen die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit in den Gruppen: Sham (n=14), TAC (n=20), TAC+Ran (n=7) und Sham+Ran (n=6). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

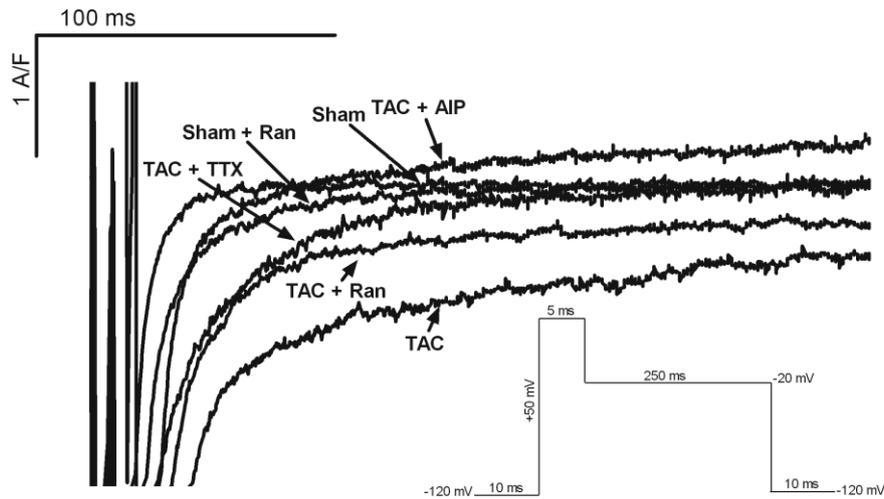


Abbildung 3.6 A

Originalabbildung der late  $I_{Na}$ -Messungen fünf Wochen nach TAC-Intervention. Diese Originalabbildungen zeigen die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit in Sham- und TAC-Zellen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und nach Zugabe von 10  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin (=Ran) oder Zugabe von 2  $\mu\text{mol/L}$  TTX bzw. von 1  $\mu\text{mol/L}$  AIP.

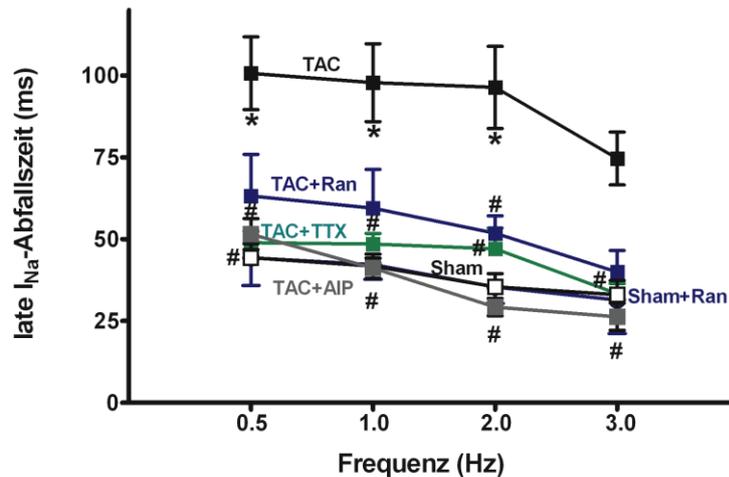


Abbildung 3.6 B

Darstellung der Mittelwerte der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit fünf Wochen nach TAC-Intervention in den Gruppen: Sham (n=7), TAC (n=26), TAC+Ran (n=17), Sham+Ran (n=8), TAC+TTX (n=16) und TAC+AIP (n=18) bei einer Ranolazin-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ , einer TTX-Konzentration von 2  $\mu\text{mol/L}$  und einer AIP-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  (2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test, \* TAC vs. Sham < 0,0001, # vs. TAC < 0,0001).

### 3.3 Einfluss des späten Natriumstroms (late $I_{Na}$ ) auf das Aktionspotential

Um eine Aussage über die Rolle des late  $I_{Na}$  in der Arrhythmogenese treffen zu können, werden die APs gemessen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit eine Woche nach TAC-Intervention zeigt sich, dass es bei Hypertrophie mit erhaltener Pumpfunktion zu keiner signifikanten Verlängerung der APD in TAC-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt (**Abbildung 3.7 B, Tabelle 3.1**). Es ist auch nicht möglich durch Zugabe von Ranolazin eine signifikante Verkürzung der APD zu erzielen (**Abbildung 3.7 A, Tabelle 3.1**).

Fünf Wochen nach TAC-Operation wird parallel zu den Veränderungen der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit eine deutliche Verlängerung der APD der TAC-Myozyten beobachtet (**Abbildung 3.8 B, Tabelle 3.1**). **Abbildung 3.8 A** veranschaulicht mittels Originalabbildungen die beschriebene APD-Verlängerung der TAC-Zellen. Konkret bedeutet dies eine gemittelte  $APD_{90}$  der TAC-Zellen bei 2 Hz von  $140,0 \pm 24,9$  ms. Diese  $APD_{90}$  der TAC-Zellen ist somit im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer  $APD_{90}$  von  $63,1 \pm 9,1$  ms deutlich verlängert ( $n=15$  vs.  $8$ , 2-way RM-ANOVA  $p < 0,05$ , **Abbildung 3.8 B**). In diesen TAC-Zellen führt die Inhibition mit Ranolazin zu einer signifikanten Verkürzung der  $APD_{90}$  auf  $80,0 \pm 12,5$  ms ( $n=19$ ). Ranolazin zeigt keinen Effekt auf die  $APD_{90}$  in der Kontrollgruppe (**Abbildung 3.8 B, Tabelle 3.1**). Um die gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren werden die Messungen in Gegenwart von TTX [ $2 \mu\text{mol/L}$ ] wiederholt. Hier zeigt sich ebenfalls eine Verkürzung der  $APD_{90}$  auf  $49,0 \pm 9,8$  ms (2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test  $p < 0,05$ ,  $n=10$ , **Abbildung 3.8 A+B**).

Darüber hinaus kann in den TAC-Zellen, in denen die  $APD_{90}$  Wochen nach TAC-Intervention verlängert ist, durch Zugabe von *AIP* als CaMKII-Inhibitor eine Verkürzung der APDs auf  $63,4 \pm 9,3$  ms (2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test  $p < 0,05$ ,  $n=18$ , **Abbildung 3.8 A+B**) beobachtet werden.

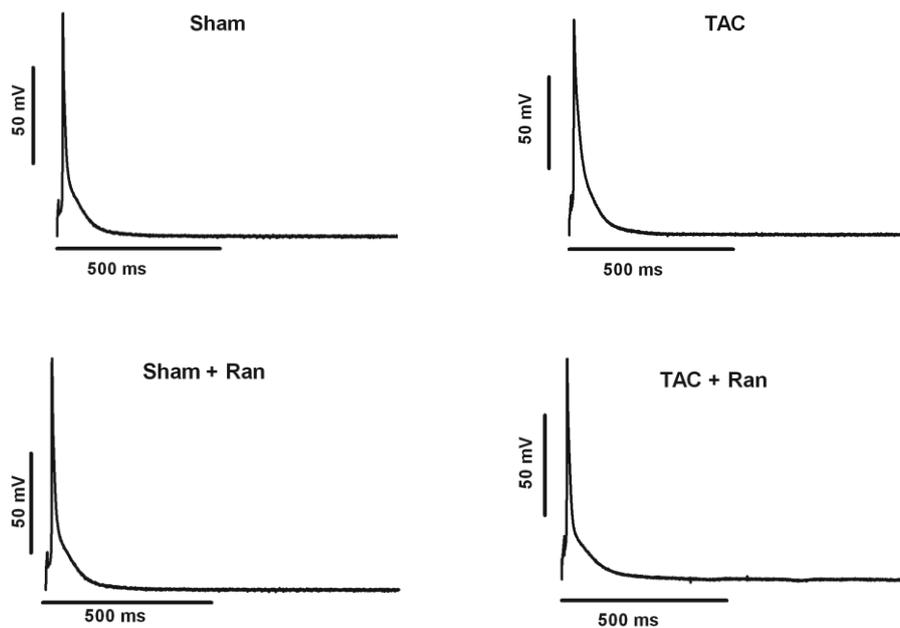


Abbildung 3.7 A

Darstellung der Originalaktionspotentiale in Kardiomyozyten eine Woche nach TAC-Intervention bei einer Frequenz von 0,5 Hz in den korrespondierten Gruppen TAC, Sham, TAC+Ran und Sham+Ran bei Ranolazin-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ .

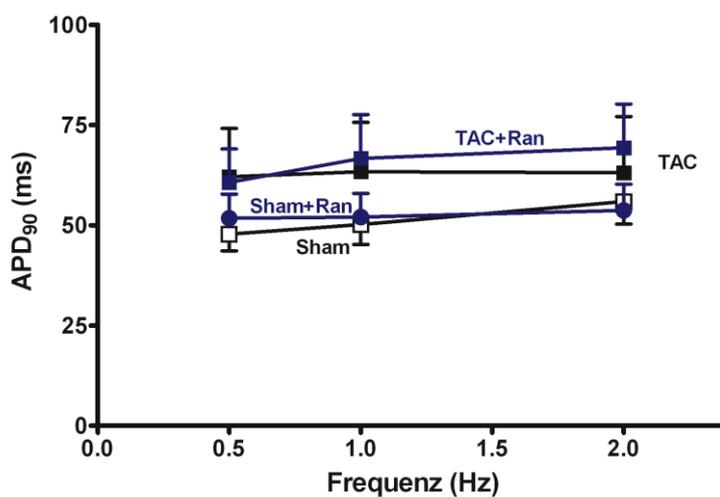


Abbildung 3.7 B

Darstellung der Mittelwerte der  $APD_{90}$  eine Woche nach TAC-Intervention in den korrespondierten Gruppen Sham ( $n=12$ ), TAC ( $n=7$ ), TAC+Ran ( $n=19$ ) Sham+Ran ( $n=15$ ) bei einer Ranolazin-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ . Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

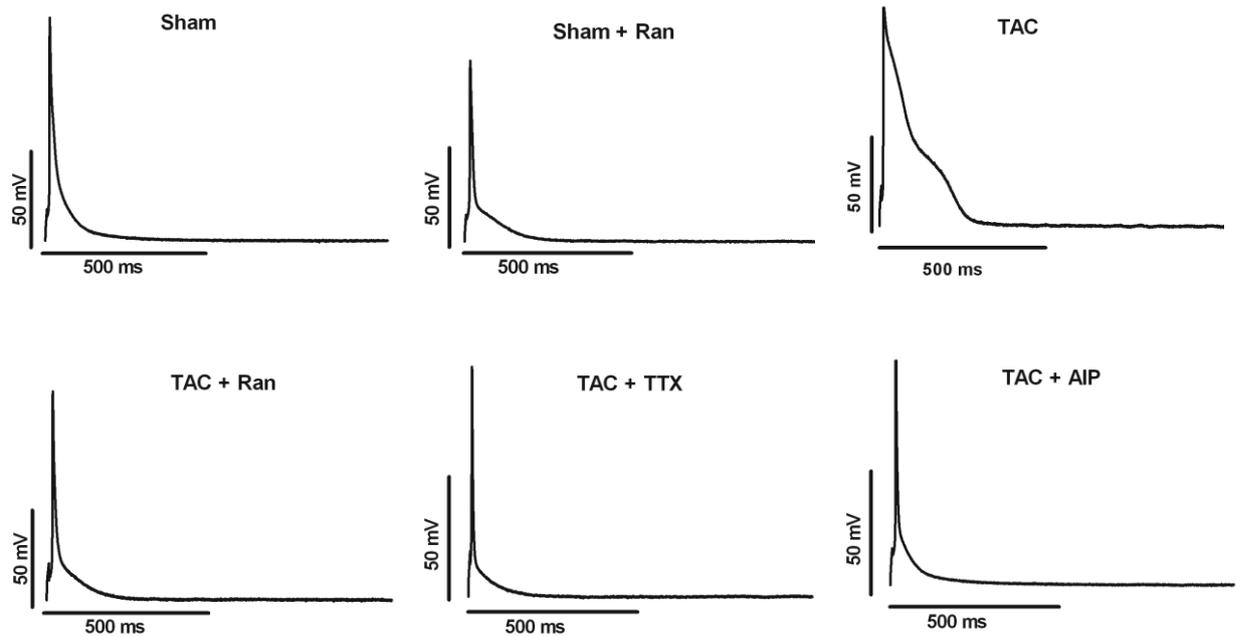


Abbildung 3.8 A

Darstellung der Originalaktionspotentiale in Kardiomyozyten bei einer Frequenz von 0,5 Hz fünf Wochen nach TAC-Intervention bei einer Ranolazin-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ , einer TTX-Konzentration von 2  $\mu\text{mol/L}$  und einer AIP-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  in den korrespondierenden Gruppen TAC, Sham, TAC+Ran, Sham+Ran, TAC+TTX und TAC+AIP.

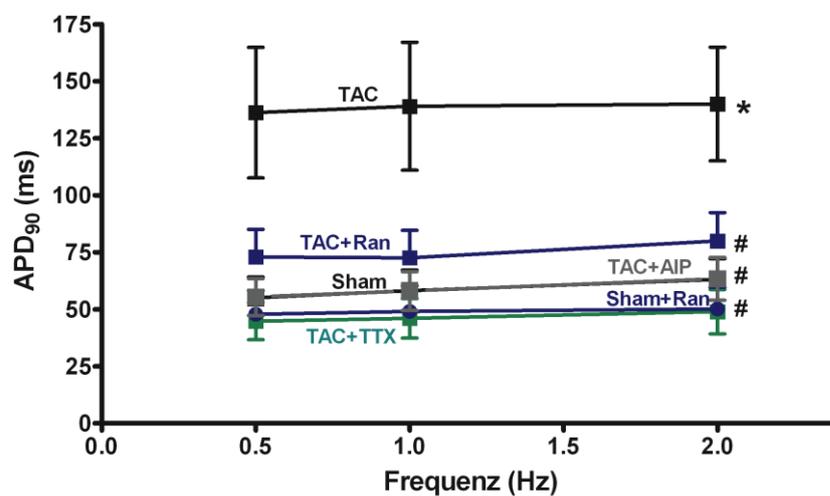


Abbildung 3.8 B

Darstellung der Mittelwerte der APD<sub>90</sub> fünf Wochen nach TAC-Intervention in den korrespondierenden Gruppen Sham (n=8), TAC (n=15), TAC+Ran (n=19), Sham+Ran (n=8), TAC+TTX (n=10) und TAC+AIP (n=18) bei einer Ranolazin-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$ , einer TTX-Konzentration von 2  $\mu\text{mol/L}$  und einer AIP-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  (2-way RM-ANOVA und Bonferroni-post-Test). \* p < 0,05 vs. Sham, # p < 0,05 vs. TAC

### 3.4 Arrhythmogene Trigger in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz

Um herauszufinden, welche Rolle der late  $I_{Na}$  bei zellulären Arrhythmien spielt, werden isolierte Kardiomyozten der fünf Wochen alten TAC-Tiere fünf Minuten mit einer Isoproterenol-lösung von  $10^{-8}$  mol/L superperfundiert und mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert.

Interessanterweise werden dabei in der Gegenwart von Isoproterenol kaum *EADs* beobachtet (Frequenz von  $0,33 \pm 0,89$  *EADs*/min). Hingegen werden mit einer Frequenz von  $2,0 \pm 0,1$  *DADs*/min deutlich mehr *DADs* in den TAC-Zellen (**Abbildung 3.9 A**) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer *DAD*-Frequenz von  $0,3 \pm 0,1$  *DADs*/min aufgezeichnet ( $n=20$  vs.  $15$ ,  $p < 0,05$ , **Abbildung 3.9 B**). In Gegenwart von Ranolazin und *AIP* ist die Frequenz der *DADs* deutlich abgefallen. Durch Ranolazin kann die *DAD*-Frequenz auf  $0,2 \pm 0,1$  *DADs*/min supprimiert werden ( $n=15$ ,  $p < 0,05$ , **Abbildung 3.9 A+B**) und durch *AIP* fällt die Frequenz auf  $0,12 \pm 0,1$  *DADs*/min ( $n=8$ ,  $p < 0,05$ , **Abbildung 3.9 B**).

Des Weiteren wird durch Isoproterenol getriggerte Aktivität (spontan auftretende APs) mit einer Frequenz von  $0,06 \pm 0,0$  in der TAC-Gruppe ( $n=20$ ) beobachtet (**Abbildung 3.9 C+D**). Hingegen werden im Vergleich in der Kontrollgruppe ( $n=15$ ,  $p < 0,05$ ) keine zellulären Arrhythmien beobachtet (**Abbildung 3.9 D**). Durch Ranolazin wird die Frequenz der getriggerten Aktivität innerhalb der TAC-Gruppe auf  $0,0 \pm 0,0$  ( $n=16$ ,  $p < 0,05$ ) gesenkt (**Abbildung 3.9 D**). Nach Zugabe von *AIP* in die Badlösung wird bei den TAC-Myozyten ( $n=8$ ) ebenfalls keine getriggerte Aktivität beobachtet.

Abbildung 3.9 A

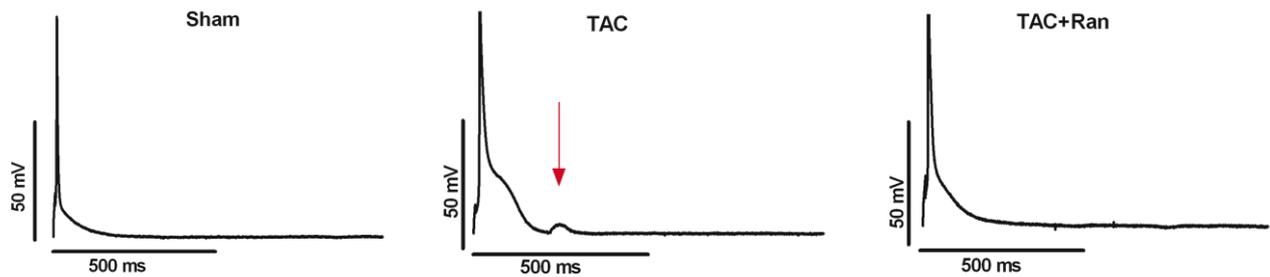


Abbildung 3.9 B

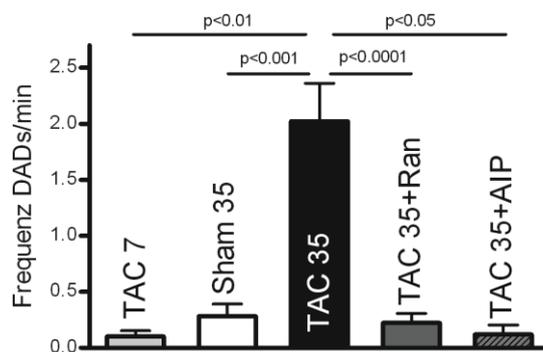


Abbildung 3.9 C

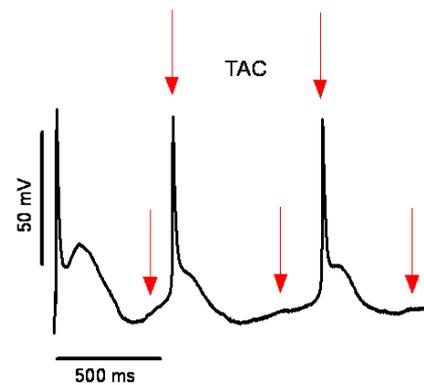
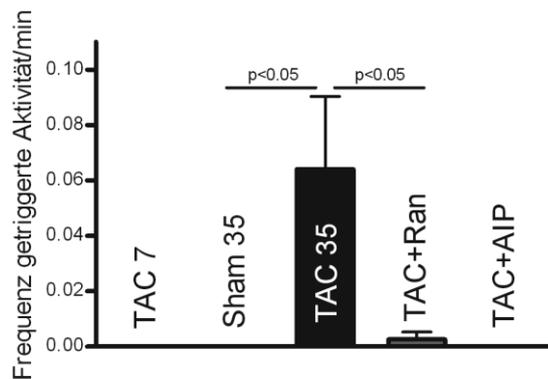


Abbildung 3.9 D



**Abbildung 3.9 A:** Darstellung der Originalabbildungen von Aktionspotentialen fünf Wochen nach TAC-Intervention in Gegenwart von Isoproterenol [ $10^{-8}$  mol/L] und Ranolazin [ $10 \mu\text{mol/L}$ ] bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. Der rote Pfeil markiert ein DAD. **B:** Frequenz von DADs/min fünf Wochen nach TAC-Intervention. Die Mittelwerte zeigen das Auftreten von DADs in den Gruppen Sham ( $n=15$ ), TAC ( $n=20$ ), TAC+Ran ( $n=15$ ) und TAC+AIP ( $n=8$ ). **C:** Originalabbildung eines Aktionspotentials fünf Wochen nach TAC-Intervention und in Gegenwart von Isoproterenol [ $10^{-8}$  mol/L] bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. Die roten Pfeile markieren die unstimuliert ausgelösten Aktionspotentiale (=getriggerte Aktivität) oder DADs. **D:** Frequenz von getriggerte Aktivität fünf Wochen nach TAC-Intervention in Gegenwart von Isoproterenol [ $10^{-8}$  mol/L]. Die Mittelwerte zeigen das Auftreten von getriggerte Aktivität in den Gruppen Sham ( $n=15$ ), TAC ( $n=20$ ), TAC+Ran ( $n=15$ ) und TAC+AIP ( $n=8$ ).

### 3.5 Veränderungen in der Natriumkanalexpression und Regulation

Die Regulation des late  $I_{Na}$  stellt aktuell ein kontroverses Thema dar. Studien zeigen, dass der late  $I_{Na}$  über die Expression der unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des  $Na^+$ -Kanals sowie über die Phosphorylierung der  $\alpha 1.5$ -Isoform über die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) reguliert werden könnte (Wagner et al. 2006; Maltsev und Undrovinas A 2008; Hund et al. 2010; Mishra et al. 2011; Ashpole et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wird sowohl die Expression der  $Na^+$ -Kanalisoformen  $Na_v 1.1$  ( $\alpha 1.1$ ),  $Na_v 1.5$  ( $\alpha 1.5$ ),  $Na_v 1.6$  ( $\alpha 1.6$ ) und  $\beta_1$ -Untereinheit als auch die CaMKII-Aktivität über die Phosphorylierung an der Aminosäure Thr-286 untersucht (P-CaMKII/GAPDH).

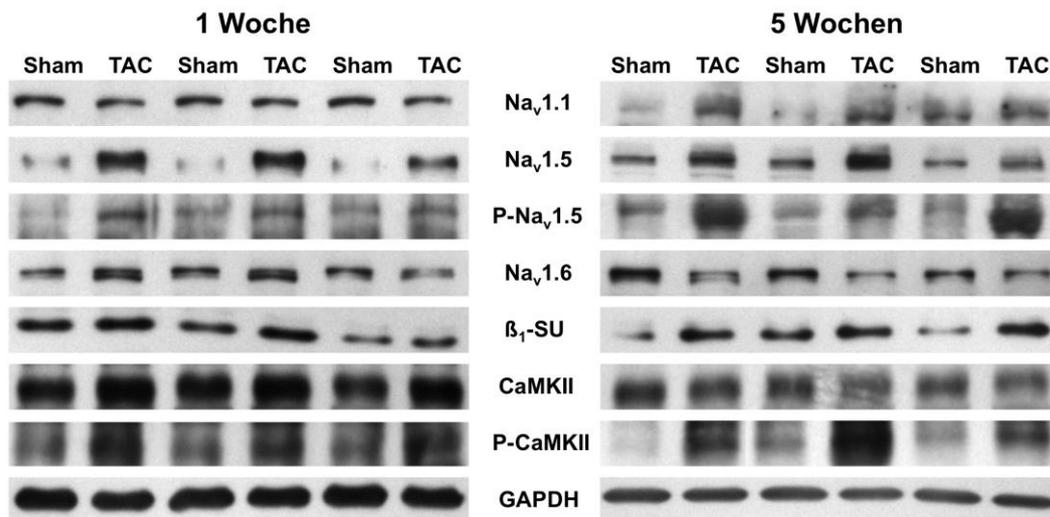
In der kompensierten Hypertrophie eine Woche nach TAC-Operation ist die Expression der neuronalen  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v 1.1$ -Untereinheit in den TAC-Tieren ( $n=6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=6$ ) um 23% erniedrigt ( $p<0,05$ , **Abbildung 3.10 A+B**), während die Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v 1.6$  unverändert bleibt ( $p=n.s.$ , Sham ( $n=6$ ) vs. TAC ( $n=6$ ), **Abbildung 3.10 A+D**). Die Expression der kardialen  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v 1.5$  ist in den TAC-Tieren eine Woche nach TAC-Intervention im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant um 192% erhöht ( $p<0,05$ , Sham ( $n=6$ ) vs. TAC ( $n=6$ ), **Abbildung 3.10 A+C**). Die Beobachtungen zeigen weiter, dass auch die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit in den TAC-Myozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Woche nach TAC-Intervention um 60% hochreguliert ist ( $p<0,05$ , Sham ( $n=6$ ) vs. TAC ( $n=6$ ), **Abbildung 3.10 A+E**). Die Aktivität der CaMKII, welche durch die Phosphorylierung der Aminosäure Thr-286 gemessen wird, ist eine Woche nach TAC-Intervention um 45% erhöht ( $p<0,05$ , Sham vs. TAC), **Abbildung 3.10 A+F**) während die Phosphorylierung der  $Na^+$ -Kanal-Isoform  $Na_v 1.5$  an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 nicht signifikant verändert ist (**Abbildung 3.10 A+G**).

Betrachtet man die verschiedenen  $Na^+$ -Kanalisoformen bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz fünf Wochen nach TAC-Intervention so ist die Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v 1.1$  in TAC-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um 71% erhöht ( $p<0,05$ , **Abbildung 3.10 A+B**), während die Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v 1.6$  in den TAC-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe fünf Wochen nach TAC-Intervention um 29% erniedrigt ist ( $p<0,05$ , TAC vs. Sham, **Abbildung 3.10 A+D**). Die Expression der kardialen  $Na^+$ -Kanal-Isoform  $Na_v 1.5$  ist auch fünf Wochen nach TAC-Intervention um 57% in den TAC-Zellen erhöht ( $p<0,05$ , Sham vs. TAC, **Abbildung 3.10 A+C**). Die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit bleibt mit einer Erhöhung um 65% auch fünf Wochen nach TAC-Intervention konstant im Vergleich zu den Beobachtungen eine Woche nach TAC-Operation ( $p<0,05$ , Sham vs. TAC, **Abbildung 3.10 A+E**). Die CaMKII-Aktivität ist nach fünf Wochen im Vergleich zu einer Woche nach TAC-Intervention von 45% auf 108% erhöht ( $p<0,05$ , TAC vs. Sham, **Abbildung 3.10 A+F**). Die

Phosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 der Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 ist in Tieren fünf Wochen nach TAC-Intervention im Vergleich zu Tieren eine Woche nach Intervention um 85% erhöht ( $p < 0,05$ , **Abbildung 3.10 A+G**).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Expression der Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 in der kompensierten Hypertrophie eine Woche nach TAC-Intervention höher ist als in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz fünf Wochen nach TAC-Intervention (-70%,  $p < 0,01$ ). Die Expression der Na<sup>+</sup>-Kanalisoform Na<sub>v</sub>1.1 wechselt von einer *down*-Regulation in eine *up*-Regulation (TAC eine Woche vs. fünf Wochen: +185%,  $p < 0,05$ ). Die CaMKII-Aktivität zeigt einen Anstieg von 40% fünf Wochen nach TAC-Intervention (vs. TAC eine Woche, +40%,  $p < 0,05$ ). Die Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 ist in Herzen fünf Wochen nach TAC-Operation im Vergleich zu Herzen eine Woche nach TAC-Intervention an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 hyperphosphoryliert.

**Abbildung 3.10 A**



**Abbildung 3.10 A**

Dargestellt sind die Proteinanalysen der CaMKII und der Na<sup>+</sup>-Kanalisoformen Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.5, P-Na<sub>v</sub>1.5, Na<sub>v</sub>1.6 und der β<sub>1</sub>-Untereinheit (β<sub>1</sub>-UE) des Na<sup>+</sup>-Kanals in Sham- und TAC-Zellen. Links eine Woche und rechts fünf Wochen nach TAC-Intervention (n=6 pro Gruppe).

Abbildung 3.10 B

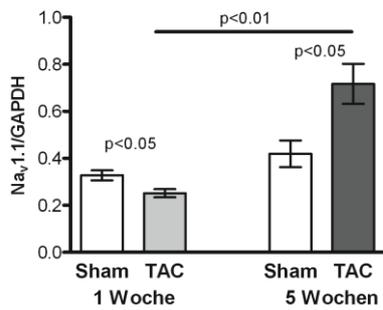


Abbildung 3.10 C

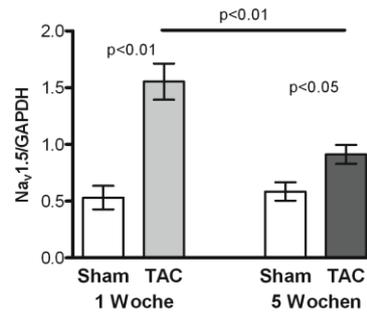


Abbildung 3.10 D

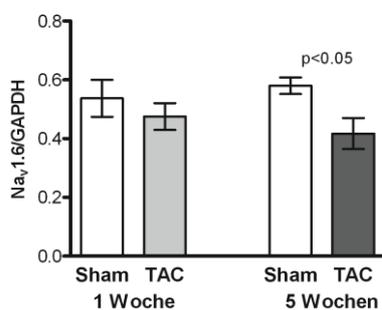


Abbildung 3.10 E

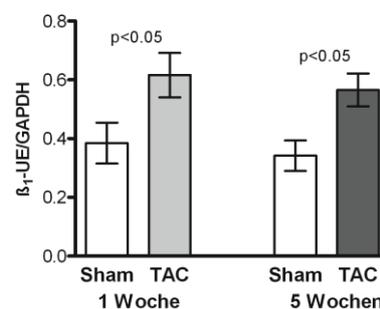


Abbildung 3.10 F

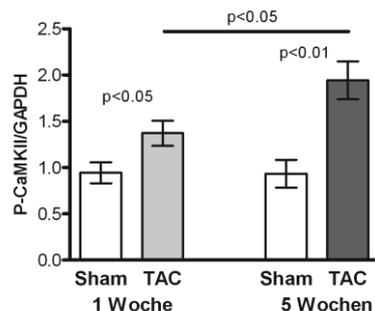
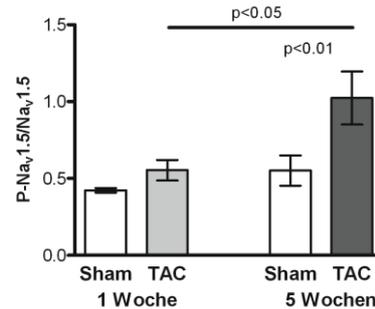


Abbildung 3.10 G



**Abbildung 3.10. B:** Mittelwerte der Proteinanalysen der Na<sup>+</sup>-Kanalisoform Na<sub>v</sub>1.1 normalisiert auf GAPDH in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention. **C:** Mittelwerte der Proteinanalysen der Na<sup>+</sup>-Kanalisoform Na<sub>v</sub>1.5 normalisiert auf GAPDH in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention. **D:** Mittelwerte der Proteinanalysen der Na<sup>+</sup>-Kanalisoform Na<sub>v</sub>1.6 normalisiert auf GAPDH in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention. **E:** Mittelwerte der Proteinanalysen der Na<sup>+</sup>-Kanalisoform β<sub>1</sub> (β<sub>1</sub>-UE) normalisiert auf GAPDH in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention. **F:** Mittelwerte der Proteinanalysen der phosphorylierten CaMKII (Thr-286) normalisiert auf GAPDH+CaMKII in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention. **G:** Mittelwerte der Proteinanalysen der phosphorylierten Na<sup>+</sup>-Kanalisoform Na<sub>v</sub>1.5 an Ser-571 (CaMKII-Phosphorylierungsstelle) normalisiert auf Na<sub>v</sub>1.5 in Sham- und TAC-Myokard eine Woche und fünf Wochen nach TAC-Intervention.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in der Druck-induzierten Hypertrophie mit erhaltener systolischer LV-Pumpfunktion der late  $I_{Na}$  sowie die Aktionspotentialdauer unverändert bleiben. Schreitet die Erkrankung voran, so entwickelt sich im Stadium der Druck-induzierten Herzinsuffizienz eine Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit geht mit einer signifikanten Aktionspotentialverlängerung einher, und eine Inhibition des Stroms mittels Ranolazin oder TTX sowie die Behandlung mit dem CaMKII-Inhibitor *AIP* führen zu einer deutlichen Verkürzung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und der Aktionspotentialdauer. Unter beta-adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol entstehen in unserem Modell der Druck-induzierten Herzinsuffizienz präferenziell *DADs* und getriggerte Aktivität, welche durch Inhibition des late  $I_{Na}$  oder der CaMKII supprimiert werden können. Western-Blot-Analysen zeigen erstmalig eine erhöhte Aktivität der CaMKII mit einer Hyperphosphorylierung der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 an der  $Na^+$ -Kanal-Isoform  $Na_v1.5$  in Mäuseherzen fünf Wochen nach TAC-Intervention. Somit scheint der late  $I_{Na}$  über die Vermittlung der CaMKII eine bedeutende Rolle für die Aktionspotentialverlängerung und Arrhythmogenese in der Herzinsuffizienz zu spielen.

### 4.1 Tiermodell der kardialen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz

Bisher basieren die meisten veröffentlichten Ergebnisse bezüglich des late  $I_{Na}$  in Kombination mit Ranolazin als dessen Inhibitor auf Untersuchungen an ischämischen oder pharmakologisch behandelten Zellen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Daten erhoben, die nicht auf einem Myokardischämiemodell, sondern auf einem nicht-ischämischen, Druck-induzierten Nachlastmodell basieren. Die dabei verwendeten Mäuse entwickeln eine Woche nach TAC-Intervention eine signifikante Hypertrophie mit erhaltener LV-Pumpfunktion.

Eine Woche nach TAC-Intervention - in der kompensierten Hypertrophie - ist keine signifikante Erhöhung der Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe in unseren Mäusen zu beobachten. Deshalb können indirekt lebensbedrohliche Arrhythmien nahezu ausgeschlossen werden. Dieser Zeitpunkt der kompensierten Hypertrophie wurde gewählt, um zelluläre elektrophysiologische Veränderungen in einem klar definierten Stadium zu untersuchen.

Beim Übergang von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz steigt die Sterblichkeit der Mäuse an. Diese Beobachtung ist am ehesten zum einen mit dem Voranschreiten der Herzinsuffizienz (Einschränkung der LV-EF) fünf Wochen nach TAC-Operation verbunden. Zum anderen sind sehr wahrscheinlich auch tödliche Arrhythmien der Grund für die erhöhte Mortalität der

Mäuse. Es ist ebenfalls von Patienten mit Herzinsuffizienz bekannt, dass diese zumeist zu gleichen Anteilen entweder an kardialen Pumpversagen oder letalen Arrhythmien versterben. Soweit bekannt, existieren bisher keine telemetrischen Daten im Mausmodell, welche den Verlauf in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz darstellen.

## **4.2 Elektrophysiologisches Remodelling in der Hypertrophie**

In Kardiomyozyten von Tieren, die in der kompensierten Hypertrophie bei erhaltener systolischer LV-Pumpfunktion (eine Woche nach TAC-Operation) untersucht wurden, konnte keine signifikante Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit nachgewiesen werden. Korrespondierend zu diesen Ergebnissen zeigen diese Zellen ebenfalls keine Verlängerung der APD und die Mäuse keine erhöhte Mortalität im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass eine unveränderte late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und eine normale Aktionspotentialdauer nicht mit einer erhöhten Mortalität der Tiere eine Woche nach TAC-Intervention einhergehen. Viele Arbeiten zum Thema Druck-induzierte Herzerkrankung unterscheiden nicht eindeutig zwischen Hypertrophie und Herzinsuffizienz, weshalb es schwierig ist, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit anderen Studien direkt zu vergleichen und zu diskutieren. Da zudem der Schweregrad einer Hypertrophie sehr variabel und stark abhängig von der jeweiligen Operationsmethode sowie von den unterschiedlichen angewendeten Messprotokollen (z.B. Kanülengröße und Zeit nach der TAC-Operation) ist, erschwert dies zusätzlich den Vergleich der unterschiedlichen TAC-Modelle bzw. TAC-Studien miteinander. Beispielsweise wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass eine APD-Verlängerung eine Woche nach TAC-Operation zu beobachten war (Toischer et al. 2010). Diese Veränderungen lassen sich im Zusammenhang mit der aktuellen Arbeit am ehesten so erklären, dass zum einen ein anderer Maustyp verwendet wurde (FVBN vs. C57/BL6) und zum anderen das Alter der Mäuse zum Untersuchungszeitpunkt anders als in der aktuellen Studie war (12 Wochen vs. 8 Wochen). Zudem zeigt sich ein Unterschied im Ausmaß der Hypertrophie (Septumdicke +18% vs. +14%). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass in unserem Modell sowohl die Verlängerung der APD als auch die Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit in der kompensierten Hypertrophie nicht beobachtet werden, diese aber beim Voranschreiten der Hypertrophie bzw. der Herzinsuffizienz auftreten.

## **4.3 Elektrophysiologisches Remodelling bei Herzinsuffizienz**

Eine typische Veränderung in der Herzinsuffizienz ist die Verlängerung des kardialen APs. Prinzipiell kann eine APD-Verlängerung auf verschiedene Weise entstehen: Zum einen

durch eine Steigerung der depolarisierenden Ströme, z.B. L-Typ-Kalziumkanäle, dem NCX oder durch Veränderungen  $\text{Na}^+$ -transportierender Kanäle, z.B. dem  $\text{Na}^+$ -Kanal, der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase oder dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher; zum anderen durch eine Erniedrigung repolarisierender Ströme, z.B.  $\text{K}^+$ -Ströme. Die Interaktion sowie die pathologischen Mechanismen dieser Ionenströme, die in der Herzinsuffizienz zur APD-Verlängerung beitragen, sind immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein gesteigerter late  $I_{\text{Na}}$  in ventrikulären Myozyten von herzinsuffizienten Herzen wurde bereits berichtet (Undrovinas AI et al. 1999; Wagner et al. 2006; Maltsev und Undrovinas A 2008; Sossalla et al. 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Verlängerung der late  $I_{\text{Na}}$ -Abfallszeit mit einer APD-Verlängerung bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz einhergeht. Diese APD-Verlängerung scheint in unserem Modell maßgeblich durch eine Verlängerung der late  $I_{\text{Na}}$ -Abfallszeit verursacht zu sein, da Inhibitoren des Stroms die verlängerte APD wieder verkürzen. Auch Maltsev und Undrovinas 2008 beschreiben einen Zusammenhang von late  $I_{\text{Na}}$  und APD-Verlängerung (Maltsev und Undrovinas 2008). Da Ranolazin auch den  $I_{\text{Kr}}$  bei einer  $\text{IC}_{50}$  von  $11,5 \mu\text{mol/L}$  inhibiert (Antzelevitch et al. 2004), werden die Messungen nicht nur mit Ranolazin, sondern zur weiteren Verifizierung mit TTX durchgeführt (Maltsev et al. 1998; Song et al. 2008). TTX inhibiert selektiv  $\text{Na}^+$ -Kanäle ohne bedeutenden Einfluss auf andere Ströme oder Kanäle auszuüben (Moore et al. 1967; Almers und Levinson 1975). Ranolazin und TTX zeigen in niedrigen Konzentrationen fünf Wochen nach TAC-Operation übereinstimmend eine signifikante Verkürzung der late  $I_{\text{Na}}$ -Abfallszeit und parallel dazu eine deutliche Verkürzung der zellulären APD. Deshalb ist der gesteigerte late  $I_{\text{Na}}$  ein prädominanter Faktor, der zur APD-Verlängerung bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz in unserem Tiermodell beiträgt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Undrovinas und Mitarbeiter, die Ranolazin an isolierten Zellen eines ischämischen Hundeherzinsuffizienzmodelles untersuchten (Undrovinas AI et al. 2006). Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verkürzung der APD durch Ranolazin. Ähnliche Ergebnisse wurden von Maltsev und Mitarbeitern beobachtet (Maltsev et al. 1998). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik Ionenströme von Kardiomyozyten aus Ventrikelmyokard von herzinsuffizienten Patienten untersucht. Die Studie beschreibt eine Verkürzung der APD auf bis zu 75% durch TTX in herzinsuffizienten Kardiomyozyten. Im Vergleich dazu wird gezeigt, dass TTX die APD in ventrikulären Myozyten eines nicht insuffizienten Spenderherzens nur um 15 bis 20% reduziert, wo der late  $I_{\text{Na}}$  mit kleiner Amplitude angenommen wird. Eine weitere Arbeit untersucht zwei weitere spezifische  $\text{Na}^+$ -Kanalblocker, Saxitoxin und Lidocain, an isolierten Kardiomyozyten in einem ischämischen Hundeherzinsuffizienzmodell (Maltsev und Undrovinas AI 1998). In diesen Experimenten führen beide  $\text{Na}^+$ -Kanalblocker zu einer Verkürzung der APD. Eine Studie aus dem Jahr 2009 von Xi und Mitarbeitern zeigt in einem Druck-induzierten Herzinsuffizienzmodell in Rattenkardiomyozyten, dass TTX auch hier zu einer Verkürzung der APD

führt (Xi et al. 2009). Schließlich gibt es eine Reihe von Arbeiten, die belegen, dass eine artifizielle Steigerung des late  $I_{Na}$  zum Beispiel durch ATX-II oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu einer Verlängerung der kardialen APD führen (Song et al. 2006; Wu L et al. 2006; Song et al. 2008; Wu L et al. 2008). Diese Effekte sind durch Ranolazin und TTX zumeist rückführbar. Zusammenfassend zeigen diese Kenntnisse, dass die Steigerung des late  $I_{Na}$  eine zentrale Rolle für die Verlängerung der APD bei fortschreitender Herzinsuffizienz spielt. Der zugrundeliegende Mechanismus der late  $I_{Na}$ -Induktion in Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz war bisher nicht ausreichend geklärt. In unserem Druck-induzierten Mausmodell zeigen wir nun, dass die Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit CaMKII-abhängig ist. Durch den CaMKII-Inhibitor *AIP* kommt es zu einer signifikanten Verkürzung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und parallel zur Verkürzung der verlängerten APDs in Kardiomyozyten von TAC-Tieren fünf Wochen nach Intervention. Frühere Arbeiten beschreiben einen vermehrten late  $I_{Na}$  in transgenen CaMKII $\delta_C$  Mäusen, adenoviralen CaMKII $\delta_C$ -transfizierten Kanninchenkardiomyozyten sowie Meerschweinkardiomyozyten, welcher zumeist durch CaMKII-Inhibitoren aufgehoben werden konnte (Wagner et al. 2006; Aiba et al. 2010). Eine weitere kürzlich erschienene Arbeit von Wagner und Mitarbeitern zeigt, dass ROS in einem CaMKII $\delta$ -Mausmodell über eine Erhöhung der CaMKII-Aktivität zu einer Steigerung des late  $I_{Na}$  führen (Wagner et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit expandieren dieses Wissen und zeigen, dass beim Remodelling in insuffizientem Myokard eine gesteigerte Expression der CaMKII dazu beiträgt, dass es durch einen vermehrten late  $I_{Na}$  zu einer APD-Verlängerung in der nicht-ischämischen Herzinsuffizienz kommt.

#### **4.4 Late $I_{Na}$ generiert arrhythmogene Trigger**

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass es bei Herzinsuffizienz zu einem intrazellulären  $Na^+$ -Anstieg kommt (z.B. Pieske et al. 2002). Dabei führt ein erhöhter  $Na^+$ -Einstrom zur  $Na^+$ -Überladung der Zelle und dadurch zum Umkehrmodus des NCX mit reduziertem  $Ca^{2+}$ -Auswärtsstrom (Sossalla et al. 2008; Undrovinas NA et al. 2010) und in der Folge zu einer sekundären  $Ca^{2+}$ -Überladung der Zelle (Sossalla et al. 2008; Undrovinas NA et al. 2010). Diese zelluläre  $Ca^{2+}$ -Überladung führt zu spontanen  $Ca^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR, welche auch als  $Ca^{2+}$ -*Sparks* bezeichnet werden (Bers 2001; Undrovinas NA et al. 2010).  $Ca^{2+}$ -*Sparks* und  $Ca^{2+}$ -Wellen treten ebenfalls gehäuft durch undichte Ryanodinrezeptoren (RyR2) bei Herzinsuffizienz auf (Maier et al. 2003; Sossalla et al. 2010a; Fischer et al. 2013). Es wird angenommen, dass die  $Ca^{2+}$ -*Sparks* ein entscheidendes Ereignis bei der Initiation und Übertragung von  $Ca^{2+}$ -Wellen sind. Das dabei anfallende zytosolische  $Ca^{2+}$  kann über den NCX eliminiert werden, durch dessen elektrogeneren Transport (3  $Na^+$  vs. 1  $Ca^{2+}$ ) ein depolarisie-

render Strom erzeugt wird. Dieser kann ein spontanes AP generieren und zur Entstehung von arrhythmogenen Triggern, beispielsweise den *DADs*, in Herzmuskelzellen beitragen kann (Lederer und Tsien 1976; Maltsev et al. 1998; Song et al. 2008). Da in unserem Modell fünf Wochen nach TAC-Intervention unter basalen Konditionen nur vereinzelt Nachdepolarisationen beobachtet werden, werden durch Zugabe von Isoproterenol die zellulären SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher gefüllt, um damit das Potential zellulärer Arrhythmien zu demaskieren. Zudem scheinen Experimente unter diesen Bedingungen (mit einer Isoproterenolkonzentration von etwa  $10^{-8}$  mol/L) klinische Relevanz zu besitzen, denn diese Konzentration ist vergleichbar mit Katecholaminspiegeln, wie sie bei Patienten mit Herzinsuffizienz vorkommen (Klensch 1966; Hasking et al. 1986). In den Übersichtsarbeiten von Antzelevitch und Burashnikov 2011 oder Zipes 2003 wird beschrieben, dass Hypoxie, Katecholamine, ventrikuläre Hypertrophie sowie Herzinsuffizienz zu den prädisponierenden Faktoren gehören, die v.a. über eine Verlängerung der APD arrhythmogene Trigger in Form von *EADs* auslösen können (Zipes 2003; Antzelevitch und Burashnikov 2011). *DADs* entstehen hauptsächlich durch erhöhte intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei Herzinsuffizienz, Hypertrophie, Katecholamin- oder Glykosidüberdosierungen beobachtet werden (Zipes 2003; Antzelevitch und Burashnikov 2011). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass trotz Einsatz eines Katecholamins, dem Isoproterenol, keine erhöhte Inzidenz von *EADs* aufgetreten ist. In Vorarbeiten von Priori und Corr 1990 wird in Kaninchen- und Hundemyokard zum einen beobachtet, dass es durch einen  $\alpha$ -adrenergen Agonisten wie Phenylephrin zu einer APD-Verlängerung kommt, aber keine arrhythmogenen Trigger in Form von *EADs* oder *DADs* entstehen (Priori und Corr 1990). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigen Priori und Corr 1990 zum anderen, dass es durch Einsatz eines  $\beta$ -adrenergen Agonisten, dem Isoproterenol, zu einer APD-Verlängerung sowie zu einer Induktion von arrhythmogenen Triggern wie *DADs* kommt (Priori und Corr 1990). Die auftretenden *DADs* sind in unseren Untersuchungen so potent, dass sich aus diesen unstimulierte APs, die hier als getriggerte Aktivität bezeichnet werden, beobachten ließen. Insbesondere sind es diese Tiere, deren Mortalität fünf Wochen nach TAC-Operation signifikant erhöht ist. Interessanterweise zeigt sich durch eine wiederholte Behandlung mit Ranolazin, dass die beobachteten AP-Veränderungen sowie *DADs* und die getriggerte Aktivität rückläufig sind. Ranolazin zeigt somit einen starken antiarrhythmischen Effekt auf die *DAD*-Entstehung, indem es die  $\text{Na}^+$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung durch weniger spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Entladungen aus dem SR reduziert (Song et al. 2008; Sossalla et al. 2008; Undrovinas NA et al. 2010). Da im Weiteren durch die Applikation von TTX ebenfalls keine *DADs* oder getriggerte Aktivität beobachtet werden, ist es wahrscheinlich, dass die Induktion von *DADs* abhängig vom late  $I_{\text{Na}}$  ist. Dies konnten auch Song et al. mittels TTX nachweisen (Song et al. 2008). Da wir in unserem

Druck-induzierten Mausmodell davon ausgehen, dass die Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit CaMKII-abhängig ist, zeigen wir durch Inhibition der CaMKII mittels *AIP*, dass es über die Verkürzung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und der konsekutiven Verkürzung der APDs in herzinsuffizienten Myozyten ebenfalls zur Reduktion der zellulären Trigger kommt, die zur Entstehung von Arrhythmien führen können (Toischer et al. 2013). Weitere veröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen diese Ergebnisse und zeigen, dass die Steigerung des late  $I_{Na}$  die CaMKII aktiviert, welche den RyR2 phosphoryliert, was schließlich zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 und *DADs* führt (Fischer et al. 2013). Konfokale Lasermikroskopie zur Bestimmung spontaner SR- $Ca^{2+}$ -Freisetzung, sog. SR- $Ca^{2+}$ -*Sparks*, zeigt ergänzend zur vorliegenden Arbeit in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz in Gegenwart von Ranolazin und des CaMKII-Inhibitors *AIP* eine reduzierte SR- $Ca^{2+}$ -*Spark*frequenz (Toischer et al. 2013). Demzufolge scheint die CaMKII eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der durch den late  $I_{Na}$  induzierten Undichtigkeit des kardialen RyR2 zu spielen, woraus *DADs* und in der Folge getriggerte Aktivität via  $Ca^{2+}$ -*Sparks* oder  $Ca^{2+}$ -Wellen entstehen können. Zusammengefasst ergibt sich aus diesen Erkenntnissen, dass die Inhibition des late  $I_{Na}$  sowohl durch Ranolazin als auch durch *AIP* einen starken antiarrhythmischen Effekt auf zellulärer Ebene ausübt.

#### 4.5 Molekulare Mechanismen

$Na^+$ -Kanäle sind Multiproteinkomplexe, deren Aktivität nicht nur durch die Porenform der  $\alpha$ -Untereinheit, sondern auch über die regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten und zahlreiche Interaktionspartner gesteuert wird. Dabei kommt es durch Veränderungen der Membranspannung zu einer Vielzahl von Struktur- und Konformationsänderungen in den Kanalstrukturen. Eines dieser Kanalstrukturen ist die  $\alpha$ -Untereinheit mit ihrer Isoform  $Na_v1.5$ , welche am Herzen die prädominante  $Na^+$ -Kanalisoform darstellt (Catterall 1992; Wagner und Maier 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die kardiale  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v1.5$  in unserem Tiermodell bei Hypertrophie deutlich höher exprimiert ist als bei Herzinsuffizienz. Interessanterweise werden trotz erhöhter Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v1.5$  bei Druck-induzierter Hypertrophie keine signifikanten Veränderungen der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit beobachtet. Da wir bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz allerdings eine deutlich niedrigere Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v1.5$  als bei Hypertrophie messen, lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Expression der  $Na^+$ -Kanalisoform  $Na_v1.5$  und der verlängerten late  $I_{Na}$ -Abfallszeitveränderung bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz herstellen. Deshalb wurden weitere  $Na^+$ -Kanalisoformen wie  $Na_v1.1$  und  $Na_v1.6$  sowie weitere Regulatoren und Modulatoren, wie beispielsweise die CaMKII oder die  $\beta_1$ -Untereinheitenexpression der  $Na^+$ -Kanäle

untersucht. Dabei zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass die  $\text{Na}_v1.1$ -Expression bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz fünf Wochen nach TAC-Operation erhöht ist, während die Expression der  $\text{Na}^+$ -Kanalisoform  $\text{Na}_v1.6$  fünf Wochen nach TAC-Intervention erniedrigt ist. In den Vorarbeiten von Xi und Mitarbeitern 2009 konnte hingegen ein gesteigerter late  $I_{\text{Na}}$  sowie eine Verlängerung der APD im Zusammenhang mit einer vermehrten Expression beider neuronalen  $\text{Na}^+$ -Kanalisoformen  $\text{Na}_v1.1$  und  $\text{Na}_v1.6$  in herzinsuffizienten Rattenkardio-myozyten gezeigt werden (Xi et al. 2009). Weitere veröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen bei VHF - in humanen Myozyten - einen gesteigerten late  $I_{\text{Na}}$  und eine vermehrte Expression der  $\text{Na}_v1.1$ -Untereinheit (Sossalla et al. 2010b). So könnte die  $\text{Na}_v1.1$ -Expression ein Mechanismus sein, der zu einer Steigerung des late  $I_{\text{Na}}$  bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz führt. Prinzipiell scheinen die sehr divergenten Ergebnisse der  $\text{Na}^+$ -Kanalisoformexpression in unserem Modell nicht die Erklärung für die erhobenen Befunde zu sein.

Da  $\text{Na}^+$ -Kanäle nicht nur durch  $\alpha$ -Untereinheiten, sondern auch über die regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten mitreguliert werden (Makita et al. 1994; Wagner und Maier 2006), untersuchten wir ebenfalls die  $\beta$ -Untereinheiten. Wir fokussierten uns dabei auf die  $\beta_1$ -Untereinheitenexpression, welche die am Herzen verbreitetste  $\beta$ -Untereinheitenisoform ist. Interessanterweise beobachteten Mishra und Mitarbeiter 2011 bei In-Vivo-Versuchen mit einem *Knockdown*-Modell der  $\beta_1$ -Untereinheit eine Zunahme des late  $I_{\text{Na}}$  in herzinsuffizienten Hundemyozyten (Mishra et al. 2011). Aufgrund dieser Studie von Mishra und Mitarbeitern 2011 könnte eine erhöhte Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit für eine Steigerung des late  $I_{\text{Na}}$  verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit wird dagegen gezeigt, dass die  $\beta_1$ -Untereinheitenexpression sowohl bei Hypertrophie als auch bei Herzinsuffizienz erhöht ist. Daher scheint die  $\beta_1$ -Untereinheitenexpression in unserem TAC-Modell keine wichtige Rolle bei der Regulierung des late  $I_{\text{Na}}$  in der Herzinsuffizienz zu spielen.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-(CaM)-abhängige Proteinkinase CaMKII, die häufigste Isoform der Proteinkinasen am Herzen (Jett et al. 1987), ist ein zentrales, regulatorisches Protein, welches komplexe regulatorische Effekte auf zelluläre Proteine ausübt (Anderson et al. 2011). Die Aktivität der CaMKII kann durch Auto-Phosphorylierung an der Aminosäure Thr-286 des Enzyms bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Aktivität der CaMKII sowohl eine Woche als auch fünf Wochen nach TAC-Intervention gemessen und die Ergebnisse zeigen, dass die CaMKII-Aktivität bei Herzinsuffizienz um ein Vielfaches höher ist als bei Hypertrophie. Vorarbeiten von Hoch et al. 1999, Kirchhefer et al. 1999, Wagner et al. 2006 und Sossalla et al. 2010a zeigen, dass in Maus-, Kaninchen-, Schaf- und humanen insuffizientem Myokard die CaMKII-Expression deutlich erhöht ist (Hoch et al. 1999; Kirchhefer et al. 1999; Wagner et al. 2006; Sossalla et al. 2010a). Weitere Studien beschrei-

ben, dass durch unterschiedliche Phosphorylierung am Na<sub>v</sub>1.5-Kanal die CaMKII direkt kardiale Na<sup>+</sup>-Kanäle moduliert (Wagner et al. 2006; Hund et al. 2010; Ashpole et al. 2012). Hund und Mitarbeiter beobachteten 2010 eine erhöhte Phosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 der Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 in Mauskardiomyozyten, die in der Folge zu einer Zunahme des late I<sub>Na</sub> und zu Nachdepolarisationen führt (Hund et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit ist die CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 der Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 in der Druck-induzierten Herzinsuffizienz deutlich hyperphosphoryliert als bei Hypertrophie. Koval und Mitarbeiter ergänzen die Beobachtungen und beschreiben in Kaninchen- und humanem Myokard proarrhythmogene Veränderungen durch eine Phosphorylierung an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-571 der Na<sup>+</sup>-Kanal-Isoform Na<sub>v</sub>1.5 (Koval et al. 2012).

Zusammenfassend zeigen die molekularbiologischen Veränderungen bei Herzinsuffizienz in unserem TAC-Modell sowohl eine Verlängerung der late I<sub>Na</sub>-Abfallszeit als auch eine Erhöhung der CaMKII-Expression und -Aktivität (Toischer et al. 2013). Des Weiteren führen erhöhte zelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zur Aktivierung der CaMKII (Schulman et al. 1992; Hanson et al. 1994; Hudmon und Schulman 2002; Zhang und Brown 2004; Wagner und Maier 2006), welche den Na<sub>v</sub>1.5 phosphoryliert und konsekutiv zu einer weiteren Steigerung des late I<sub>Na</sub> führt (Yao et al. 2011; Toischer et al. 2013). Diese Steigerung des late I<sub>Na</sub> verursacht erneut über zelluläre Na<sup>+</sup>-bedingte Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation (Sossalla et al. 2008) eine Aktivierung der CaMKII, welche den RyR2 phosphoryliert (Maier et al. 2003), was schließlich zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 und zu arrhythmogenen Triggern wie DADs führen kann (Fischer et al. 2013; Toischer et al. 2013). Somit zeigt die vorliegende Arbeit erstmalig, dass eine vermehrte Expression der CaMKII bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz und die CaMKII-abhängige Regulierung des late I<sub>Na</sub> durch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an Ser-571 der Na<sub>v</sub>1.5-Untereinheit der Hauptmechanismus ist, der zur Steigerung des late I<sub>Na</sub>, zur APD-Verlängerung und in der Folge zu proarrhythmogenen Veränderungen bei Druck-induzierter Herzerkrankung führt.

### **4.6 Limitationen der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der late I<sub>Na</sub> bei niedrigen Frequenzen von 0,5 bis 2 Hz ein prädominanter Faktor ist, der zur APD-Verlängerung bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz beiträgt. Höhere Frequenzen, weitere Kanäle oder Ströme wurden in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht. Daher könnten bei größeren Frequenzen weitere Kanäle oder Ströme ebenfalls eine wichtige Rolle spielen und zu einer APD-Verlängerung führen. Des Weiteren ist zu konstatieren, dass alle Experimente auf zellulärer Ebene durch-

geführt wurden, so dass eine direkte Übertragung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen in Bezug auf Arrhythmien in eine In-Vivo-Situation nicht ohne weitere Untersuchungen möglich ist, da beispielsweise keine Zell-Zell-Kontakte und -Interaktionen oder möglicherweise vorhandenes Narbengewebe, welches die Reizweiterleitung beeinflussen könnte, mit in die Beobachtungen einbezogen wurden.

#### **4.7 Klinische Relevanz**

Die vorliegende Arbeit versucht, die Arrhythmogenese im Rahmen dieser klinisch sehr relevanten Pathophysiologie der Druck-induzierten Herzerkrankungen näher mit besonderem Fokus auf den late  $I_{Na}$  zu untersuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Stadium der Druck-induzierten Herzinsuffizienz eine Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit sowie eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Unter beta-adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol entstehen im selben Stadium arrhythmogene Trigger in Form von *DADs* sowie daraus entstehende getriggerte Aktivität, welche durch Inhibition des late  $I_{Na}$  oder der CaMKII supprimiert werden können. Zusammengenommen ergibt sich aus diesen Befunden, dass die Inhibition des late  $I_{Na}$  sowohl durch Ranolazin als auch indirekt über den CaMKII-Inhibitor *AIP* einen starken antiarrhythmischen Effekt auf zellulärer Ebene ausübt, was für die Klinik von großer Relevanz sein könnte. Denn die klassischen Antiarrhythmika verfügen häufig über ein proarrhythmogenes Potential sowie eine limitierte Einsetzbarkeit aufgrund der teils schweren Organtoxizitäten. Vor allem Klasse-I-Antiarrhythmika zeigen bei koronarer Herzkrankheit und letztendlich bei struktureller Herzerkrankung ein hohes proarrhythmogenes Potential und führen zu einer erhöhten Mortalität bei diesen Patienten (Echt et al. 1991; Greene et al. 1992; Hohnloser und Singh 1995). Somit bleibt zumeist nur Amiodaron als Antiarrhythmikum für die Behandlung von Vorhof- als auch Ventrikelarrhythmien bei Patienten mit struktureller Herzerkrankung übrig. Amiodaron zeigt jedoch eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen wie Mikroablagerungen auf der Vorderfläche der Hornhaut (*Cornea verticillata*), Photosensibilisierung, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Lungenfibrose und Hautveränderungen. Deshalb besteht ein großer Bedarf an neuen Substanzen, insbesondere für die Behandlung von Arrhythmien bei Patienten mit struktureller Herzerkrankung.

Die vorliegende Arbeit impliziert nun im Tiermodell, dass Ranolazin ein Antiarrhythmikum für Herzinsuffizienzpatienten sein könnte. Tatsächlich gibt es bereits erste Hinweise in klinischen Studien, welche einen potenten antiarrhythmischen Effekt der Substanz nahelegen. Eine große klinische Studie „MERLIN-TIMI 36“ (*Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Elevation Acute Syndromes - Thrombolysis In Myocardial Infaction*

36) zeigt, dass Ranolazin als Ergänzung zur Standardtherapie bei Patienten mit einem NSTEMI (Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt) signifikant das Auftreten von supra-ventrikulären und ventrikulären Arrhythmien reduziert (Scirica et al. 2007). Patienten mit einer reduzierten EF ( $\leq 40\%$ ), starben zu 4,9% am plötzlichen Herztod. Eine Behandlung mit Ranolazin führte nahezu zu einer Halbierung der Raten eines plötzlichen Herztodes auf 2,7%. In diesem Kontext muss jedoch erwähnt werden, dass die Studie nicht darauf ausgelegt war, primär Arrhythmien zu untersuchen und der p-Wert für letzteres Ergebnis bei 0,07 liegt. In der gleichen Studie wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt und Patienten mit erhöhtem natriuretischem Peptid Typ B (*brain natriuretic peptide*, (BNP)) ( $>80$  pg/ml) untersucht (BNP, 1,935 Patienten) (Morrow et al. 2010). BNP und das N-terminale pro-*brain* natriuretische Peptid Typ B (NT-pro BNP) sind dabei gute Parameter zur Diagnosesicherung und Prognoseabschätzung einer Herzinsuffizienz. Es wurde gezeigt, dass es bei Patienten mit einem erhöhten BNP durch die Behandlung mit Ranolazin zu einer signifikanten Reduktion des kardiovaskulären Todes, der Myokardinfarkte, wiederkehrender kardialer Ischämien sowie Arrhythmien kommt. Das Risiko des plötzlichen Herztodes konnte durch die Behandlung mit Ranolazin ebenfalls numerisch um  $\sim 34\%$  reduziert werden ( $p=0,11$ ; Morrow et al. 2010). Mehrere kleinere Arbeiten zeigen potente antiarrhythmische Effekte von Ranolazin bei Patienten mit struktureller Herzerkrankung. Zumeist handelt es sich hierbei jedoch um kleine kollektive Beobachtungsstudien und zumeist nicht um randomisierte, placebokontrollierte Designs. So zeigt z.B. eine Arbeit, dass Ranolazin bei Patienten mit rezidivierenden ventrikulären Tachykardien und regelmäßigen Auslösungen eines implantierten Defibrilators (ICD) deutlich die Anzahl der ventrikulären Tachykardien sowie die Auslösungen des ICDs bei Herzinsuffizienz reduziert (Bunch et al. 2011). Auch eine Reduktion von ventrikulären Extrasystolen konnte gezeigt werden (Scirica et al. 2007; Wilson et al. 2009; Yeung et al. 2014, im Druck). Wichtig erscheint in diesem Kontext, dass Ranolazin anders als z.B. Amiodaron keine relevante Organtoxizität besitzt und im Vergleich zu den Klasse-I-Antiarrhythmika zu keiner Erhöhung des plötzlichen Herztodes führt.

Des Weiteren scheint Ranolazin nicht nur antiarrhythmische Effekte auf ventrikuläre, sondern auch auf atriale Arrhythmien auszuüben. In einer Arbeit von Murdock und Mitarbeitern wird 2009 gezeigt, dass 72% der Patienten mit VHF nach oraler Gabe von 2 Gramm Ranolazin in den Sinusrhythmus konvertiert sind (Murdock et al. 2009). Ergänzend zeigen Miles und Murdock 2010, dass Ranolazin das erneute Auftreten von VHF bei Patienten nach koronarer Bypass-Operation im Vergleich zu Amiodaron signifikant reduziert (Miles et al. 2011). Der Mechanismus der antiarrhythmischen Wirkung von Ranolazin bei VHF ist mittlerweile grundlagenwissenschaftlich erforscht (Burashnikov et al. 2007; Sossalla et al. 2008). Aktuell laufen zwei große randomisierte, placebokontrollierte Multicenterstudien, welche den Effekt von

Ranolazin zum Rhythuserhalt bei Patienten mit VHF alleine oder auch in Kombination mit Dronedaron klinisch untersuchen (HARMONY-Studie und RAFFAELLO-Studie).

Ebenfalls befindet sich eine identisch designte Studie zur Reduktion von ICD-Schocks bei Patienten mit ventrikulären Rhythmusstörungen in der Rekrutierungsphase. Die Ergebnisse dieser großen Studien sind abzuwarten und werden über eine mögliche Translation der experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in den klinischen Einsatz Aufschluss geben. Zusammenfassend besteht weiterer Bedarf insbesondere an klinischen Studien, um die antiarrhythmogene Wirkung von Ranolazin bei Patienten mit Herzinsuffizienz genauer zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in der Druck-induzierten Hypertrophie mit erhaltener systolischer linksventrikulärer Pumpfunktion der späte Natriumstrom sowie die Aktionspotentialdauer unverändert bleiben. Schreitet die Erkrankung voran, so zeigt sich im Stadium der Druck-induzierten Herzinsuffizienz eine Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit. Diese Verlängerung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit geht mit einer signifikanten Aktionspotentialverlängerung einher. Eine Inhibition des Stroms mittels der Natriumkanalinhibitoren Ranolazin oder Tetrodotoxin in niedriger Konzentration (beide spezifische Inhibitoren des späten Natriumstroms) bewirkt eine deutliche Verkürzung des TAC-Effekts auf die late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und die Aktionspotentialdauer. Durch den  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase-II-Inhibitor, das *Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide*, kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Verkürzung der late  $I_{Na}$ -Abfallszeit und parallel zur Verkürzung der prolongierten Aktionspotentialdauer in Kardiomyozyten von TAC-Tieren fünf Wochen nach Intervention. Unter beta-adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol entstehen in unserem Modell der Druck-induzierten Herzinsuffizienz präferenziell späte Nachdepolarisationen und getriggerte Aktivität, welche durch Inhibition des späten Natriumstroms oder der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II supprimiert werden können. Passend hierzu zeigt sich, dass TAC-Tiere nach einer Woche keine erhöhte Mortalität aufweisen, während die Tiere mit Herzinsuffizienz nach fünf Wochen eine gesteigerte Mortalität zeigen. Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass die Veränderungen des späten Natriumstroms bei Druck-induzierter Herzinsuffizienz und konsekutiv die Aktionspotentialdauer von einer Erhöhung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II-Expression und -Aktivität parallelisiert werden. In diesem Stadium der Herzkrankung konnte eine Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, welche den  $Na_v1.5$  phosphoryliert und sehr wahrscheinlich zur Steigerung des späten Natriumstroms und damit verbundenen elektrophysiologischen Alterationen mit Entstehung von arrhythmogenen Triggern führt, aufgezeigt werden.

Die Inhibition des späten Natriumstroms und der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II und die damit verbundene Suppression von Arrhythmien bei Herzinsuffizienz sind mittlerweile auch Gegenstand der klinischen Forschung und bedürfen weiterer Untersuchungen, um die mögliche Translation der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit in den klinischen Einsatz zu evaluieren.

## 6. Anhang

### 6.1 AP-Parameter

#### 1 Woche

	<u>Sham</u>	<u>TAC</u>	<u>Sham+Ran</u>	<u>TAC+Ran</u>
Amplitude (mV)	106.3 ± 2.6	106.4 ± 5.1	107.1 ± 1.8	106.7 ± 3.6
V max. (V/s)	109.4 ± 11.4	107.8 ± 15.6	115.1 ± 6.9	108.9 ± 11.7
APD <sub>50</sub> (ms)	12.7 ± 1.8	11.1 ± 2.2	10.3 ± 1.2	10.1 ± 3.7

#### 5 Wochen

	<u>Sham</u>	<u>TAC</u>	<u>Sham+Ran</u>	<u>TAC+Ran</u>	<u>TAC+TTX</u>	<u>TAC+AIP</u>
Amplitude (mV)	103.5 ± 4.4	99.8 ± 3.8	87.0 ± 4.9	103.23 ± 2.9	89.1 ± 5.4	97.5 ± 4.0
V max. (V/s)	108.2 ± 14.7	84.8 ± 13.5	85.0 ± 12.2	98.6 ± 10.6	63.1 ± 8.3	97.7 ± 10.4
APD <sub>50</sub> (ms)	15.4 ± 2.6	30.7 ± 8.0	10.0 ± 1.9	17.7 ± 4.4	12.4 ± 3.4	9.4 ± 1.5 (#)

\* = signifikant vs. Sham

# = signifikant vs. TAC

**Tabelle 3.1** Mittelwerte der AP-Parameter Amplitude (mV), V max. = maximal erreichte Depolarisationsgeschwindigkeit (V/s) und APD<sub>50</sub> (ms) von TAC- und Sham-Zellen eine bzw. fünf Wochen nach TAC-Intervention. Gemessen in den Gruppen Sham, TAC, Sham+Ran, TAC+Ran, TAC+TTX und TAC+AIP. Konzentrationen: Ranolazin 10 µmol/L, TTX 2 µmol/L und AIP 1 µmol/L

## 6.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1	Schematische Darstellung des sarkoplasmatischen Retikulums.....	3
Abb. 1.2	Die elektromechanische Kopplung des Kardiomyozyten.....	5
Abb. 1.3	Querbrückenzyklus bzw. Prinzip der Gleitfilamenttheorie .....	6
Abb. 1.4	Schematische Darstellung einer kreisenden Erregung.....	10
Abb. 1.5	Darstellung einer frühen und einer späten Nachdepolarisation .....	11
Abb. 1.6	Der sarkolemmale Natriumkanal.....	13
Abb. 1.7	Grundprinzip spannungsgesteuerter Ionenkanäle.....	14
Abb. 1.8	Struktur und Aktivierung der CaMKII.....	19
Abb. 1.9	Die CaMKII und die elektromechanische Kopplung .....	20
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der transversalen aortalen Konstriktion.....	23
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Perfusionsanlage nach Langendorff .....	26
Abb. 2.3	Schematische Darstellung des <i>Patch-Clamp</i> -Aufbaus .....	30
Abb. 2.4	Prinzip des Pipettenziehgerätes .....	31
Abb. 2.5	Messkonfigurationen und ihre Herstellung .....	33
Abb. 2.6	Originalabbildung des späten Natriumstroms (late $I_{Na}$ ).....	35
Abb. 2.7	Originalregistrierung einer Aktionspotentialmessung .....	37
Abb. 3.1	Echokardiographie im M-Mode des linksventrikulären Durchmessers .....	49
Abb. 3.2 A	Mittelwerte der durch Echokardiographie ermittelten Septumdicken .....	51
Abb. 3.2 B	Mittelwerte des <i>heart-weight/body-weight</i> -Verhältnisses.....	51
Abb. 3.2 C	Mittelwerte der durch Echokardiographie ermittelten Ejektionsfraktion .....	51
Abb. 3.2 D	Mittelwerte des durch Echokardiographie ermittelten LVEDD .....	51
Abb. 3.2 E	Mittelwerte der Herzgewichte.....	51
Abb. 3.2 F	Mittelwerte der Membrankapazitäten .....	51
Abb. 3.3	Mäuseherzen fünf Wochen nach TAC-Operation.....	52
Abb. 3.4	Kaplan-Meier-Kurve von Kontroll- und TAC-Tieren.....	53

Abb. 3.5 A	Late $I_{Na}$ -Originalabbildungen eine Woche nach TAC-Intervention .....	55
Abb. 3.5 B	Mittelwerte der late $I_{Na}$ -Abfallszeit eine Woche nach TAC-Intervention .....	55
Abb. 3.6 A	Late $I_{Na}$ -Originalabbildungen fünf Wochen nach TAC-Intervention .....	56
Abb. 3.6 B	Mittelwerte der late $I_{Na}$ -Abfallszeit fünf Wochen nach TAC-Intervention .....	56
Abb. 3.7 A	Originalaktionspotentiale in Kardiomyozyten .....	58
Abb. 3.7 B	Mittelwerte der $APD_{90}$ eine Woche nach TAC-Intervention .....	58
Abb. 3.8 A	Originalaktionspotentiale in Kardiomyozyten .....	59
Abb. 3.8 B	Mittelwerte der $APD_{90}$ fünf Wochen nach TAC-Intervention .....	59
Abb. 3.9 A	Originalaktionspotentiale in Gegenwart von Isoproterenol und Ranolazin .....	61
Abb. 3.9 B	Frequenz von DADs/min (Mittelwerte fünf Wochen nach TAC-Intervention) ..	61
Abb. 3.9 C	Aktionspotential mit unstimuliert ausgelösten Aktionspotentialen.....	61
Abb. 3.9 D	Frequenz - getriggerte Aktivität (Mittelwerte nach fünf Wochen) .....	61
Abb. 3.10 A	Abbildung und Übersicht der Proteinanalysen .....	63
Abb. 3.10 B	Proteinanalysen der $Na^+$ -Kanalisoform $Na_v1.1$ .....	64
Abb. 3.10 C	Proteinanalysen der $Na^+$ -Kanalisoform $Na_v1.5$ .....	64
Abb. 3.10 D	Proteinanalysen der $Na^+$ -Kanalisoform $Na_v1.6$ .....	64
Abb. 3.10 E	Proteinanalysen der $Na^+$ -Kanalisoform $\beta_1$ ( $\beta_1$ -UE) .....	64
Abb. 3.10 F	Proteinanalysen der phosphorylierten CaMKII (Thr-286) .....	64
Abb. 3.10 G	Proteinanalysen der $Na^+$ -Kanalisoform $Na_v1.5$ an Ser-571 .....	64

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Stammlösung für die Myozytenisolation.....	26
Tab. 2.2	Enzymlösung.....	27
Tab. 2.3	Myozytenstoppufferlösung .....	27
Tab. 2.4	Badlösung zur Messung des late $I_{Na}$ .....	35
Tab. 2.5	Pipettenlösung zur Messung des late $I_{Na}$ .....	36
Tab. 2.6	Badlösung für AP-Messungen .....	37

Tab. 2.7	Pipettenlösung für AP-Messungen.....	37
Tab. 2.8	Homogenisierungspuffer.....	40
Tab. 2.9	Lämmli-Puffer .....	40
Tab. 2.10	4 x Tris/SDS-Stock für Sammel- und Trenngelherstellung .....	41
Tab. 2.11	Sammel- und Trenngel .....	42
Tab. 2.12	Laufpuffer .....	43
Tab. 2.13	Transferpuffer .....	43
Tab. 2.14	Waschpuffer .....	44
Tab. 2.15	Blockierpuffer.....	45
Tab. 2.16	Antikörperverdünnungspuffer.....	45
Tab. 2.17	Primäre Antikörper für Western-Blots .....	45
Tab. 2.18	Sekundäre Antikörper für Western-Blots.....	45
Tab. 2.19	Messtyrode.....	47
Tab. 2.20	ASC-Tyrode.....	47
Tab. 2.21	Isoproterenollösung .....	47
Tab. 3.1	Mittelwerte AP-Parameter.....	77

## 6.4 Formelverzeichnis

Formel 1.1	Das Laplace-Gesetz .....	9
Formel 2.1	Gleichgewichts-/Nernstpotential .....	28
Formel 2.2	Messstrom I.....	28
Formel 2.3	Messstrom I und Umrechnung auf die Leitfähigkeit .....	28
Formel 2.4	Kehrwert des Widerstandes (Leitfähigkeit g [Siemens]) .....	28
Formel 2.5	Berechnung $V_{\max}$ .....	38
Formel 2.6	Berechnung der Membrankapazität.....	39
Formel 2.7	Berechnung des Standardfehlers.....	48

## 7. Literaturverzeichnis

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

Almers W, Levinson SR (1975): Tetrodotoxin binding to normal depolarized frog muscle and the conductance of a single sodium channel. *J Physiol* 247, 483-509

An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M, Kass RS (1998): Novel LQT-3 mutation affects Na<sup>+</sup> channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ Res* 83, 141-146

Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, 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

Anderson ME, Brown JH, Bers DM (2011): CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51, 468-473

Antzelevitch C, Burashnikov A (2011): Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin* 3, 23-45

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

Ashpole NM, Herren AW, Ginsburg KS, Brogan JD, Johnson DE, Cummins TR, Bers DM, Hudmon A (2012): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Regulates Cardiac Sodium Channel Na<sub>v</sub>1.5 Gating by Multiple Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 287, 19856-19869

Balser JR, Nuss HB, Orias DW, Johns DC, Marban E, Tomaselli GF, Lawrence JH (1996): Local anesthetics as effectors of allosteric gating. Lidocaine effects on inactivation-deficient rat skeletal muscle Na channels. *J Clin Invest* 98, 2874-2886

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1993): Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 265, C533-540

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994): Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-293

Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H (2006): Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart* 92, 6-14

Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011): Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50, 940-950

Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr. (1995): Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683-685

Bers DM (1991): Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann N Y Acad Sci* 639, 375-385

Bers DM: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2. Auflage; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Bers DM, Guo T (2005): Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 86-98

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 H (1871): Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Saechs Akad 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

Bunch TJ, Mahapatra S, Murdock D, Molden J, Weiss JP, May HT, Bair TL, Mader KM, Crandall BG, Day JD et al. (2011): Ranolazine reduces ventricular tachycardia burden and ICD shocks in patients with drug-refractory ICD shocks. *Pacing Clin Electrophysiol* 34, 1600-1606

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

Catterall WA (1992): Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72, 15-48

Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA et al. (2004): Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol* 43, 1375-1382

Chen LQ, Santarelli V, Horn R, Kallen RG (1996): A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 108, 549-556

Cheng H, Lederer WJ (2008): Calcium sparks. *Physiol Rev* 88, 1491-1545

Collins KA, Korcarz CE, Lang RM (2003): Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics* 13, 227-239

Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A (1979): Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am J Physiol* 236, 561-567

Davis BA, Schwartz A, Samaha FJ, Kranias EG (1983): Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 258, 13587-13591

Davis BA, Edes I, Gupta RC, Young EF, Kim HW, Steenaart NA, Szymanska G, Kranias EG (1990): The role of phospholamban in the regulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem* 99, 83-88

Delbridge LM, Bassani JW, Bers DM (1996): Steady-state twitch  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 270, 192-199

Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM (1997): Cardiac myocyte volume,  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 272, 2425-2435

Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balsler JR, Anderson ME (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2, 173-177

Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL et al. (1991): Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med* 324, 781-788

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

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

Fabiato A (1985): Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 291-320

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, 469-495

Ferrier GR (1977): Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. *Prog Cardiovasc Dis* 19, 459-474

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J et al. (2013): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in human cardiac pathology. *Circulation* 128, 970-981

Frank O (1895): Zur Dynamik des Herzmuskels *J Biol*, 32, 370-447. (Translation from German: Chapman CP, Wassermann EB (1959): On the dynamics of cardiac muscle. *Am Heart J*, 58, 282-317

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

Fredj S, Sampson KJ, Liu H, Kass RS (2006): Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br J Pharmacol* 148, 16-24

Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, Kallen RG (1997): Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* 498, 309-318

Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, Vargiu P, Simoncini I, Laragh JH (1992): Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 19, 1550-1558

Gao L, Blair LA, Marshall J (2006): CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1606-1610

Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966): The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184, 170-192

Greene HL, Roden DM, Katz RJ, Woosley RL, Salerno DM, Henthorn RW (1992): The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial: first CAST ... then CAST-II. *J Am Coll Cardiol* 19, 894-898

Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56-64

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

Hanson PI, Meyer T, Stryer L, Schulman H (1994): Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron* 12, 943-956

Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI (1986): Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 73, 615-621

Hibberd MG, Jewell BR (1982): Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol* 329, 527-540

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 (1995): Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors, and clinical implications. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6, 920-936

Hoppe U, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer H, Osterspey A, Schmaltz A, Erdmann E, in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 94, 488–509

Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE (2003): Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, 1261-1269

Hudmon A, Schulman H (2002): Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364(Pt 3), 593-611

Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N et al. (2010): A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120, 3508-3519

Huxley HE (1961): The contractile structure of cardiac and skeletal muscle. *Circulation* 24, 328-335

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

Huxley HE (2004): Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur J Biochem* 271, 1403-1415

Hwang H, Arcidi JM, Jr., Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, Shryock JC, Kloner RA (2009): Ranolazine as a cardioplegia additive improves recovery of diastolic function in isolated rat hearts. *Circulation* 120, 16-21

Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T (1999): Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res* 84, 1401-1406

Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H (1995): A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 806-812

Info Phys Tech, Nr. 61/2005, VDI Technologiezentrum, o.O. 2005

Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR (1987): Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch Biochem Biophys* 255, 354-360

Ju YK, Saint DA, Gage PW (1996): Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 497 ( Pt 2), 337-347

Junqueira LC, Carneiro J.: *Histologie*; 4. Auflage; Springer Verlag, Berlin 1996, Seite 238

Kentish JC, Wrzosek A (1998): Changes in force and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol* 506, 431-444

Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI (1986): Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circ Res* 58, 755-768

Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ (2001): Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res* 88, 1059-1065

Khouri MG, Peshock RM, Ayers CR, de Lemos JA, Drazner MH (2010): A 4-tiered classification of left ventricular hypertrophy based on left ventricular geometry: the Dallas heart study. *Circ Cardiovasc Imaging* 3, 164-171

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

Klensch H (1966): The basal noradrenaline level in human peripheral venous blood. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 290, 218-224

Koval OM, Snyder JS, Wolf RM, Pavlovicz RE, Glynn P, Curran J, Leymaster ND, Dun W, Wright PJ, Cardona N et al. (2012): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel in cardiac disease. *Circulation* 126, 2084-2094

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 U S A* 83, 4253-4257

Lederer WJ, Tsien RW (1976): Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. *J Physiol* 263, 73-100

Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997): The effect of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 ( Pt 1), 17-31

Linzbach AJ (1960): Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 5, 370-382

Lipkind GM, Fozzard HA (1994): A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na<sup>+</sup> channel. *Biophys J* 66, 1-13

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 U S A* 83, 9497-9501

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994): Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75, 401-409

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, Bers DM (2007): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* 73, 631-640

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, Sheets MF, Hanck DA, January CT, Fozzard HA (1987): Sodium current in voltage clamped internally perfused canine cardiac Purkinje cells. *Biophys J* 52, 1-11

Makita N, Bennett PB, Jr., George AL, Jr. (1994): Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem* 269, 7571-7578

Makita N, Shirai N, Wang DW, Sasaki K, George AL, Jr., Kanno M, Kitabatake A (2000): Cardiac Na<sup>(+)</sup> channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by beta(1)-subunit. *Circulation* 101, 54-60

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977): Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74, 629-645

Maltsev VA, Undrovinas AI (1998): Relationship between steady-state activation and availability of cardiac sodium channel: evidence of uncoupling. *Cell Mol Life Sci* 54, 148-151

Maltsev VA, Undrovinas A (2008): Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol* 96, 421-451

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

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF (1998): Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 508, 647-657

Meadows LS, Isom LL (2005): Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 67, 448-458

Messner DJ, Catterall WA (1986): The sodium channel from rat brain. Role of the beta 1 and beta 2 subunits in saxitoxin binding. *J Biol Chem* 261, 211-215

Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992): Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199-1202

Miles RH, Passman R, Murdock DK (2011): Comparison of effectiveness and safety of ranolazine versus amiodarone for preventing atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 108, 673-676

Mishra S, Undrovinas NA, Maltsev VA, Reznikov V, Sabbah HN, Undrovinas A (2011): Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, 1596-1605

Moore JW, Narahashi T, Shaw TI (1967): An upper limit to the number of sodium channels in nerve membrane? *J Physiol* 188, 99-105

Morrow DA, Scirica BM, Karwatowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Budaj A, Varshavsky S, Wolff AA, Skene A, McCabe CH, Braunwald E (2007): Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial. *JAMA* 297, 1775-1783

Morrow DA, Scirica BM, Sabatine MS, de Lemos JA, Murphy SA, Jarolim P, Theroux P, Bode C, Braunwald E (2010): B-type natriuretic peptide and the effect of ranolazine in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: observations from the MERLIN-TIMI 36 (Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST Elevation Acute Coronary-Thrombolysis In Myocardial Infarction 36) trial. *J Am Coll Cardiol* 55, 1189-1196

Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS (2004): The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 123, 155-165

Murdock DK, Kersten M, Kaliebe J, Larrain G (2009): The use of oral ranolazine to convert new or paroxysmal atrial fibrillation: a review of experience with implications for possible "pill in the pocket" approach to atrial fibrillation. *Indian Pacing Electrophysiol J* 9, 260-267

Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, Catterall WA (1996): cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem* 271, 28837-28843

Neef S: Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens auf die Aktionspotentiale von frühen aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten. Med. Diss. Göttingen 2011

Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802

Nerbonne JM, Kass RS (2005): Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85, 1205-1253

Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik, 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

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

Priori SG, Corr PB (1990): Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol* 258(6 Pt 2), H1796-1805

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

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

Puglisi JL, Bers DM (2001): LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, 2049-2060

Qu Y, Rogers JC, Tanada TN, Catterall WA, Scheuer T (1996): Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol* 108, 375-379

Rasenack E: Regulation des kardialen sarkolemmalen Natriumkanals durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II<sub>δC</sub> (CaMKII<sub>δC</sub>). Ein neuer Mechanismus für die Entstehung von kardialen Arrhythmien. Med. Diss. Göttingen 2006

Rastogi S, Sharov VG, Mishra S, Gupta RC, Blackburn B, Belardinelli L, Stanley WC, Sabbah HN (2008): Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, 2149-2155

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR (1991): Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8277-8281

Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, Klevit RE (1999): Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* 38, 855-861

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

Schmidt RF, Lang F: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 30. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, Seite 64

Schulman H, Hanson PI, Meyer T (1992): Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium* 13(6-7), 401-411

Schwinger RH, Bohm M, Koch A, Uhlmann R, Uberfuhr P, Kreuzer E, Reichart B, Erdmann E (1993): Force-frequency-relation in human atrial and ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* 119, 73-78

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

Sjostrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM (1958): The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res* 1, 271-287

Song Y, Shryock JC, Wu L, Belardinelli L (2004): Antagonism by ranolazine of the pro-arrhythmic effects of increasing late I<sub>Na</sub> 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, 2031-2039

Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schondube 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, Wittkopper 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, Schondube FA, Hasenfuss G et al. (2010b): 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, Didie 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

Srinivasan M, Edman CF, Schulman H (1994): Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. *J Cell Biol* 126, 839-852

Starling EH (1895): *Linacre lecture on the law of the heart*. Longmanns, Green & Co., London 1918

Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H (1991): The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 968-975

Tobimatsu T, Fujisawa H (1989): Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 264, 17907-17912

Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T et al. (2010): Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003

Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 61, 111-122

Tomaselli GF, Zipes DP (2004): What causes sudden death in heart failure? *Circ Res* 95, 754-763

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), S169-S177

Undrovinas NA, Maltsev VA, Belardinelli L, Sabbah HN, Undrovinas A (2010): Late sodium current contributes to diastolic cell  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in chronic heart failure. *J Physiol Sci* 60, 245-257

Unwin PN, Zampighi G (1980): Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283, 545-549

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by  $\text{Mg}^{2+}$  and phosphorylation. *Science* 267, 1997-2000

Wagner S, Maier LS (2006): Modulation of cardiac  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  currents by CaM and CaMKII. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1, S26-S33

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH et al. (2006):  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac  $\text{Na}^{+}$  channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138

Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM et al. (2009): Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 285-294

Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, 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

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

Wilson SR, Scirica BM, Braunwald E, Murphy SA, Karwatowska-Prokopczuk E, Buros JL, Chaitman BR, Morrow DA (2009): Efficacy of ranolazine in patients with chronic angina observations from the randomized, double-blind, placebo-controlled MERLIN-TIMI (Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes) 36 Trial. *J Am Coll Cardiol* 53, 1510-1516

Wit AL, Boyden PA (2007): Triggered activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 4(3 Suppl), 17-23

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, 1034-1046

Wu L, Shryock JC, Song Y, Li Y, Antzelevitch C, Belardinelli L (2004): Antiarrhythmic effects of ranolazine in a guinea pig in vitro model of long-QT syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 599-605

Wu L, Shryock JC, 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 L, Rajamani S, Shryock JC, Li H, Ruskin J, Antzelevitch C, Belardinelli L (2008): Augmentation of late sodium current unmasks the proarrhythmic effects of amiodarone. *Cardiovasc Res* 77, 481-488

Xi Y, Wu G, Yang L, Han K, Du Y, Wang T, Lei X, Bai X, Ma A (2009): Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. *Eur J Heart Fail* 11, 749-757

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993): Phosphorylation and activation of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 268, 8394-8397

Yao L, Fan P, Jiang Z, Viatchenko-Karpinski S, Wu Y, Kornyejev D, Hirakawa R, Budas GR, Rajamani S, Shryock JC et al. (2011): Na<sub>v</sub>1.5-dependent persistent Na<sup>+</sup> influx activates CaMKII in rat ventricular myocytes and N1325S mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, 577-586

Yeung E, Krantz MJ, Schuller JL, Dale RA, Haigney MC (2014): Ranolazine for the Suppression of Ventricular Arrhythmia: A Case Series. (*Ann Noninvasive Electrocardiol*, im Druck)

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* 76, 367-385

Zhang T, Brown JH (2004): Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63, 476-486

Zimmer HG (1998): The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci* 13, 203-210

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

---

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Toischer K, **Hartmann N**, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 61, 111-122

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

### Abstracts

Sossalla S, Maurer U, **Hartmann N**, Schotola H, Didié M, Wagner S, Maier LS (2010): Chronic overexpression of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II induces diastolic dysfunction and arrhythmias via augmentation of late Na current. *Clin Res Cardiol*, 99, Suppl. 1

Mallwitz A, Sag CM, Sossalla ST, **Hartmann N**, Steuer F, Sowa T, Maier LS (2011): CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to proarrhythmic effects of increased late Na current in isolated cardiac myocytes. *Official journal of the German Cardiac Society*. Suppl. 1

**Hartmann N**, Sossalla ST, Toischer T, Schulte T, Wagner S, Hasenfuß G, Maier LS (2011): Role of late I<sub>Na</sub> in the pathogenesis of pressure overload-induced hypertrophy and heart failure. Gehalten am 29. April 2011 in Mannheim, Deutschland, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 77. Jahrestagung 27.-30. April 2011

Sossalla S, Toischer K, **Hartmann N**, Schulte T, Wagner S, Hasenfuss G, Maier L.S. (2011): Pressure overload-induced hypertrophy and heart failure are associated with arrhythmic triggers caused by late I<sub>Na</sub>. *Eur Heart J*, 32 ( Abstract Supplement ), 997-998.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Lars S. Maier bedanken. Er gab mir nicht nur die Möglichkeit, die Doktorarbeit durchzuführen, sondern gab mir die Gelegenheit zu einer hochinteressanten klinischen Ausbildung sowie zur wissenschaftlichen Tätigkeit in seinem Labor. Er brachte mir stets großes Vertrauen und fortwährende Unterstützung entgegen. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. med. Samuel T. Sossalla für die ausgezeichnete Betreuung, die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten, für dieses interessante und klinisch sehr relevante Thema, die vielseitige Unterstützung sowie die unzähligen Ratschläge sehr herzlich bedanken. Seine Ideen und sein Enthusiasmus sowie sein Engagement haben zum Gelingen dieser Arbeit enorm beigetragen.

Dr. med. Karl Toischer möchte ich für seine kompetente Einführung, Unterstützung und Begleitung in der Durchführung der Experimente und bei den Operationen an Mäuseherzen danken.

Ich danke ebenfalls Dr. med. Stefan Neef und Dr. med. Stefan Wagner für den Rat in vielen praktischen und theoretischen Fragen.

Ebenfalls gilt mein Dank meiner Vor-Doktorandin Nina Fluschnik, welche mich in die Technik der *Patch-Clamp*-Messungen einführte und jederzeit bereit war, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Nicht zuletzt danke ich allen nicht genannten Mitarbeitern, Doktoranden sowie den technischen Assistenten Timo Schulte, Thomas Sowa und Felicia Steuer für die stets freundliche Zusammenarbeit, das immer sehr angenehme Arbeitsklima, gute Laune und die jederzeit vorhandene Hilfe und Unterstützung.

Abschließend möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß aussprechen, der mir als Direktor der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung die Doktorarbeit durchzuführen.

## Lebenslauf

Ich, Nico Hartmann, wurde am 25.06.1982 als Sohn meiner Eltern Jutta und Lothar Hartmann in Fulda geboren. Meine Schwester, Patricia Hartmann, kam vier Jahre nach mir zur Welt. Nach dem Besuch der Don-Bosco-Grundschule in Künzell (1998-1992) wechselte ich auf die Realschule und gymnasiale Oberstufe des Marianums in Fulda, an dem ich 1998 meinen Realschulabschluss ablegte.

Ab Sommer 1998 begann ich die Ausbildung zum Chemielaboranten. Mit erfolgreichem Abschluss und Erhalt des Gesellenbriefes absolvierte ich ab Sommer 2002 meinen Wehrersatzdienst auf der Intensivstation im Krankenhaus Eichhof in Lauterbach.

Nach Ende meines Dienstes im Februar 2003 arbeitete ich zunächst weiter in meinem Ausbildungsberuf als Chemielaborant bei KWALIS GmbH & Co. KG in Fulda.

Im Herbst 2003 begann ich, an der Adolf-Reichwein-Schule in Marburg mein Abitur mit einem naturwissenschaftlichen Schwerpunkt nachzuholen und erlangte im Sommer 2006 die Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 1,8).

Mit der Zusage der Georg-August-Universität zum Sommersemester 2007 begann ich schließlich das Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Göttingen. Im März 2009 bestand ich das 1. Staatsexamen (Physikum) mit Erfolg (Note: gut).

Im Wintersemester 2009/2010 absolvierte ich ein Forschungssemester, um in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie im Herzzentrum der Universitätsmedizin Göttingen (eine DFG-geförderte Arbeitsgruppe) meine experimentelle Doktorarbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. Lars S. Maier zu beginnen. Seit Sommersemester 2010 setzte ich studienbegleitend meine wissenschaftliche Tätigkeit in der Forschergruppe von Prof. Dr. med. Lars S. Maier und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Samuel Sossalla als studentische Hilfskraft weiter fort und arbeitete an weiteren Projekten mit.

Die im Rahmen der Doktorarbeit erhobenen Ergebnisse stellte ich auf den Frühjahrestagungen der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie im April 2010 und 2011 in Mannheim als Vortrag vor. Im Zuge dessen erhielt ich eine Reisekostenunterstützung der Nachwuchsförderung der DGK. Inzwischen sind die wissenschaftlichen Ergebnisse in Form eines wissenschaftlichen Artikels veröffentlicht. Für meine bisherigen Leistungen erhielt ich 2012 das Kurzstipendium aus Mitteln des Niedersächsischen Ministeriums für Wissenschaft und Kultur (verliehen von der Georg-August-Universität-Göttingen) sowie ein Kurzstipendium von Pro Juventute Academica. Im Jahr 2013 erhielt ich zudem ein Stipendium der Richard-Winter-Stiftung zur Förderung der Nachwuchswissenschaftler in Forschung und Lehre.