

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

**Der Späte Natriumstrom in einem
mybpc3-Mausmodell der Hypertrophen
Kardiomyopathie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

(für Humanmedizin)

der Medizinischen Fakultät der

Universität Regensburg

vorgelegt von

Nele Ungeheuer

aus

Hamburg

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert


1. Berichterstatter Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter Prof. Dr. York Zausig

Datum der mündlichen Prüfung: 02. März 2018

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

Hamburg, den 02.03.2018

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. J. J. J.', written in a cursive style.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	6
1.1 HINTERGRÜNDE DER HYPERTROPHEN KARDIOMYOPATHIE	6
1.2 DAS AKTIONSPOTENTIAL.....	9
1.3 ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG.....	10
1.4 DAS KARDIALE MYOSIN-BINDENDE PROTEIN C.....	14
1.5 DER SPANNUNGSABHÄNGIGE NATRIUMKANAL	16
1.5.1 <i>Aufbau</i>	17
1.5.2 <i>Funktionsweise</i>	18
1.5.3 <i>Transport und Lokalisation des $Na_v1.5$</i>	19
1.5.4 <i>Der Späte Natriumstrom (Late I_{Na})</i>	21
1.5.5 <i>Regulation des Late I_{Na}</i>	21
1.5.6 <i>Störungen der Natriumbiomöostase</i>	24
1.6 DIE β -ADRENERGE SIGNALKASKADE.....	27
1.7 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN.....	28
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 CHARAKTERISIERUNG DES MAUSMODELLS.....	29
2.1.1 <i>Isolation von Kardiomyozyten aus Mäuseherzen</i>	31
2.2 MESSUNG DES SPÄTEN NATRIUMSTROMS (LATE I_{Na})	35
2.2.1 <i>Messprinzip</i>	35
2.2.2 <i>Versuchsaufbau</i>	36
2.2.3 <i>Lösungen</i>	38
2.2.4 <i>Patchpipetten und Elektroden</i>	39
2.2.5 <i>Versuchsdurchführung</i>	41
2.2.6 <i>Messung des Late I_{Na} nach Vorbehandlung mit Ranolazin und Isoproterenol und ATX-II</i>	43
2.3 DATENAUSWERTUNG	44
3 ERGEBNISSE	45
3.1 PHÄNOTYP DES MAUSMODELLS.....	45
3.1.1 <i>Hypertrophie des Herzmuskels: Auswertung der Relation Herzgewicht zu Körpergewicht</i>	46
3.1.2 <i>Zellgröße: Auswertung der Membrankapazität der Kardiomyozyten <i>mybpc3</i>-KI versus Wildtyp</i>	47
3.2 DER SPÄTE NATRIUMSTROM IN WT KARDIOMYOZYTEN LÄSST SICH DURCH ATX-II STIMULIEREN.....	47
3.3 VERÄNDERUNGEN DES SPÄTEN NATRIUMSTROMS IM <i>MYBPC3</i> -KI-MAUSMODELLS	49

3.4	DIE STEIGERUNG DES SPÄTEN NATRIUMSTROMS UNTER β -ADRENERGER STIMULATION IST IM <i>MYBPC3</i> -KI MAUSMODELL UNVERÄNDERT.	50
3.5	SYNOPSIS VON MEMBRANKAPAZITÄT, SERIENWIDERSTAND (R-SERIES) UND LIQUID JUNCTION.....	53
3.6	KORRELATIONSANALYSEN.....	53
3.6.1	<i>Korrelation Alter und Später Natriumstrom</i>	54
3.6.2	<i>Korrelation Alter und Stromantwort auf Stimulation mit Isoproterenol</i>	54
4	DISKUSSION	55
4.1	DER SPÄTE NATRIUMSTROM LÄSST SICH DURCH ATX-II STIMULIEREN.....	55
4.2	DER SPÄTE NATRIUMSTROM IST IM <i>MYBPC3</i> -KI MAUSMODELL REDUZIERT.	56
4.3	DIE ROLLE DES SPÄTEN NATRIUMSTROMS HINSICHTLICH DER GESTEIGERTEN β -ADRENERGEN ANTWORT IN <i>MYBPC3</i> -KI MÄUSEN.	59
4.4	EINSCHRÄNKUNGEN DES MAUSMODELLS	61
4.5	CONFOUNDER.....	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	66

Abbildungsverzeichnis

<i>ABBILDUNG 1</i>	11
<i>ABBILDUNG 2</i>	12
<i>ABBILDUNG 3</i>	13
<i>ABBILDUNG 4</i>	16
<i>ABBILDUNG 5</i>	18
<i>ABBILDUNG 6</i>	25
<i>ABBILDUNG 7</i>	26
<i>ABBILDUNG 8</i>	31
<i>ABBILDUNG 9</i>	31
<i>ABBILDUNG 11</i>	37
<i>ABBILDUNG 12</i>	40
<i>ABBILDUNG 13</i>	46
<i>ABBILDUNG 14</i>	47
<i>ABBILDUNG 15</i>	48
<i>ABBILDUNG 16</i>	48
<i>ABBILDUNG 17</i>	49
<i>ABBILDUNG 18</i>	50
<i>ABBILDUNG 19</i>	51
<i>ABBILDUNG 20</i>	51
<i>ABBILDUNG 21</i>	52
<i>ABBILDUNG 22</i>	54
<i>ABBILDUNG 23</i>	54

Tabellenverzeichnis

<i>TABELLE 1</i>	34
<i>TABELLE 2</i>	34
<i>TABELLE 3</i>	34
<i>TABELLE 4</i>	38
<i>TABELLE 5</i>	39
<i>TABELLE 6</i>	46
<i>TABELLE 7</i>	52
<i>TABELLE 8</i>	53

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	<i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATX-II	<i>Anemone toxin II</i>
AV-	Atrioventrikular-
BW	<i>Body Weight</i>
CaMKII	<i>Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARDIA	<i>Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults</i>
cMyBP-C	<i>Cardiac myosin-binding protein C</i>
cTnC	<i>Cardiac Troponin C</i>
cTnI	<i>Cardiac Troponin I</i>
cTnT	<i>Cardiac Troponin T</i>
DAD	<i>Delayed afterdepolarisation</i>
DOCA-	<i>Deoxycorticosterone acetate</i>
EAD	<i>Early afterdepolarisation</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N'-N'-tetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i>
fMyBP-C	<i>Fast myosin-binding protein C</i>
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
HCM	<i>Hypertrophic Cardiomyopathy</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HW	<i>Heart Weight</i>
ICD	<i>Implantable cardioverter-defibrillator</i>
Ig	Immunglobulin
Iso	Isoproterenol
KI	<i>Knock In</i>
KO	<i>Knock Out</i>
Late I _{Na}	<i>Late sodium current</i>
LMM	<i>Light Meromyosin</i>

MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
Na _v	<i>Voltage gated sodium channel</i>
Na _v ab	<i>Voltage-gated Na(+) channel from <i>Arcobacter butzleri</i></i>
NOS	NO-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase 2
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
P	Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RyR	Ryanodinrezeptor
SAP97	<i>Synapse-associated protein 97</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmatic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SGK	<i>Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase</i>
SIDS	<i>Sudden Infant Death Syndrom</i>
sMyBP-C	<i>Slow myosin-binding protein C</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	<i>Tranverse Aortic Constriction</i>
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
T-Tubuli	Transversale Tubuli
TTX	Tetradotoxin
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung des Myokards, die mit einer betont linksventrikulären Hypertrophie, einer diastolischen Dysfunktion sowie einer Neigung zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen einhergeht (1). Bei den betroffenen Patienten äußert sich die Herzerkrankung in Form von Belastungsintoleranz und Belastungsdyspnoe. Sie kann sich aber auch in Form von lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen erstmanifestieren (2,3). Die Mechanismen sind nur unzureichend verstanden aber eine gestörte Natriumhomöostase spielt möglicherweise eine Rolle. Um dies zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit der Späte Natriumstrom sowie dessen β -adrenerge Regulation in einem Mausmodell der HCM untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen reduzierten Späten Natriumstrom und eine unveränderte β -adrenerge Signaltransduktion im Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp. Ein häufig diskutierter therapeutischer Ansatzpunkt, die Inhibition des Späten Natriumstroms mittels Ranolazin, wäre auf der Grundlage dieser Ergebnisse für die HCM nicht zielführend.

1.1 Hintergründe der Hypertrophen Kardiomyopathie

Nach der epidemiologischen CARDIA Studie (Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults) tritt die HCM anhand von echokardiographischen Kriterien mit einer Prävalenz von 1:500 auf (4). Unter Berücksichtigung der Genträger (noch) ohne phänotypische Ausprägung lässt sich jedoch eine deutlich höhere Prävalenz von 1:200 vermuten (5). In der Altersgruppe unter 35 Jahren und bei Athleten ist sie die Hauptursache des plötzlichen Herztodes (6). Als eine der häufigsten genetischen Herzmuskelerkrankungen kommt der HCM damit eine erhebliche klinische Relevanz zu.

Bisher konnten >1400 verschiedene ursächliche Mutationen in mehr als 11 Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, erfasst werden (7). Die phänotypische Ausprägung ist sehr variabel und korreliert dabei nicht zwangsweise mit dem jeweiligen Genotyp (8,9). Eine typische Veränderung ist eine betont linksventrikuläre Hypertrophie insbesondere im Bereich des Septums, die zu einer dynamischen Obstruktion der linksventrikulären

Ausflussbahn führen kann (10,11). Die meist unter Belastung auftretende Verengung kann außerdem durch eine abnorme Mitralklappenbildung bedingt sein, bei der eine überdurchschnittlich große Klappe in den Ausflusstrakt vorbricht und diesen einengt (12). Hinzu kommt eine Unfähigkeit des Myokards zu relaxieren. Diese Dysfunktion führt zu einer verminderten Füllung des Herzens während der Diastole (13). Weiterhin zeichnet sich die HCM durch ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien aus. Dazu zählen zum einen die lebensgefährlichen Rhythmusstörungen als Ursache des plötzlichen Herztodes, zum anderen aber auch ein vermehrtes Auftreten von Vorhofflimmern mit konsekutiv erhöhtem Risiko für thrombembolische Ereignisse (3,14). Als Folge der verminderten Relaxationsfähigkeit des Myokards während der Diastole, der Verdickung des Myokards mit erhöhtem Sauerstoffbedarf sowie der zum Teil nicht-atherosklerotischen Verengung der intramuralen Koronargefäße durch Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur steigt bei HCM-Patienten das Risiko für ischämische Ereignisse (15,16).

Für die meisten Mutationen konnte eine erhöhte Kalziumsensibilität der Myofilamente nachgewiesen werden (17,18). In einigen Fällen zeigte sich zudem eine kürzere Dauer des Querbrückenzyklus und eine inkomplette Relaxation bei 10^{-9} M Kalzium (19).

Mutationen im Gen MYBPC3, welches das kardiale Myosin bindende Protein C kodiert, wurden 1995 erstmals beschrieben und gehören mit etwa 40% zu den häufigsten Ursachen der HCM (8,20,21). Meist in Introns gelegen, führen sie dort zu abnormen Splicing und verursachen einen Frameshift mit vorzeitigem Translationsstopp (22). Die verkürzten und funktionslosen Proteinfragmente sowie die fehlerhaften mRNA-Fragmente werden rasch von dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem Nonsense-Mediated mRNA Decay abgebaut und sind in Kardiomyozyten von HCM Patienten nicht mehr nachzuweisen (22,23).

Zudem kann der Ausfall eines Allels bei heterozygoten Trägern nicht hinreichend kompensiert werden. In Kardiomyozyten von HCM-Patienten nach Myektomie zeigte sich eine Reduktion des vollständigen kardialen MyBP-C Proteins um 20-30% (24,25). Ob dies Folge oder Ursache der Hypertrophie und kontraktile Dysfunktion ist, wird bei bisher noch widersprüchlichen Ergebnissen diskutiert. Barefield et al. (26) konnten nach Durchführung einer Transversen Aortenkonstriktion (TAC) an heterozygoten Mäusen mit Mutation im MYBPC3 nach 4 Wochen eine stressbedingte Reduktion des Gesamtproteins an kardialem MyBP-C zeigen. Zudem zeigte sich in Herzmuskelzellen von HCM-Patienten nach Myektomie ein erhöhter Anteil von unphosphoryliertem cMyBP-C (23%) im Vergleich zu Zellen aus gesunden Gewebeproben (10%) (27).

Auch für die Mutationen im cMyBP-C konnte eine erhöhte Kalziumsensibilität nachgewiesen werden (8,9,28). Aufgrund erhöhter Kalziumsensibilität in Knock-out (KO-) Mausmodellen, in denen das Gen für cMyBP-C ausgeschaltet ist (29–32) wird derzeit von einem direkten Zusammenhang zwischen der Haploinsuffizienz und der erhöhten Kalziumsensitivität ausgegangen (33). KO-Mäuse wiesen außerdem eine linksventrikuläre Hypertrophie auf (29,34).

Die in den nachfolgenden Experimenten untersuchte Mutation gehört dieser Gruppe an und wurde in einem Knock-In Mausmodell (*mybpc3*-KI) imitiert. In Kardiomyozyten dieses Mausmodells konnte 2015 eine verkürzte Sarkomerlänge im Zytosol nachgewiesen werden (35). Vorherige Inkubation mit 30 μ M Isoproterenol zeigte in *mybpc3*-KI Mäusen eine gesteigerte positiv inotrope Reaktion und einen deutlichen Abfall der diastolischen Sarkomerlänge unter zusätzlicher Erhöhung der Arbeitslast. Diese konnte durch Inkubation mit dem Inhibitor des Späten Natriumstroms Ranolazin auf Kontrollniveau zurückgeführt werden (35).

Eine Erhöhung des Späten Natriumstroms (Late I_{Na}) konnte als Ursache einer diastolischen Dysfunktion und erhöhtem Auftreten von Arrhythmien im Rahmen der Herzinsuffizienz bereits nachgewiesen werden (36–40): Der erhöhte Natriumeinstrom führt zu einem verminderten Antrieb oder zur Umkehr des Natrium-Kalzium-Austauschers NCX (siehe Kapitel 1.5.6). Die dadurch bedingte Kalziumüberladung der Zelle in der Diastole verhindert somit die Relaxation des Myokards und führt zu dem klinischen Bild der Diastolischen Dysfunktion (37,40,41). Weiterhin steht ein erhöhter Später Natriumstrom durch die Verlängerung des Aktionspotentials im Zusammenhang mit Frühen Nachpolarisationen (Early Afterdepolarisation = EAD), die ein erhöhtes Risiko für maligne Rhythmusstörungen mit sich ziehen (38,39). Sowohl hinsichtlich der diastolischen Dysfunktion als auch zur Prävention von Arrhythmien konnten therapeutische Effekte von Ranolazin gezeigt werden (42,43).

In einer Studie an humanen Kardiomyozyten von HCM-Patienten nach Myektomie konnte ein erhöhter Später Natriumstrom, eine Überaktivität der Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II (CaMKII) und eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer nachgewiesen werden (44). Eine Dysregulation des Späten Natriumstroms spielt daher möglicherweise bei der Entwicklung der HCM eine Rolle. Dessen Inhibition könnte daher einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt bieten.

Die ESC-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der HCM wurden 2014 aktualisiert und in deutscher Version von der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie herausgegeben (13). Die

medikamentöse Therapie umfasst abhängig vom Vorliegen einer Obstruktion die Gabe von β -Blockern, Kalziumantagonisten vom Verapamil-Typ, Diuretika und Disopyramid sowie orale Antikoagulation bei Vorhofflimmern. In seltenen Fällen kommt bei Patienten mit regionaler Heterogenität der linksventrikulären Kontraktion und Relaxation eine kardiale Resynchronisationstherapie und bei Hochrisikopatienten für lebensgefährliche Arrhythmien eine ICD-Implantation in Frage. Invasive Eingriffe wie die chirurgische Myektomie und Septale Alkoholablation bei inoperablen Patienten sind Patienten mit erheblicher Obstruktion und einem Druckgradienten >50 mmHg vorbehalten. Bei therapierefraktärer, endgradiger Herzinsuffizienz besteht zudem die Möglichkeit der Herztransplantation (13). Sämtliche Therapieoptionen sind derzeit allerdings symptomatischer Natur. Ein besseres Verständnis der Übersetzung von Genotyp zu Phänotyp ist daher dringend notwendig, um bereits vor der klinischen Manifestation präventiv eingreifen zu können.

1.2 Das Aktionspotential

Im Ruhezustand ist die Zellmembran hauptsächlich für Kaliumionen und nur sehr geringfügig für andere Ionen permeabel und ähnelt daher dem Nernst'schen Gleichgewichtspotential für Kalium von ca. -90 mV (45). Dieses Gleichgewicht kann für jedes Ion nach der Nernst'schen Gleichung berechnet werden (siehe Kapitel 2.2.1).

Wird durch eine Erregung das Membranschwellenpotential von -70 mV überschritten, öffnen sich die Spannungsabhängigen Natriumkanäle und das Membranpotential nähert sich durch den schnellen Einstrom von Natriumionen in die Zelle (Natrium-Spitzenstrom; I_{Na}) dem Natriumgleichgewichtspotential von etwa $+60$ mV. Durch die schnelle spannungsabhängig Inaktivierung der Natriumkanäle nach 1-2 ms hält dieser Natriumspitzenstrom nur wenige Millisekunden an. Ein geringer Residualstrom bleibt durch inkomplette Inaktivierung der Natriumkanäle für mehrer Hundert Millisekunden erhalten (Später Natriumstrom; Late I_{Na}) (46). Dem Aufstrich folgt eine kurze Phase der Repolarisation auf ungefähr 0 mV, die durch einen Auswärtsstrom von Kaliumionen (transienter Auswärtsstrom, i_o) und einem Einwärtsstrom (elektrischer Auswärtsstrom) negativ geladener Chloridionen bedingt ist. In der Plateauphase wird das Membranpotential von ca. 0 mV für etwa 300-400 ms gehalten, da sich repolarisierende und depolarisierende Ströme elektrisch aufheben. Das Ausmaß depolarisierender Ströme und der Beginn repolarisierender Kaliumströme sind maßgeblich für die Länge der Plateauphase verantwortlich (47).

1.3 Elektromechanische Kopplung

Das Sarkolemm verfügt in der Herzmuskelzelle über Einstülpungen (Transversale- (T)-Tubuli), in denen sich verdichtet spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle finden. Diese stehen in räumlicher Nähe zu Kalziumkanälen (Ryanodinrezeptoren = RyR) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (48). Die funktionelle Einheit aus L-Typ Kalziumkanal, Ryanodinrezeptor und dazwischen gelegener Spalt wird als Diade bezeichnet. In dem sogenannten Diadischen Spalt können Kalziumkonzentrationen aufgebaut werden, die weitestgehend unabhängig von der zytoplasmatischen Ionenkonzentrationen sind (49–51). Das SR fungiert unter anderem als Kalziumspeicher, der bei Öffnung der Ryanodinrezeptoren entleert werden kann und durch ATP-abhängige Kalziumpumpen (SR Ca^{2+} -ATPase = SERCA) wieder aufgefüllt wird (52). Hierüber wird der Großteil des Kalziums in der Diastole aus dem Zytosol eliminiert, um eine Relaxation zu ermöglichen. Zusätzlich wird der Gradient für Natrium über die Zellmembran genutzt, um über den sekundär aktiven NCX ein Kalzium-Ion gegen 3 Natrium-Ionen aus dem Intrazellularraum zu schleusen (47,53). Ein Bruchteil des intrazellulären Kalziums wird über primär aktive Pumpen nach extrazellulär und in die Mitochondrien gepumpt (47).

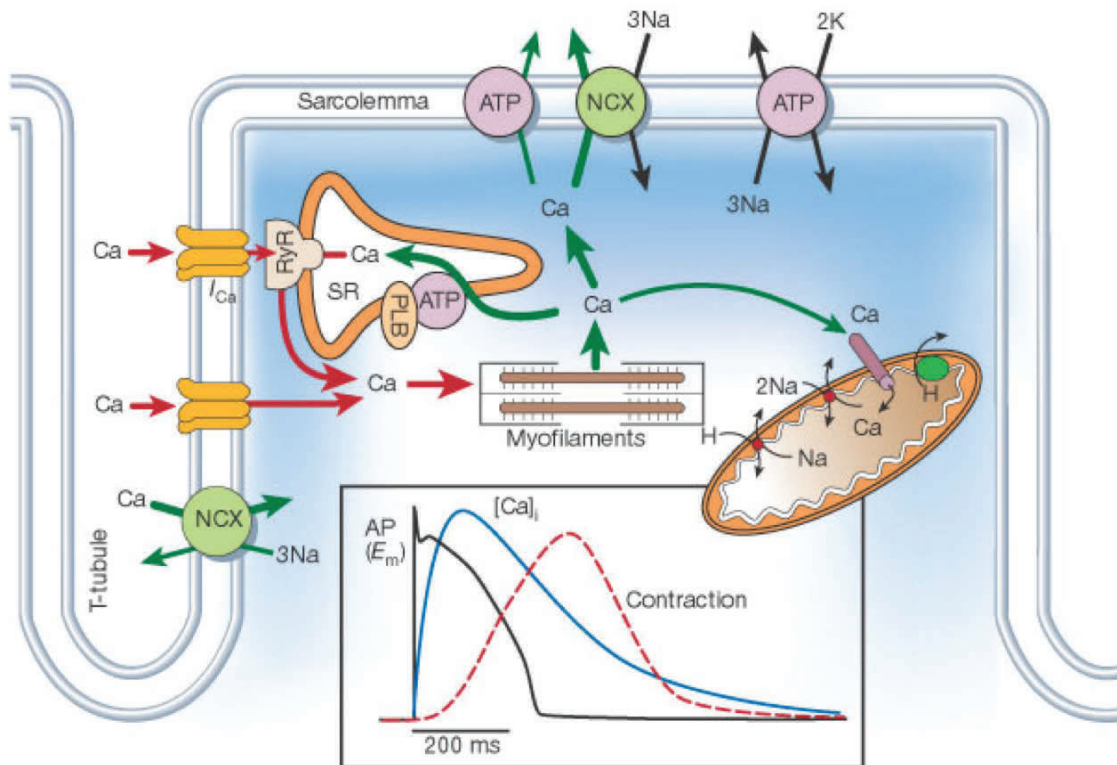


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Elektromechanischen Kopplung nach Bers, 2002 (47). Das Sarkolemm weist Einziehungen auf (T-Tubuli), in denen verdichtet L-Typ Kalziumkanäle liegen. Die Diade aus L-Typ Kalzium-Kanal, Ryanodinrezeptor (RyR) und dazwischenliegendem Zytosol bildet eine funktionelle Einheit zur Kalzium getriggerten Kalziumfreisetzung. Wiederherstellung des Natriumgradienten erfolgt über die Na^+/K^+ ATPase. Die Elimination des Kalziums erfolgt über Pumpen in das SR, unter Nutzung des Natriumgradienten via NCX nach extrazellulär sowie in geringem Umfang auch über primär aktive Pumpen in den Extrazellulärraum und die Mitochondrien. Unten im Bild ist der zeitliche Zusammenhang zwischen Aktionspotential, Kalziumeinstrom in das Zytosol und Reaktion des kontraktile Apparates dargestellt.

Wird nun eine Erregung an die Herzmuskelzelle weitergegeben öffnen sich die L-Typ Kalziumkanäle in den T-Tubuli. Dieser relativ geringe Kalziumeinstrom führt zu einem erheblichen Konzentrationsanstieg des Kalziums in dem kleinen Spalt zwischen L-Typ Kalziumkanal und Ryanodinrezeptor (Diadischer Spalt) und reicht aus, um die Öffnung letzterer zu erreichen (51). Hierdurch können Kalziumionen aus dem Speicher des Sarkoplasmatischen Retikulums in das Zytosol ausströmen. Zum einen führt diese Kalziumfreisetzung als eine Art Feedback-Mechanismus zur Kalzium-abhängigen Inaktivierung des L-Typ Kalziumkanals (54–56), zum anderen bedingt er durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Aktivierung des kontraktile Apparates (47,57).

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit des Kontraktiles Apparates und besteht aus einem dicken und einem dünnen Filament, deren Interaktion – die sogenannte Querbrückenbildung - die Verkürzung des Sarkomers ermöglicht. Das dünne Filament besteht aus Aktin, Tropomyosin und dem Hetero-Trimer Troponin aus Troponin T, C und I (58,59). Das dicke Filament setzt sich hingegen aus den verschiedenen Sektionen des Myosins zusammen (60). Der Schaftteil des Myosins, der ebenfalls das Myosin-bindende Protein C (siehe Kapitel 1.4) enthält, bildet das Rückgrat des dicken Filaments. Hiervon gehen mehrere Halsregionen (S2) ab, die den Kopfteil (S1) beziehungsweise die Motordomäne tragen. In der Kopfregion liegt die Domäne für die Bindung von Aktin und die Hydrolyse von ATP (59,61).

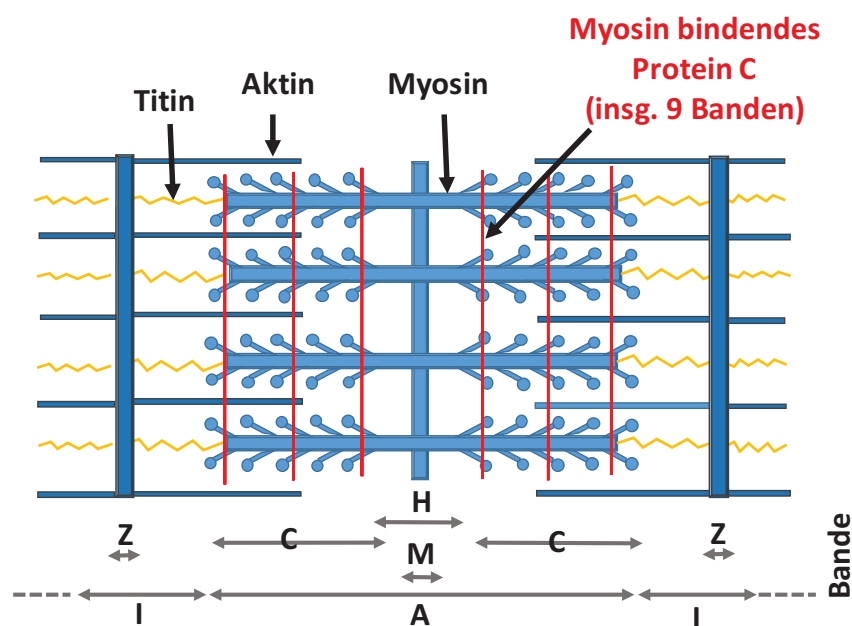


Abbildung 2

Schematische Abbildung einer Sarkomereinheit, bestehend aus Aktin, Myosin und Titin. Die Z-Scheiben begrenzen zu beiden Seiten das Sarkomer. An ihnen ist das Myosin über das elastische Titin aufgehängt. Mittig steht der Z-Bande die M-Bande gegenüber, an der beidseits das dicke Filament fixiert ist. Das gesamte Myosinfilament erstreckt sich über die A-Bande. I- bzw. H-Banden beschreiben den Bereich, in dem nur Aktin- bzw. Myosinelemente vorzufinden sind. In der C-Bande liegt mit insgesamt 9 Banden beidseits des M-Streifens das kardiale Myosin bindende Protein C.

Für die Aktivierung der Myofilamente ist die Bindung von Kalziumionen an Troponin erforderlich (47). Troponin C fungiert als Kalziumsensor, Troponin I als Inhibitor der Aktin-Myosin-Verbindung und Troponin T als Bindungsglied zwischen Kalziumsensor und Tropomyosin (62). Strömt nun ausreichend Kalzium in die Zelle ein, bindet dieses an Troponin C, erhöht dadurch dessen Bindungsaffinität für Troponin I und schwächt die

Bindung zwischen Troponin I und Troponin T (59,63,64). Dieser Bindungswechsel führt zur Bewegung des Tropomyosins und dadurch zur Freilegung von Myosin-S1 Bindungsstellen des Aktins, welche die Bildung von Querbrücken zwischen dem dünnen und dicken Filament ermöglicht (65). Bei Dissoziation von Adenosindiphosphat und Phosphat ($\text{ADP} + \text{P}$) schlägt das Myosinköpfchen um und verschiebt das dünne gegen das dicke Filament. Aufgrund der Verschiebung des dünnen Filaments jeweils in Richtung M-Bande kommt es zur Verkürzung des Sarkomers. Zur Lösung der Querbrücke bedarf es erneuter Energiezufuhr durch ATP, dessen Hydrolyse zu ADP und Phosphat die Rückstellung des Myosinköpfchens ermöglicht.

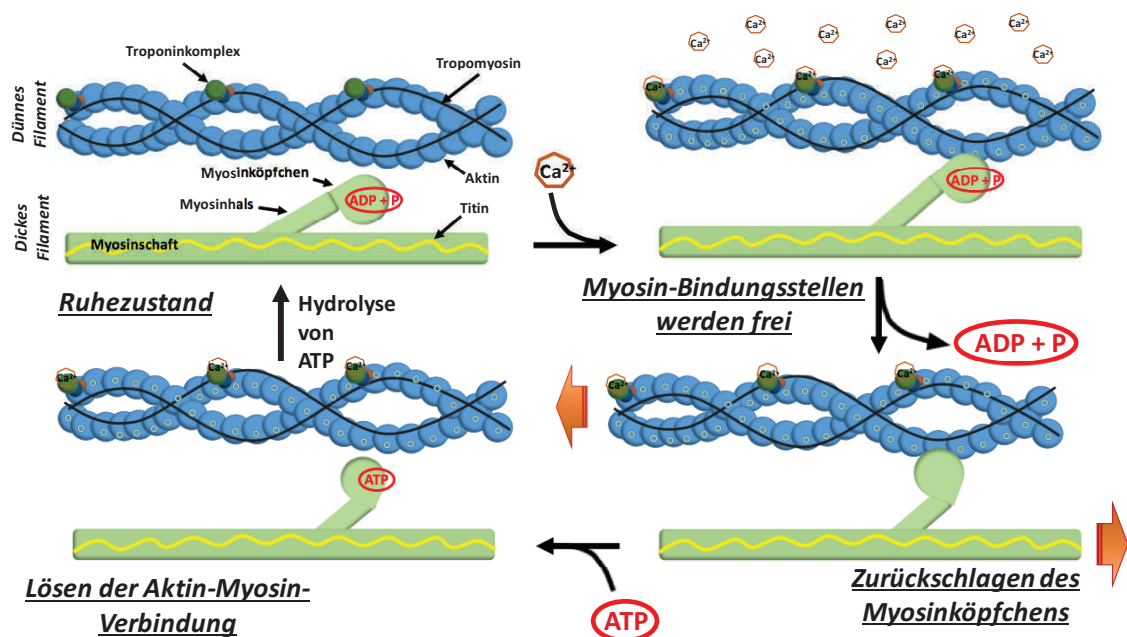


Abbildung 3

Querbrückenzyklus: A) Im Ruhezustand liegen dickes und dünnes Filament parallel nebeneinander, nach Hydrolyse von ATP sind ADP und Phosphat am Myosinköpfchen gebunden. B) Nach Bindung von Kalziumionen an Troponin C verschiebt sich das α -Tropomyosin und Myosin-Bindungsstellen werden frei. C) Nach Dissoziation von ADP + Phosphat schlägt das Myosinköpfchen zurück und verschiebt das dünne Filament Richtung M-Bande und führt so zur Verkürzung des Sarkomers. D) Durch die erneute Bindung von ATP kann sich Myosin wieder von seiner Bindungsstelle am Aktin lösen. Durch die Hydrolyse von ATP wird das Myosinköpfchen wieder in seine Ausgangsposition zurückgestellt (A).

Das Ausmaß der Kraftentwicklung unterliegt mehreren Regulationsmechanismen. Der als Frank-Starling bezeichnete Mechanismus reguliert die Kraftentwicklung der Herzmuskelzellen in Abhängigkeit vom Volumenangebot. Die Vordehnung der Myofilamente führt zu einer Verminderung des Abstandes zwischen Myosin und Aktin und

erleichtert die Ausbildung von Querbrücken (66,67). So entsteht eine Anpassung der Kalziumsensibilität der Myofilamente im Zeitintervall eines Herzschlages (68,69).

Zudem gibt es einige sarkomere Proteine, die posttranslational mittels Phosphorylierung in ihrer Funktion noch modifiziert werden können. Am kardialen Troponin T (cTnT), Troponin I (cTnI) und Myosin-bindenden Protein C wurden mehrere Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A und CaMKII identifiziert (61,70,71). Auch die Proteinkinase C und D tragen über Phosphorylierung der regulativen Einheiten zur Modifikation der kontraktilen Funktion bei (72,73). In einigen Studien wird ein direkter Einfluss auf die Kalziumsensibilität der Myofilamente und Modulation der Querbückenbildung durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung von sarkomeren Zielproteinen beschrieben (61,74–76). Dem widersprechen Daten, die einen direkten Einfluss der PKA verneinen (77,78).

1.4 Das kardiale Myosin-bindende Protein C

Bei der Familie der Myosin-bindenden Proteine C handelt es sich um akzessorische Proteine des kontraktilen Apparates in quergestreifter Muskulatur, die 2 % des gesamten kontraktilen Proteins ausmachen (79). Sie wurden 1973 erstmals als Verunreinigung bei der Aufarbeitung von Myosin entdeckt (80). Man unterscheidet 3 Isoformen: das langsame (s=slow) skelettale MyBP-C, das schnelle (f=fast) skelettale MyBP-C und das kardiale (c=cardiac) MyBP-C (81). Alle 3 Isoformen gehören zu der Superfamilie der intrazellulären Immunglobuline (Ig) und zeigen eine homologe Struktur aus Immunglobulinen (Ig) und Fibronectin-III-Domänen (82,83).

Während die beiden Formen sMyBPC3 und fMyBPC3 nebeneinander in der Skelettmuskulatur vorzufinden und genetisch auf Chromosom 12 und 19 lokalisiert sind, zeigt sich im Herzen ausschließlich die kardiale Isoform (cMYBP-C) (84,85). Letztere wird durch das Gen MYBPC auf Chromosom 11 kodiert und zeichnet sich durch eine zusätzliche Ig-Domäne am N-Terminus (86) sowie eine weitere Phosphorylierungsdomäne und Proteinschleife aus (87). Das mehr als 21.000 Basenpaare umfassende Gen MYBPC3 trägt in 34 kodierenden von insgesamt 35 Exons die Erbinformation für das kardiale Myosin-bindende Protein C mit einem Gewicht von 135 +/- 15kDa (80,88).

Das cMyBPC ist in zwei Gruppen mit jeweils 9 Banden auf beiden Seiten der H-Zone in der C-Zone angeordnet (siehe Abb. 2). Hier interagiert es durch mehrere Bindungsstellen mit Proteinen des kontraktilen Apparates, allerdings liegt es in größeren Abständen (43nm) als

die Myosinköpfchen vor und ist daher nur mit ungefähr jedem 3. Myosinköpfchen assoziiert (89,90). Während der C-Terminus des MyBP-C an das Leichte Meromyosin (LMM) bindet (91,92) geht man zur Zeit davon aus, dass der N-Terminus des Proteins abwechselnd sowohl mit Aktin als auch mit der Motordomäne des Myosinköpfchens interagiert (90,93). Zu dem Ausmaß der Aktin-Interaktion gibt es zurzeit allerdings noch unterschiedliche Angaben (94,95). Domäne C8-C10 des Myosin-bindenden Proteins C zeigen zudem eine Bindungsaffinität zu Titin (93).

Durch die Bindung an Aktin und Myosin stabilisiert das cMyBP-C die Anordnung der Filamente (96). Insbesondere der N-Terminus reguliert die Aktivierung des kontraktile Apparates und Dauer der Querbrückenbindungen (97–99). Ein modulierender Einfluss auf den Frank-Starling-Mechanismus konnte ebenfalls gezeigt werden (98). In Abwesenheit des MyBP-C in KO-Mausmodellen rücken die Myosinköpfe näher an das Aktin heran und die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Querbrücken zwischen dickem und dünnem Filament steigt (100,101). Der Einfluss des cMyBP-C auf die Interaktion von Aktin und Myosin kann durch Phosphorylierung am M-Motiv des cMyBP-C reguliert werden. Innerhalb des M-Motivs befinden sich mehrere Phosphorylierungsstellen. Sie sind Zielstrukturen der Proteinkinase A, CaMKII, Proteinkinase C und D und der ribosomalen S6 Kinase (70,73,87,102–105). Kommt es zur cAMP-abhängigen Phosphorylierung in diesem Bereich, verringert sich die Bindungsaffinität zum S2-Teil des Myosins (106) und erleichtert somit die Interaktion von Aktin und Myosin und damit folglich auch die Kontraktion. Der fördernde Einfluss der PKA-abhängigen Phosphorylierung an Ser-282 auf die Querbrückenbildung und Kraftentwicklung des linken Ventrikels konnte in einem Mausmodell gezeigt werden (107).

In Patienten mit Vorhofflimmern konnte 2006 ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Phosphorylierung durch die Proteinkinase A am Ser-282 des cMyBP-C und einer kontraktile Dysfunktion des Vorhofs sowie der Genese von Arrhythmien nachgewiesen werden (108). Zwei Jahre später zeigte eine Studie eine ebenfalls verminderte Phosphorylierung am Ser-282 des cMyBP-C bei Patienten im Endstadium der Hypertrophen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz (109). Allerdings gibt es hierzu auch widersprüchliche Daten, die eine Minderphosphorylierung des kardialen Troponin I bei unverändertem Phosphorylierungsstatus des cMyBP-C zeigen (110). Einigkeit besteht hingegen darin, dass eine verminderte Phosphorylierung die Degradierung des MyBP-C beschleunigt (103,111,112).

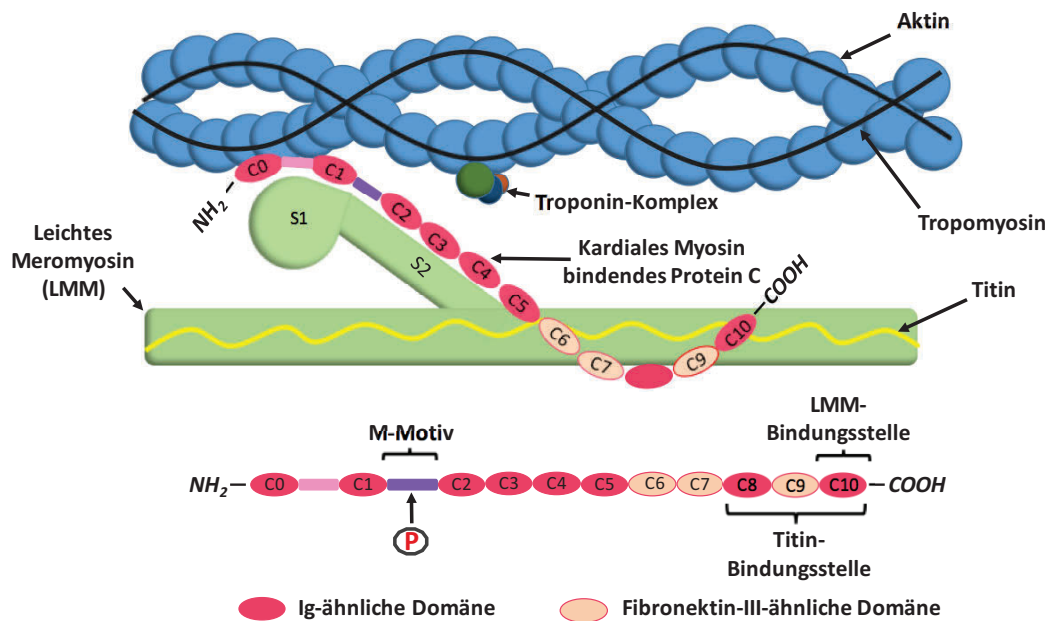


Abbildung 4

Aufbau und Anordnung des kardialen Myosin-bindenden Proteins C im Sarkomer. Das MyBP-C wird aus 8 Immunglobulin-ähnlichen Domänen und 3 Fibronektin-III-ähnlichen Domänen gebildet. Zwischen C1 und C2 liegt das M-Motiv, eine Aminosäuresequenz mit mehreren Zielstrukturen für Proteinkinase A und C und CaMKinase II. Der C-Terminus zeigt eine hohe Bindungsaffinität für LMM und Titin, der NH₂-Terminus interagiert hingegen mit Aktin und der Motodomäne des Myosins.

1.5 Der Spannungsabhängige Natriumkanal

Hodgkin und Huxley konnten bereits im Jahre 1952 zeigen wie sich das Membranpotential von Zellen durch Natriumströme verändert. Mithilfe der Voltage-Clamp-Technik an Axonen des Riesenkalmars beschrieben sie schon damals die Selektivität und Aktivierung von Natriumkanälen sowie eine grobe Vorstellung von Aktionspotentialen (113–116). Ohne die genaue Struktur der Kanäle zu kennen, legten sie damit den Grundstein für den heutigen Kenntnisstand und die damit einhergehenden therapeutischen Ansatzpunkte.

Es sind 9 verschiedene Variationen der α -Untereinheit (Na_v1.1-1.9) bekannt (117). Sie kommen in erregbarem Gewebe wie im peripheren und zentralen Nervensystem sowie Skelett- und Herzmuskel vor und bilden die Grundlage jeglicher Erregungsweiterleitung. Sie sind damit unabdinglich für die Initiation von Muskelkontraktionen und zur Reizwahrnehmung und -verarbeitung im Nervensystem.

1.5.1 Aufbau

Bei dem Spannungsabhängigen Natriumkanal handelt es sich um ein membranständiges glykosyliertes Protein, das sich aus einer α - Einheit aus ca. 2000 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa und deutlich kleineren β -Einheiten von 30-40 kDa zusammensetzt (118).

Die α -Untereinheit reicht aus, um einen funktionalen Natriumkanal zu erstellen (119,120), während die β -Untereinheiten eher eine modulierende Funktion auf die Aktivität des Kanals hat (121,122). Letztere bestehen aus einem Immunglobulin-ähnlichen, extrazellulären Proteingerüst mit einem einzelnen transmembranen Segment und einem kurzen intrazellulären Segment und sind als β_1 -Untereinheit non-kovalent und als β_2 -Untereinheit über Disulfidbrücken mit der α -Untereinheit verknüpft (123–125).

Die erstmalige dreidimensionale Darstellung von Spannungsabhängigen Natriumkanälen in Bakterien (Na_vAb) erlaubte eine genauere Darstellung der funktionellen Anordnung der Untereinheiten. Die α -Untereinheit bildet mit ihren 4 Domänen aus jeweils 6 Segmenten, die sowohl intra- als auch extrazellulär über sogenannte Proteinloops miteinander verbunden sind, eine Pore zum selektiven Durchtritt von Natriumionen sowie mehrere randständige Module zur spannungsabhängigen Regulation der Porenöffnung (126). Die Öffnung ist zudem von einer Proteinschleife durchzogen, die eine wichtige Rolle bei der schnellen Inaktivierung des Kanals spielt (127).

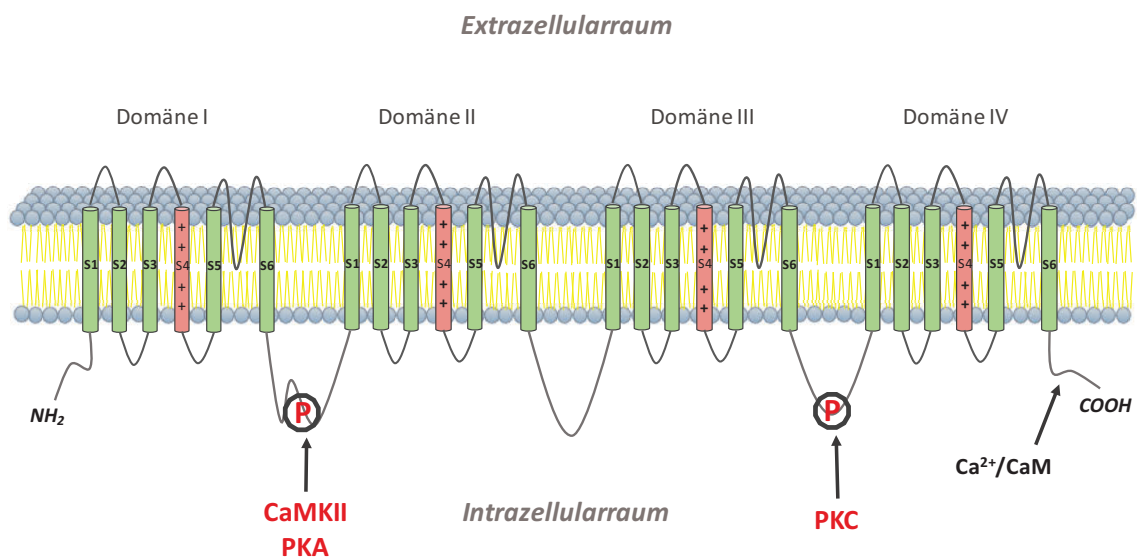


Abbildung 5

Aufbau der α -Untereinheit des spannungabhängigen Natriumkanals aus 4 Domänen mit jeweils 6 Segmenten (126). Sie sind über extrazelluläre und intrazelluläre Proteinschleifen verknüpft. Das S4-Segment dient als Spannungssensor. Die Auswärtsbewegung des Spannungssensors bei Durchtritt übt Zug auf die porenbildenden Segmente S5 und S6 aus und führt dadurch zu Öffnung der Pore. Phosphorylierungsstellen der PKA, CaMKII und PKC sind markiert.

1.5.2 Funktionsweise

1952 vermuteten bereits Hodgkin und Huxley, dass ein Übertritt von elektrisch geladenen Partikeln notwendig sei, um einen Natriumstrom in die Zelle zu induzieren (115). Später konnte diese Hypothese mithilfe von Patch-Clamp-Experimenten bestätigt werden (128,129). Das Segment 4 spielt hierbei eine zentrale Rolle in der Detektion von Spannungsänderungen (130). Bei Depolarisation der Membran kommt es zu einer Auswärtsbewegung sowie Rotation des transmembranen Proteins. Hierdurch wird die Ladung von einem intrazellulären hydrophilen Modul durch eine hydrophobe Sperre zwischen Intra- und Extrazellularraum in ein extrazelluläres hydrophiles Modul transportiert (130,131). Diese Auswärtsbewegung des Segments 4 zieht eine Rollbewegung des gesamten Spannungssensors (S1-S4) mit sich, die wiederum Zug auf die S4-S5 Verbindung zu den porenbildenden Segmenten S5 und S6 ausübt (132).

Die daraus resultierende Bewegung des S5- und S6-Segmentes führt zu einer Vergrößerung der Porenöffnung und erlaubt den Durchtritt von Ionen (126).

Die Selektivität für Natriumionen wird hauptsächlich durch die Ladung und Größe der Porenöffnung determiniert. Die Pore verfügt über eine negativ geladene äußere Bindungsstelle aus 4 Glutamatresten, die mit einer Größe von ca. 4,6 Å ein positiv geladenes Natriumion und 2 Wassermoleküle fassen kann (126). Der weitere Porendurchtritt wird von 2 Carbonylgruppen ausgekleidet, die ein Natriumion und 4 Wassermoleküle binden können. So entsteht ein negativ geladener Kanal, der mit Wassermolekülen ausgekleidet ist und das Natriumion durch partielle De- und Rehydratisierung von extra- nach intrazellulär weiterreicht (126,133).

Zur Wiederherstellung der Erregbarkeit der Zelle muss der Ionenstrom eingestellt werden. Man unterscheidet hierbei die schnelle und die langsame Inaktivierung des Natriumkanals. Die schnelle Inaktivierung nach 1-2 ms wurde von Hodgkin und Huxley (114) bei ihren Versuchen an Axonen des Riesenkalmars beschrieben. Sie konnte später einer Proteinschleife zwischen Domäne 3 und 4 zugeordnet werden, die wie eine Klappe von innen die Pore verschließt (127). Eine Schlüsselsequenz aus Aminosäuren (IFM-Motiv) ist essentiell für die inaktivierende Funktion der Proteinschleife (134).

Der Mechanismus der langsamen Inaktivierung im Zeitintervall von 100ms bis zu mehreren Sekunden (135,136) ist hingegen noch nicht hinreichend geklärt. Vermutet wird ein Zusammenbruch der Pore, bei der zwei der vier Segmente 6 in das Zentrum der Pore fallen während die anderen zwei nach außen driften (137). Dieser langsam-inaktivierte Zustand ist deutlich stabiler und bedarf einer langen Erholungsphase (136).

1.5.3 Transport und Lokalisation des Na_v1.5

Während des Transports an die Zelloberfläche wird der synthetisierte Natriumkanal einer Vielzahl von Posttranslationalen Modifikationen unterzogen. Phosphorylierung (138–140), Methylierung (141,142) und Glykosylierung des Proteins (143) regulieren Transport und den zielgerichteten Einbau in die Zellmembran und nehmen dadurch Einfluss auf die Dichte an Natriumkanälen und die Höhe des Natriumstroms. Durch PKA-abhängige Phosphorylierung wird der Transport und Einbau des Na_v1.5 und damit auch der Natriumstrom hochreguliert (138,139), während die Phosphorylierung durch die PKC einen gegenteiligen Effekt zu erzielen scheint (140). Beltran-Alvarez et al. (141,142) zeigten eine vermehrte Expression des Na_v1.5 durch posttranslationale Methylierung des Proteins. Die aufwendige Glykosylierung des Proteins findet in mehreren Schritten im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt und resultiert in zwei verschiedenen

Glykosylierungsmustern, die sowohl Kanalfunktion als auch den Transportweg zur Zellmembran beeinflussen können (143).

Die Spannungsabhängigen Natriumkanäle $Na_v1.5$ sind im Bereich der Glanzstreifen, der lateralen Membran und der T-Tubuli verdichtet lokalisiert, wo sie mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren und in sogenannten Multiproteinkomplexen angeordnet sind (144–148). An der lateralen Membran konnte eine Interaktion von $Na_v1.5$ mit Dystrophin und Syntrophin gezeigt werden. Diese verankern den Natriumkanal in der Zellmembran (149), während sich in den Glanzstreifen hingegen keine Expression von Dystrophin nachweisen ließ (150). Im Bereich der Glanzstreifen und der T-Tubuli wurde stattdessen eine Koexistenz von $Na_v1.5$ und SAP97 (synapse-associated protein 97) gezeigt (145,151) – ein Protein der Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen, die bei der Verankerung und Anordnung von Ionenkanälen und Rezeptoren in der Zellmembran involviert sind. Insgesamt konnten bisher 17 Proteine oder Proteinfamilien als Interaktionspartner der Spannungsabhängigen Natriumkanäle identifiziert werden. Diese nehmen hinsichtlich Einbau, Anordnung und Stabilisierung in der Zellmembran, Transport und Aktivität des Kanals eine regulierende Funktion ein (152). Die Bedeutung dieser komplexen Regulation innerhalb der Multiproteinkomplexe zeigt sich in einigen Patienten mit Long QT Syndrom und Brugada Syndrom, bei denen Mutationen in den mit dem $Na_v1.5$ interagierenden Proteinen nachgewiesen wurden (153,154).

Das Zytoskelett der Herzmuskelzelle besteht aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten und dient der mechanischen Stabilität und intrazellulären Transportvorgängen. Mikrotubuli spielen unter anderem eine zentrale Rolle bei dem Transport von Kanalproteinen an die Zelloberfläche (155). Störungen in der Funktion der Mikrotubuli könnten daher Einfluss auf den Transport und Einbau von Spannungsabhängigen Natriumkanälen in die Zellmembran haben. Der in der Krebstherapie verwendete Hemmstoff des mikrotubulären Abbaus Paclitaxel führt durch Hemmung dieses Transportvorganges zu einer geringeren Dichte an Natriumkanälen und einem verminderten Natriumstrom, der das Auftreten von lebensgefährlichen Arrhythmien begünstigt (156). Dybkova et al. konnten zudem zeigen, dass Paclitaxel vermutlich über Inhibition der Translokation von β -Arrestin-2 die β -adrenerge Aktivierung der CaMKII stört und so zu einer verminderten CaMKII-abhängigen Phosphorylierung der Spannungsabhängigen Natriumkanäle führt (157).

Aktinfilamente ziehen sich bis in membranständige Proteine, deren Position sie festigen und deren Adhärens-Kontakte zu benachbarten Zellen sie unterstützen. Unter anderem besteht

Kontakt von Aktin zu Ankyrin-G, das als Verbindungsglied zwischen Zytoskelett und membranständigen Proteinen fungiert sowie zu α -Aktinin-2, das zur Fixierung von Titin an die Z-Scheiben dient. Ankyrin-G und α -Aktinin-2 interagieren beide mit dem Nav1.5 (147,158,159). Syntrophin ist ebenfalls an Aktinfilamente gekoppelt und bildet so ein Bindeglied zwischen Zytoskelett und Spannungsabhängigem Natriumkanal (160,161).

1.5.4 Der Späte Natriumstrom (Late I_{Na})

Dudel et al. konnten 1967 den Einfluss von Tetrodotoxin (TTX) auf die Länge der Plateauphase des Aktionspotentials in Purkinje-Zellen zeigen und beschrieben in diesem Zusammenhang erstmals den Späten Natriumstrom in Herzmuskelzellen (162). Dieser entsteht durch die unvollständige Inaktivierung der Spannungsabhängigen Natriumkanäle und bezeichnet einen dem Natriumspitzenstrom folgenden Residualstrom während des Aktionspotentials (163). Zu den beteiligten Spannungsabhängigen Natriumkanälen gehört hauptsächlich die herzspezifische Isoform $Na_v1.5$ (164). Einige Studien zeigen allerdings eine Beteiligung anderer, eher für das Nervensystem spezifischen Isoformen (165,166). Xi et al. beschrieben einen zunehmenden Beitrag der Isoformen $Na_v1.1$ und $Na_v1.6$ in Kardiomyozyten abhängig von der Höhe des Späten Natriumstroms (167). Obwohl der Späte Natriumstrom mit weniger als 1% des Spitzenstroms ein sehr kleiner Strom ist, reicht er aufgrund seiner Dauer von mehreren Hundert Millisekunden dennoch aus, um auf die intrazelluläre Natriumkonzentration sowie auf die Länge der Plateauphase und des Aktionspotentials Einfluss zu nehmen (168,169).

Der Späte Natriumstrom kann nach Abzug des Leckstroms nach 1000 ms als Anteil des Spitzenstroms in Prozent oder auf die Membrankapazität gerechnet dargestellt werden. Geringfügige Änderungen des Messintervalls können durch die große Steigung der Stromkurve direkt vor der Plateauphase des Aktionspotentials große Messunterschiede bedingen und erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Zu bedenken ist ebenfalls, dass sich die Höhe des Späten Natriumstroms in den unterschiedlichen Herzregionen unterscheidet (170).

1.5.5 Regulation des Late I_{Na}

Abgesehen von der spannungsabhängigen Regulation des Natriumkanals gibt es noch weitere regulative Mechanismen, die die Verfügbarkeit der Natriumkanäle, die schnelle und langsame Inaktivierung sowie die Erholungsphase beeinflussen. Unter physiologischen

Bedingungen dienen diese Veränderungen der Feinabstimmung der Elektromechanischen Kopplung.

Durch Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum und dem Sarkoplasmatischen Retikulum wird das regulatorische Protein Calmodulin aktiviert. Tan et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an ein Motiv des Carboxy-Endes der α -Untereinheit des Natriumkanals dessen Interaktion mit der Proteinschleife zwischen Domäne III und IV moduliert (171). Ca^{2+} /Calmodulin fördert dadurch – vermutlich als eine Art Feedback-Mechanismus – die schnelle und intermediäre Inaktivierung und führt somit zu einer reduzierten Kanalfunktion. Erhöhte diastolische Kalziumlevel könnten durch dieses negative Feedback die Kanalfunktion herabsetzen und kompensatorisch zu einem erniedrigten Natriumeinstrom führen.

Unter β -adrenerger Stimulation erhöht sich der Späte Natriumstrom. Murphy BJ et al. (160) konnten zeigen, dass die cAMP abhängige Proteinkinase A in Kardiomyozyten die α -Untereinheit des Natriumkanals an der Proteinschleife zwischen Domäne I und II phosphoryliert und somit die Leitfähigkeit der Zelle für Natrium erhöht (174,175). Interessanterweise konnten Dybkova et al. allerdings nachweisen, dass die β -adrenerge Stimulation des Späten Natriumstroms nicht über die Proteinkinase A reguliert wird (157). Stattdessen zeigte sich eine vermutlich über β -Arrestin-2 und Epac (siehe Kapitel 1.6) vermittelte Aktivierung der CaMKII durch Isoproterenol, die für die Erhöhung des Späten Natriumstroms nach β -adrenerger Stimulation verantwortlich gemacht wird (157).

Die CaMKII δ ist die vorwiegende Isoform in Kardiomyozyten und kann sowohl durch Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin als auch durch Autophosphorylierung Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängig aktiviert werden (176,177). Während der Einfluss der CaMKII auf L-Typ Ca-Kanäle bereits bekannt war (178), konnte 2006 ein direkter Einfluss auf den Spannungsabhängigen Natriumkanal nachgewiesen werden (169). In Mäusen und Kaninchen mit Überexpression der CaMKII zeigte sich eine verlangsamte Schnelle Inaktivierung der Natriumkanäle und eine Steigerung des Späten Natriumstrom mit konsekutiver Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration (179). Die CaMKII kann zudem durch Oxidation von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) katalytisch aktiv werden (180). Eine gesteigerte Produktion (via NADPH Oxidase-2 (NOX-2) und mitochondriale Elektronentransportkette) von ROS kann zur Oxidation des Enzyms führen und es dadurch aktivieren. Weitere beteiligte Kinasen sind die Proteinkinase C (PKC), die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) und die Adenosin-Monophosphat-aktivierte

Proteinkinase (AMPK), die allesamt über Phosphorylierung an verschiedenen Stellen des Spannungsabhängigen Natriumkanals zu einer Erhöhung des Späten Natriumstroms führen können (181–184). Durch Nitrosylierung des Na_v1.5 durch Stickstoffmonoxid kann der Späten Natriumstrom ebenfalls erhöht werden (185).

Ein vermehrter Abbau von Na_v1.5 kann den Natriumeinstrom in die Herzmuskelzelle hingegen herabsetzen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der Na_v1.5 durch die E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-2 ubiquityliert werden kann (186) und abhängig von der Aktivität des Ubiquitin-Proteasom Systems abgebaut wird (187). In einem Mausmodell, das eine Punktmutation im Dystrophin-Gen trägt (C57BL/Ros-5Cv (mdx^{5cv}) Mäuse), konnte eine Reduktion des Gesamtproteins an Na_v1.5 um 50% sowie eine Verminderung des Natriumstroms um 30% im Vergleich zum WT gezeigt werden (188). Durch Inhibition der Proteasomen in diesem Mausmodell konnten diese Abweichungen auf Kontrollniveau zurückgeführt werden (189). Dies könnte auch hinsichtlich der HCM relevant sein, in der eine reduzierte Gesamtmenge an MyBPC-3 in Herzmuskelzellen durch verstärkten Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System nachgewiesen werden konnte (22,24,26,109). Des Weiteren konnten 4 Aminosäuren des extrazellulären Proteingerüsts der β1-Untereinheit identifiziert werden, durch dessen N-terminale Glykosylierung die Eigenschaften der β-Untereinheit bestimmt werden. Johnson et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Sialinsäure zu einem inhibierenden Effekt der β-Untereinheit auf die Kanalfunktion führt und für eine beschleunigte schnelle Inaktivierung verantwortlich ist (190).

Es besteht zudem die Möglichkeit, pharmakologisch auf die Aktivität der Spannungsabhängigen Natriumkanäle Einfluss zu nehmen. Lokalanästhetika, Antiarrhythmika und Antiepileptika binden an Aminosäurereste des porenbildenden Segments 6 und blockieren bzw. erschweren damit den Durchtritt der Natriumionen (191–196). Die Guanidinium-Toxine Tetrodotoxin und Saxitoxin binden von außen an den Spannungsabhängigen Natriumkanal im Bereich der Pore und blockieren durch Interaktion mit dem Selektivitätsfilter den Durchtritt von Natriumionen (197). Seeanemonentoxine, zu denen auch das ATX-II zählt, verlangsamen durch Bindung an die extrazelluläre Proteinschleife zwischen Segment 3 und 4 der Domäne IV die Schnelle Inaktivierung und erhöhen somit den Späten Natriumstrom (198). Für die Messungen des Späten Natriumstroms wurde außerdem der selektive Inhibitor des Späten Natriumstroms Ranolazin verwendet. Obwohl der Wirkmechanismus von Ranolazin auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig geklärt ist, konnte der inhibierende Einfluss auf den Späten Natriumstrom in Studien nachgewiesen werden (43,199,200). Ranolazin ähnelt in seiner

Struktur den Lokalanästhetika, sodass ein ähnlicher Wirkmechanismus vermutet wird. Tatsächlich konnte in Mausmodellen, in denen die Bindungsstelle für Lokalanästhetika durch gezielte Mutation ausgeschaltet wurden, eine erhebliche Wirkungsabnahme von Ranolazin erzielt werden (201). Im Gegensatz zu den Lokalanästhetika weist Ranolazin allerdings eine 38-fach höhere Wirkung auf den Späten Natriumstrom im Vergleich zum Natriumspitzenstrom auf (202). Zurzeit ist Ranolazin (Ranexa[®] – Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA) als antianginöse Zweitlinientherapie zugelassen (203,204).

1.5.6 Störungen der Natriumhomöostase

Es gibt eine Vielzahl an Mutationen in dem für den Spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ kodierenden Gen *SCN5A*, die sich in Form des Long-QT-Syndroms 3 und des Brugada-Syndroms äußern können (205,206). Das Long-QT-Syndrom 3 beruht auf verschiedenen Mutationen im Gen *SCN5A*, die zu einer gestörten Inaktivierung des $\text{Na}_v1.5$ und einem persistierenden Natriumstrom während des Aktionspotentials führen (207). Die Folge ist eine langanhaltende Repolarisationsphase, die sich im Elektrokardiogramm als verlängerte QT-Strecke darstellt. Auch für das Brugada-Syndrom konnten mehrere ursächliche Mutationen im Gen *SCN5A* identifiziert werden (208). Diese führen allerdings im Gegensatz zum Long-QT-Syndrom 3 zu einer eingeschränkten Funktion oder einem Funktionsverlust des $\text{Na}_v1.5$ und somit zu einem verminderten Natriumeinstrom (206). Beide Erkrankungen gehen mit einem erhöhten Risiko für lebensgefährliche Arrhythmien einher (209).

Darüber hinaus kann die posttranslationale Modifikation des $\text{Na}_v1.5$ bei kardialen Erkrankungen verändert sein (210). Im Rahmen der Herzinsuffizienzforschung beispielsweise wird eine Dysregulation der CaMKII (157,179,183,211), der Proteinkinase C (183) und der SGK (181), gestörte Glykosylierungs- (212,213) und Methylierungsmuster (141,142) am $\text{Na}_v1.5$ sowie eine gestörte Redox-Regulation der CaMKII (168) im Zusammenhang mit veränderten Natriumströmen beschrieben.

Auch durch Medikamenteneinnahme kann die Natriumhomöostase der Zelle gestört werden. Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib, Sunitinib und Nilotinib, die in der Krebstherapie zum Einsatz kommen (214,215), können unter anderem über einen persistierenden Natriumstrom zu einem medikamentös induzierten Long QT-Syndrom führen (216).

Folgen eines erhöhten Late I_{Na} sind das erhöhte Risiko für Frühe Nachdepolarisationen (EAD – early afterdepolarisation) (217,218) sowie eine verminderte Relaxationsfähigkeit des

Myokards (Diastolische Dysfunktion) (41,43,219,220) – beides Symptome, die auch bei der Hypertrophen Kardiomyopathie eine Rolle spielen. EADs können durch eine Verlängerung des Aktionspotentials entstehen (47). In CaMKII δ C-überexprimierten Mäusen (Tg) mit erhöhtem arrhythmogenen Potential wurden zudem Late I_{Na}-unabhängige EADs in Phase 3 beschrieben (221). Späte Nachdepolarisationen (DAD - delayed afterdepolarisation) beruhen hingegen auf zytosolischer und sarkoplasmatischer Kalziumüberladung, die das Auftreten von sogenannten Kalzium-Sparks (spontaner Kalziumaustritt aus dem SR) begünstigt und ein erneutes Aktionspotential triggern kann (47,222,223).

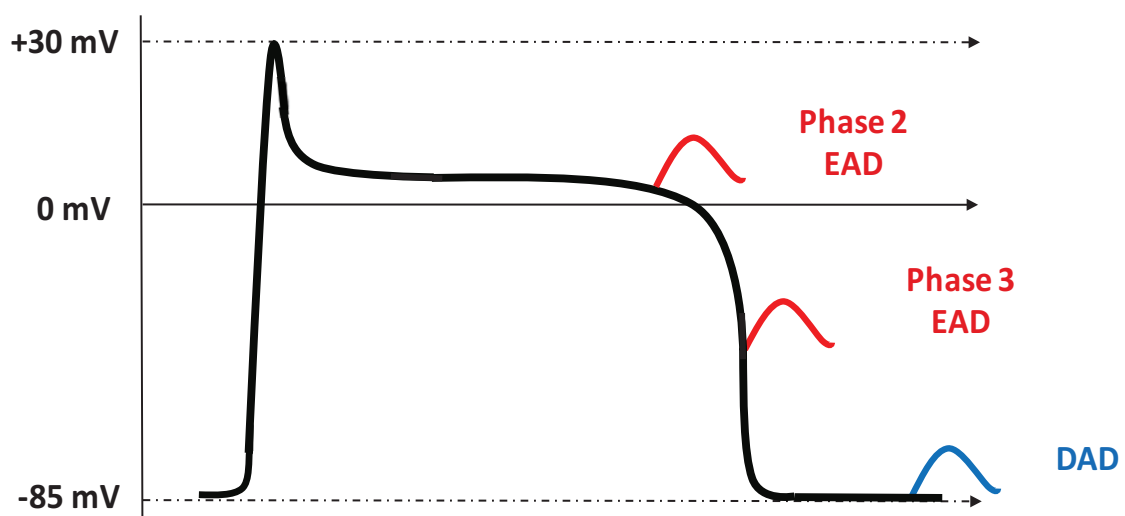


Abbildung 6

Darstellung von Frühen und Späten Nachdepolarisationen. Frühe Nachdepolarisationen (EADs) entstehen durch Verlängerung des Aktionspotentials aufgrund persistierender depolarisierender Ionenströme oder gestörter repolarisierender Kaliumströme. Sogenannte Phase 3 EADs können zudem durch Kalziumfreisetzung aus dem SR während des Aktionspotentials getriggert werden, die über einen I_{NCX}-Einwärtsstrom eine Reaktivierung von I_{Na} ermöglichen (221). Späte Nachdepolarisationen (DAD) beruhen hingegen auf spontanen Kalziumfreisetzungen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum.

Der NCX ist ein membranständiges Transportprotein, das sekundär aktiv (d.h. abhängig von der Arbeit der primär aktiven Na⁺/K⁺-ATPase) zwei Natriumionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle übertreten lässt, um ein Kalziumion aus der Zelle ausschleusen zu können (53). Erhöht sich der Natriumeinstrom in die Zelle, verringert sich der Gradient für Natrium über die Zellmembran und somit auch der Antrieb für NCX. Folglich wird weniger Kalzium aus der Zelle aus dem Zytosol eliminiert, bei Umkehr des NCX wird sogar zusätzliches Kalzium gegen Natrium in die Zelle geschleust (53,224). Wird

nicht ausreichend Kalzium in der Diastole aus dem Zytosol eliminiert, bindet dieses weiterhin über Calmodulin an Troponin C und verhindert die für die ausreichende Füllung der Ventrikel und Koronargefäße essentielle Relaxation des Herzmuskels.

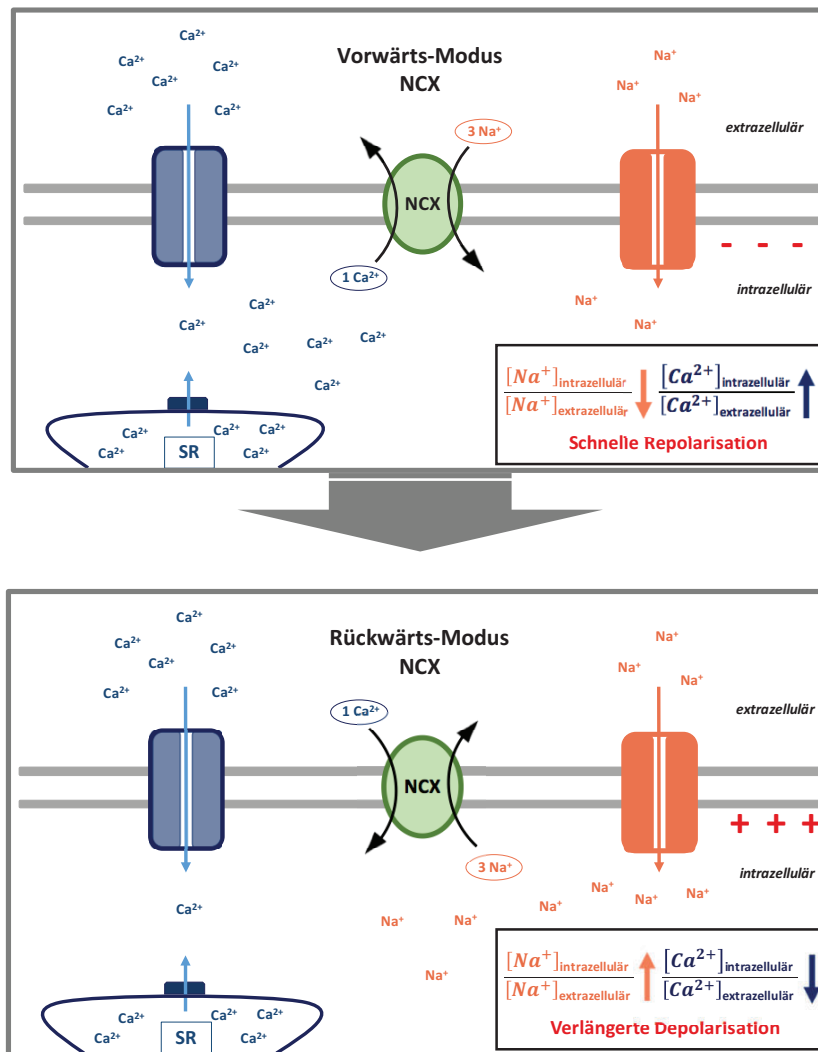


Abbildung 7

Umkehr-Mechanismus des NCX. Bei einem hohen Gradienten für Natrium über die Zellmembran, negativem Membranpotential und erhöhten Kalziumkonzentrationen in der Zelle arbeitet der NCX im Vorwärtsmodus und schleust ein Kalzium-Ion im Tausch gegen 3 Natrium-Ionen nach extrazellulär. Netto wird dabei mehr positive Ladung in die Zelle transportiert, bei verlängerter Depolarisation der Zelle steht dem Konzentrationsgradient demnach der elektrische Gradient entgegen. Ein geringer Gradient für Natrium durch Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration und eine niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentration können ebenfalls den Antrieb des NCX aufheben, sodass es zu einem Wechsel in den Rückwärts-Modus kommt. Im Rückwärts-Modus wird ein Kalzium-Ion im Tausch gegen 3 Natrium-Ionen nach intrazellulär geschleust.

1.6 Die β -adrenerge Signalkaskade

Unter Stress wird durch die Erhöhung der Herzfrequenz und Kontraktionskraft, die Beschleunigung der Relaxation in der Diastole und die Zentralisation des Blutvolumens der Auswurf des Herzens an den gesteigerten Sauerstoff- und Energiebedarf des Körpers angepasst. Innerhalb von Sekunden kann dabei das Herzzeitvolumen auf fast das 5-fache gesteigert werden (225). Die genaue Regulation findet über G-Protein gekoppelte Adrenorezeptoren statt, die empfindlich für Adrenalin und Noradrenalin sind. Neben der G-Protein vermittelten Signalkaskade sind allerdings auch G-Protein-unabhängige Signaltransduktionen über zwei β -Arrestin Isoformen bekannt (226,227). Durch Bindung eines Liganden an den β -Rezeptor kommt es über eine Konformationsänderung zur Bindung von GTP an die α -Untereinheit des G-Proteins (228,229). Die α -Untereinheit dissoziiert und die Zielproteine werden aktiviert (229,230). Die Adenylatzyklase produziert cAMP, das die cAMP-abhängigen Proteinkinase A aktiviert. Durch PKA-abhängige Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen, Ryanodinrezeptoren und Phospholamban wird ein effizienter Kalziumein- und ausstrom ermöglicht (231,232). Zudem erhöht sich der einwärtsgerichtete Natriumstrom (I_{Na}) und die repolarisierenden Kaliumströme durch die PKA-abhängige Phosphorylierung von Spannungsabhängigen Natriumkanälen ($Na_v1.5$) und Kaliumkanälen (KCNQ1) (174,233,234). Eine Hochregulation des Natrium-Kalzium-Austauschers NCX wird ebenfalls beschrieben (235). Die Phosphorylierung von Troponin I und Titin sorgt zudem für das Absinken der Kalziumsensibilität und erhöht die Elastizität der Myofilamente, wodurch die Relaxation der Herzmuskelzellen und die Füllung der Ventrikel in der Diastole unterstützt werden (232,236). Außerdem schützt die PKA-abhängige Phosphorylierung am M-Motiv des Myosin bindenden Protein C vor dessen Degradierung und führt zur Erleichterung der Querbrückenbildung zwischen Aktin und Myosin (103,107,111,112).

Neben der PKA-vermittelten Signaltransduktion gibt es auch noch PKA-unabhängige Kaskaden über das durch cAMP aktivierbare Austauscherprotein Epac (237). Abhängig von der Isoform Epac 1 oder Epac 2 sind hiermit eine Hypertrophie des Herzmuskels und eine Neigung zu Arrhythmien durch eine CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Ryanodinrezeptoren assoziiert (238,239). Der Beitrag der CaMKII in der Transduktion β -adrenerger Stimulation wurde lange Zeit unterschätzt. Obwohl die direkte Aktivierung durch Kalzium erfolgt, wird das Ausmaß der Aktivität durch das sympathische Nervensystem reguliert (240). Dybkova et al. konnten zeigen, dass die Iso-abhängige Aktivierung der CaMKII über das Austauscherprotein Epac und über β -Arrestin 2 geschieht (157). Die Aktivierung ist zusätzlich von funktionstüchtigen Mikrotubuli abhängig (157). Die CaMKII

trägt u.a. zur Modifikation von Spannungsabhängigen Natriumkanälen ($\text{Na}_v1.5$) (157,179), L-Typ Kalziumkanälen (178), des Natrium-Kalzium-Austauschers NCX (241), Ryanodinrezeptoren (242), Phospholamban (243) und Kalium-Auswärtsgleichrichters (verzögerter Gleichrichter, i_k) (244) bei. Zudem konnte am cMyBPC eine Phosphorylierung durch die CaMKII an 2 der 3 PKA-Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (245).

1.7 Ziele und Fragestellungen

Es sind eine Vielzahl an pathologischen Veränderungen in der HCM bekannt, die allerdings bisher kein klares Bild darüber liefern, welche von ihnen im direkten ursächlichen Zusammenhang mit der Mutation stehen und welche sich sekundär aufgrund bestehender pathologischer Veränderungen entwickeln. Die Studie von Coppini et al. (44) hat zudem neue Fragen hinsichtlich elektrophysiologischer Veränderungen der Herzmuskelzellen aufgeworfen. Diese sollen in der vorliegenden Arbeit anhand des *mybpc3*-KI-Mausmodells überprüft werden. Folgende Fragen werden beantwortet:

1. Kommt es unter ATX-II zu einer Stimulation und unter Ranolazin zu einer Hemmung des Späten Natriumstroms?
2. Ist der Späte Natriumstrom im *mybpc3*-KI-Mausmodell im Vergleich zu WT Mäusen verändert?
3. Ist die β -adrenerge Stimulation des Späten Natriumstroms im *mybpc3*-KI-Mausmodell intakt?

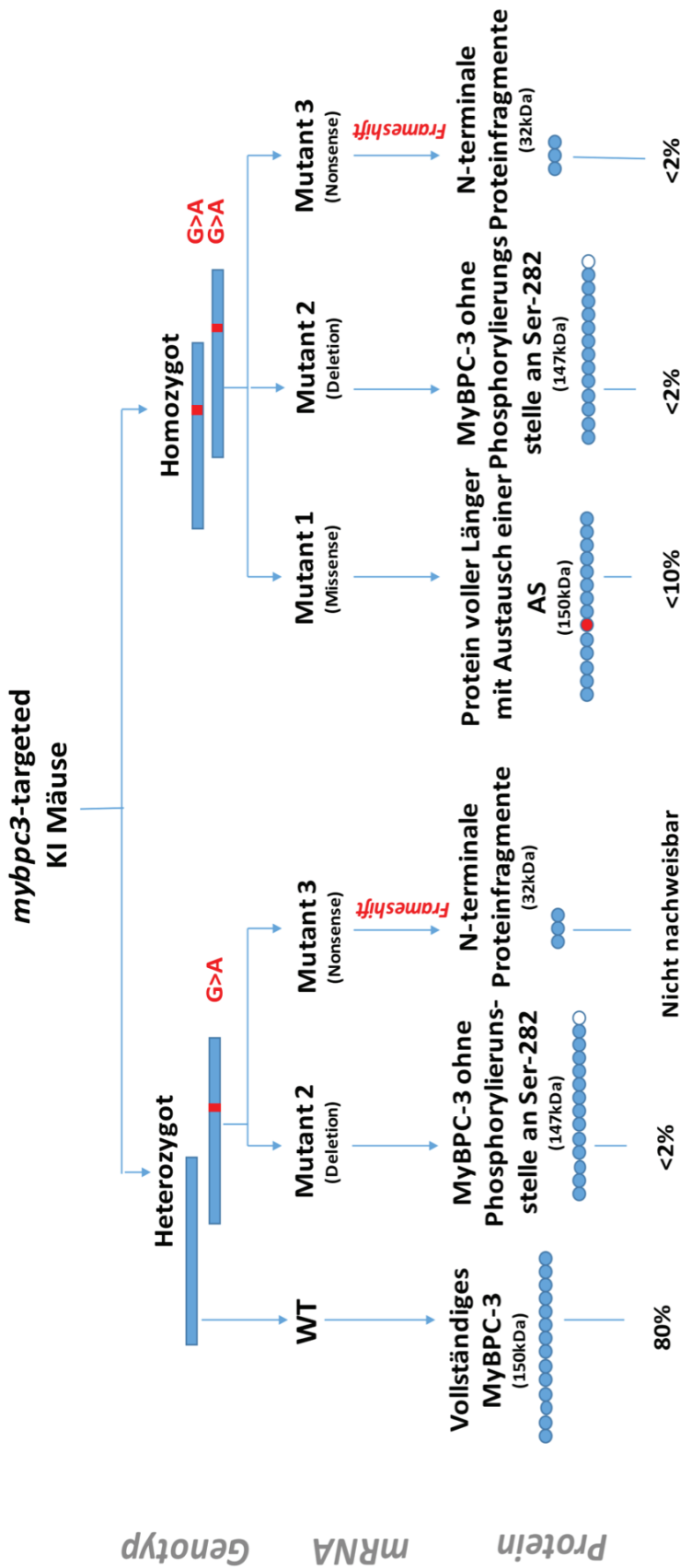
Zu diesem Zweck wird mittels der Ruptured Whole-Cell-Patchclamp Technik der Späte Natriumstrom in dem KI Mausmodell im Vergleich zum WT untersucht und dessen Reaktion auf Ranolazin und ATX-II überprüft. Daraufhin wird die Erhöhung des Späten Natriumstroms unter aufsteigenden Konzentrationen von Isoproterenol auf Unterschiede zwischen *mybpc3*-KI-Mäusen und Wildtypmäusen geprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Charakterisierung des Mausmodells

Um den Späten Natriumstrom in Kardiomyozyten mit Hypertropher Kardiomyopathie zu beurteilen wurde ein Mausmodell auf dem Black Swiss Background verwendet.

Das Knock-In Mausmodell trägt eine Punktmutation im letzten Nukleotid 6 (Guanin zu Alanin) eines Gens, das für das sarkomere kardiale Myosin-bindende Protein C kodiert (MYBPC3). Der mutierte Genabschnitt wird interessanterweise in 3 verschiedene mRNA übersetzt (1. Missense 2. Deletion/Insertion 3. Nonsense). Missense und Deletion führen zu einem Myosin-bindenden Protein voller Länge mit Austausch einer Aminosäure (AS) beziehungsweise zu einem fast vollständigen Protein ohne Phosphorylierungsstelle am Serin-282. Im Falle der Nonsense Mutation kommt es hingegen zu einem Frameshift mit vorzeitigem Translationsabbruch. Die hierbei entstandenen N-terminalen Proteinfragmente werden zügig über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert und sind in heterozygoten Mäusen nicht mehr nachweisbar (22). Die prozentuale Verteilung unterscheidet sich in heterozygoten und homozygoten Mäusen (siehe Abb. 8). In heterozygoten und homozygoten Genträgern ist zudem sowohl die Gesamtmenge der mRNA (50%/80%) als auch die Gesamtmenge des Proteins MyBP-C3 (20%/90%) reduziert (22). Vignier et al. vermuten einen mutationsbedingten Zerfall der mRNA sowie eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom Systems (22).



Überblick der mRNA-Synthese und Proteinexpression. Dargestellt sind das heterozygote und homozygote Mausmodell der Hypertrophen Kardiomyopathie mit einer KI-Punktmutation im Gen MYBPC3 (Guanin zu Alanin) mit ihrer Übersetzung in mRNA und Proteine/Proteinfragmente. Heterozygote Mäuse besitzen ein WT Allel und ein Allel mit besagter Punktmutation. Daraus resultieren 50% WT mRNA und 2 Varianten einer mutierten mRNA (2. Deletion 3. Nonsense). Die mRNA-Variante 2 übersetzt sich in ein fast vollständiges Protein ohne eine Phosphorylierungsstelle am Ser-282. Eine Proteinexpression der mRNA-Variante 3 kann in heterozygoten Mäusen nicht nachgewiesen werden. In homozygoten Mäusen hingegen finden sich <2% Proteinfragmente, die auf der Nonsense-Mutation (mRNA-Variante 3) basieren. In homozygoten Mäusen ist das 2. Allel ebenfalls von der Punktmutation betroffen. Dadurch findet sich keine WT-mRNA sondern ausschließlich 3 Varianten einer mutierten mRNA (1.Missense 2.Deletion 3.Nonsense). Die Gesamtmenge der mRNA und der exprimierten Proteine sind im heterozygoten und noch deutlich ausgeprägter im homozygoten Mausmodell reduziert.

Abbildung 8

Sowohl heterozygote als auch homozygote Mäuse mit besagter KI-Mutation zeigten äußerlich keine Auffälligkeiten und eine übliche Lebenserwartung von ca. zwei Jahren. Nur bei homozygoten Mäusen fand sich eine systolische Dysfunktion und eine Linksventrikuläre Hypertrophie (22).

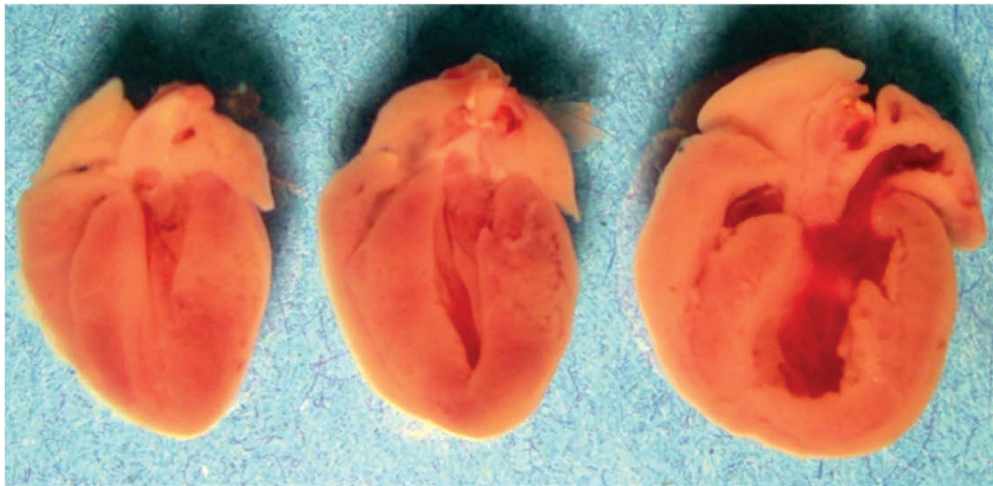


Abbildung 9

Originalbild (aus Vignier et al., 2009) von Längsschnitten durch Herzen des *myhpc3-KI* Mausmodells der HCM. Abgebildet sind von links nach rechts die Längsschnitte durch ein WT-Herz, ein heterozygoter Träger der Mutation ohne Herzmuskelhypertrophie sowie rechts ein homozygoter Genträger der Mutation mit makroskopisch sichtbarer Herzmuskelhypertrophie (22).

Für beide Genotypen konnte zudem eine erhöhte Kalziumsensitivität der Myofilamente, Relaxation ab geringeren intrazellulären Kalziumkonzentrationen, ein schnellerer Abfall der intrazellulären diastolischen Kalziumkonzentration und eine diastolische Dysfunktion gezeigt werden. Eine verkürzte diastolische Sarkomerlänge zeigte sich hingegen nur bei homozygoten Mäusen (28).

Für die Messungen des späten Natriumstroms wurden ausschließlich homozygote Genträger verwendet.

2.1.1 Isolation von Kardiomyozyten aus Mäuseherzen

Alle Tierexperimente wurden der örtlichen Tierschutzbehörde angezeigt 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.

Zur Anwendung kamen Mäuse mit Black-Swiss Hintergrund beiderlei Geschlechts im Alter von durchschnittlich $16,3 \pm 0,67$ Wochen (Höchstalter: 29 Wochen; Mindestalter: 10 Wochen) und mit einem Körpergewicht von durchschnittlich $25,35 \pm 0,53$ g (Höchstgewicht: 33,41g; Mindestgewicht: 17,44g). Die Isolation der Mäuseherzzellen wurde von einem technischen Assistenten des Labors durchgeführt.

Die Mäuse wurden zuerst in einem Isofluran-gesättigten Glasbehälter narkotisiert und die Tiefe der Narkose über Regelmäßigkeit und Qualität der Atmung kontrolliert. Bei ausreichender Narkose wurde den Mäusen schnell und schmerzfrei das Genick gebrochen. Über den Zugang unterhalb des Rippenbogens durch das Diaphragma wurde daraufhin das Herz durch eine Durchtrennung des Aortenbogens distal der Koronararterien und proximal des Truncus brachiocephalicus herauspräpariert und schnellstmöglich in Einfachtyrode gelegt. Durch mechanische Manipulation von außen wurde versucht, potenziell thrombotisches Material aus dem Herzen und der versorgenden Gefäße zu entfernen.

Daraufhin wurde das Herz- und Körpergewicht abzüglich des Herzgewichtes ermittelt. Das Herz wurde dann mit einer stumpfen Einfachkanüle (Sterican, 20G) über den Aortenbogen bis kurz vor der Aortenklappe kanüliert und mit Einfachtyrode (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 1) zur weiteren Säuberung gespült.

Mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsanlage wurde daraufhin das Herz mithilfe von 20ml Enzymlösung (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 2) perfundiert und durch LiberaseTM (Enzymgemisch aus Kollagenase I und II) und Trypsin anverdaut.

Die verwendete Perfusionsanlage, besteht aus einem Schlauchsystem, durch das die Enzymlösung möglichst luftblasenfrei in einem umgebenden Wasserbad auf 40 °C erhitzt wird, bevor sie kurz vor dem Eintritt in das endständig befestigte kanülierte Herz auf $36,5 \pm 0,1$ °C abkühlt. Die Herzen wurden je nach Bedarf mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 3ml/min. für 6-8 min. von der Enzymlösung durchflossen und durch die vorhandenen Enzyme verdaut. Das Herz sollte nach dem enzymatischen Verdau eine milchglasartige Färbung und eine leicht tropfenförmige Form annehmen.

Daraufhin wurden die Herzen von der Kanüle abgezogen und im kalziumhaltigen Einfachtyrodebad mit einer OP-Schere zerkleinert und durch Auf- und Abpipettieren zur Suspension gebracht. Durch Zugabe von 2,5 ml Stopplösung (siehe Tabelle 3) wurde der enzymatische Abbau beendet. Die unverdauten Teile wurden durch Nylongaze mit Poren in Größe von max. 200 µm herausgefilitert.

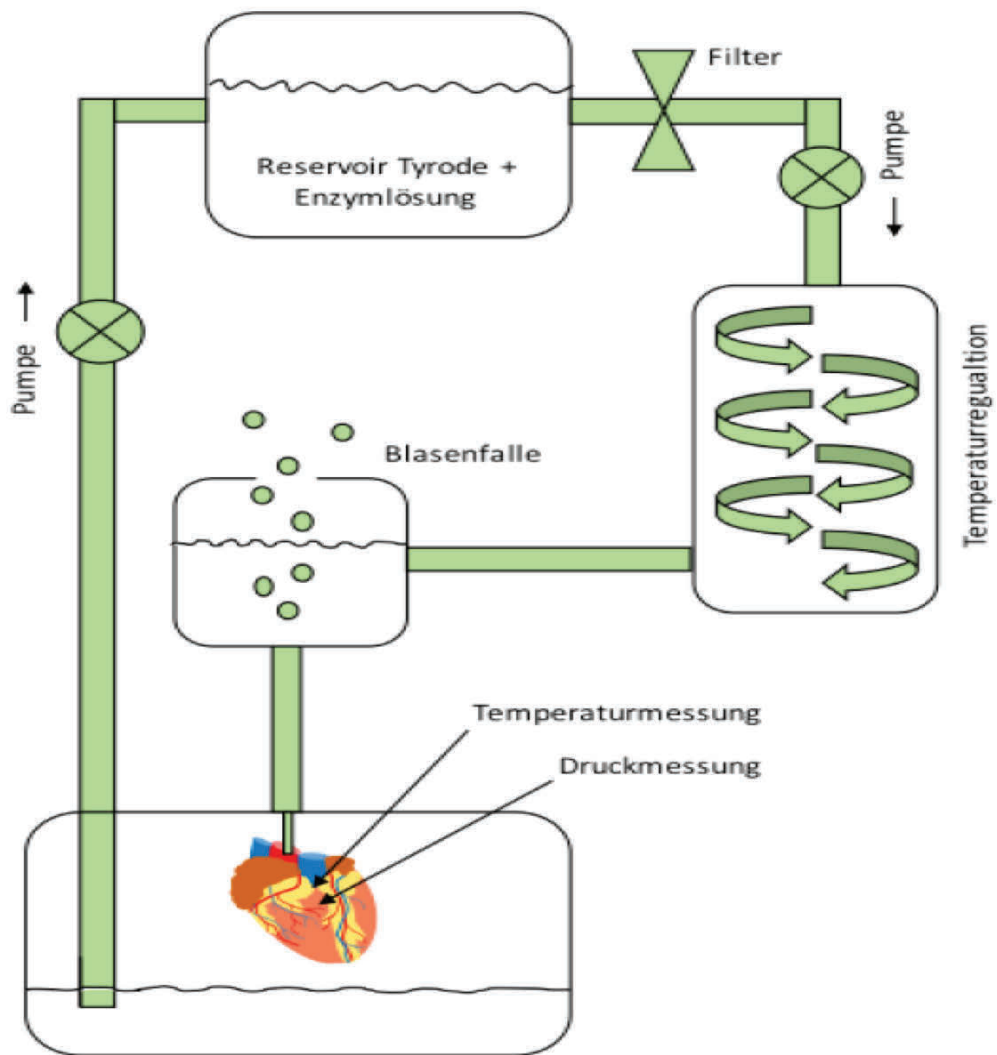


Abbildung 10

Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. Das präparierte Herz wird über die Aorta kanüliert und retrograd mit der enzymhaltigen Tyrode perfundiert. Ständige Kontrolle des Ventrikeldrucks und der Temperatur erlauben eine möglichst atraumatische Perfusion.

Tabelle 1 - **Tyrodepuffer** zur retrograden Perfusion nach Langendorff. Gelöst in ddH₂O. Der pH ist mit NaOH auf 7,42 bei 36,5°C eingestellt.

Substanz	Konzentration
NaCl	113 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mmol/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6 mmol/l
Phenol-red	0,032 mmol/l
NaHCO ₃	12 mmol/l
KHCO ₃	10 mmol/l
HEPES	10 mmol/l
Taurine	30 mmol/l
2,3-Butadionemoxime (BDM)	10 mmol/l
Glukose	5,5 mmol/l

Tabelle 2 - **Enzymlösung** zur Lösung des mechanischen Zusammenhaltes der Kardiomyozyten. In Tyrodepuffer gelöst. pH 7,42 bei 36,5°C.

Substanz	c_{soll} (mmol/l)	Volumen/Volumen %	Gewicht/Volumen %
Liberase™			1,5mg/20ml
Trypsin 10-fach, 2,5%		0,0139	
10mM CaCl ₂	0,0125		110,98

Tabelle 3 - **Enzymstopp** zur kontrollierten Beendigung des enzymatischen Abbaus. In Tyrodepuffer gelöst. pH 7,42 bei 36,5°C.

Substanz	c_{soll} (mmol/l)	Volumen/Volumen %
Bovine calf serum (BCS)		etwa 10
10 mM CaCl ₂	0,0125	

Daraufhin folgte der "Kalziumaufbau", bei dem die isolierten Mausekardiomyozyten an zunehmend höhere Kalziumkonzentrationen von 0,1mmol/l auf 0,8mmol/l gewöhnt wurden. Die Kardiomyozyten wurden für den Messvorgang in ihrer Tyrodelösung mit höchster Kalziumkonzentration auf mehrere Messkammern gegeben. Diese waren vorweg mit einer Schicht aus kollagenähnlichen Glykoproteinen (Laminin) überzogen worden, um die einzelnen Kardiomyozyten auf der Messkammer zu fixieren. Die Tyrode wurde nach Ablagerung der Zellen auf der Lamininschicht mithilfe der Badlösung ausgewaschen.

2.2 Messung des Späten Natriumstroms

2.2.1 Messprinzip

Die Patch-Clamp-Technik wird genutzt um Aussagen über die Leitfähigkeit einer bestimmten Zellmembran in Abhängigkeit von der Offenwahrscheinlichkeit ihrer Ionenkanäle treffen zu können – in diesem Fall über die Leitfähigkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle in der Zellmembran von Mauskardiomyozyten.

Bei der Voltage-Clamp-Methode wird das Membranpotential auf einen bestimmten Wert festgelegt (Sollspannung = U_{Soll}). Abweichungen von diesem Wert aufgrund von Ionenströmen über die Membran werden durch einen Kompensationsstrom in entgegengesetzte Richtung ausgeglichen. Dieser Kompensationsstrom wird automatisch von dem HEKA-Verstärker nach Messung des aktuellen Membranpotentials und Abgleich mit der Sollspannung generiert.

Der Betrag des Kompensationsstroms ist nun genauso groß wie der Betrag des Natriumstroms über die Zellmembran bei der Spannungsdifferenz zwischen der Sollspannung und dem Natriumgleichgewichtspotential (E_{Na}), sprich die Spannung, bei der durch ein elektrochemisches Gleichgewicht kein Natriumnettostrom vorhanden wäre.

Wie bei jedem gewöhnlichen Schaltkreis kann auch hier das Ohm'sche Gesetz angewendet werden.

$$U = R \times I$$

U ist dabei die Spannungsdifferenz zwischen Sollspannung (U_{Soll}) und Natriumgleichgewichtspotential (E_{Na}) und R entspricht dem Widerstand, der von der Leitfähigkeit der Zellmembran für Natriumionen abhängt. I ist der registrierte Natriumnettostrom über die Zellmembran, der durch einen entgegengesetzten Kompensationsstrom ausgeglichen werden muss um die Sollspannung konstant zu halten.

Da die Leitfähigkeit g dem Kehrwert des Widerstandes entspricht

$$G = 1/R \text{ ergibt sich aus dem Ohm'schen Gesetz:}$$

$$\Rightarrow U = 1/G \times I$$

$$\Rightarrow G = I/U$$

Demnach ist die Leitfähigkeit das Maß für den Natriumnettostrom über die Zellmembran in Abhängigkeit von der Abweichung des Sollwertes von dem Natriumgleichgewichtspotential.

Das Natriumgleichgewichtspotential lässt sich mithilfe der Nernst'schen Gleichung berechnen.

$$\text{Nernst-Gleichung: } E = \frac{R \times T}{F} \log \frac{[\text{extrazellulär}]}{[\text{intrazellulär}]}$$

E= Gleichgewichtspotential

R= universelle Gaskonstante

T= absolute Temperatur in Kelvin

F= Faradaysche Konstante

In der Biologie findet die Nernst'sche Gleichung hauptsächlich Anwendung bei der Beschreibung von Diffusionsvorgängen an selektiv-permeablen Membranen. Bei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen tendieren die Ionen nach ihrem chemischen Diffusionsgradienten von der höher konzentrierten Lösung in die niedriger konzentrierte Lösung überzugehen. Bei Übertritt der Ionen entsteht allerdings durch den gleichzeitigen Übertritt von Ladung ein elektrisches Diffusionspotential, das dem chemischen Potential gegenübersteht. Ohne äußere Einflüsse stellt sich daraufhin ein elektrochemisches Gleichgewicht ein. Dieses Potential, bei dem der Nettoionenstrom gleich 0 ist, nennt sich Gleichgewichtspotential (E_m). In der Theorie bedeutet dies, dass der Natriumstrom über die Zellmembran bei gleichbleibender Leitfähigkeit proportional zu dem Abstand der Sollspannung von dem Natriumgleichgewichtspotential (E_{Na}) ist. Da sich die Offenwahrscheinlich der Kanäle jedoch fortwährend ändert, dienen die Experimente hauptsächlich dazu, die Leitfähigkeit zu ermitteln. Hierzu wird der Natriumstrom über die Zellmembran (bzw. indirekt über den notwendigen Kompensationsstrom) registriert, um bei einer festgelegten Sollspannung auf die Leitfähigkeit schließen zu können.

2.2.2 Versuchsaufbau

Der Messplatz befindet sich in einem gesonderten, klimatisierten Raum, der während der Messungen verschlossen bleibt, um Erschütterungen zu vermeiden, die den Kontakt zwischen Pipette und Zelle stören könnten. Zudem ist die Patchanlage auf einem schwingungsgedämpften Tisch platziert, der auch geringste mechanische Schwingungen innerhalb des Raumes abfängt. Die gesamte Messapparatur wird durch einen faradayschen Käfig abgeschirmt, um das Störsignal durch das elektromagnetische Wechselfeld des öffentlichen Spannungsnetzes zu unterbinden und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

Das Gerüst der Anlage bildet ein invertiertes Mikroskop (Nikon Eclipse TE-300), das mit einer maximal 300-fachen Gesamtvergrößerung eine Darstellung auch unterschiedlich großer Zellen gewährleistet. Am Arbeitstisch des Mikroskopes ist der Pipettenhalter befestigt, der einen Anschluss zur Applikation von Unter- und Überdrücken bietet. An

letzterem besteht über ein fixiertes Schlauchsystem mit endständigem Dreiwegehahn die Möglichkeit, manuell Über- bzw. Unterdruck anzulegen oder gegen den atmosphärischen Druck zu nullen. Zudem befindet sich auf dem Arbeitsplatz ein Mikromanipulator, über den man mit Hilfe eines Joysticks die Annäherung der Pipette an die Zellen in den Versuchskammern dirigieren kann.

Die elektrischen Signale werden von einem Vorverstärker aufgenommen und an den Patch-Clamp-Verstärker/Amplifier (EPC10 von HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) weitergeleitet, der über seine integrierte AD/DA-Funktion das analoge Signal in ein digitales Signal umwandeln kann. Eine spezielle Software (Patchmaster 2.0 HEKA Elektronik) speichert und verwertet diese digitalen Daten und dient gleichzeitig als Steueroberfläche für den Verstärker.

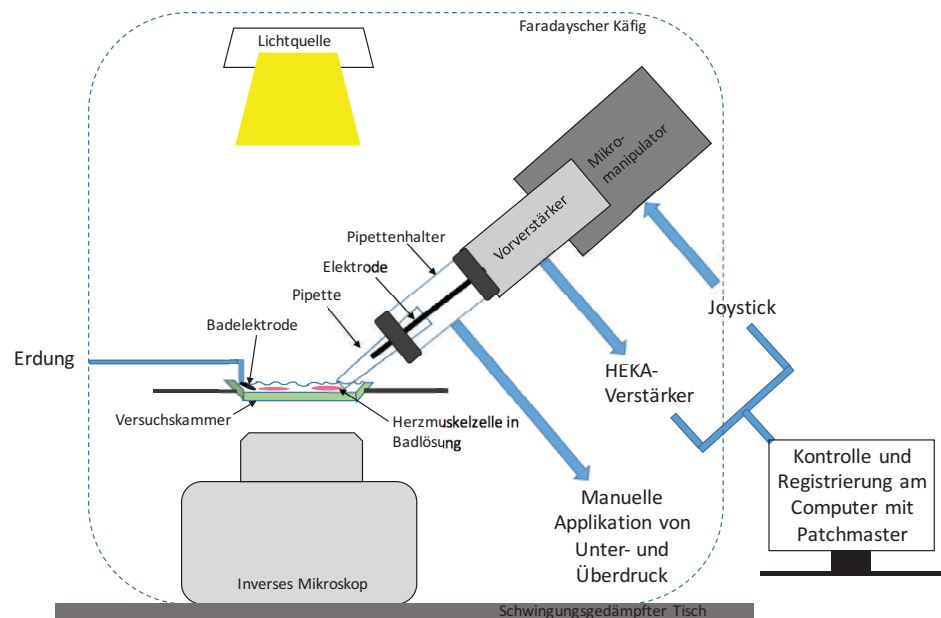


Abbildung 11

Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Setups. Die Kardiomyozyten liegen in der mit Badlösung befüllten Messkammer und werden von der Lichtquelle beleuchtet. Eine Elektrode in der Badlösung ist an einen Erdleiter angeschlossen. Die mit Pipettenlösung befüllte Pipette ist in einer Vorrichtung aus Pipettenhalter, Vorverstärker und Mikromanipulator befestigt, die die Annäherung an die Zelle, Applikation von Unter- und Überdruck sowie die Steuerung und Registrierung von elektrischen Signalen ermöglicht. In der Pipette liegt die Patchpipette, die die Pipettenlösung mit dem HEKA-Verstärker verbindet. Durch das inverse Mikroskop kann der Messvorgang unter Blickkontrolle erfolgen.

2.2.3 Lösungen

Die Zusammensetzung der Lösungen ist den nachstehenden Tabellen zu entnehmen.

Badlösung:

Die Badlösung soll bei der Messung des Späten Natriumstroms ein möglichst physiologisches extrazelluläres Milieu bieten, das die Zellen weder mechanisch noch chemisch schädigt, und durch gezielte Modifikation der Zusammensetzung die Elimination potentiell interferierender Ionenströme ermöglichen.

Die verwendete Badlösung basiert auf einer Einfachtyrode, deren Zusammensetzung dem Extrazellulärmilieu angepasst wurde. Sie ist isoton und wird mit Hilfe von CsOH bei Raumtemperatur auf einen physiologischen pH von 7,4 eingestellt. Um interferierende Kaliumströme auszuschalten wurde Kalium durch elektrophysiologisch äquivalentes Cäsium ersetzt.

Tabelle 4 - **Badlösung.** Gelöst in ddH₂O. pH-Einstellung auf 7,4 mit CsOH.

Substanzen	Konzentration
NaCl	135 mmol/l
Tetramethylammonium-chlorid (TMAC)	5 mmol/l
CsCl	4 mmol/l
MgCl ₂	2 mmol/l
Glukose	10 mmol/l
HEPES	10mmol/l

Pipettenlösung:

Die Pipettenlösung steht nach dem Einreißen der Zellmembran (Rupturing) mit der Intrazellularflüssigkeit der Kardiomyozyten in Verbindungen und ähnelt dieser daher weitestgehend. Der pH wurde bei Raumtemperatur mithilfe von CsOH auf 7,4 angehoben.

Um neben dem Natriumstrom alle weiteren potenziell interferierenden Ionenströme zu eliminieren wurde erneut Kalium durch Cäsium ersetzt und Inhibitoren sarkolemmaler Ionenkanäle hinzugefügt.

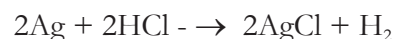
Niflummat (0,03 mmol/l) diente dabei zur Blockade Kalzium-sensibler Chloridkanäle, Strophantidin zur Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase und Nifedipin (0,02 mmol/l) zur Inhibition spannungsabhängiger Kalziumkanäle.

Tabelle 5 - **Pipettenlösung.** Gelöst in ddH₂O. pH-Einstellung auf 7,4 mit CsOH.

Substanz	Konzentration
CsCl	95 mmol/l
Cs-Glutamat	40 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
MgCl ₂	0,92 mmol/l
EGTA	1 mmol/l
Mg-ATP	5 mmol/l
Li-GTP	0,3 mmol/l
CaCl ₂	0,36 mmol/l
HEPES	5 mmol/l
Nifluminsäure	0,03 mmol/l
Nifedipin	0,02 mmol/l
Strophanthidin	0,004 mmol/l

2.2.4 Patchpipetten und Elektroden

Ziel des Aufbaus ist es, einen isolierten Zugang einer Messelektrode in das Intrazellulärmilieu des Kardiomyozyten zu erlangen. Als Messelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht genutzt (Silber/Silberchloridelektrode). Die Chlorierung des Silberdrahtes erfolgte durch elektrochemische Oxidation in Chlorwasserstoffsäure. Wird eine Spannung an 2 Silberdrähte in dieser Lösung angelegt, so wird die Anode (der zum Pluspol gerichtete Leiter) mit Silberchlorid bedeckt.



Die fertig chlorierte Elektrode war an dem Mikromanipulator befestigt und wurde in die mit Pipettenlösung befüllte Patchpipette eingeführt. Nach dem Einreißen der Zellmembran wurde demnach über diesen elektrischen Leiter eine Verbindung zwischen Verstärker und Pipettenlösung/Zellplasma hergestellt. Gegenüber steht die Badelektrode (Referenzelektrode), die einen Kontakt zwischen Badlösung (entspricht dem Extrazellulärmilieu) und dem Erdleiter herstellt.

Durch regelmäßiges Chlorieren der Elektroden wurden Potentialdifferenzen zwischen den beiden Elektroden vermieden, allerdings kam es durch Konzentrationsunterschiede mobiler, geladener Anionen in den beiden Lösungen zu Diffusionspotentialen (Liquid junctions

potential). Diese wurden durch einen sorgfältigen Lösungsansatz und insbesondere eine Optimierung der pH-Einstellung minimiert.

Die Patchpipetten wurden mithilfe eines Pipettenziehgerätes (DMZ Universal Electrode Puller; Zeitz Puller GmbH) aus Glaskapillaren direkt vor dem Messmanöver hergestellt. Die Glaskapillaren bestehen aus Borsilikatglas und weisen einen Innendurchmesser von 1,2 mm und eine Länge von 7,6 cm auf. In zwei aufeinanderfolgenden Phasen wurden die Glaskapillaren zentral erhitzt und auseinandergezogen, sodass zwei konisch zulaufende Pipettenspitzen mit definierter Länge und Öffnungsdurchmesser entstanden. Durch gezielte Änderung hinsichtlich Temperatur, Zeitintervall und Zugkraft konnten Länge und Öffnungsdurchmesser und somit der initiale Pipettenwiderstand ($M\Omega$) modifiziert werden. Ein Initialer Widerstand von 2-3 $M\Omega$ nach Eintauchen in die Badlösung stellte sich hierbei als bester Kompromiss heraus, um die Messgenauigkeit bei minimalem Widerstand zu gewährleisten und dennoch eine hohe Erfolgsquote während des Gigaseals bei möglichst kleinem Öffnungsdurchmesser zu garantieren. Die Pipettenkapazität (pF) in Abhängigkeit von der Oberfläche der Glaskapillare wurde nach Erreichen des Gigaseals über den HEKA-Verstärker ermittelt und von der Membrankapazität (pF) abgezogen.

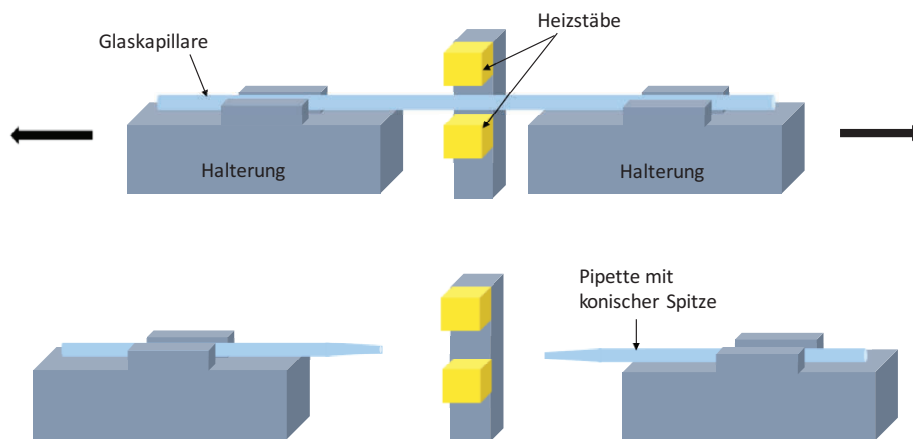


Abbildung 12

Prinzip des Pipettenziehens. Eine Glaskapillare wird mit beiden Enden in eine Halterung gespannt und fixiert. Mittig wird die Glaskapillare durch 2 Heizstäbe mit einer bestimmten Temperatur für ein definiertes Zeitintervall erhitzt. Zeitgleich ziehen die beiden Halterungen mit einer festgelegten Zugkraft nach außen. Somit entstehen 2 Pipetten mit konisch zulaufender Spitze und definierter Öffnungsfläche.

2.2.5 Versuchsdurchführung

Bereits vor dem Messvorgang wurden sämtliche Lösungen auf Raumtemperatur gebracht. Die zu untersuchenden Zellen wurden wie beschrieben auf den Messkammern fixiert und mit Badlösung und gegebenenfalls Isoproterenol oder Ranolazin inkubiert (siehe Kapitel 2.2.6). Im Falle einer Beteiligung von Isoproterenol wurde die Lichtzufuhr, aufgrund dessen Lichtempfindlichkeit, auf Rotlicht beschränkt. Messelektrode und -kammern wurden an der Messapparatur installiert und der Faradaysche Käfig so weit wie möglich geschlossen um elektrische Störungen zu minimieren.

Für jeden einzelnen Versuch wurde eine Pipette frisch gezogen und mithilfe eines Microfills mit Pipettenlösung soweit befüllt, dass nach Befestigung am Mikromanipulator die Messelektrode vollständig und luftblasenfrei von der Lösung umgeben war. Über einen separaten Anschluss an dem Mikromanipulator wurde vor Eintauchen in die Badlösung ein Überdruck appliziert, damit sich die Pipettenspitze möglichst verschlussfrei in der Lösung bewegen konnte. Zudem erleichterte das Flüssigkeitspolster vor der Pipettenspitze den Sealvorgang, da die leichte Eindellung der Zellmembran eine weitere Annäherung der Pipette ermöglichte.

Nach einmaligem Eintauchen der Pipettenspitze in die Badlösung wurde der Verstärker in den Setup-Modus gesetzt, d.h. vorhandene Potentialdifferenzen registriert und als Nullwerte festgelegt. Die auf dem Oszilloskop dargestellte Nulllinie stellte damit den Ausgangspunkt der Messungen dar. Zudem wurde repetitiv ein biphasischer, rechteckiger Kommandospannungstestpuls von 5mV angelegt. Die daraus resultierende Stromantwort diente primär zur visuellen Verlaufskontrolle des Versuchs.

Über das Mikroskop wurde nun eine geeigneter Kardiomyozyt auffindig gemacht. Kriterien hierfür waren eine möglichst isolierte Lage von anderen Zellen, eine intakte Zelloberfläche mit scharfkantigen Enden und eine deutlich sichtbare Querstreifung.

Unter visueller Kontrolle wurde nun die Pipettenspitze mithilfe des Mikromanipulators so nah wie möglich über der zu untersuchenden Zelle platziert. Zur maximalen Annäherung an die Zelle wurde das Oszilloskop zu Hilfe genommen. Je kürzer die Distanz zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran ist, desto eingeschränkter fließen die mobilen Ionen, d.h. der Widerstand nimmt zu und die Stromantwort ab. Sobald sich eine deutliche Abnahme der Stromantwort auf den Spannungstestpuls abzeichnete, konnte mit einer ausreichenden Nähe zur Zellmembran gerechnet werden. Je nach Zellstabilität konnte oftmals eine Lichtreflektion durch Eindellung der Zellmembran erkannt werden.

Nach Abnahme des Überdrucks und gegebenenfalls Applikation eines geringen Unterdrucks konnte daraufhin ein Gigaseal hergestellt werden, d.h. die Zellmembran stand mit der Pipettenspitze soweit in Kontakt, dass der Widerstand auf mehr als $1\text{G}\Omega$ anstieg und somit die Stromantwort vernachlässigbar gering wurde.

In dieser Konfiguration wurden ausschließlich noch kapazitive Ströme detektiert, die als kleine Spikes zu Beginn und Ende des Kommandospannungspulses imponierten und durch Umschaltung in den On-Cell-Modus des HEKA-Verstärkers kompensiert wurden. Sie sind Ausdruck der kapazitiven Eigenschaften der Pipette und sind proportional zur Pipettenoberfläche.

Um nun Zugang zum Zytoplasma der Zelle zu erhalten wurde das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung ("Patch") durch einen erhöhten Unterdruck eingerissen (Rupturing). Maßstab für ein erfolgreiches Rupturing war hierbei der Erhalt des Gigaseals um die Pipettenöffnung herum (geringer Leckstrom) und ein möglichst niedriger Zugangspipettenwiderstand (Serienwiderstand). Dieser setzt sich aus dem initialen Pipettenwiderstand, dem Widerstand der verbleibenden Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung und dem Widerstand der Badlösung zusammen. Es wurden keine Serienwiderstände größer $7\text{M}\Omega$ toleriert. Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurde 3 Minuten abgewartet, um ausreichend Zeit für das Vermischen der Pipettenlösung mit dem Zytoplasma und der Inhibition von interferierenden Ionenkanälen zu bieten.

Durch Aktivierung des Whole-Cell-Modus des HEKA-Verstärkers wurde die Membrankapazität der Zellmembran registriert und kompensiert. Diese ist proportional zur Membranoberfläche und wird in den späteren Auswertungen als Maßstab für die Größe der Zelle genutzt. Die bestehende Konfiguration stellt die Endposition für die Messungen des späten Natriumstroms dar. Es handelt sich bei der Whole-Cell-Ableitung nicht um Messungen einzelner Kanäle, sondern um die Messung der Gesamtheit aller funktionstüchtigen und nicht-inhibierten Kanäle.

2.2.6 Messung des Späten Natriumstroms nach Vorbehandlung mit Ranolazin und Isoproterenol und ATX-II

Als spezifischer Inhibitor des Späten Natriumstroms verhindert Ranolazin sekundär eine Kalziumüberladung der Zelle und kommt bisher hauptsächlich in der antianginösen Therapie zum Einsatz (246–250). Alle Kardiomyozyten einer Messkammer wurden jeweils vor der Messung bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten mit der Ranolazin-haltigen Badlösung inkubiert. Da es Hinweise darauf gibt, dass Ranolazin erst nach Öffnung der Natriumkanäle seine Zielstruktur erreicht und seine Wirkung entfalten kann (201,251), wurde in der Auswertung nicht der erste, sondern stets der letzte (10.) Durchlauf des Protokolls als stabiler Zustand des Natriumnettostroms verwertet (Steady-state). Das Seeanemmonotoxin ATX-II bindet an die extrazelluläre Proteinschleife zwischen S3 und S4 der Domäne IV der α -Untereinheit, verlangsamt darüber die Inaktivierung des Spannungsabhängigen Natriumkanals und führt so zu einer selektiven Erhöhung des Späten Natriumstroms (198). ATX-II wurde der Badlösung hinzugefügt bis eine ATX-II-Konzentration von 0,5 nmol/l erreicht war. Die Inkubationszeit der Zellen mit ATX-II vor Beginn der Messungen betrug mindestens 15 Minuten.

Die Messungen nach 15-minütiger Inkubation mit Isoproterenol wurden ähnlich durchgeführt. Isoproterenol ist ein synthetisches Noradrenalin-Derivat und gehört zu den Sympathomimetika. Zur Beurteilung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Isoproterenol und Late I_{Na} wurden 5 aufsteigende Konzentrationen von 10^{-12} bis 10^{-5} M Isoproterenol in der Badlösung verwendet (Dosis-Wirkungskurve). Zur Kontrolle wurde auch unter Isoproterenoleinfluss die Inhibition des gemessenen Stroms über die Blockade des späten Natriumstroms mithilfe von Ranolazin überprüft (Gruppe 10^{-6} M Isoproterenol + 10 μ M Ranolazin; Gruppe 10^{-12} M Isoproterenol + 10 μ M Ranolazin).

2.3 Datenauswertung

Die Rohdaten der Messungen (Stromstärke, Zeit) wurden mithilfe einer speziellen Software (Patchmaster™, HEKA Elektronik) in Form von Koordinaten gespeichert und in eine Excel-Arbeitsmappe importiert. Mithilfe dieser Arbeitsmappe wurde das Integral zwischen 100 und 500 ms berechnet. Der zum Zeitpunkt 1000 ms noch registrierte Natriumstrom wurde als Leckstrom betrachtet und von dem Gesamtstrom subtrahiert. Zudem wurde das Ergebnis auf die Membrankapazität (pF) normalisiert um Schwankungen der Zellgröße auszugleichen.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Daten wurde die Software Graphpad Prism verwendet. Als statistische Tests wurden je nach Anzahl und Zusammenhang der zu vergleichenden Gruppen der Student t-Test und die einfaktorische und mehrfaktorische Varianzanalyse (One-Way-/Two-Way-ANOVA) verwendet. Mittels Bonferroni- und Student-Newman-Keul's Methode wurden diese Daten auf signifikante Unterschiede von Paaren innerhalb einer Gruppe untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt. Zur Darstellung der Dosis-Wirkungskurve wurde in Annäherung an die Boltzmann-Funktion eine Sigmoidfunktion verwendet, bei der unter Angabe der maximalen und minimalen Wirkung der Wendepunkt der S-förmigen Kurve (EC50) berechnet werden konnte. Dieser entspricht in diesem Fall der Dosis, bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht wurde.

3 Ergebnisse

In der HCM spielt eine Dysregulation der Natriumhomöostase möglicherweise eine Rolle (44). Um dies zu überprüfen wurde in Herzmuskelzellen eines KI-Mausmodells der HCM mit einer Mutation im Myosin-bindenden Protein C3 (MyBPC-3) der Späte Natriumstrom auf Abweichungen zum Wildtyp untersucht.

Zuerst wurde mittels Analyse des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht die Hypertrophie des gesamten Herzens im KI-Mausmodell sowie anhand der Membrankapazität die Größe der einzelnen Zellen im Vergleich zu Wildtypkardiomyozyten ermittelt. Eine deutliche Vergrößerung des Herzmuskels im Vergleich zum Körpergewicht sowie eine Zellhypertrophie (gemessen als Membrankapazität) konnten für das *mybpc3* Knock-In Mausmodell bestätigt werden. Daraufhin wurde der Späte Natriumstrom mittels Whole-Cell-Patch-Clamp Technik für beide Gruppen ermittelt und verglichen. Der gemessene Strom im WT zeigte eine adäquate Antwort auf Vorbehandlung mit spezifischen Stimulatoren/Inhibitoren (ATX-II/ Ranolazin) des Späten Natriumstroms und konnte somit als Später Natriumstrom verifiziert werden. Im Vergleich zu WT-Herzmuskelzellen war der Späte Natriumstrom in Kardiomyozyten des *mybpc3* Knock-In Mausmodells signifikant erniedrigt. Darüberhinaus wurde die β -adrenerge Regulation des Späten Natriumstroms durch vorherige Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Isoproterenol zwischen KI-Mausmodell und WT verglichen. Im *mybpc3* Knock-In Mausmodell zeigten sich im Vergleich zum WT keine Abweichungen in der Dosis-Wirkungskurve. Es kann daher von einer unveränderten β -adrenergen Regulation des Späten Natriumstroms in dem Mausmodell der HCM ausgegangen werden.

3.1 Phänotyp des Mausmodells

Die Mäuse des *mybpc3* KI-Mausmodells ließen sich hinsichtlich äußerlicher Erscheinungsform und Verhalten nicht von den WT-Mäusen unterscheiden. Der Herzmuskel war in KI-Mäusen in den meisten Fällen sichtbar verdickt. Die Kardiomyozyten der KI-Mäuse zeigten sich unter dem Mikroskop nicht wesentlich verlängert aber in der Breite verdickt. Oft stellten sich leichte Unregelmäßigkeiten an der Zellmembran dar. Die typische Querstreifung war in beiden Zellgruppen zu erkennen.

Tabelle 6 - **Merkmale der untersuchten Gruppe.** Dargestellt sind Anzahl (N) der untersuchten Mäuse mit jeweiligem Genotyp (Wildtyp/*mybpc3* KI-Mausmodell). Herzgewicht, die Relation von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW) sowie das mittlere Alter der Mäuse sind im KI-Mausmodell signifikant erhöht * $p < 0,05$ (t-Test).

Genotyp	N	HW (mg)	BW (g)	HW/BW (mg/g)	Alter (Wochen)	m/w
Wildtyp	33	189,9 ± 4,93	26,1 ± 0,8	7,36 ± 0,15	17,64 ± 1,03	23/10
<i>mybpc3</i>	32	299,3 ± 8,87 *	24,57 ± 0,66	12,27 ± 0,31 *	14,91 ± 0,68 *	22/10

3.1.1 Hypertrophie des Herzmuskels: Auswertung der Relation Herzgewicht zu Körpergewicht

Zur Darstellung der Herzhypertrophie im *mybpc3*-KI Mausmodell wurde im Verlauf der Kardiomyozytenisolation das Mäuseherz präpariert und das Gewicht (mg) im Vergleich zum Körpergewicht (g) gemessen. Durch die Verwendung des Quotienten wurden individuelle Wachstumsschwankungen ausgeglichen. Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht war in *mybpc3*-KI Mausmodell mit $12,27 \pm 0,31$ mg/g im Vergleich zur Wildtypmaus mit $7,36 \pm 0,15$ mg/g signifikant erhöht.

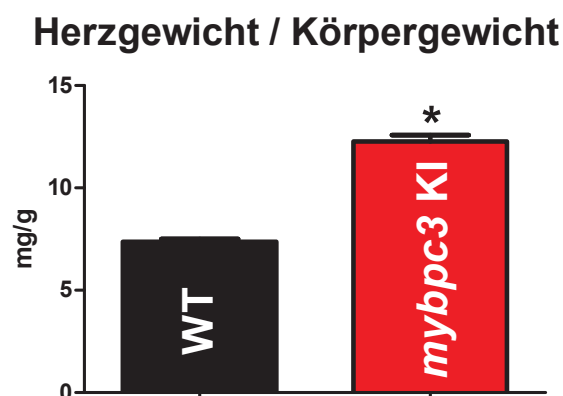


Abbildung 13

Dargestellt ist die Relation von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW) in *mybpc3*-KI Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Das Verhältnis HW/BW war in *mybpc3*-KI-Mäusen signifikant erhöht * $p < 0,05$ (t-Test).

3.1.2 Zellgröße: Auswertung der Membrankapazität der Kardiomyozyten *mybpc3*-KI versus Wildtyp

Zur Abschätzung der Größe der einzelnen Kardiomyozyten wurde im Zuge der Patch-Clamp-Messungen die Membrankapazität bestimmt. Diese beschreibt die Fähigkeit von Membranen, Ladungen zu speichern. Da bei hypertrophen Zellen die Fläche an ummantelnder Zellmembran zunimmt ist die Membrankapazität proportional zur Membranoberfläche. Die Membrankapazität zeigte sich im *mybpc3* Mausmodell mit $321,6 \pm 7,93$ pF im Vergleich zur Wildtypmaus mit $228,9 \pm 5,18$ pF signifikant erhöht.

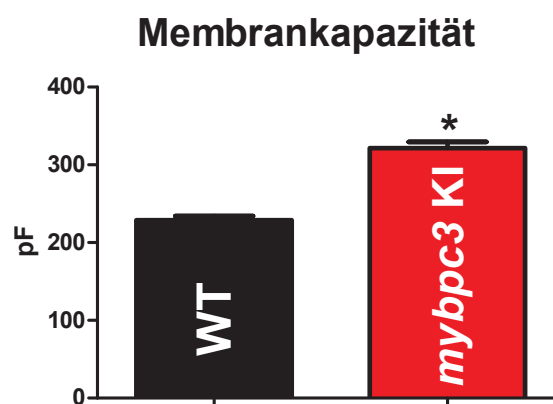


Abbildung 14

Darstellung der durchschnittlichen Membrankapazitäten aller zu den Patch-Clamp-Experimenten verwendeten Kardiomyozyten des *mybpc3*-KI Mausmodells und der Wildtypmäuse. Die Membrankapazität ist bei den *mybpc3*-KI Kardiomyozyten signifikant erhöht * $p < 0,05$ (t-Test).

3.2 Der Späte Natriumstrom in WT Kardiomyozyten lässt sich durch ATX-II stimulieren

In Herzmuskelzellen der WT Mäuse wurde der Späte Natriumstrom in Ruptured Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten gemessen. Der Strom entspricht der Fläche unter der gemessenen Stromkurve im Intervall 100-500ms in Relation zur Membrankapazität der Zelle. Nach Vorbehandlung mit einem spezifischen Stimulator des Späten Natriumstroms (ATX-II) konnte der Späte Natriumstrom signifikant gesteigert werden.

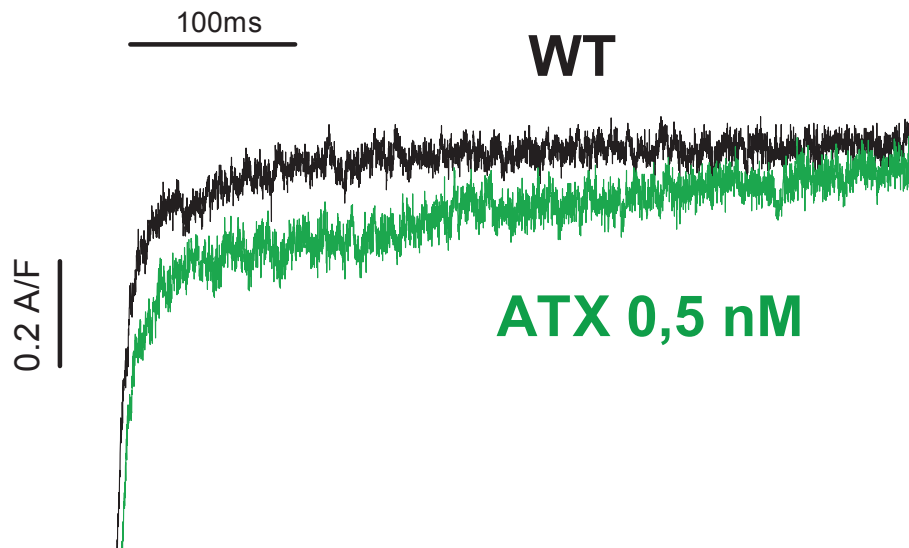


Abbildung 15

Originalregistrierung des Späten Natriumstroms in Herzmuskelzellen der WT Mäuse ohne pharmakologische Vorbehandlung (WT) und nach Inkubation mit ATX 0,5 nM. Es handelt sich um Einzelmessungen und nicht um die Mittelwerte der Gruppen. Die x-Achse zeigt den Zeitverlauf in Millisekunden, die y-Achse die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

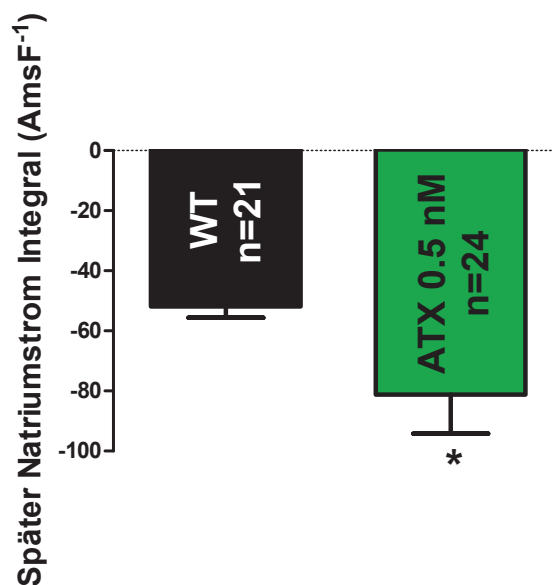


Abbildung 16

Mittelwerte des Späten Natriumstroms in WT-Kardiomyozyten ohne pharmakologische Intervention und nach Inkubation mit ATX-II 0,5 nM. Der Späte Natriumstrom ist nach Vorbehandlung mit ATX-II 0,5 nM im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten signifikant erhöht * $p < 0,05$ (t-Test).

3.3 Veränderungen des Späten Natriumstroms im *mybpc3*-KI Mausmodells

Mittels der Whole-Cell-Patch-Clamp Experimente wurde der Späte Natriumstrom in den Kardiomyozyten des Mausmodells und der Wildtyp-Kardiomyozyten im Intervall von 100-500 ms gemessen und auf die jeweilige Membrankapazität der Zelle genormt. Der Späte Natriumstrom zeigte sich im *mybpc3*-KI Mausmodell signifikant erniedrigt. Durch 15-minütige Vorbehandlung mit einem Inhibitor des Späten Natriumstroms (Ranolazin) in beiden Gruppen konnte der Späte Natriumstrom signifikant vermindert werden und der vorliegende Strom als Später Natriumstrom verifiziert werden.

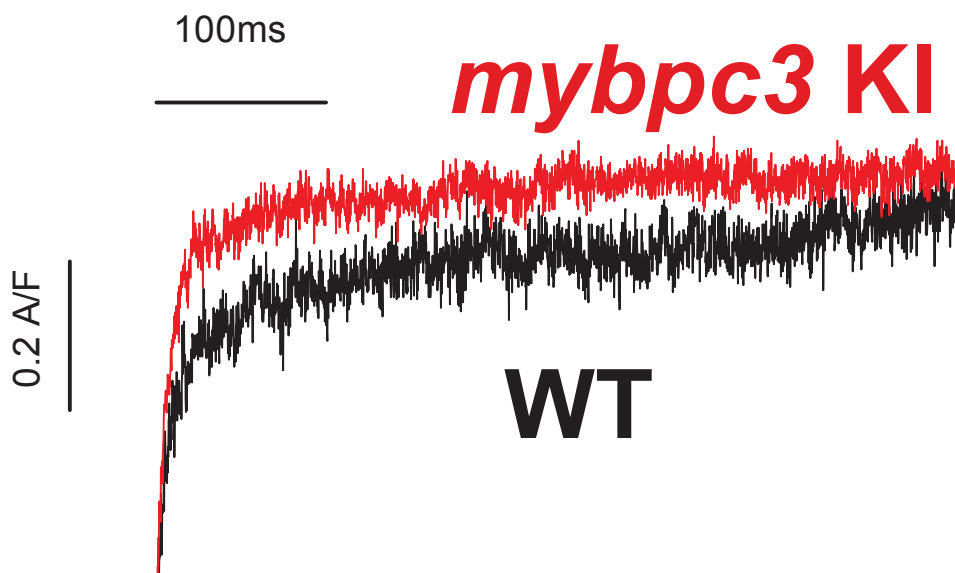


Abbildung 17

Originalregistrierung des Späten Natriumstroms in Kardiomyozyten des KI Mausmodells sowie Wildtypkardiomyozyten. Es handelt sich um Einzelmessungen und nicht um die Mittelwerte der Gruppen. Die x-Achse zeigt den Zeitverlauf in Millisekunden, die y-Achse die Stromstärke in Ampere auf die Membrankapazität in Farad genormt.

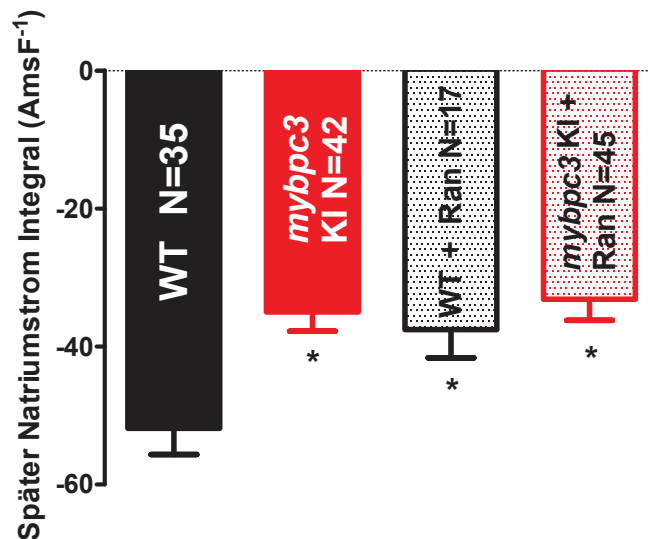


Abbildung 18

Der Späte Natriumstrom in Kardiomyozyten im Intervall 100-500ms und auf die Membrankapazität genormt. Der Späte Natriumstrom in KI-Mäusen mit und ohne Vorbehandlung mit Ranolazin ist im Vergleich zum Späten Natriumstrom in WT Zellen signifikant vermindert (* $p < 0,05$ *mybpc3* + Ran vs. WT). Vorherige Inkubation mit Ranolazin zeigte in WT-Mäusen einen signifikanten Abfall des Späten Natriumstroms (* $p < 0,05$ WT + Ran vs. WT). In *mybpc3*-KI war der Effekt von Ranolazin auf den ohnehin sehr niedrigen Späten Natriumstrom deutlich geringer ausgeprägt. (* $p < 0,05$ Ein-Weg-ANOVA, Student Newman-Keul's).

3.4 Die Steigerung des Späten Natriumstroms unter β -adrenerger Stimulation ist im *mybpc3*-KI Mausmodell unverändert

Die Herzmuskelzellen des *mybpc3*-KI Mausmodells zeigten in vorherigen Experimenten eine gesteigerte inotrope Reaktion auf Stimulation mit Isoproterenol (35). Außerdem kam es bei gleichzeitiger Erhöhung der Arbeitslast zu einem drastischen Abfall der diastolischen Sarkomerlänge. Nach Behandlung mit Ranolazin, dem Inhibitor des Späten Natriumstroms, zeigten die Herzmuskelzellen eine größere Toleranz gegenüber erhöhter Arbeitslast (35). Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Späte Natriumstrom unter β -adrenerge Stimulation untersucht. Die Zellen beider Gruppen wurden vor den Messungen mit Isoproterenolkonzentrationen von 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M für 15 min. inkubiert. Zwei Kontrollgruppen mit niedriger und hoher Isoproterenolkonzentration (10^{-12} , 10^{-5} M) wurden zusätzlich mit Ranolazin vorbehandelt, um die Inhibition des Späten Natriumstroms darstellen zu können.

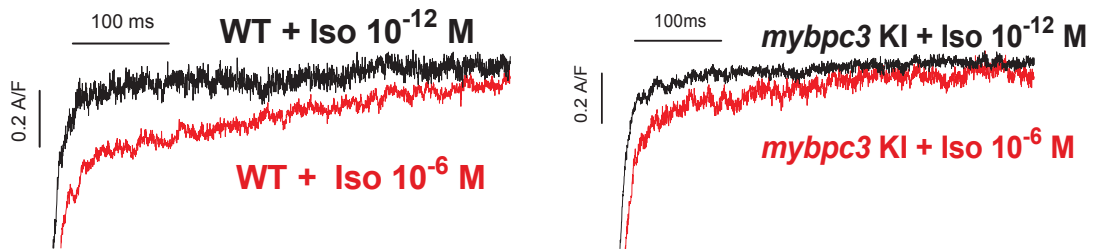


Abbildung 19

Originalregistrierungen des Späten Natriumstroms in Kardiomyozyten der Wildtypmäuse (WT) und *mybpc3*-KI Mäuse nach Inkubation mit niedriger (10^{-12} M) und hoher (10^{-6} M) Isoproterenolkonzentration. Dargestellt sind beispielhafte Einzelmessungen und keine Mittelwerte der Gruppen.

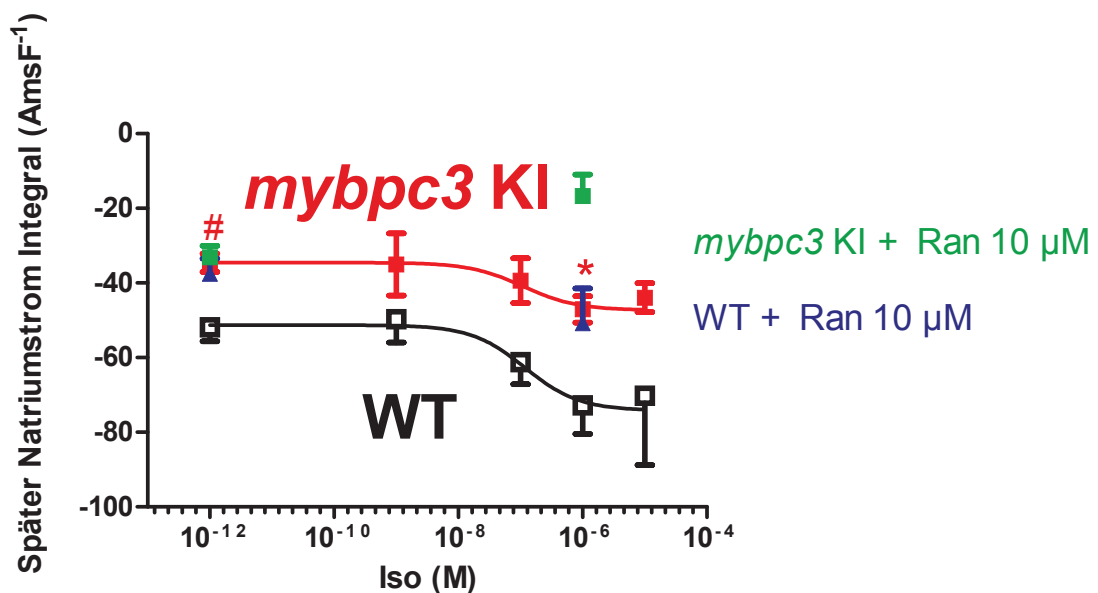


Abbildung 20

Dargestellt ist der Anstieg des Späten Natriumstroms in Abhängigkeit zur Isoproterenolkonzentration. Messungen wurden bei Konzentrationen von 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M Isoproterenol in beiden Gruppen durchgeführt. Zudem sind zwei Kontrollgruppen bei 10^{-12} und 10^{-6} M Isoproterenol nach Inkubation mit Ranolazin $10 \mu\text{M}$ dargestellt. Der Späte Natriumstrom ist bei einer Konzentration von 10^{-6} M Isoproterenol signifikant niedriger in Kardiomyozyten des KI Mausmodells als in Wildtypmäusen ($*p < 0,05$ *mybpc3* + Iso 10^{-6} vs. WT + Iso 10^{-6}). Zu beachten ist, dass der Ausgangsstrom des KI-Mausmodells bei einer Isoproterenolkonzentration von 10^{-12} M ebenfalls signifikant niedriger ist als in Wildtypkardiomyozyten ($\# p < 0,05$ *mybpc3* + Iso 10^{-12} vs. WT + Iso 10^{-12}). (Zwei-Wege-ANOVA, Bonferroni)

Tabelle 7 - **Mittelwerte des Späten Natriumstroms (I_{NaP})** in Abhängigkeit von der Isoproterenolkonzentration. Der Natriumstrom im *mybpc3*-KI Mausmodell ist bei 10^{-12} M und 10^{-6} M Isoproterenol im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant vermindert * $p < 0,05$ (Zwei-Wege-ANOVA, Bonferroni).

Iso (M)	10^{-12}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	$10^{-12}+$	$10^{-6}+$
						10 μ M Ran	10 μ M Ran
WT	-51,86 $\pm 3,78$	-49,67 $\pm 6,27$	-61,24 $\pm 5,92$	-72,76 $\pm 7,66$	-70,22 $\pm 18,59$	-37,56 $\pm 4,09$	-62,52 $\pm 9,86$
<i>mybpc3</i>	-34,58 $\pm 2,44$	-35,06 $\pm 8,33$	-39,37 $\pm 6,02$	-47,07 $\pm 3,57$	-43,93 $\pm 3,88$	-33,13 $\pm 3,05$	-16,67 $\pm 5,74$

*

*

Dosis-Wirkungskurve:

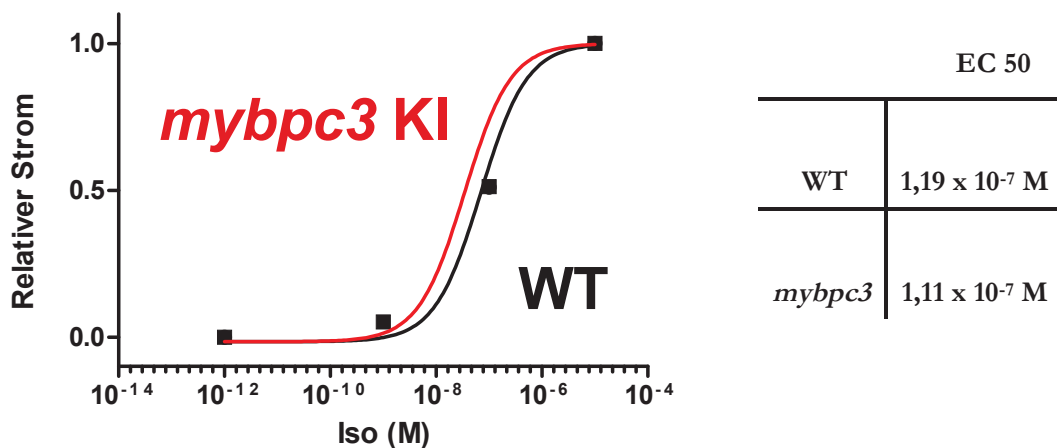


Abbildung 21

Absolute Mittelwerte für den Späten Natriumstrom unter ansteigender Isoproterenolkonzentrationen wurden „normalisiert“. Auf der x-Achse ist die Antwort auf die β -adrenerge Stimulation als relativer Strom von 0-1 eingetragen, die y-Achse zeigt die verschiedenen Isoproterenolkonzentrationen. Die Antwort auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Isoproterenol unterscheiden sich in den beiden Gruppen nicht. Die EC50 Werte beider Gruppen beschreiben die Isoproterenolkonzentration bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht wurde.

3.5 Synopsis von Membrankapazität, Serienwiderstand (R-Series) und Liquid Junction.

Tabelle 8 - Angegeben sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen mit Standardfehler (SEM).

Genotyp	Pharmakologische Intervention	N Messungen	N Maus	Membrankapazität (pF)	R-Series (M Ω)	Liquid Junction (mV)
WT	Keine	35	14	228,88 \pm 10,68	3 \pm 0,19	4,67 \pm 1,67
	10 μ M Ranolazin	17	10	249,58 \pm 20,4	3,38 \pm 0,3	5,61 \pm 1,72
	Iso 10 ⁻⁹ M	10	2	245,6 \pm 24,56	4,19 \pm 0,22	5,92 \pm 2,41
	Iso 10 ⁻⁷ M	24	10	236,71 \pm 9,22	3,21 \pm 0,17	7,11 \pm 1,35
	Iso 10 ⁻⁶ M	34	12	243,35 \pm 12,06	3,52 \pm 0,18	6,45 \pm 1,18
	Iso 10 ⁻⁵ M	7	2	226 \pm 21,2	3,06 \pm 0,31	13,47 \pm 1,3
	Iso 10 ⁻⁶ M+ 10 μ M Ranolazin	4	2	241,75 \pm 43,08	3,7 \pm 0,47	5,61 \pm 4,17
<i>mybpc3</i>	Keine	42	19	368,76 \pm 20,58	3,09 \pm 0,16	1,44 \pm 1,36
	10 μ M Ranolazin	45	23	341,98 \pm 14,1	3,1 \pm 0,19	3,46 \pm 1,34
	Iso 10 ⁻⁹ M	4	2	268,75 \pm 58,7	3,57 \pm 0,32	2,1 \pm 3,93
	Iso 10 ⁻⁷ M	15	9	315,8 \pm 23,43	4,12 \pm 0,38	2,11 \pm 2
	Iso 10 ⁻⁶ M	54	14	278,22 \pm 14,78	2,9 \pm 0,13	7,98 \pm 1
	Iso 10 ⁻⁵ M	13	3	298,77 \pm 23,42	3,64 \pm 0,28	5,5 \pm 1,11
	Iso 10 ⁻⁶ M+ 10 μ M Ranolazin	5	2	319,6 \pm 23,61	3,18 \pm 0,2	4,9 \pm 1,59

Korrelationsanalysen

Die Korrelationsanalysen dienen dazu, möglich Störfaktoren zu identifizieren. Aufgrund signifikanter Altersunterschiede zwischen den miteinander verglichenen Gruppen der WT und KI Mäusen wurde das Alter der Mäuse auf eine mögliche Korrelation mit dem Späten Natriumstrom untersucht.

3.5.1 Korrelation Alter und Später Natriumstrom

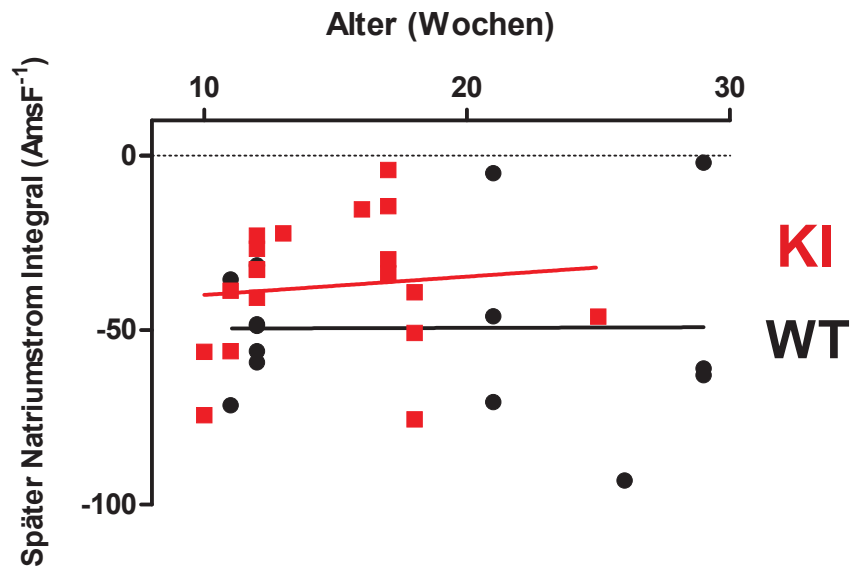


Abbildung 22

Dargestellt sind die Mittelwerte des Späten Natriumstroms jeweils einer Maus. Es zeigen sich weder in den WT Mäusen noch im *mybp3*-KI Mausmodell signifikante Unterschiede des Späten Natriumstroms in Abhängigkeit vom Alter der Maus.

3.5.2 Korrelation Alter und Stromantwort auf Stimulation mit Isoproterenol

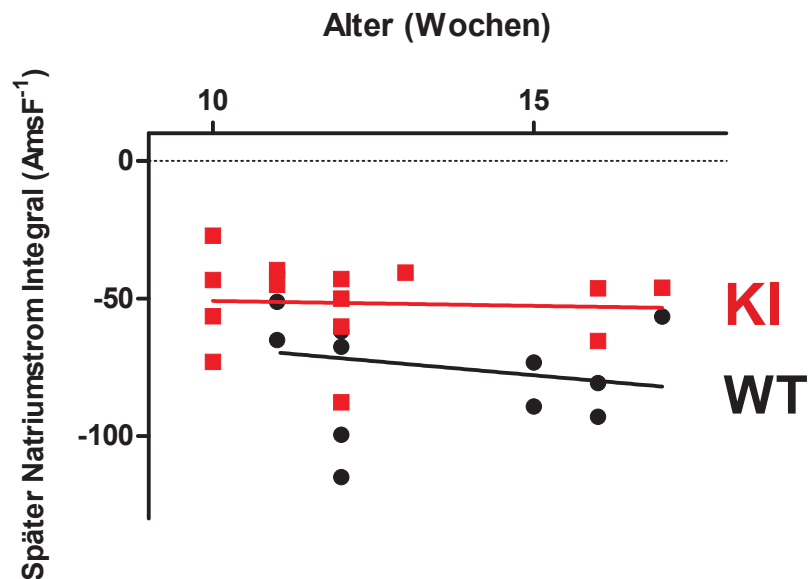


Abbildung 23

Mittelwerte der gemessenen Späten Natriumströme einer Maus nach mindestens 15-minütiger Vorbehandlung mit Isoproterenol 10^{-6} M. Es zeigt sich in beiden Gruppen keine Korrelation zwischen Alter und Stromantwort auf Stimulation mit Isoproterenol.

4 Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass der Späte Natriumstrom in Kardiomyozyten entgegen vorheriger Annahmen in dem *mybp3*-KI Modell nicht erhöht, sondern erniedrigt ist. Durch vorherige Inkubation mit dem Inhibitor des Späten Natriumstroms, Ranolazin, konnte der Späte Natriumstrom in Herzmuskelzellen der Wildtypmäuse signifikant gesenkt werden. Im *mybp3*-KI Modell war der Effekt bei ohnehin sehr geringem Späten Natriumstrom deutlich schwächer ausgeprägt. Unter β -adrenerger Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von Isoproterenol zeigte sich sowohl in Kardiomyozyten des Wildtyps als auch der *mybp3*-KI Mäuse ein signifikanter Anstieg des Späten Natriumstroms. Dieser war zwar hinsichtlich der absoluten Werte im *mybp3*-KI Mausmodell im Vergleich zum WT vermindert, relativ zum Ausgangsstrom zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die β -adrenerge Regulation des Mausmodells zeigt sich daher unbeeinträchtigt. Die Diskrepanz, insbesondere zu der Studie von Coppini et al. (44), bleibt zu klären. Eine mögliche Erklärung wäre eine sekundäre Erhöhung des Späten Natriumstroms durch HCM-typische Veränderungen (z.B. dynamische Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes), die eine erhebliche Einschränkung für die therapeutische Senkung des Späten Natriumstroms mit Ranolazin bedeuten würde.

4.1 Der Späte Natriumstrom lässt sich durch ATX-II stimulieren

Zur Darstellung des Späten Natriumstroms wurden Herzmuskelzellen von Wildtypmäusen mit einem spezifischen Stimulator (ATX-II) des Späten Natriumstroms für mindestens 15 Minuten inkubiert und auf eine typische Antwort geprüft. ATX-II gehört zu den hochspezifischen Stimulatoren des Späten Natriumstrom und kann durch eine Hemmung der Schnellen Inaktivierung der Spannungsabhängigen Natriumkanäle den Späten Natriumstrom erhöhen (198,250,252). In WT Kardiomyozyten zeigte der gemessene Strom einen signifikanten Anstieg unter ATX-II. Bei dem gemessenen Strom in den WT Kardiomyozyten handelt es sich daher eindeutig um den Späten Natriumstrom, der sich adäquat durch einen etablierten Stimulator regulieren lässt.

4.2 Der Späte Natriumstrom ist im *mybpc3*-KI Mausmodell reduziert

Coppini et al. konnten 2013 zeigen, dass der Späte Natriumstrom sowie die Aktivität der CaMKII in Herzmuskelzellen, die von HCM-Patienten gewonnen wurde, signifikant erhöht war (44). Die Ergebnisse aus den Experimenten an dem *mybpc3*-KI Mausmodell der HCM hingegen zeigen, dass der Späte Natriumstrom im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht erhöht, sondern signifikant erniedrigt ist. Auf den ersten Blick im direkten Widerspruch, fallen bei genauerem Vergleich der untersuchten Zellgruppen deutliche Unterschiede auf. Die 20 untersuchten HCM-Patienten der italienischen Studie trugen unterschiedliche Mutationen (7/20 mit Mutation im Myosin-bindenden Protein) und wiesen im Mittel einen Krankheitsverlauf zwischen Diagnose und chirurgischer Intervention von 9 Jahren auf. Zudem zeigten alle Patienten eine Muskelhypertrophie im Bereich des oberen Septums mit einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts (Druckgradient > 30mmHg). Bei allen Patienten fanden sich Zeichen der Herzinsuffizienz (50% NYHA II, 50% NYHA III) und in einigen Fällen zusätzliche klinische Symptome wie Angina pectoris (27%), Synkopen (53%) oder vorbeschriebene Herzrhythmusstörungen (Vorhofflimmern (27%), Ventrikuläre Tachykardie (50%)). Zu bedenken ist, dass eine ausgeprägte klinische Symptomatik und Einschränkung der Lebensqualität essentielle Kriterien für die Indikationsstellung einer chirurgischen Intervention sind. Im Vergleich zeigten die in der Arbeit verwendeten Mäuse des *mybpc3*-KI Mausmodells eine deutliche Herzhypertrophie und Zellvergrößerung (siehe Kapitel 2.1), allerdings keine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn oder Zeichen der Herzinsuffizienz (22). Interessanterweise ist aus der Herzinsuffizienzforschung bereits bekannt, dass eine erhöhte Nachlast zu einer CaMKII-abhängigen Erhöhung des Späten Natriumstroms führen kann, die unter Ranolazin auf Kontrollniveau zurückgeführt werden konnte (180,211,257). Eine linksventrikuläre Obstruktion ist eine Form der erhöhten Nachlast und kann daher zu einer Hochregulation des Späten Natriumstroms führen. Zudem kommt es bei langjährigem Krankheitsverlauf durch das verdickte Myokard und pathologisch veränderte Koronargefäße häufig zu ischämischen Ereignissen, die auch in Form von Miniinfarkten das Myokard schädigen können und zum Remodeling des Herzmuskels führen können. Auch nach ischämischen Ereignissen des Myokards zeigt sich eine Erhöhung des Späten Natriumstroms (258–260), sodass es besonders wichtig ist, zwischen primären Veränderungen als direkte Folge der Mutation und sekundären Veränderungen, die sich aufgrund von langjähriger Nachlasterrhöhung oder ischämischen Ereignissen entwickeln, zu unterscheiden. Es ist daher zu vermuten, dass Mutationen im MYBPC-Gen nicht via Erhöhung des Späten Natriumstroms zur phänotypischen Ausprägung der HCM führen, sondern dass eine Dysregulation der Natriumströme erst

sekundär durch den Phänotyp entsteht. Patienten würden demnach nur im fortgeschrittenen Stadium von der medikamentösen Senkung des Späten Natriumstroms profitieren.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie eine Verminderung des Späten Natriumstroms zu erklären ist. Das Brugada-Syndrom führt durch verschiedene Mutationen im $\text{Na}_v1.5$ oder mit dem $\text{Na}_v1.5$ interagierenden Proteinen zu einer verminderten Funktion oder Funktionsverlust des $\text{Na}_v1.5$, der mit einer Verkürzung oder gar Fehlen der Plateauphase und kürzerer Dauer des Aktionspotentials einhergeht (206). Der Funktionsverlust des $\text{Na}_v1.5$ und der dadurch reduzierte Natriumeinstrom (Natriumspitzenstrom und Late I_{Na}) führen zu einem erhöhten Risiko für Arrhythmien (209). Das kardiale MyBP-C steht zwar nicht im direkten Zusammenhang mit Spannungsabhängigen Natriumkanälen, es kann aber möglicherweise indirekt über mit dem $\text{Na}_v1.5$ interagierende Proteine Einfluss auf die Funktion des Natriumkanals nehmen. Ankyrin-G und α -Aktinin 2 beispielsweise sind Bestandteile des Zytoskeletts und interagieren mit $\text{Na}_v1.5$ (147,158,159). Das Myosin-bindende Protein C stabilisiert die Anordnung von Aktin und Myosin. Abweichungen dieser Struktur durch Mutationen im MyBP-C könnten den Einfluss von Ankyrin-G und α -Aktinin-2 auf den $\text{Na}_v1.5$ stören. Mutationen im $\text{Na}_v1.5$, welche die Interaktion mit Ankyrin-G behindern, konnten bereits als Ursache des Brugada-Syndrom durch eine Verminderung des Natriumstroms nachgewiesen werden (147). Interessanterweise führen auch Mutationen in dem Gen ACTN2, das das α -Aktinin-2 kodiert, zu dem klinischen Bild der Hypertrophen Kardiomyopathie (262).

Dystrophin und Syntrophin bilden das Membranskelett der Herzmuskelzelle und interagieren ebenfalls mit dem $\text{Na}_v1.5$. (149). In einem Mausmodell ($\text{mdx}^{5\text{cv}}$) konnte durch genetische Veränderung des Dystrophins eine Reduktion des $\text{Na}_v1.5$ um 50% und ein um 30% verminderter Natriumstrom erzielt werden, der sich durch Inhibition der Proteasomen wieder normalisierte (188,189). Die Ubiquitinierung des $\text{Na}_v1.5$ findet über die Nedd4-2 statt (186). Rougier et al. (263) konnten die Nedd4-2-abhängige Herabregulation der Dichte an Spannungsabhängigen Natriumkanälen zeigen. Dies könnte auch hinsichtlich der HCM relevant sein, in der ein vom Ubiquitin-Proteasom-System abhängiger Abbau des cMyBP-C in jungen Mäusen des *mybpc3*-KI Mausmodells nachgewiesen werden konnte (264). Auch in dem *mybpc3*-KI Mausmodell ist das Myosin bindende Protein C – vermutlich durch einen gesteigerten Abbau des Proteins – in seiner Gesamtmenge um 20-90% gegenüber WT-Mäusen reduziert (22,24,26,109).

Zusätzlich könnte die posttranslationale Modifikation des $\text{Na}_v1.5$ durch PKC-abhängige Phosphorylierung gestört sein. Mutationen im Gen GPD1L, welches für das Glycerol 3-

phosphat-dehydrogenase 1-like protein kodiert, wurden als mögliche Ursache des Brugada-Syndroms (265,266) und des Sudden Infant Death Syndroms (SIDS) (267) beschrieben. Sie führen vermutlich über eine vermehrte PKC-abhängige Phosphorylierung des $\text{Na}_v1.5$ zu einer Reduktion des Natriumstroms I_{Na} (268). Allerdings ist hier anzumerken, dass eine Phosphorylierung durch die PKC gleichzeitig zu einer Verlangsamung der Schnellen Inaktivierung des Kanals und somit zu einer Erhöhung des Natriumstroms führen kann (183,184).

Möglich wäre ebenfalls eine Dislokation der $\text{Nav}1.5$ durch fehlgerichtete Transportvorgänge in der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Transportwege des $\text{Nav}1.5$ in Abhängigkeit vom Glykosylierungsmuster unterscheiden (143). Durch Glykosylierung an der $\beta 1$ -Untereinheit des $\text{Na}_v1.5$ kann beispielsweise die schnelle Inaktivierung des Kanals verstärkt werden und zu einem verminderten Späten Natriumstrom führen (190). Inwieweit eine abweichende Posttranslationale Modifikation oder gestörte Einbau- und Abbauprozess des Spannungsabhängigen Natriumkanals in der HCM eine Rolle spielen ist derzeit noch nicht geklärt.

Ein isoliert verminderter Late I_{Na} erhält die niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration und sorgt über den großen Gradienten für Natrium über die Zellmembran für eine effiziente Elimination des Kalziums über den NCX. Der schnelle Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration ermöglicht die Erschlaffung des kontraktiven Apparates und eine adäquate Füllung des Herzens in der Diastole. Möglich wäre daher eine kompensatorische Herabregulation des Späten Natriumstroms zur Beschleunigung des NCX. Für die meisten Mutationen, u.a. für die Mutationen im Myosin bindenden Protein C konnte eine erhöhte Kalziumsensibilität der Myofilamente nachgewiesen werden (28,33). Wenn die Myofilamente sensibler auf Kalzium reagieren, muss die intrazelluläre Kalziumkonzentration in der Diastole stärker abfallen um eine Relaxation zu ermöglichen. Tatsächlich zeigten sowohl heterozygote als auch homozygote Mäuse des *mybpc3*-KI Mausmodells einen schnelleren Abfall der Kalziumkonzentration in der Diastole, als WT-Mäuse (28).

Darüber hinaus fördert die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an das COOH-Ende der α -Untereinheit des Natriumkanals die schnelle und intermediäre Inaktivierung des Kanals (171). Erhöhte diastolische Kalziumkonzentrationen könnten daher zu einer Reduktion des Natriumstromes führen. Der erniedrigte Späte Natriumstrom in dem *mybpc3*-KI Mausmodell lässt sich durch diesen Feedback-Mechanismus allerdings nicht erklären, da sich in diesem Modell keine im Vergleich zum WT veränderten diastolischen Kalziumkonzentrationen zeigten (35).

Es bedarf weiterführender Untersuchungen, um die Ursachen des reduzierten Späten Natriumstroms in dem *mybpc3*-KI Mausmodell zu klären. Zudem bleibt abzuwarten, ob sich der Befund in weiteren Modellen der HCM bestätigt oder eine Eigenart dieses Mausmodells bleibt. Hiervon hängt ab, ob eine Senkung des Späten Natriumstroms durch Ranolazin eine therapeutische Relevanz haben könnte. Ranolazin erzielt vielfältige therapeutische Effekte über die spezifische Inhibition von Late I_{Na} (202,248). Es konnte eine Verbesserung der diastolischen Dysfunktion und der Häufigkeit von Arrhythmien durch Verhinderung einer Natrium- und Kalziumüberladung der Zelle und Aufhebung der ROS-abhängigen Verlängerung des Aktionspotentials gezeigt werden (168,199,246,269,270). Bei ohnehin erniedrigtem Late I_{Na} wäre dieser therapeutische Angriffspunkt obsolet. Bei sekundärer Erhöhung des Late I_{Na} aufgrund einer obstruktiven Nachlasterrhöhungen oder Herzinsuffizienz, die möglicherweise den erhöhten Late I_{Na} in der Studie von Coppini et al. erklärt (44), würden Patienten der HCM nur im Spätstadium oder mit obstruktiver Komponente von einer therapeutischen Senkung des Späten Natriumstroms profitieren.

4.3 Die Rolle des Späten Natriumstroms hinsichtlich der gesteigerten β -adrenergen Antwort in *mybpc3*-KI Mäusen

Flenner et al. (35) konnte in vorherigen Einzelzellstudien an dem verwendeten *mybpc3*-KI Mausmodell eine gesteigerte inotrope Reaktion der Herzmuskelzellen auf Stimulation mit Isoproterenol darstellen. Die ohnehin verkürzte diastolische Sarkomerlänge im KI-Mausmodell verstärkte sich zudem nach Inkubation mit Isoproterenol bei erhöhter Arbeitsbelastung erheblich und es kam zu einem gehäuften Auftreten von Arrhythmien. Die Abweichungen vom Wildtyp konnten nach Behandlung mit Ranolazin auf Kontrollniveau zurückgeführt werden (35). Neben vielen anderen Ionenkanälen und sarkomeren Proteinen (siehe Kapitel 1.6) unterliegt der Späte Natriumstrom der β -adrenergen Stimulation und kann durch CaMKII-abhängige Phosphorylierung deutlich gesteigert werden. Aufgrund des reversiblen Effekts des Inhibitors des Späten Natriumstroms Ranolazin wurde eine Dysregulation des Späten Natriumstroms mit konsekutiver diastolischer Kalziumüberladung der Zelle vermutet.

Diese Hypothese konnten in den Patchclamp Experimenten nicht bestätigt werden. Obwohl sich der Späte Natriumstrom in seinen absoluten Werten vor und nach ISO-Stimulation von dem der WT Mäuse unterschied, zeigte sich nach der Normalisierung der Werte kein Unterschied in der β -adrenergen Antwort des Späten Natriumstroms in Relation zum

Ausgangsstrom (EC50 WT 1.19×10^{-7} M; EC50 *mybpc3*-KI 1.11×10^{-7} M). Es konnte daher gezeigt werden, dass der Späte Natriumstrom an der β -adrenergen Fehlregulation des *mybpc3*-KI Modells nicht beteiligt ist. Flenner et al. (35) mutmaßen, dass β -antagonistische Eigenschaften von Ranolazin dem drastischen Abfall der diastolischen Sarkomerlänge unter ISO-Stimulation und erhöhter Arbeitsbelastung entgegenwirken. Tatsächlich konnte eine Affinität von Ranolazin zum β_1 -Rezeptor und die Aufhebung der PKA-abhängigen Phosphorylierung von cTnI und Phospholamban sowie eine Rechtsverschiebung der inotropen Antwort auf ISO-Stimulation unter Ranolazin gezeigt werden (35). Es gibt allerdings auch widersprüchliche Daten, die keinen β -antagonistischen Effekt von Ranolazin zeigen konnten (203,271). Zu bedenken ist außerdem, dass die sympathische Aktivierung ebenfalls einen lusitropen Effekt auf die Herzmuskelzellen bewirkt, sodass ein rein kompetitiver Antagonismus am β_1 -Rezeptor keine verbesserte Relaxation in der Diastole erklären würde. Zudem reichte die alleinige Stimulation mit Isoproterenol nicht aus, um den erheblichen Abfall der diastolischen Sarkomerlänge herbeizuführen. Nur in Kombination mit einer erhöhten Stimulationsfrequenz, d.h. einer erhöhten Arbeitsbelastung, zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der diastolischen Sarkomerlänge (35). Der positive Effekt auf die verkürzte diastolische Sarkomerlänge in den KI Mäusen ist daher möglicherweise anderen Eigenschaften des Pharmakons zuzuschreiben. Lovelock et al. (272) konnten in einem (DOCA)-salt Mausmodell der salzinduzierten Hypertension mit diastolischer Dysfunktion einen Late I_{Na} -unabhängigen, direkten Effekt von Ranolazin auf die Myofilamente zeigen. In dem (DOCA)-salt Mausmodell konnte ein erhöhtes Aufkommen von ROS nachgewiesen werden, die mit einer diastolischen Dysfunktion assoziiert war (273). Dies führte überraschenderweise nicht zu einer Erhöhung des Späten Natriumstroms und der diastolischen Kalziumkonzentration. Stattdessen zeigte sich eine veränderte Aktin-Myosin Interaktion und eine verkürzte diastolische Sarkomerlänge, für die eine oxidative Modifikation des cMyBP-C verantwortlich gemacht wird. In den Herzmuskelzellen dieses Mausmodells fanden sich erhöhte Spiegel von glutathionyliertem cMyBP-C (272). Sowohl in vivo als auch in Muskelstreifen und Einzelzellexperimenten konnte eine Verbesserung der diastolischen Dysfunktion durch Ranolazin nachgewiesen werden, die mit dem Ausmaß des oxidativ veränderten cMyBP-C korrelierte (272). Auch in dem verwendeten *mybpc3*-KI Mausmodell zeigten sich erhöhte Level von glutathionyliertem cMyBP-C und eine Abnahme der Kalziumsensibilität der Myofilamente nach Behandlung mit Ranolazin (35).

4.4 Einschränkungen des Mausmodells

Trotz 90%iger genetischer Syntenie zwischen Maus und Mensch (274) gibt es viele Merkmale des Mäuseherzens, die bei dem Vergleich zum menschlichen Herzen bedacht werden sollten. Zum einen schlägt das Mäuseherz mit einer Herzfrequenz von bis zu 800 Schlägen/min (275) deutlich schneller als das menschliche Herz. Das Aktionspotential ist erheblich kürzer in Herzmuskelzellen der Maus und zeichnet sich durch eine schnellere Repolarisation ohne prominente Plateauphase aus (276). Ursächlich dafür sind uneinheitlich ausgeprägte Ionenströme, insbesondere des Kalziumstroms I_{Ca} sowie repolarisierender Kaliumströme. Des Weiteren weisen die Kardiomyozyten der Maus teils unterschiedliche Isoformen der sarkomeren Proteine auf. So zeigt sich beispielsweise in menschlichen Herzmuskelzellen eine 90-95 %ige Expression des langsamen β -MHC (Myosin Heavy Chain), während sich in den Herzmuskelzellen der Maus hauptsächlich (94-100 %) das schnelle α -MHC finden lässt (277). Hinsichtlich des Myosin-bindenden Proteins C konnten speziesspezifische Unterschiede in dem prozentualen Anteil von Prolin und Alanin in dem Verbindungsbereich zwischen Domäne C0 und C1 am N-Termins des Myosin bindenden Proteins gezeigt werden (278). In Mäusen zeigte sich ein 28,2%iger Anteil an Prolin und Alanin während das menschliche Myosin bindenden Protein C einen Anteil von 51% in diesem Bereich aufweist (278). Darüber hinaus weist die Prolin/Alanin-reiche Region im humanen cMyBP-C eine höhere Bindungsaffinität zu Aktin auf und unterscheidet sich dadurch in seinem Einfluss auf den Querbrückenzyklus (94,279). Auch die Interaktion des cMyBP-C mit den verschiedenen Isoformen (z.B. α -MHC und β -MHC) weist Unterschiede zwischen Maus und Mensch auf (280).

Zudem lässt sich in Herzmuskelzellen der Maus eine unterschiedlich ausgeprägte post-translationale Modifikation der sarkomeren Proteine erkennen. In humanen Herzmuskelzellen zeigte sich ein geringerer Anteil an phosphoryliertem Troponin I (50-56%) als in Mäuseherzzellen (76%-80%) mit höherer Herzfrequenz (278–281). Vermutet wird eine ausgeprägte, frequenzabhängige Anpassung der Kalziumsensibilität der Myofilamente in Mäuseherzzellen (285,286). Darüber hinaus unterscheidet sich der Kalziumhaushalt in Mäuseherzen. Während in Mauskardiomyozyten ca. 90-92% des Kalziums in der Diastole über die SERCA in das SR zurückgepumpt werden (287,288), sind es nur 76% in humanen Kardiomyozyten (289). Die Elimination des Kalziums aus dem Zytosol über den NCX spielt damit in Mäuseherzzellen eine deutlich geringere Rolle als in humanen Zellen. Pathologische Veränderungen des Späten Natriumstroms sind daher möglicherweise in einem Mausmodell geringer ausgeprägt als in menschlichen Zellen.

Das untersuchte Mausmodell ist zudem homozygoter Genträger und weist die Punktmutation im Gen MYBPC auf beiden Allelen auf. Der Großteil der Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie ist aufgrund der autosomal-dominanten Vererbung allerdings heterozygoter Erbträger einer einzelnen Mutation. Weniger als 5% der Patienten zeigen 2 oder mehr Mutationen. Sie sind größtenteils mit einer ausgeprägteren linksventrikulären Hypertrophie und einem erhöhtem Risiko für lebensgefährliche Arrhythmien assoziiert (290–292). Für einige Mutationen wird allerdings auch ein autosomal-rezessiver Erbgang beschrieben (293,294,294,295). Homozygote Erben dieser Mutationen zeigen ebenfalls einen vergleichsweise schwereren Phänotyp (296). Ein heterozygotes Mausmodell der *mybpc3*-KI Reihe existiert, es weist allerdings keinen typischen Phänotyp mit linksventrikulärer Hypertrophie auf. Das homozygote *mybpc3*-KI Mausmodell zeigt zwar den erwünschten Phänotyp, kann aber nicht per se als „schwere Form“ mit zwei betroffenen Allelen im Gegensatz zur „leichten Form“ mit einem betroffenen Allel angesehen werden, da es sich in mRNA- und Proteinexpression deutlich von dem heterozygoten Mausmodell unterscheidet (siehe Kapitel 2.1). Derzeit wird noch untersucht, welches der beiden mRNA- und Proteinmuster am ehesten der Expression in humanen Zellen gleicht.

Insgesamt gestaltet sich die Evaluation eines Mausmodells der Hypertrophen Kardiomyopathie sehr problematisch. HCM-Patienten mit der gleichen Mutation zeigen sehr heterogene klinische Ausprägungen, sodass es schwierig ist, einen bestimmten Phänotyp als Sollwert für ein Mausmodell festzulegen.

4.5 Confounder

In der Korrelationsanalyse wurden die signifikanten Altersunterschiede der untersuchten Gruppen auf einen Zusammenhang zu dem Späten Natriumstrom überprüft. Es ergab sich allerdings keine Korrelation zu der Höhe des Späten Natriumstroms. Somit kann das Alter als Ursache des signifikant verminderten Späten Natriumstroms im *mybp3*-Mausmodell ausgeschlossen werden.

Zudem muss bedacht werden, dass möglicherweise die Art der Berechnung des Späten Natriumstroms das Bild verzerren könnte. Bei der Ruptured Whole-Cell-Patch-Clamp Technik wird der Gesamtstrom aller Natriumkanäle gemessen. Da dieser bei großen Zellen größer ist als bei kleinen wird der gemessene Strom durch die Membrankapazität als Maß der Zellgröße dividiert. Dabei wird von einer definierten Dichte an Spannungsabhängigen Natriumkanälen pro Membranfläche ausgegangen. Bisher ist es noch nicht geklärt, wie es im Detail zu der Vergrößerung der Zellen in der HCM kommt und ob es dabei zu einem proportionalen Anstieg der Anzahl an Spannungsabhängigen Natriumkanälen kommt oder ob die Zelle einfach anschwillt. Für ein besseres Verständnis der Kanalfunktion und Inaktivierung des Kanals wäre es daher sinnvoll, in weiterführenden Experimenten zusätzlich den Spitzennatriumstrom zu messen und die Dichte der Natriumkanäle in der lateralen Membran und im Bereich der T-Tubuli und Glanzstreifen zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine genetische Erkrankung des Herzmuskels, die insbesondere mit einer diastolischen Dysfunktion und der Entwicklung von lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen assoziiert ist (1). Mutationen im Myosin-bindenden Protein C gehören zu den häufigsten Mutationen, die zu der Entwicklung einer HCM führen (8,20,21). Die pathophysiologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene sind bisher unzureichend geklärt, für die meisten Mutationen konnte allerdings eine erhöhte Kalziumsensibilität der Myofilamente nachgewiesen werden (9,28,33). Eine Studie an humanen Kardiomyozyten von HCM-Patienten zeigte zudem einen gesteigerten Späten Natriumstrom mit erhöhten diastolischen Kalziumkonzentrationen (44). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Späten Natriumstrom und dessen β -adrenerge Regulation an einem Mausmodell der Hypertrophen Kardiomyopathie mit einer definierten Mutation im Gen für das kardiale Myosin-bindende Protein C zu untersuchen. Die Ergebnisse der Ruptured Whole-Cell Patch-Clamp Experimente zeigen, dass der Späte Natriumstrom in dem Mausmodell im Vergleich zum WT nicht wie bisher angenommen erhöht, sondern signifikant erniedrigt ist. Wie diese deutliche Abweichung zu den Ergebnissen an humanen Kardiomyozyten zu deuten ist, bleibt noch zu klären. Möglich wäre eine sekundäre Erhöhung des Späten Natriumstroms durch ischämische Ereignisse oder eine langzeitige Nachlasterrhöhung aufgrund einer Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn, die sich in dem Mausmodell ohne Obstruktion nicht darstellt. Das Mausmodell zeigte in vorherigen Experimenten zudem eine gesteigerte Reaktion auf β -adrenerge Stimulation sowie einen deutlichen Abfall der ohnehin verkürzten diastolischen Sarkomerlänge bei zusätzlicher Erhöhung der Arbeitsbelastung (35). Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Späte Natriumstrom nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Isoproterenol untersucht. Hier zeigten sich keine Unterschiede der β -adrenergen Regulation des Späten Natriumstroms zwischen dem Mausmodell und WT-Mäusen. Damit konnte der Späte Natriumstrom als Ursache der gesteigerten β -adrenergen Reaktion für dieses Mausmodell der HCM ausgeschlossen werden.

Ein positiver Effekt auf die diastolische Dysfunktion und diastolische Sarkomerlänge unter Arbeitsbelastung konnte dennoch für den Inhibitor des Späten Natriumstrom Ranolazin gezeigt werden (35,256). Über welche Mechanismen diese Effekte vermittelt werden, müssen weitere Experimente noch ergeben. Derzeit werden eine Desensibilisierung der Myofilamente sowie eine Antagonisierung am β 1-Rezeptor durch Ranolazin diskutiert (35,272).

6 Literaturverzeichnis

1. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, u. a. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 5. November 2003;42(9):1687–713.
2. Harmon KG, Drezner JA, Maleszewski JJ, Lopez-Anderson M, Owens D, Prutkin JM, u. a. Pathogenesis of Sudden Cardiac Death in National Collegiate Athletic Association Athletes. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circ Arrhythm Electrophysiol.* 1. April 2014;7(2):198–204.
3. Maron BJ, Haas TS, Murphy CJ, Ahluwalia A, Rutten-Ramos S. Incidence and Causes of Sudden Death in U.S. College Athletes. *J Am Coll Cardiol.* 29. April 2014;63(16):1636–43.
4. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: an important global disease. *Am J Med.* 2004;116(1):63–5.
5. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 31. März 2015;65(12):1249–54.
6. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy in a General Population of Young Adults. *Circulation.* 15. August 1995;92(4):785–9.
7. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy After 20 Years: Clinical Perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 21. August 2012;60(8):705–15.
8. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, u. a. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 6. Mai 2003;107(17):2227–32.
9. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, u. a. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2. November 2004;44(9):1903–10.
10. Sherrid MV, Wever-Pinzon O, Shah A, Chaudhry FA. Reflections of Inflections in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 14. Juli 2009;54(3):212–9.
11. Sherrid MV, Chu CK, Delia E, Mograder A, Dwyer EM. An echocardiographic study of the fluid mechanics of obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1. September 1993;22(3):816–25.
12. Patel P, Dhillon A, Popovic ZB, Smedira NG, Rizzo J, Thamilarasan M, u. a. Left Ventricular Outflow Tract Obstruction in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients

Without Severe Septal Hypertrophy: Implications of Mitral Valve and Papillary Muscle Abnormalities Assessed Using Cardiac Magnetic Resonance and Echocardiography. *Circ Cardiovasc Imaging*. Juli 2015;8(7):e003132.

13. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, u. a. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 14. Oktober 2014;35(39):2733–79.
14. Olivetto I, Cecchi F, Casey SA, Dolara A, Traverse JH, Maron BJ. Impact of Atrial Fibrillation on the Clinical Course of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 20. November 2001;104(21):2517–24.
15. Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural (“small vessel”) coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1. September 1986;8(3):545–57.
16. Maron MS, Olivetto I, Maron BJ, Prasad SK, Cecchi F, Udelson JE, u. a. The case for myocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 25. August 2009;54(9):866–75.
17. Robinson P, Mirza M, Knott A, Abdulrazzak H, Willott R, Marston S, u. a. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 25. Oktober 2002;277(43):40710–6.
18. Robinson P, Griffiths PJ, Watkins H, Redwood CS. Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circ Res*. 7. Dezember 2007;101(12):1266–73.
19. Marston SB. How Do Mutations in Contractile Proteins Cause the Primary Familial Cardiomyopathies? *J Cardiovasc Transl Res*. 22. März 2011;4(3):245–55.
20. Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, u. a. Cardiac myosin binding protein–C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*. Dezember 1995;11(4):438–40.
21. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, u. a. Mutations in the cardiac myosin binding protein–C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*. Dezember 1995;11(4):434–7.
22. Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Krämer E, Pointu H, u. a. Nonsense-Mediated mRNA Decay and Ubiquitin–Proteasome System Regulate Cardiac Myosin-Binding Protein C Mutant Levels in Cardiomyopathic Mice. *Circ Res*. 31. Juli 2009;105(3):239–48.

23. Schlossarek S, Mearini G, Carrier L. Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol.* April 2011;50(4):613–20.
24. Carballo S, Copeland O, Jacques A, Livesey K, Redwood C, Watkins H, u. a. Evidence for haploinsufficiency as the mechanism of action of MyBP-C mutations that cause HCM. *J Mol Cell Cardiol.* April 2008;44(4):768.
25. Jacques A, Hoskins AC, Kentish JC, Marston SB. From genotype to phenotype: a longitudinal study of a patient with hypertrophic cardiomyopathy due to a mutation in the MYBPC3 gene. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29(6–8):239–46.
26. Barefield D, Kumar M, Gorham J, Seidman JG, Seidman CE, de Tombe PP, u. a. Haploinsufficiency of MYBPC3 Exacerbates the Development of Hypertrophic Cardiomyopathy in Heterozygous Mice. *J Mol Cell Cardiol.* Februar 2015;79:234–43.
27. Copeland O, Sadayappan S, Messer AE, Steinen GJM, van der Velden J, Marston SB. Analysis of cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in human heart muscle. *J Mol Cell Cardiol.* Dezember 2010;49(6):1003–11.
28. Fraysse B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, u. a. Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol.* Juni 2012;52(6):1299–307.
29. Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, u. a. Hypertrophic Cardiomyopathy in Cardiac Myosin Binding Protein-C Knockout Mice. *Circ Res.* 22. März 2002;90(5):594–601.
30. Palmer BM, McConnell BK, Li GH, Seidman CE, Seidman JG, Irving TC, u. a. Reduced cross-bridge dependent stiffness of skinned myocardium from mice lacking cardiac myosin binding protein-C. *Mol Cell Biochem.* 2004;263(1):73–80.
31. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Krämer E, Vassort G, u. a. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 1. Februar 2006;69(2):370–80.
32. Chen PP, Patel JR, Rybakova IN, Walker JW, Moss RL. Protein kinase A-induced myofilament desensitization to Ca²⁺ as a result of phosphorylation of cardiac myosin-binding protein C. *J Gen Physiol.* 1. Dezember 2010;136(6):615–27.
33. Marston S, Copeland O, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrier L. How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy? *J Muscle Res Cell Motil.* 5. November 2011;33(1):75–80.
34. Carrier L, Knöll R, Vignier N, Keller DI, Bausero P, Prudhon B, u. a. Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovasc Res.* 1. August

2004;63(2):293–304.

35. Flenner F, Friedrich FW, Ungeheuer N, Christ T, Geertz B, Reischmann S, u. a. Ranolazine antagonizes catecholamine-induced dysfunction in isolated cardiomyocytes, but lacks long-term therapeutic effects in vivo in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 28. Dezember 2015;109(1):90–102.
36. Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res.* 1. Mai 1994;28(5):581–97.
37. Zeitz O, Maass AE, Nguyen PV, Hensmann G, Kögler H, Möller K, u. a. Hydroxyl Radical-Induced Acute Diastolic Dysfunction Is Due to Calcium Overload via Reverse-Mode Na⁺-Ca²⁺ Exchange. *Circ Res.* 17. Mai 2002;90(9):988–95.
38. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail.* März 2007;9(3):219–27.
39. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of Sodium and Calcium Dysregulation in Tachyarrhythmias in Sudden Cardiac Death. *Circ Res.* 6. Mai 2015;116(12):1956–70.
40. Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 15. März 2003;57(4):897–912.
41. Pieske B, Maier LS, Piacentino V, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate Dependence of [Na⁺]_i and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation.* 23. Juli 2002;106(4):447–53.
42. Moss AJ, Zareba W, Schwarz KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* Dezember 2008;19(12):1289–93.
43. Sossalla S, Wagner S, Rasenack ECL, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, u. a. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts — Role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol.* Juli 2008;45(1):32–43.
44. Coppini R, Ferrantini C, Yao L, Fan P, Del Lungo M, Stillitano F, u. a. Late Sodium Current Inhibition Reverses Electromechanical Dysfunction in Human Hypertrophic Cardiomyopathy Clinical Perspective. *Circulation.* 4. Februar 2013;127(5):575–84.
45. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie.* 7. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014. 1024 S.
46. Saint DA, Ju YK, Gage PW. A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1992;453:219–31.

47. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 10. Januar 2002;415(6868):198–205.
48. Scriven DR, Dan P, Moore ED. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. November 2000;79(5):2682–91.
49. Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW. Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science*. 20. April 1990;248(4953):283–283.
50. Peskoff A, Post JA, Langer GA. Sarcolemmal calcium binding sites in heart: II. Mathematical model for diffusion of calcium released from the sarcoplasmic reticulum into the diadic region. *J Membr Biol*. Juli 1992;129(1):59–69.
51. Langer GA, Peskoff A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophys J*. März 1996;70(3):1169–82.
52. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1. März 2002;7:d671-683.
53. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiol Rev*. 1. Juli 1999;79(3):763–854.
54. Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and Rapid Recovery of Ca²⁺ Current During Ca²⁺ Release From Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Circ Res*. 1. Januar 1995;76(1):102–9.
55. Sham JSK, Song L-S, Chen Y, Deng L-H, Stern MD, Lakatta EG, u. a. Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8. Dezember 1998;95(25):15096–101.
56. Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. März 1999;22(3):549–58.
57. A Fabiato, Fabiato and F. Calcium and Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Annu Rev Physiol*. 1979;41(1):473–84.
58. Ebashi S. Calcium ions and muscle contraction. *Nature*. 24. November 1972;240(5378):217–8.
59. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiol Rev*. 4. Januar 2000;80(2):853–924.
60. Margossian SS, Lowey S. [7] Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. In: *Enzymology B-M in*, Herausgeber. Academic Press; 1982 [zitiert 27. Oktober 2016]. S. 55–71. (Structural and Contractile Proteins Part B: The

Contractile Apparatus and the Cytoskeleton; Bd. 85). Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668798285009X>

61. Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and Tropomyosin. *Circ Res.* 7. September 1998;83(5):471–80.
62. de Tombe PP. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech.* Mai 2003;36(5):721–30.
63. Tobacman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:447–81.
64. Cooke R. Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol Rev.* 1. Juli 1997;77(3):671–97.
65. Lehman W, Vibert P, Uman P, Craig R. Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments. *J Mol Biol.* 11. August 1995;251(2):191–6.
66. Lakatta EG. Starling's law of the heart is explained by an intimate interaction of muscle length and myofilament calcium activation. *J Am Coll Cardiol.* November 1987;10(5):1157–64.
67. Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, Kurihara S. Length Dependence of Tension Generation in Rat Skinned Cardiac Muscle. *Circulation.* 2. Oktober 2001;104(14):1639–45.
68. Kentish JC, Keurs HE ter, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI. 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.* 1. Juni 1986;58(6):755–68.
69. Dobesh DP, Konhilas JP, Tombe PP de. Cooperative activation in cardiac muscle: impact of sarcomere length. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 1. März 2002;282(3):H1055–62.
70. Mohamed AS, Dignam JD, Schlender KK. Cardiac Myosin-Binding Protein C (MyBP-C): Identification of Protein Kinase A and Protein Kinase C Phosphorylation Sites. *Arch Biochem Biophys.* 15. Oktober 1998;358(2):313–9.
71. Schlender KK, Bean LJ. Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 15. Februar 1991;266(5):2811–7.
72. Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, u. a. Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res.* 26. November 2004;95(11):1091–9.

73. Xiao L, Zhao Q, Du Y, Yuan C, Solaro RJ, Buttrick PM. PKC ϵ Increases Phosphorylation of the Cardiac Myosin Binding Protein C at Serine 302 both in Vitro and in Vivo. *Biochemistry (Mosc)*. 12. Juni 2007;46(23):7054–61.
74. Strang KT, Sweitzer NK, Greaser ML, Moss RL. Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ Res*. März 1994;74(3):542–9.
75. Fentzke RC, Buck SH, Patel JR, Lin H, Wolska BM, Stojanovic MO, u. a. Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *J Physiol*. 1. Mai 1999;517(1):143–57.
76. Winegrad S, Weisberg A, Lin LE, McClellan G. Adrenergic regulation of myosin adenosine triphosphatase activity. *Circ Res*. Januar 1986;58(1):83–95.
77. Tombe PP de, Stienen GJM. Protein Kinase A Does Not Alter Economy of Force Maintenance in Skinned Rat Cardiac Trabeculae. *Circ Res*. 1. Mai 1995;76(5):734–41.
78. Janssen PM, de Tombe PP. Protein kinase A does not alter unloaded velocity of sarcomere shortening in skinned rat cardiac trabeculae. *Am J Physiol*. November 1997;273(5 Pt 2):H2415-2422.
79. Offer G, Moos C, Starr R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. *J Mol Biol*. 15. März 1973;74(4):653–76.
80. Offer G, Moos C, Starr R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. *J Mol Biol*. 15. März 1973;74(4):653–76.
81. Yamamoto K, Moos C. The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J Biol Chem*. 7. Oktober 1983;258(13):8395–401.
82. Einheber S, Fischman DA. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. März 1990;87(6):2157–61.
83. Ackermann MA, Kontogianni-Konstantopoulos A. Myosin Binding Protein-C Slow: An Intricate Subfamily of Proteins. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010 [zitiert 7. Dezember 2016];2010. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852610/>
84. Fougousse F, Delezoide A-L, Fiszman MY, Schwartz K, Beckmann JS, Carrier L. Cardiac Myosin Binding Protein C Gene Is Specifically Expressed in Heart During Murine and Human Development. *Circ Res*. 23. Januar 1998;82(1):130–3.
85. Gautel M, Fürst DO, Cocco A, Schiaffino S. Isoform Transitions of the Myosin Binding Protein C Family in Developing Human and Mouse Muscles. *Circ Res*. 23. Januar 1998;82(1):124–9.

86. Yasuda M, Koshida S, Sato N, Obinata T. Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscles. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 1995;27(10):2275–86.
87. Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S. Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J.* 1. Mai 1995;14(9):1952–60.
88. Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, u. a. Organization and Sequence of Human Cardiac Myosin Binding Protein C Gene (MYBPC3) and Identification of Mutations Predicted to Produce Truncated Proteins in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 1. März 1997;80(3):427–34.
89. Craig R, Offer G. The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 16. März 1976;192(1109):451–61.
90. Luther PK, Bennett PM, Knupp C, Craig R, Padrón R, Harris SP, u. a. Understanding the Organisation and Role of Myosin Binding Protein C in Normal Striated Muscle by Comparison with MyBP-C Knockout Cardiac Muscle. *J Mol Biol.* 5. Dezember 2008;384(1):60–72.
91. Miyamoto CA, Fischman DA, Reinach FC. The interface between MyBP-C and myosin: site-directed mutagenesis of the CX myosin-binding domain of MyBP-C. *J Muscle Res Cell Motil.* Oktober 1999;20(7):703–15.
92. Flashman E, Watkins H, Redwood C. Localization of the binding site of the C-terminal domain of cardiac myosin-binding protein-C on the myosin rod. *Biochem J.* 1. Januar 2007;401(Pt 1):97–102.
93. Moolman-Smook J, Flashman E, Lange W de, Li Z, Corfield V, Redwood C, u. a. Identification of Novel Interactions Between Domains of Myosin Binding Protein-C That Are Modulated by Hypertrophic Cardiomyopathy Missense Mutations. *Circ Res.* 18. Oktober 2002;91(8):704–11.
94. Shaffer JF, Kensler RW, Harris SP. The Myosin-binding Protein C Motif Binds to F-actin in a Phosphorylation-sensitive Manner. *J Biol Chem.* 1. Mai 2009;284(18):12318–27.
95. Rybakova IN, Greaser ML, Moss RL. Myosin Binding Protein C Interaction with Actin. *J Biol Chem.* 21. Januar 2011;286(3):2008–16.
96. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac Myosin Binding Protein C. *Circ Res.* 28. Mai 2004;94(10):1279–89.
97. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RHA. Myosin Binding Protein C, a Phosphorylation-Dependent Force Regulator in Muscle That Controls the Attachment of Myosin Heads by Its Interaction With Myosin S2. *Circ Res.*

7. Januar 2000;86(1):51–8.

98. Herron TJ, Rostkova E, Kunst G, Chaturvedi R, Gautel M, Kentish JC. Activation of myocardial contraction by the N-terminal domains of myosin binding protein-C. *Circ Res.* 26. Mai 2006;98(10):1290–8.

99. Razumova MV, Shaffer JF, Tu A-Y, Flint GV, Regnier M, Harris SP. Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an in vitro motility assay: Evidence for long-lived cross-bridges. *J Biol Chem.* 24. November 2006;281(47):35846–54.

100. Stelzer JE, Dunning SB, Moss RL. Ablation of Cardiac Myosin-Binding Protein-C Accelerates Stretch Activation in Murine Skinned Myocardium. *Circ Res.* 12. Mai 2006;98(9):1212–8.

101. Colson BA, Bekyarova T, Fitzsimons DP, Irving TC, Moss RL. Radial displacement of myosin cross-bridges in mouse myocardium due to ablation of myosin binding protein-C. *J Mol Biol.* 16. März 2007;367(1):36–41.

102. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, u. a. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 1985;17(10):937–45.

103. Yuan C, Guo Y, Ravi R, Przyklenk K, Shilkofski N, Diez R, u. a. Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts — Evidence for novel phosphorylation sites. *PROTEOMICS.* 1. Juli 2006;6(14):4176–86.

104. Bardswell SC, Cuello F, Rowland AJ, Sadayappan S, Robbins J, Gautel M, u. a. Distinct Sarcomeric Substrates Are Responsible for Protein Kinase D-mediated Regulation of Cardiac Myofilament Ca²⁺ Sensitivity and Cross-bridge Cycling. *J Biol Chem.* 19. Februar 2010;285(8):5674–82.

105. Sadayappan S, Gulick J, Osinska H, Barefield D, Cuello F, Avkiran M, u. a. A Critical Function for Ser-282 in Cardiac Myosin Binding Protein-C Phosphorylation and Cardiac Function. *Circ Res.* 8. Juli 2011;109(2):141–50.

106. Gruen M, Prinz H, Gautel M. cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett.* 25. Juni 1999;453(3):254–9.

107. Gresham KS, Mamidi R, Stelzer JE. The contribution of cardiac myosin binding protein-c Ser282 phosphorylation to the rate of force generation and in vivo cardiac contractility. *J Physiol.* 1. September 2014;592(Pt 17):3747–65.

108. El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, u. a.

Molecular Determinants of Altered Ca²⁺ Handling in Human Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation*. 15. August 2006;114(7):670–80.

109. Jacques AM, Copeland O, Messer AE, Gallon CE, King K, McKenna WJ, u. a. Myosin binding protein C phosphorylation in normal, hypertrophic and failing human heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*. August 2008;45(2):209–16.

110. van Dijk SJ, Dooijes D, dos Remedios C, Michels M, Lamers JMJ, Winegrad S, u. a. Cardiac myosin-binding protein C mutations and hypertrophic cardiomyopathy: haploinsufficiency, deranged phosphorylation, and cardiomyocyte dysfunction. *Circulation*. 24. März 2009;119(11):1473–83.

111. Decker RS, Decker ML, Kulikovskaya I, Nakamura S, Lee DC, Harris K, u. a. Myosin-Binding Protein C Phosphorylation, Myofibril Structure, and Contractile Function During Low-Flow Ischemia. *Circulation*. 22. Februar 2005;111(7):906–12.

112. Sadayappan S, Osinska H, Klevitsky R, Lorenz JN, Sargent M, Molkenstein JD, u. a. Cardiac myosin binding protein c phosphorylation is cardioprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. November 2006;103(45):16918–23.

113. Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*. 28. April 1952;116(4):449–72.

114. Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*. 28. April 1952;116(4):473–96.

115. Hodgkin AL, Huxley AF. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*. 28. April 1952;116(4):497–506.

116. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 28. August 1952;117(4):500–44.

117. Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*. 2003;4(3):207.

118. Beneski DA, Catterall WA. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Januar 1980;77(1):639–43.

119. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, u. a. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 8. November 1984;312(5990):121–7.

120. Goldin AL, Snutch T, Lübbert H, Dowsett A, Marshall J, Auld V, u. a. Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oktober 1986;83(19):7503–7.

121. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, u. a. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. 8. Mai 1992;256(5058):839–42.
122. Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, u. a. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. 3. November 1995;83(3):433–42.
123. Hartshorne RP, Catterall WA. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juli 1981;78(7):4620–4.
124. Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *J Biol Chem*. 10. Dezember 1982;257(23):13888–91.
125. Hartshorne RP, Catterall WA. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J Biol Chem*. 10. Februar 1984;259(3):1667–75.
126. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. 10. Juli 2011;475(7356):353–8.
127. Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*. 23. September 1988;241(4873):1658–61.
128. Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*. 13. April 1973;242(5398):459–61.
129. Armstrong CM, Bezanilla F. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol*. Mai 1974;63(5):533–52.
130. Yang N, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*. Juli 1995;15(1):213–8.
131. Chanda B, Bezanilla F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol*. November 2002;120(5):629–45.
132. Yarov-Yarovoy V, DeCaen PG, Westenbroek RE, Pan C-Y, Scheuer T, Baker D, u. a. Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Januar 2012;109(2):E93–102.
133. Hille B. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J Gen Physiol*. 11. Januar 1975;66(5):535–60.
134. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, u. a. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*. 22. Juni

1989;339(6226):597–603.

135. Adelman WJ, Palti Y. The Effects of External Potassium and Long Duration Voltage Conditioning on the Amplitude of Sodium Currents in the Giant Axon of the Squid, *Loligo pealei*. *J Gen Physiol.* 1. November 1969;54(5):589–606.

136. Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol.* Oktober 1978;283:1–21.

137. Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature.* 20. Mai 2012;486(7401):135–9.

138. Aiba T, Farinelli F, Kosteckí G, Hesketh GG, Edwards D, Biswas S, u. a. A mutation causing Brugada syndrome identifies a mechanism for altered autonomic and oxidant regulation of cardiac sodium currents. *Circ Cardiovasc Genet.* Juni 2014;7(3):249–56.

139. Baba S, Dun W, Boyden PA. Can PKA activators rescue Na⁺ channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovasc Res.* 1. November 2004;64(2):260–7.

140. Hallaq H, Wang DW, Kunic JD, George AL, Wells KS, Murray KT. Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 1. Februar 2012;302(3):H782–9.

141. Beltran-Alvarez P, Espejo A, Schmauder R, Beltran C, Mrowka R, Linke T, u. a. Protein arginine methyl transferases-3 and -5 increase cell surface expression of cardiac sodium channel. *FEBS Lett.* 1. Oktober 2013;587(19):3159–65.

142. Beltran-Alvarez P, Pagans S, Brugada R. The cardiac sodium channel is post-translationally modified by arginine methylation. *J Proteome Res.* 5. August 2011;10(8):3712–9.

143. Mercier A, Clément R, Harnois T, Bourmeyster N, Bois P, Chatelier A. Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* Juni 2015;1850(6):1215–23.

144. Baba S, Dun W, Cabo C, Boyden PA. Remodeling in Cells From Different Regions of the Reentrant Circuit During Ventricular Tachycardia. *Circulation.* 18. Oktober 2005;112(16):2386–96.

145. Ou Y, Stregé P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, u. a. Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem.* 17. Januar 2003;278(3):1915–23.

146. Brette F, Orchard CH. Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res*

Commun. 29. September 2006;348(3):1163–6.

147. Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, u. a. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. Dezember 2004;101(50):17533–8.

148. Leoni A-L, Gavillet B, Rougier J-S, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, u. a. Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PLoS One*. 19. Februar 2010;5(2):e9298.

149. Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1. Januar 1998;18(1):128–37.

150. Kaprielian RR, Stevenson S, Rothery SM, Cullen MJ, Severs NJ. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. *Circulation*. 6. Juni 2000;101(22):2586–94.

151. Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JMB, Auerbach DS, Furspan PB, u. a. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31. Juli 2012;109(31):E2134–2143.

152. Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. April 2013;1833(4):886–94.

153. Cerrone M, Priori SG. Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *Eur Heart J*. September 2011;32(17):2109–18.

154. Mizusawa Y, Wilde AAM. Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 1. Juni 2012;5(3):606–16.

155. Hammond J, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*. Februar 2008;20(1):71–6.

156. Casini S, Tan HL, Demirayak I, Remme CA, Amin AS, Scicluna BP, u. a. Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovasc Res*. 1. März 2010;85(4):691–700.

157. Dybkova N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, u. a. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late INa. *Cardiovasc Res*. 20. Juni 2014;103(1):168–77.

158. Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. Cell

membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry (Mosc)*. 12. Januar 2010;49(1):166–78.

159. Lemailet G, Walker B, Lambert S. Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem*. 25. Juli 2003;278(30):27333–9.

160. Iwata Y, Sampaolesi M, Shigekawa M, Wakabayashi S. Syntrophin is an actin-binding protein the cellular localization of which is regulated through cytoskeletal reorganization in skeletal muscle cells. *Eur J Cell Biol*. Oktober 2004;83(10):555–65.

161. Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 1. Juli 2013;70(14):2533–54.

162. Dudel J, Peper K, Rüdell R, Trautwein W. The effect of tetrodotoxin on the membrane current in cardiac muscle (Purkinje fibers). *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 1967;295(3):213–26.

163. Maltsev VA, Undrovinas AI. A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. Januar 2006;69(1):116–27.

164. Maltsev VA, Undrovinas A. Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol*. April 2008;96(1–3):421–51.

165. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking SCN10A channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ Res*. 20. Juli 2012;111(3):322–32.

166. Mishra S, Reznikov V, Maltsev VA, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A. Contribution of sodium channel neuronal isoform Nav1.1 to late sodium current in ventricular myocytes from failing hearts. *J Physiol*. 15. März 2015;593(6):1409–27.

167. Xi Y, Wu G, Yang L, Han K, Du Y, Wang T, u. a. Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. *Eur J Heart Fail*. August 2009;11(8):749–57.

168. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, u. a. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res*. 4. März 2011;108(5):555–65.

169. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, u. a. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. 1. Dezember 2006;116(12):3127–38.

170. Qi D, Yang Z, Robinson VM, Li J, Gao C, Guo D, u. a. Heterogeneous distribution of I_{Na-L} determines interregional differences in rate adaptation of repolarization. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc*. Juni 2015;12(6):1295–303.

171. Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, u. a. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 24. Januar 2002;415(6870):442–7.
172. Matsuda JJ, Lee H, Shibata EF. Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation. *Circ Res*. Januar 1992;70(1):199–207.
173. Schubert B, VanDongen AM, Kirsch GE, Brown AM. Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science*. 4. August 1989;245(4917):516–9.
174. Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, Catterall WA. cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem*. 15. November 1996;271(46):28837–43.
175. Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, Kallen RG. Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol*. 15. Januar 1997;498 (Pt 2):309–18.
176. Hanson PI, Meyer T, Stryer L, Schulman H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*. Mai 1994;12(5):943–56.
177. Hanson PI, Schulman H. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 25. August 1992;267(24):17216–24.
178. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol*. August 2002;34(8):919–39.
179. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, u. a. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. 1. Dezember 2006;116(12):3127–38.
180. Wagner S, Dantz C, Flebbe H, Azizian A, Sag CM, Engels S, u. a. NADPH oxidase 2 mediates angiotensin II-dependent cellular arrhythmias via PKA and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. Oktober 2014;75:206–15.
181. Das S, Aiba T, Rosenberg M, Hessler K, Xiao C, Quintero PA, u. a. Pathological Role of Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 in Adverse Ventricular Remodeling. *Circulation*. 30. Oktober 2012;126(18):2208–19.
182. Light PE, Wallace CHR, Dyck JRB. Constitutively Active Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates Voltage-Gated Sodium Channels in Ventricular Myocytes. *Circulation*. 22. April 2003;107(15):1962–5.
183. Ma J, Luo A, Wu L, Wan W, Zhang P, Ren Z, u. a. Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late

- sodium current in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 15. April 2012;302(8):C1141–51.
184. Watson CL, Gold MR. Modulation of Na⁺ Current Inactivation by Stimulation of Protein Kinase C in Cardiac Cells. *Circ Res*. 1. September 1997;81(3):380–6.
185. Ahern GP, Hsu SF, Klyachko VA, Jackson MB. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem*. 15. September 2000;275(37):28810–5.
186. Bemmelen MX van, Rougier J-S, Gavillet B, Apothéloz F, Daidié D, Tateyama M, u. a. Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by Nedd4-2 Mediated Ubiquitination. *Circ Res*. 6. August 2004;95(3):284–91.
187. Kang L, Zheng MQ, Morishima M, Wang Y, Kaku T, Ono K. Bepridil up-regulates cardiac Na⁺ channels as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity. *Br J Pharmacol*. Juni 2009;157(3):404–14.
188. Gavillet B, Rougier J-S, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, u. a. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res*. 18. August 2006;99(4):407–14.
189. Rougier J-S, Gavillet B, Abriel H. Proteasome inhibitor (MG132) rescues Nav1.5 protein content and the cardiac sodium current in dystrophin-deficient mdx5cv mice. *Front Physiol* [Internet]. 26. März 2013 [zitiert 31. Januar 2017];4. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607792/>
190. Johnson D, Montpetit ML, Stocker PJ, Bennett ES. The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J Biol Chem*. 22. Oktober 2004;279(43):44303–10.
191. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science*. 16. September 1994;265(5179):1724–8.
192. Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of drug access to the receptor site for antiarrhythmic drugs in the cardiac Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5. Dezember 1995;92(25):11839–43.
193. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. August 1996;93(17):9270–5.
194. Wang GK, Quan C, Wang S. A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltage-gated mu1 Na⁺ channels. *Pflugers Arch*. Januar 1998;435(2):293–302.
195. Yarov-Yarovoy V, Brown J, Sharp EM, Clare JJ, Scheuer T, Catterall WA.

Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment IIS6 of the Na⁽⁺⁾ channel alpha subunit. *J Biol Chem.* 5. Januar 2001;276(1):20–7.

196. Yarov-Yarovoy V, McPhee JC, Idsvoog D, Pate C, Scheuer T, Catterall WA. Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J Biol Chem.* 20. September 2002;277(38):35393–401.

197. Fozzard HA, Lipkind GM. The Tetrodotoxin Binding Site Is within the Outer Vestibule of the Sodium Channel. *Mar Drugs.* 1. Februar 2010;8(2):219–34.

198. Rogers JC, Qu Y, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA. Molecular Determinants of High Affinity Binding of α -Scorpion Toxin and Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the Na⁺ Channel α Subunit. *J Biol Chem.* 7. Mai 1996;271(27):15950–62.

199. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* Juli 2006;318(1):214–22.

200. Undrovinas NA, Maltsev VA, Belardinelli L, Sabbah HN, Undrovinas A. Late Sodium Current Contributes to Diastolic Cell Ca²⁺ Accumulation in Chronic Heart Failure. *J Physiol Sci JPS.* Juli 2010;60(4):245–57.

201. Fredj S, Sampson KJ, Liu H, Kass RS. Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br J Pharmacol.* Mai 2006;148(1):16–24.

202. Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN. Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J Cardiovasc Electrophysiol.* Mai 2006;17 Suppl 1:S169–77.

203. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, u. a. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol.* 21. April 2004;43(8):1375–82.

204. Gratsianskiĭ NA. [Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina. Results of CARISA]. *Kardiologiya.* 2004;44(3):78.

205. Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* November 2008;98(2–3):120–36.

206. Wilde AAM, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res.* 1. April 2011;108(7):884–97.

207. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*. 24. August 1995;376(6542):683–5.
208. Meregalli PG, Tan HL, Probst V, Koopmann TT, Tanck MW, Bhuiyan ZA, u. a. Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies. *Heart Rhythm*. März 2009;6(3):341–8.
209. Peters CH, Abdelsayed M, Ruben PC. Triggers for arrhythmogenesis in the Brugada and long QT 3 syndromes. *Prog Biophys Mol Biol*. Januar 2016;120(1–3):77–88.
210. Marionneau C, Abriel H. Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol*. Mai 2015;82:36–47.
211. Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, u. a. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. August 2013;61:111–22.
212. Ufret-Vincenty CA, Baro DJ, Lederer WJ, Rockman HA, Quinones LE, Santana LF. Role of sodium channel deglycosylation in the genesis of cardiac arrhythmias in heart failure. *J Biol Chem*. 27. Juli 2001;276(30):28197–203.
213. Ednie AR, Horton K-K, Wu J, Bennett ES. Expression of the sialyltransferase, ST3Gal4, impacts cardiac voltage-gated sodium channel activity, refractory period and ventricular conduction. *J Mol Cell Cardiol*. Juni 2013;59:117–27.
214. Adams VR, Leggas M. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin Ther*. Juli 2007;29(7):1338–53.
215. Agrawal M, Garg RJ, Cortes J, Quintás-Cardama A. Tyrosine kinase inhibitors: the first decade. *Curr Hematol Malig Rep*. April 2010;5(2):70–80.
216. Lu Z, Wu C-YC, Jiang Y-P, Ballou LM, Clausen C, Cohen IS, u. a. Suppression of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling and Alteration of Multiple Ion Currents in Drug-Induced Long QT Syndrome. *Sci Transl Med*. 25. April 2012;4(131):131ra50.
217. January CT, Chau V, Makielski JC. Triggered activity in the heart: cellular mechanisms of early after-depolarizations. *Eur Heart J*. Dezember 1991;12 Suppl F:4–9.
218. January CT, Moscucci A. Cellular mechanisms of early afterdepolarizations. *Ann N Y Acad Sci*. 27. Januar 1992;644:23–32.
219. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, u. a. Relationship Between Na⁺-Ca²⁺-Exchanger Protein Levels and Diastolic Function of Failing Human Myocardium. *Circulation*. 9. Februar 1999;99(5):641–8.
220. Bers DM. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology*. 1. Dezember 2006;21(6):380–7.

221. Edwards AG, Grandi E, Hake JE, Patel S, Li P, Miyamoto S, u. a. Nonequilibrium reactivation of Na⁺ current drives early afterdepolarizations in mouse ventricle. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* Dezember 2014;7(6):1205–13.
222. Marban E, Robinson SW, Wier WG. Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J Clin Invest.* November 1986;78(5):1185–92.
223. Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:107–27.
224. Langer GA. Sodium-calcium exchange in the heart. *Annu Rev Physiol.* 1982;44:435–49.
225. Vatner SF, Franklin D, Higgins CB, Patrick T, Braunwald E. Left ventricular response to severe exertion in untethered dogs. *J Clin Invest.* Dezember 1972;51(12):3052–60.
226. Kim I-M, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, u. a. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23. September 2008;105(38):14555–60.
227. Patel CB, Noor N, Rockman HA. Functional selectivity in adrenergic and angiotensin signaling systems. *Mol Pharmacol.* Dezember 2010;78(6):983–92.
228. Sheikh SP, Vilardarga JP, Baranski TJ, Lichtarge O, Iiri T, Meng EC, u. a. Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation. *J Biol Chem.* 11. Juni 1999;274(24):17033–41.
229. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 10. Januar 2002;415(6868):206–12.
230. Louet M, Charlier L, Martinez J, Floquet N. Dissociation of membrane-anchored heterotrimeric G-protein induced by G(α) subunit binding to GTP. *J Chem Inf Model.* 26. November 2012;52(11):3022–7.
231. Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science.* 6. Juni 2003;300(5625):1530–2.
232. Xiao R-P, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, u. a. Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* Juni 2006;27(6):330–7.
233. Zhou J, Shin H-G, Yi J, Shen W, Williams CP, Murray KT. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res.* 20. September 2002;91(6):540–6.

234. Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spätjens RLHMG, Beekman JDM, u. a. Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation*. 3. Juni 2003;107(21):2753–60.
235. Zhang YH, Hancox JC. Regulation of cardiac Na⁺–Ca²⁺ exchanger activity by protein kinase phosphorylation—Still a paradox? *Cell Calcium*. Januar 2009;45(1):1–10.
236. Krüger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27(5–7):435–44.
237. Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*. Dezember 2006;31(12):680–6.
238. Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel J-L, Heymes C, Morel E, u. a. Epac Mediates β -Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res*. 25. April 2008;102(8):959–65.
239. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, u. a. Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation*. 26. Februar 2013;127(8):913–22.
240. Grimm M, Brown JH. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. Februar 2010;48(2):322–30.
241. Mani SK, Egan EA, Addy BK, Grimm M, Kasiganesan H, Thiagarajan T, u. a. β -Adrenergic Receptor Stimulated Ncx1 Upregulation is Mediated via a CaMKII/AP-1 Signaling Pathway in Adult Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Februar 2010;48(2):342–51.
242. Currie S. Cardiac ryanodine receptor phosphorylation by CaM Kinase II: keeping the balance right. *Front Biosci Landmark Ed*. 1. Juni 2009;14:5134–56.
243. Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1. Mai 2008;13:5988–6005.
244. Xie Y, Ding W-G, Matsuura H. Ca²⁺/calmodulin potentiates I Ks in sinoatrial node cells by activating Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Pflugers Arch*. Februar 2015;467(2):241–51.
245. Tong CW, Wu X, Liu Y, Rosas PC, Sadayappan S, Hudmon A, u. a. Phosphoregulation of Cardiac Inotropy via Myosin Binding Protein-C During Increased Pacing Frequency or β 1-Adrenergic Stimulation. *Circ Heart Fail*. Mai 2015;8(3):595–604.
246. Sossalla S, Wagner S, Rasenack ECL, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, u. a. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human

hearts — Role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J Mol Cell Cardiol.* Juli 2008;45(1):32–43.

247. Stone PH, Gratsiansky NA, Blokhin A, Huang I-Z, Meng L, ERICA Investigators. Antianginal efficacy of ranolazine when added to treatment with amlodipine: the ERICA (Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina) trial. *J Am Coll Cardiol.* 1. August 2006;48(3):566–75.

248. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, u. a. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation.* 24. August 2004;110(8):904–10.

249. Cattaneo M, Porretta AP, Gallino A. Ranolazine: Drug overview and possible role in primary microvascular angina management. *Int J Cardiol.* 15. Februar 2015;181:376–81.

250. Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* Dezember 2006;41(6):1031–8.

251. Nesterenko VV, Zygmunt AC, Rajamani S, Belardinelli L, Antzelevitch C. Mechanisms of atrial-selective block of Na⁺ channels by ranolazine: II. Insights from a mathematical model. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* Oktober 2011;301(4):H1615–24.

252. Liang F, Fan P, Jia J, Yang S, Jiang Z, Karpinski S, u. a. Inhibitions of late I_{Na} and CaMKII act synergistically to prevent ATX-II-induced atrial fibrillation in isolated rat right atria. *J Mol Cell Cardiol.* Mai 2016;94:122–30.

253. Létienne R, Vié B, Puech A, Vieu S, Le Grand B, John GW. Evidence that ranolazine behaves as a weak beta₁- and beta₂-adrenoceptor antagonist in the rat [correction of cat] cardiovascular system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* April 2001;363(4):464–71.

254. Zhao G, Walsh E, Shryock JC, Messina E, Wu Y, Zeng D, u. a. Antiadrenergic and hemodynamic effects of ranolazine in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* Juni 2011;57(6):639–47.

255. McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation.* 1. Januar 1996;93(1):135–42.

256. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong E-M, Lardin HA, Liu H, Patel BG, u. a. Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ Res.* 16. März 2012;110(6):841–50.

257. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, u. a.

- Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*. 7. September 2010;122(10):993–1003.
258. Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation*. Juli 1994;90(1):391–9.
259. Noble D, Noble PJ. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart Br Card Soc*. Juli 2006;92 Suppl 4:iv1-iv5.
260. Le Grand B, Vie B, Talmant JM, Coraboeuf E, John GW. Alleviation of contractile dysfunction in ischemic hearts by slowly inactivating Na⁺ current blockers. *Am J Physiol*. August 1995;269(2 Pt 2):H533-540.
261. Maier LS, Sossalla S. The late Na current as a therapeutic target: where are we? *J Mol Cell Cardiol*. August 2013;61:44–50.
262. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, u. a. Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis. *J Am Coll Cardiol*. 16. März 2010;55(11):1127–35.
263. Rougier J-S, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothéloz F, u. a. Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. März 2005;288(3):C692-701.
264. Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T, Carrier L. Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol*. Januar 2012;107(1):235.
265. Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, u. a. Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation*. 12. Februar 2002;105(6):707–13.
266. London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, u. a. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation*. 13. November 2007;116(20):2260–8.
267. Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, u. a. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 13. November 2007;116(20):2253–9.
268. Valdivia CR, Ueda K, Ackerman MJ, Makielski JC. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. Oktober 2009;297(4):H1446–52.

269. Sossalla S, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann W-H, u. a. Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII δ C can be reversed by inhibition of late Na⁺ current. *Basic Res Cardiol.* März 2011;106(2):263–72.
270. Hwang H, Arcidi JM, Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, u. a. Ranolazine as a cardioplegia additive improves recovery of diastolic function in isolated rat hearts. *Circulation.* 15. September 2009;120(11 Suppl):S16-21.
271. Chandler MP, Stanley WC, Morita H, Suzuki G, Roth BA, Blackburn B, u. a. Short-term treatment with ranolazine improves mechanical efficiency in dogs with chronic heart failure. *Circ Res.* 23. August 2002;91(4):278–80.
272. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong E-M, Lardin HA, Liu H, Patel BG, u. a. Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ Res.* 16. März 2012;110(6):841–50.
273. Silberman GA, Fan T-HM, Liu H, Jiao Z, Xiao HD, Lovelock JD, u. a. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation.* 2. Februar 2010;121(4):519–28.
274. Chinwalla AT, Cook LL, Delehaunty KD, Fewell GA, Fulton LA, Fulton RS, u. a. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 5. Dezember 2002;420(6915):520–62.
275. Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I, Third Edition: Essential Principles and Practices [Internet]. CRC Press. 2010 [zitiert 3. Januar 2017]. Verfügbar unter: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Laboratory-Animal-Science-Volume-I-Third-Edition-Essential/Hau-Schapiro/p/book/9781420084559>
276. Nerbonne JM. Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med.* April 2004;14(3):83–93.
277. Milani-Nejad N, Janssen PML. Small and Large Animal Models in Cardiac Contraction Research: Advantages and Disadvantages. *Pharmacol Ther.* März 2014;141(3):235–49.
278. Shaffer JF, Harris SP. Species-specific differences in the Pro-Ala rich region of cardiac myosin binding protein-C. *J Muscle Res Cell Motil.* Dezember 2009;30(7–8):303–6.
279. Squire JM, Luther PK, Knupp C. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J Mol Biol.* 15. August 2003;331(3):713–24.
280. Tanner BCW, Wang Y, Robbins J, Palmer BM. Kinetics of cardiac myosin isoforms in mouse myocardium are affected differently by presence of myosin binding

- protein-C. *J Muscle Res Cell Motil.* Dezember 2014;35(5–6):267–78.
281. van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PML, u. a. The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca²⁺-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res.* Februar 2003;57(2):505–14.
282. Ayaz-Guner S, Zhang J, Li L, Walker JW, Ge Y. In vivo phosphorylation site mapping in mouse cardiac troponin I by high resolution top-down electron capture dissociation mass spectrometry: Ser22/23 are the only sites basally phosphorylated. *Biochemistry (Mosc).* 1. September 2009;48(34):8161–70.
283. Taglieri DM, Monasky MM, Knezevic I, Sheehan KA, Lei M, Wang X, u. a. Ablation of p21-activated kinase-1 in mice promotes isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in association with activation of Erk1/2 and inhibition of protein phosphatase 2A. *J Mol Cell Cardiol.* Dezember 2011;51(6):988–96.
284. Zhang L, Yu Y, Song Z, Wang Y-Y, Yu Z-B. Synergistic effects between phosphorylation of phospholamban and troponin I promote relaxation at higher heart rate. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:651627.
285. Janssen PML, Stull LB, Marbán E. Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Februar 2002;282(2):H499-507.
286. Yasuda S, Coutu P, Sadayappan S, Robbins J, Metzger JM. Cardiac transgenic and gene transfer strategies converge to support an important role for troponin I in regulating relaxation in cardiac myocytes. *Circ Res.* 17. August 2007;101(4):377–86.
287. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* 15. April 1994;476(2):279–93.
288. Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol.* April 1998;274(4 Pt 2):H1335-1347.
289. Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, u. a. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res.* 4. April 2003;92(6):651–8.
290. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet.* 10. Januar 2005;42(10):e59–e59.
291. Kelly M, Semsarian C. Multiple Mutations in Genetic Cardiovascular Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 1. April 2009;2(2):182–90.
292. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, Baldi M, Will ML, Baldini K, u. a. Clinical

features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol.* 6. April 2010;55(14):1444–53.

293. Ho CY, Lever HM, DeSanctis R, Farver CF, Seidman JG, Seidman CE. Homozygous mutation in cardiac troponin T: implications for hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 17. Oktober 2000;102(16):1950–5.

294. Xin B, Puffenberger E, Tumbush J, Bockoven JR, Wang H. Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet A.* 15. November 2007;143A(22):2662–7.

295. Gray B, Yeates L, Medi C, Ingles J, Semsarian C. Homozygous mutation in the cardiac troponin I gene: Clinical heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 30. September 2013;168(2):1530–1.

296. Xu Q, Dewey S, Nguyen S, Gomes AV. Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J Mol Cell Cardiol.* Mai 2010;48(5):899–909.

Danksagung

Dieses Projekt ist in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Lucie Carrier, Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg, entstanden. Ich danke ihr und ihrer Arbeitsgruppe für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas und die gute Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt dem Team von Prof. Dr. Lars Maier, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Genannt sei zu allererst Herr Prof. Dr. Lars Maier, dem ich für seine hervorragende Leitung der Arbeitsgruppe, die herzliche Arbeitsatmosphäre und das Vertrauen in meine Arbeit danken möchte.

Die größte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, der Datenauswertung und der schriftlichen Verfassung meiner Doktorarbeit habe ich von meinem Betreuer Prof. Dr. Stefan Wagner erhalten. Ich möchte mich daher für seine wertvolle Zeit, die fachliche Unterstützung und seine ansteckende Begeisterung für die Forschung bedanken.

Außerdem bin ich Herrn Timo Schulte zu großem Dank verpflichtet, der mit der Isolation der Herzmuskelzellen einen großen Beitrag zu dieser Doktorarbeit geleistet hat.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei dem Rest des Teams - jeder einzelne hat mit seiner Hilfsbereitschaft und Unterstützung zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Zum Schluss sei noch dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) gedankt, durch dessen Stipendium ich die finanzielle und zeitliche Freiheit hatte, mich vollkommen auf die Doktorarbeit zu konzentrieren.