

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

**Die Bedeutung des Natrium-Kalzium-Austauschers für den
Kalziumhaushalt und die Entstehung zellulärer Arrhythmien in atrialen
und ventrikulären Kardiomyozyten des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Meindl

2019

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

**Die Bedeutung des Natrium-Kalzium-Austauschers für den
Kalziumhaushalt und die Entstehung zellulärer Arrhythmien in atrialen
und ventrikulären Kardiomyozyten des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Meindl

2019

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Hirt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Die Anatomie der Herzmuskelzelle	6
1.2 Die elektromechanische Kopplung	7
1.2.1 Das Aktionspotential	7
1.2.2 Wichtige Kanäle und Strukturen	8
1.2.3 Die Funktionen des Kalziums	12
1.3 Der Natrium Kalzium Austauscher (NCX)	14
1.3.1 Struktur und Anatomie des NCX	14
1.3.2 Die Funktion des NCX	16
1.4 Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Zellen	16
1.5 Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern	17
1.5.1 Grundlagen der Herzinsuffizienz	17
1.5.2 Das Vorhofflimmern	18
1.5.3 Der NCX bei Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern	20
1.6 Aufgabenstellung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Die Isolation humaner Kardiomyozyten	21
2.1.1 Die Isolation linksventrikulärer humaner Kardiomyozyten	21
2.1.2 Die Isolation rechtsatrialer humaner Kardiomyozyten	22
2.2 Die Fluoreszenzmikroskopie	23
2.2.1 Die Fluoreszenzfarbstoffe	24
2.2.2 Das Konfokalmikroskop	25
2.3 Patch-clamp Messungen	29
2.4 Vorhersageparameter von Arrhythmogenität	33
2.5 Statistische Auswertungen	34
2.6 Liste der Lösungen und Stoffe	35
3. Ergebnisse	39
3.1 Der Einfluss des NCX-Inhibitors auf das diastolische Kalziumleck in menschlichen Vorhofzellen	39
3.2 SAR-NCXi beeinflusst SR-Kalziumgehalt und NCX-Aktivität	49
3.2.1 Der SR-Kalziumgehalt ist erhöht unter NCX-Inhibition	50
3.2.2 Die Aktivität des NCX wird durch SAR-NCXi vermindert	52
3.3 Bei erhöhtem SR-Kalziumgehalt bleibt die Sparkfrequenz unter SAR-NCXi gleich	54

3.4 In ventrikulären Zellen zeigen sich ähnliche Effekte unter NCX-Inhibition	57
3.5 Der Inhibitor beeinflusst das Aktionspotential nicht.....	63
3.5.1 Die AP-Morphologie bleibt durch SAR-NCXi unbeeinflusst.....	65
3.5.2 Unterschiedliche Variabilität der Aktionspotentialdauer unter SAR-NCXi	67
4. Diskussion	74
4.1 Der Einfluss der NCX-Inhibition auf das diastolische Kalziumleck.....	74
4.2 Die Beladung des SR unter NCX-Inhibition	80
4.3 Die Aktivität des NCX unter Inhibition mit dem neuen Medikament	81
4.4 Die Einflüsse des SAR-NCXi auf Aktionspotentiale	82
4.5 Vergleich mit anderen Inhibitoren und NCX-KO Mäusen.....	84
4.6 Limitationen der Arbeit.....	85
5. Zusammenfassung	87
6. Anhang.....	88
6.1 Formelverzeichnis	88
6.2 Tabellenverzeichnis	88
6.3 Abbildungsverzeichnis.....	88
6.4 Abkürzungsverzeichnis.....	89
7. Literaturverzeichnis.....	91
8. Danksagung.....	

1. Einleitung

Nach wie vor zählen Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015). Dazu gehört auch die Herzinsuffizienz, die einerseits durch die kontraktile Dysfunktion und andererseits über die erhöhte Wahrscheinlichkeit für Arrhythmien die Patienten gefährdet. Sie stellt die Endstrecke zahlreicher Erkrankungen dar, besitzt trotz Weiterentwicklungen in der medikamentösen und apparativen Behandlung eine extrem hohe Mortalität und zählt somit zu den häufigsten und kostenintensivsten chronischen Erkrankungen in den westlichen Industrieländern (Dickstein *et al.*, 2008). Die ohnehin schon hohe Prävalenz wird durch die demographische Entwicklung in den nächsten Jahren und Jahrzehnten noch weiter steigen (Lloyd-Jones *et al.*, 2002).

Das Vorhofflimmern zählt zu den häufigsten Arrhythmien und ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (Dobrev, 2010). Es kommt dabei zu einer mangelnden Vorhofkontraktion bei Belastung und zu einem erhöhten Risiko von Thrombembolien und Schlaganfällen (Bootman *et al.*, 2011). Auch beim Vorhofflimmern ist die medikamentöse Behandlung problematisch, da derzeit verfügbare Präparate einerseits nur eine moderate Wirkung haben und andererseits zu lebensgefährlichen Arrhythmien führen können.

Der Herzinsuffizienz und dem Vorhofflimmern ist gemein, dass es über einen strukturellen Umbau (das sogenannte Remodeling) unter anderem zu einem veränderten Kalziumhaushalt in den atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten kommt. Dabei wird auch der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) vermehrt exprimiert, welcher sowohl an der Entstehung von Arrhythmien, als auch den Ursachen systolischer und diastolischer Insuffizienz beteiligt ist (Shattock *et al.*, 2015). Außerdem spielt er auch eine wichtige Rolle in der elektromechanischen Kopplung (Neco *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit soll der Einfluss einer Blockade des NCX in humanen Kardiomyozyten auf die Entstehung von Arrhythmien und die Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt untersucht werden.

1.1 Die Anatomie der Herzmuskelzelle

Die Muskulatur des Herzens, das Myokard, besteht aus verzweigten Zellen, den Kardiomyozyten, welche über die Glanzstreifen mit den sog. *Gap junctions* (porenbildende Proteinkomplexe) funktionell und elektrochemisch gekoppelt sind (Lüllmann-Rauch, 2009). Ventrikuläre Herzmuskelzellen sind in der Regel zwischen 50 und 100 µm lang und bis zu 15 µm breit, atriale Zellen hingegen 10 bis 20 µm lang und 5 µm breit (Sugi, 2012). Die Kardiomyozyten enthalten im Wesentlichen die Mitochondrien zur Energieproduktion, das sarkoplasmatische Retikulum (SR) zur Kalziumregulation und den Kontraktionsapparat (Schmidt *et al.*, 2003). Das Sarkolemm weist in ventrikulären Zellen auf Höhe der Z-Scheiben (siehe Abbildung 1) weite Einstülpungen auf, welche T-Tubuli genannt werden und zusammen mit den terminalen Zisternen des SR kurze Diaden ausbilden (Aumüller and Wurzinger, 2010). In den atrialen Zellen sind diese T-Tubuli in den meisten Spezies eher rudimentär ausgebildet (siehe Kapitel 1.4) (Bootman *et al.*, 2011).

Damit sich die einzelnen Zellen und folglich auch das Herz als Ganzes zusammenziehen kann, muss die chemische Energie, welche von den Mitochondrien zur Verfügung gestellt wird, in mechanische Energie umgewandelt werden. Dies wird von den Myofibrillen, welche zusammen mit den Mitochondrien 85 % des Zellvolumens ausmachen, übernommen (Schmidt *et al.*, 2003).

Sie bestehen aus Myofilamenten, dem dünnen Aktin (7 nm) und dem dicken Myosin (15 nm), welche so regelmäßig angeordnet sind, dass sich eine Querstreifung ergibt (siehe Abbildung 1) (Lüllmann-Rauch, 2009). Der I-Streifen entspricht dem Bereich, in dem ausschließlich Aktinfilamente, die an den Z-Scheiben verankert sind, vorliegen, sodass dieser Bereich am hellsten erscheint. Der A-Streifen spiegelt den ganzen Bereich wider, in dem die Myosinfilamente vorliegen. In der Diastole, wenn sich Myosin und Aktin am wenigsten überlagern, weist dieser Streifen eine H-Bande auf, in der ausschließlich Myosin vorliegt. Dieser Bereich verschwindet bei der Kontraktion jedoch, da sich dann Aktin- und Myosinfilamente überlagern (Aumüller and Wurzinger, 2010).

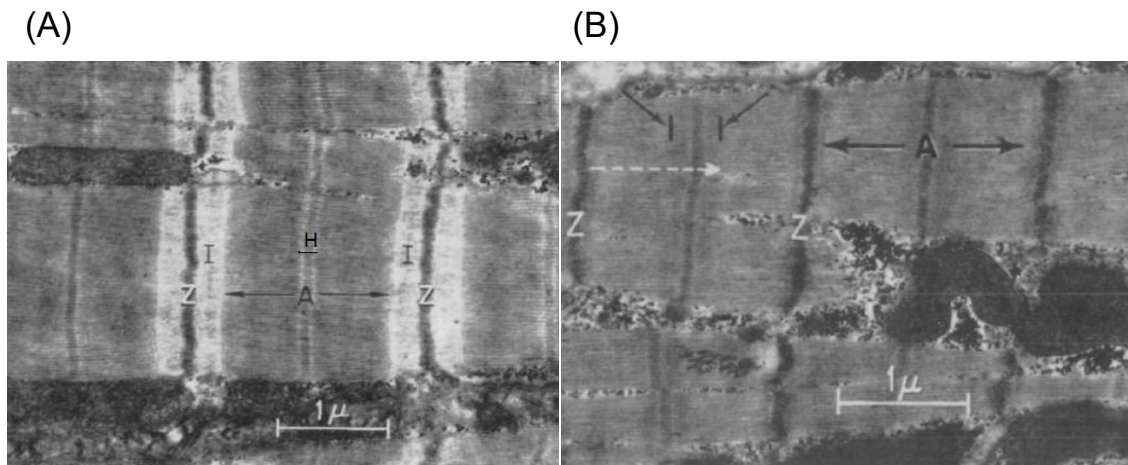


Abbildung 1: Das Sarkomer

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Sarkomere von Herzmuskelzellen während der Diastole (A) und der Systole (B). Die Länge der A-Bande bleibt gleich, während I- und H-Bande aufgrund der Verschiebung der Filamente ineinander verschwinden (aus (Sonnenblick et al., 1967)).

1.2 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung des Herzens bedeutet, dass eine Ladungsänderung in den Kardiomyozyten zu einer mechanischen Aktion (siehe Abbildung 1) führt. Dabei kommt es durch De- und Repolarisation zu einer Änderung des Aktivierungszustands verschiedener Kanäle und Strukturen. Das führt wiederum zu einer veränderten Elektrolytkonzentration in der Zelle, was schließlich zur mechanischen Aktion führt (siehe Kapitel 1.1 und Kapitel 1.2.3).

1.2.1 Das Aktionspotential

Das Aktionspotential (AP) ist die Schwankung des Membranpotentials und dient zugleich als Auslöser der elektromechanischen Kopplung und damit der Kontraktion. Es wird von benachbarten Zellen durch die *Gap junctions* ausgelöst (siehe Kapitel 1.1) und lässt sich in fünf Phasen unterteilen (Birkeland et al., 2005).

In Phase 0 kommt es zur Depolarisation durch die Öffnung von spannungsgesteuerten Na^+ -Kanälen (Na_v), welche durch Ströme aus den Nachbarzellen aktiviert werden und Natriumionen (Na^+) entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle einströmen

lassen. Dadurch ändert sich das Membranpotential vom Ruhewert -80 mV bis zu einem sogenannten *Overshoot* (Überschuss) von +30 mV. Die Kanäle schließen wieder innerhalb einer Millisekunde (Bers, 2001; Brown *et al.*, 1981).

In Phase 1 lösen auswärts gerichtete Kalium (K^+)-Ströme, (I_{to} : transient outward) eine leichte Repolarisation aus. Diese Kanäle sind nur bei depolarisierten Potentialen aktiv.

Phase 2 ist die Plateau-Phase, in der auch die Kontraktion stattfindet. Die Stabilität des Membranpotentials kommt durch das Gleichgewicht aus einwärts gerichteten Kalzium (Ca^{2+})-Strömen durch den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanal (Doerr *et al.*, 1990) und die auswärts gerichteten K^+ -Strömen zustande.

In Phase 3 kommt es zur Repolarisation auf das Ruhemembranpotential, indem die Ca^{2+} -Ströme abnehmen, während die K^+ -Ströme durch verzögerte Gleichrichtungskanäle (*delayed rectifier channels*) zunehmen (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990). Das Ca^{2+} wird aus dem Zytosol entfernt und die Relaxation beginnt (Bers, 2001).

Die 4. Phase ist schließlich die des Ruhemembranpotentials. Dieses bleibt durch die Öffnung der einwärtsgerichteten Gleichrichtungskanäle (*inward rectifier channels*) stabil bis das nächste Aktionspotential ausgelöst wird (siehe Abbildung 4, Kasten A).

Im Gegensatz zur Skelettmuskelzelle, in der das Aktionspotential für die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich ist (Bers, 2001), hat die alleinige Depolarisation der Herzmuskelzelle keinen derartigen Effekt (siehe Kapitel 1.2.3) (Näbauer *et al.*, 1989).

1.2.2 Wichtige Kanäle und Strukturen

Der L-Typ Kalziumkanal (LTCC) wird aufgrund seiner Beeinflussbarkeit durch 1,4-Dihydropyridin auch Dihydropyridinrezeptor genannt und ist hauptsächlich in den T-Tubuli nahe dem sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Wibo *et al.*, 1991). Er ist spannungsabhängig und öffnet sich ab ca. -40 mV, um Ca^{2+} entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle einströmen zu lassen (Schmidt *et al.*, 2003).

Die Schließung erfolgt einerseits spannungsabhängig bei Repolarisation, andererseits durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch eine negative Rückkopplung als Regulation gegeben ist (Bers, 2002). Der Anteil des Kalziums, der

durch den LTCC in die Zelle strömt, reicht jedoch nicht aus, um eine Kontraktion auszulösen. Deswegen ist seine Hauptaufgabe die Stimulation der Kalziumfreisetzung aus dem SR (Fabiato, 1983).

Das SR ist ein membranbegrenzter Hohlraum, fungiert als Kalziumspeicher der Herzmuskelzelle und bildet mit seinen terminalen Zisternen und den T-Tubuli die sogenannten Diaden aus (Lüllmann-Rauch, 2009). Von seinen zahlreichen Kanälen und Transportern seien hier vor allem der Ryanodin-Rezeptor (RyR) und die SR-Kalzium-ATPase (SERCA) genannt.

Der RyR liegt in der Isoform RyR2 im menschlichen Herzen vor und ist der wichtigste Kanal für die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR. Dabei ist er in einen makromolekularen Komplex mit zahlreichen regulatorischen Proteinen eingebunden, mit denen er interagiert (Bers, 2004). Er ist vor allem in den terminalen Zisternen des SR lokalisiert, nahe den LTCC, mit denen er die sogenannten *Couplons* (Kupplungen) bildet (Franzini-Armstrong *et al.*, 1999). Seine Offenwahrscheinlichkeit wird durch verschiedene Kalziumkonzentrationen im Zytoplasma und im SR beeinflusst (Bers, 2002). Die Termination der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Freisetzung ist nicht abschließend geklärt, laut Bers (Bers, 2002) kommen jedoch drei mögliche Mechanismen in Betracht: Die erste Theorie ist, dass über *coupled gating* (benachbarte Kanäle befinden sich im gleichen Öffnungszustand) eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, dass alle Kanäle gleichzeitig schließen werden. Dies wird jedoch von Sham *et al.* (Sham *et al.*, 1998) abgelehnt. Lukyanenko *et al.* (Lukyanenko *et al.*, 1998) argumentieren sowohl gegen die erste, als auch die zweite Theorie, nämlich dass die Ca^{2+} -Freisetzung durch lokale Depletion an der SR-Seite des RyR beendet wird. Die heute gängige ist die dritte Theorie, nach der ein RyR durch das hohe intrazelluläre Ca^{2+} gehemmt wird bzw. im Sinne einer Adaptation die Offenwahrscheinlichkeit des RyR über die Zeit sinkt und er erst wieder durch hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen reaktiviert werden kann (Bers, 2002).

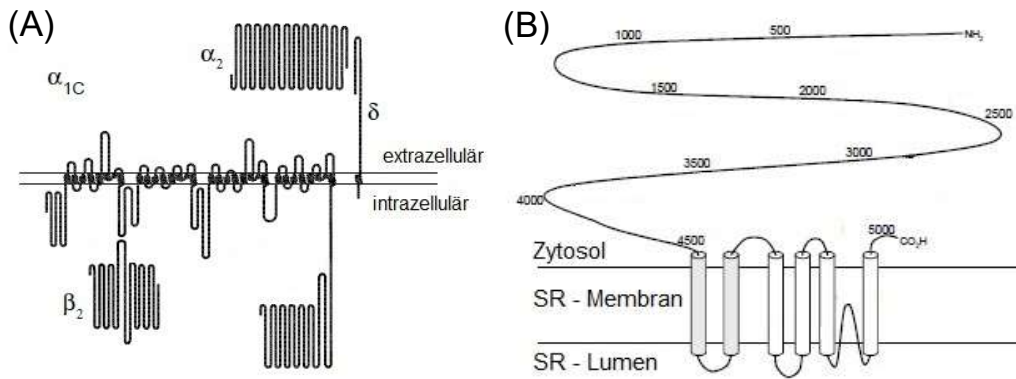


Abbildung 2: Der LTCC und der RyR2

(A): Hier ist die α_{1c} -Untereinheit des kardialen LTCC und ihre Interaktion mit der β_2 -Untereinheit und der α_2 - und δ -Untereinheit gezeigt. In (B) sieht man den kardialen RyR2 (Bers, 2001).

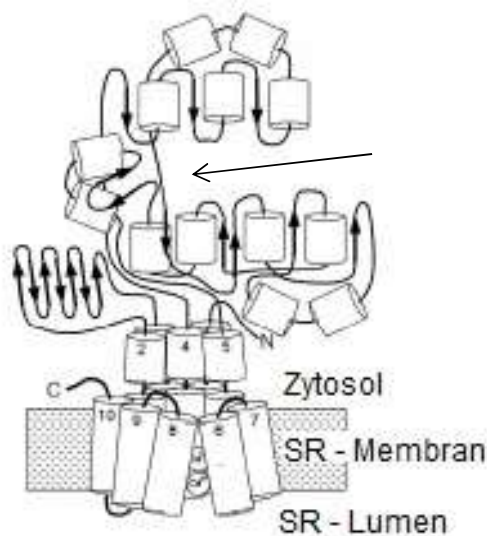
Die SERCA liegt im menschlichen Herzen als Isoform SERCA2a vor und pumpt unter Energieaufwand das Kalzium, das durch den RyR2 freigesetzt wurde wieder in das SR zurück. Dabei werden jeweils zwei Ca^{2+} -Ionen durch die Spaltung eines Moleküls Adenosintriphosphat (ATP) über die Membran bewegt (Erkasap, 2007). Dieser Transporter ist der wichtigste Mechanismus zur Beendigung der Kontraktion und der Auffüllung des SR mit Ca^{2+} , da er in humanen ventrikulären Herzmuskelzellen bis zu 70 % des systolischen Kalziums in das SR pumpt (Bers, 2002). Zu einem sehr geringen Teil wird das Kalzium vom mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter und der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase aus dem Zytosol gepumpt. Der größte Teil der verbleibenden 30% wird vom NCX übernommen (28%), auf den im Kapitel 1.4 gesondert eingegangen wird.

Für die Funktion des NCX, sowie zahlreicher weiterer Transporter in der Zellmembran der Kardiomyozyten, ist der Na^+ -Gradient über die Membran entscheidend. Um diesen aufrecht zu erhalten, ist die permanente Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase vonnöten (Shattock *et al.*, 2015). Sie wurde erstmals 1957 beschrieben (Skou, 1957) und befördert unter der Spaltung von einem Molekül ATP drei Na^+ -Ionen von intra- nach extrazellulär und zwei K^+ -Ionen von extra- nach intrazellulär (Kaplan, 2002) (siehe Abbildung 4).

Die Na⁺-K⁺-ATPase besteht aus drei Untereinheiten, der α-, β- und γ-Untereinheit (siehe Abbildung 3). Letztere besteht im Herzen aus Phospholemman, welches nach Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C zu einer Stimulierung der Aktivität führt (Shattock *et al.*, 2015). Die α-Untereinheit existiert in den Kardiomyozyten vorwiegend entweder als α₁-, α₂- oder α₃-Isoform, welche unterschiedliche Funktionen haben. So sorgt erstere für die Aufrechterhaltung des Gesamthaushaltes des zellulären Natriums, während die zweite speziell in den Diaden aktiv ist und somit direkten Einfluss auf den Kalziumausstrom während des Aktionspotentials hat (Despa *et al.*, 2012).

Durch die sogenannten Herzglykoside, wie Digitoxin oder Digoxin ist eine Inhibition der Na⁺-K⁺-ATPase möglich (Kaplan, 2002). Dabei ist zu beachten, dass die Glykoside eine erhöhte Selektivität für die α₂-Isoform besitzen (Katz *et al.*, 2010). Dadurch kommt es zu einem intrazellulären Na⁺-Anstieg sowie zur Depolarisation der Zellen.

(A)



(B)

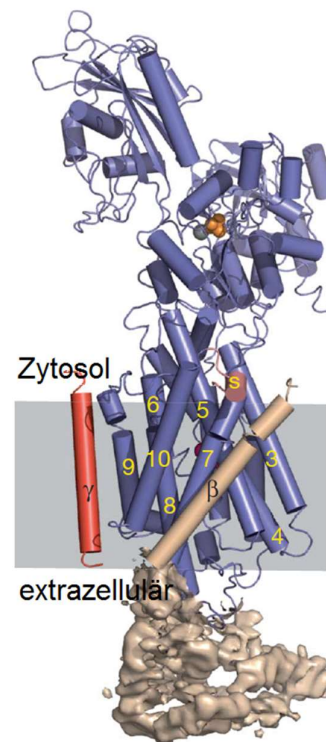


Abbildung 3: Struktur der SERCA2a und der NKA

(A): Struktur der kardialen SERCA2a. Durch den Pfeil markiert ist die Region der ATP-Spaltung (Bers, 2001). (B): Struktur der Na⁺-K⁺-ATPase, mit der α-, β- und γ-Untereinheit in blau, braun und rot (Morth *et al.*, 2007).

1.2.3 Die Funktionen des Kalziums

Bereits Ringer konnte 1883 in seinen Experimenten mit Froschherzen zeigen, dass Kontraktionen in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} nicht zustande kamen und stellte somit fest, dass Ca^{2+} eine entscheidende Rolle für die elektromechanische Kopplung spielt (Ringer, 1883).

Einerseits sorgt das von extrazellulär einströmende Ca^{2+} für die Freisetzung des sarkoplasmatischen Ca^{2+} , genannt *Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR)* (Fabiato, 1983). Hierbei interagieren in der Diade in den *Couplons* je ca. 25 LTCC mit 100 RyR2 (Franzini-Armstrong *et al.*, 1999). Diese werden durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Diade aktiviert und lassen das sarkoplasmatische Ca^{2+} ausströmen, wodurch es in der Diade zu Ca^{2+} -Konzentrationen von über 100 $\mu\text{mol/l}$ kommt und die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration steigt (Bers, 2014).

Andererseits führt der starke Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration von ca. 100 nmol/l während der Diastole auf über 1 $\mu\text{mol/l}$ während der Systole (Bers, 2001) letztlich zu einer Verschiebung der Myofilamente gegeneinander und somit zur Kontraktion.

Bei dieser sogenannten Gleitfilamenttheorie kommt es zur Bindung des Kalziums an Troponin C, wodurch die Bindungsstelle des Myosins an den Aktinfilamenten freigegeben wird und die Myosinköpfe durch das Spalten von ATP an den Aktinfilamenten entlangwandern können (Huxley, 1969).

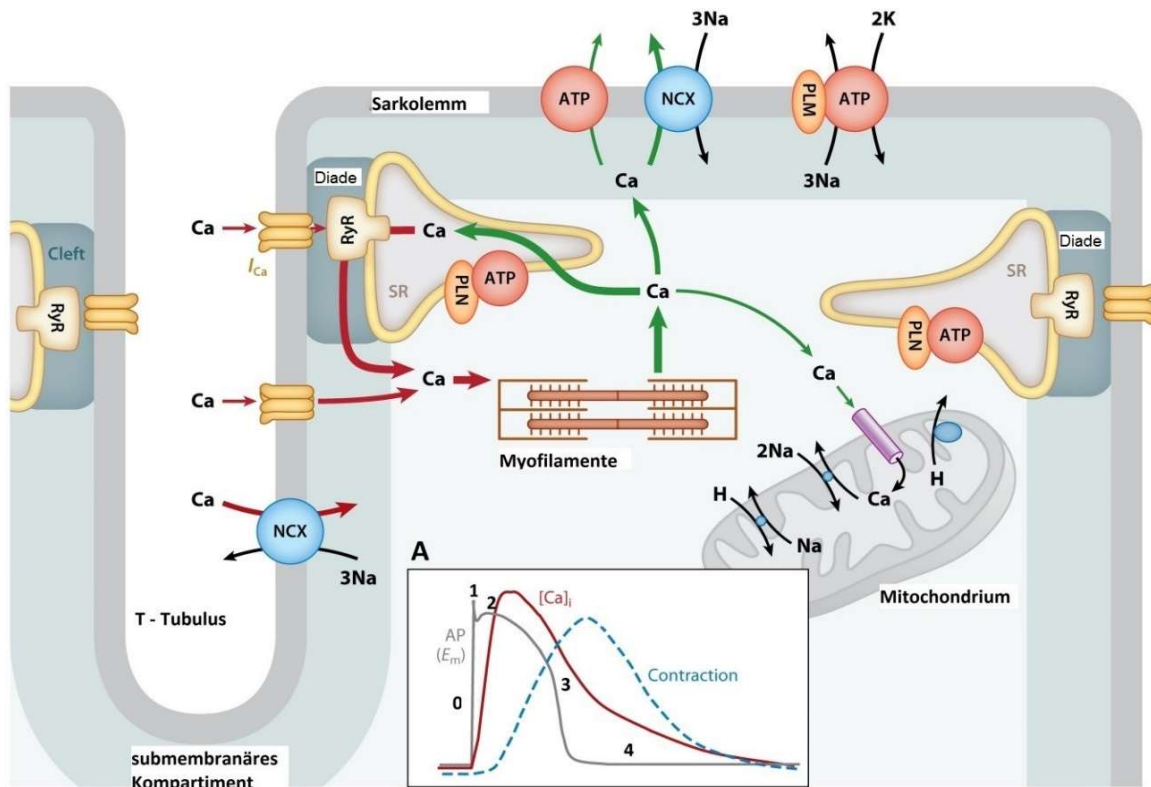


Abbildung 4: Die Elektromechanische Kopplung und das Aktionspotential

Die roten Pfeile stellen die Wege des Kalziums in das Zytosol, die grünen Pfeile Wege aus dem Zytosol dar. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den verschiedenen Kompartimenten (submembranär, Diade). Im Kasten A sind die verschiedenen Phasen des Aktionspotentials, die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Kontraktion der Zelle über die Zeit dargestellt. Adaptiert aus (Bers, 2014).

1.3 Der Natrium Kalzium Austauscher (NCX)

Da in dieser Dissertation der Effekt eines NCX-Inhibitors getestet wurde, sollen der Kanal, seine Struktur und insbesondere seine Funktion im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.1 Struktur und Anatomie des NCX

Der NCX liegt in seiner Isoform NCX1.1 im Sarkolemm menschlicher Kardiomyozyten vor und besteht aus 938 Aminosäuren (Nicoll *et al.*, 1990).

Lange Zeit wurden ihm neun Transmembrandomänen zugeschrieben. Allerdings zeigen neueste Studien zu seinem prokaryotischen Homolog, dem NCX_Mj aus dem Archeabakterium *Methanococcus jannaschii* eine Sekundärstruktur mit zehn Transmembrandomänen (Liao *et al.*, 2012).

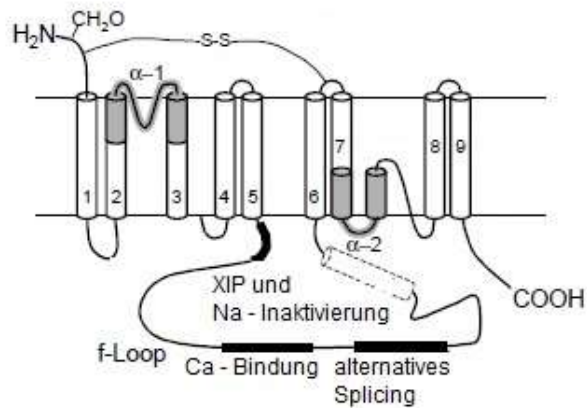
Auch wenn es große Unterschiede im Aufbau zwischen dem eukaryotischen NCX und dem NCX_Mj gibt, so wird dennoch vermutet, dass auch der NCX zehn Transmembrandomänen besitzt. Diese können in zwei Fünfergruppen je am N- und C-terminalen Ende unterteilt werden können, die durch einen großen intrazellulären *Loop* (Schleife) getrennt sind (siehe Abbildung 5) (Ren and Philipson, 2013).

Dieser *Loop* enthält ca. 59 % der Aminosäuren des kompletten Moleküls und ist für die Regulation des NCX durch Na^+ , Ca^{2+} , ATP und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) verantwortlich (Ottolia *et al.*, 2005). Hierfür enthält er unter anderem zwei kalziumbindende Domänen, die eine allosterische Aktivierung durch Ca^{2+} ermöglichen und die XIP-Region (*eXchanger Inhibitory Peptide*), welche in Inaktivierungsprozesse involviert ist (Philipson *et al.*, 2002).

Außerdem befindet sich hier die Region des alternativen Spleißens, welche den Unterschied zwischen der herzspezifischen Form, NCX1.1 und anderen Formen, wie NCX1.3 (Niere) oder NCX1.4 (Gehirn) ausmacht (Philipson *et al.*, 2002).

Teile der Transmembrandomänen 2/3 und 7/8 mit ihren jeweiligen Verbindungen bilden die sogenannten *α -repeats* aus. Das sind Regionen mit intramolekularer Homologie, die sehr wahrscheinlich für den eigentlichen Ionentransport verantwortlich sind (Ottolia *et al.*, 2005).

(A)



(B)

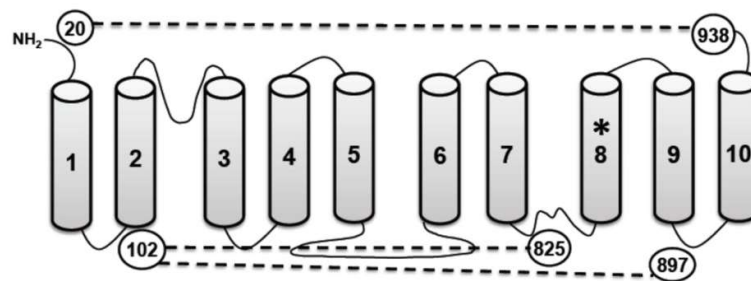


Abbildung 5: Das Modell des NCX1

(A): Die lange Zeit angenommene Variante mit neun Transmembrandomänen. Zu beachten ist hierbei der große f-Loop mit den Bindungsstellen für XIP, Na⁺, sowie Ca²⁺ und die Region des alternativen Spleißens (Bers, 2001); (B): Das heute akzeptierte Modell mit zehn Transmembrandomänen (Ren and Philipson, 2013).

Der NCX ist über Ankyrin B in der Zellmembran verankert und eventuell mit der Natrium-Kalium-ATPase und dem Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor in einem Komplex verbunden (Mohler *et al.*, 2005). Über die genaue Verteilung des NCX über die Zellmembran, insbesondere die Konzentration in den T-Tubuli und die Assoziation mit den Diaden, welche dramatische Unterschiede für die Funktion und die Involvierung in die elektromechanische Kopplung bedeuten würden, herrscht noch keine Klarheit (Shattock *et al.*, 2015). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass nicht nur der Anstieg der Kalziumkonzentration über die ganze Zelle, sondern auch der lokale Anstieg der Konzentration nahe der Diade schon zu einer Aktivierung des NCX-Stroms führt, was für eine erhöhte Anzahl an NCX in den T-Tubuli spricht (Acsai *et al.*,

2011). Zurzeit wird deshalb von einer Assoziation von 15 % aller NCX mit den Diaden ausgegangen, während der Rest über die Membran verteilt ist (Shattock *et al.*, 2015). Daraus ergeben sich die zwei wichtigen Aufgaben des NCX im Herzen.

1.3.2 Die Funktion des NCX

Grundsätzlich werden über den NCX jeweils drei Na⁺-Ionen gegen ein Ca²⁺-Ion passiv entlang ihres elektrochemischen Gradienten ausgetauscht. Da hierbei eine Ladungsverschiebung stattfindet, ist die Aktivität auch vom Membranpotential abhängig. Der Austausch ist in beide Richtungen möglich: wenn Kalzium aus der Zelle und Natrium in die Zelle fließt, wird das *forward mode* (Vorwärtsmodus) genannt, im umgekehrten Fall *reverse mode*, Rückwärtsmodus (Bers, 2001).

Aufgrund seiner Abhängigkeit vom Membranpotential und den Ionenkonzentrationen läuft der NCX während des Aktionspotentials meist im *forward mode*. Eine seiner Hauptaufgaben ist somit die Entfernung des durch den LTCC eingeströmten Kalziums aus der Zelle, wodurch er seinen Beitrag zur Relaxation leistet (Bers, 2002). Nur bei sehr positiven Potentialen und/oder hoher intrazellulärer Natriumkonzentration kommt es zur Umkehr in den *reverse mode*. Dies geschieht beispielsweise in Phase 0 des Aktionspotentials (siehe 1.2). Es wird vermutet, dass dieser kurze Kalziumeinstrom in die Zelle entscheidend sein könnte, um den CICR über ein sogenanntes *primen* (im Sinne einer Vorbeladung) der Diade mit Kalzium zu fördern (Neco *et al.*, 2010).

1.4 Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Zellen

Wie oben bereits angedeutet, gibt es zwischen den atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten bedeutende strukturelle Unterschiede, die auf den unterschiedlichen physiologischen Funktionen beruhen (Bootman *et al.*, 2011).

In den atrialen Zellen gibt es nur rudimentär ausgebildete T-Tubuli und die RyR2 sind über die ganze Zelle verteilt, sodass es nur in der Peripherie der Zelle zur Ausbildung von Diaden kommt (Smyrnias *et al.*, 2010). Beim AP kommt es zunächst lediglich zu einer Ca²⁺-Freisetzung im Randgebiet der Zelle, die Ausbreitung derselben über die ganze Zelle ist jedoch unter anderem von der SR-Ca²⁺-Beladung und der Anwesenheit von Katecholaminen abhängig (Mackenzie *et al.*, 2004).

Außerdem wird in atrialen Kardiomyozyten vermehrt SERCA2a exprimiert, wodurch auch die schnellere Ca^{2+} -Elimination erklärt wird. Zwar ist in den Vorhofzellen auch ein Protein namens Sarcolipin vorhanden, welches die SERCA2a blockiert, dieses ist jedoch bei Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern vermindert, wodurch sich in diesen Fällen eine SR- Ca^{2+} -Überladung ergeben kann (Uemura *et al.*, 2004).

Der NCX ist in atrialen Kardiomyozyten um bis zu 50 % weniger exprimiert und aufgrund der fehlenden T-Tubuli auch nur in der Peripherie der Zellen vorhanden (Wang *et al.*, 1996).

All diese Unterschiede führen zu einem veränderten Kalziumhaushalt und auf den ersten Blick zu einer weniger effektiven elektromechanischen Kopplung. Dabei ist zu beachten, dass die strukturellen Unterschiede sehr variabel ausgebildet sind. Das ist einerseits speziesabhängig, kann andererseits aber innerhalb einer Spezies und sogar innerhalb eines Vorhofs von Zelle zu Zelle variieren (Bootman *et al.*, 2011). So besitzen menschliche atriale Kardiomyozyten wahrscheinlich durchaus organisierte T-Tubuli, welche wiederum bei Vorhofflimmern reduziert sind (Bootman *et al.*, 2011; Louch *et al.*, 2010).

1.5 Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern

Wie bereits zu Anfang erwähnt, zählen die Herzinsuffizienz und das Vorhofflimmern zu den häufigsten Krankheitsbildern der westlichen Industrienationen. Als potentielle Einsatzgebiete eines NCX-Inhibitors sind sie für diese Arbeit besonders relevant und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.5.1 Grundlagen der Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man eine Situation, in der das Herz aufgrund einer Störung nicht mehr in der Lage ist, den Organismus entsprechend seines Energie- und Nährstoffbedarfs mit ausreichend Blut zu versorgen (Schettler and Andrassy, 1998).

Da die Herzinsuffizienz keine eigenständige Erkrankung, sondern ein Symptomkomplex ist, sind auch die Ursachen vielfältig. So können beispielsweise entzündliche oder ischämische Ereignisse zum Zelluntergang führen. Außerdem kann aufgrund von erhöhter Druck- oder Volumenbelastung durch arterielle Hypertonie oder

Klappeninsuffizienzen eine Ventrikeldilatation und somit letztlich die Herzinsuffizienz entstehen (Schettler and Andrassy, 1998).

Auf zellulärer Ebene führen strukturelle und proteinbiochemische Umbauprozesse (das sogenannte *Remodeling*) unter anderem zu veränderten Ionenströmen. Diese erhöhen einerseits das Risiko für Arrhythmien und fördern andererseits die Entstehung von kontraktile Dysfunktion.

Zur kontraktile Dysfunktion kommt es bei der Herzinsuffizienz insbesondere aufgrund des veränderten Kalzium- und Natriumhaushalts. Bei hoher Herzfrequenz kommt es deswegen nicht mehr zu einer vermehrten Kraft, sondern zu einer Abnahme derselben (Hasenfuss and Pieske, 2002). Ursächlich für die systolische Funktionsstörung ist dabei eine verminderte Befüllung des SR mit Ca^{2+} , da die SERCA bei Herzinsuffizienz weniger, der NCX aber mehr exprimiert wird und das SR Kalziumleck erhöht ist (Hasenfuss and Pieske, 2002; Marx *et al.*, 2000).

Zur diastolischen Funktionsstörung trägt ein erhöhter Natriumgehalt der Zelle bei, welcher dann sekundär über den reverse NCX zu einer Kalziumüberladung führt (Pieske *et al.*, 2002).

1.5.2 Das Vorhofflimmern

Das Vorhofflimmern gilt als häufigste Form der Arrhythmie und erhöht die Morbidität und Mortalität der Patienten (Dobrev, 2010). Es kommt dabei über sog. *Reentry*-Mechanismen zu kreisenden Erregungen, die zu Flimmerfrequenzen von ca. 350/min führen (Bootman *et al.*, 2011).

Grundsätzlich müssen für das Entstehen der kreisenden Erregungen zwei Grundbedingungen erfüllt sein:

Erstens muss das Substrat, sprich der Zellverband, durch eine strukturelle Veränderung den *Reentry* möglich machen. Zweitens muss ein Trigger, sprich ektope Erregungen, den *Reentry* auslösen. Wenn es dadurch zum Vorhofflimmern kommt, führt dies zu einem *Remodeling*, wodurch sich das Flimmern in einem *Circulus vitiosus* selbst erhält (Dobrev, 2010).

Die zellulären Grundlagen von ektopten Erregungen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: frühe und späte Nachdepolarisationen, EADs (*early afterdepolarisations*) und DADs (*delayed afterdepolarisations*).

Bei den EADs kommt es während der Plateauphase des Aktionspotentials (Phase 2, siehe Kapitel 1.2) zu einer Reaktivierung des LTCC, was durch zwei Mechanismen verursacht werden kann. Einerseits führen prolongierte Plateauphasen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des LTCC (Wu *et al.*, 2002). Dies wird z.B. durch die vermehrte Aktivität von sogenannten späten Natriumströmen verursacht (Wagner *et al.*, 2006; Maltsev *et al.*, 2001). Andererseits kann es durch einen spontanen Kalziumeinstrom zu NCX-Aktivität kommen, welche über einen Natriumeinstrom eine Depolarisation verursacht (January and Moscucci, 1992; Sato *et al.*, 2017).

Zu den DADs kommt es bei der Herzinsuffizienz durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 (Marx *et al.*, 2000). Das so während der Diastole ausgeschüttete Kalzium gelangt durch den NCX im Austausch gegen Natrium nach extrazellulär. Da es hierbei auch zur Ladungsverschiebung kommt, führt dies zur Depolarisation (Sipido *et al.*, 2007).

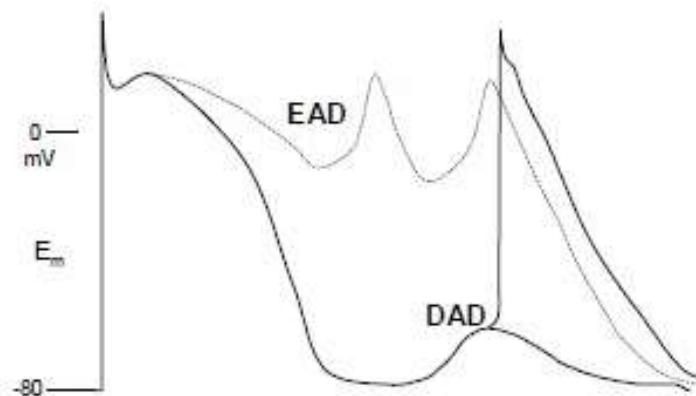


Abbildung 6: Die Entstehung von EADs und DADs

Gezeigt ist zum einen die Entstehung eines EAD aus der Plateauphase des Aktionspotentials und zum anderen die Entstehung eines DAD aus der Phase des Ruhemembranpotentials (Bers, 2001).

1.5.3 Der NCX bei Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern

Ob, wie oben angenommen der NCX bei Herzinsuffizienz tatsächlich vermehrt exprimiert und aktiv ist, wurde oft angezweifelt, aber von vielen Arbeitsgruppen immer wieder nachgewiesen (Studer *et al.*, 1994; Antoons *et al.*, 2012; Shattock *et al.*, 2015). Diese vermehrte Aktivität trägt, wie oben dargestellt, maßgeblich zu der Entstehung von Arrhythmien über die erhöhte Wahrscheinlichkeit für DADs bei.

Außerdem kann die systolische und diastolische Dysfunktion, sowohl über die Kalziumdepletion des SR, als auch durch die Kalziumüberladung der Zelle während der Diastole verschärft werden (siehe Kapitel 1.5.1).

1.6 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, welchen Einfluss die Blockade des NCX1 in humanen Kardiomyozyten mit einem neuartigen Inhibitor auf den Kalziumhaushalt einerseits und die Aktionspotentialmorphologie andererseits hat.

Es sollen somit indirekt Rückschlüsse auf die Arrhythmogenität und die Auswirkungen auf die Inotropie einer derartigen Blockade gezogen werden.

Dazu wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Die Behandlung von humanen Vorhof- und Ventrikelzellen mit dem neuartigen NCX-Inhibitor führt zu einer veränderten diastolischen Kalziumfreisetzung.
2. Es kommt dabei zu einer veränderten Kalziumbeladung des sarkoplasmatischen Retikulums.
3. Zwischen den ersten beiden Punkten besteht ein direkter Zusammenhang.
4. Die Entfernung des Kalziums aus dem Zytoplasma wird durch das Medikament konzentrationsabhängig beeinflusst.
5. Die Behandlung von humanen Vorhofzellen mit dem Inhibitor führt zu einer veränderten Aktionspotentialmorphologie.
6. Das Medikament hat einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit zur Arrhythmieentstehung auf zellulärer Ebene.

2. Material und Methoden

2.1 Die Isolation humaner Kardiomyozyten

Die Forschung insbesondere mit menschlichen Zellen sowie die Verwendung von Patientendaten stellen eine ethische Herausforderung dar und müssen GCP-konform (gute klinische Praxis-konform) erfolgen. So müssen insbesondere unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes viele Dinge beachtet werden (WMA - Generalversammlung, 1964). Vor Beginn der Studie wurde das Studienprotokoll der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg vorgelegt und durch ein Ethikvotum bewilligt. Die teilnehmenden Patienten erlitten durch das Mitmachen keinerlei gesundheitlichen Schaden. Jeder Teilnehmer wurde durch qualifiziertes Fachpersonal ausführlich über Risiken, Nutzen und den Ablauf der Studie sowie die Verwendung der Daten aufgeklärt. Erst nach der schriftlichen Einwilligung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen. Die Patientendaten wurden initial erhoben und zur Anonymisierung dann einer Nummer zugeordnet. Die Archivierung der Primärdaten erfolgt in der Universitätsklinik Regensburg. Diese sollen 10 Jahre erhalten und dann vernichtet werden.

2.1.1 Die Isolation linksventrikulärer humaner Kardiomyozyten

Für die Probengewinnung konnte in Zusammenarbeit mit der Herz- und Thoraxchirurgie des Uniklinikums Regensburg ein Teil des linken Ventrikels von Patienten, die eine Herztransplantation oder eine Myektomie erhielten, entnommen werden. Das Gewebe wurde direkt nach der Operation in Custodiol (Dr. Franz Köhler Chemie GMBH V08/08.13) gegeben und gekühlt in das Labor transportiert.

Hier wurde das Herzstück mit einer Schere von Fett und Bindegewebe befreit und im Anschluss in kleine, 1-2 mm³ große Würfel geschnitten.

Um vom Gewebe Blut und andere lose Bestandteile zu entfernen, wurden die Stückchen in ein Becherglas mit einem Magnetrührstab in Joklik Minimal Essential Medium (JMEM)-Lösung (siehe Tabelle 8) gegeben, mehrfach abfiltriert und gewaschen.

Für den ersten Verdauschritt wurden in 18 mL JMEM 0,02 g Collagenase 2 und 2 mL Trypsin (siehe Tabelle 9) gelöst und das Gewebe für 45 Minuten bei 37°C darin

inkubiert und gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung durch ein Zellsieb mit 250-300 µm Porendurchmesser gegossen, die Flüssigkeit für 10 Minuten mit 900 Umdrehungen pro Minute bei 95 x g ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Stopplösung (siehe Tabelle 7) resuspendiert und unter dem Mikroskop beurteilt.

Das im Filter hängengebliebene Gewebe wurde in den nächsten Verdauschritt überführt. Ab dem zweiten Verdauschritt wurde die Menge an Collagenase immer weiter reduziert und auf Trypsin verzichtet. Die Verdauzeit pro Schritt betrug nun 15 Minuten. Das restliche Prozedere entsprach dem des ersten Verdauschritts. In der Regel konnte der Verdau nach 6 Stufen beendet werden, da die Zellen hiernach stetig schlechter wurden.

Nur die Überstände mit Zellen, die unter dem Lichtmikroskop eine deutliche Querstreifung aufwiesen, deren Kanten deutlich und gerade waren und bei denen keine oder kaum intrazelluläre Granula sichtbar waren, wurden für die Messungen verwendet.

Das Protokoll wurde übernommen und abgewandelt von der Arbeitsgruppe um Sossalla (Sossalla *et al.*, 2010).

2.1.2 Die Isolation rechtsatrialer humaner Kardiomyozyten

Für die Probengewinnung konnte in Zusammenarbeit mit der Herz- und Thoraxchirurgie des Uniklinikums Regensburg jeweils das rechte Herzohr, das im Rahmen von Bypass-Operationen für das Anlegen der Herz-Lungen-Maschine entfernt wird, direkt im Operationssaal in Custodiol (Dr. Franz Köhler Chemie GMBH V08/08.13) überführt und auf Eis gekühlt in das Labor gebracht werden. Hier wurde es mit einer Schere von Fett und Bindegewebe befreit und gewogen. Nur bei einem Gewicht >70 mg wurde eine Isolation vorgenommen. Hierfür wurde der Herzmuskel in 1-2 mm³ große Würfel geschnitten und in Isolationstyrode (siehe Tabelle 5) gewaschen, indem das Gewebe immer wieder in eine neue Lösung in einem Becherglas mit Magnetührstab gegeben, gerührt und abfiltriert wurde.

Für den ersten Verdauschritt wurden 0,0154 g Collagenase 1 und 0,0080 g Protease (siehe Tabelle 9) in 20 mL Isolationstyrode gelöst und das Gewebe unter O₂-Begasung bei 37°C für 45 Minuten darin inkubiert und gerührt. Nach 10 Minuten wurden 40 µL 10

mmol/l CaCl_2 zugegeben, was auf das Gesamtvolumen umgerechnet 20 $\mu\text{mol/l}$ entsprach.

Danach wurde alles abfiltriert und die Gewebestücke in den zweiten Verdauschritt überführt. Hierbei handelte es sich wieder um 20 mL Isolationstyrode mit 0,0154 g Collagenase 1 und 20 $\mu\text{mol/l}$ CaCl_2 , auf die Protease wurde verzichtet. Abermals bei 37°C und unter O_2 -Begasung, wurde das Gewebe nun gerührt und nach 10 Minuten zum ersten Mal überprüft. Dafür wurden die Gewebestücke mit einer Schere noch einmal kleiner geschnitten, mit einer Pasteurpipette mit großer Öffnung auf und ab pipettiert und im Anschluss 10 μL der Lösung unter dem Mikroskop angesehen. Diese Überprüfung wurde in immer kürzeren Abständen wiederholt, bis Zellen unter dem Mikroskop sichtbar waren, beziehungsweise die Zahl der Zellen nicht mehr anstieg.

Dann wurde die Stopplösung (siehe Tabelle 7) zu dem Gewebe in der Enzymlösung gegeben, alles noch einmal gerührt, geschnitten, auf und ab pipettiert und anschließend durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 200 $\mu\text{mol/l}$ in ein Falconröhrchen gegossen. Der Siebinhalt wurde in 25 mL storage-Lösung (siehe Tabelle 6) gegeben, gerührt, geschnitten, auf und ab pipettiert und wieder in ein Falconröhrchen abgesiebt.

Die beiden Filtrate wurden nun für 10 Minuten mit 900 Umdrehungen pro Minute bei 95 x g ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden mit 500 μL storage-Lösung resuspendiert. Für den darauffolgenden Kalziumaufbau wurde die Kalziumkonzentration zunächst auf 0,2 mmol/l und nach 10 Minuten auf 0,3 mmol/l gehoben. Im Anschluss konnten die Zellen ausplattiert und gemessen werden. Das Protokoll wurde übernommen und abgewandelt von der Arbeitsgruppe um Escande (Escande *et al.*, 1986).

2.2 Die Fluoreszenzmikroskopie

Mittels konfokalem Lasermikroskop können Fluoreszenzfarbstoffe auf Zellebene gemessen werden. Diese haben die Eigenschaft, nach Bindung bestimmter Ionen ihr emittiertes Lichtspektrum oder die Intensität der Emission zu ändern. Somit kann das Verhalten der bindenden Ionen über die Zeit beobachtet und gemessen werden.

2.2.1 Die Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe besitzen durch ihre Struktur mit vielen freien Elektronenpaaren die Eigenschaft, Photonen einer bestimmten Wellenlänge absorbieren zu können, wodurch das System auf ein höheres, instabiles Niveau gehoben wird. Dazu sind insbesondere aromatische Ringstrukturen geeignet. Nach wenigen Nanosekunden findet ein Abfall auf das Ausgangsniveau statt. Dabei kommt es zur Emission von Photonen mit weniger Energie, sprich größerer Wellenlänge, als die Photonen, die absorbiert wurden, da Energie als Wärme verloren geht. Die Differenz in der Wellenlänge der absorbierten und emittierten Photonen wird als *Stokes-Shift* bezeichnet und ist der entscheidende Faktor, um Fluoreszenz zu messen. Durch das Auftrennen des Lichts nach verschiedener Wellenlänge kann so bestimmt werden, wieviel Licht an welcher Stelle durch den Farbstoff emittiert wird (Lichtman and Conchello,2005).

Um nun Zellstrukturen oder wie in diesem Fall, Ionen darstellen zu können, muss der Farbstoff einerseits selektiv daran binden und andererseits seine Fluoreszenzeigenschaften durch die Bindung verändern (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Die Arbeitsgruppe um Tsien (Tsien, 1980) entwickelte aus Derivaten von BAPTA [1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid], das mit dem Chelatkomplexbildner EGTA [ethylene glycol bis(/3-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid] verwandt ist, Stoffe mit sehr guter und spezifischer Kalziumbindung. Für die Änderung der Fluoreszenz durch die Bindung an das Zielmolekül gibt es zwei Gruppen von Farbstoffen mit unterschiedlichen Eigenschaften.

Ratiometrische Farbstoffe verändern bei der Bindung die Wellenlänge ihres Absorptions- oder Emissionsmaximums.

In dieser Arbeit kamen jedoch nicht-ratiometrische Farbstoffe zum Einsatz. Zu dieser Gruppe gehört auch Fluo-3. Es emittiert und absorbiert bei konstanten Wellenlängen, sowohl im gebundenen, als auch im ungebundenen Zustand und verändert nur die Intensität der Emission um das bis zu 200-fache (Harkins *et al.*, 1993). Somit ergibt sich im Gegensatz zu den ratiometrischen Farbstoffen ein günstigeres Verhältnis zur Hintergrundfluoreszenz.

Fluo-4 (siehe Abbildung 4), mit dem die Messungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist ein Analogon zu Fluo-3 mit dem Unterschied, dass hierbei zwei Chloratome durch zwei Fluoratome ausgetauscht wurden, wodurch sich eine Verbesserung der Fluoreszenzintensität ergibt (Gee *et al.*, 2000). Sein Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 350 nm und durch seine Dissoziationskonstante $K_D = 350 \text{ nmol/l}$ können sehr sensitiv schon geringe Änderungen der Kalziumkonzentration detektiert werden (*The Molecular Probes Handbook*).

Um mit Fluo-4 das zytosolische Kalzium messen zu können, muss ein Weg gefunden werden, den Farbstoff in die Zelle zu bringen und dort zu behalten. Dies wird durch eine Veresterung mit einer Azetoxymethylgruppe (AM) erreicht (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Diese zusätzliche Gruppe macht das Molekül lipophil und somit membranpermeabel (siehe Tabelle 3).

Wenn der Farbstoff in der Zelle ist, wird die AM-Gruppe durch zytosolische Esterasen abgespalten und das Molekül ist in der Zelle gefangen.

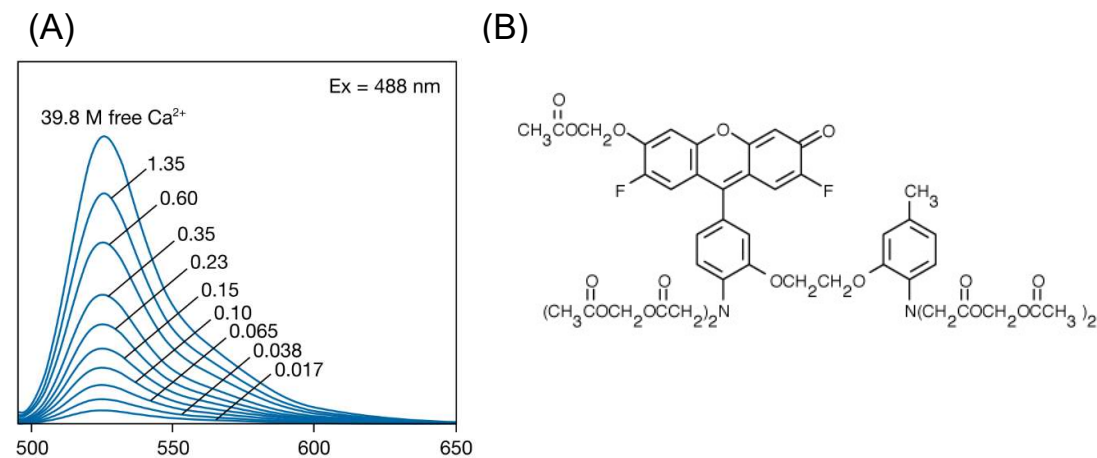


Abbildung 7: Fluo-4

(A): Emissionsspektrum Fluo-4. (B): Strukturformel von Fluo-4AM (*The Molecular Probes Handbook*).

2.2.2 Das Konfokalmikroskop

Mit dem konfokalen Lasermikroskop können fluoreszierende Farbstoffe gemessen werden. Durch spezielle Lochblenden kann ausschließlich die Fluoreszenz der

Fokusebene gemessen werden. Die anderen Ebenen werden dabei ausgeblendet und dadurch ein sehr scharfes Bild mit wenig Hintergrundrauschen erzeugt (Minsky, 1988).

Dies wird auf der einen Seite erreicht durch eine punktuelle Beleuchtung mit Laserlicht, das die Probe im Sinne einer Zerlegung in Pixel abscannt.

Auf der anderen Seite muss die emittierte Fluoreszenz der im Fokus liegenden Schicht aufgezeichnet werden, wie in Abbildung 8 gezeigt (Corle and Kino, 1996).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Linescan-Modus* wurde eine Bildzeile mit definierter Pixelanzahl immer wieder über einen definierten Zeitraum abgebildet. Das Laserlicht gelangte dabei über ein doppeltes Linsensystem und das Objektiv zur Probe, um den Strahlengang von Belichtung und Abbildung der Probe zu vereinheitlichen. Dies musste außerdem zeitlich synchronisiert ablaufen.

Das auf diese Weise vom angeregten Fluo-4 emittierte Licht wurde durch einen dichroitischen Spiegel zur Lochblende geleitet.

Der dichroitische Filter hat die Eigenschaft, Licht mit größerer Wellenlänge passieren zu lassen und Licht mit geringerer Wellenlänge zu reflektieren. In diesem Aufbau wurde die kritische Schwelle so gewählt, dass das Anregungslicht auf die Probe gelenkt wurde und das emittierte Licht durch die Lochblende zum Photomultiplier gelangte.

Hierbei musste ein Kompromiss aus möglichst kleiner Lochblende, sprich optimalem Kontrast und der dadurch kleiner werdenden Belichtungsstärke gefunden werden.

Am Photomultiplier eintreffende Photonen lösten Elektronen aus der Kathode des Multipliers. Diese wurden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und lösten in hintereinandergeschalteten Dynoden mehrere Sekundärelektronen, welche durch den Spannungsabfall an einem Widerstand detektiert wurden.

Dadurch kam es einerseits zu einer Signalverstärkung, andererseits zur Umwandlung von Photonen in messbaren Strom.

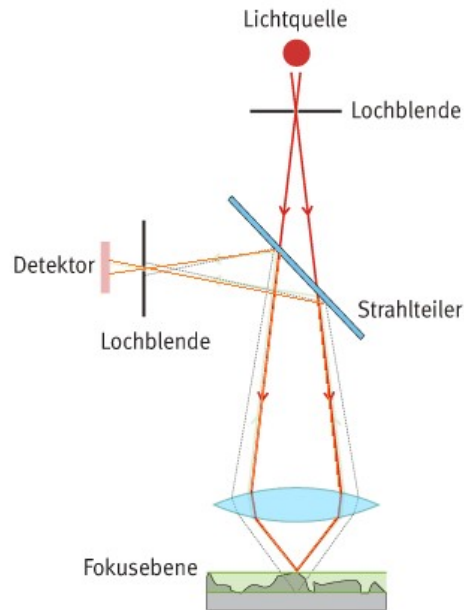


Abbildung 8: Der Strahlengang im Konfokalmikroskop

Das Anregungslicht (rot) geht durch den dichroitischen Spiegel (Strahlteiler) und das Objektiv auf das Objekt. Das in der Fokusebene (grün) emittierte Licht (orange) gelangt durch die Lochblende zum Detektor. Die Strahlen aus anderen Ebenen werden neben die Lochblende reflektiert (gestrichelt) (Fries Research & Technology GmbH).

2.2.2.1 Messung des diastolischen Kalziumlecks aus dem SR

Das Ziel dieser Messungen war es, elementare spontane Freisetzungseignisse von Kalzium aus dem SR, sogenannte *Sparks* (Funken), zu detektieren und auszuwerten. Sie entstehen durch die Öffnung von einzelnen oder mehreren, in Clustern angeordneten RyRs (Guatimosim *et al.*, 2002), sind ein Maß für das SR-Kalziumleck und können über den NCX Arrhythmien auslösen (Bers, 2001; Cheng *et al.*, 1993).

Die Registrierung erfolgte unidirektional, d.h. die Bildzeile wurde jedes Mal in die gleiche Richtung gescannt. Pro *Linescan* wurden 10000 Bildzeilen mit jeweils 512 Pixeln, welche einer Größe von $0,0695 \mu\text{m} * 0,76 \text{ms}$ entsprachen und die eine Farbtiefe von 8 Bit hatten, über einen Zeitraum von 7636 ms gemessen. Das entsprach einer Scanbreite von $35,6 \mu\text{m}$.

Für die Messungen wurden je nach Zelldichte 250-500 μL Zellsuspension auf eine Kammer mit einem beschichteten Plastikboden (Ibidi ibiTreat 10814) mit 4 μL Laminin

(Sigma L2020) ausplattiert und für 30 Minuten ruhen gelassen, damit sich die Kardiomyozyten anhaften konnten. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen für 30 Minuten mit 250 µL Fluo-4 Farbstofflösung und den unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen von NCXi (siehe 2.5), beziehungsweise DMSO 1,18 mol/l (Sigma D8418) zur Kontrolle inkubiert.

Auf dem Objektisch des Mikroskops (Zeiss LSM 700) wurden die Kammern mit Messtyrode (siehe Tabelle 1) und dem jeweiligen Arzneistoff superperfundiert und mit einem Myopacer (IonOptix Fuse 2.0 A) mit der Frequenz von 1 Hz stimuliert.

Für die eigentliche Sparkmessung wurde die Stimulation dann ausgeschaltet und ein *Linescan* mit oben beschriebenen Einstellungen durchgeführt.

Für die Auswertung wurden die Registrierungen im Programm ImageJ (National Institutes of Health, 2004) geöffnet und mit dem Plugin Sparkmaster ausgewertet. Dabei wurden die *Sparks* einerseits gezählt und andererseits die räumliche und zeitliche Ausdehnung und Fluoreszenzintensität gemessen und in Excel übertragen.

Für die räumliche Ausdehnung wurden die *Sparks* als Funktion dargestellt und die Breite dieser Funktion jeweils bei der Hälfte des Maximums gemessen (Halbwertsbreite, *Full Width at Half Maximum*, FWHM). Ebenso wurde bei der zeitlichen Ausdehnung verfahren (*Full Duration at Half Maximum*, FDHM) (Institute for Telecommunication Sciences, 1996).

Für die Bestimmung der Intensität wurde die maximale Fluoreszenz eines *Sparks* durch die Hintergrundfluoreszenz der Zelle geteilt.

Mithilfe dieser Werte konnte das relative SR-Kalziumleck pro Zelle berechnet werden:

Formel 1: SR-Kalziumleck

SR – Kalziumleck =

$$\left(\frac{\text{Sparkfrequenz}}{100\mu\text{m}\cdot\text{s}} \right) * \text{Mittelwert}_{\text{Sparkbreite}} * \text{Mittelwert}_{\text{Sparkdauer}} * \text{Mittelwert}_{(F/F_0)}$$

2.2.2.2 Messung des Kalziumgehalts des SR

Die Messungen des Kalziumgehalts des SR erfolgte entweder direkt im Anschluss an die Sparkmessungen oder gesondert, jedoch unter den grundsätzlich gleichen Bedingungen und Einstellungen (bis auf die Zeit, siehe unten). Hierbei musste jedoch erreicht werden, dass das komplette Kalzium, das im SR der Zelle gespeichert war, geordnet ins Zytosol ausgeschüttet wurde.

Dazu wurde nach einigen Stimulationen mit dem Myopacer dieser deaktiviert und gleichzeitig eine 10 mmol/l Koffeinelösung (siehe Tabelle 2) so nahe wie möglich an die Zelle getropft. Bei dieser hohen Koffeinkonzentration öffnen sich sämtliche RyR und geben das komplette SR-Kalzium frei. Dieser Effekt konnte durch die Anfärbung mit Fluo-4 als Amplitude des gemessenen Transienten abgebildet werden (Bers *et al.*, 1996).

Die Kanäle bleiben durch die andauernde Umspülung mit Koffein offen. Somit wird das Kalzium, welches die SERCA in das SR zurückpumpt, sofort wieder in das Zytosol ausgeschleust. Da der NCX wie oben beschrieben (siehe Kapitel 1.3) den Hauptmechanismus für das Ausschleusen des Kalziums aus der Zelle darstellt, ergibt der Abfall des Transienten annähernd die NCX-Funktion.

Um dies ausreichend aufzeichnen zu können, wurde die Anzahl der Bildzeilen im Gegensatz zur Sparkmessung auf das Dreifache erhöht, sodass ein längerer Zeitraum erfasst werden konnte.

2.3 Patch-clamp Messungen

Die Entwicklung der Patch-clamp Methode hat eine lange Geschichte und geht ursprünglich unter anderem zurück auf die Vermutungen von Sir Isaac Newton, dass Nervensignale elektrischer Natur seien. Luigi Galvani begann Ende des 18. Jahrhunderts mit elektrophysiologischen Experimenten an Froschmuskeln. Im 19. Jahrhundert waren es Forscher wie Emil Heinrich du Bois-Reymond, die zum ersten Mal Aktionspotentiale an Muskeln und Nerven messen konnten. Intrazelluläre Messungen waren ab Anfang des 20. Jahrhunderts dank der Entdeckung von Riesenkalmar-Axonon möglich (Hodgkin and Huxley, 1939). Die Weiterentwicklung der Patch-clamp Technik unter anderem mit der Entwicklung des *Gigaseal*

(Verbindung zwischen Pipette und Zelle mit sehr hohem elektrischem Widerstand) geht auf die Forschungen von Erwin Neher und Bert Sakmann aus Göttingen zurück (Neher and Sakmann, 1976), wofür sie 1991 den Nobelpreis erhielten. Mit dieser Technik ist es beispielsweise möglich, den Ionenfluss durch einzelne Kanäle oder das Membranpotential einer einzelnen lebendigen Zelle zu messen. Erste Experimente mit Herzmuskelzellen wurden bereits in den 80er Jahren durchgeführt (Pidoplichko and Verkhratsky, 1987; Verkhratsky and Parpura, 2014).

Zur Durchführung der Experimente mussten zunächst Mikropipetten aus Glas mit dem entsprechend kleinen Durchmesser von 1-5 μm erzeugt werden. Dies gelang in zwei Schritten. Zunächst wurde durch das Erhitzen und gleichzeitigen Zug an feinen Glaskapillaren (World Precision Instruments TW 150F-3) diese gedehnt. Im zweiten Schritt entstand durch erneutes Erhitzen und einen ruckartigen Zug an der dünnsten Stelle ein Abbruch der Glaskapillare, sodass zwei dünne, glattwandige Pipetten entstanden. Durchgeführt wurde dies mit Hilfe eines sogenannten *Pullers* (Zieher): DPuller (Zeitz-Instruments DMZ-Universal Puller).

Anschließend wurden diese mit einer Elektrolytflüssigkeit, die in ihrer Zusammensetzung möglichst dem Zytosol entsprechen sollte (siehe Tabelle 4) befüllt. Aufgrund des geringen Durchmessers wurde dafür eine Füllhilfe, bestehend aus einem dünnen Hohl Draht (World Precision Instruments Microfil MF34G-5) mit vorgeschaltetem Filter (Millex-GV N4PA7069B) verwendet.

Nun wurde ein chlorierter Silberdraht in die Pipette eingeführt. Dieser musste regelmäßig chloriert werden, was durch das Eintauchen des Silberdrahts in konzentrierte Chlorbleichlauge über Nacht erfolgte. Als Badelektrode wurde ein Pellet aus einem Silber/Silberchlorid-Gemisch verwendet. Diese Elektroden erlauben in einer Flüssigkeit, die Chloridionen enthält, einen Stromfluss in beide Richtungen. Dabei verbindet sich entweder Chlorid aus der Lösung mit dem elementaren Silber, sodass es dabei zu einer Elektronenaufnahme an der Elektrode kommt oder das gebundene Chlorid geht in Lösung und setzt somit Elektronen aus der Elektrode frei. Da Bad- und Pipettenlösung unterschiedliche Chloridkonzentrationen aufweisen und die Zellmembran für einzelne Ionen unterschiedlich durchlässig ist, entstehen somit sog. Offsetspannungen (Numberger, 1996).

Die Pipette wurde nun an ein luftdichtes System innerhalb des Messstandes mit mehreren Spritzen, durch die verschiedene Drücke in der Pipette erzeugt werden können, angeschlossen.

Für den Messstand wurde außerdem ein Faraday'scher Käfig benötigt, um das Hintergrundrauschen durch elektronische Geräte und Stromleitungen möglichst gering zu halten. Es wurde ein schwingungsgedämpfter Tisch verwendet, um eine Verletzung der Zellen durch die Pipette zu vermeiden. An dem Inversionsmikroskop (Zeiss Axio Observer A1) war ein Mikromanipulator (Eppendorf AG 5170) mit dem Pipettenhalter befestigt, welcher mit einem Joystick (HEKA MIM4) bedient werden konnte. Der Verstärker (HEKA EPC-10) enthielt außerdem den AD-Wandler, wodurch die Signale im Computer von dem Programm Patch-Master (HEKA) gelesen werden konnten.

Nun wurde die Pipette mit leichtem Überdruck – um ein Ansaugen von frei flottierendem Zelldetritus zu vermeiden – in die Badlösung mit den isolierten und am Kammerboden fixierten Kardiomyozyten eingetaucht. Zunächst mussten nach dem Eintauchen der Pipette in das Bad die oben beschriebenen Offsetpotentiale ausgeglichen werden, was mit der Messsoftware Patch-Master (HEKA) durchgeführt wurde. Dabei wird der Nullpunkt des Potentials so festgelegt, dass zwischen Pipetten- und Badlösung kein Stromfluss stattfindet.

Nach dem vorsichtigen Anfahren der Zellmembran unter optischer Kontrolle erfolgte die letzte Annäherung unter Beobachtung des Pipettenwiderstands, der bei unmittelbarem Kontakt zur Zellmembran deutlich anstieg. Durch das Aufheben des zuvor angelegten Überdrucks beziehungsweise durch das Aufbauen eines leichten Unterdrucks wurde danach eine hochohmige Abdichtung, das *Gigaseal* zwischen Pipette und Zellmembran etabliert.

Der Zustand nach der *seal*-Bildung wird als *cell-attached* Konfiguration bezeichnet. Um das Membranpotential der ganzen Zelle messen zu können, wird beispielsweise durch Unterdruck das Membranstück unter der Pipette rupturiert, wodurch eine direkte Verbindung zwischen Pipettenflüssigkeit und Zellinnerem hergestellt wird. Dies wird *whole-cell* Konfiguration genannt.

Nach kurzer Zeit entsprechen die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen denen der Pipettenlösung, da deren Volumen wesentlich größer ist (Numberger, 1996).

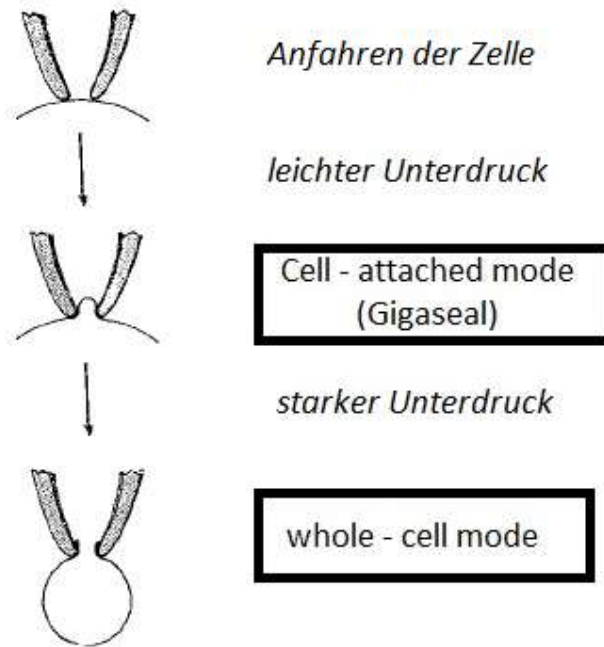


Abbildung 9: Der whole-cell mode

Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bis zum Erreichen des whole-cell modes. Übernommen und abgeändert von (Hamill et al., 1981).

Hat man nun die *whole-cell* Konfiguration erreicht, kann man das Membranpotential der Zelle festlegen und die Ströme, die zur Aufrechterhaltung dessen nötig sind messen (*voltage-clamp*). In dieser Arbeit wurde jedoch der Gesamtstromfluss über die Zellmembran bestimmt und das resultierende Membranpotential gemessen (*current-clamp*).

Theoretisch kann man so mit einer Nullstromklemme (0 pA) das Ruhemembranpotential messen (Hamill et al., 1981), jedoch müssen meist Leck-Ströme ausgeglichen werden.

In stimulierbaren Zellen wie den Kardiomyozyten können nun ausgehend vom Ruhemembranpotential durch Strompulse, die das Schwellenwertpotential überschreiten, APs ausgelöst werden.

Zuvor mussten jedoch die kapazitiven Artefakte ausgeglichen werden. Diese ergeben sich durch den Serienwiderstand in der Pipette, der durch die Pipettenlösung einerseits und die potenziell angesaugten Zellbestandteile andererseits entsteht.

Außerdem weist die Zellmembran im *whole-cell-mode* eine kapazitative Wirkung auf. Im verwendeten Messaufbau wurden diese vom Verstärker erfasst und ausgeglichen.

Würde man dies unterlassen, werden Spannungsänderungen verlangsamt, wodurch sich unter anderem Verfälschungen in den Amplituden und der Kinetik der Aktionspotentiale ergeben (Numberger, 1996).

Für die Messung wurden für eine eher geringe Zelldichte je 150 μL Zellsuspension auf die mit 4 μL Laminin (Sigma L2020) beschichteten Kammern (Ibidi ibiTreat 10814) verteilt und für 30 Minuten in Ruhe gelassen, damit sich die Kardiomyozyten anhaften konnten. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Badlösung mit dem jeweiligen Medikament auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden, wie oben beschrieben die Patch-clamp-Experimente gestartet.

Zur Induktion von Arrhythmien wurden die gleichen Experimente in einer eigenen Messreihe unter einer 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin-Konzentration (Roth 7323.1) durchgeführt. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, führt Digoxin über eine Blockade der NKA zu einem intrazellulären Na^+ -Anstieg und einem K^+ -Abfall einerseits, sowie einer Depolarisation der Zelle andererseits. Dies führt zu einer Instabilität des Ruhemembranpotentials und kann unter anderem zu DADs führen.

2.4 Vorhersageparameter von Arrhythmogenität

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des NCX-Inhibitors auf die Entstehung von Arrhythmien auf zellulärer Ebene untersucht werden. Dafür wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen immer wieder unterschiedliche Parameter untersucht, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von arrhythmischen Ereignissen vorhersagen können (Thomsen *et al.*, 2004).

Dabei hat sich gerade für Torsade-de-Pointes-Tachykardien, welche auf zellulärer Ebene aus EADs entstehen, die Variabilität von aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen (*beat-to-beat-variability*, BVR) als zuverlässiger Vorhersageparameter erwiesen. Diese kann mittels Kurzzeitvariabilität (*short-term-variability*, STV), siehe Formel 2, berechnet und somit quantifiziert werden (Hinterseer *et al.*, 2007).

Die STV konnte bisher unter anderem bei Patienten mit QT-Zeit verlängernden Medikamenten, aber auch im Tiermodell zuverlässig die proarrhythmische Wirkung der Medikamente vorhersagen (Bossu *et al.*, 2017) und wurde deshalb in dieser Arbeit als Parameter verwendet.

Formel 2: Short-term-variability

$$STV = \frac{\sum |D_{n+1} - D_n|}{[n \times \sqrt{2}]}$$

Dabei ist STV die Kurzzeitvariabilität, D ist der analysierte Zeitparameter (z.B. QT-Zeit oder wie in dieser Arbeit die Aktionspotentialdauer) und n die Anzahl der untersuchten Aktionspotentiale.

Die Aufzeichnung dieser Aktionspotentiale erfolgte über das Programm Patch-master (HEKA). Die weitere Auswertung der Potentiale erfolgte über das Programm Labchart (ADInstruments).

2.5 Statistische Auswertungen

Sämtliche erhobenen Daten wurden zunächst in Excel (Microsoft Corporation) gespeichert und dort teilweise auch schon ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte dann im Programm Prism (GraphPad). Die klinischen Daten und andere Regressionsanalysen wurden mit SPSS (IBM) ausgewertet. Die Angabe der Durchschnittswerte im Ergebnisteil sowohl im Text, als auch in den Abbildungen erfolgte als Durchschnitt \pm Standardfehler des Durchschnitts (Mean \pm SEM). Durchschnittswerte der klinischen Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung (SD) angegeben.

Die Signifikanzprüfung erfolgte mithilfe des One-Way Anova. Als signifikant wurde ein falsch positiver Fehler $p < 0,05$ angesehen.

2.6 Liste der Lösungen und Stoffe

Tabelle 1: Messtyrode/Badlösung

KCl (Roth 6781.1)	4	mmol/l
NaCl (Sigma S7653)	140	mmol/l
MgCl ₂ (Roth KK36.1)	1	mmol/l
HEPES (Roth 9105.3)	5	mmol/l
Glucose (Roth X997.2)	10	mmol/l
CaCl ₂ (Sigma 21115)	2	mmol/l
pH 7,40 bei Raumtemperatur (RT) mit NaOH (Roth 6771.3) eingestellt		
gelöst in doppelt destilliertem Wasser (dd H ₂ O)		

Tabelle 2: Koffeinlösung

Koffein (Sigma C0750)	10	mmol/l
pH 7,4 bei RT mit NaOH (Roth 6771.3) eingestellt		
gelöst in Messtyrode		

Tabelle 3: Farbstofflösung Fluo-4

Fluo-4 AM (Life Technologies F14201)	83,33	µmol/l
DMSO (Sigma D8418)	1,18	mol/l
Pluronic F-127 (Life Technologies P3000MP)	29,25	mmol/l
gelöst in Messtyrode (1 mmol/l CaCl ₂)		

Tabelle 4: Pipettenlösung

Kalium L-Aspartat (Fluka 11230)	122	mmol/l
NaCl (Sigma S7653)	10	mmol/l
KCl (Roth 6781.1)	8	mmol/l
MgCl ₂ (Roth KK36.1)	1	mmol/l
Mg-ATP (Sigma A9187)	5	mmol/l
Li-GTP (Sigma G5884)	0,3	mmol/l
HEPES (Roth 9105.3)	10	mmol/l
pH 7,20 bei RT mit KOH (Roth 4330.1) eingestellt		
gelöst in dd H ₂ O		

Tabelle 5: Ca²⁺-freie Vorhof-Isolationstyrode

NaCl (Sigma S7653)	100	mmol/l
KCl (Roth 6781.1)	10	mmol/l
MgCl ₂ (Roth KK36.1)	5	mmol/l
KH ₂ PO ₄ (Sigma P9791)	1,2	mmol/l
Taurin (Sigma T0625)	50	mmol/l
MOPS (Sigma M1254)	5	mmol/l
BDM (Sigma B0753)	10	mmol/l
Glucose (Roth X997.2)	20	mmol/l
pH 7,20 bei 37 °C mit NaOH (Roth 6771.3) eingestellt		
gelöst in dd H ₂ O		

Tabelle 6: Storage-Medium Vorhofisolation

KCl (Roth 6781.1)	30 mmol/l
KH ₂ PO ₄ (Sigma P9791)	10 mmol/l
MgCl ₂ (Roth KK36.1)	1 mmol/l
HEPES (Roth 9105.3)	10 mmol/l
Glucose (Roth X997.2)	11 mmol/l
Taurin (Sigma T0625)	20 mmol/l
Glutamic acid (Roth 1743.2)	70 mmol/l
BDM (2,3-Butanedione monoxime) (Sigma B0753)	10 mmol/l
BCS (Bovine Calf Serum, Rinderkalbsserum) (ThermoScientific AY6168765)	2 %
pH 7,40 bei RT mit KOH (Roth 4330.1) eingestellt	
gelöst in dd H ₂ O	

Da es sich bei Rinderkalbsserum um ein Naturprodukt handelt, ist keine genauere Konzentrationsangabe möglich.

Tabelle 7: Stopplösung Vorhofisolation

BDM (Sigma B0753)	20 mmol/l
BCS (ThermoScientific AY6168765)	2 %
gelöst in Isolationstyrode	

Tabelle 8: Ventrikelisolationstyrode

Joklik-MEM (AppliChem A1539.1000)	insgesamt 11,27 g/L
pH 7,40 bei 37°C mit NaOH (Roth 6771.3) eingestellt	
gelöst in dd H2O	

Bei JMEM handelt es sich um ein Kulturmedium, zusammengesetzt aus zahlreichen Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Stoffen und Salzen (AppliChem GmbH).

Tabelle 9: Enzymlösungen

Collagenase Type I (Worthington M2C13334)	15,4 mg	≥125 units/mg
Collagenase Type II (Worthington 43J1467A)	siehe Text	≥125 units/mg
Protease (Sigma P8038)	8 mg	≤0.05 Kilo units/mg RNase ≤5.0 Kilo units/mg DNase
Trypsin (GIBCO 15090-046)	1,05	mmol/l

Da es sich hierbei um Enzyme handelt, wird bei den Kollagenasen und der Protease die ungefähre Aktivität, nicht die Konzentration angegeben.

SAR-NCXi

Der SAR-NCXi ist ein Inhibitor des NCX1, der dem Labor vom Pharmakonzern Sanofi zur Verfügung gestellt wurde. Das Substrat, ein Pulver, wurde in doppelt destilliertem Wasser gelöst und als Stocklösung in der Konzentration 3 mmol/l eingefroren. Für die Messungen wurde der Wirkstoff in der jeweiligen Konzentration (3 µmol/l und 300 nmol/l) in der Messtyrode gelöst.

3. Ergebnisse

3.1 Der Einfluss des NCX-Inhibitors auf das diastolische Kalziumleck in menschlichen Vorhofzellen

Für die konfokalmikroskopischen Messungen mit atrialen Kardiomyozyten konnte das folgende Patientenkollektiv erhoben werden (Tabelle 10). Insgesamt wurden hier die Zellen von 22 Patienten gemessen und in die Statistik mit aufgenommen.

Tabelle 10: Patientendaten der konfokalmikroskopischen Messungen (Vorhof)

	Absolute Häufigkeit (Relative Häufigkeit in %)	Mittelwert ± SD
Gesamtzahl	22 (100 %)	
Alter		66,77 ± 9,154
Männliches Geschlecht	18 (81,8 %)	
Normale EF (> 55 %)	14 (66,7 %)	
Leichtgradig eingeschränkte EF (45-55 %)	4 (19 %)	
Mittelgradig eingeschränkte EF (35-45 %)	1 (4,8 %)	
Schwergradig eingeschränkte EF (<35%)	2 (9,5 %)	
Mittlere EF in %		54,30 ± 14,97
Sinusrhythmus	19 (86,4 %)	
Vorhofflimmern	1 (4,5 %)	
Schrittmacher	2 (9,1 %)	

Diabetes mellitus	10 (45,5 %)	
BMI in kg/m²		29,67 ± 4,37
Koronare Herzkrankheit	20 (90,9 %)	
Z.n. Myokardinfarkt	10 (45,5 %)	
Arterielle Hypertonie	18 (85,7 %)	
Hochgradige Aortenstenose	4 (18,2 %)	
Hochgradige Mitralinsuffizienz	2 (9,1 %)	
Diastolische Dysfunktion	8 (38,1 %)	
regelmäßig eingenommene Medikamente		
β-Blocker	15 (68,2 %)	
ACE-Hemmer / AT1-Blocker	18 (81,8 %)	
Kalziumantagonist	7 (31,8 %)	
Statine	18 (81,8 %)	
Laborwerte		
NTproBNP vor Operation in pg/ml		2343,35 ± 3372,79
CRP in mg/l		5,86 ± 4,06
HbA1c in %		6,44 ± 1,16

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es in Herzmuskelzellen auch in Ruhe zu einer gewissen Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in Form von sogenannten *Sparks* (Cheng *et al.*, 1993).

Je mehr Kalzium spontan freigesetzt wird, desto weniger steht beim nächsten Aktionspotential zur Verfügung, um die Kontraktion auszulösen.

Außerdem können die *Sparks* über den NCX Nachdepolarisationen auslösen, welche zu gefährlichen Arrhythmien führen (Cheng and Lederer, 2008).

Die gemessenen *Sparks* können nun bezüglich Frequenz, Amplitude, Dauer und Breite analysiert und das diastolische Kalziumleck somit annäherungsweise berechnet werden.

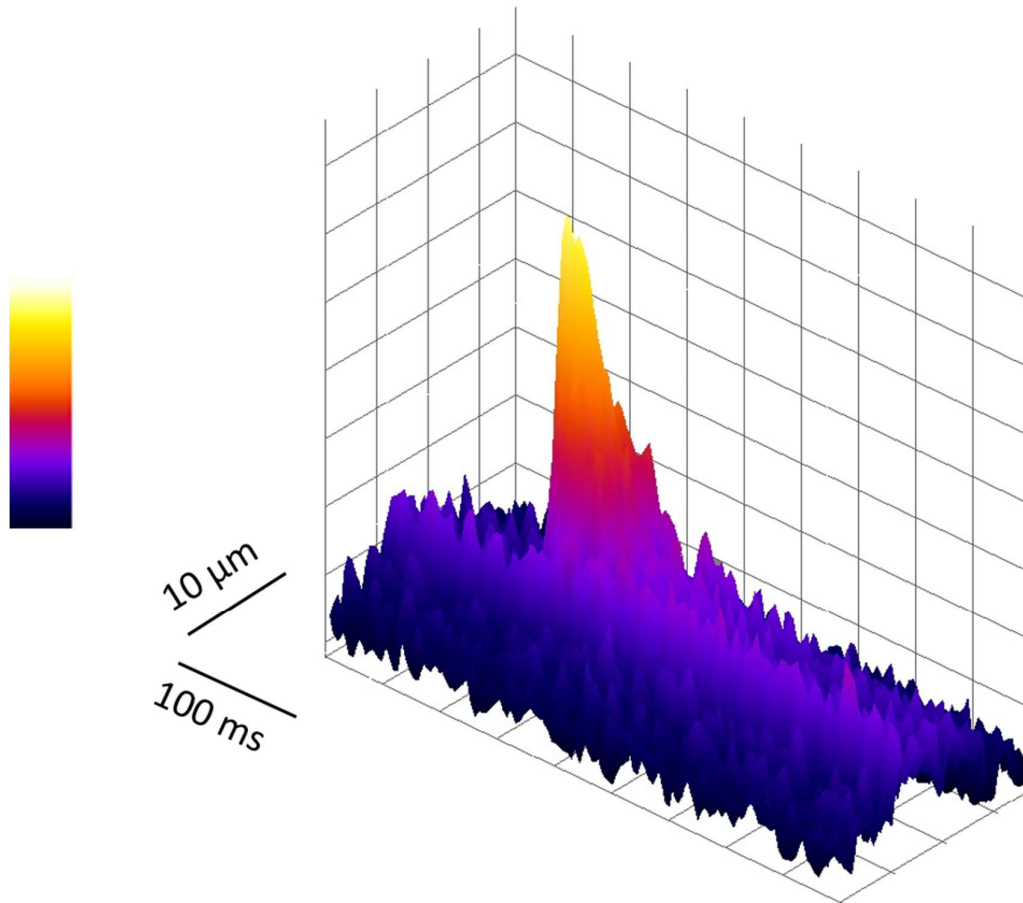


Abbildung 10: Kalziumspark

Originalregistrierung eines typischen Kalziumsparks als 3-dimensionale Darstellung mit seinen drei Dimensionen: Breite, Länge (= Zeitdauer) und Intensität (erstellt mit ImageJ).

Bei jedem Patient konnten pro Medikamentengruppe ca. 15-20 Zellen gemessen werden. Dann wurden die Zellen, in denen es entweder zu keiner Sparkfreisetzung oder einer übermäßigen Kalziumfreisetzung in Form eines sog. Sparkgewitters mit mehr als 30 Sparks oder einer Kalzium-wave (Welle) kam, von der Auswertung ausgeschlossen.

Die folgenden Auswertungen pro Patient bedeuten, dass bei jedem Patienten die Durchschnittswerte aller Parameter ausgerechnet wurden und diese dann in die Statistik eingingen.

3.1.1 Der NCX-Inhibitor reduziert die Häufigkeit von Sparks

Die Menge an spontanen elementaren Kalziumfreisetzungen wurde durch die Zugabe des Inhibitors in den Kardiomyozyten signifikant gesenkt ($p < 0,05$), siehe Abbildung 11.

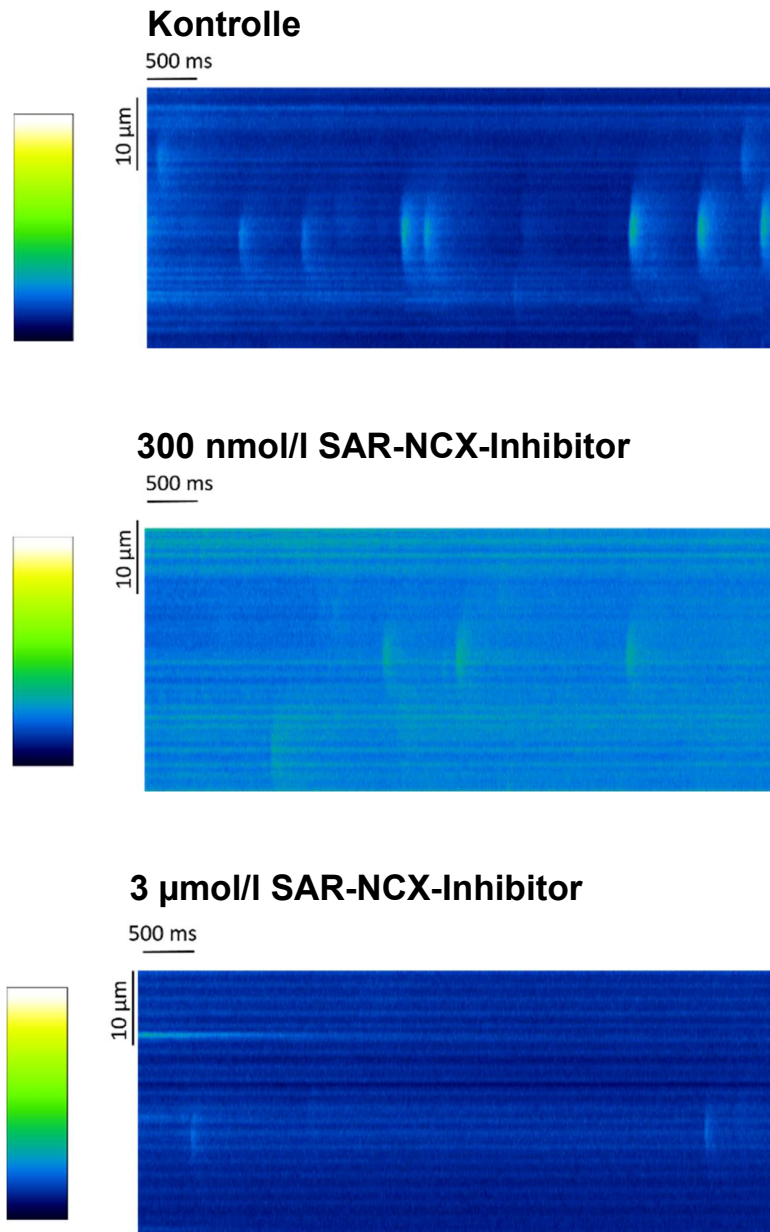


Abbildung 11: Originalregistrierungen

Es sind verschiedene repräsentative Originalregistrierungen der konfokalmikroskopischen Messungen gezeigt. Deutlich sichtbar ist hierbei die verringerte Anzahl an Kalziumsparks in den Messungen mit NCXi.

Für die Vorhofszellen ergaben sich pro *Linescan* als absolute Zahl im Durchschnitt $7,56 \pm 0,40$ Sparks (n = 12) in der Kontrollgruppe, $5,72 \pm 0,63$ Sparks (n = 11) unter 300 nmol/l SAR-NCX-Inhibitor und $4,63 \pm 0,35$ Sparks (n = 11) unter 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCX-Inhibitor.

Um diese Werte für andere Veröffentlichungen vergleichbar zu machen, wurde die Frequenz in Sparks pro 100 μm pro s umgerechnet.

Hier ergab sich bei den Messungen der atrialen Zellen für die Kontrollgruppe ein Wert von $2,79 \pm 0,15$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ (n = 12), unter 300 nmol/l SAR-NCX-Inhibitor $2,11 \pm 0,23$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ (n = 11) und unter 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCX-Inhibitor $1,71 \pm 0,13$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ (n = 11) (siehe Abbildung 12).

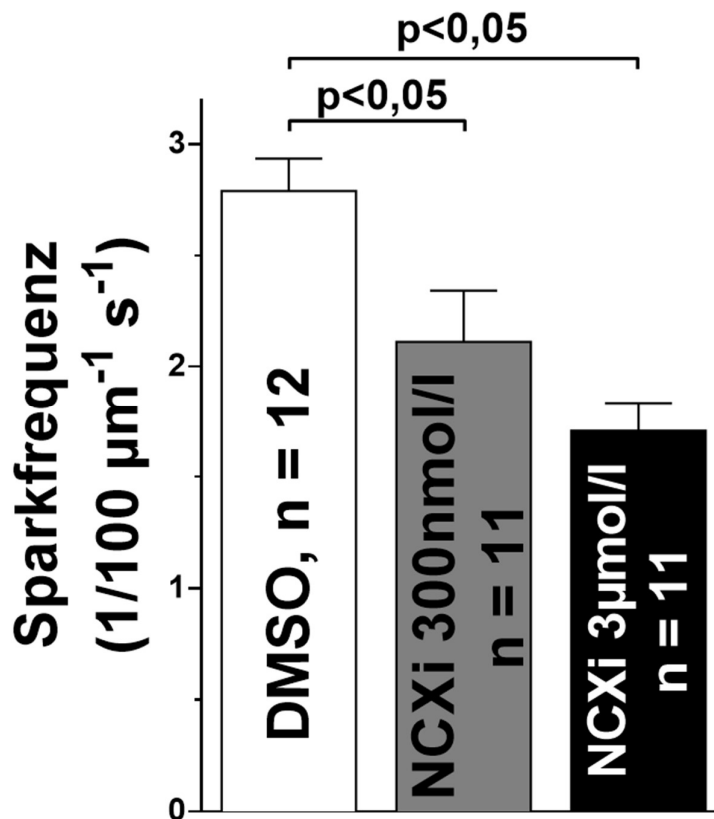


Abbildung 12: Sparkfrequenz/100 $\mu\text{m/s}$

Dargestellt sind die jeweiligen Durchschnittswerte der Kalziumsparkfrequenz pro 100 μm pro s. Eine signifikante Reduktion der spontanen Kalziumfreisetzungen ergaben sich dabei sowohl bei der hohen, als auch der niedrigeren NCXi-Konzentration.

3.1.2 Der Einfluss des NCX-Inhibitor auf die Sparkausdehnung

Bei der Ausdehnung von Kalziumsparks werden einerseits die Amplitude und andererseits Länge und Breite betrachtet (siehe Abbildung 10).

Dabei entspricht der Amplitude die Intensität der Fluoreszenz, die ja in direkter Relation zur Kalziumkonzentration steht.

Die Breite ist die tatsächliche räumliche Ausdehnung.

Bei der Länge des *Sparks* wiederum handelt es sich um die zeitliche Ausdehnung, weshalb diese in Millisekunden angegeben wird.

Für die Messungen der Amplituden ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, bei Breite und Dauer zeigte sich unter 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi jeweils eine Zunahme.

Bei der Amplitude eines *Sparks* kann man durch Subtraktion des Fluoreszenzmaximums (F) durch die Hintergrundfluoreszenz (F_0) der gemessenen Zelle auf die relative Menge an freigesetztem Kalzium rückschließen.

In den Vorhofzellen wurde in der Kontrollgruppe ein Quotient von $1,74 \pm 0,06$ ($n = 13$) versus den Werten der Medikamentenkonzentrationen von $1,92 \pm 0,09$ ($n = 11$) (300 nmol/l SAR-NCXi) und $1,93 \pm 0,08$ ($n = 11$) (3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi) gemessen. Dies ergab keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 13).

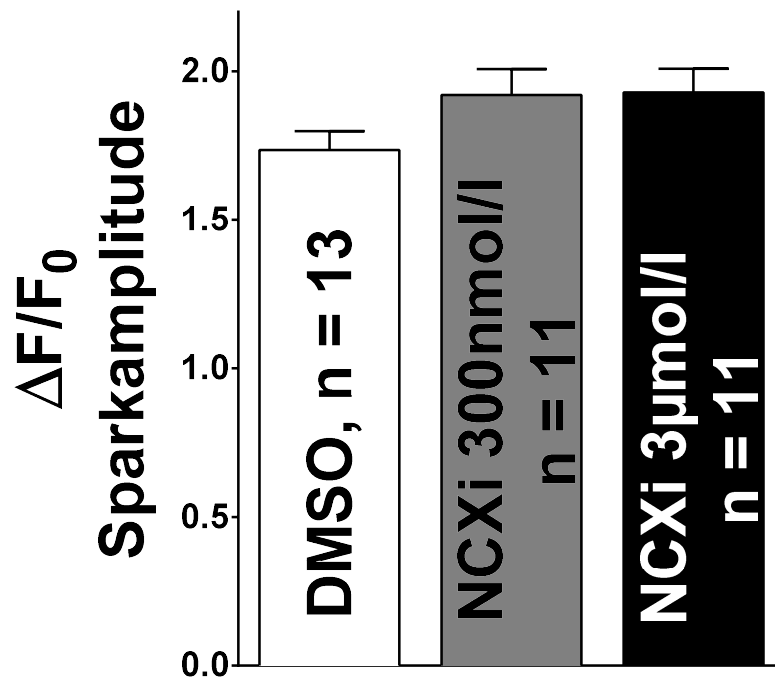


Abbildung 13: Kalziumsparkamplitude

Gezeigt ist der errechnete Durchschnitt der Amplituden sämtlicher Sparks pro Patient.

Die Ausdehnung der *Sparks* auf der Zeitachse nahm bei den atrialen Zellen unter Behandlung mit SAR-NCXi deutlich zu. So lag die durchschnittliche Sparkdauer in der Kontrolle bei $23,95 \pm 1,2 \text{ ms}$ ($n = 12$). Unter 300 nmol/l Inhibitor wurden im Durchschnitt $31,22 \pm 3,19 \text{ ms}$ ($n = 10$) und unter $3 \mu\text{mol/l}$ Inhibitor $34,13 \pm 2,41 \text{ ms}$ ($n = 12$) gemessen.

Im Vergleich von Kontrolle zu hoher SAR-NCXi-Konzentration konnte eine signifikante Zunahme gemessen werden ($p < 0,05$). Bei der niedrigen SAR-NCXi-Konzentration war die Zunahme der Sparkdauer zwar nicht signifikant, jedoch im Trend erkennbar ($p = 0,09$) (Abbildung 14).

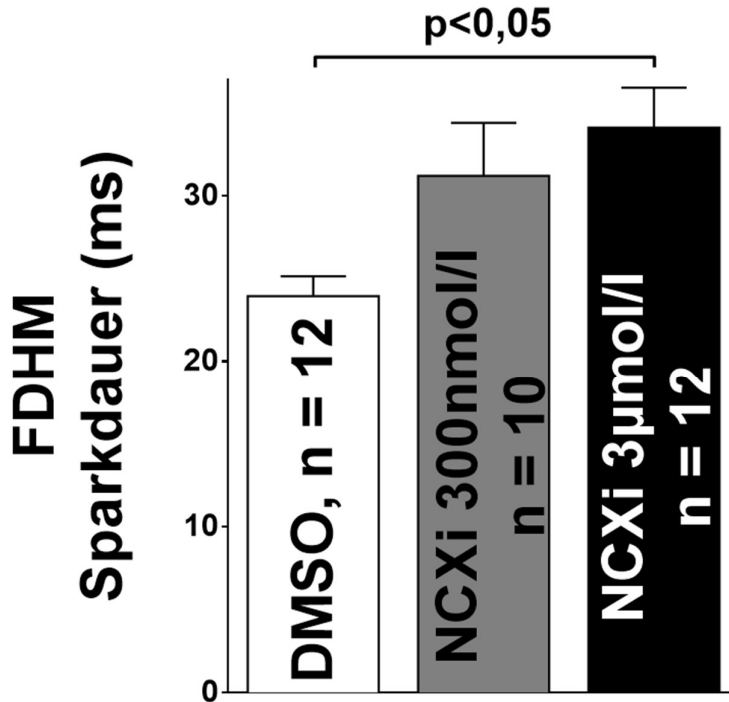


Abbildung 14: Sparkdauer

Gezeigt ist die durchschnittliche zeitliche Ausdehnung der Kalziumsparks in den drei Gruppen mit der signifikanten Zunahme der Sparkdauer unter 3 µmol/l NCXi.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Breite der *Sparks*.

Hier lag in den Vorhofzellen die räumliche Ausdehnung der *Sparks* in der Kontrollgruppe bei $1,80 \pm 0,07 \mu m$ (n = 12), unter 300 nmol/l SAR-NCXi $2,03 \pm 0,12 \mu m$ (n = 9) und unter 3 µmol/l SAR-NXCI bei $2,20 \pm 0,13 \mu m$ (n = 12).

Die Breite nahm unter Medikamentenbehandlung somit auch konzentrationsabhängig zu (Kontrolle versus 300 nmol/l SAR-NCXi: p = 0,34, Kontrolle versus 3 µmol/l SAR-NCXi: p < 0,05), siehe Abbildung 15.

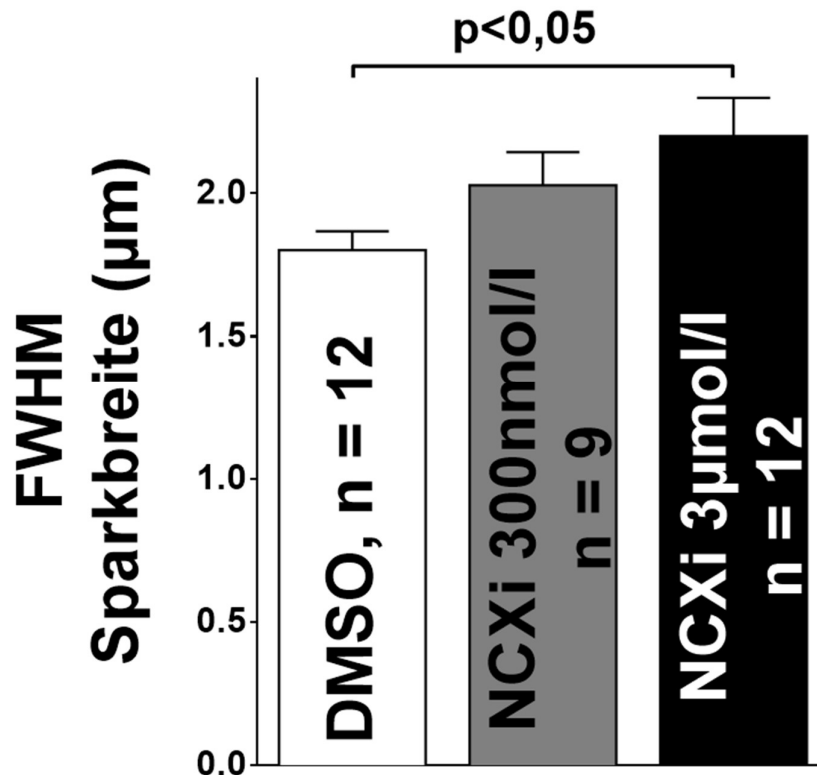


Abbildung 15: Sparkbreite

Gezeigt ist die durchschnittliche räumliche Ausdehnung der Kalziumsparks und deren signifikante Zunahme unter 3 µmol/l NCXi.

3.1.3 Das diastolische Kalziumleck wird durch den NCX-Inhibitor nicht beeinflusst

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, lässt sich das diastolische Kalziumleck näherungsweise mit der gezeigten Formel errechnen (siehe 2.2.3).

Da es sich bei Fluo-4 um einen nicht-ratiometrischen Farbstoff handelt, werden die Werte als relatives Kalziumleck ohne Einheit angegeben.

Wenn man dies auf die erhobenen Messungen anwendet, ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, da die Frequenz unter dem Inhibitor zwar zurückging, Breite und Dauer der *Sparks* jedoch zunahmen.

So ergab sich für die atrialen Zellen für die Kontrollgruppe ein diastolisches Kalziumleck von $2,25 \pm 0,28$ (n = 13) und für die Medikamentenkonzentrationen 1,67

$\pm 0,16$ (n = 10) unter 300 nmol/l SAR-NCXi und $1,98 \pm 0,14$ (n = 10) unter 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi, siehe Abbildung 16.

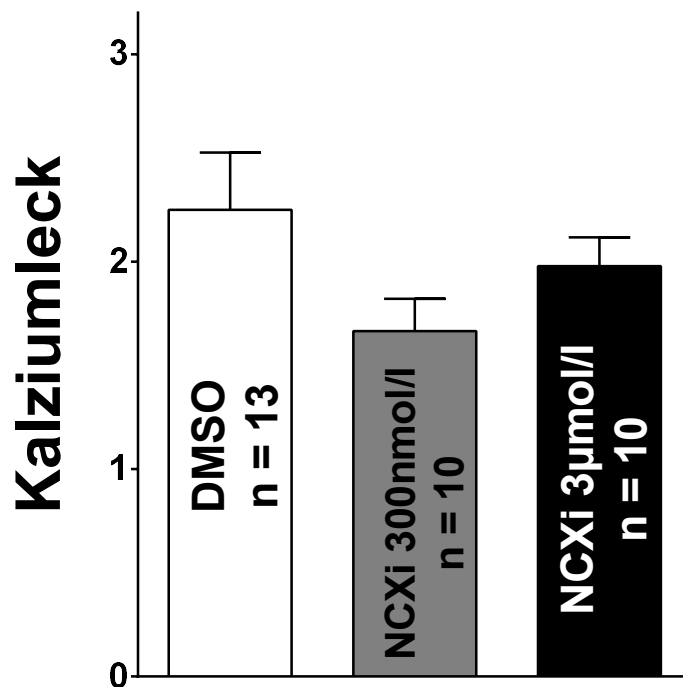


Abbildung 16: Das diastolische Kalziumleck

Gezeigt sind die durchschnittlichen errechneten diastolischen Kalziumleck-Werte pro Patient in den drei Gruppen für die Vorhofzellen.

3.2 SAR-NCXi beeinflusst SR-Kalziumgehalt und NCX-Aktivität

Bei den Messungen mit Koffein zur Bestimmung des SR-Kalziumgehalts und der NCX-Aktivität wurden die Vorhofzellen von 18 Patienten gemessen, wobei die meisten parallel für Sparkmessungen genutzt wurden.

Pro Patient und Medikamentengruppe wurden im Durchschnitt 1-2 Zellen gemessen und nur jene in die Auswertung aufgenommen, welche eine deutliche Reaktion auf das Koffein zeigten.

3.2.1 Der SR-Kalziumgehalt ist erhöht unter NCX-Inhibition

Die Bedeutung des SR-Kalziumgehalts wurde in der Einleitung schon beschrieben, kurz zusammengefasst kann man jedoch sagen, dass bei einem hohen SR-Kalziumgehalt die Inotropie der Zelle steigt, da bei jedem Aktionspotential mehr Kalzium ausgeschüttet werden kann und sich die Kontraktilität somit erhöht.

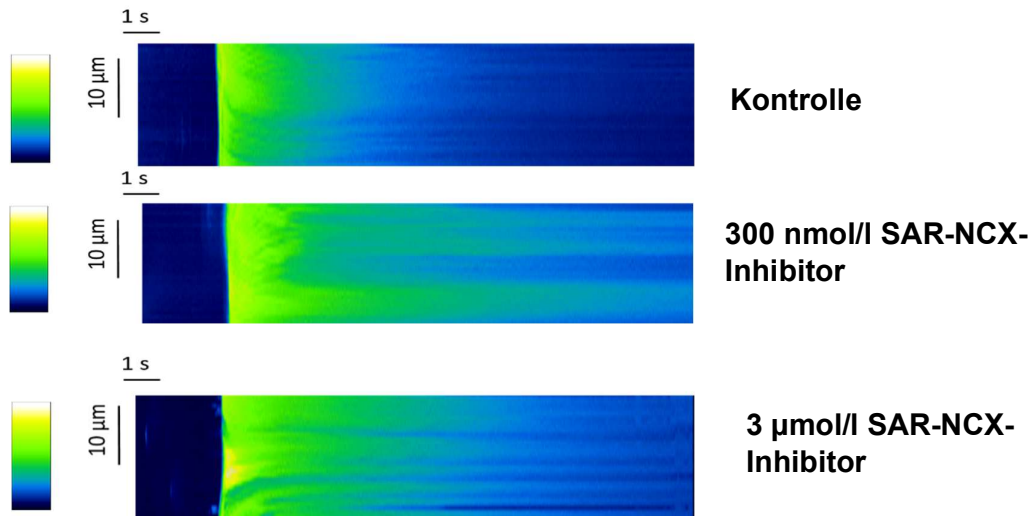
Dem gegenüber steht jedoch eine größere Wahrscheinlichkeit für arrhythmische Ereignisse, da sich bei vermehrtem SR-Kalziumgehalt die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR erhöht, was über den NCX zu DADs führen kann (Cheng and Lederer, 2008).

Mithilfe der Koffein-Messungen konnte nun eine komplette Ausschüttung des Kalziums aus dem SR erreicht werden, welche sich in der Aufnahme als *Peak* (Spitze) der Fluoreszenz ausdrückt.

Nach Subtraktion durch die jeweilige Hintergrundfluoreszenz konnte eine Amplitude ($\Delta F/F_0$ Koffeintransient) errechnet werden, die der relativen Menge an Kalzium entspricht.

Hierbei kam es zu einer signifikant erhöhten Amplitude, sprich einem erhöhten SR-Kalziumgehalt unter 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi. Dies ist in den repräsentativen Originalregistrierungen in Abbildung 17 deutlich zu sehen.

(A)



(B)

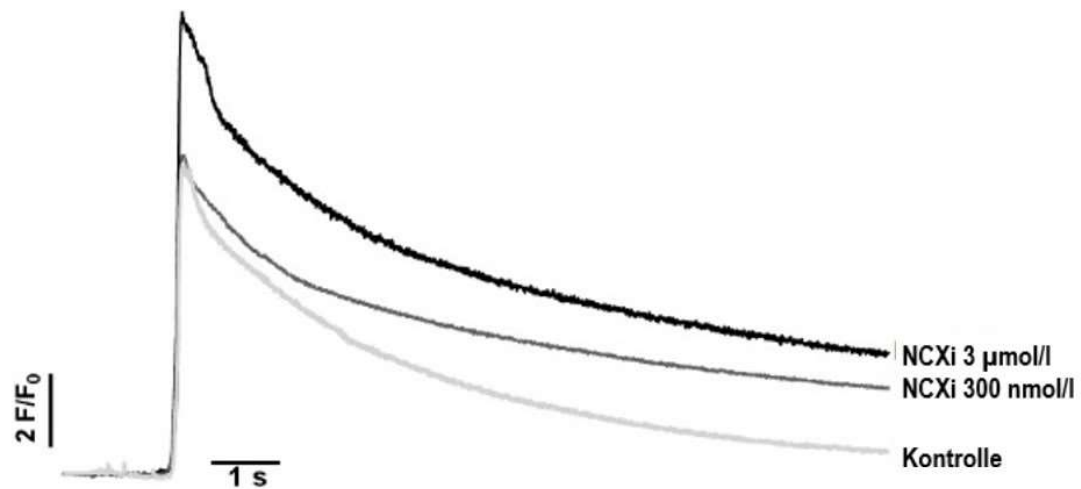


Abbildung 17: Originalregistrierungen der Koffeintransienten

Gezeigt sind repräsentative Messungen nach Zugabe von Koffein (A). In (B) wird die Auswertung der jeweiligen Messung (Kontrolle hell, 300 nmol/l SAR-NCXi grau und 3 μmol/l SAR-NCXi schwarz) dargestellt.

Die Amplitude lag in der Kontrolle im Mittel bei $8,62 \pm 0,68$ ($n = 14$), unter 300 nmol/l SAR-NCXi bei $8,52 \pm 0,76$ ($n = 11$) und unter $3 \mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi bei $11,58 \pm 1,30$ ($n = 9$) (siehe Abbildung 18).

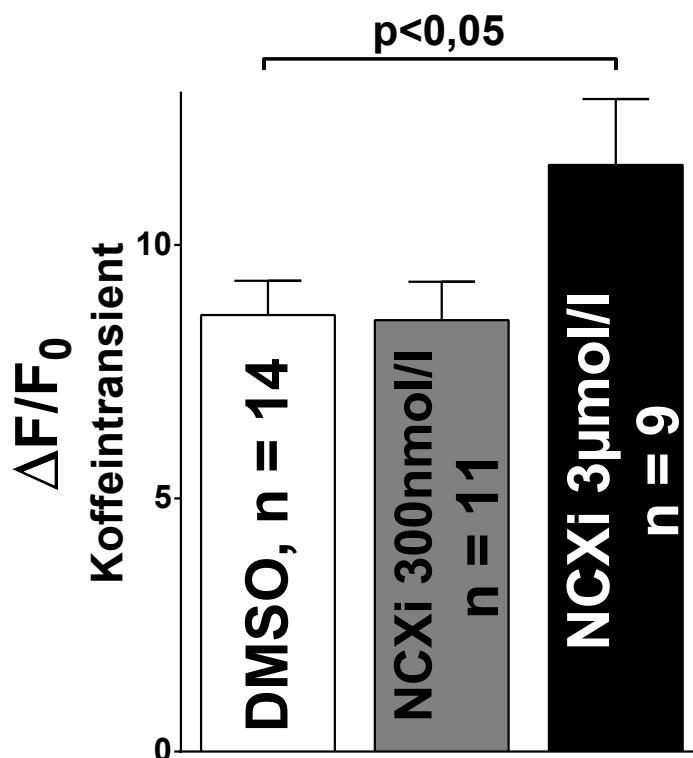


Abbildung 18: Die Amplituden der Koffeintransienten

Im Vergleich der Durchschnittswerte der Amplituden zeigte sich eine signifikante Zunahme derselben unter NCXi $3 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.2 Die Aktivität des NCX wird durch SAR-NCXi vermindert

Durch die Koffeinmessungen konnten anhand der Geschwindigkeit des Abfalls des Transienten auch Rückschlüsse auf die Aktivität des NCX gezogen werden (siehe Kapitel 2.2.2.2).

In Zahlen lässt sich das über die Relaxationszeit (RT 50% und RT 80%) fassen. Diese gibt die Zeit an, die der Transient benötigt, um auf 50% beziehungsweise 20% des Wertes der Amplitude abzufallen.

Da der NCX in der vorliegenden Arbeit medikamentös spezifisch inhibiert wurde, ist es wenig verwunderlich, dass es zu einer konzentrationsabhängig signifikanten Zunahme der RT 50% kam ($p < 0,05$).

Auch in den Originalregistrierungen in Abbildung 17 (A) kann man die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz zu Beginn des Transienten und den unterschiedlichen Rückgang derselben in den verschiedenen Medikamentengruppen sehen.

In der Abbildung 19 wurden außerdem die in Abbildung 17 bereits gezeigten Originalmessungen so bearbeitet, dass die Amplituden auf eine Einheitsgröße normalisiert sind und die unterschiedliche Geschwindigkeit des Transientenabfalls noch deutlicher beurteilt werden kann.

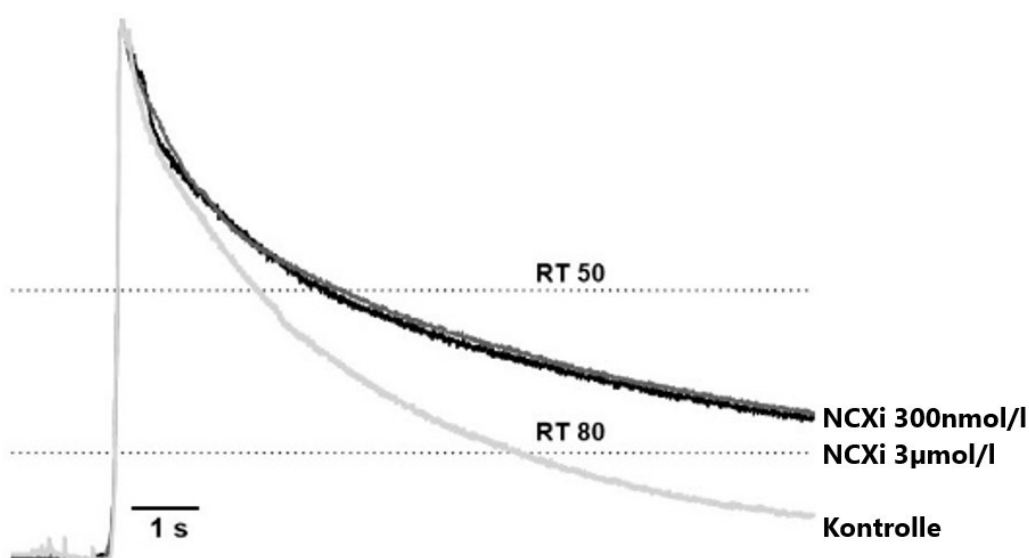


Abbildung 19: Die Funktion des NCX

Gezeigt sind beispielhafte Originalmessungen, bei welchen die jeweilige Amplitude auf 1 normalisiert wurde. Dadurch ist der unterschiedliche Abfall der Transienten deutlich erkennbar (Kontrolle hell, 300 nmol/l SAR-NCXi grau und 3 µmol/l SAR-NCXi schwarz). Die gestrichelten Linien RT 50 und RT 80 zeigen, wie die jeweiligen Werte zustande kommen.

Die Werte für die RT 50% waren im Durchschnitt in der Kontrolle $2023 \pm 181,7 \text{ ms}$ ($n = 11$), in der niedrigen SAR-NCXi-Konzentration $3034 \pm 337,9 \text{ ms}$ ($n = 11$) und in der hohen $3503 \pm 386,2 \text{ ms}$ ($n = 7$) (Abbildung 20).

Da die Transienten unter $3 \mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi während der Zeitdauer der Messung nicht auf 20% der Amplitude abfielen (siehe Abbildung 17 B), wurde für die Bestimmung

der RT 80% die *Baseline* (Fluoreszenz vor Koffeingabe) in allen Gruppen auf den Endpunkt des Transientenabfalls angehoben.

So wurden die Mittelwerte von $4990 \pm 378,5$ ms ($n = 14$) für die Kontrolle, $6389 \pm 312,5$ ms ($n = 11$) für 300 nmol/l SAR-NCXi und $6473 \pm 388,2$ ms ($n = 7$) für 3 μ mol/l SAR-NCXi für die RT 80% mit korrigierter *Baseline* berechnet, was auch einer signifikanten Zunahme durch das Medikament entspricht ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 20).

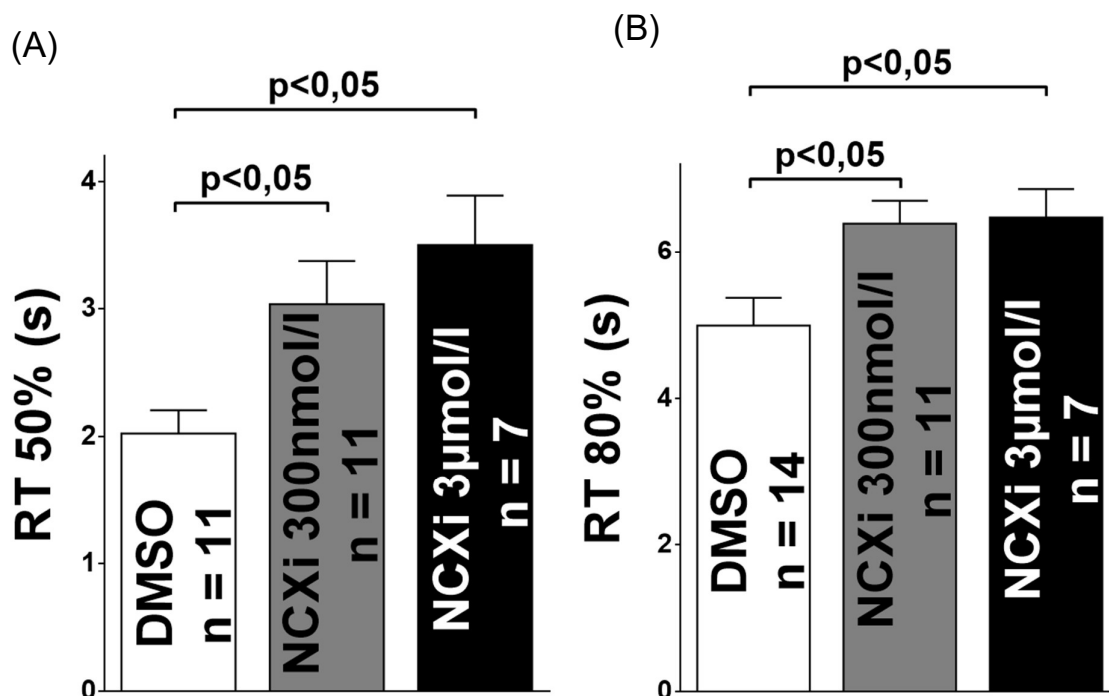


Abbildung 20: Der Abfall der Koffeintransienten

Gezeigt sind in (A) die Durchschnittswerte der RT 50% und in (B) die RT 80% mit korrigierter Baseline pro Patient. Es ergab sich jeweils eine signifikante Zunahme der Relaxationszeit unter beiden Medikamentenkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Bei erhöhtem SR-Kalziumgehalt bleibt die Sparkfrequenz unter SAR-NCXi gleich

Wie oben beschrieben, führt ein erhöhter SR-Kalziumgehalt in der Regel auch zu einer erhöhten Sparkfrequenz, was wiederum eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für DADs und somit eine erhöhte Arrhythmie neigung zur Folge hat.

Wie bereits gezeigt, sorgt das Medikament zumindest in der hohen Konzentration einerseits für einen erhöhten SR-Kalziumgehalt, andererseits jedoch in beiden Konzentrationen für eine signifikant verringerte diastolische Kalziumsparkfrequenz.

Die Frage, die sich nun stellt ist einerseits, ob die Korrelation zwischen SR-Kalziumgehalt und Sparkfrequenz in der vorliegenden Arbeit überhaupt gegeben war und wenn ja, inwiefern dies auch unter Medikamenteneinfluss der Fall ist.

Hierzu wurde die lineare Regression zwischen diesen Parametern erhoben. Dies war möglich, da bei 9 Patienten sowohl Spark-, als auch Koffeinmessungen erfolgten.

Wird die abhängige Variable Sparkfrequenz auf der y-Achse in Bezug zum jeweiligen Koffeintransienten als unabhängige Variable (x-Achse) abgebildet, so kann der lineare Zusammenhang als Gerade mit der Funktion $f(x) = mx + n$ gezeigt werden (siehe Abbildung 21). Dabei gibt der Faktor m die Steigung der Geraden an, den sogenannten *slope*-Wert. Ist dieser Wert 0, so ist die Funktion parallel zur x-Achse und es besteht keinerlei Zusammenhang zwischen abhängiger und unabhängiger Variable. Mithilfe des F-Tests kann bestimmt werden, ob die Nullhypothese (*slope*-Wert gleich 0) abgelehnt werden kann und somit ein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht.

In der Analyse zur linearen Regression konnte in der Kontrollgruppe, wenn auch kein signifikanter, so doch ein deutlicher Zusammenhang zwischen Sparkfrequenz und Amplitude des Koffeintransienten festgestellt werden ($p = 0,053$). Der *slope*-Wert betrug 0.47 ± 0.15 ($n = 5$). In den Messungen mit SAR-NCXi zeigte sich hingegen keine Steigung, so war der *slope*-Wert bei 300 nmol/l -0.14 ± 0.18 ($n = 5$) und bei 3 $\mu\text{mol/l}$ -0.38 ± 0.60 ($n = 5$).

Dies zeigt für SAR-NCXi in beiden Konzentrationen, dass egal wie hoch die Amplitude des Koffeintransienten bei einem Patienten war, die Sparkfrequenz mehr oder weniger unbeeinflusst blieb (siehe Abbildung 21).

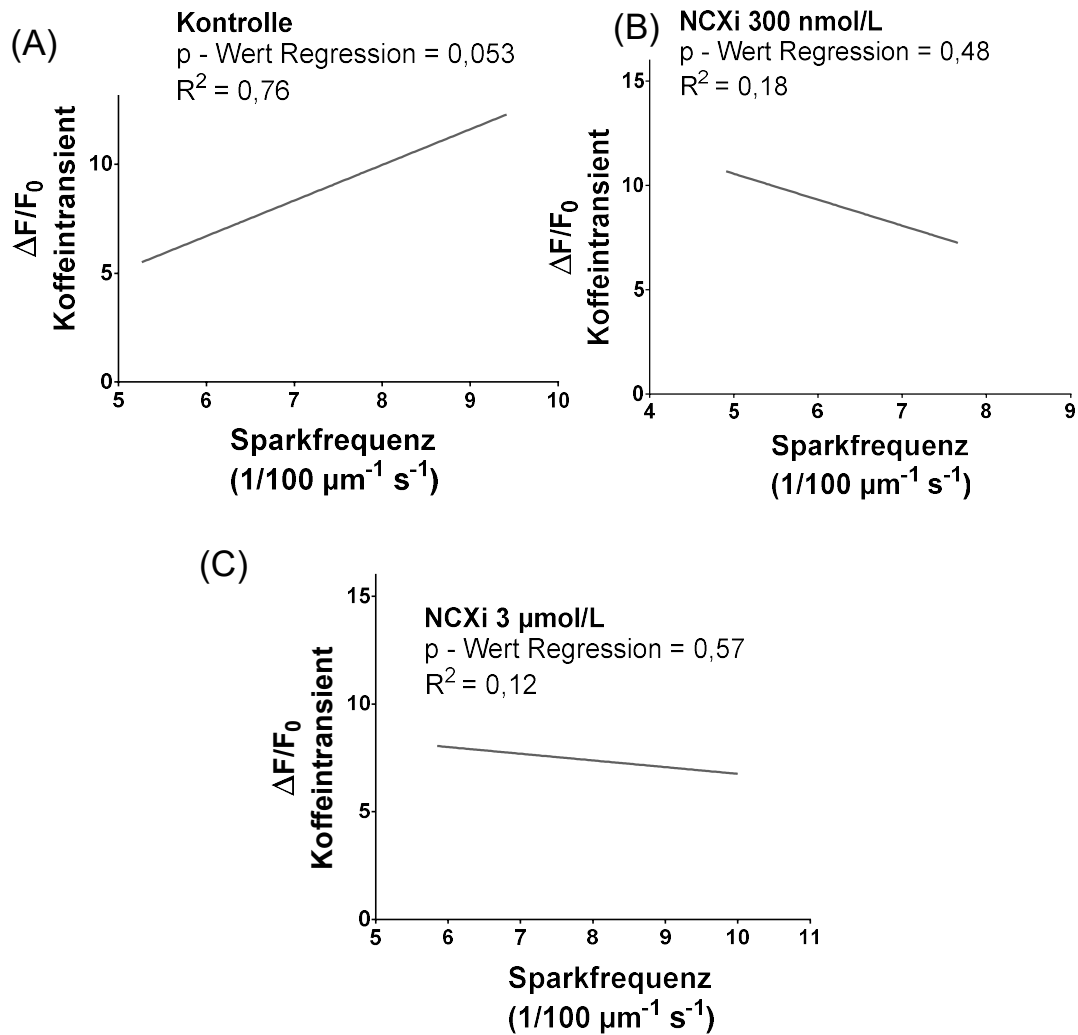


Abbildung 21: Der Zusammenhang von Kalziumbeladung und Sparkfrequenz

Dargestellt ist jeweils die lineare Regression mit dem Koffeintransienten als abhängige Variable und der Sparkfrequenz als unabhängige Variable. In (A) zeigt sich, dass die unter Kontrollbedingungen gemessenen Zellen einen annähernd positiven Zusammenhang zwischen Koffeintransienten und Sparkfrequenz aufwiesen bei einem $p = 0,053$. Unter dem Einfluss von NCXi war dieser Zusammenhang nicht gegeben. Es kann bei einer n-Zahl von jeweils 5 jedoch argumentiert werden, dass die R^2 -Werte in den NCXi-Gruppen jeweils sehr klein sind, sodass die Aussagekraft der gemessenen Regression begrenzt ist.

3.4 In ventrikulären Zellen zeigen sich ähnliche Effekte unter NCX-Inhibition

Die Ergebnisse aus den Messungen mit atrialen Kardiomyozyten sollten in Messungen mit ventrikulären Zellen überprüft werden. Schließlich würde der Effekt einer systemischen Therapie vorrangig diese betreffen. Das Problem dabei ist die Zellgewinnung. Sie ist nur bei Herztransplantationen und Myektomien möglich – beides Eingriffe, die am Universitätsklinikum Regensburg während der Messperiode nicht sehr häufig durchgeführt wurden. Für die konfokalmikroskopischen Messungen mit ventrikulären Kardiomyozyten konnte somit das folgende Patientenkollektiv erhoben werden (Tabelle 11). Insgesamt wurden hier die Zellen von 4 Patienten gemessen und in die Statistik mit aufgenommen.

Tabelle 11: Patientendaten der konfokalmikroskopischen Messungen (Ventrikel)

	Absolute Häufigkeit (Relative Häufigkeit in %)	Mittelwert ± SD
Gesamtzahl	4 (100 %)	
Alter		49,75 ± 10,21
Männliches Geschlecht	4 (100 %)	
Normale EF (> 55 %)	1 (25 %)	
Schwergradig eingeschränkte EF (<35%)	3 (75 %)	
Mittlere EF in %		27,00 ± 22,20
BMI in kg/m²		24,32 ± 10,02
Koronare Herzkrankheit	3 (75 %)	
Arterielle Hypertonie	3 (75 %)	

Ischämische Kardiomyopathie	2 (50 %)	
hypertroph obstruktive Kardiomyopathie	1 (25 %)	
dilatative Kardiomyopathie	1 (25 %)	
Laborwerte		
NTproBNP vor Operation in pg/ml		3222,00 ± 1648,97
CRP in mg/l		8,35 ± 0,92

Die Menge an Kalziumsparks wurde durch die Zugabe des Inhibitors auch in den Ventrikelzellen signifikant gesenkt ($p < 0,05$).

Bei den Ventrikelzellen waren es für die Kontrollgruppe Werte von $2,51 \pm 0,18$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ ($n = 4$), für die niedrige SAR-NCX-Inhibitor-Konzentration $1,53 \pm 0,12$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ ($n = 3$) und für die hohe SAR-NCX-Inhibitor-Konzentration $0,90 \pm 0,27$ Sparks/100 $\mu\text{m/s}$ ($n = 3$) (Abbildung 22).

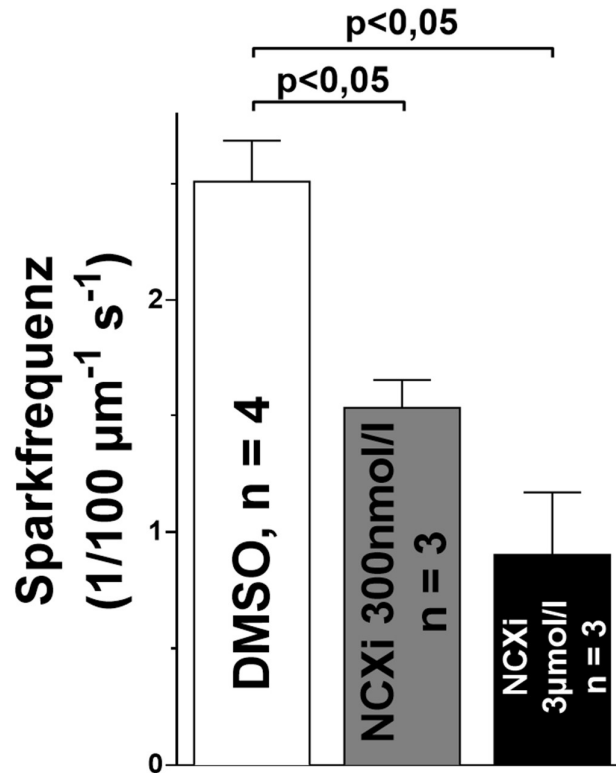


Abbildung 22: Die Sparkfrequenz in den ventrikulären Zellen

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Sparkfrequenz unter SAR-NCXi in beiden Konzentrationen.

Auch in den ventrikulären Zellen kam es zu keinen großen Differenzen der Kalziumsparkausdehnung.

Der Vergleich der Amplituden in der Kontrolle ($1,69 \pm 0,12$, $n = 4$) und bei der niedrigen ($1,76 \pm 0,24$, $n = 3$) und hohen ($1,73 \pm 0,31$, $n = 3$) SAR-NCXi-Konzentration ergaben im Vergleich keine Signifikanz ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 23).

Außerdem kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Dauer ($p > 0,05$). Die durchschnittliche Sparkdauer war in der Kontrolle $19,43 \pm 4,61$ ms ($n = 4$), unter 300 nmol/l SAR-NCXi $16,79 \pm 1,30$ ms ($n = 3$) und unter 3 μmol/l SAR-NCXi $24,03 \pm 6,32$ ms ($n = 3$).

Zwar ging auch hier zumindest bei einer hohen SAR-NCXi-Konzentration der Trend zu längeren *Sparks*, jedoch ist dies aufgrund der niedrigen n-Zahl und der großen Standardfehler eher spekulativ (siehe Abbildung 24).

Ebenso verhielt es sich bei der räumlichen Ausdehnung der *Sparks*. So lagen die Mittelwerte bei $1,41 \pm 0,16 \mu\text{m}$ ($n = 4$) in der Kontrolle und bei $1,33 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ($n = 3$) und $1,60 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ($n = 3$) für die niedrige und hohe Medikamentenkonzentration. Dies ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23).

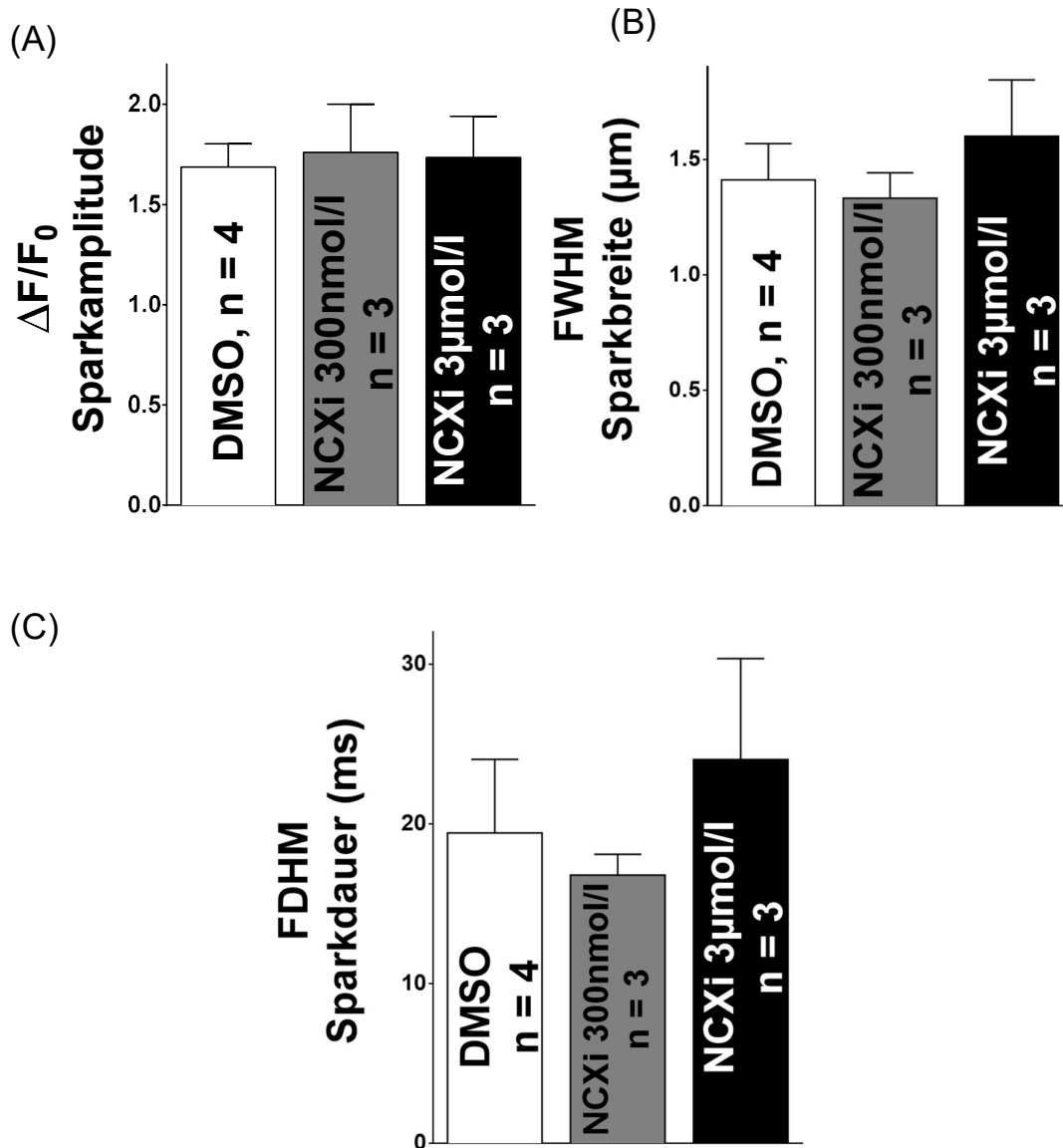


Abbildung 23: Die Ausdehnung der Sparks in den ventrikulären Zellen

Gezeigt sind die Durchschnittliche Sparkamplitude (A), die Sparkbreite (B) und die Sparkdauer (C) der ventrikulären Zellen sowie unter 300 nmol/l NCXi, 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi. Bei keinem der genannten Parameter ergab sich eine signifikante Veränderung.

Wie zuvor bei den atrialen Messungen wurde auch hier das diastolische Kalziumleck über das Produkt aus Sparkfrequenz und -ausdehnung berechnet. Die genauen Werte waren hier für die Kontrolle $1,38 \pm 0,66$ ($n = 4$), für die geringe SAR-NCXi-Konzentration $0,60 \pm 0,10$ ($n = 3$) und für die hohe SAR-NCXi-Konzentration $0,75 \pm 0,50$ ($n = 3$) (siehe Abbildung 24).

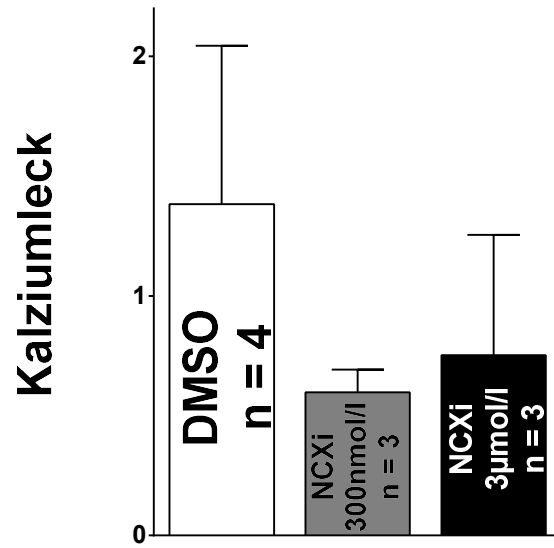


Abbildung 24: Das diastolische Kalziumleck in den ventrikulären Zellen

Beim diastolischen Kalziumleck ergaben sich in den ventrikulären Zellen große Standardfehler, sodass keine signifikanten Unterschiede messbar waren.

3.5 Der Inhibitor beeinflusst das Aktionspotential nicht

Für die Messungen mit der Patch-clamp-Methode konnten folgende Patientendaten erhoben werden (Tabelle 12). Insgesamt wurden hier die Messungen der Zellen von 26 Patienten in die Statistik mit aufgenommen.

Tabelle 12: Patientendaten der Patch-clamp Messungen

	Absolute Häufigkeit (Relative Häufigkeit in %)	Mittelwert ± SD
Gesamtzahl	26 (100 %)	
Alter		69,15 ± 8,21
Männliches Geschlecht	22 (84,6 %)	
Normale EF (> 55 %)	12 (50 %)	
Leichtgradig eingeschränkte EF (45-55 %)	4 (16,7 %)	
Mittelgradig eingeschränkte EF (35-45 %)	5 (20,8 %)	
Schwergradig eingeschränkte EF (<35%)	3 (12,5 %)	
Mittlere EF in %		55,33 ± 15,88
Sinusrhythmus	23 (88,5 %)	
paroxysmales Vorhofflimmern	1 (3,8 %)	
persistierendes Vorhofflimmern	1 (3,8 %)	
Schrittmacher	1 (3,8 %)	

Diabetes mellitus	9 (34,6 %)	
BMI in kg/m²		28,51 ± 3,97
Koronare Herzkrankheit	25 (96,2 %)	
Z.n. Myokardinfarkt	5 (19,2 %)	
Arterielle Hypertonie	22 (84,6 %)	
Hochgradige Aortenstenose	2 (8,0 %)	
Hochgradige Mitralinsuffizienz	1 (4,0 %)	
Diastolische Dysfunktion	8 (33,3 %)	
regelmäßig eingenommene Medikamente		
β-Blocker	20 (76,9 %)	
ACE-Hemmer / AT1-Blocker	20 (76,9 %)	
Kalziumantagonist	10 (38,5 %)	
Statine	21 (80,8 %)	
Laborwerte		
NTproBNP vor Operation in pg/ml		571,26 ± 531,10
CRP in mg/l		10,20 ± 20,42
HbA1c in %		6,65 ± 1,04

3.5.1 Die AP-Morphologie bleibt durch SAR-NCXi unbeeinflusst

Bezüglich der Aktionspotentialmorphologie können verschiedene Parameter ausgewertet werden.

So kann neben dem Ruhemembranpotential einerseits die Höhe und Geschwindigkeit des Aufstrichs der einzelnen Aktionspotentiale ausgewertet werden. Andererseits wird die Dauer bis zur 50%igen, beziehungsweise 90%igen Repolarisation verglichen.

Es wurden jeweils 20 Aktionspotentiale mit der Frequenz 1 Hz ausgelöst und ausgewertet.

Zunächst wird die Originalregistrierung eines typischen Aktionspotentials gezeigt, bei dem man als erste Spitze die künstliche Stimulation und das darauffolgende eigentliche Aktionspotential der Zelle sieht (siehe Abbildung 25).

Außerdem sind in Abbildung 25 die Parameter der Aktionspotentialentstehung gezeigt: das durchschnittliche Ruhemembranpotential der Zellen zwischen den Aktionspotentialen, die Höhe der ausgelösten Erregungen und die Geschwindigkeit des Aufstrichs derselben.

Dabei zeigte sich für die unbehandelten Zellen ein Ruhemembranpotential von $-81,64 \pm 1,69 \text{ mV}$ ($n = 9$), für die mit SAR-NCXi behandelten Zellen $-78,19 \pm 1,41 \text{ mV}$ ($n = 11$) bei 300 nmol/l und $-81,28 \pm 2,56 \text{ mV}$ ($n = 9$) bei 3 $\mu\text{mol/l}$.

Bei der Aktionspotentialamplitude waren die Werte in der Kontrolle $99,38 \pm 5,55 \text{ mV}$ ($n = 9$), bei 300 nmol/l NCXi $101,61 \pm 4,52 \text{ mV}$ ($n = 11$) und bei 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi $98,79 \pm 4,54 \text{ mV}$ ($n = 9$). Dies ergab jeweils keine signifikanten Unterschiede.

Auch beim dritten Parameter verhielt es sich so. So zeigten die Aktionspotentiale in der Kontrolle eine Aufstrichgeschwindigkeit von $48,43 \pm 7,22 \text{ V/s}$ ($n = 9$), unter 300 nmol/l SAR-NCXi $52,81 \pm 5,03 \text{ V/s}$ ($n = 11$) und unter 3 $\mu\text{mol/l}$ $46,96 \pm 5,58 \text{ V/s}$ ($n = 9$).

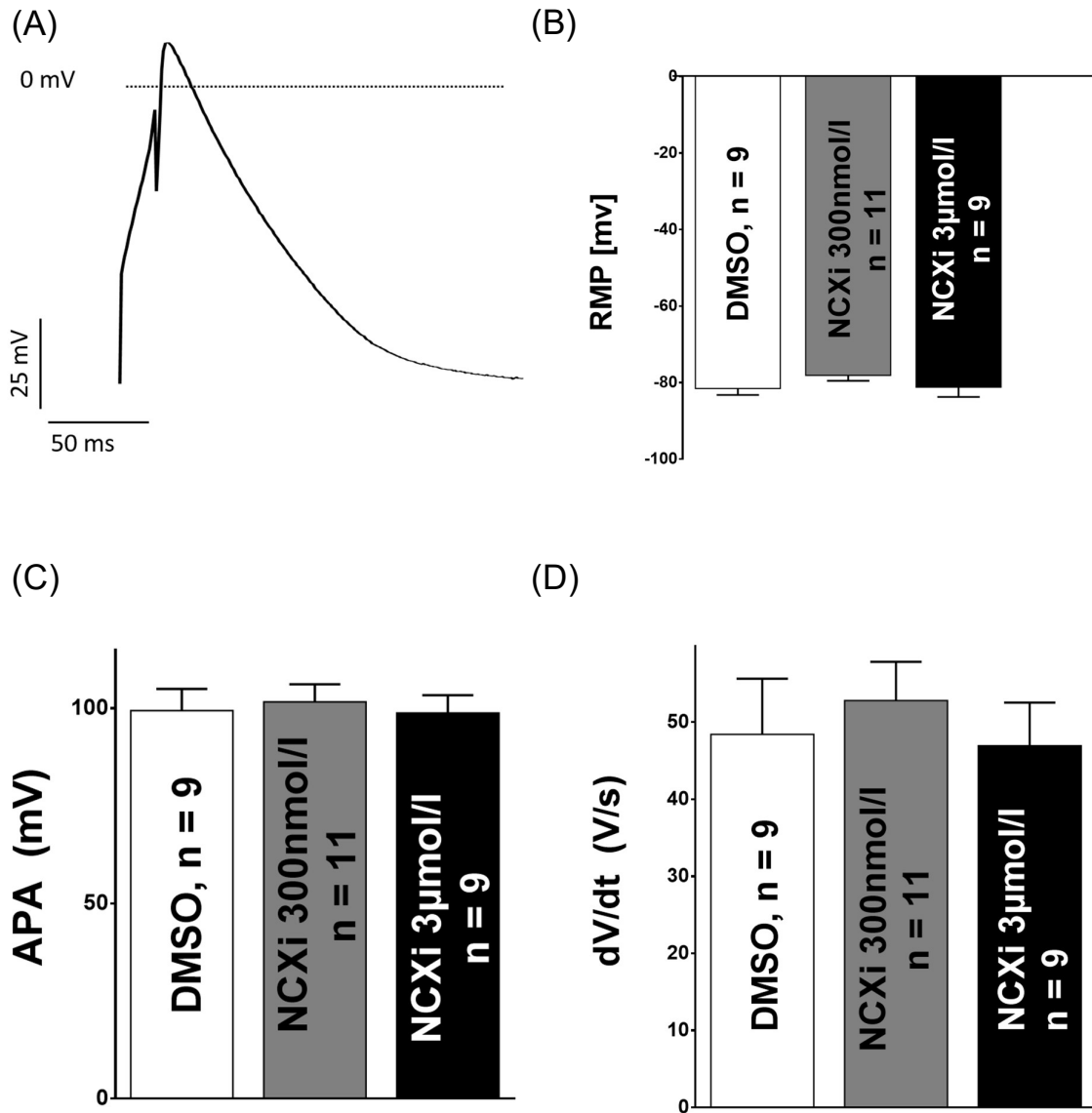


Abbildung 25: Die Aktionspotentialmorphologie

In (A) ist die Originalregistrierung eines typischen Aktionspotentials (Kontrolle) zu sehen mit der ersten Spitze, die der Stimulation entspricht und dem dadurch ausgelösten Aktionspotential. Außerdem sind die Durchschnittswerte von Ruhemembranpotential (B), Aktionspotentialamplitude (C) und maximaler Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials (D) der Kontrollgruppe und unter verschiedenen Konzentrationen des SAR-NCXi gezeigt, welche keine signifikante Änderung durch das Medikament zeigten. RMP = Ruhemembranpotential, APA = Aktionspotentialamplitude, dV/dt = Aufstrichgeschwindigkeit.

Auch für die Aktionspotentialdauer als Maß einer potentiellen Arrhythmieentstehung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

So war die APD 50% (Dauer von der Spitze des Aktionspotentials bis zur 50%igen Repolarisation) in der Kontrolle $22,17 \pm 0,79 \text{ ms}$ ($n = 9$) gegenüber $19,73 \pm 2,26 \text{ ms}$ ($n = 11$) bei 300 nmol/l NCXi und $25,61 \pm 1,23 \text{ ms}$ ($n = 8$) bei 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi.

Die Werte für die APD 90% waren ebenso nicht signifikant unterschiedlich: die Zellen der Kontrollgruppe benötigten im Durchschnitt $48,40 \pm 8,87 \text{ ms}$ ($n = 9$), während die Zellen unter 300 nmol/l und 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi $46,10 \pm 7,90 \text{ ms}$ ($n = 11$) beziehungsweise $54,65 \pm 12,76 \text{ ms}$ ($n = 8$) für die 90%ige Repolarisation benötigten.

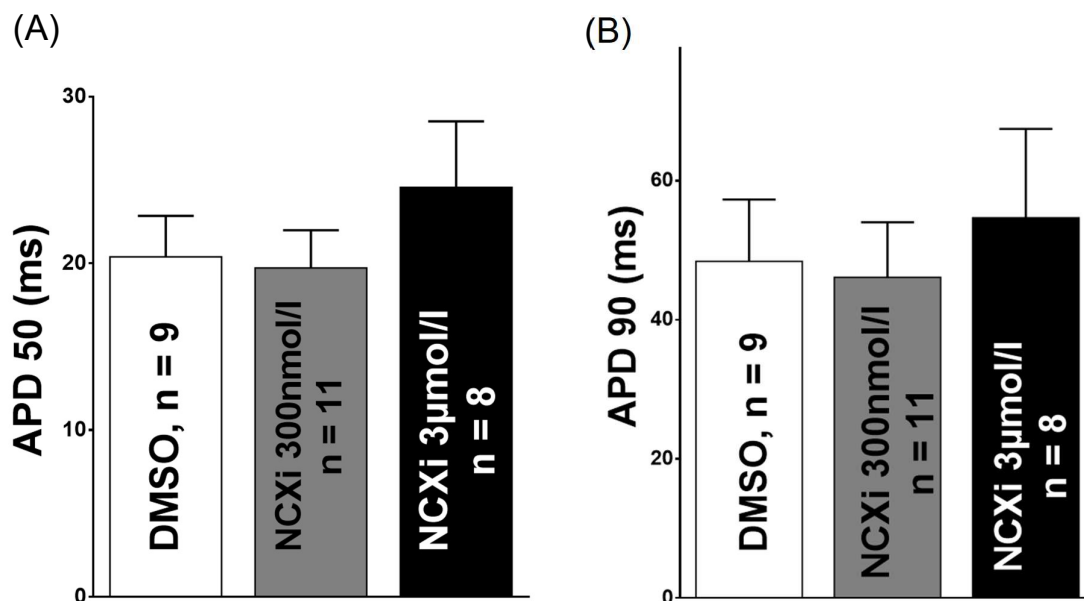


Abbildung 26: Die Aktionspotentialdauer

Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Dauer der Aktionspotentiale, ausgedrückt durch die Zeit bis zur 50%igen (A) und 90%igen (B) Repolarisation. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. APD = Aktionspotentialdauer.

3.5.2 Unterschiedliche Variabilität der Aktionspotentialdauer unter SAR-NCXi

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Funktion des NCX entscheidend für die Entstehung von DADs. Somit könnte eine Inhibition diese unterdrücken. Auch die verminderte Sparkfrequenz (siehe 3.1.3) unter der Medikation würde dies begründen. Leider fanden sich in den Messungen keinerlei spontane Depolarisationen.

Ein anderer Parameter, der die Induzierbarkeit von Arrhythmien sehr gut vorhersagen kann, ist die Variabilität der Aktionspotentialdauer. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Dennoch zeigte sich die deutliche Tendenz, dass die Variabilität der Aktionspotentialdauer durch den SAR-NCXi abnahm (Abbildung 27).

So waren die Werte für die Kontrolle $2,11 \pm 0,87 \text{ ms}$ ($n = 8$), für 300 nmol/l NCXi $1,86 \pm 0,60 \text{ ms}$ ($n = 11$) und für 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi $0,94 \pm 0,43 \text{ ms}$ ($n = 6$). Ein Welch-Test für den Vergleich von Kontrollgruppe mit 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi ergab einen p-Wert von 0,23. Dies liegt vor allem an der großen Variabilität der einzelnen Werte, sodass die Standardfehler jeweils sehr groß waren und eine signifikante Aussage bei der vorliegenden n-Zahl nicht möglich ist.

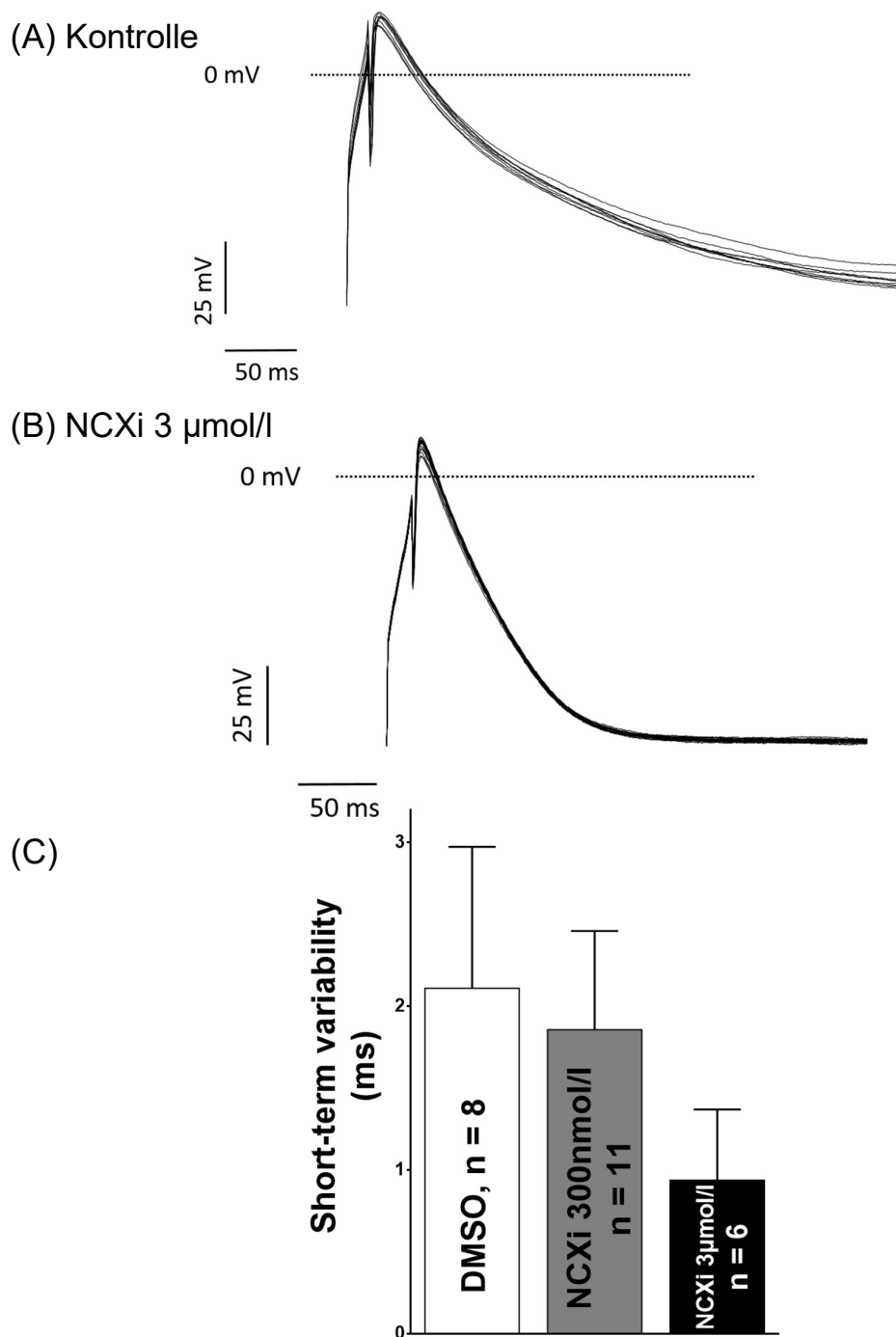


Abbildung 27: Die Variabilität der Aktionspotentiale

Gezeigt sind Originalregistrierungen mit jeweils 20 APs in der Frequenz 1/s in der Kontrolle mit hoher (A) und unter 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi mit niedriger STV (B). In (C) werden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen für die STV dargestellt.

3.5.3 Keine Induktion von Arrhythmien durch Digoxin

Im Anschluss an die obige Versuchsreihe wurden abermals Patch-clamp-Experimente durchgeführt. Die Frage war dieses Mal, ob sich durch die Zugabe von Digoxin 10 $\mu\text{mol/l}$ Arrhythmien auslösen, beziehungsweise Hinweise für eine vermehrte Arrhythmogenität der Zellen finden ließen. Zusätzlich wurden die Zellen wieder mit SAR-NCXi in den beiden Konzentrationen 300 nmol/l und 3 $\mu\text{mol/l}$ behandelt und die oben bereits beschriebenen Parameter ausgewertet.

Auch hier zeigten sich unter Verwendung des SAR-NCXi keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Abbildung 28).

Beim Ruhemembranpotential waren die Mittelwerte für 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin $-80,31 \pm 4,38 \text{ mV}$ ($n = 8$), bei Zugabe von 300 nmol/l NCXi $-74,44 \pm 1,81 \text{ mV}$ ($n = 6$) und bei Zugabe von 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi $-76,37 \pm 1,75 \text{ mV}$ ($n = 7$) ($p > 0,05$).

Bei der Aktionspotentialamplitude waren die Werte für 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin $90,61 \pm 6,48 \text{ mV}$ ($n = 8$), bei Zugabe von 300 nmol/l NCXi $85,31 \pm 6,30 \text{ mV}$ ($n = 6$) und bei Zugabe von 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi $92,31 \pm 2,68 \text{ mV}$ ($n = 7$) ($p > 0,05$).

Für die maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials wurden bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin $36,85 \pm 4,70 \text{ V/s}$ ($n = 8$), bei Zusatz von 300 nmol/l NCXi $34,74 \pm 4,69 \text{ V/s}$ ($n = 6$) und bei Zusatz von 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi $36,32 \pm 2,60 \text{ V/s}$ ($n = 7$) gemessen ($p > 0,05$).

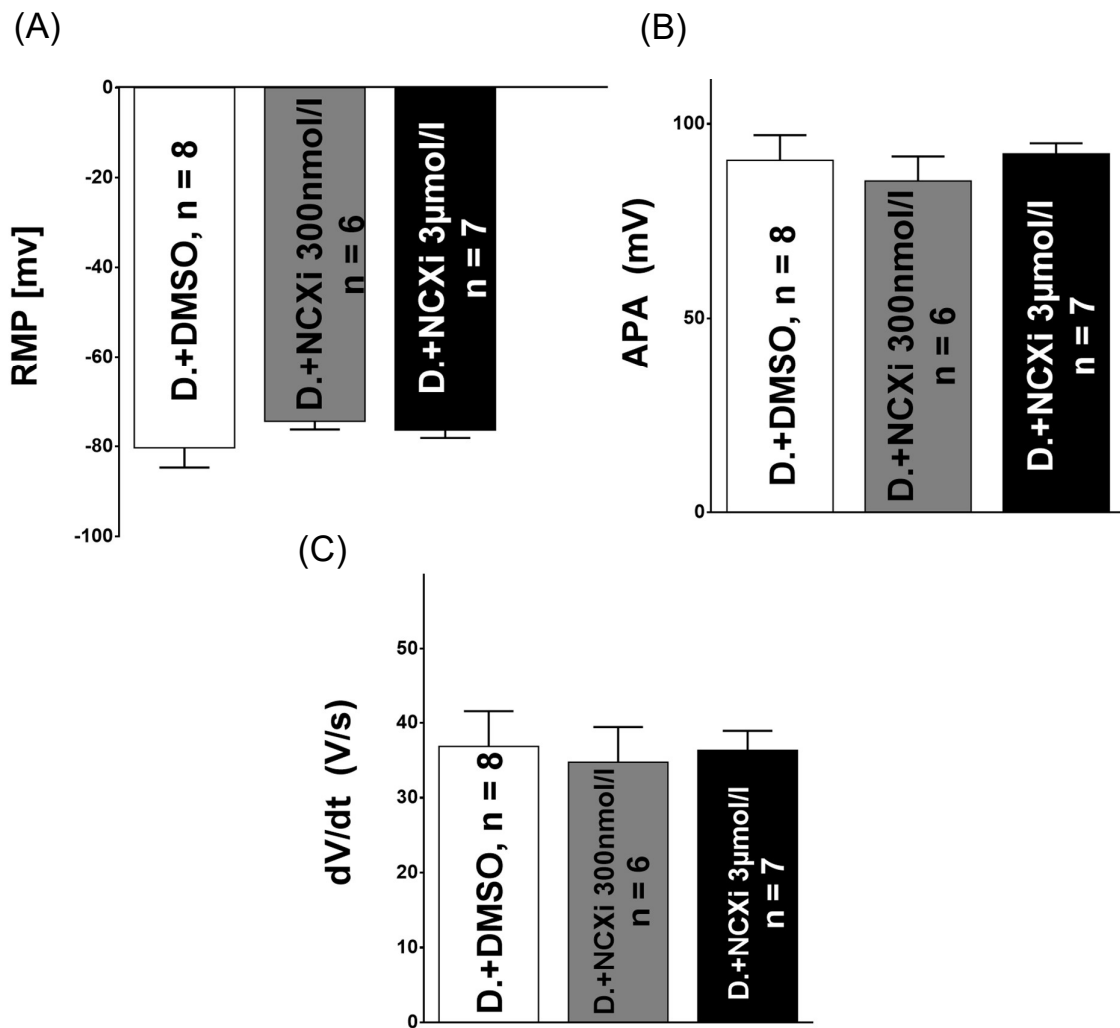


Abbildung 228: Die Aktionspotentialmorphologie unter Digoxin

Es sind die Parameter der Aktionspotentialmorphologie unter 10 μmol/l Digoxin gezeigt: Durchschnittswerte von Ruhemembranpotential (A), Aktionspotentialamplitude (B) und maximaler Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials (C). RMP = Ruhemembranpotential, APA = Aktionspotentialamplitude, dV/dt = Aufstrichgeschwindigkeit.

Auch bei der Aktionspotentialdauer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 29). Die APD 50 % und APD 90 % war nach Behandlung der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin bei $24,22 \pm 3,30 \text{ ms}$ bzw. $58,06 \pm 10,06 \text{ ms}$ ($n = 8$), bei zusätzlicher Behandlung mit 300 nmol/l $26,05 \pm 3,43 \text{ ms}$ bzw. $70,32 \pm 16,72 \text{ ms}$ ($n = 6$) und bei 3 $\mu\text{mol/l}$ $24,98 \pm 2,27 \text{ ms}$ bzw. $58,63 \pm 9,38 \text{ ms}$ ($n = 7$) ($p > 0,05$).

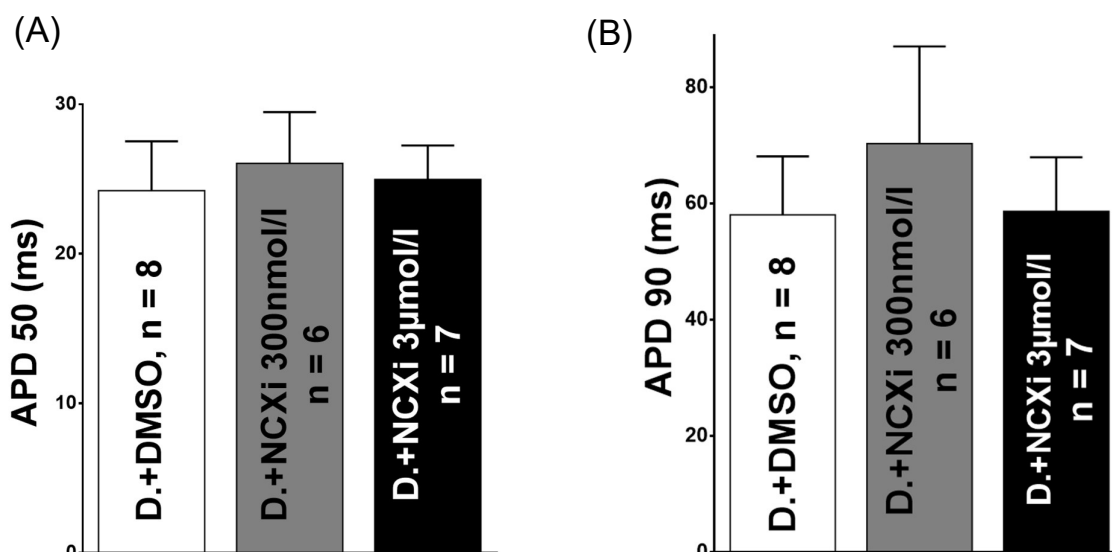


Abbildung 29: Die Aktionspotentialdauer unter Digoxin

Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Dauer der Aktionspotentiale unter Digoxin 10 $\mu\text{mol/l}$, ausgedrückt durch die Zeit bis zur 50%igen (A) und 90%igen (B) Repolarisation. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Ebenso wie zuvor wurde die Analyse der Variabilität der Aktionspotentialdauer durchgeführt. Auch unter Digoxin zeigte sich augenscheinlich ein leichter Trend zur Reduktion derselben unter NCXi, insbesondere in der höheren Konzentration (siehe Abbildung 30). Allerdings lag der p-Wert im Welch-Test für den Vergleich von 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Digoxin + 3 $\mu\text{mol/l}$ SAR-NCXi bei 0,5, weshalb keine valide Aussage möglich ist. Die genauen Werte für Digoxin 10 $\mu\text{mol/l}$ und den jeweiligen Zusatz von 300 nmol/l NCXi und 3 $\mu\text{mol/l}$ NCXi lagen bei $2,37 \pm 0,60 \text{ ms}$ ($n = 8$), $2,09 \pm 0,59 \text{ ms}$ ($n = 4$) und $1,67 \pm 0,82 \text{ ms}$ ($n = 6$).

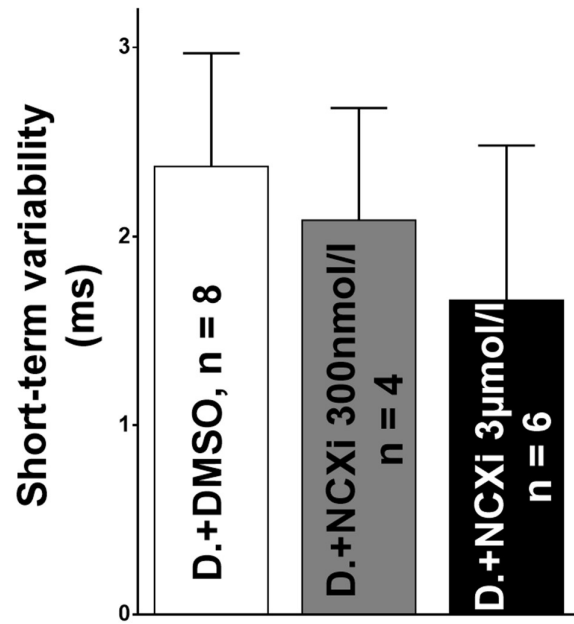


Abbildung 30: Die Variabilität der Aktionspotentiale unter Digoxin 10 µmol/l

Es zeigt sich eine gewisse Reduktion der STV durch den NCXi, diese ist jedoch aufgrund der großen Standardfehler nicht aussagekräftig.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss eines neuartigen Inhibitors des NCX auf den Kalziumhaushalt und die Arrhythmogenität von humanen Kardiomyozyten getestet. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung zu mehreren deutlichen Veränderungen führt.

Es konnte mithilfe des konfokalen Lasermikroskops einerseits eine signifikant verringerte Anzahl an Kalziumsparks und andererseits in Koffeinexperimenten eine signifikant höhere Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums mit Kalzium nachgewiesen werden.

In Patch-clamp Experimenten konnte eine unveränderte Aktionspotentialmorphologie gemessen werden. Eine veränderte Induzierbarkeit von Arrhythmien konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch ein leichter Trend zu stabileren Aktionspotentialen unter SAR-NCXi.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das neue Medikament im humanen Zellexperiment zu einer verringerten Wahrscheinlichkeit für arrhythmische Ereignisse bei erhöhtem SR-Kalzium Gehalt führt und somit weitere Testungen für den Einsatz bei Herzinsuffizienz und zur Arrhythmie-Prävention gerechtfertigt sind.

4.1 Der Einfluss der NCX-Inhibition auf das diastolische Kalziumleck

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, kommt es bei Herzinsuffizienz zu einer vermehrten Expression und Aktivität des NCX, was diese wiederum verstärkt und die Neigung der einzelnen Herzmuskelzellen zu Arrhythmien fördert (Hasenfuss and Pieske, 2002; Pogwizd *et al.*, 2001).

Der ausschlaggebende Punkt ist hierbei, dass es aufgrund des vermehrten diastolischen Kalziumlecks in der Herzinsuffizienz über den NCX zur Kalziumextrusion aus der Zelle und somit zu einer Entleerung des SR kommt (Pogwizd *et al.*, 2001). Da es dabei auch zur Ladungsverschiebung kommt, können DADs provoziert und damit Arrhythmien ausgelöst werden (Venetucci *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit konnte durch die Inhibition des NCX eine signifikante Verringerung der Kalziumsparkfrequenz nachgewiesen werden. Allerdings war das diastolische Kalziumleck aufgrund der größeren Ausdehnung der Sparks in der Medikamentengruppe insgesamt nicht signifikant herabgesetzt. Umso erstaunlicher ist dies, da der SR-Kalziumgehalt unter dem NCX-Inhibitor signifikant erhöht war und dies eigentlich zu einer erhöhten Frequenz von Kalziumsparks und einem erhöhten diastolischen Kalziumleck führen müsste (Cheng and Lederer, 2008).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich in den Zellen der Patienten der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Anzahl von spontanen Kalzium-Freisetzungseignissen aus dem SR während der Diastole. Die Ursache dafür liegt in den Vorerkrankungen der Patienten, da ausschließlich Patienten mit vorgeschädigtem Herz operiert und somit nur deren Zellen gemessen werden konnten. Eine erhöhte diastolische Sparkfrequenz in Kardiomyozyten, die einem pathologischen Umbau unterlegen sind, konnte für viele Krankheiten nachgewiesen werden, allen voran das Vorhofflimmern und die Herzinsuffizienz (Chang *et al.*, 2011; Bers, 2014). Für die signifikante Verringerung der Sparkfrequenz unter SAR-NCXi kommen verschiedene Mechanismen in Betracht, von denen im Folgenden drei erläutert und gezeigt werden (siehe Abbildung 32).

Erstens sorgt eine erhöhte NCX-Aktivität im insuffizienten Herzen für höhere diastolische Kalziumwerte (Lou *et al.*, 2012). Auch wenn die eigentliche Funktion des *forward mode* des NCX die Kalziumextrusion ist, zeigt sich gerade bei erhöhten intrazellulären Natriumwerten und einem instabilen Ruhemembranpotential eine erhöhte *reverse mode* Aktivität des NCX, wie in Abbildung 31 gezeigt (Bers, 2002; Despa *et al.*, 2002).

Dazu kommt es unter anderem durch vermehrte späte Natriumströme, wie sie in insuffizienten Kardiomyozyten auftreten (Wagner *et al.*, 2011b).

Die *reverse mode* Aktivität des NCX sorgt für einen diastolischen Kalziumeinstrom in die Zelle, welcher einzelne RyR aktivieren und somit *Sparks* entstehen lassen kann. Die Blockade des NCX durch SAR-NCXi verhindert dies und sorgt somit für die verringerte Sparkfrequenz.

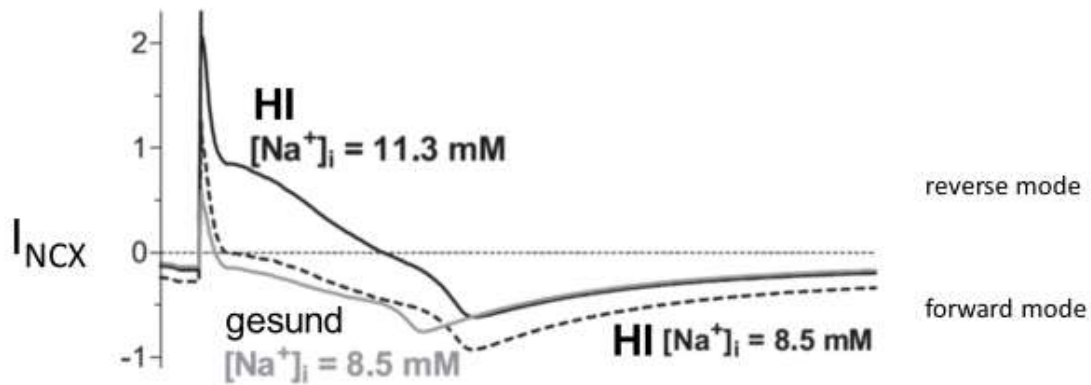


Abbildung 31: Der NCX-Strom (I_{NCX})

Gezeigt ist der errechnete Strom des NCX bei insuffizienten Zellen (schwarz und gestrichelt, HI), beziehungsweise gesunden Zellen (grau) und unterschiedlichen Natriumkonzentrationen. Es zeigt sich eine deutlich vermehrte Aktivität im reverse mode bei Herzinsuffizienz (in Anlehnung an Despa *et al.*, 2002).

Der zweite wichtige Faktor in insuffizienten Kardiomyozyten ist die sog. CaMKII (Kalzium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II), die hauptsächlich in der delta-Isoform in menschlichen Kardiomyozyten vorliegt und zahlreiche Funktionen hat. Sie kann die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 durch Phosphorylierung erhöhen und sorgt somit für eine pathologisch erhöhte Sparkfrequenz (Wehrens *et al.*, 2004; Ai *et al.*, 2005). Die Aktivität der CaMKII ist in insuffizienten Kardiomyozyten erhöht, da sie von reaktiven Sauerstoffspezies (siehe unten) und einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration (siehe oben) aktiviert wird (Wagner *et al.*, 2011a). Somit kann ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten *reverse* NCX-Aktivität und einer erhöhten Sparkfrequenz hergestellt werden, da diese eine Aktivierung der CaMKII begünstigt, welche wiederum die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöht.

Drittens zeigt sich in Kardiomyozyten von herzinsuffizienten Patienten eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese entstehen, wenn die ATP-Produktion im Mitochondrium aufgrund pathologischer Prozesse gestört ist (Bertero and Maack, 2018).

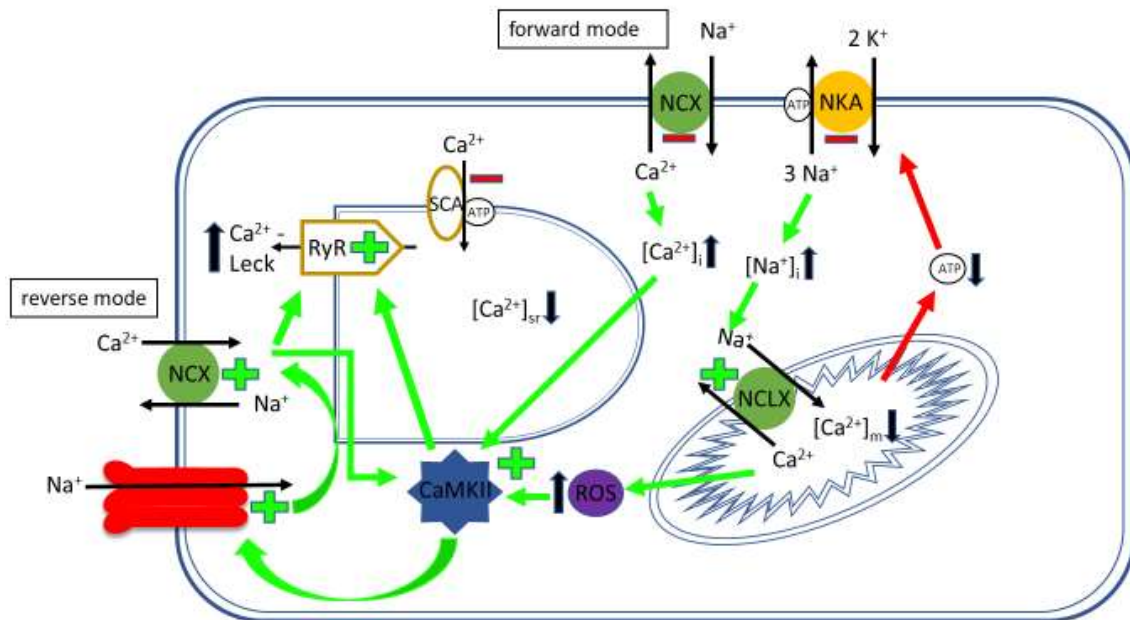
Dafür verantwortlich ist unter anderem der mitochondriale NCX, der sogenannte NCLX (Natrium-Kalzium-Lithium-Austauscher) (Boyman *et al.*, 2013). Dieser ist dem „normalen“ NCX strukturell und funktionell sehr ähnlich. Er sorgt im Austausch gegen

Natrium als Gegenspieler zum mitochondrialen Kalzium-Uniporter für die Kalzium-Extrusion aus dem Mitochondrium in das Zytosol. Dabei ist auch die Aktivität des NCLX vom elektrischen Potential und den jeweiligen Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran abhängig. Da es in insuffizienten Kardiomyozyten zu einer erhöhten intrazellulären Natrium-Konzentration kommt, wird also vermehrt Kalzium aus dem Mitochondrium transportiert. Dadurch ist die ATP-Produktion gehemmt, während die Entstehung von ROS gefördert wird (Kohlhaas *et al.*, 2010; Cox and Matlib, 1993). Eine Blockade des NCLX hat sich in Tiermodellen mit Herzinsuffizienz bereits als günstig erwiesen (Liu *et al.*, 2014).

Angenommen, dass der NCLX aufgrund seiner Verwandtschaft mit dem NCX von SAR-NCXi ebenso geblockt wird, kann eine verminderte Sparkfrequenz und positive Auswirkungen auf geschädigte Kardiomyozyten durch verschiedene Auswirkungen erklärt werden: Die zuvor verminderte ATP-Produktion führt zu einer gestörten NKA- sowie SERCA-Aktivität. Durch die NCX-Blockade wird nun mehr ATP produziert und somit eine Ursache der Überladung der Zelle mit Natrium behoben. Auf der anderen Seite wird auch die SR-Kalzium-Beladung gefördert.

Die verminderte ROS-Entstehung, die damit verbundene geringere CaMKII-Aktivierung und RyR-Phosphorylierung ist eine weitere Erklärung für eine verminderte Sparkfrequenz durch SAR-NCXi.

(A) Modell einer insuffizienten Zelle während der Diastole



(B) Wirkung SAR-NCX_i

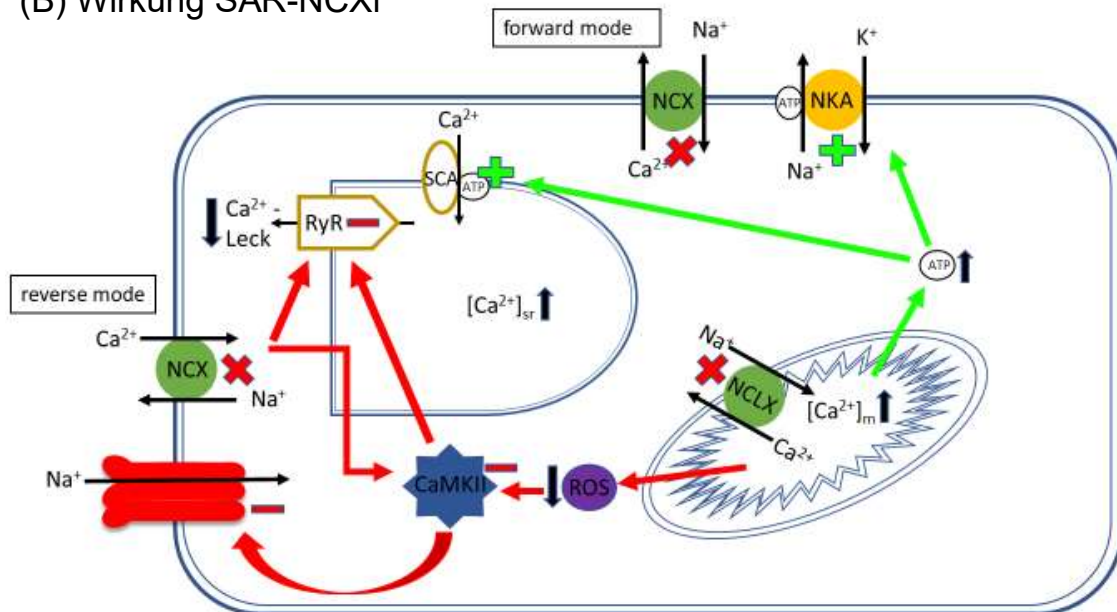


Abbildung 32: Mechanismen der Sparkfrequenzreduktion unter SAR-NCX_i

In (A) gezeigt sind die im Text beschriebenen Wege, wie eine erhöhte NCX-Aktivität, speziell die erhöhte reverse NCX-Aktivität und die erhöhte NCLX-Aktivität, in von Herzinsuffizienz betroffenen Zellen zu einem erhöhten SR-Kalzium-Leck führt. Dabei stehen grüne Pfeile und + für vermehrte Aktivität, hingegen rot und – für eine Hemmung oder verminderte Aktivität. Das – beim forward mode des NCX steht dabei für die im Verhältnis zum gesunden Herzen

vermehrte Aktivität im reverse mode. Diese Funktionsumkehr sorgt einerseits für erhöhte Kalziumkonzentrationen in der Diastole, welche die RyR-Öffnung triggern können. Indirekt wird andererseits über die aktivierte CaMKII der RyR phosphoryliert. Diese wird auch durch ROS aktiviert, welche bei reduzierten Kalzium-Konzentrationen im Mitochondrium entstehen. Diese kommen durch die bei Herzinsuffizienz typischerweise erhöhte Natriumkonzentration im Zytosol zustande, wodurch ein Austausch über den NCLX erfolgt. Dadurch kommt es auch zur eingeschränkten ATP-Produktion, wodurch unter anderem NKA und SERCA weniger arbeiten können und die Natrium- und Kalziumkonzentrationen im Zytosol weiter steigen. In (B) wird die Rolle des SAR-NCXi gezeigt (rote X). Dadurch werden die Mechanismen, die zur Offenwahrscheinlichkeit des RyR beitragen auf verschiedenen Ebenen unterbrochen. $[Ca^{2+}]_i$ = zytosolische Kalziumkonzentration; $[Ca^{2+}]_m$ = mitochondriale Kalziumkonzentration; $[Ca^{2+}]_{SR}$ = Kalziumkonzentration SR; SCA = SERCA. Abgewandelt aus (Bers, 2002).

Die klinische Konsequenz der verminderten Sparkfrequenz liegt auf der Hand, da spontane, diastolische Sparks für die Entstehung von DADs verantwortlich sind und somit zur Arrhythmieentstehung beitragen (Wagner *et al.*, 2015). Außerdem tragen sie durch die Entleerung des SR zu der systolischen Funktionsstörung in insuffizienten Herzen bei (Hasenfuss and Pieske, 2002).

Die gemessenen spontanen Freisetzungseignisse waren unter der Medikation mit SAR-NCXi signifikant größer. Das bedeutet, dass sie bei verringerter Frequenz eine größere räumliche und eine längere zeitliche Ausdehnung hatten.

Dies kann auf die fehlende Funktion des *forward* NCX zurückgeführt werden. Dieser kann das Kalzium nach der Freisetzung aus dem SR aus der Diade schaffen. Wird er durch das Medikament blockiert, verbleibt das Kalzium länger im Zytosol und führt auch zu einer ausgedehnteren Freisetzung aus den benachbarten RyR2. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in NCX-knockout Mäusen gemacht (Neco *et al.*, 2010).

Aus den Messungen der Kalziumsparks kann somit geschlossen werden, dass der NCX-Inhibitor *in vitro* zu einer verminderten Arrhythmieeigung bei erhaltener Inotropie führt.

4.2 Die Beladung des SR unter NCX-Inhibition

Wie bereits mehrfach beschrieben, kommt es beim Remodeling in der Herzinsuffizienz unter anderem auch zu einer Entleerung von Kalzium aus dem SR. Dadurch steht bei einem Aktionspotential weniger Kalzium zur Verfügung, das eine Kontraktion auslösen kann, wodurch es zu einer verminderten Inotropie kommt (Marx *et al.*, 2000).

Dabei spielt einerseits das erhöhte diastolische Kalziumleck eine Rolle und andererseits die vermehrte Aktivität des NCX, der dieses Kalzium aus der Zelle schleust, sodass es für eine Wiederaufnahme in das SR nicht mehr zur Verfügung steht (Hasenfuss and Pieske, 2002). Somit könnte eine Inhibition des NCX zu einer vermehrten Befüllung des SR mit Kalzium führen.

Durch die Applikation von Koffein kommt es in den Kardiomyozyten zu einer maximalen Ausschüttung von Kalzium aus dem SR durch den RyR (Varro *et al.*, 1993). In dieser Arbeit konnte somit der Kalziumgehalt des SR gemessen werden. Hier zeigte sich unter hoher NCX-Inhibitor Konzentration eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es ist anzunehmen, dass durch die verminderte Aktivität des NCX im *forward mode* weniger Kalzium aus der Zelle befördert wird, sodass der SERCA2a mehr Kalzium zur Verfügung steht, um das SR zu befüllen (Erkasap, 2007).

Außerdem kann argumentiert werden, dass aufgrund der Inhibition des NCX, der hauptsächlich im *forward mode* aktiv ist und somit Natrium in die Zelle bringt, dieses bei Inhibition des NCX nicht über die Natrium-Kalium-ATPase aus dem Zytosol entfernt werden muss (Shattock *et al.*, 2015; Bers, 2002). Dadurch steht der Zelle vermehrt ATP zur Verfügung, das die SERCA2a benötigt, um das Kalzium in das SR zu pumpen (Erkasap, 2007; Bers, 2002; Shattock *et al.*, 2015).

Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit keine direkten Experimente zur Kontraktilität und Inotropie der Zellen unter NCX-Inhibition gemacht, allerdings bedeutet die vermehrte Befüllung des SR mit Kalzium, dass diese Parameter positiv beeinflusst werden. So führt ein höherer Kalziumgehalt des SR bei regelrechter Stimulation auch zu einer vermehrten Kalziumausschüttung (Eisner, 2014).

Im insuffizienten Herzen kommt es zwar zu einer verminderten Sensitivität des kontraktiven Apparats gegenüber Kalzium, dennoch ist die Kontraktionskraft direkt

proportional zur Kalziumkonzentration (MacGowan, 2005). Deswegen wurden früher Sympathikomimetika zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt, welche auch die Menge an systolischer Kalziumausschüttung erhöhen und damit zu einer besseren Kontraktilität führen. Dies führt jedoch bei fortgesetzter Anwendung zu einer vermehrten Arrhythmieeigung, welche unter anderem auf dem erhöhten diastolischen Kalziumleck, einer vermehrten Depolarisation durch den NCX und dem Auftreten von DADs beruht (DeSantiago *et al.*, 2008). Auf lange Sicht überwiegen somit die negativen Auswirkungen von Sympathikomimetika, sodass sie heute für diese Indikation verlassen sind (Bers, 2002; MacGowan, 2005). An Medikamenten, die eine Verbesserung der Inotropie bewirken, ohne ein erhöhtes Risiko für Herzrhythmusstörungen mit sich zu bringen wird deshalb intensiv geforscht. Möglicherweise könnte ein Medikament mit inhibierender Wirkung auf den NCX diese Eigenschaften aufweisen.

Zusammenfassend kann man hier also sagen: Die Behandlung von humanen Kardiomyozyten mit dem NCX-Inhibitor führte in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikant erhöhten Kalziumgehalt des SR. Dies löst in der Regel eine erhöhte systolische Kalziumausschüttung aus, welche wiederum eine verstärkte Kontraktion zur Folge hat. Bei einer vergleichbaren Wirkung von Katecholaminen kommt es durch den SAR-NCXi jedoch zu keiner vermehrten Arrhythmieeigung, da das diastolische Kalziumleck nicht erhöht ist und die Anzahl der spontanen Kalziumfreisetzungen aus dem SR sogar signifikant verringert ist. Auch fällt durch die Inhibition des NCX der entscheidende Mechanismus zur Entstehung von DADs weg.

4.3 Die Aktivität des NCX unter Inhibition mit dem neuen Medikament

Bei den Experimenten mit Koffein konnte durch den Abfall des Kalziumtransienten auch auf die Funktion des NCX geschlossen werden. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass während der Messung die SERCA2a zwar aktiv wird und das ausgeschüttete Kalzium wieder in das SR zurückpumpt, der RyR jedoch geöffnet bleibt, sodass dieses Kalzium sogleich wieder in das Zytosol ausgeschüttet wird. Somit entspricht der Abfall

des Kalziumtransienten der *forward* NCX-Funktion, da alle anderen Transporter zu vernachlässigen sind (siehe 1.2.2) (Varro *et al.*, 1993).

Wie oben gezeigt, war die Zeit, die von den Zellen benötigt wurde um das Kalzium aus dem Zytosol zu befördern, von der Konzentration des SAR-NCXi abhängig.

Damit kann zwar keine Aussage über die Spezifität des Medikaments getroffen werden, jedoch wurde damit der inhibierende Effekt auf den NCX in beiden genutzten Konzentrationen gezeigt.

Die Effekte des Medikaments auf die anderen gemessenen Parameter können also durchaus auf die verminderte Aktivität des NCX zurückgeführt werden.

4.4 Die Einflüsse des SAR-NCXi auf die Aktionspotentiale

Wie in der Einleitung erläutert, kann die vermehrte Aktivität des NCX bei spontaner Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Diastole zu DADs führen. Diese sind neben anderen wichtige Faktoren für die Entstehung von Arrhythmien, wie Vorhofflimmern verantwortlich (Voigt *et al.*, 2012).

Da in den Versuchen mit konfokaler Lasermikroskopie unter SAR-NCXi eine verringerte Sparkfrequenz nachgewiesen werden konnte, sollte in Patch-clamp Experimenten die These geprüft werden, ob tatsächlich weniger DADs bei mit SAR-NCXi behandelten Kardiomyozyten auftreten.

Dass die NCX-Aktivität auch in die Entstehung von EADs, die gefährliche Arrhythmien wie Torsade-de-pointes-Tachykardien beispielsweise bei Patienten mit Long-QT-Syndromen auslösen können, involviert ist, wird von einigen Arbeitsgruppen vermutet (Antoons *et al.*, 2007; Sipido *et al.*, 2007; Milberg *et al.*, 2008).

EADs treten umso wahrscheinlicher auf, je länger die Plateauphase eines Aktionspotentials dauert (Volders *et al.*, 2000), weswegen in den Patch-clamp Experimenten auch ein besonderes Augenmerk auf diesem Parameter lag.

Wie im Ergebnisteil gezeigt, konnte unter dem neuartigen Inhibitor keine verminderte Wahrscheinlichkeit für EADs oder DADs nachgewiesen werden, da weder in der

Kontrollgruppe, noch durch Provokation mit Digoxin spontane Nachdepolarisationen gemessen werden konnten.

Die Gründe dafür können vielfältig sein. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass die Nachdepolarisationen von den negativen Strömen, die angelegt werden mussten, um die Leck-Ströme der oft sehr instabilen Zellen auszugleichen, unterdrückt wurden.

Auch in der Aktionspotentialdauer konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden, wie sie von anderen Arbeitsgruppen mit anderen NCX-Inhibitoren durchaus gezeigt wurden (Johnson *et al.*, 2010).

Vermutlich hielten sich hierbei zwei Faktoren die Waage: Die fehlende Depolarisation durch den Natriumeinstrom im *forward mode* des NCX müsste eine verkürzte APD zur Folge haben, da das Kalzium nun beispielsweise vermehrt über die SERCA2a ins SR gepumpt wird, wodurch keine depolarisierenden Ströme entstehen.

Jedoch kam es unter SAR-NCXi zu einer verstärkten Beladung des SR mit Kalzium. Dies führt zwar zu einer vermehrten, aber auch verlängerten Freisetzung des Kalziums aus dem SR während der Systole, was das AP potentiell verlängern könnte (Nagy *et al.*, 2014).

Die Patch-clamp Experimente haben immerhin gezeigt, dass es unter SAR-NCXi in beiden Konzentrationen zu keinerlei negativer Beeinflussung der Aktionspotentialmorphologie kommt. So waren die Aufstrichgeschwindigkeiten und Amplituden der APs zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, was bei einem signifikanten Eingriff in den Ionenhaushalt der Zellen durch ein Medikament durchaus zu befürchten ist.

Die sogenannte *beat-to-beat-variability* (Variabilität der Aktionspotentialdauer bei aufeinanderfolgenden Stimulationen) wurde in dieser Arbeit als *short-term-variability* der Aktionspotentialdauer dargestellt. Diese drückt als mathematische Formel aus, wie sehr sich die Dauer der aufeinanderfolgenden Repolarisationen voneinander abweicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Wert auf Zellebene eine sehr gute Vorhersage von Torsade-de-Point-Tachykardien auf Organebene erlaubt (Thomsen *et al.*, 2004; Abi-Gerges *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit konnte zwar auch bei diesem Parameter kein signifikanter Effekt des SAR-NCXi gemessen werden und die Werte unterlagen großen Schwankungen. Jedoch zeigt sich ein positiver Trend zu einer niedrigeren *beat-to-beat-variability* mit dem Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.5 Vergleich mit anderen Inhibitoren und NCX-KO Mäusen

Aufgrund der theoretischen Überlegungen zu den positiven Effekten einer NCX-Inhibition wurden zahlreiche NCX-Inhibitoren und NCX-Knockout (KO) Mäuse, von anderen Arbeitsgruppen bezüglich ihres Einflusses auf den Kalziumhaushalt und die Arrhythmogenität getestet. Dabei zeigte sich, dass ein kompletter NCX-Knockout bei Mäusen nicht mit dem Leben vereinbar ist, ein sogenannter herzspezifischer Knockout mit einer geringen Restaktivität des kardialen NCX jedoch mit einer nur leicht reduzierten Herzaktivität bei gleichem Überleben bis ins Erwachsenenalter einhergeht (Henderson *et al.*, 2004). Andere Arbeitsgruppen führten ihre Experimente mit 50%igem NCX-Knockout durch.

In den KO-Mäusen konnte unter anderem der ebenfalls in dieser Arbeit beobachtete Effekt gezeigt werden, dass die Sparkfrequenz unter NCX-Inhibition bzw. NCX-Knockout abnimmt, dabei jedoch Sparkgröße und -dauer zunehmen. Dies begründen die Autoren mit dem verminderten Abtransport des Kalziums aus der Diade (Goldhaber and Philipson, 2013; Neco *et al.*, 2010). Außerdem konnte in NCX-KO Mäusen beispielsweise eine verminderte Nekrose und verbesserter Kontraktilität nach Ischämie und Reperfusion gezeigt werden (Imahashi *et al.*, 2005; Ohtsuka *et al.*, 2004).

Andere bereits untersuchte NCX-Inhibitoren sind beispielsweise SEA-0400, SN-6 oder KB-R7943 (Antoons *et al.*, 2012). Diese wurden in verschiedenen Tiermodellen von Herzinsuffizienz, Arrhythmie oder bei Ischämie und Reperfusion sowohl in Zellen oder Gewebestücken, als auch *in vitro* getestet. Dabei fanden sich in unterschiedlichen Studien jeweils sehr variable Ergebnisse, jedoch zeigen Übersichtsarbeiten einige deutliche Tendenzen:

So konnte nachgewiesen werden, dass es unter KB-R7943, aber auch SEA-0400 zu einer signifikant verringerten Entstehung von DADs und Arrhythmien bei Digitalis-

Intoxikation in verschiedenen Tierzellmodellen kam (Sato *et al.*, 2000; Namekata *et al.*, 2009). Auch bei Ischämie und Reperfusion konnten positive Effekte gezeigt werden, wie zum Beispiel in einem Rattenherzmodell, welches nach Behandlung mit KB-R7943 eine signifikant verringerte Anzahl an ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern aufwies (Elias *et al.*, 2001).

In vivo Experimente erwiesen vor allem bei angeborenen Herzfehlern wie Long-QT-Syndrom 2 oder 3 einen antiarrhythmischen Effekt von NCX-Inhibitoren (Milberg *et al.*, 2008). Auch in einem Kaninchenmodell mit Herzinsuffizienz konnte durch KB-R7943 die Inzidenz von Torsade-de-Pointes-Tachykardien reduziert werden (Kijawornrat *et al.*, 2010).

Jeweils einschränkend ist dabei die Tatsache, dass die verwendeten Inhibitoren nicht alle spezifisch auf den kardialen NCX wirken. So weiß man bei KB-R7943 beispielsweise, dass es zusätzlich Kalium-, Natrium- und Kalziumkanäle blockiert. Ob die NCX-Blockade alleine die gezeigten Effekte verursacht ist nicht sicher beurteilbar (Antoons *et al.*, 2012).

4.6 Limitationen der Arbeit

Eine wichtige Limitation der vorliegenden Dissertation ist, dass die gemessenen Vorhofzellen operationsbedingt allesamt aus dem rechten Vorhofrohr stammen und somit keine sichere Aussage über die Wirksamkeit auf das restliche Myokard möglich ist. Allerdings konnten einige Ergebnisse in den Messungen mit ventrikulären Zellen bestätigt werden.

Grundsätzlich muss gerade bei den Ventrikelzellen, aber auch bei allen anderen Messungen die teils geringe n-Zahl angesprochen werden. Diese musste aufgrund der schwierigen Beschaffung des jeweiligen Humangewebes und der fehleranfälligen Isolation der Zellen in Kauf genommen werden, da die Messungen nur mit qualitativ hochwertigen Zellen erfolgten.

Außerdem haben die Daten aus einzelnen Zellen, wie sie hier erhoben wurden, eine limitierte Aussagekraft bezüglich der Auswirkungen auf Zellverbände oder das gesamte Herz.

Die Erkenntnisse aus den Messungen mit dem konfokalen Lasermikroskop wurden hauptsächlich über das Bestimmen, Auszählen und Ausmessen der Kalziumsparks gewonnen. Dazu muss angemerkt werden, dass diese Auswertung – wenn auch durch den Computer unterstützt – subjektiv erfolgt und untersucherabhängig unterschiedlich ausfallen kann.

Eine weitere Begrenzung der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen von Arrhythmien unter Digoxineinwirkung. Diese wurden erst bei nachfolgenden Experimenten der Arbeitsgruppe durch ein verändertes Protokoll ausgelöst. Somit ist die Aussagekraft der Patch-clamp-Experimente, wie sie hier durchgeführt wurden, möglicherweise eingeschränkt.

Die Messungen mit dem SAR-NCXi erfolgten grundsätzlich mit der Absicht, auf lange Sicht Medikamente zu entwickeln, die für Menschen mit Herzinsuffizienz oder Arrhythmien eine Verbesserung von Morbidität und Mortalität bewirken. Eine Limitation für den Einsatz eines NCX-Inhibitors ergibt sich jedoch aus der Tatsache, dass der NCX in zahlreichen Isoformen in vielen Zelltypen, allen voran den Neuronen, zu finden ist. Deshalb wären, wenn der Inhibitor nicht spezifisch an der kardiomyozytären Unterform des NCX wirkt, eine Vielzahl an unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erwarten.

Fraglich ist außerdem die Wirkung des SAR-NCXi auf die verschiedenen Isoformen im Herzen in der Zellmembran und im Mitochondrium (NCLX). Ob der Einfluss des Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen auf die beiden Funktionsrichtungen, *forward* und *reverse mode*, unterschiedlich ist, bedarf weiterer Untersuchungen. So wurden von einigen Autoren bereits spezifische *reverse mode* NCX-Inhibitoren publiziert (Nagy *et al.*, 2014; Amran *et al.*, 2003; Amran *et al.*, 2004).

Somit kann man zusammenfassen, dass weitere Experimente notwendig sind, um auf der einen Seite über die spezifische Wirksamkeit und auf der anderen Seite die Toxizität des SAR-NCXi Aufschluss zu erlangen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung des NCX die elektromechanische Kopplung und die Entstehung von Arrhythmien in menschlichen Kardiomyozyten beeinflusst.

Dies wurde durch ein neues Medikament, den SAR-NCXi erreicht, dessen inhibierende Wirkung auf den NCX in der Arbeit bestätigt wurde.

In Experimenten mit dem konfokalen Lasermikroskop wurde unter dem Medikament einerseits die signifikante Verringerung von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR während der Diastole nachgewiesen. Diese sind der Ursprung von DADs, die in einem insuffizienten, von *Remodeling* betroffenen Ventrikel lebensgefährliche Arrhythmien und im Vorhof das Vorhofflimmern auslösen können.

Andererseits war die Beladung des SR mit Ca^{2+} signifikant erhöht. In einer von Herzinsuffizienz betroffenen Zelle hat dies grundsätzlich eine Licht- und eine Schattenseite: Bei einer höheren Ca^{2+} -Konzentration im SR kann pro Schlag mehr Ca^{2+} freigesetzt werden, was zu einer erhöhten Kraftentwicklung führt. Auf der anderen Seite kommt es bei einer Ca^{2+} -Überladung zu mehr arrhythmischen Ereignissen.

Hierzu konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe unter dem SAR-NCXi diese Korrelation zwischen vermehrter SR-Beladung mit Ca^{2+} und spontaner Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR aufgehoben war.

In Patch-clamp Experimenten wurde eine unveränderte Aktionspotentialmorphologie unter SAR-NCXi in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen.

Ein Parameter für das Auftreten von Arrhythmien auf Zellebene, die *beat-to-beat-variability*, wurde mit dem Medikament zwar nicht signifikant, jedoch tendenziell verringert.

Somit sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durchaus von klinischer Relevanz, da sie zeigen konnten, dass eine Modulation des NCX mit dem SAR-NCXi im Zellmodell zur positiven Beeinflussung von Mechanismen führt, die zur Entstehung von Arrhythmien und Aggravation von Herzinsuffizienz beitragen.

6. Anhang

6.1 Formelverzeichnis

Formel 1: SR-Kalziumleck	28
Formel 2: Short- und Long-Term Variability	35

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messtyrode/Badlösung	35
Tabelle 2: Koffeinlösung	35
Tabelle 3: Farbstofflösung Fluo-4	35
Tabelle 4: Pipettenlösung	36
Tabelle 5: Ca ²⁺ -freie Vorhof-Isolationstyrode	36
Tabelle 6: Storage-Medium Vorhofisolation	37
Tabelle 7: Stopplösung Vorhofisolation	37
Tabelle 8: Ventrikelisolationstyrode	38
Tabelle 9: Enzymlösungen	38
Tabelle 10: Patientendaten der konfokalmikroskopischen Messungen (Vorhof)	39
Tabelle 11: Patientendaten der konfokalmikroskopischen Messungen (Ventrikel)	57
Tabelle 12: Patientendaten der Patch-clamp Messungen	63

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Sarkomer	7
Abbildung 2: Der LTCC und der RyR2	10
Abbildung 3: Struktur der SERCA2a und der NKA	11
Abbildung 4: Die Elektromechanische Kopplung und das Aktionspotential	13
Abbildung 5: Das Modell des NCX1	15
Abbildung 6: Die Entstehung von EADs und DADs	19
Abbildung 7: Fluo-4	25
Abbildung 8: Der Strahlengang im Konfokalmikroskop	27
Abbildung 9: Der whole-cell mode	32
Abbildung 10: Kalziumspark	42
Abbildung 11: Originalregistrierungen	43
Abbildung 12: Sparkfrequenz/100µm/s	44
Abbildung 13: Kalziumsparkamplitude	46
Abbildung 14: Sparkdauer	47
Abbildung 15: Sparbreite	48
Abbildung 16: Das diastolische Kalziumleck	49
Abbildung 17: Originalregistrierungen der Koffeintransienten	51
Abbildung 18: Die Amplituden der Koffeintransienten	52
Abbildung 19: Die Funktion des NCX	53
Abbildung 20: Der Abfall der Koffeintransienten	54

Abbildung 21: Der Zusammenhang von Kalziumbeladung und Sparkfrequenz.....	56
Abbildung 22: Die Sparkfrequenz in den ventrikulären Zellen	59
Abbildung 23: Die Ausdehnung der Sparks in den ventrikulären Zellen	61
Abbildung 24: Das diastolische Kalziumleck in den ventrikulären Zellen.....	62
Abbildung 25: Die Aktionspotentialmorphologie	66
Abbildung 26: Die Aktionspotentialdauer	67
Abbildung 27: Die Variabilität der Aktionspotentiale	69
Abbildung 28: Die Aktionspotentialmorphologie unter Digoxin	71
Abbildung 29: Die Aktionspotentialdauer unter Digoxin.....	72
Abbildung 30: Die Variabilität der Aktionspotentiale unter Digoxin 10 µmol/l.....	73
Abbildung 31: Der NCX-Strom (I_{NCX})	76
Abbildung 32: Mechanismen der Sparkfrequenzreduktion unter SAR-NCXi	78

6.4 Abkürzungsverzeichnis

AD-Wandler	Umwandler von analogen in digitale Informationen
AM	Azetoxymethylgruppe
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis (O-Aminophenoxy) Ethan-N,N,N',N'-Tetraacetsäure
BCS	Bovine Calf Serum (Rinderkalb Serum)
BDM	2,3-Butanedione monoxime
Ca ²⁺	Kalziumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II
CICR	Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung
DAD	verzögerte Nachdepolarisation
DMSO	Dimethylsulfoxid

EAD	frühe Nachdepolarisation
EGTA	Ethylenglycol bis (3-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetsäure
F	Fluoreszenz
F ₀	Hintergrundfluoreszenz
ΔF	relative Fluoreszenz
H ₂ O	Wasser
I _{to}	transient outward Strom (=auswärtsgerichteter Kaliumstrom)
JMEM	Joklik Minimal Essential Medium
K ⁺	Kaliumion
LTCC	L-Typ Kalziumkanal
Na ⁺	Natriumion
Na _v	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NCLX	mitochondrialer Natrium-Kalzium-Austauscher
NCXi	NCX-Inhibitor
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
O ₂	Sauerstoff
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RyR	Ryanodinrezeptor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAR-NCXi	NCX-Inhibitor, der in dieser Arbeit verwendet wurde
SERCA	Kalziumpumpe des sarko- und endoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
XIP	inhibitorisches Peptid des NCX

7. Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges, N., Valentin, J.-P. and Pollard, C.E. (2010), "Dog left ventricular midmyocardial myocytes for assessment of drug-induced delayed repolarization. Short-term variability and proarrhythmic potential", *British journal of pharmacology*, Vol. 159 No. 1, pp. 77–92.
- Acsai, K., Antoons, G., Livshitz, L., Rudy, Y. and Sipido, K.R. (2011), "Microdomain $[Ca^{2+}]$ near ryanodine receptors as reported by L-type Ca^{2+} and Na^+/Ca^{2+} exchange currents", *The Journal of Physiology*, Vol. 589 No. Pt 10, pp. 2569–2583.
- Ai, X., Curran, J.W., Shannon, T.R., Bers, D.M. and Pogwizd, S.M. (2005), " Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure", *Circulation research*, Vol. 97 No. 12, pp. 1314–1322.
- Amran, M.S., Hashimoto, K. and Homma, N. (2004), "Effects of sodium-calcium exchange inhibitors, KB-R7943 and SEA0400, on aconitine-induced arrhythmias in guinea pigs in vivo, in vitro, and in computer simulation studies", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 310 No. 1, pp. 83–89.
- Amran, M.S., Homma, N. and Hashimoto, K. (2003), "Pharmacology of KB-R7943. A Na^+ - Ca^{2+} exchange inhibitor", *Cardiovascular drug reviews*, Vol. 21 No. 4, pp. 255–276.
- Antoons, G., Oros, A., Bito, V., Sipido, K.R. and Vos, M.A. (2007), "Cellular basis for triggered ventricular arrhythmias that occur in the setting of compensated hypertrophy and heart failure: considerations for diagnosis and treatment", *Journal of electrocardiology*, Vol. 40 No. 6 Suppl, p. 14.
- Antoons, G., Willems, R. and Sipido, K.R. (2012), "Alternative strategies in arrhythmia therapy: evaluation of Na/Ca exchange as an anti-arrhythmic target", *Pharmacology & therapeutics*, Vol. 134 No. 1, pp. 26–42.
- AppliChem GmbH, "Joklik - MEM, modified for spinner culture".
- Aumüller, G. and Wurzing, L.J. (2010), *Anatomie: 208 Tabellen, Duale Reihe*, 2. überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Bers, D.M. (2001), *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, DICM*, Vol. 237, 2. ed., Kluwer, Dordrecht.
- Bers, D.M. (2002), "Cardiac excitation-contraction coupling", *Nature*, Vol. 415 No. 6868, pp. 198–205.
- Bers, D.M. (2004), "Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 37 No. 2, pp. 417–429.
- Bers, D.M. (2014), "Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction", *Annual review of physiology*, Vol. 76, pp. 107–127.
- Bers, D.M., Bassani, J.W. and Bassani, R.A. (1996), "Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 779, pp. 430–442.
- Bertero, E. and Maack, C. (2018), "Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria", *Circulation research*, Vol. 122 No. 10, pp. 1460–1478.
- Birkeland, J.A., Sejersted, O.M., Taraldsen, T. and Sjaastad, I. (2005), "EC-coupling in normal and failing hearts", *Scandinavian cardiovascular journal SCJ*, Vol. 39 No. 1-2, pp. 13–23.
- Bootman, M.D., Smyrniak, I., Thul, R., Coombes, S. and Roderick, H.L. (2011), "Atrial cardiomyocyte calcium signalling", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1813 No. 5, pp. 922–934.
- Bossu, A., Varkevisser, R., Beekman, H.D.M., Houtman, M.J.C., van der Heyden, M.A.G. and Vos, M.A. (2017), "Short-term Variability of Repolarization Is Superior to Other Repolarization Parameters in

- the Evaluation of Diverse Antiarrhythmic Interventions in the Chronic Atrioventricular Block Dog”, *Journal of cardiovascular pharmacology*, Vol. 69 No. 6, pp. 398–407.
- Boyman, L., Williams, G.S.B., Khananshvil, D., Sekler, I. and Lederer, W.J. (2013), “NCLX. The mitochondrial sodium calcium exchanger”, *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 59, pp. 205–213.
- Brown, A.M., Lee, K.S. and Powell, T. (1981), “Sodium current in single rat heart muscle cells”, *The Journal of physiology*, Vol. 318, pp. 479–500.
- Chang, S.-L., Chen, Y.-C., Yeh, Y.-H., Lin, Y.-K., Wu, T.-J., Lin, C.-I., Chen, S.-A. and Chen, Y.-J. (2011), “Heart failure enhanced pulmonary vein arrhythmogenesis and dysregulated sodium and calcium homeostasis with increased calcium sparks”, *Journal of cardiovascular electrophysiology*, Vol. 22 No. 12, pp. 1378–1386.
- Cheng, H. and Lederer, W.J. (2008), “Calcium sparks”, *Physiological reviews*, Vol. 88 No. 4, pp. 1491–1545.
- Cheng, H., Lederer, W.J. and Cannell, M.B. (1993), “Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 262 No. 5134, pp. 740–744.
- Corle, T.R. and Kino, G.S. (1996), *Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems*, Acad. Press, San Diego.
- Cox, D.A. and Matlib, M.A. (1993), “A role for the mitochondrial Na(+)-Ca²⁺ exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria”, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 268 No. 2, pp. 938–947.
- DeSantiago, J., Ai, X., Islam, M., Acuna, G., Ziolo, M.T., Bers, D.M. and Pogwizd, S.M. (2008), “Arrhythmogenic effects of beta2-adrenergic stimulation in the failing heart are attributable to enhanced sarcoplasmic reticulum Ca load”, *Circulation research*, Vol. 102 No. 11, pp. 1389–1397.
- Despa, S., Islam, M.A., Weber, C.R., Pogwizd, S.M. and Bers, D.M. (2002), “Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged”, *Circulation*, Vol. 105 No. 21, pp. 2543–2548.
- Despa, S., Lingrel, J.B. and Bers, D.M. (2012), “Na⁺/K⁺-ATPase 2-isoform preferentially modulates Ca²⁺ transients and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac myocytes”, *Cardiovascular research*, Vol. 95 No. 4, pp. 480–486.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J.J.V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P.A., Strömberg, A., van Veldhuisen, D.J., Atar, D., Hoes, A.W., Keren, A., Mebazaa, A., Nieminen, M., Priori, S.G. and Swedberg, K. (2008), “ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)”, *European journal of heart failure*, Vol. 10 No. 10, pp. 933–989.
- Dobrev, D. (2010), “Atrial Ca²⁺ signaling in atrial fibrillation as an antiarrhythmic drug target”, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, Vol. 381 No. 3, pp. 195–206.
- Doerr, T., Denger, R., Doerr, A. and Trautwein, W. (1990), “Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp”, *Pflügers Archiv European journal of physiology*, Vol. 416 No. 3, pp. 230–237.
- Eisner, D. (2014), “Calcium in the heart: from physiology to disease”, *Experimental physiology*, Vol. 99 No. 10, pp. 1273–1282.
- Elias, C.L., Lukas, A., Shurraw, S., Scott, J., Omelchenko, A., Gross, G.J., Hnatowich, M. and Hryshko, L.V. (2001), “Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by KB-R7943. Transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences”, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Vol. 281 No. 3, H1334-45.

- Erkasap, N. (2007), "SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new?", *Anadolu kardiyoloji dergisi AKD = the Anatolian journal of cardiology*, 7 Suppl 1, pp. 43–46.
- Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J.F. and Coraboeuf, E. (1986), "Characteristics of the time-dependent slow inward current in adult human atrial single myocytes", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 18 No. 5, pp. 547–551.
- Fabiato, A. (1983), "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum", *The American journal of physiology*, Vol. 245 No. 1, p. 14.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. and Ramesh, V. (1999), "Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles", *Biophysical journal*, Vol. 77 No. 3, pp. 1528–1539.
- Fries Research & Technology GmbH, available at: www.konfokalmikroskop.de.
- Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D. and Johnson, I. (2000), "Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes", *Cell calcium*, Vol. 27 No. 2, pp. 97–106.
- Goldhaber, J.I. and Philipson, K.D. (2013), "Cardiac sodium-calcium exchange and efficient excitation-contraction coupling: implications for heart disease", *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 961, pp. 355–364.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985), "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 260 No. 6, pp. 3440–3450.
- Guatimosim, S., Dilly, K., Santana, L.F., Saleet Jafri, M., Sobie, E.A. and Lederer, W.J. (2002), "Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)]_i transient", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 34 No. 8, pp. 941–950.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981), "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflügers Archiv European journal of physiology*, Vol. 391 No. 2, pp. 85–100.
- Harkins, A.B., Kurebayashi, N. and Baylor, S.M. (1993), "Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3", *Biophysical journal*, Vol. 65 No. 2, pp. 865–881.
- Hasenfuss, G. and Pieske, B. (2002), "Calcium cycling in congestive heart failure", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 34 No. 8, pp. 951–969.
- Henderson, S.A., Goldhaber, J.I., So, J.M., Han, T., Motter, C., Ngo, A., Chantawansri, C., Ritter, M.R., Friedlander, M., Nicoll, D.A., Frank, J.S., Jordan, M.C., Roos, K.P., Ross, R.S. and Philipson, K.D. (2004), "Functional adult myocardium in the absence of Na⁺-Ca²⁺ exchange: cardiac-specific knockout of NCX1", *Circulation research*, Vol. 95 No. 6, pp. 604–611.
- Hinterseer, M., Thomsen, M.B., Beckmann, B.-M., Pfeufer, A., Schimpf, R., Wichmann, H.-E., Steinbeck, G., Vos, M.A. and Kaab, S. (2007), "Beat-to-beat variability of QT intervals is increased in patients with drug-induced long-QT syndrome. A case control pilot study", *European Heart Journal*, Vol. 29 No. 2, pp. 185–190.
- HODGKIN, A.L. and Huxley, A.F. (1939), "Action potentials recorded from inside a nerve fibre", *Nature*, No. 3651.
- Huxley, H.E. (1969), "The mechanism of muscular contraction", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 164 No. 3886, pp. 1356–1365.
- Imahashi, K., Pott, C., Goldhaber, J.I., Steenbergen, C., Philipson, K.D. and Murphy, E. (2005), "Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury", *Circulation research*, Vol. 97 No. 9, pp. 916–921.
- Institute for Telecommunication Sciences (1996), "Glossary of Telecommunication Terms", available at: <https://www.its.bldrdoc.gov/fs-1037/fs-1037c.htm>.

- January, C.T. and Moscucci, A. (1992), "Cellular mechanisms of early afterdepolarizations", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 644, pp. 23–32.
- Johnson, D.M., Heijman, J., Pollard, C.E., Valentin, J.-P., Crijns, Harry J G M, Abi-Gerges, N. and Volders, P.G.A. (2010), "I(Ks) restricts excessive beat-to-beat variability of repolarization during beta-adrenergic receptor stimulation", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 48 No. 1, pp. 122–130.
- Kaplan, J.H. (2002), "Biochemistry of Na,K-ATPase", *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 71 No. 1, pp. 511–535.
- Katz, A., Lifshitz, Y., Bab-Dinitz, E., Kapri-Pardes, E., Goldshleger, R., Tal, D.M. and Karlish, S.J.D. (2010), "Selectivity of Digitalis Glycosides for Isoforms of Human Na,K-ATPase", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285 No. 25, pp. 19582–19592.
- Kijawornrat, A., Ziolo, M.T., Nishijima, Y., Roche, B.M. and Hamlin, R.L. (2010), "Effects of sarcolemmal Ca(2+) entry, ryanodine function, and kinase inhibitors on a rabbit model of heart failure", *International heart journal*, Vol. 51 No. 4, pp. 285–290.
- Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M.F., Böhm, M., O'Rourke, B. and Maack, C. (2010), "Elevated cytosolic Na+ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes", *Circulation*, Vol. 121 No. 14, pp. 1606–1613.
- Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D.B., Belmares, R. and Jiang, Y. (2012), "Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 335 No. 6069, pp. 686–690.
- Lichtman, J.W. and Conchello, J.-A. (2005), "Fluorescence microscopy", *Nature methods*, Vol. 2 No. 12, pp. 910–919.
- Liu, T., Takimoto, E., Dimaano, V.L., DeMazumder, D., Kettlewell, S., Smith, G., Sidor, A., Abraham, T.P. and O'Rourke, B. (2014), "Inhibiting mitochondrial Na+/Ca2+ exchange prevents sudden death in a Guinea pig model of heart failure", *Circulation research*, Vol. 115 No. 1, pp. 44–54.
- Lloyd-Jones, D.M., Larson, M.G., Leip, E.P., Beiser, A., D'Agostino, R.B., Kannel, W.B., Murabito, J.M., Vasan, R.S., Benjamin, E.J. and Levy, D. (2002), "Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study", *Circulation*, Vol. 106 No. 24, pp. 3068–3072.
- Lou, Q., Janardhan, A. and Efimov, I.R. (2012), "Remodeling of calcium handling in human heart failure", *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 740, pp. 1145–1174.
- Louch, W.E., Sejersted, O.M. and Swift, F. (2010), "There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca2+ handling", *Journal of biomedicine & biotechnology*, Vol. 2010, p. 503906.
- Lukyanenko, V., Wiesner, T.F. and Gyorke, S. (1998), "Termination of Ca2+ release during Ca2+ sparks in rat ventricular myocytes", *The Journal of physiology*, 507 (Pt 3), pp. 667–677.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009), *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*, 3., vollst. überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- MacGowan, G.A. (2005), "The myofilament force-calcium relationship as a target for positive inotropic therapy in congestive heart failure", *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, Vol. 19 No. 3, pp. 203–210.
- Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Conway, S.J. and Bootman, M.D. (2004), "The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction", *Journal of cell science*, Vol. 117 No. Pt 26, pp. 6327–6337.
- Maltsev, V.A., Sabbah, H.N. and Undrovinas, A.I. (2001), "Late sodium current is a novel target for amiodarone: studies in failing human myocardium", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 33 No. 5, pp. 923–932.

- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosembly, N. and Marks, A.R. (2000), "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts", *Cell*, Vol. 101 No. 4, pp. 365–376.
- Milberg, P., Pott, C., Fink, M., Frommeyer, G., Matsuda, T., Baba, A., Osada, N., Breithardt, G., Noble, D. and Eckardt, L. (2008), "Inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger suppresses torsades de pointes in an intact heart model of long QT syndrome-2 and long QT syndrome-3", *Heart rhythm the official journal of the Heart Rhythm Society*, Vol. 5 No. 10, pp. 1444–1452.
- Minsky, M. (1988), "Memoir on inventing the confocal scanning microscope", *Scanning*, Vol. 10 No. 4, pp. 128–138.
- Mohler, P.J., Davis, J.Q. and Bennett, V. (2005), "Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain", *PLoS biology*, Vol. 3 No. 12, pp. e423.
- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sørensen, T.L.-M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B. and Nissen, P. (2007), "Crystal structure of the sodium–potassium pump", *Nature*, Vol. 450 No. 7172, pp. 1043–1049.
- Näbauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. (1989), "Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 244 No. 4906, pp. 800–803.
- Nagy, N., Kormos, A., Kohajda, Z., Szébeni, Á., Szepesi, J., Pollesello, P., Levijoki, J., Acsai, K., Virág, L., Nánási, P.P., Papp, J.G., Varró, A. and Tóth, A. (2014), "Selective Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition prevents Ca²⁺ overload-induced triggered arrhythmias", *British journal of pharmacology*, Vol. 171 No. 24, pp. 5665–5681.
- Namekata, I., Tsuneoka, Y., Takahara, A., Shimada, H., Sugimoto, T., Takeda, K., Nagaharu, M., Shigenobu, K., Kawanishi, T. and Tanaka, H. (2009), "Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400", *Journal of pharmacological sciences*, Vol. 110 No. 1, pp. 111–116.
- National Institutes of Health (2004), "ImageJ", available at: <https://imagej.nih.gov/> (accessed 12 July 2018).
- Neco, P., Rose, B., Huynh, N., Zhang, R., Bridge, J.H.B., Philipson, K.D. and Goldhaber, J.I. (2010), "Sodium-calcium exchange is essential for effective triggering of calcium release in mouse heart", *Biophysical journal*, Vol. 99 No. 3, pp. 755–764.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976), "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres", *Nature*, Vol. 260 No. 5554, pp. 799–802.
- Nicoll, D.A., Longoni, S. and Philipson, K.D. (1990), "Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 250 No. 4980, pp. 562–565.
- Numberger, M. (1996), *Patch-Clamp-Technik*.
- Ohtsuka, M., Takano, H., Suzuki, M., Zou, Y., Akazawa, H., Tamagawa, M., Wakimoto, K., Nakaya, H. and Komuro, I. (2004), "Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in myocardial ischemia/reperfusion injury. Evaluation using a heterozygous Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mouse model", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 314 No. 3, pp. 849–853.
- Ottolia, M., Nicoll, D.A. and Philipson, K.D. (2005), "Mutational analysis of the alpha-1 repeat of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 280 No. 2, pp. 1061–1069.
- Philipson, K.D., Nicoll, D.A., Ottolia, M., Quednau, B.D., Reuter, H., John, S. and Qiu, Z. (2002), "The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 976, pp. 1–10.

- Pidoplichko, V.I. and Verkhatsky, A.N. (1987), "Sodium currents in the membrane of isolated cardiomyocytes", *Biomedica biochimica acta*, Vol. 46 No. 8-9, S668-72.
- Pieske, B., Maier, L.S., Piacentino, V., Weisser, J., Hasenfuss, G. and Houser, S. (2002), "Rate dependence of $[Na^+]_i$ and contractility in nonfailing and failing human myocardium", *Circulation*, Vol. 106 No. 4, pp. 447–453.
- Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. and Bers, D.M. (2001), "Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness", *Circulation research*, Vol. 88 No. 11, pp. 1159–1167.
- Ren, X. and Philipson, K.D. (2013), "The topology of the cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX1", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 57, pp. 68–71.
- Ringer, S. (1883), "A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction", *The Journal of physiology*, Vol. 4 No. 2-3, pp. 222–225.
- Sanguinetti, M.C. and Jurkiewicz, N.K. (1990), "Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents", *The Journal of general physiology*, Vol. 96 No. 1, pp. 195–215.
- Sato, D., Clancy, C.E. and Bers, D.M. (2017), "Dynamics of sodium current mediated early afterdepolarizations", *Heliyon*, Vol. 3 No. 9, e00388.
- Satoh, H., Ginsburg, K.S., Qing, K., Terada, H., Hayashi, H. and Bers, D.M. (2000), "KB-R7943 block of Ca^{2+} influx via Na^+/Ca^{2+} exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca^{2+} overload in rat ventricular myocytes", *Circulation*, Vol. 101 No. 12, pp. 1441–1446.
- Schettler, G. and Andrassy, K. (Eds.) (1998), *Innere Medizin: Verstehen, lernen, anwenden ; 242 Tabellen*, Gesamtausg., 9., komplett überarb. und neugestaltete Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Schmidt, R.F., Unsicker, K. and Birbaumer, N. (2003), *Anatomie, Biochemie und Physiologie der inneren Organe: Stoffaustausch, Homöostase, Reproduktion, Lehrbuch Vorklinik*, integrierte Darstellung in vier Teilen / Schmidt, Unsicker. Fachhrsg. Birbaumer ... ; Teil C, Dt. Ärzte-Verl., Köln.
- Sham, J.S., Song, L.S., Chen, Y., Deng, L.H., Stern, M.D., Lakatta, E.G. and Cheng, H. (1998), "Termination of Ca^{2+} release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95 No. 25, pp. 15096–15101.
- Shattock, M.J., Ottolia, M., Bers, D.M., Blaustein, M.P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., Bridge, J.H.B., Chen-Izu, Y., Clancy, C.E., Edwards, A., Goldhaber, J., Kaplan, J., Lingrel, J.B., Pavlovic, D., Philipson, K., Sipido, K.R. and Xie, Z.-J. (2015), " Na^+/Ca^{2+} exchange and Na^+/K^+ -ATPase in the heart", *The Journal of physiology*, Vol. 593 No. 6, pp. 1361–1382.
- Sipido, K.R., Bito, V., Antoons, G., Volders, P.G. and Vos, M.A. (2007), " Na^+/Ca^{2+} exchange and cardiac ventricular arrhythmias", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1099, pp. 339–348.
- Skou, J.C. (1957), "The Influence of some cations on an Adenosine Triphosphatase from peripheral nerves", *Biochimica et biophysica acta*, No. 23, pp. 394–401.
- Smyrniak, I., Mair, W., Harzheim, D., Walker, S.A., Roderick, H.L. and Bootman, M.D. (2010), "Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation", *Cell calcium*, Vol. 47 No. 3, pp. 210–223.
- Sonnenblick, E.H., Ross, J., Covell, J.W., Spotnitz, H.M. and Spiro, D. (1967), "The ultrastructure of the heart in systole and diastole. Changes in sarcomere length", *Circulation research*, Vol. 21 No. 4, pp. 423–431.
- Sossalla, S., Fluschnik, N., Schotola, H., Ort, K.R., Neef, S., Schulte, T., Wittköpper, K., Renner, A., Schmitto, J.D., Gummert, J., El-Armouche, A., Hasenfuss, G. and Maier, L.S. (2010), "Inhibition of

- elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium”, *Circulation research*, Vol. 107 No. 9, pp. 1150–1161.
- Statistisches Bundesamt (2015), “Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015”, available at:
https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf;jsessionid=20808C3C01EFEAC6EFA60D5FE2899DE.InternetLive2?__blob=publicationFile.
- Studer, R., Reinecke, H., Bilger, J., Eschenhagen, T., Böhm, M., Hasenfuss, G., Just, H., Holtz, J. and Drexler, H. (1994), “Gene expression of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure”, *Circulation research*, Vol. 75 No. 3, pp. 443–453.
- Sugi, H. (Ed.) (2012), *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans*, InTech.
- The Molecular Probes Handbook: A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES 11th Edition (2010)*.
- Thomsen, M.B., Verduyn, S.C., Stengl, M., Beekman, J.D.M., Pater, G. de, van Opstal, J., Volders, P.G.A. and Vos, M.A. (2004), “Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs”, *Circulation*, Vol. 110 No. 16, pp. 2453–2459.
- Tsien, R.Y. (1980), “New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures”, *Biochemistry*, Vol. 19 No. 11, pp. 2396–2404.
- Uemura, N., Ohkusa, T., Hamano, K., Nakagome, M., Hori, H., Shimizu, M., Matsuzaki, M., Mochizuki, S., Minamisawa, S. and Ishikawa, Y. (2004), “Down-regulation of sarcolipin mRNA expression in chronic atrial fibrillation”, *European journal of clinical investigation*, Vol. 34 No. 11, pp. 723–730.
- Varro, A., Negretti, N., Hester, S.B. and Eisner, D.A. (1993), “An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes”, *Pflügers Archiv European journal of physiology*, Vol. 423 No. 1-2, pp. 158–160.
- Venetucci, L.A., Trafford, A.W., O'Neill, S.C. and Eisner, D.A. (2008), “The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release”, *Cardiovascular research*, Vol. 77 No. 2, pp. 285–292.
- Verkhatsky, A. and Pappas, V. (2014), “History of electrophysiology and the patch clamp”, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 1183, pp. 1–19.
- Voigt, N., Li, N., Wang, Q., Wang, W., Trafford, A.W., Abu-Taha, I., Sun, Q., Wieland, T., Ravens, U., Nattel, S., Wehrens, X.H.T. and Dobrev, D. (2012), “Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation”, *Circulation*, Vol. 125 No. 17, pp. 2059–2070.
- Volders, P.G., Vos, M.A., Szabo, B., Sipido, K.R., Groot, S.H. de, Gorgels, A.P., Wellens, H.J. and Lazzara, R. (2000), “Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts”, *Cardiovascular research*, Vol. 46 No. 3, pp. 376–392.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E.C.L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S.K.G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J.H., Bers, D.M. and Maier, L.S. (2006), “Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels”, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 116 No. 12, pp. 3127–3138.
- Wagner, S., Maier, L.S. and Bers, D.M. (2015), “Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death”, *Circulation research*, Vol. 116 No. 12, pp. 1956–1970.
- Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., Belardinelli, L. and Maier, L.S. (2011a), “Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload”, *Circulation research*, Vol. 108 No. 5, pp. 555–565.

- Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., Belardinelli, L. and Maier, L.S. (2011b), "ROS-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late INa augmentation leading to cellular Na and Ca overload", *Circulation research*, Vol. 108 No. 5, pp. 555–565.
- Wang, J., Schwinger, R.H., Frank, K., Müller-Ehmsen, J., Martin-Vasallo, P., Pressley, T.A., Xiang, A., Erdmann, E. and McDonough, A.A. (1996), "Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger in the human heart", *The Journal of clinical investigation*, Vol. 98 No. 7, pp. 1650–1658.
- Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S.R. and Marks, A.R. (2004), "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor", *Circulation research*, Vol. 94 No. 6, e61-70.
- Wibo, M., Bravo, G. and Godfraind, T. (1991), "Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors", *Circulation research*, Vol. 68 No. 3, pp. 662–673.
- WMA - Generalversammlung (1964), "WMA Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen", available at:
http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/Deklaration_von_Helsinki_2013_D E.pdf.
- Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., Roden, D.M., Passier, R., Olson, E.N., Colbran, R.J. and Anderson, M.E. (2002), "Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy", *Circulation*, Vol. 106 No. 10, pp. 1288–1293.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die diese Dissertation möglich gemacht haben:

Zuallererst bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Stefan Wagner für die Bereitstellung des Themas, aber auch seine unermüdliche Begeisterung für die Pathophysiologien des Herzens. Diese war sehr ansteckend und hat mich immer wieder motiviert, neue Versuche zu starten und weiterzuführen. Durch die gute Betreuung während der Laborzeit und auch beim Verfassen der Dissertation konnte ich sehr viel über die Kardiologie und über das wissenschaftliche Arbeiten lernen.

Auch bei Prof. Dr. Lars Maier möchte ich mich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seinem Lehrstuhl durchzuführen, bedanken. Ebenso bei Marzena Drzymalski für die anfängliche Betreuung.

Ein großer Dank geht an Frau Felicia Radtke. Mit ihren Isolationen und der Unterstützung in Form von hilfreichen Tipps jeden Tag bis hin zu nächtlichen Einsätzen bei Herztransplantationen hat sie vieles überhaupt erst möglich gemacht. Auch Herrn Thomas Sowa möchte ich dafür danken, dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Insbesondere bei Dr. Karin Hammer, aber auch bei Dr. Stefan Neef, Dr. Adam Rokita und Dr. Julian Mustroph möchte ich mich für zahlreiche Ratschläge und die Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön geht selbstverständlich an alle Doktoranden, die mit mir im Labor waren und mir einerseits fachlich und praktisch immer wieder geholfen haben und andererseits die Zeit im Labor so unterhaltsam gemacht haben: Danke Melanie, Alex, Bernadette, Maxi, Klaus und Michael.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie danken. Allen voran meinen Eltern, die mir diesen Lebensweg ermöglichen und mich in Allem so wunderbar unterstützen. Meiner Freundin Marlene gebührt besonderer Dank für das Lösen unlösbarer Probleme und die ständige Motivation.