

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Abteilung für Rhythmologie / Department für Kardiologie und Angiologie

Leitung: Prof. Dr. med. Lars Eckardt

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institutsbereich Pharmakologie und Toxikologie

Kommissarische Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

Institutsbereich Vegetative Pharmakologie

Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

**Einfluss des Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX1)-Antagonisten SEA0400 auf
Kalzium-Handling und Arrhythmogenese in Abhängigkeit vom NCX1-Expressi-
onsniveau: Studien an isolierten Kardiomyozyten aus NCX1-Überexpressor- und
-Knockout-Mausmodellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Bauer, Bastian Klemens

aus Jena

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Pott

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Peter Boknik

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Abteilung für Rhythmologie / Department für Kardiologie und Angiologie

- Leitung: Prof. Dr. med. Lars Eckardt

Institut für Pharmakologie und Toxikologie / Institutsbereich Vegetative Pharmakologie

- Kommissarische Leitung / Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

- Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Pott

- Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Peter Boknik

Zusammenfassung

Einfluss des Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX1)-Antagonisten SEA0400 auf Kalzium-Handling und Arrhythmogenese in Abhängigkeit vom NCX1-Expressionsniveau: Studien an isolierten Kardiomyozyten aus NCX1-Überexpressor- und -Knockout-Mausmodellen

Bastian Klemens Bauer

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1) wird als Ziel in der pharmakologischen Therapie von Herzrhythmusstörungen diskutiert. SEA0400 ist ein synthetischer NCX1-Inhibitor und konnte in Tiermodellen ein antiarrhythmisches Potential entfalten. Unklar ist jedoch inwieweit das veränderte NCX1-Expressionsniveau, das bei Vorhofflimmern und bei Herzinsuffizienz erhöht ist, die Wirkung von SEA0400 beeinflusst. Diese Fragestellung wurde an isolierten Herzmuskelzellen von NCX1-Überexpressor(OE)- und NCX1-Knockout(KO)-Mausmodellen untersucht.

SEA0400 verminderte in allen Genotypen die NCX1-Aktivität. Die Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums stieg in allen Genotypen gleichsinnig an, resultierte aber nur in den zugehörigen Wildtypen (WT_{OE} , WT_{KO}) und im KO, nicht jedoch im OE in einem positiv inotropen Effekt. SEA0400 reduzierte die Häufigkeit von spontanen Kalziumfreisetzungen als Maß für Proarrhythmie im OE. In WT_{OE} , WT_{KO} und insbesondere im KO stiegen die proarrhythmischen Ca^{2+} Freisetzungen jedoch an und es wurden vermehrt Hyperkontraktionen mit konsekutivem Ca^{2+} -induzierten Zelltod beobachtet.

Es liegt somit nahe, dass die proarrhythmische und inotrope Wirkung von SEA0400 abhängig vom NCX1-Expressionsniveau ist. Zur Entfaltung eines antiarrhythmischen Effekts pharmakologischer NCX1-Inhibition scheint ein Mindestexpressionsniveau von NCX1 nötig zu sein. Bei einer Expression unterhalb dieser Schwelle könnte eine Inhibition hingegen Herzrhythmusstörungen begünstigen.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Bastian Klemens Bauer, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einfluss des Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX1)-Antagonisten SEA0400 auf Kalzium-Handling und Arrhythmogenese in Abhängigkeit vom NCX1-Expressionsniveau: Studien an isolierten Kardiomyozyten aus NCX1-Überexpressor- und -Knockout-Mausmodellen

in der Abteilung für Rhythmologie / Department für Kardiologie und Angiologie und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Christian Pott

1. selbstständig,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. und sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.
5. Es wird explizit darauf verwiesen, dass die Inhalte dieser Dissertation zum Zeitpunkt der Einreichung als Teil einer Originalarbeit in Vorbereitung sind (Bögeholz et al.). Weiterhin sind die Inhalte dieser Arbeit als Abstract und als Poster auf der Jahrestagung der DGK (Bauer et al. 2015) publiziert worden.

Die Promotionsordnung des Fachbereichs 5 Medizinische Fakultät vom 23.10.2008, zuletzt geändert durch Beschluss des Fachbereichsrates vom 14.02.2014, ist mir bekannt.

.....

Bastian Klemens Bauer

Münster, den 27.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz von Herzrhythmusstörungen	1
1.2	Antiarrhythmische Therapie	2
1.3	Erregungs-Kontraktions-Kopplung	4
1.3.1	Das kardiale Aktionspotential (AP)	4
1.3.2	Ca ²⁺ -Homöostase während der Erregungs-Kontraktions-Kopplung	5
1.3.3	Die kardiale Ca ²⁺ -Elimination	6
1.4	Der kardiale Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX1)	7
1.4.1	NCX1 - Molekulare Struktur	7
1.4.2	NCX1 - Funktion	8
1.4.3	NCX1 - Pathophysiologie	10
1.4.4	NCX1 - Mausmodelle	12
1.4.4.1	Das NCX1-Überexpressor-Mausmodell	12
1.4.4.2	Das NCX1-Knockout-Mausmodell	13
1.5	SEA0400	15
1.5.1	SEA0400 und andere NCX-Inhibitoren	15
1.5.2	SEA0400 – Wirkmechanismus	16
1.5.3	SEA0400 – Wirkprofil	18
1.5.4	SEA0400 – Kalzitropie und Inotropie	19
1.5.5	SEA0400 – Ischämie	21
1.5.6	SEA0400 – Arrhythmie	21
2.	Zielsetzung der Arbeit	24
3.	Material und Methoden	26
3.1	Das NCX1-Überexpressor- und das NCX1-Knockout-Mausmodell	26
3.2	Isolation ventrikulärer Herzmuskelzellen	27

3.2.1	Euthanasie der Versuchstiere	27
3.2.2	Herzexplantation und -präparation	27
3.2.3	Herzperfusion und Isolation ventrikulärer Herzmuskelzellen	28
3.2.4	Schrittweise Erhöhung der Ca ²⁺ -Konzentration	31
3.3	Planimetrische Vermessung der Zellgröße	33
3.4	Kalzium-Imaging	33
3.4.1	Ca ²⁺ -sensitive Fluoreszenz-Farbstoffe	33
3.4.2	Ca ²⁺ -Epifluoreszenz-Messung	35
3.4.3	Schnelle Perfusion und Pharmaka-Applikation	39
3.5	Statistische Analyse	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Vermessung der Zellgröße	41
4.2	Bestimmung der NCX1-Aktivität und der SR Ca ²⁺ -Beladung in Ab- und Anwesenheit von SEA0400	42
4.2.1	Protokoll und Vorversuche zur Bestimmung der NCX1-Aktivität und SR Ca ²⁺ -Beladung	42
4.2.2	Ergebnisse zur Bestimmung der NCX1-Aktivität	44
4.2.3	Ergebnisse zur Bestimmung der SR Ca ²⁺ -Beladung	45
4.3	Bestimmung der Kalzitropie in Ab- und Anwesenheit von SEA0400	46
4.3.1	Protokoll zur Bestimmung der Kalzitropie	46
4.3.2	Ergebnisse zur Bestimmung der Kalzitropie	47
4.4	Bestimmung der Proarrhythmie in Ab- und Anwesenheit von SEA0400	50
4.4.1	Protokoll zur Bestimmung der Proarrhythmie	50
4.4.2	Ergebnisse zur Bestimmung der Proarrhythmie	50
5.	Diskussion	57
5.1	Der Einfluss von SEA0400 auf die NCX1-Aktivität in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression	57

5.2	Der Einfluss von SEA0400 auf die SR Ca ²⁺ -Beladung in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression	58
5.3	Der Einfluss von SEA0400 auf die Amplitude des systolischen Ca ²⁺ -Transienten in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression	60
5.4	Der Einfluss von SEA0400 auf das Arrhythmie-Verhalten in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression	64
5.5	Limitationen der vorliegenden Arbeit	68
5.6	Schlussfolgerungen	70
6.	Zusammenfassung	72
7.	Literaturverzeichnis	74
8.	Vorabpublikationen	92
8.1	Zeitschriftenartikel	92
8.2	Abstracts	92
9.	Curriculum vitae	94
10.	Danksagungen	96
11.	Anhang	xv

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die Ionenregulation in ventrikulären Kardiomyozyten	5
Abb. 2:	Darstellung des NCX1-Äquilibriumspotentials	10
Abb. 3:	Strukturformeln SEA0400, KB-R7943, SN-6	16
Abb. 4:	Arbeitsplatz Herzexplantation	28
Abb. 5:	Langendorff-Perfusor	29
Abb. 6:	Messkammer	35
Abb. 7:	Arbeitsplatz Ca ²⁺ -Epifluoreszenz	38
Abb. 8:	Mikromanipulator mit schneller Perfusion	39
Abb. 9:	Vermessung der Zellgröße	41
Abb. 10:	Einfluss von SEA0400 auf die NCX1-Aktivität	44
Abb. 11:	Einfluss von SEA0400 auf die SR Ca ²⁺ -Beladung	46
Abb. 12:	Einfluss von SEA0400 auf die systolische Kalzitropie I	48
Abb. 13:	Einfluss von SEA0400 auf die systolische Kalzitropie II	49
Abb. 14:	Einfluss von SEA0400 auf die sCRs/Zelle im OE	51
Abb. 15:	Einfluss von SEA0400 auf die sCRs/Zelle im KO	52
Abb. 16:	Einfluss von SEA0400 auf die Fraktion der Zellen mit sCRs	54
Abb. 17:	SEA0400 und Ca ²⁺ -Hyperkontraktionen	55
Abb. 18:	Koffein-induzierte Ca ²⁺ -Transienten und Oszillationen	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Perfusionspuffer	30
Tab. 2:	Verdaulösung	31
Tab. 3:	Stopp-I-Lösung	31
Tab. 4:	Stopp-II-Lösung	31
Tab. 5:	Schrittweise Erhöhung der Ca ²⁺ -Konzentration	32
Tab. 6:	Lagerlösung	32
Tab. 7:	Fluo-4 AM	33
Tab. 8:	Indo-1 AM	34
Tab. 9:	Pluronic®-Lösung	34
Tab. 10:	Fluo-4 AM Lösungsansatz	36
Tab. 11:	Indo-1 AM Lösungsansatz	36
Tab. 12:	Tyrode	37
Tab. 13:	SEA0400-Lösungsansatz	40
Tab. 14:	Koffein-Lösungsansatz	42
Tab. 15:	Schlüsselbefunde zum Einfluss von SEA0400	71

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
$\Delta\mu_{Ca}$	Elektrochemischer Gradient für Ca^{2+}
$\Delta\mu_{Na}$	Elektrochemischer Gradient für Na^+
®	Amtlich registriertes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
*	$p < 0,05$
A	Elektrochemische Triebkraft
AM	Acetoxymethyl
Aqua bidest	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
bar	Bar – Einheit für den Druck
BDM	2,3-Butanedione monoxime
Ca^{2+}	Kalzium
$CaCl_2$	Kalziumdichlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBD1	Ca^{2+} -Bindungs-Domäne 1
CBD2	Ca^{2+} -Bindungs-Domäne 2
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
$C_8H_{10}N_4O_2$	Koffein
$C_6H_{12}O_6$	Glukose
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Saccharose
CO_2	Kohlenstoffdioxid

Da	Dalton
DAD	Späte Nachdepolarisation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAD	Frühe Nachdepolarisation
E_{Ca}	Gleichgewichtspotential für Ca^{2+}
E_{eq}	Gleichgewichtspotential
EKG	Elektrokardiogramm
E_m	Membranpotential
E_{Na}	Gleichgewichtspotential für Na^+
F/F_0	Quotient aus der systolischen und diastolischen Fluoreszenz-Emission
g	Gramm
H^+	Proton
H_2O	Wasser
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
Hz	Hertz
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
I_{Ca}	Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Einwärtsstrom
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IE	Internationale Einheit
I_K	K^+ -Auswärtsstrom
I_{K1}	Einwärts-gleichrichtender K^+ -Auswärtsstrom
I_{Kr}	Schnell inaktivierender K^+ -Auswärtsstrom
I_{Ks}	Langsam inaktivierender K^+ -Auswärtsstrom
I_{Na}	Späte Komponente des Na^+ -Einstroms
I_{NCX1}	NCX1-Einwärts- oder Auswärtsstrom

I_{to}	Transienter, spannungsabhängiger K^+ -Auswärtsstrom
k	Kilo
K^+	Kalium
kb	Kilobasenpaare
KB-R7943	2-[4-[(4-nitrophenyl)methoxy]phenyl]ethylester
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$KHCO_3$	Kalium-Bikarbonat
KO	heterozygotes NCX1-Knockout-Mausmodell
l	Liter
m	Meter
m	Milli
M	Molar
MCU	Mitochondrialen- Ca^{2+} -ATPase
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnesiumsulfat Heptahydrat
MHC	Myosin-schwere-Kette
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
Mol	Stoffmenge
n	Nano
n	Anzahl der in einen Versuch eingegangen Zellen
Na^+	Natrium
Na_2HPO_4	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natrium-Bikarbonat

NCX1	Natrium-Kalzium-Austauscher Isoform 1
NCX2	Natrium-Kalzium-Austauscher Isoform 2
NCX3	Natrium-Kalzium-Austauscher Isoform 3
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
OE	homozygotes NCX1-Überexpressor-Mausmodell
ORM-10103	2-[(3,4-Dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyran-6-yl)oxy]-5-nitro-pyridine
p	Statistischer Signifikanzwert
pH	Wasserstoffionenexponent
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
QRS	Zeitintervall im EKG zwischen Q- und S-Zacke
QT	Zeitintervall im EKG zwischen Q-Zacke und T-Welle
RyR2	Kardialer Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
sCR	Spontane Ca ²⁺ -Freisetzung
SEA0400	2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline
SEM	Standardfehler
SERCA	Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SN-6	2-[[4-[(4-Nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic-acid-ethyl-ester
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
stim	Feldstimulation
SV40	Polyadenylierungssequenz
T ₅₀	Dauer bis zum Erreichen des halbmaximalen Koffein-induzierten Ca ²⁺ -Transienten
TMS	Transmembran-Segment
Tyrode	Extrazelluläre Messlösung

U	Units
V	Volt
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT _{KO}	Korrespondierender Wildtyp des KO
WT _{OE}	Korrespondierender Wildtyp des OE
XIP	Exchanger inhibitory peptide

1. Einleitung

1.1 Klinische Relevanz von Herzrhythmusstörungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind nach jüngsten Angaben der WHO weltweit nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen (Mendis and World Health Organization 2014), insbesondere in Ländern mit hohem Pro-Kopf-Einkommen. In den USA sind 31,9% der jährlich beinahe 2,5 Millionen Todesfälle auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen (Go et al. 2014), wobei bis zu 63% davon durch einen plötzlichen Herztod bedingt sind (Zheng et al. 2001) (zur Übersicht siehe (Myerburg et al. 1993)). In bis zu 84% gehen dem plötzlichen Herztod ventrikuläre Tachykardien (VT), Kammerflimmern und Torsade-Pointes-Tachykardien voraus (Bayés de Luna et al. 1989; Koplan and Stevenson 2009) (zur Übersicht siehe (Pugsley 2002)), so dass Arrhythmien eine erhebliche Bedeutung an der Gesamtmortalität zufällt. 2001 ging die „American Heart Association“ von 500.000 Arrhythmie-bedingten Todesfällen aus (zur Übersicht siehe (Pugsley 2002)). In einem Großteil der Fälle von plötzlichem Herztod liegen strukturelle Herzveränderungen, wie insbesondere die Koronare Herzkrankheit (KHK), aber auch Kardiomyopathien, angeborene Herzfehler, Klappenvitien und Kanalopathien vor (Zipes et al. 2006). Das relative Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden, ist bei präsender struktureller Herzerkrankung um das 7-fache erhöht. Nach einem Herzinfarkt steigt das Risiko um den Faktor 16, bei Patienten mit Herzinsuffizienz sogar um den Faktor 26 (Rea et al. 2004). Die epidemiologische Bedeutung der erhöhten Vulnerabilität gegenüber Arrhythmie bedingten Todesfällen in diesem Kollektiv wird auch durch Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz deutlich: bei jährlich 550.000 neuen Diagnosen leiden derzeit 4,9 Millionen Menschen in den USA an einer Herzinsuffizienz (Bonow et al. 2005). Die häufigste Herzrhythmusstörung ist das Vorhofflimmern (Chugh et al. 2014). Bei einer Prävalenz von bis zu 2% stellt Vorhofflimmern einen bedeutenden epidemiologischen Faktor dar, wobei Menschen zwischen 75 und 85 Jahren am häufigsten betroffen sind (Camm et al. 2012). Vorhofflimmern geht mit einem fünffach erhöhten Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls und einem dreifach erhöhten Risiko für das Auftreten einer Herzinsuffizienz einher - konsekutiv ist die Hospitalisierungs- und Sterberate bei Patienten mit Vorhofflimmern erhöht (Camm et al. 2012).

1.2 Antiarrhythmische Therapie

Antiarrhythmika werden nach Vaughan-Williams anhand ihrer Zielstrukturen in vier Klassen eingeteilt (zur Übersicht siehe (Williams 1984)). Sie besitzen unterschiedliche Wirkprofile und elektrophysiologische Eigenschaften, in denen sie jedoch teilweise Überlappungen zeigen (zur Übersicht siehe (Williams 1984; Harrison 1985)).

a) Klasse I-Antiarrhythmika

Atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten werden durch einen schnellen Natrium(Na^+)-Einwärtsstrom depolarisiert in dessen Folge sich das Herz kontrahiert. Klasse I-Antiarrhythmika inhibieren diesen schnellen Na^+ -Einwärtsstrom. Die Na^+ -Kanalblockade kann eine Na^+ -Kanalreaktivierung bei Nachdepolarisationen verhindern und elektrische Automatie unterdrücken. Zudem können kreisförmige Erregungen (Re-Entry) durch eine reduzierte Erregungsleitungsgeschwindigkeit im funktionellen Synzytium des Herzmuskels unterbrochen werden (zur Übersicht siehe (Capucci et al. 1998)).

Anhand ihrer elektrophysiologischer Eigenschaften und ihres Bindungsverhaltens werden Klasse I-Antiarrhythmika weiter in die Subgruppen IA, B und C unterteilt. Für Vertreter der Klasse IA (Chinidin, Ajmalin und Prajmalin) und IB (Lidocain) existieren heute nur noch wenige Indikationen (Rolf et al. 2003; Blomström-Lundqvist et al. 2003; Mok et al. 2004; Zipes et al. 2006). Zur Klasse IC gehören die beiden Pharmaka Flecainid und Propafenon. Beide Substanzen werden zur Kardioversion und Rezidivprophylaxe von Vorhofflimmern bei Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung eingesetzt (IA), wobei sowohl der intravenöse als auch der orale Einsatz nach dem „Pill in the Pocket“ Konzept möglich ist (Camm et al. 2012). Generell haben sich die Indikationen für Klasse I-Antiarrhythmika vor allem durch die CAST-I- und CAST-II-Studie deutlich eingeschränkt. Nach Myokardinfarkt zeigte sich unter Therapie mit Flecainid, Encainid und Moricizin eine erhöhte Sterblichkeit (The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators 1989; The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators 1992).

b) Klasse II-Antiarrhythmika

β -Blocker bilden die Klasse II der Antiarrhythmika. Indem sie kompetitiv adrenerge Substanzen an β -Rezeptoren inhibieren, wirken sie kardial negativ inotrop, chronotrop und dromotrop und reduzieren Automatie-Mechanismen. Es kommt zu einem verminderten myokardialen Sauerstoffbedarf bei erhöhtem Sauerstoffangebot. Auf zellulärer Ebene wirken β -Blocker einer zum Beispiel durch Herzinsuffizienz bedingten gesteigerten sym-

pathischen Aktivität entgegen und reduzieren die durch den kardialen Ryanodin-Rezeptor (RyR2) vermittelte spontane Kalzium(Ca^{2+})-Freisetzung (sCR) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (zur Übersicht siehe (Wehrens and Marks 2004)).

c) Klasse III-Antiarrhythmika

Zu den Klasse III-Antiarrhythmika gehören Amiodaron, Sotalol und Dronedaron. Sie inhibieren vor allem den schnellen Kalium(K^+)-Ausstrom in der Repolarisationsphase (I_{Kr}) und verlängern dadurch die QT-Zeit. Eine Verlängerung der QT-Zeit geht mit einer verminderten Heterogenität der AP-Dauer einher, wodurch Arrhythmien unterbunden werden können (Singh and Williams 1970). Konsekutiv besteht jedoch die Gefahr der Entstehung von Torsade-de-Pointes-Tachykardien (zur Übersicht siehe (Steinbeck 1992)). Sotalol hat neben der Inhibition verschiedener repolarisierender K^+ -Ströme auch β -blockierende Eigenschaften (zur Übersicht siehe (Hohnloser and Woosley 1994)). Als wichtigster Vertreter der Klasse III-Antiarrhythmika weist Amiodaron Eigenschaften aller vier Vaughan-Williams Klassen sowie pleiotrope Effekte auf eine Vielzahl von Ionenkanalpopulationen auf und gilt daher als „multi-channel-Blocker“ (zur Übersicht siehe (Singh et al. 1989; Podrid 1995)).

Neben der antiarrhythmischen Wirksamkeit von Amiodaron wurden jedoch auch zahlreiche unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen beschrieben (Goldschlager et al. 2007). Nach ersten, vielversprechenden klinischen Studien (Touboul 2003; Singh et al. 2007; Davy et al. 2008; Hohnloser et al. 2009) konnte überraschenderweise für das nebenwirkungsärmere Dronedaron in der PALLAS-Studie eine Übersterblichkeit bei symptomatischer Herzinsuffizienz gezeigt werden (Køber et al. 2008; Connolly et al. 2011), infolgedessen die Indikation für Dronedaron eingeschränkt wurde (Camm et al. 2012).

d) Klasse IV-Antiarrhythmika

Die Klasse IV der Antiarrhythmika besteht aus den Ca^{2+} -Antagonisten. Die Hemmung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen ist bei Nifedipin vornehmlich auf die glatte Gefäßmuskulatur beschränkt. Diltiazem und insbesondere Verapamil wirken hauptsächlich am Sinusknoten, Atrioventrikular(AV)-Knoten und dem Myokard. Dementsprechend resultiert ein negativ chronotroper, dromotroper und inotroper Effekt sowie eine gering ausgeprägte arterielle Vasodilatation (zur Übersicht siehe (Abernethy and Schwartz 1999)).

Trotz einer Vielzahl von Optionen in der medikamentösen Therapie von Herzrhythmusstörungen ist das Verhältnis von arrhythmiebedingten Todesfällen seit 1970 konstant

(zur Übersicht siehe (Pugsley 2002)). Antiarrhythmika erreichen sowohl bei lebensbedrohlichen, ventrikulären Rhythmusstörungen, als auch bei nicht unmittelbar lebensbedrohlichen, supraventrikulären Rhythmusstörungen nicht die Zuverlässigkeit von implantierbaren Kardioverter-Defibrillatoren (ICD) und Katheterablationen (Moss et al. 1996; Buxton et al. 1999; Moss et al. 2002; Blomström-Lundqvist et al. 2003; Zipes et al. 2006; Camm et al. 2012). Da diese Verfahren jedoch kostenintensiv und komplikationsbehaftet sind (zur Übersicht siehe (Neyt et al. 2013; Brüggjenjürgen et al. 2013; Gialama et al. 2014)), sowie häufig durch eine antiarrhythmische Pharmakotherapie ergänzt werden (Pacífico et al. 1999; Kettering et al. 2002), ist die Weiterentwicklung von Antiarrhythmika unerlässlich (zur Übersicht siehe (Roden 2003; Saksena and Madan 2003)).

1.3 Erregungs-Kontraktions-Kopplung

1.3.1 Das kardiale Aktionspotential (AP)

Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung in ihrer Gesamtheit beschreibt nach Bers den Zusammenhang der kardialen, elektrischen Erregung und der mechanischen Arbeit des kontraktiven Herzens (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Die Prozesse der Erregungs-Kontraktions-Kopplung in ventrikulären Kardiomyozyten sind in (Abb. 1) dargestellt.

Die Aktivierung spezialisierter Schrittmacherzellen des Herzens wird durch das spezifische Reizleitungssystem vom Sinusknoten, über Vorhöfe und AV-Knoten, bis in die Ventrikel über Gap Junctions von Zelle zu Zelle geleitet (zur Übersicht siehe (Boyett 2009). In Abhängigkeit von der Herzregion und der dort vorherrschenden Expression von Ionenkanälen ergibt sich ein topographisch, in seiner zeitlichen Dynamik leicht variierendes Aktionspotential (AP) (zur Übersicht siehe (Nerbonne and Guo 2002; Nerbonne and Kass 2005)). Die spannungsabhängige Aktivierung von einwärtsrichtenden Na^+ -Kanälen führt zu einem steilen Aufstrich des Ruhemembranpotentials (Phase 0 des AP). Durch Inaktivierung der Na^+ -Kanäle bei positiveren Membranpotentialen und transienter Aktivierung eines spannungsabhängigen K^+ -Auswärtsstroms (I_{to}) wird eine kurze Repolarisation erzeugt (Phase 1), der sich die Plateauphase anschließt (Phase 2). Der Ca^{2+} -Einwärtsstrom (I_{Ca}) der Plateauphase wird hauptsächlich durch spannungsabhängige, einwärtsrichtende L-Typ Ca^{2+} -Kanäle getragen, die zwischen -40 und -30 mV öffnen (zur Übersicht siehe (Coraboeuf and Nargeot 1993)). Die anhaltende Depolarisation der Plateauphase führt zur Öffnung verzögerter, spannungsabhängiger, auswärtsrichtender K^+ -Kanäle, was letztendlich zur vollständigen Repolarisation auf das Niveau des Ruhe-

membranpotential führt. Im Gegensatz zu den Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen gibt es verschiedene spannungsabhängige (z.B. $I_{\text{Kr}(\text{rapid})}$, $I_{\text{Ks}(\text{slow})}$) und nicht-spannungsabhängige K^+ -Ströme (I_{K1}), deren Expression in Abhängigkeit zur Spezies variiert (zur Übersicht siehe (Nerbonne and Kass 2005)). Bei Deaktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle übernimmt der auswärts gerichtete K^+ -Strom die Überhand und die Repolarisation wird eingeleitet (Phase 3). Die Inaktivierung erfolgt sowohl spannungs- als auch Ca^{2+} -abhängig (zur Übersicht siehe (Coraboeuf and Nargeot 1993)). Die Ca^{2+} -Abhängigkeit wird durch Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin vermittelt (Peterson et al. 1999), es resultiert ein negativer Feedback-Mechanismus.

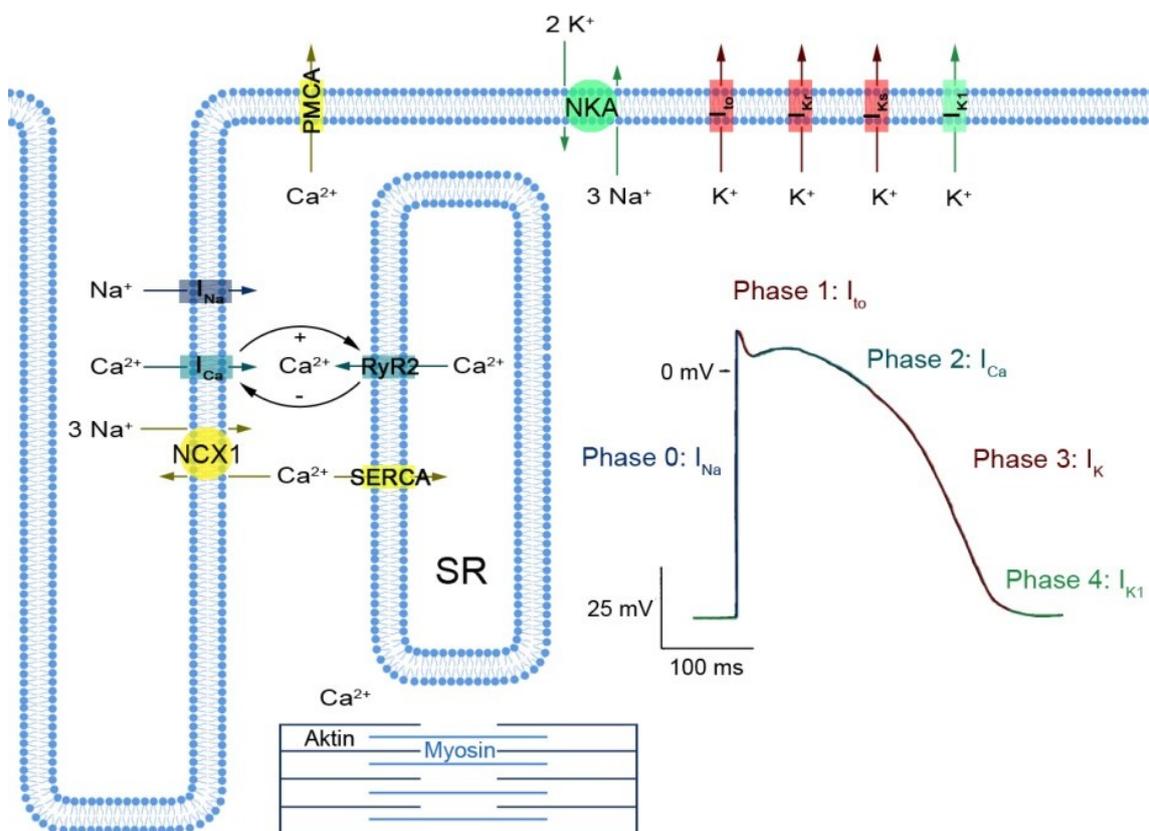


Abb. 1: Die Ionenregulation in ventrikulären Kardiomyozyten

1.3.2 Ca^{2+} -Homöostase während der Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Während des Aktionspotentials kommt es durch die Aktivierung von I_{Ca} durch Bindung von Ca^{2+} an den Ryanodinrezeptor (RyR2) zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (Fabiato 1983). L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und RyR2 liegen im Abstand von 10-15 nm im sogenannten dyadischen Spalt unmittelbar beieinander und bilden funktionelle

Einheiten. Diese topographische Nähe ist wahrscheinlich eine Voraussetzung für die enge funktionelle Kopplung beider Proteine (zur Übersicht siehe (Louch et al. 2010)). Das aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} bindet an den Ca^{2+} -Rezeptor Troponin C, der neben Troponin I und T dem Troponin-Heterotrimer angehört. Durch die Bindung wird über die kontraktile Myofilamente Aktin und Tropomyosin die kardiale Kontraktion eingeleitet (zur Übersicht siehe (Solaro and Rarick 1998)). Die Höhe der Amplitude des aus der SR-Freisetzung entstehenden systolischen Ca^{2+} -Transienten beeinflusst in einem nicht-linearen Zusammenhang maßgeblich die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten (zur Übersicht siehe (Solaro and Rarick 1998; Bers 2002)). Somit kann die Kalzitropie - reguliert durch das Ausmaß des aus dem SR-freigesetzten Ca^{2+} und der Höhe des Ca^{2+} -Transienten – als ein indirekter Parameter für die Kontraktionskraft, also die Inotropie des Herzens herangezogen werden (zur Übersicht siehe (Blaustein and Lederer 1999)).

1.3.3 Die kardiale Ca^{2+} -Elimination

Zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase muss, neben der oben beschriebenen Repolarisation des kardialen Aktionspotentials, die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR terminiert und das zytosolisch akkumulierte Ca^{2+} entfernt werden. Damit die Zelle weder Ca^{2+} verliert noch akkumuliert, muss die Eliminationskapazität identisch dem Ca^{2+} -Eintritt in das Zytosol sein. Damit Ca^{2+} von Troponin C dissoziieren und die Myofilamente relaxieren können, ist es essentiell, dass das zytosolische Ca^{2+} auf weniger als 200nmol/L gesenkt wird (zur Übersicht siehe (Barry and Bridge 1993)). Es stehen verschiedene Eliminations-Mechanismen zur Verfügung, deren quantitativer Beitrag spezies-abhängig variiert. Die sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) befördert Ca^{2+} gegen einen Konzentrationsgradienten Adenosintriphosphat (ATP) abhängig in das SR zurück, während NCX1 am Ende der Systole ein Ca^{2+} -Ion gegen drei Na^+ -Ionen nach extrazellulär schleust. Auf die spezifische Funktionsweise von NCX wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Zwei weitere alternative Mechanismen zur Ca^{2+} -Elimination sind die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA), welche Ca^{2+} ATP-abhängig aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum befördert und die mitochondriale Ca^{2+} -ATPase (MCU), welche eine Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien gewährleistet. Genau wie die MCU hat auch die PMCA nur einen geringen quantitativen Einfluss auf die Ca^{2+} -Eliminationskapazität. In ventrikulären Kardiomyozyten von Kaninchen wird die Ca^{2+} -Elimination zu 70% von SERCA, zu 28% von NCX1 und nur zu jeweils 1% von der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der Mitochondrialen- Ca^{2+} -ATPase (MCU) getragen (Bers et

al. 1996). Ein ähnliches Bild findet sich bei humanen ventrikulären Myozyten (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Bei Ratten trägt die SERCA 92%, NCX1 lediglich 7%, PMCA und MCU 1% zur Ca^{2+} -Depletion des Zytosols bei (Bassani et al. 1994a). Bei Mäusen findet sich entsprechend eine Aufteilung von 90%, 9% und 1% (Li et al. 1998).

1.4 Der kardiale Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX1)

1.4.1 NCX1 - Molekulare Struktur

1988 gelang es das NCX1-Protein zu isolieren und anhand von einem 120 kDa (Kilodalton) und einem daraus proteolytisch entstehenden 70 kDa großem Protein darzustellen. Mit Hilfe der aufgereinigten Proteine konnte ein polyklonaler NCX1-Antikörper generiert werden (Philipson et al. 1988), der zwei Jahre darauf zur Identifikation von cDNA (komplementäre DNA) verwendet wurde. Zur Klonierung von NCX1 wurde aus der cDNA, cRNA (komplementäre RNA) synthetisiert und in Oozyten injiziert, die daraufhin NCX1 exprimierten (Nicoll et al. 1990). Experimentelle Analysen weisen darauf hin, dass NCX1 aus 9 Transmembran-Segmenten (TMS) besteht (Nicoll et al. 1999; Iwamoto et al. 2000), wobei es jüngst Hinweise gab, die von einer NCX1-Topologie mit 10 TMSs ausgehen (Sääf et al. 2001; Ren and Philipson 2013).

In der Mitte des Moleküls befinden sich die beiden homologen, repetitiven Sequenzen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die jeweils ca. 40 Basenpaare lang sind. $\alpha 1$ befindet sich im Bereich der TMSs 2 und 3, $\alpha 2$ im Bereich von TMS 7 und 8. Beide sind an der Ausbildung von 4 Kationen-Bindungsstellen beteiligt, wobei eine Bindungsstelle spezifisch für Ca^{2+} ist und die anderen drei mit hoher Wahrscheinlichkeit Na^+ binden (Liao et al. 2012). Zwischen dem 5. und 6. TMS ist ein 550 Basenpaare-großer intrazellulärer Bereich lokalisiert (zur Übersicht siehe (Philipson and Nicoll 2000)), an dessen Beginn die Calmodulin ähnliche, autoregulative „XIP“-Einheit (exchanger inhibitory peptide) lokalisiert ist (Li et al. 1991), die wahrscheinlich für die Autoregulation von NCX1 durch Na^+ und Ca^{2+} notwendig ist (Matsuoka et al. 1993). Auf der intrazellulären Schleife konnten die allosterischen Ca^{2+} -Bindungs-Domänen CBD1 (Levitsky et al. 1994) und CBD2 (Hilge et al. 2006) identifiziert werden, bei denen es sich um weitere autoregulatorische Einheiten handelt. Eine hohe Ca^{2+} -Konzentration resultiert in einer gesteigerten NCX1-Aktivität, indem Ca^{2+} an die CBDs bindet. Umgekehrt wird NCX1 durch hohes $[\text{Na}^+]_i$ inhibiert. Eine Na^+ -abhängige NCX1-Inaktivierung tritt jedoch erst deutlich oberhalb (>30 mM) der physiologischen Konzentration auf (Despa and Bers 2013). Weitere inhibitorische Modulationsfaktoren

der NCX1-Aktivität sind unter anderem ein niedriger pH im Sinne einer Azidose (Philipson et al. 1982) und eine Erschöpfung der ATP-Konzentration (Haworth et al. 1987).

1.4.2 NCX1 - Funktion

Um die Ca^{2+} -Homöostase zu wahren, ist es essentiell, dass während des Kontraktionszyklus Ca^{2+} weder verloren geht noch akkumulieren kann. Dadurch, dass NCX1 die gleiche Menge Ca^{2+} , das durch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ins Zytosol gelangt, im Austausch gegen Na^+ nach extrazellulär transportiert, wird das Ca^{2+} -Gleichgewicht in der Waage gehalten (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Die heute gängige Auffassung geht von einem NCX1-Forward- und -Reverse-Mode aus. Das heißt dem Natrium-Kalzium-Austauscher wird je nach Modus eine Ca^{2+} -Influx- bzw. eine Ca^{2+} -Efflux-Funktion zugeschrieben (Mullins 1977; Mullins 1981). Mit einem thermodynamischen Ansatz wurde 1984 eine Stöchiometrie von 3 Na^+ - zu 1 Ca^{2+} -Ionen angenommen (Reeves and Hale 1984), die durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (Liu and Xuan 1986; Axelsen and Bassingthwaite 1988; Crespo et al. 1990). Entsprechend eines Austausches von 3 Na^+ - für 1 Ca^{2+} -Ion gelangt also, je nach Funktionsmodus, beim NCX1-Forward-/Reverse-Mode jeweils eine positive Nettoladung nach intra-/extrazellulär. Die Triebkraft für den NCX1-Extrusionsmodus, bei dem Ca^{2+} entgegen seines elektrochemischen Gradienten in das extrazelluläre Kompartiment transportiert wird, resultiert neben dem jeweils einwärtsgerichteten elektrischen, vor allem aus dem chemischen Gradienten für Na^+ . Dieser Austausch von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen wird indirekt durch die primär-aktive Na^+/K^+ -ATPase (NKA) ermöglicht, so dass die NCX1-Aktivität ein sekundär-aktiver Prozess ist (zur Übersicht siehe (Bögeholz et al. 2012)). Indem die NKA gegen den bestehenden Konzentrationsgradienten 3 Na^+ -Ionen über die Zellmembran nach extra- und zwei K^+ -Ionen nach intrazellulär befördert, leistet sie einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Na^+ -Konzentrationsgradienten und folglich auch des Ruhemembranpotentials. Während das Ruhemembranpotential für die Entstehung und Fortleitung von Aktionspotentialen, und damit für die kardiale Erregungs-Kontraktions-Kopplung unerlässlich ist, spielt der Konzentrationsgradient für Na^+ und K^+ zwischen extra- und intrazellulärem Kompartiment eine wichtige Rolle in der Ionen-Homöostase, der Regulierung des Zellvolumens und der Funktion von sekundär aktiven Transportern. Die benötigte Energie für den primär-aktiven Transportprozess wird durch Hydrolyse von einem Molekül ATP bereitgestellt (zur Übersicht siehe (Glitsch 2001)).

Die Annahme, dass der NCX1-Funktionsmodus sich umkehren kann, wird durch folgendes mathematisches Modell veranschaulicht (Mullins 1979). Die elektrochemische Triebkraft (A) wird durch die freie Energie der elektrochemischen Gradienten für Na⁺ und Ca²⁺ ($\Delta\mu_{\text{Na}}$ und $\Delta\mu_{\text{Ca}}$) bestimmt, wobei;

$$A=3\Delta\mu_{\text{Na}}-1\Delta\mu_{\text{Ca}} \quad (1)$$

Übersteigt die einwärtsgerichtete Triebkraft für 3 Na⁺-Ionen die für 1 Ca²⁺-Ion, wird Ca²⁺ im Austausch für Na⁺ aus der Zelle befördert. Verringert sich vice versa $\Delta\mu_{\text{Na}}$ im Vergleich zu $\Delta\mu_{\text{Ca}}$, folgt ein Ca²⁺-Influx und ein Na⁺-Efflux. Gleichung (1) kann auch als;

$$A=3E_{\text{Na}}-2E_{\text{Ca}}-E_{\text{m}} \quad (2)$$

ausgedrückt werden. E_{Na} und E_{Ca} sind die Gleichgewichtspotentiale für Na⁺ und Ca²⁺, E_{m} das Membranpotential. Befindet sich die elektrochemische Triebkraft im Gleichgewicht (A=0), entspricht das Umkehrpotential dem Membranpotential, das im Fall von NCX1 identisch mit dem Gleichgewichtspotential (E_{eq} ; ca. -40 mV) ist; (zur Übersicht siehe (Barry and Bridge 1993)).

$$E_{\text{eq}}=3E_{\text{Na}}-2E_{\text{Ca}} \quad (3)$$

Wenn das Membranpotential nun niedriger als das NCX1-Umkehrpotential ist, arbeitet der spannungsabhängige NCX1 (Kimura et al. 1986) im Forward-Mode (Ca²⁺-Extrusion). Ist das Membranpotential positiver wird der Reverse-Mode aktiviert (zur Übersicht siehe (Barry and Bridge 1993)). Während des kardialen Aktionspotentials verändert sich das NCX1-Äquilibriumspotential durch den Na⁺- und Ca²⁺-Einstrom sowie den Spannungsverlauf dynamisch (Abb. 2) (zur Übersicht siehe (Bers 2002)).

Ob der NCX1-Reverse-Mode, also der Einstrom von Ca²⁺ über NCX1 im Austausch gegen 3 Na⁺-Ionen unter physiologischen Bedingungen vorkommt und – wenn ja – welche Relevanz er hat, ist bisher nicht abschließend geklärt. In Patch-Clamp-Experimenten konnten einige Autoren lediglich einen vernachlässigbar kleinen Einfluss des NCX1-Reverse Modes auf die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung feststellen (Sipido et al. 1997; Weber et al. 2002). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass der NCX1-Reverse-Mode einen Beitrag zur Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR leistet (Wasserstrom and Vites 1996; Neco et al. 2010). In neueren Arbeiten konnte ein Einfluss des Na⁺-Einstroms (I_{Na}) auf die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung gezeigt werden, der allerdings in einem homozygoten NCX1-KO-Mausmodell nicht reproduzierbar war (Larbig et al. 2010). Dieser Befund legt nahe, dass der NCX1-Reverse-Mode eine wichtige Rolle in der Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Freisetzung spielt (Larbig et al. 2010).

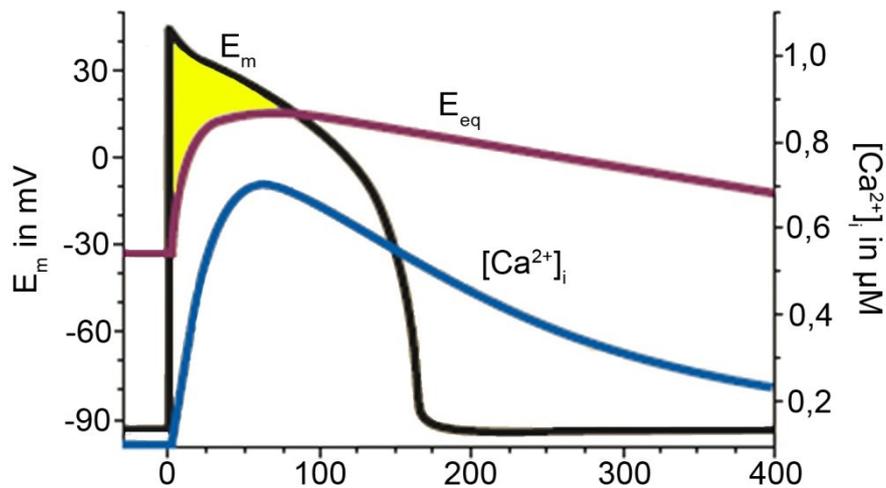


Abb. 2: Darstellung des NCX1-Äquilibriumspotentials (E_{eq}). Zu Beginn des Aktionspotentials ist E_m negativer als E_{eq} , sodass eine Ca^{2+} -Extrusion durch den NCX1-Forward-Mode erfolgt. Im Laufe des Aktionspotentials überschreitet E_m E_{eq} , NCX1 arbeitet kurzzeitig im Reverse-Mode (gelbe Fläche), bevor es im Laufe der Repolarisation erneut zu einem Wechsel des NCX1-Funktionsmodus kommt. E_{eq} ändert sich während des kardialen Aktionspotentials dynamisch, da sich E_m sowie die zytosolische Ca^{2+} - und Na^+ -Konzentration (E_{Ca} und E_{Na}) ändern. (Modifiziert aus Bers 2002)

1.4.3 NCX1 - Pathophysiologie

Eine erhöhte NCX1-Aktivität wird mit Herzrhythmusstörungen in Verbindung gebracht. Der klassische NCX1-vermittelte Pathomechanismus beruht dabei auf der Entstehung von späten Nachrepolarisationen (delayed afterdepolarization = DAD). Kommt es während der elektrischen Diastole zu einer spontanen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, wird das Membranpotential durch die einsetzende Ca^{2+} -Extrusion des NCX1-Forward-Mode passager positiver, und eine DAD bildet sich aus. Überschreitet diese dabei die Schwelle zur Reaktivierung spannungsabhängiger Na^+ - oder Ca^{2+} -Kanäle, so wird ein spontanes Aktionspotential ausgelöst (Pogwizd et al. 1999; Pott et al. 2012) (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988; Sipido et al. 2007)). Neben DADs werden auch frühe Nachdepolarisationen (early afterdepolarizations = EAD) beschrieben. Es wird angenommen, dass diese während der Repolarisationsphase des Aktionspotentials durch eine spontane Reaktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen mit erneuter Depolarisierung der Zellmembran entstehen (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988)). Neben den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen ist auch NCX1 in der Lage, das Membranpotential während der Repolarisation zu positiveren Werten zu verschieben. Bei Reaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle mit fol-

gender Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Freisetzung verstärkt der NCX1-Forward-Mode den Einwärtsstrom. Neben dieser unterstützenden Funktion von NCX1 bei der EAD-Genese ist es auch möglich, dass eine spontane Ca^{2+} -Freisetzung primär den NCX1-Forward-Mode aktiviert. Dadurch wird die Repolarisation verzögert und die Wahrscheinlichkeit für eine Reaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die den Membranpotential-Aufstrich des EADs unterstützen können, steigt (Weiss et al. 2010). Generell gilt: je länger die Plateauphase des Aktionspotentials anhält, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit dass die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle oder Na^+ -Kanäle reaktivieren und ein EAD auslösen (Kupersmith and Hoff 1985) (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988)).

Sowohl bei herzinsuffizienten Patienten als auch beim Vorhofflimmern ist die NCX1-Proteinexpression erhöht. Somit könnte NCX bei diesen Krankheitsbildern bzgl. der Proarrhythmie eine besondere Rolle spielen (Hasenfuss 1998; Voigt et al. 2012). Auch in humanen Proben herzinsuffizienter Patienten wurde eine erhöhte NCX1-Expression (Studer et al. 1994; Flesch et al. 1996) und -Aktivität festgestellt (Reinecke et al. 1996). Bei der Herzinsuffizienz gleichen sich die quantitativen und relativen Beiträge von SERCA und NCX1 zur zytosolischen Ca^{2+} -Elimination an, so dass in der Konsequenz Ca^{2+} vermehrt nach extrazellulär transportiert wird (O'Rourke et al. 1999; Pieske et al. 1999) (zur Übersicht siehe (Bers and Despa 2006)). Die beschriebenen elektrophysiologischen Veränderungen begünstigen eine Depletion des SR Ca^{2+} -Gehalts und reduzieren somit das für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung zur Verfügung stehende Ca^{2+} . Konsekutiv kommt es zur systolischen Dysfunktion und Pumpschwäche (zur Übersicht siehe (Bers and Despa 2006)). Letztendlich ist jedoch unklar, ob die in der Herzinsuffizienz beobachtete NCX1-Expressionserhöhung Ursache oder Auswirkung der Herzinsuffizienz ist. Dementsprechend ist denkbar, dass sich die NCX1-Expression im Rahmen einer Adaptation erhöht, um einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung entgegenzusteuern. Eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration könnte zudem den Ca^{2+} -induzierten autoinhibitorischen Effekt auf RyR2 steigern (Sham et al. 1998) und somit die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR weiter reduzieren sowie die systolische Dysfunktion verstärken.

Neben der Herzinsuffizienz und der Arrhythmie wird NCX1 auch als Vermittler des ischämischen Myokarduntergangs diskutiert. Bei der Ischämie fallen durch anaerobe Glykolyse und ATP-Verbrauch vermehrt H^+ -Ionen an, die einen verstärkten Na^+ -Influx durch den Na^+/H^+ -Antiporter bewirken. Die erhöhte zytosolische Na^+ -Konzentration kann durch die Ischämie bedingte Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase nicht korrigiert werden, so dass der NCX1-Reverse-Mode begünstigt wird, wodurch es zu einem massenhaften Einstrom von

Ca²⁺ in die Herzmuskelzelle mit nachfolgender Hyperkontraktion und Zelltod kommt. Dementsprechend wurde bei myokardialer Ischämie in einem Mausmodell mit gesteigerter NCX1-Expression eine verminderte Kontraktilität und Bereitstellung von Energiemetaboliten wie ATP beobachtet (Cross et al. 1998).

1.4.4 NCX1 - Mausmodelle

1.4.4.1 Das NCX1-Überexpressor-Mausmodell

Als erstes transgenes Modell wurde ein heterozygoten NCX1-Überexpressor-Mausmodell etabliert (Adachi-Akahane et al. 1997). Im Folgenden werden die Voruntersuchungen zu dem in dieser Studie verwendeten homozygoten NCX1-Überexpressor(OE)-Mausmodell beschrieben, das eine mehr als 3-fache NCX1-Aktivität aufweist (Reuter et al. 2004; Roos et al. 2007).

Bis zu einem Alter von <12,5 Wochen ließen sich keine pathologischen Veränderungen an diesen Tieren zeigen. Echokardiographisch stellten sich Herzfunktion und -morphologie unverändert dar. Es zeigte sich eine diskrete, jedoch nicht signifikante Verdickung des diastolischen Durchmessers des interventrikulären Septums und der posterioren Wand. Auch das Verhältnis zwischen Herz- zu Körpergewicht und die Zellkapazität als Hypertrophiemarker waren im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp (WT_{OE}) nicht signifikant verändert. Es konnten keine Herzinsuffizienz-spezifischen Expressionsveränderungen von Schlüsselproteinen der Ca²⁺-Homöostase festgestellt werden. Lediglich der RyR2 und der phosphorylierte RyR2 wiesen erhöhte Expressions-Level auf. Zwischen OE und WT_{OE} bestand kein Unterschied in der diastolischen Ca²⁺-Konzentration, der systolischen Ca²⁺-Amplitude und der SR Ca²⁺-Beladung (Pott et al. 2012).

Vorangegangene Untersuchungen zur Ca²⁺-Homöostase im OE zeigten, kompensatorisch zum gesteigerten NCX1-vermittelten Ca²⁺-Efflux, einen verstärkten Ca²⁺-Influx durch verzögerte Inaktivierung von I_{Ca}. Durch Entfernung des zytosolischen und des SR Ca²⁺ durch Applikation des Ca²⁺-Chelators BAPTA wurde dieser Effekt aufgehoben (Pott et al. 2007a). Entsprechend scheint die, im OE auftretende, verzögerte Inaktivierung der L-Typ Ca²⁺-Kanäle, Ca²⁺-abhängig zu sein. Es wurde geschlossen, dass durch die verstärkte Ca²⁺-Extrusion die submembranöse Ca²⁺-Konzentration im dyadischen Spalt reduziert ist und sich somit die auto-inhibitorische Ca²⁺-induzierte I_{Ca}-Inaktivierung verzögert. Demnach passt sich die Ca²⁺-Aufnahme der Herzmuskelzelle an die gesteigerte

NCX1-vermittelte Ca^{2+} -Extrusion an. Darüber hinaus wurde im OE eine verlängerte Aktionspotentialdauer festgestellt, die am ehesten durch den verstärkten depolarisierenden Einwärtsstrom des NCX1-Forward-Mode während der Repolarisation bedingt ist (Pott et al. 2007a). Die bei der Herzinsuffizienz häufig beobachtete Reduktion auswärts gerichteter K^+ -Ströme (Beuckelmann et al. 1993) lag im OE nicht vor (Pott et al. 2012). Auf Ganzherz-Ebene spiegelten sich diese Befunde im Elektrokardiogramm (EKG) in einer Verlängerung der QT-Dauer wieder (Pott et al. 2012).

Das homozygote NCX1-Überexpressor-Mausmodell wurde auch hinsichtlich einer möglichen Proarrhythmie untersucht (Pott et al. 2012). In Einzelzell-Untersuchungen isolierter, ventrikulärer Herzmuskelzellen bestand kein Unterschied in der Anzahl der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle zwischen den Genotypen. Allerdings war die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen im OE gegenüber dem WT_{OE} erhöht. Als mögliche Erklärung wurde ein verstärktes SR Ca^{2+} -Leck durch die erhöhte Expression von RyR2 und phosphoryliertem RyR2 im OE angeführt. Zudem ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass bei erhöhter NCX1-Aktivität spontane Ca^{2+} -Freisetzungen vermehrt in spontane Aktionspotentiale übersetzt werden. Im Vergleich zum WT_{OE} traten im OE zudem häufiger EADs auf, die am ehesten durch die Verlängerung des Aktionspotentials bedingt wurden. Mechanistisch gründet sich das verlängerte Aktionspotential auf der verzögerten I_{Ca} -Inaktivierung und der gesteigerten NCX1-Aktivität. Entsprechend dieser zellphysiologischen Befunde zeigten sich in einem Langendorff-Setup vermehrt ventrikuläre Arrhythmien auf Ganzherzebene (Pott et al. 2012).

Im Alter von 4 Monaten wurden im OE Zeichen einer kardialen Hypertrophie beschrieben. Sowohl das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht und Tibia-Länge, als auch die Zellkapazität waren erhöht. Für einen gegebenen I_{Ca} zeigte sich eine reduzierte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung und damit eine Beeinträchtigung der Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Zudem waren Mäuse mit einer NCX1-Überexpression eher prädisponiert eine Herzinsuffizienz zu erleiden als ihre korrespondierenden Wildtypen (Reuter et al. 2004; Roos et al. 2007).

1.4.4.2 Das NCX1-Knockout-Mausmodell

Das heterozygote Knockout(KO)-Mausmodell weist eine um 50% reduzierte NCX1-Expression auf (Jordan et al. 2010). Die kardialen Funktionsparameter stellten sich echokardiographisch bis zu einem Alter von 18 Monaten unauffällig dar und waren identisch mit denen des korrespondierenden Wildtyp (WT_{KO}). Bei gleichem Körpergewicht waren

im KO der Durchmesser des interventrikulären Septums und die linksventrikuläre Masse vermindert, was sich auch in einem reduzierten Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge widerspiegelte (Jordan et al. 2010). Diese Befunde waren jedoch nicht mit morphologischen Veränderungen im Sinne einer Herzinsuffizienz assoziiert. Zudem konnte eine zelluläre Hypertrophie bei identischer Zellkapazität zwischen KO und WT_{KO} ausgeschlossen werden. In Western Blot Experimenten wurde, wie bereits vorbeschrieben, eine reduzierte NCX1-Expression bestimmt, wobei die Expression anderer Schlüsselproteine des Ca²⁺-Haushalts durch die modifizierte NCX1-Aktivität unbeeinflusst blieb (Bögeholz et al. 2015). In Koffeinstößen konnte die verminderte Ca²⁺-Extrusionskapazität des KO verifiziert werden, während die SR Ca²⁺-Beladung unverändert war. Auch die diastolischen und systolischen Ca²⁺-Level stellten sich zwischen den Genotypen identisch dar (Bögeholz et al. 2015). Die I_{Ca}-Amplitude stellte sich im KO bei unveränderter Inaktivierungs-Kinetik der L-Typ Ca²⁺-Kanäle genau wie die Aktionspotentialdauer vermindert dar. Die auswärtsgerichteten K⁺-Ströme waren leicht reduziert und können somit die verkürzte Aktionspotential-Dauer nicht erklären. Dementsprechend scheint die verkürzte Repolarisation vorwiegend aus einem verminderten depolarisierenden NCX1- und L-Typ Ca²⁺-Kanal-Einwärtsstrom zu resultieren. Die Ca²⁺-Influx-Kapazität verändert sich gleichsinnig mit der reduzierten Ca²⁺-Efflux-Kapazität des KO und beugt somit einer zytosolischen und SR Ca²⁺-Überladung vor. Als Erklärungsmodell kommt – analog zum NCX1-Überexpressor-Mausmodell – erneut die veränderte Ca²⁺-Dynamik im dyadischen Spalt in Betracht, wobei die verminderte NCX1 Ca²⁺-Extrusion eine erhöhte submembranöse Ca²⁺-Konzentration und damit eine vermehrte Ca²⁺-abhängige Inhibition der Funktion der L-Typ Ca²⁺-Kanäle bedingt (Pott et al. 2007b, Bögeholz et al. 2015).

Ebenso wie im NCX1-Überexpressor-Mausmodell wurde auch im heterozygoten Knockout das Arrhythmie-Verhalten untersucht: Zwischen KO und WT_{KO} gab es keinen Unterschied hinsichtlich des Auftretens von spontanen Ca²⁺-Freisetzungen in isolierten Kardiomyozyten. Während die Häufigkeit von DADs/Zelle zwischen den Genotypen gleich war, zeigte sich die Amplitude der DADs im KO – bei verlängerter Dauer – reduziert. Dabei wurden die DADs im KO deutlich seltener in spontane Aktionspotentiale übersetzt, wodurch auch das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen/Zelle reduziert war. Die Autoren diskutierten, dass eine gegebene spontane Ca²⁺-Freisetzung im Vergleich zum WT_{KO} einen, durch den NCX1-Forward-Mode vermittelten, reduzierten Einwärtsstrom generiert. Die dadurch verminderte Amplitude des DAD würde das für ein spontanes Aktionspotential erforderliche Schwellenpotential stochastisch weniger häufig überschreiten. EADs fanden sich demgegenüber fast ausnahmslos im WT_{KO}. Die verminderte

Zahl von EADs/Zelle im KO ist vor allem durch die verkürzte Dauer des Aktionspotentials, das wiederum durch die reduzierten I_{Ca} und I_{NCX1} bedingt ist, zu erklären. Zusammenfassend schützt die isolierte Modifikation des NCX1-Levels im KO vor Proarrhythmie. Komplementär zur NCX1-Überexpression scheint eine reduzierte NCX1-Expression einen protektiven Effekt hinsichtlich arrhythmischer Ereignisse zu haben (Bögeholz et al. 2015).

1.5 SEA0400

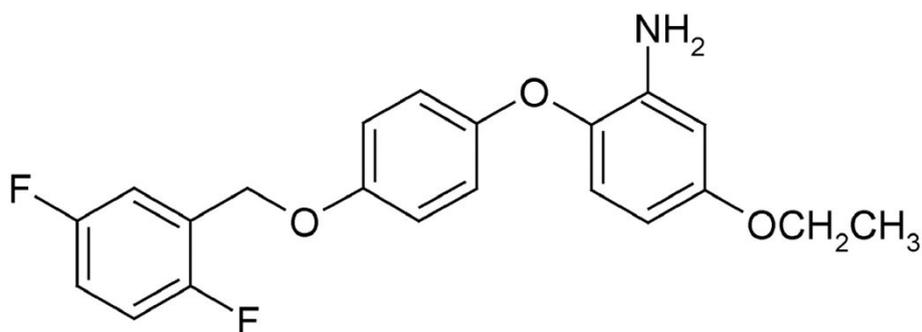
1.5.1 SEA0400 und andere NCX-Inhibitoren

Bi- und Trivalente Kationen, Dichlorobezamil, Bepridil und einige Peptide sind dafür bekannt die NCX1-Funktion unspezifisch blockieren zu können (zur Übersicht siehe (Matsuda et al. 1997; Shigekawa and Iwamoto 2001)). Das Peptid XIP ist ein spezifischer NCX-Inhibitor mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 1,5 μ M. XIP scheint jedoch nicht durch die Zellmembran permeieren zu können (Li et al. 1991). Anders KB-R7943, ein Benzyloxyphenyl-Derivat, das den NCX-Reverse-Mode mit einer IC_{50} von 1,2-2,4 μ M hemmt. Während andere Ionen-Transporter wie der Na^+/H^+ -Antiporter, die Na^+/K^+ -ATPase und der Ca^{2+} -ATPase bei 10 μ M nicht und der NCX-Forward-Mode erst bei einer IC_{50} von $> 30 \mu$ M inhibiert werden (Iwamoto et al. 1996), blockt KB-R7943 in niedrigen Konzentrationen auch I_{Ca} , I_{Na} und I_{K1} (Watano et al. 1996; Matsuda et al. 2001). Das Benzyloxyphenyl-Derivat SN-6 weist eine mit KB-R7943 vergleichbare inhibitorische Potenz für NCX1 ($IC_{50}=2,9 \mu$ M) auf, ist jedoch spezifischer (Iwamoto et al. 2004a). Der zurzeit potenteste NCX-Inhibitor ist SEA0400 (2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline). Genau wie KB-R7943 und SN-6 ist das 2001 synthetisierte SEA0400 ein Benzyloxyphenyl-Derivat (zur Übersicht siehe (Iwamoto 2004)), dass jedoch mit einer IC_{50} von 5-33 nM für den NCX-Reverse-Mode eine wesentlich höhere inhibitorische Potenz aufweist (Matsuda et al. 2001). Durch die Alkylgruppe ist der Transport durch Membranen im Vergleich zu KB-R7943, das eine Thioharnstoff-Gruppe besitzt, erschwert (Abb. 3) (Birinyi et al. 2005).

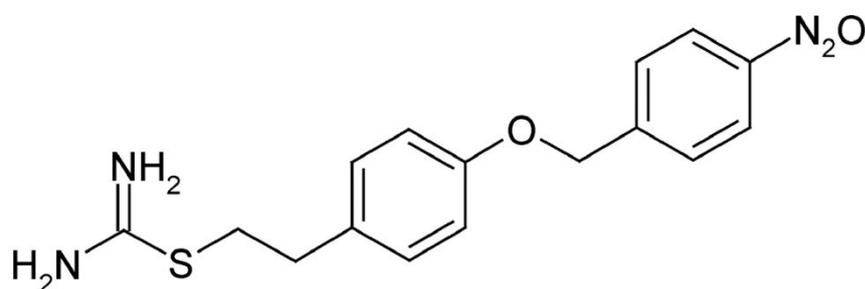
Während SEA0400 (Iwamoto et al. 2004b) und SN-6 (Iwamoto et al. 2004a) vor allem NCX1 inhibieren, weist KB-R7943 (Iwamoto et al. 2001) eine höhere Potenz für die NCX3-Isoform auf. Je nach Gewebe und NCX-Expression ist somit eine selektive Hemmung der vorliegenden Isoform möglich. Jüngst wurde mit ORM-10103 ein neuer NCX-Inhibitor beschrieben, der IC_{50} -Werte von 780 nM und 960 nM für den NCX-Forward- und -Reverse-Mode aufweist. ORM-10103 ist, abgesehen von einer leichten Reduktion

der auswärtsgerichteten K^+ -Ströme, hochspezifisch für NCX und zeigte in ersten Versuchen einen antiarrhythmischen Effekt (Jost et al. 2013; Terracciano and Hancox 2013).

SEA0400



KB-R7943



SN-6

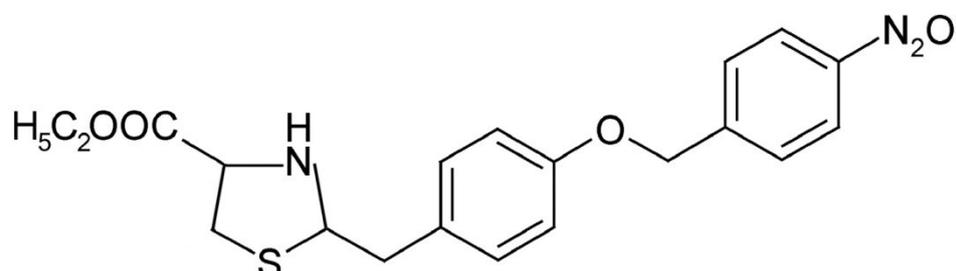


Abb. 3: Strukturformeln SEA0400, KB-R7943, SN-6

1.5.2 SEA0400 – Wirkmechanismus

Die NCX1-Aktivität wird, neben dem Membranpotential, durch die intrazelluläre Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration moduliert. Dabei werden zwei voneinander unabhängige Zustände unterschieden, der I_1 - und der I_2 -Inaktivierungs-Status. Der I_1 -Inaktivierungs-Status ist Na^+ -abhängig, wobei hohe Na^+ -Konzentrationen NCX in einen inaktiven Zustand versetzen. Zusätzlich wird der I_1 -Inaktivierungs-Status durch Ca^{2+} moduliert, indem bei steigende Ca^{2+} -Konzentrationen eine Erholung aus dem I_1 -Inaktivierungs-Status gefördert wird. Der I_2 -Inaktivierungs-Status ist ausschließlich Ca^{2+} -abhängig und liegt bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen vor. Sobald Ca^{2+} ansteigt, wird der inaktive I_2 -Status aufgehoben

(Hilgemann et al. 1992). Die I_1 -Inaktivierungs-Kinetik scheint im Gegensatz zur Ca^{2+} -abhängigen I_2 -Inaktivierung, mit der NCX-inhibitorischen Wirkung der Benzyloxyphenyl-Derivate assoziiert zu sein. Wird sowohl die I_1 - als auch die I_2 -Regulation durch Proteolyse mit α -Chymotrypsin ausgeschaltet, verbleibt NCX im aktiven Zustand und die Sensitivität für SEA0400 wird drastisch reduziert (Lee et al. 2004). Während jedoch kein Unterschied in der inhibitorischen Potenz von SEA0400 zwischen einem NCX-Wildtyp und einem NCX mit supprimierter I_2 -Inaktivierung beobachtet werden konnte (Bouchard et al. 2004), zeigte sich durch genetische Veränderungen der XIP-Region, dass eine Elimination des I_1 -Inaktivierungs-Status mit einer reduzierten und eine beschleunigte I_1 -Inaktivierungs-Kinetik mit einer erhöhten Sensitivität für die NCX-Inhibition einhergeht (Iwamoto et al. 2004b; Iwamoto et al. 2004a). Zudem führte eine 4-fache Reduktion der zytosolischen Na^+ -Konzentration zu einer 10-fach verminderten NCX-Inhibition. Folglich ist die NCX-inhibitorische Potenz von SEA0400 von der zytosolischen Na^+ -Konzentration abhängig (Lee et al. 2004). Demnach scheint es plausibel, dass die Benzyloxyphenyl-Derivate NCX im I_1 -Inaktivierungs-Status stabilisieren. Zudem ist es im Sinne eines therapeutischen Regimes denkbar, dass die gesteigerte Potenz von SEA0400 bei erhöhten zytosolischen Na^+ -Konzentrationen einen protektiven Effekt bei Ischämien entfaltet (Bouchard et al. 2004).

In zahlreichen Studien konnte eine selektive inhibitorische Potenz von XIP, KB-R7943, SN-6 und SEA0400 auf den NCX-Reverse-Mode gezeigt werden, wobei dieses Thema kontrovers diskutiert wird und der zugrundeliegende Mechanismus noch ungeklärt ist (Li et al. 1991; Iwamoto et al. 2002; Lee et al. 2004; Ozdemir et al. 2008). KB-R7943 und SEA0400 bilden inaktive Komplexe bevorzugt mit bestimmten NCX-Konformationen. Die Enzym-Inhibitor-Komplexe stehen dabei weder für den NCX-Reverse- noch für den -Forward-Mode zur Verfügung. Das Verhältnis der verschiedenen NCX-Konformationen und damit die inhibitorische Potenz ist wiederum von den vorherrschenden Ionenverhältnissen abhängig. Zum Beispiel ist die Na^+ -abhängige I_1 -Inaktivierung charakteristisch für den NCX-Reverse-Mode mit einer hohen zytosolischen Na^+ -Konzentration, während der I_1 -Zustand beim NCX-Einwärtsstrom gänzlich abwesend ist. Entsprechend wäre die inhibitorische Potenz für den NCX-Reverse-Mode größer als für den -Forward-Mode, wenn SEA0400 bevorzugt den I_1 -Inaktivierungs-Status bindet (Lee et al. 2004). Diese scheinbare, ionenabhängige Präferenz der Benzyloxyphenyl-Derivate für den NCX-Reverse-Mode bringt bei Ischämie – neben der damit verbundenen SEA0400-induzierten, pharmakokinetischen Protektion bei hohen zytosolischen Na^+ -Konzentrationen – die therapeutische Implikation mit sich, dass die bevorzugte NCX-Reverse-Mode Hemmung

einer diastolischen Ca^{2+} -Überladung vorgebeugt und somit der Ischämie-Reperfusionsschaden reduziert wird (Matsuda et al. 2001). Gegen eine selektiven Inhibition der NCX-Operations-Modi sprechen Studien von Kimura, Tanaka und Ozdemir mit KB-R7943 (Kimura et al. 1999) und SEA0400 (Tanaka et al. 2002; Ozdemir et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass SEA0400 den NCX1-Reverse-Mode nur geringfügig stärker inhibiert als den NCX1-Forward-Mode. Dieser Effekt kam etwas ausgeprägter in Maus- als in Schweine-Kardiomyozyten zum Tragen. Auch eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration führte nur zu einer geringfügigen Veränderung der Potenz des NCX1-Blocks und nach Applikation von Nifedepin, Ryanodin und Thapsigargin ergab die Messung der isolierten NCX1-abhängigen Ca^{2+} -In- und -Efflux-Raten keine spezifische Präferenz von SEA0400 für einen der beiden NCX1-Funktionsmodi. Unter physiologischen Bedingungen wurde sogar eine stärkere Inhibition des einwärtsrichtenden I_{NCX1} (Faktor 3) durch SEA0400 als für den auswärtsgerichteten I_{NCX1} (Faktor 2) berichtet. Diese Befunde sprechen gegen eine selektive Hemmung des NCX1-Reverse-Mode, insbesondere während der normalen Erregungs-Kontraktions-Kopplung (Ozdemir et al. 2008).

Gleichwohl schließt diese Erkenntnis einen reduzierten Ischämie-Reperfusionsschaden durch SEA0400 nicht aus. Der mit der hohen zytosolischen Na^+ -Konzentration assoziierte, verstärkte Ca^{2+} -Influx würde nach wie vor durch SEA0400 inhibiert werden. Gegebenenfalls liegt zudem, unter den speziellen pathologischen Bedingungen, auch eine spezifischere Inhibition des NCX1-Reverse-Mode vor. Des Weiteren könnte eine durch Ca^{2+} -Überladung induzierte Proarrhythmie (Nagy et al. 2004) immer noch durch die Inhibition des NCX1-Reverse-Mode reduziert werden. Die Inhibition des NCX1-Forward-Mode (Ozdemir et al. 2008) würde einen reduzierten Einwärtsstrom mit sich bringen und könnte daher ebenfalls einen antiarrhythmischen Effekt besitzen. Zusammenfassend ist somit nach bisherigem Kenntnisstand der Forschung keine endgültige Aussage über eine SEA0400-inhibitorische Präferenz für einen NCX1-Operationsmodus möglich.

1.5.3 SEA0400 – Wirkprofil

In Zellen des zentralen Nervensystem der Ratte beträgt die IC_{50} für die Na^+ -abhängige Ca^{2+} -Aufnahme 5 bis 33 nM (Matsuda et al. 2001), in kardialen Hunde-Membranvesikeln 90 nM und in Ratten-Kardiomyozyten 92 nM (Takahashi et al. 2003). Für den NCX1-generierten Einwärts- und -Auswärtsstrom wurden für Meerschweinchen-Kardiomyozy-

ten IC_{50} -Werte von 40 und 32 nM bestimmt (Tanaka et al. 2002), für Hunde-Kardiomyozyten 111 und 108 nM (Birinyi et al. 2005). In elektrophysiologischen Studien an Maus-, Meerschweinchen-, Hunde- und Schweine-Kardiomyozyten inhibierte 1 μ M SEA0400 den NCX1-Forward-Mode um 50-82,5% und den NCX1-Reverse-Mode um 60-86,5% (Tanaka et al. 2002; Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013).

Erste Studienergebnisse zeigten, dass SEA0400 ein spezifischer NCX-Inhibitor ist. Es konnte kein Effekt auf den Na^+/H^+ -Austauscher, die Na^+/K^+ -ATPase, die Ca^{2+} -ATPase und auf Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle (Matsuda et al. 2001) sowie deren transmembranöse Ionenströme festgestellt werden (Tanaka et al. 2002; Nagy et al. 2004). Auch Adenosin, Glutamat, Bradykinin-, Leukotrien-, muskarinerge Acetylcholin- und adrenerge Rezeptoren sowie verschiedene Enzyme wurden durch SEA0400 nicht beeinflusst (Matsuda et al. 2001). Zudem hatte SEA0400 keinen Einfluss auf RyR2, SERCA und die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (Birinyi et al. 2008). Jedoch stellten Experimente an embryonalen Herzsclhäuchen homozygoter NCX1-Knockout-Mäuse die Selektivität von SEA0400 für NCX1 in Frage. In völliger Abwesenheit von NCX1 durch einen kompletten homozygoten Knockout kam es zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Transienten. Da die verminderte Höhe der Ca^{2+} -Amplitude während einer Feldstimulation observiert wurde, schlussfolgerten die Autoren, dass SEA0400 einen in die Erregungsausbreitung involvierten Ionenkanal beeinflussen muss, wobei der spezifische Mechanismus in dieser Studie nicht weiterführend geklärt wurde (Reuter et al. 2002a). Tatsächlich konnte in einigen Folgestudien gezeigt werden, dass die Applikation von SEA0400 mit einer Reduktion von I_{Ca} einhergeht. In Hunde-Kardiomyozyten wurde I_{Ca} mit einer IC_{50} von 3,6 μ M inhibiert (Birinyi et al. 2005) und die Applikation von 1 μ M SEA0400 reduzierte I_{Ca} um 25-33% in Maus-, Hunde- und Schweine-Kardiomyozyten (Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013), nicht aber in weiteren Studien an Meerschweinchen- und Hunde-Kardiomyozyten (Tanaka et al. 2002; Nagy et al. 2004).

1.5.4 SEA0400 – Kalzitropie und Inotropie

Der Einfluss der dualen Inhibition von NCX1 und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch SEA0400 auf den systolischen Ca^{2+} -Transienten und die Inotropie wurde in mehreren Studien untersucht. 1 μ M SEA0400 erhöhte, durch den verminderte Ca^{2+} -Efflux, signifikant die diastolische Ca^{2+} -Konzentration (Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013). Die gleiche Konzentration hatte keinen Effekt auf die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten in isolierten Kardiomyozyten des Hundes (Nagy et al. 2004; Bourgonje et al. 2013), sowie auf das

inotrope Verhalten von Herzmuskelfasern des Meerschweinchens (Tanaka et al. 2007) und von Langendorff-perfundierten Kaninchen-Herzen (Farkas et al. 2008). Demgegenüber stellte sich in Langendorff-Experimenten an Ratten-Herzen eine positive Inotropie dar (Farkas et al. 2008) und die Applikation von 1 μM SEA0400 führte in Maus- und Schweine-Kardiomyozyten zu einer Zunahme der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und der Kontraktionskraft (Tanaka et al. 2005; Ozdemir et al. 2008). Bei, durch Koffeinstoß-Experimente quantifizierter, weiter bestehender NCX1-Inhibition konnte der Anstieg des Ca^{2+} -Transienten jedoch genauso wenig wie die erhöhte SR Ca^{2+} -Beladung in einem Mausmodell mit Herzinsuffizienz repliziert werden (Ozdemir et al. 2008). Die strukturellen und molekularen Alterationen dieses Herzinsuffizienz-Mausmodells gehen mit einer verminderten Aufnahmekapazität des SR und einem vermehrten SR Ca^{2+} -Leck in Folge erhöhter RyR2-Phosphorylierung einher, was die ausbleibende positive Kalzitropie erklärt (Antoons et al. 2006). Auch in einem Hundemodell mit chronischem atrioventrikulärem Block und erhaltener linksventrikulärer Funktion blieb ein Anstieg der Ca^{2+} -Amplitude aus. Die in diesem Modell vorliegende Herzmuskelhypertrophie ging, genau wie die Herzinsuffizienz, mit einem elektrischen Remodeling einher, welches den ausbleibenden Effekt erklären könnte (Bourgonje et al. 2013). Bourgonje et al. spekulierten außerdem, dass SEA0400 durch die NCX1-Inhibition und die folglich reduzierte Ca^{2+} -Extrusion, zusätzlich eine verstärkte Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle herbeiführt. Dieser Mechanismus würde die I_{Ca} -Inhibition und damit die negativ inotrope Teilkomponente von SEA0400 verstärken und könnte insbesondere bei hohen Herzfrequenzen einer zytosolischen Ca^{2+} -Überladung vorbeugen. Die Differenzierung in die negativ inotrope I_{Ca} -abhängige und die positiv inotrope NCX1-abhängige Komponente konnte durch eine schnellere Reversibilität des L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Blocks gezeigt werden (Ozdemir et al. 2008). Nach Erlöschen dieses Gegenpols kam es zu einem, durch die NCX1-Inhibition getragenen, Anstieg der Ca^{2+} -Amplitude (Bourgonje et al. 2013). SEA0400 scheint insbesondere in Mäusen und Ratten eine positive Inotropie und Erhöhung des systolischen Ca^{2+} -Transienten zu bewirken. Es wurde postuliert, dass SEA0400 den Anstieg des Ca^{2+} -Transienten insbesondere in Spezies mit kurzer AP-Dauer und hohen zytosolischen Na^+ -Konzentration vermitteln würde, da NCX1 unter diesen Bedingungen vor allem im Forward-Mode operiert (Tanaka et al. 2005; Tanaka et al. 2007; Farkas et al. 2008). Dieser würde unter dem Einfluss von SEA0400 inhibiert werden und somit zu einer vermehrten Ca^{2+} -Akkumulation führen. Dazu passt, dass der Anteil von NCX1 an der Ca^{2+} -Extrusion in Ratten und Mäusen deutlich geringer ist als in anderen Spezies (zur Übersicht siehe (Bers 2002)) und eine Inhibition somit stärker in

die Ca^{2+} -Homöostase eingreifen könnte. Die These, dass die in Mäusen erhöhte zytosolische Na^+ -Konzentration zu einer verstärkten Blockade des NCX1-Reverse-Mode mit vermindertem Ca^{2+} -Transienten führen würde, konnte nicht bestätigt werden (Ozdemir et al. 2008). Ozdemir et al. konnten keinen Spezies abhängigen Unterschied der SEA0400 Wirkung zwischen Mäusen und Schweinen beobachten.

Während Ca^{2+} -Antagonisten wegen ihrer negativen inotropen Effekte bei Herzinsuffizienz kontraindiziert sind, führte die Gabe von SEA0400 zu keiner Beeinträchtigung der Hämodynamik. In Hunden ließ eine Dosis von 0,4 bis 0,8 mg/kg SEA0400 den systolischen linksventrikulären Druck unbeeinflusst, wohingegen er durch 0,3 mg/kg Verapamil um 15 mmHg reduziert wurde. Beide Medikamente wiesen in der applizierten Dosis einen therapeutischen antiarrhythmischen Effekt auf (Bourgonje et al. 2013). Des Weiteren hatte 1 mg/kg SEA0400 keinen Einfluss auf Herzfrequenz, Blutdruck und EKG-Parameter, lediglich die QRS-Dauer wurde geringfügig um 2 ms verlängert (Nagasawa et al. 2005).

1.5.5 SEA0400 – Ischämie

In Studien zum Ischämie-Reperfusionsschaden konnte SEA0400 durch die NCX1-Inhibition einen protektiven Effekt entfalten. Die Applikation von 3 mg/kg SEA0400 reduzierte in Ratten das Infarktvolume nach zerebraler Ischämie genauso, wie einem Funktionsverlust nach renaler Ischämie entgegengewirkt werden konnte. Die korrespondierenden in-Vitro-Experimente zeigten eine verminderte Ca^{2+} -Überladung in Astrozyten und Tubuluszellen (Matsuda et al. 2001; Ogata et al. 2003). In Langendorff-perfundierten Kaninchen-Herzen verringerte 1 μM SEA0400 bei erhaltenem linksventrikulären Druck die Infarktgröße um 75% (Magee et al. 2003). Zudem verbesserte sich, wie in Ratten-Herzen, die postischämische kardiale Funktion (Takahashi et al. 2003). Echokardiographisch wurde ein verminderter Verlust der Ejektionsfraktion und eine geringere Zunahme des linksventrikulären-enddiastolischen Durchmessers und Volumens registriert (Yoshiyama et al. 2004).

1.5.6 SEA0400 – Arrhythmie

In einem Hundemodell wurde in vivo ein antiarrhythmischer Effekt von SEA0400 bei Ouabain-induzierten Arrhythmien beobachtet, wohingegen im selben Modell SEA0400 nicht vor Ischämie-induzierten Arrhythmien schützen konnte (Nagasawa et al. 2005). In-

Vitro konnte der antiarrhythmische Effekt bei Ouabain-induzierten Arrhythmie an isolierten Meerschweinchen-Papillarmuskeln reproduziert werden (Tanaka et al. 2007). Bei Ouabain handelt es sich um ein Digitalis-Glykosid, welches die zytosolische Na^+ -Konzentration erhöht und somit den NCX1-Reverse-Mode verstärkt und den Forward-Mode hemmt, wodurch die zelluläre Ca^{2+} -Beladung steigt. Die resultierende spontane Ca^{2+} -Aktivität und die positive Inotropie wurden dabei von SEA0400 reduziert, was eine NCX1-Abhängigkeit des Ouabain-Effekts nahelegt (Tanaka et al. 2007). Es ist denkbar, dass SEA0400 zum einen durch Inhibition des NCX1-Reverse-Mode die SR Ca^{2+} -Beladung und damit die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 vermindert und zum anderen die Übersetzung von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen in DADs durch den NCX1-Forward-Mode unterbindet. Tatsächlich wurde die DAD-Inzidenz und -Amplitude, genau wie die EAD-Amplitude, bei Anwendung von $1 \mu\text{M}$ SEA0400 in Dofetilid-induzierten Arrhythmien an Papillarmuskeln und Purkinjefasern von Hunden vermindert (Nagy et al. 2004). Dofetilid verlängert die AP-Dauer, was mit einem erweiterten Fenster für die EAD-Entstehung einhergeht. Dofetilid induzierte Arrhythmien konnten in Hunden des Weiteren durch SEA0400 und Verapamil unterdrückt werden. Es kam zu einer Abnahme der Repolarisationszeitvariabilität, sowie zu einer Reduktion der EADs und Torsade-de-Pointes-Tachykardien. SEA0400 bewirkte außerdem eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer (Bourgonje et al. 2013). Bereits in früheren Studien konnte dieser antiarrhythmische Effekt für Verapamil gezeigt werden (Oros et al. 2010), so dass Bourgonje et al. die Wirkung vor allem auf die L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Inhibition zurückführten. Die durch Verapamil verminderte Variabilität der Repolarisationszeit und der reduzierte I_{Ca} während der Plateauphase würden demnach die EAD-Häufigkeit verringern. Die beobachtete Verkürzung der AP-Dauer spiegelt jedoch vor allem die Inhibition des NCX1-Einwärtsstroms in der späten Plateauphase (Tanaka et al. 2005) wieder und könnte somit den protektiven Beitrag einer NCX1-Antagonisierung erklären. Diesem möglichen Mechanismus entsprechend unterdrückte SEA0400 in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ in Kaninchen-Kardiomyozyten EADs und zusätzlich auch spontane Ca^{2+} -Freisetzungen bei einem lediglich um 15% nicht signifikant reduzierten I_{Ca} (Zhao et al. 2012), was für eine Beteiligung von NCX1 an der Arrhythmie-Genese spricht. Genauso konnte $1 \mu\text{M}$ SEA0400 in Hundekardiomyozyten bei β -adrenerge Stimulation und Inhibition von I_{Ks} eine Verlängerung der AP-Dauer rückgängig machen, sowie die EAD-Frequenz vermindern (Johnson et al. 2010). In Langendorff-perfundierten, AV-Knoten ablatierten Kaninchen-Herzen reduzierte $1 \mu\text{M}$ SEA0400 ebenfalls die monophasische AP-Dauer und das Auftreten von EADs und Torsade-de-Pointes-Tachykardien unter Sotalol (Milberg et al. 2008), nicht

aber unter Dofetilid-Applikation (Farkas et al. 2009). Der womöglich maßgebliche Unterschied zwischen diesen beiden Studien war, dass Milberg et al. ein Protokoll mit zusätzlichen Stimulationen der Herzen durchführten, während die Herzen bei Farkas et al. ausschließlich mit ihrer intrinsischen Frequenz schlugen. Der protektive Effekt von SEA0400 bei durch Sotalol induzierten Arrhythmien konnte auch bei Tachykardie induzierter chronischer Herzinsuffizienz in Kaninchen reproduziert werden (Milberg et al. 2012). In Ratten supprimierte 1 mg/kg SEA0400 außerdem effektiv VTs und reduzierte die Gesamtmortalität in einem Ischämie-Reperusions-Modell. Zusätzlich wurde die Häufigkeit des Ca^{2+} -induzierten Zelltod vermindert (Takahashi et al. 2003). Keinen Effekt, weder in-Vivo noch in-Vitro, hatte SEA0400, im Gegensatz zu KB-R7943, bei Aconitin-induzierten Arrhythmien in Meerschweinchen. Möglicherweise kann das weniger spezifische KB-R7943 dem arrhythmischen Potential der Aconitin-vermittelten, verlängerten Aktivität der Na^{+} -Kanäle besser entgegenwirken (Amran et al. 2004). Zusammenfassend scheint die duale Inhibition von NCX und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch SEA0400 in der Mehrzahl der publizierten Studien an Tiermodellen einen protektiven Effekt gegenüber Herzrhythmusstörungen zu haben. Allerdings konnte dieser Effekt in einigen Studien nicht reproduziert werden, was möglicherweise auf Unterschiede bezüglich der Spezies, der Art des Modells, des Versuchsaufbaus und des Mechanismus der untersuchten Arrhythmien zurückzuführen sein könnte. Zeichen einer hämodynamischen Kompromittierung durch SEA0400 wurden nicht gezeigt. Ungeachtet dessen gibt es Befunde, welche auf unerwünschte Nebenwirkungen von SEA0400 hindeuten: in 2 von 8 Hunden löste SEA0400 in Kombination mit Digitalis – trotz antiarrhythmischer Protektion – einen Herzstillstand aus (Nagasawa et al. 2005) und nach Applikation von 1 μ M SEA0400 stieg die spontane Ca^{2+} -Aktivität in Maus-, nicht jedoch in Schweine-Kardiomyozyten an (Ozdemir et al. 2008).

2. Zielsetzung der Arbeit

SEA0400 hat sich in mehreren Studien an Tiermodellen als antiarrhythmisch erwiesen. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die genauen Bedingungen, unter denen SEA0400 einen potentiell antiarrhythmischen Effekt entfaltet zu evaluieren.

Bisher ist der Einfluss des NCX1-inhibitorischen SEA0400 bei isoliert veränderter NCX1-Aktivität unbekannt. Dies ist jedoch von unmittelbarer Bedeutung, da bei der Herzinsuffizienz, die zu Proarrhythmien prädisponiert, und bei der häufigsten Herzrhythmusstörung, dem Vorhofflimmern, eine erhöhte NCX1-Expression vorliegt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten OE- und KO-Mausmodelle zeigen eine chronisch adaptierte Ca^{2+} -Dynamik ohne Anhalt für eine Herzinsuffizienz. Es sollen insbesondere folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat SEA 0400 auf die NCX1-Aktivität in Gegenwart erhöhter oder erniedrigter NCX1-Expression?

In zahlreichen Studien wurde der NCX1-inhibitorische Effekt von SEA0400 nachgewiesen (Tanaka et al. 2002; Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013). Bisher ist unklar, ob die im OE und KO veränderte Ca^{2+} -Dynamik eventuell einen Einfluss auf die NCX1-inhibitorische Potenz von SEA0400 hat.

2. Welchen Einfluss hat SEA0400 auf die SR Ca^{2+} -Beladung in Gegenwart erhöhter oder erniedrigter NCX1-Expression?

Die Ca^{2+} -Beladung des SR ist ein wichtiger Faktor in der Regulation der Inotropie und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen. Es ist denkbar, dass der Einfluss von SEA0400 auf die SR Ca^{2+} -Beladung durch das NCX1-Expressionsniveau beeinflusst wird. Bei der erhöhten Anzahl von NCX1-Molekülen im OE könnte die Wirkung von SEA0400 weniger ins Gewicht fallen, während vice versa im KO eine akute NCX1-Inhibition eine Ca^{2+} -Überladung bedingen könnte. Auch eine weniger stark ausgeprägte oder fehlende SR Ca^{2+} -Beladung durch Inhibition des NCX1-Reverse-Mode ist nicht ausgeschlossen.

3. Welchen Einfluss hat SEA0400 auf die Kalzitropie als Maß für die Inotropie in Gegenwart erhöhter oder erniedrigter NCX1-Expression?

Die Kalzitropie ist von einer Reihe von Faktoren abhängig: SR Ca^{2+} -Beladung, diastolische Ca^{2+} -Konzentration und Höhe der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung spielen eine bedeutende Rolle und können jeweils von NCX1 moduliert werden. Auch die veränderte Ca^{2+} -Dynamik im OE und KO könnte einen Einfluss auf die Erregungs-Kontraktions-Kopplung haben. Es stellt sich somit die Frage, ob die SEA0400-vermittelte NCX1-Inhibition die Inotropie beeinflusst, und wenn ja, inwieweit dieser Effekt vom NCX1-Expressionsniveau abhängig ist.

4. Welchen Einfluss hat SEA0400 auf das Arrhythmie-Verhalten in Gegenwart erhöhter oder erniedrigter NCX1-Expression?

Während der OE durch einen proarrhythmischen Phänotyp gekennzeichnet ist (Pott et al. 2012), ist der KO auf zellulärer Ebene vor Nachdepolarisationen geschützt (Bögeholz et al. 2015). Es scheint möglich, dass die akute NCX1-Inhibition in der NCX1-vermittelten Arrhythmie-Genese interveniert und protektiv wirkt. Andererseits könnte insbesondere im KO eine Ca^{2+} -Überladung resultieren, die ein proarrhythmisches Verhalten begünstigt.

3. Material und Methoden

3.1 Das NCX1-Überexpressor- und das NCX1-Knockout-Mausmodell

Transgene NCX1-Überexpressor-Mäuse und -Knockout-Mäuse wurden durch die Arbeitsgruppe um K.D. Philipson (Cardiovascular Research Laboratories; David Geffen School of Medicine; University of California; Los Angeles; USA) zur Zucht zur Verfügung gestellt.

Das transgene Konstrukt der Überexpressor-Mäuse besteht aus einer vom kardialen NCX1 des Hundes klonierten Gensequenz (3,2 Kilobasenpaare (kb)) (Nicoll et al. 1990), einem α -Myosin Heavy Chain Promotor (MHC-Promotor) (5,5 kb) und dem transkriptionellem Terminator SV40 (1 kb), der durch Polyadenylierung zum Transkriptionsstopp führt. Per Mikroinjektion wurde das Konstrukt in die Keimzellen von C57B1/6xC3HF1-Mäusen eingebracht (Adachi-Akahane et al. 1997). Durch Züchtung von heterozygoten Überexpressor-Mäusen wurde das in dieser Arbeit verwendete homozygote OE-Mausmodell erzeugt (Reuter et al. 2004; Roos et al. 2007). Das homozygote OE-Mausmodell zeigt bei 3-fach erhöhter NCX1-Aktivität (Reuter et al. 2004; Roos et al. 2007) bis zu einem Lebensalter von 12,5 Wochen keine Zeichen pathologischer Auffälligkeiten oder einer Herzinsuffizienz (Pott et al. 2012).

Das NCX1-Knockout(KO)-Mausmodell wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe um K.D. Philipson erstellt. Mit Hilfe des cre/loxP Rekombination-Systems wurde das Exon 2 sowie die PGKneo Kasette des NCX1-Gen entfernt. Der Erfolg der Exzision wurde mittels Southern Blot und PCR bestätigt. Die heterozygoten NCX1-Stammzellen wurden in C57BL/6-Blastozysten eingebracht und anschließend in Black Swiss Mäusen gezüchtet (Reuter et al. 2002b). Das KO-Mausmodell hat eine 50%ige NCX1-Expression und zeigt ebenfalls keine Zeichen einer Herzinsuffizienz (Jordan et al. 2010).

Die Unterhaltung der OE-und KO- Zuchten wurde in den Räumlichkeiten des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Münster durchgeführt. In der homozygoten OE-Zucht wurden jeweils Tiere des gleichen Genotyps miteinander verpaart. Die Validierung des Genotyps erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion durch Medizinisch-technische Laborassistenten des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, wobei aufgrund der homozygoten Verpaarung nicht jedes Tier genotypisiert wurde. In der heterozygoten KO-Zucht wurden sowohl Tiere des gleichen als auch von unterschiedlichen Genotypen miteinander verpaart. Die Genotypisierung erfolgte ebenso wie bei den OE-Mäusen durch eine Gewebeprobe (Schwanzspitze) mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion. Ab einem Alter von 4 Wochen wurden die Jungtiere beider

Zuchten Geschlechter getrennt zu 3-4 Tieren in separaten Käfigen gehalten. Zur eindeutigen Identifikation wurde jeder Maus anhand von Ohrmarkierungen, des Geschlechts, der Fellfarbe und des Geburtsdatums eine eindeutige Geburtennummer zugeordnet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Experimente verwendeten Versuchstiere hatten ein Alter von 8 bis 12,5 Wochen. Die Methodik der Zuchtunterhaltung und Genotypisierung wurde bereits in der Vergangenheit unter anderem von unserer Arbeitsgruppe in dieser oder ähnlicher Form verwendet bzw. beschrieben (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015, Bögeholz 2015).

3.2 Isolation ventrikulärer Herzmuskelzellen

Die enzymatische Isolation Ca^{2+} -toleranter muriner ventrikulärer Herzmuskelzellen erfolgte in modifizierter Form nach Mitra und Morad (Mitra and Morad 1985) und wird im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Euthanasie der Versuchstiere

Die Euthanasie erfolgte mittels inhalativer Kohlenstoffdioxid-Narkose. Auf einen vorausgehenden Einsatz von Sedativa wurde verzichtet, da eine Reduktion des Stresslevels der Versuchstiere durch diese Substanzen nicht gezeigt werden konnte (zur Übersicht siehe (Conlee et al. 2005)). Das Versuchstier wurde in einen zuvor gesäuberten, luftdichtverschließbaren Plexiglas-Käfig mit konnektierter Kohlenstoffdioxid(CO_2)-Einleitung gesetzt. Der Einfluss der CO_2 -Flussrate auf das Stresslevel von Versuchstieren ist nicht abschließend geklärt (zur Übersicht siehe (Conlee et al. 2005)). Wir konnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Reduktion von Lokomotorik, Defäkation und Miktion bei langsamer CO_2 -Zufuhr (0,1 mbar) beobachten. Nach terminaler Schnappatmung und Miktion kam es zum Tod des Versuchstieres.

3.2.2 Herzexplantation und -präparation

Das euthanasierte Versuchstier wurde am Präparationsarbeitsplatz in Rückenlage mit Leukosilk®-Klebestreifen (BSN Medical GmbH) fixiert und das thorakoabdominale Fell mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Beginnend mit einer Schnittinzision kaudal des Sternums wurde das thorakale Fell entfernt. Anschließend erfolgte durch eine Inzision direkt

unterhalb des Proc. xiphoideus die Eröffnung des Situs. Nach einer subcostalen Schnittführung von medial nach lateral wurde das Diaphragma zertrennt, der ventrale knöcherne Thorax beidseits lateral weiter eröffnet und nach kranial aufgeklappt. Unter Sicht auf das Mediastinum und die lateral anliegenden Pleurahöhlen wurde das Herz freigelegt und mit Hilfe einer Kniepinzette (World Precision Instruments) kranial seiner Basis am oberen Gefäßpol gegriffen und aus dem Mediastinum nach ventral mobilisiert. Die Gefäße wurden 2-3 mm distal der Aortenklappen abgesetzt und das Herz in eine Petrischale mit Perfusionspuffer (Tab. 1) überführt, um das kavitätäre Blut durch leichtes Schwenken soweit wie möglich auszuwaschen. (Abb. 4)

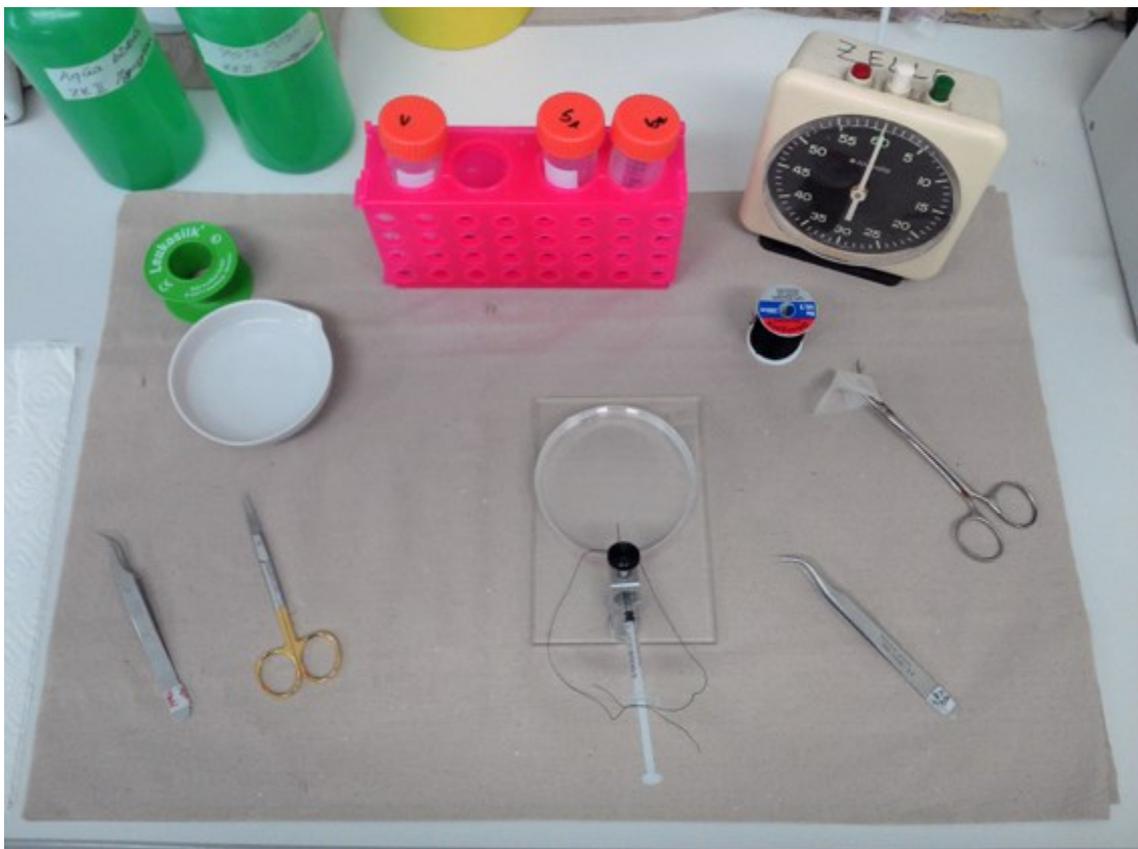


Abb. 4: Arbeitsplatz Herzexplantation

3.2.3 Herzperfusion und Isolation ventrikulärer Herzmuskelzellen

In einer weiteren mit Perfusionspuffer gefüllten Petrischale wurde die Aorta mit Hilfe von zwei Kniepinzetten gegriffen. Ohne die Taschenklappen der Aorta zu perforieren wurde diese auf eine Kanüle (21 Gauge) gezogen, die auf einer 1 ml Spritze (B Braun) aufsaß und 0,9 ml Perfusionspuffer sowie 0,1 ml Heparin (500 IE; Ratiopharm®) enthält. Die Befestigung der Aorta erfolgte mit einem Seidenfaden in einer sich 1 mm oberhalb des

Kanülen-Endes befindlichen Nut. Bei korrekter Platzierung der Kanüle distal der Aortenklappe führte das langsame Anspritzen von 0,3-0,5 ml, genauso wie die folgende Perfusion, durch den retrograden Fluss zum Verschluss der aortalen Taschenklappen und zum Strom des heparinisierten Perfusionspuffers durch die Koronargefäße, die daraufhin abblassten. Kanüle und Herz wurden anschließend von der Spritze diskonnektiert und an einen Langendorff-Perfusor angebracht, der mit einem auf 37,1°C eingestellten Wärmebad (Haake Fisons DC3) verbunden war, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten (Abb. 5). Das Herz wurde für 1 min mit heparinisierten (14,3 IE/ml) Perfusionspuffer perfundiert, um weiteres kavitäres und koronares Blut auszuwaschen. Anschließend wurde das Herz für 5:50-6:10 min mit einer Verdauung (Tab. 2) mit „Collagenase type 2 / 240 U/mg“ (Worthington Biochemical Corp.) und „Protease from streptomyces griseus type XIV / 7,3 U/mg“ (Sigma-Aldrich Co.) perfundiert, um die extrazelluläre Matrix abzubauen und die Herzmuskelzellen aus ihrem Verband zu lösen. Die Perfusion und der Verdauungsprozess wurden durch vorsichtige Massage des Myokards mit einer Kniepinzette von Herzbasis Richtung Herzspitze unterstützt. Der Langendorff-Perfusor wurde mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min betrieben (Ismatec®), um schwankende Flussvolumina, zu vermeiden.

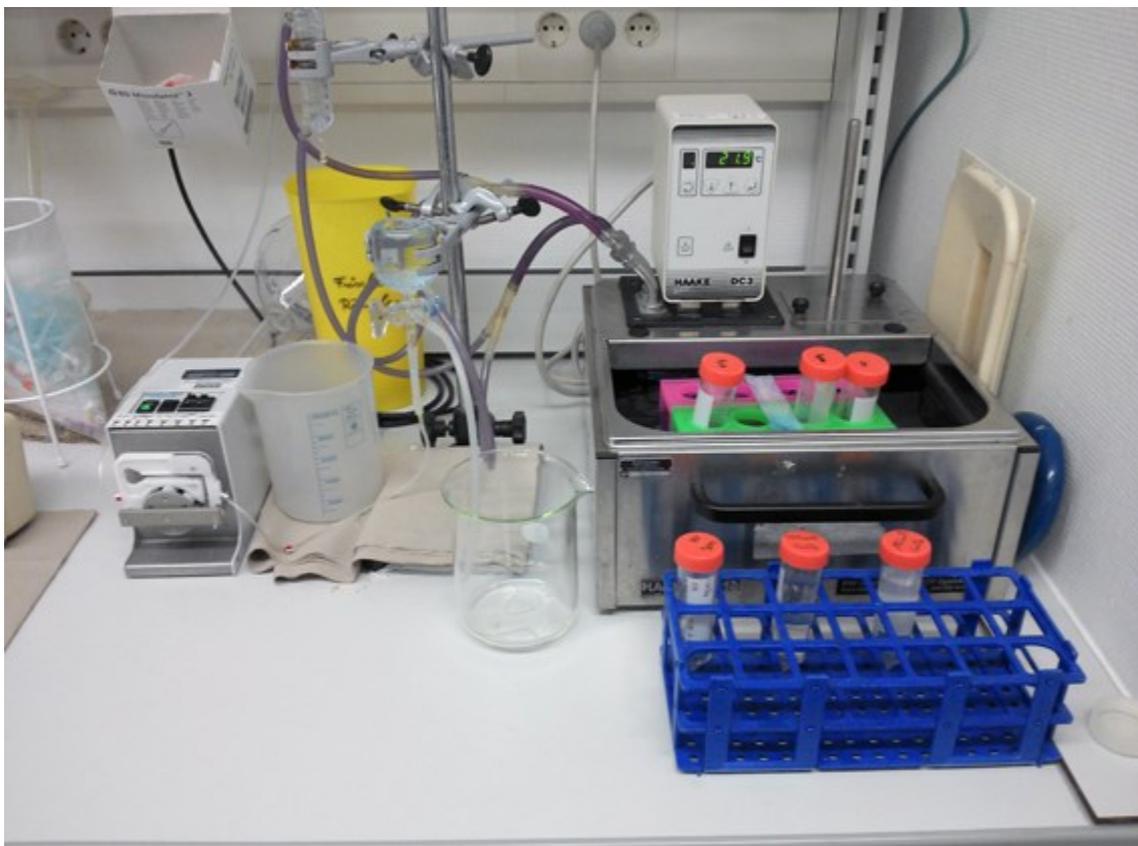


Abb. 5: Langendorff-Perfusor

Die Kanüle wurde anschließend samt Herz vom Langendorff-Perfusor diskonnektiert. Im Sinne einer Oberflächenvergrößerung wurde das Herz von der Spitze her mit mehreren Inzisionen Richtung Herzbasis eröffnet, die Vorhöfe auf Höhe der Klappenebene abgesetzt und das ventrikuläre Gewebe anschließend in eine Petrischale mit Perfusionspuffer und Serum des Neugeborenen Kalbs überführt (Stopp-I-Lösung) (Tab. 3). Das gesteigerte Angebot an Proteinen aus dem Serum des Neugeborenen Kalbs reduziert durch eine kompetitive Inhibition die proteolytischen Aktivität der im Herzgewebe verbliebenen Verdauung und präserviert somit die gewonnenen vitalen Herzmuskelzellen. Das Epikard wurde mit einer Kniepinzette vorsichtig mechanisch disseziert und das ventrikuläre Gewebe in der Stopp-I-Lösung geschwenkt, um einzelne Herzmuskelzellen aus dem Synzytium der Herzmuskulatur zu lösen. Die Zellsuspension wurde durch einen Nylonfilter in ein 50 ml Falcon überführt. Zur Reduktion des mechanischen Stresses auf die Herzmuskelzellen wurde die natürliche Sedimentation der Zentrifugation vorgezogen. Nach 15 min wurden 2,5 ml des Überstandes abgenommen und 7,5 ml der Stopp-II-Lösung (Tab. 4) hinzugefügt.

Perfusionspuffer	
Reagenz	Endkonzentration in mM
Natriumchlorid (NaCl)	113
Kaliumchlorid (KCl)	4,7
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,6
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) x 2 H ₂ O	0,6
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1,2
Natrium-Bikarbonat (NaHCO ₃)	12
Kalium-Bikarbonat (KHCO ₃)	10
Taurin	30
HEPES	10
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11,1
Auf 245 ml Aqua bidest + 5 ml 500 mM 2,3-Butanedione monoxime (BDM)	
pH = 7,43	

Tab. 1: Perfusionspuffer

Verdauulösung	
Reagenz	Menge
Perfusionspuffer	25 ml
Kalziumdichlorid (CaCl ₂)	31,2 µl
Collagenase type 2 / 240 U/mg*	19,8 µg
Protease from streptomyces griseus type XIV / 5,2 U/mg*	1,8 µg
Collagenase type 2 / 190 U/mg**	26 µg
Protease from streptomyces griseus type XIV / 7,3 U/mg**	1,2 µg
*bis 12/2012 **seit 12/2012	

Tab. 2: Verdauulösung

Stopp-I-Lösung	
Reagenz	Menge
Perfusionspuffer	9 ml
Serum des neugeborenen Kalbs	1 ml
Kalziumdichlorid (CaCl ₂) 10mM	12,5 µl

Tab. 3: Stopp-I-Lösung

Stopp-II-Lösung	
Reagenz	Menge
Perfusionspuffer	28,5 ml
Serum des neugeborenen Kalbs	1,5 ml
Kalziumdichlorid (CaCl ₂) 10mM	37,5 µl

Tab. 4: Stopp-II-Lösung

3.2.4 Schrittweise Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration

Für die folgenden Untersuchungen der isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen war es essentiell, deren Kontraktilität durch Anheben des extrazellulären Ca²⁺ auf ein physiologisches Level wiederherzustellen. Um dies schonend zu erreichen und hyperkontraktili-

tät oder irreguläre Kontraktionen zu vermeiden, wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach folgendem Protokoll schrittweise angehoben (Tab. 5). Die zeitweilige Lagerung der Zellen bis zum unmittelbar folgenden Beginn der Ca^{2+} -Epifluoreszenz-Messungen erfolgte in Lagerlösung (Tab. 6).

Zeit in min	Menge in μl	$[\text{CaCl}_2]$ in mM	Endkonzentration in μM
0	50	10	62
3	50	10	112
6	100	10	209
9	30	100	501
12	50	100	985

Tab. 5: Schrittweise Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration

Lagerlösung	
Reagenz	Endkonzentration in mM
Natriumchlorid (NaCl)	52,5
Kaliumchlorid (KCl)	4,8
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,2
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	1,2
Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	11,1
Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	145
Kalziumdichlorid (CaCl_2)	0,2
HEPES	10

Tab. 6: Lagerlösung

Die Methodik der Euthanasie, der Herzexplantation, der Zellisolation und Asservierung der Zellen inklusive der verwendeten Lösungen wurde bereits in der Vergangenheit unter anderem von unserer Arbeitsgruppe in dieser oder ähnlicher Form verwendet bzw. beschrieben (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015, Bögeholz 2015).

3.3 Planimetrische Vermessung der Zellgröße

Zur Evaluation einer möglichen zellulären Hypertrophie wurden isolierte ventrikuläre Myozyten zur zweidimensionalen, planimetrischen Vermessung in eine Zellkammer überführt. Mit Hilfe einer an einem Nikon eclipse TI-RCP Mikroskop konnektierten CoolSNAP HQ2 CCD Kamera (Photometrics) wurden hochauflösende Aufnahmen (1394 x 1040 Pixel) angefertigt, die anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware NIS-Elements AR v. 4.10 (Nikon GmbH) vermessen wurden. Dabei wurde die Zellfläche (μm^2) in Relation zur Pixelgröße bestimmt. Die planimetrische Vermessung der Zellgröße im Rahmen einer Hypertrophie-Bestimmung ist ein etabliertes Verfahren (Neef et al. 2010).

3.4 Kalzium-Imaging

3.4.1 Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenz-Farbstoffe

Für die Ca^{2+} -Epifluoreszenz-Messung wurden die Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffe Fluo-4 Acetoxymethyl (Fluo-4 AM; Invitrogen™; Life Technologies) (Tab. 7) und Indo-1 Acetoxymethyl (Indo-1 AM; Invitrogen; Life Technologies) (Tab. 8) eingesetzt. Fluo-4 AM und Indo-1 AM sind Ca^{2+} -Chelatoren, die in ihrer Ca^{2+} -gebundenen Form als Fluoreszenz-Marker fungieren. Die Veresterung mit der Acetoxymethyl-Gruppe erhöht die Lipophilie des Moleküls, sodass es durch die Zellmembran in das kardiomyozytäre Zytosol permeieren kann. Die Lipophilie wird weiter durch das nicht-ionisierende Pluronic® F-127 (Invitrogen; Life Technologies) (Tab. 9) gesteigert. Im Zytosol wird die Acetoxymethyl-Gruppe durch unspezifische Esterasen hydrolysiert, dabei geht das Molekül in einen geladenen Zustand über und verliert seine Lipophilie, wodurch die Fluoreszenz-Farbstoffe wesentlich langsamer durch Membranen permeieren können und im Zytosol verbleiben (Invitrogen™, Life Technologies 2010).

Fluo-4 AM	
Reagenz	Menge
Fluo-4 AM (Invitrogen, Life Technologies)	50 μg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	45,6 μl
Lagerung bei -20°C	

Tab. 7: Fluo-4 AM

Indo-1 AM	
Reagenz	Menge
Indo-1 AM (Invitrogen, Life Technologies)	1 mg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	990 µl
Lagerung bei -20°C	

Tab. 8: Indo-1 AM

Pluronic®-Lösung	
Reagenz	Menge
Pluronic® F-127 (Invitrogen; Life Technologies)	50 mg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	200 µl

Tab. 9: Pluronic®-Lösung

Fluo-4 AM weist im Gegensatz zu Fluo-3 AM anstelle von zwei Chlor- zwei Fluoratome auf, wodurch die spezifische Fluoreszenz-Emission bei 522 nm durch Exzitation von 488 nm doppelt so hoch ist. Bei Applikation geringerer Konzentrationen von Fluo-4 AM kann eine ebenso hohe Fluoreszenz-Intensität wie unter Fluo-3 AM erzielt werden, wodurch es zu einer Reduktion der toxischen Nebenprodukte Formaldehyd und Essigsäure kommt. Durch Verwendung von 488 nm und nicht der für Fluo-4 AM spezifischen Exzitationswellenlänge von 494 nm wird sowohl die Phototoxizität, als auch das Photobleaching vermindert (Gee et al. 2000). Fluo-4 AM ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff, der im Gegensatz zu ratiometrischen Farbstoffen wie Indo-1 AM keine direkte Aussage zur absoluten Ca^{2+} -Konzentration zulässt. Durch die hohe spezifische Fluoreszenz-Emission und den besseren Kontrastumfang von Fluo-4 AM eignet es sich vor allem für qualitative Aussagen und kann für relative Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration eingesetzt werden, die als F/F_0 (Quotient aus der systolischen und diastolischen Fluoreszenz-Emission) angegeben werden. So können, eine unveränderte Zellgröße und fehlender Anhalt für eine Hypertrophie vorausgesetzt, Datensätze von verschiedenen Zellen auch hinsichtlich der relativen Kalziumkonzentration miteinander verglichen werden.

Die Verwendung von Zweikanalfarbstoffen wie Indo-1 AM lässt auch direkte Vergleiche der Ca^{2+} -Konzentration zwischen verschiedenen Zellen zu. Indo-1 AM wird üblicherweise mit Wellenlängen um 340 nm angeregt. Die Emissions-Maxima liegen je nach

Publikation bei ca. 405 nm für die Ca²⁺-gebundene und 475 nm für die Ca²⁺-ungebundene Form. Konsekutiv erhöht sich bei elevierter zytosolischer Ca²⁺-Konzentration die Emission bei 405 nm und verringert sich bei 475 nm (Bootman et al. 2013). Der Quotient

$$\text{Indo-1 Ratio} = \frac{\text{Ca}^{2+}\text{-gebundene Indo-1 Emission (405 nm)}}{\text{Ca}^{2+}\text{-ungebundene Indo-1 Emission (475 nm)}}$$

stellt ein direktes Maß für die Ca²⁺-Konzentration dar. Ratiometrische Farbstoffe werden durch Bildung des Quotienten nicht durch mögliche Beladungsunterschiede oder Unterschiede in der Zellgröße beeinflusst, weisen jedoch einen geringeren Kontrastumfang auf (Bootman et al. 2013).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Exzitationswellenlänge von 365 nm, die weniger zytotoxisch erschien, und Emissionswellenlängen von 405 und 495 nm verwendet.

3.4.2 Ca²⁺-Epifluoreszenz-Messung

Die mit Fluo-4 AM (Tab. 10) bzw. Indo-1 AM Lösungsansatz (Tab. 11) inkubierten Kardiomyozyten wurden in eine Messkammer überführt, an deren Seiten je eine Anode und eine Kathode eingebracht sind (Abb. 6).

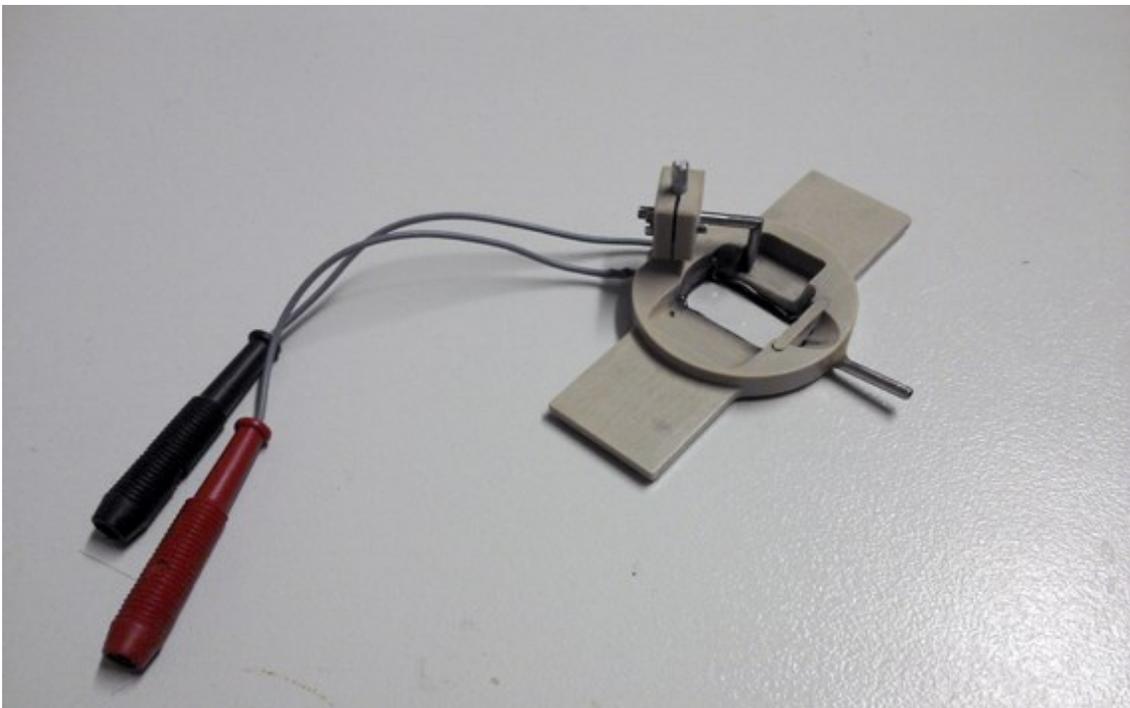


Abb. 6: Messkammer

Bei der Auswahl der Zellen für die verschiedenen Messungen wurde darauf geachtet, dass eine intakte Struktur (Querstreifung, rechteckige Form) und Funktion (gleichmäßige, geordnete Kontraktion) vorlag. Messungen einer Experimentenreihe wurden in einem möglichst kurzen Zeitfenster fertiggestellt, um die Wirkung nicht beeinflussbarer Variablen wie z.B. Temperaturschwankungen zu minimieren, wobei die Raumtemperatur jeweils $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ betrug. Zudem erfolgten die Experimente der Mausmodelle und ihrer korrespondierenden Wildtypen stets alternierend.

Fluo-4 AM Lösungsansatz	
Reagenz	Menge
Lagerlösung	500 μl
Pluronic	10 μl
Fluo-4 AM	2 μl
50 μl Zellsuspension + 50 μl Fluo-4 AM Lösungsansatz für 10 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubieren	

Tab. 10: Fluo-4 AM Lösungsansatz

Indo-1 AM Lösungsansatz	
Reagenz	Menge
Lagerlösung	250 μl
Pluronic	10 μl
Indo-1 AM	12,5 μl
50 μl Zellsuspension + 12,5 μl Indo-1 AM Lösungsansatz für 10 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubieren	

Tab. 11: Indo-1 AM Lösungsansatz

Durch einen Stimulator (Stimulator CS Type 223; Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus) wurden unter Kontrolle der Computer-Software Clampex (Vers. 8.2.0.232; Axon Instruments) biphasische Feldstimuli appliziert (47,8 mV; je 5 ms pro Polarität und 5 μs zwischen den Polaritäten), die zu einer Depolarisation und Kontraktion der Kardiomyozyten-Zellmembran führten. Die Messkammer war über einen Polyethylen-Schlauch und eingebrachter Flusskontrolle (PHTM) mit einer langsamen Perfusion – bestehend aus

einer 50 ml Perfusor-Spritze (B Braun), die auf einer Hahnbank (Discofix; B Braun) angebracht war - verbunden. Neben dem Hauptkompartiment der Messkammer mit Elektroden und Zulauf der langsamen Perfusion befand sich, durch eine Kunststoff-Lamina abgegrenzt, ein Nebenkompartment. Nach Überschreiten des maximalen Füllungsvolumens der Hauptkammer von 1 ml floss die Flüssigkeit in die Nebenkammer und wurde durch eine Pumpe (P-1; Pharmacia Biotech) abgesaugt. Nach einer zweiminütigen Sedimentationsphase der in der Messkammer eingebrachten Zellsuspension, wurde die mit Tyrode (Extrazelluläre Messlösung) (Tab. 12) befüllte langsame Perfusion eingeschaltet (1,5 ml/min). Die am Kammerboden liegenden Kardiomyozyten wurden umspült, um die extrazelluläre Farbstoffhaltige Lösung auszuwaschen (5 min). Anschließend wurde die Feldstimulation eingeschaltet.

Tyrode	
Reagenz	Endkonzentration in mM
Natriumchlorid (NaCl)	140
Kaliumchlorid (KCl)	5,8
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,5
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) x 2 H ₂ O	0,4
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,9
HEPES	10
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11,1
Kalziumdichlorid (CaCl ₂)	2
pH 7,3	

Tab. 12: Tyrode

Zwischen dem Deckglas der Messkammer und dem Objektiv wurde Immersionsöl (Immersionol™; 518 F; Zeiss) aufgetragen, um die Lichtrefraktion zu minimieren und einen optimalen Strahlengang zu gewährleisten. Änderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurden wie im Vorangehenden beschrieben durch die Ca²⁺-sensitiven Farbstoffe Fluo-4 AM bzw. Indo-1 AM registriert. Beide wurden jeweils durch das Licht einer Xenon Kurzbogenlampe (Ushio Inc.) angeregt. Zur spektralen Isolierung der spezifischen Exzitationswellenlänge von Fluo-4 AM (488 nm) und Indo-1 AM (365 nm) wurde ein vorge-schalteter Monochromator (S/N 1962; Photon Technology International) entsprechend

konfiguriert. Ein dichroitischer Spiegel koppelte das anregende Licht in den Strahlengang des Objektivs ein und leitete es von unten zur Messkammer, wodurch in den mit dem jeweiligen Farbstoff beladenen Kardiomyozyten Fluoreszenz-Licht hervorgerufen wurde. Der davon im Objektiv gesammelte Anteil wurde erneut zum dichroitischen Spiegel geleitet, der das jetzt längerwellige Fluoreszenz-Licht nicht reflektierte, sondern durchließ. Eine eingebrachte ladungsträgergekoppelte Kamera (CCD) (TK-C1380; JVC) übertrug den zentrierten Bildausschnitt auf einen externen Monitor (PVM-97; Sony).

Bei Verwendung von Fluo-4 AM amplifizierte ein einzelnes Photomultiplikations-Detektions-System (Photon Technology International) die Fluoreszenz-Emission bei 522 nm. Indo-1 AM erforderte den Einsatz eines weiteren dichroitischen Spiegels, der die beiden Emissionswellenlängen von 405 und 495 nm separierte und anschließend, getrennt von jeweils einem Photomultiplikations-Detektions-System, weiter prozessierte. Das Signal wurde durch einen Analog-Digital-Wandler (Computer Interface, Photon Technology International) digitalisiert und in die PC-Software Felix (Version 1.42b; Photon Technology International) eingespeist, mit der auch die Auswertung der Ca^{2+} -Epifluoreszenz-Messung erfolgte (Abb. 7).

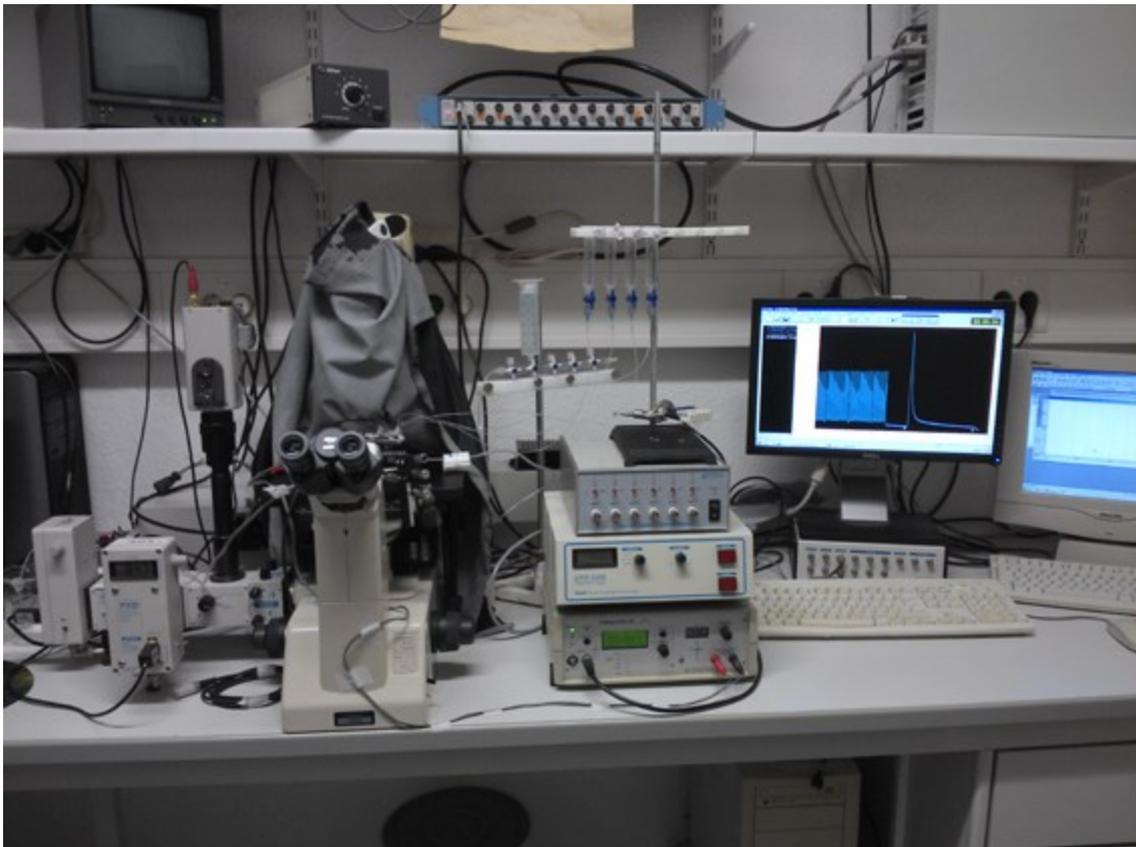


Abb. 7: Arbeitsplatz Ca^{2+} -Epifluoreszenz

3.4.3 Schnelle Perfusion und Pharmaka-Applikation

Um die Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten Pharmaka auf isolierte Kardiomyozyten zu evaluieren, bedurfte es einer raschen und zeitlich exakt abgestimmten Applikation. Einem Mikromanipulator (Narishige Japan), der in allen drei Raumebenen beweglich ist, wurde eine 3-läufige Glaskapillare (Warner Instruments) aufgesetzt. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde selbige exakt positioniert, um einen schnellen laminaren Strom um die Zelle zu erzeugen. Die Glaskapillare war mittels Polyethylenschlauch an einem Verteiler konnektiert (Perfusion Manifold, Warner Instruments), der Zulauf aus bis zu 6 Spritzen (BD) erhält, die auf einem höhenjustierbaren Spritzenhalter (Warner Instruments) installiert wurden. Die Spritzen wurden manuell durch ein Ventil (Discofix®; B Braun) geöffnet. Der durch die Schwerkraft angetriebene Fluss ermöglicht eine Applikation mit einer Latenz von 2-3s (Abb. 8), wobei darauf zu achten galt, die schnelle Perfusion in unmittelbarer Nähe der Zelle zu positionieren, um eine laminare Strömung mit möglichst hoher Strömungsgeschwindigkeit zu erzeugen.

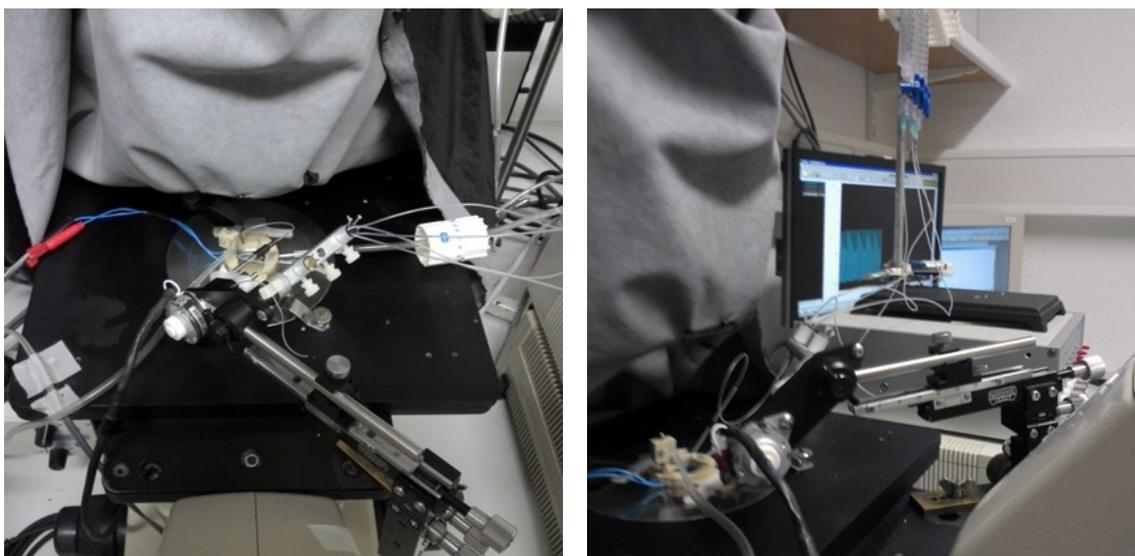


Abb. 8: Mikromanipulator mit schneller Perfusion

Die schnelle Perfusion wurde zur Applikation von SEA0400 (Tab. 13), sowie für Koffeinstoß-Experimente verwendet. Für SEA0400 wurden Konzentrationen von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ bis 3 $\mu\text{mol/l}$ gewählt, die sich in initialen Dosisfindungsversuchen als geeignet erwiesen hatten. Auch andere Arbeitsgruppen verwendeten in zellphysiologischen Studien mit SEA0400 ebenfalls Konzentrationen in diesem Bereich (Magee et al. 2003; Nagy et al. 2004; Tanaka et al. 2005; Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Milberg et al. 2008; Farkas et al. 2009; Johnson et al. 2010; Milberg et al. 2012; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013).

1mM SEA0400-Lösungsansatz	
Reagenz	Menge
SEA0400 (C ₂₁ H ₁₉ F ₂ NO ₃)	3,71 mg
Tyrode	10 ml
1mM SEA040- Lösungsansatz + Tyrode	
Endkonzentration	Verdünnung
3 µM SEA0400-Lösung	3:1000
1 µM SEA0400-Lösung	1:1000
0,3 µM SEA0400-Lösung	3:10.000

Tab. 13: SEA0400-Lösungsansatz

Die in diesem Abschnitt (Kapitel 3.4, Seite 33) beschriebene Methodik inklusive der verwendeten Lösungen wurde bereits in der Vergangenheit unter anderem von unserer Arbeitsgruppe in dieser oder ähnlicher Form verwendet bzw. beschrieben (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015, Bögeholz 2015).

3.5 Statistische Analyse

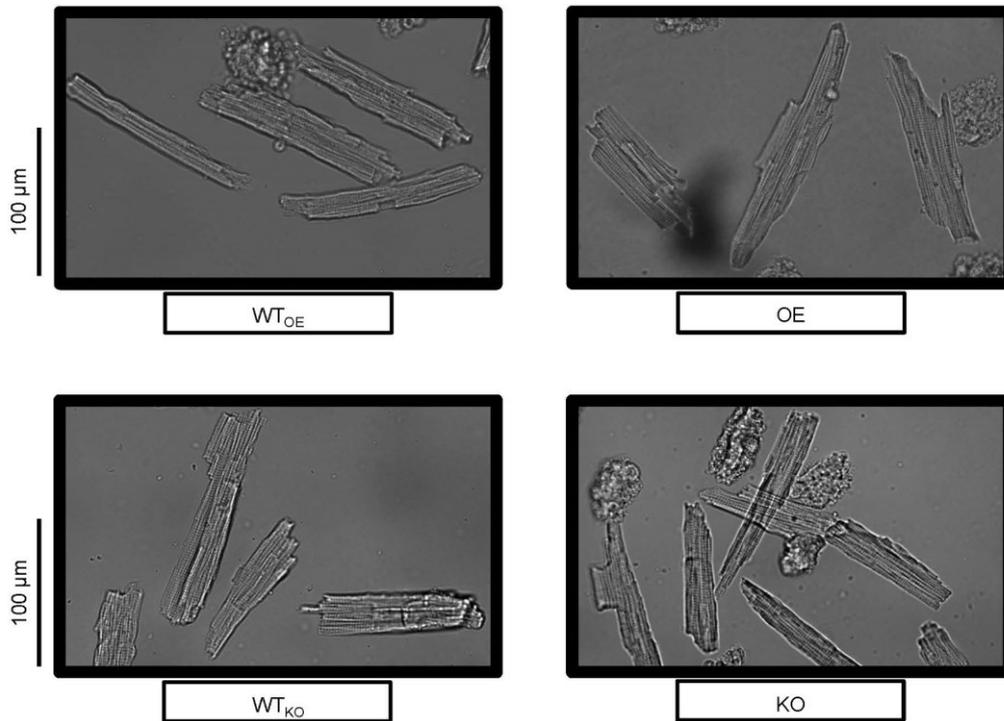
Für die statische Auswertung wurden der Student's t-Test und der Fisher-Test verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Vermessung der Zellgröße

Die planimetrische Vermessung der Zellgröße ergab keine Unterschiede zwischen OE und WT_{OE} (Zellgröße in μm^2 ; WT_{OE}: 2872 ± 92 , n=100; OE: 2866 ± 89 , n=100; p=0,9608 WT_{OE} v. OE) sowie zwischen KO und WT_{KO} (WT_{KO}: 2878 ± 84 , n=150; KO: 2809 ± 87 , n=100; p=0,5802 WT_{KO} vs. KO) (Abb. 9), so dass sich kein Anhalt für eine zelluläre Hypertrophie ergab.

A



B

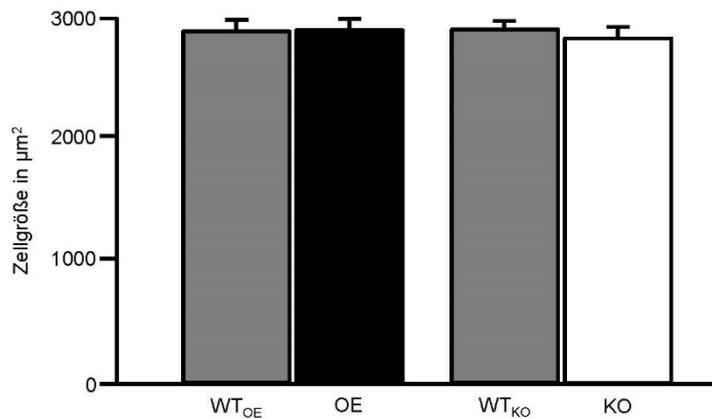


Abb. 9: Vermessung der Zellgröße. **a** Mikroskopische Darstellung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten von OE, KO und deren korrespondierenden Wildtypen. **b** Quantifizierung der planimetrischen Vermessung der Zellgröße.

4.2 Bestimmung der NCX1-Aktivität und der SR Ca²⁺-Beladung in Ab- und Anwesenheit von SEA0400

4.2.1 Protokoll und Vorversuche zur Bestimmung der NCX1-Aktivität und SR Ca²⁺-Beladung

Mit Hilfe von Koffeinstoß-Experimenten wurde die NCX1-Aktivität sowie die Ca²⁺-Beladung des SR bestimmt. Die Aufbereitung und Einbringung isolierter Ca²⁺-toleranter Kardiomyozyten in die Ca²⁺-Epifluoreszenz-Messung erfolgte wie beschrieben und unter Rücksicht der aufgeführten Gütekriterien (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 35). Unter Verwendung von Fluo-4 AM wurde der gemessene Ca²⁺-Transient als F/F₀ angegeben und auf die basale Ca²⁺-Konzentration der jeweiligen Zelle normalisiert. Zu Beginn des Protokolls wurden die Zellen 60 s mit einer Frequenz von 1 Hz feldstimuliert, um anhand der systolischen und diastolischen Ca²⁺-Konzentrationen noch einmal visuell zu verifizieren, ob eine balancierte Ca²⁺-Homöostase vorlag. Es folgte eine 10-sekündige Phase ohne Feldstimulation, um eine vollständige Ca²⁺-Beladung des SR zu gewährleisten. Traten in dieser Phase spontane Ca²⁺-Freisetzungen auf, wurde der Versuch abgebrochen, da durch eine solche partielle SR Ca²⁺-Depletion keine einheitliche und vollständige SR Ca²⁺-Beladung für den Koffeinstoß gewährleistet werden konnte. Im Anschluss wurde die Zelle 60 s mit 10 mM Koffein (Tab. 14) superperfundiert.

100mM Koffein-Lösungsansatz	
Reagenz	Menge
Koffein-Pulver (C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂) (Sigma-Aldrich)	970,95 mg
Tyrode	50 ml
10mM Koffein-Lösung, 1:10 Verdünnung mit Tyrode	

Tab. 14: Koffein-Lösungsansatz

Koffein bindet an den kardialen sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor (RyR2) und führt dadurch zu einer maximalen, anhaltenden Ca²⁺-Freisetzung des SR, so dass der in der Epifluoreszenz aufgezeichnete Ca²⁺-Transient in seiner Amplitude mit der Beladung des SR korreliert (zur Übersicht siehe (Fabiato and Fabiato 1977)). Die gleichzeitige funktionelle Hemmung der SERCA durch die persistierende Ca²⁺-Freisetzung über den Ryanodin-Rezeptor (Weber and Herz 1968) führt zu einer hauptsächlich von NCX1-getragenen Extrusion von Ca²⁺ in den extrazellulären Raum (Bassani et al. 1994b). Die

Abfallkinetik des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten korreliert daher mit der NCX1-Aktivität (Bassani et al. 1994b). Die NCX1-Aktivität wurde durch die Dauer bis zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude quantifiziert (T_{50}).

Um einen verfälschenden, sogenannten „run-down“ Effekt, also eine Abschwächung der Ca^{2+} -Freisetzung durch repetitive Koffeinapplikation an einer Zelle auszuschließen, wurde im Rahmen von Vorexperimenten, ohne Gabe von SEA0400, ein zweiter Koffeinstoß an derselben Zelle durchgeführt. Dabei beobachteten wir, dass die NCX1-Aktivität im Sinne eines „run-down“ Effekts reduziert wurde. Folglich wurde die Basalbedingung des Experiments (Koffeinstoß ohne SEA0400) und die experimentelle Intervention (Koffeinstoß in Gegenwart von SEA0400) an zwei verschiedenen Zellen durchgeführt. 1 μM SEA0400 wurde für eine Dauer von 5 min vor Beginn des Koffeinstoßes und auch während der Koffeinexposition mit Hilfe der schnellen Perfusion appliziert.

Der Einsatz von Einkanal Farbstoffen wie Fluo-4 AM, die Fluoreszenz proportional zur absoluten Menge an Ca^{2+} emittieren, muss hier abgewogen werden, da Unterschiede in der Beladungszeit oder der Zellgröße, z.B. im Rahmen einer Hypertrophie, zu falschen Ergebnissen führen können. Ratiometrische Farbstoffe wie Indo-1 AM werden nicht durch diese Faktoren beeinflusst, zeigten aber in Vorexperimenten andere Nachteile bei der Messung von Koffeinstößen. Dabei kam es nach der Applikation von Koffein und der folgenden Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR unter Indo-1 AM häufig zur Ausbildung eines Plateaus auf Höhe der maximalen Ca^{2+} -Konzentration, was die Bestimmung der T_{50} unmöglich machte. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf einer Fluoreszenzlöschung durch direkte Interaktion von Indo-1 AM und Koffein (O'Neill et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine Unterschiede der Zellgröße vorliegen (siehe Kapitel 4.1, Seite 41). In weiteren Experimenten zeigte sich, dass das OE- und das KO-Mausmodell echokardiographisch keine Zeichen einer Herzhypertrophie, keine Unterschiede in der Zellkapazität, sowie der Zellgröße aufwiesen und die Koffein-induzierten Ca^{2+} -Amplitude im KO und WT_{KO} bei Verwendung von Indo-1 AM identisch war (Jordan et al. 2010; Pott et al. 2012; Bögeholz et al. 2015). Auch andere Arbeitsgruppen verwendeten zur Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehalts Einkanal Farbstoffe wie Fluo-3 AM (Neef et al. 2010; Voigt et al. 2012). Daher wurde mit Hilfe von Fluo-4 AM bei identischer Beladungszeit der isolierten Myozyten die Ca^{2+} -Beladung des SR auch zwischen verschiedenen Zellen verglichen.

4.2.2 Ergebnisse zur Bestimmung der NCX1-Aktivität

Zur besseren Visualisierung der T_{50} wurden die Koffein-induzierten Ca^{2+} -Amplituden auf die Amplitude der jeweiligen basalen Wildtyp Messung normalisiert (Abb. 10). Der OE zeigte, wie bereits von unserer Arbeitsgruppe vorherbeschrieben (Pott et al. 2012), eine akzelerierte Abfallkinetik der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Amplitude im Vergleich zum WT_{OE} (T_{50} Basal; WT_{OE} : $2,01 \pm 0,12$ s, $n=42$; OE: $1,23 \pm 0,20$ s, $n=37$; $p=0,0013$ WT_{OE} vs. OE). Vice versa ist die T_{50} des KO gegenüber dem WT_{KO} verlangsamt (T_{50} Basal; WT_{KO} : $2,08 \pm 0,16$ s, $n=24$; KO: $3,26 \pm 0,20$ s, $n=26$; $p<0,0001$ WT_{KO} vs. KO).

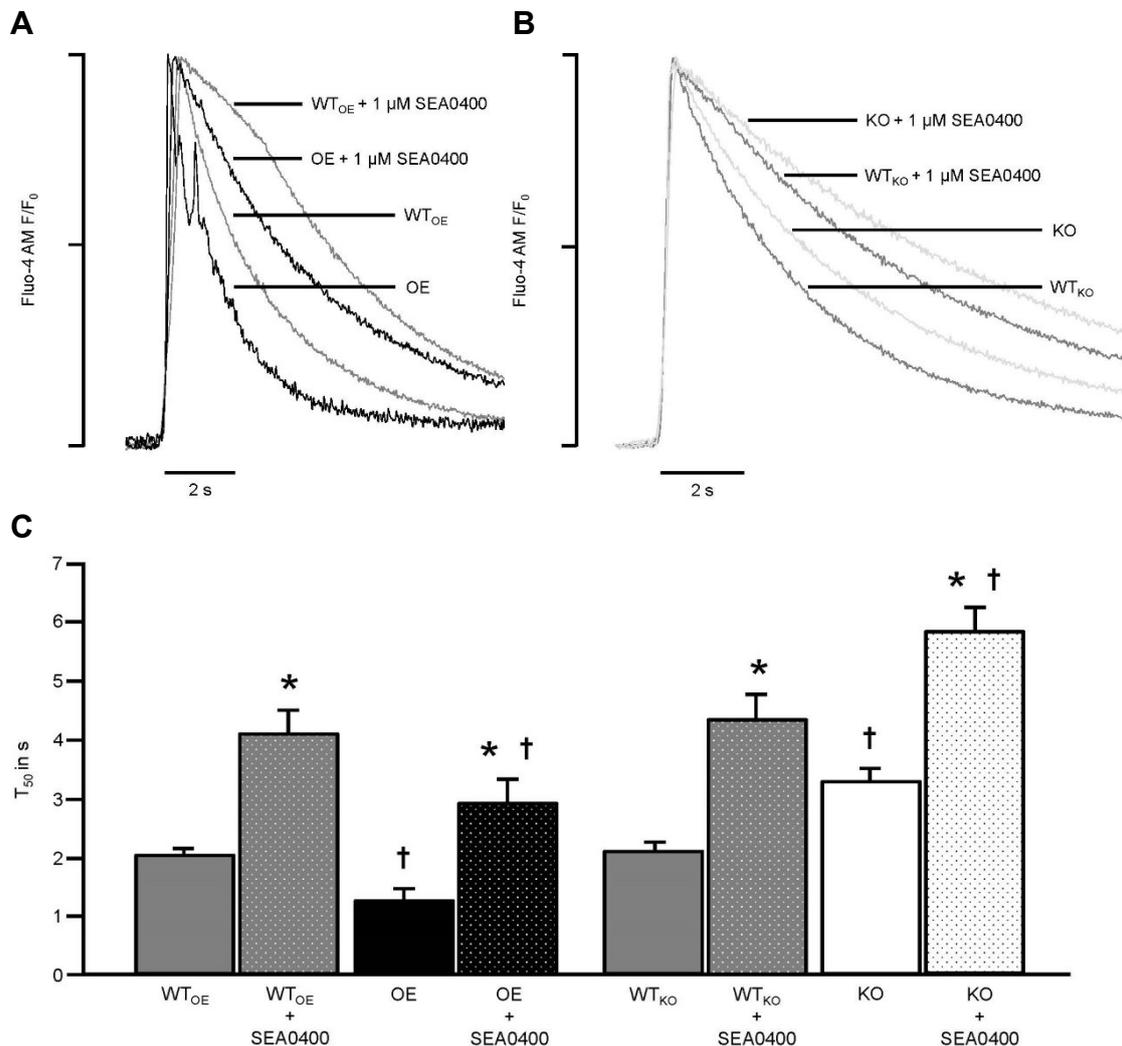


Abb. 10: Einfluss von SEA0400 auf die NCX1-Aktivität. a und b Repräsentative Darstellung von Koffein-induzierten Fluo-4 AM F/F₀ Ca^{2+} -Transienten in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400 im OE, KO und deren korrespondierenden Wildtypen. Die Transienten wurden jeweils auf den basalen Koffeinstoß des entsprechenden Wildtyps normalisiert. c Quantifizierung der T_{50} in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400.

*= $p<0.05$ SEA0400 vs. Basal; †= $p<0.05$ OE/KO vs. $\text{WT}_{\text{OE/KO}}$

Zusätzlich zu den basalen Koffeinstoß-Experimenten wurden Messungen mit Zusatz von 1 μM SEA0400 durchgeführt. SEA0400 reduzierte die NCX1-Aktivität signifikant in allen Genotypen (T_{50} unter 1 μM SEA0400; WT_{OE}: $4,07 \pm 0,37$ s, n=25, $p < 0,0001$ vs. Basal; OE: $2,89 \pm 0,42$ s, n=21, $p = 0,0002$ vs. Basal; WT_{KO}: $4,31 \pm 0,43$ s, n=24, $p < 0,0001$ vs. Basal; KO: $5,79 \pm 0,39$ s, n=24, $p < 0,0001$ vs. Basal). Der intergenotypische Unterschied der T_{50} unter SEA0400 deckt sich mit den Befunden der basalen Koffeinstoß-Experimente und ist sowohl im Vergleich von OE und WT_{OE} ($p = 0,0386$), als auch zwischen KO und WT_{KO} ($p = 0,0155$) signifikant. Die relative NCX1-Inhibition von SEA0400 fiel am stärksten im OE- und am schwächsten im KO-Mausmodell aus (OE: +134%; WT_{OE}: +102%; WT_{KO}: +108%; KO: +78%).

4.2.3 Ergebnisse zur Bestimmung der SR Ca^{2+} -Beladung

Die Messung der SR Ca^{2+} -Beladung anhand der Amplitude des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten (Abb. 11) erbrachte unter basalen experimentellen Bedingungen keinen Unterschied zwischen den Genotypen (Fluo-4 AM F/F_0 des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten Basal; WT_{OE}: $3,47 \pm 0,13$, n=42; OE: $3,60 \pm 0,11$, n=37; $p = 0,4633$ WT_{OE} vs. OE und WT_{KO}: $3,43 \pm 0,17$, n=24; KO: $3,74 \pm 0,12$, n=26; $p = 0,1451$ WT_{KO} vs. KO). Die durch die Fluo-4 AM Fluoreszenz dargestellte identische SR Ca^{2+} -Beladung zwischen den Genotypen unter basalen Bedingungen ist konsistent mit Vorbefunden zu der mit Indo-1 AM dargestellten SR Ca^{2+} -Beladung im KO (Bögeholz et al. 2015).

In Gegenwart von 1 μM SEA0400 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der SR Ca^{2+} -Beladung in allen Genotypen (Fluo-4 AM F/F_0 des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten mit 1 μM SEA0400; WT_{OE}: $4,37 \pm 0,16$, n=25, $p < 0,0001$ vs. Basal; OE: $4,62 \pm 0,16$, n=21, $p < 0,0001$ vs. Basal; WT_{KO}: $4,61 \pm 0,16$, n=24, $p < 0,0001$ vs. Basal; KO: $4,76 \pm 0,14$, n=24; $p < 0,0001$ vs. Basal). Es bestand kein Unterschied der SR Ca^{2+} -Beladung zwischen OE und WT_{OE} ($p = 0,2739$) sowie zwischen KO und WT_{KO} ($p = 0,4717$). Somit führte SEA0400 zu einem ähnlich ausgeprägten Anstieg der Beladung des SR in allen Genotypen.

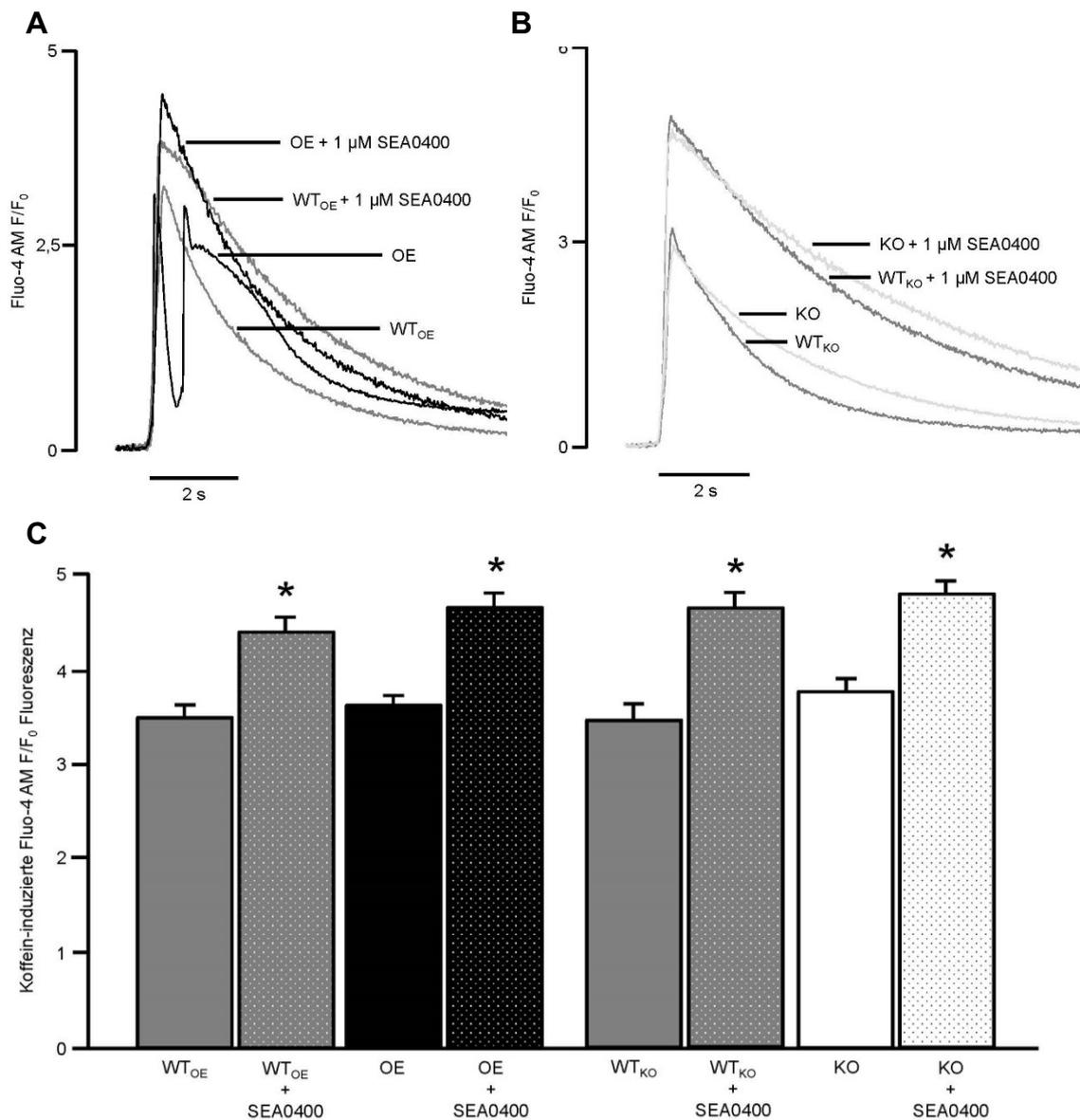


Abb. 11: Einfluss von SEA0400 auf die SR Ca²⁺-Beladung. a und b Repräsentative Darstellung von Koffein-induzierten Fluo-4 AM F/F₀ Ca²⁺-Transienten in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400 im OE, KO und deren korrespondierenden Wildtypen. c Quantifizierung der SR Ca²⁺-Beladung in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400.

*=p<0.05 SEA0400 vs. Basal

4.3 Bestimmung der Kalzitropie in Ab- und Anwesenheit von SEA0400

4.3.1 Protokoll zur Bestimmung der Kalzitropie

Im Folgenden wurde das systolische Ca²⁺-Level in allen vier Genotypen in Ab- und Anwesenheit von SEA0400 in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve bestimmt. Dazu wurden isolierte Kardiomyozyten mit Indo-1 AM beladen und mit einer Frequenz von 1

Hz feldstimuliert, bis das diastolische und das systolische Ca^{2+} -Level einen Steady State erreichte. Zellen, die keinen Steady State erreichten, bzw. stark schwankende Ca^{2+} -Transienten zeigten, wurden außer Betracht gelassen, da davon ausgegangen werden muss, dass bei nicht balancierter Ca^{2+} -Dynamik keine physiologische Ca^{2+} -Homöostase vorliegt, was möglicherweise auf Zellschäden durch die enzymatische Isolation zurückzuführen wäre. Gleiches galt für Zellen, die vor Beginn der Messung spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aufwiesen. Generell wurde bei der Auswahl der Zellen darauf geachtet, dass die Gütekriterien erfüllt waren (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 35). Die Zellen waren fest auf dem Deckglas fixiert, um dem laminaren Strom der schnellen Perfusion zu widerstehen. Sobald sich mehr als eine Zelle im Fluoreszenz-Fokus befand, wurde das Experiment abgebrochen, da unter diesen Bedingungen keine Aussage über die einzelne Zelle getroffen werden kann. Die Gütekriterien waren bei sämtlichen in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich und wurden vor und nach jeder Messung überprüft.

Durch ein standardisiertes Protokoll wurde die Wirkung von SEA0400 auf die Kalzitropie untersucht. Das Pharmakon wurde mit Hilfe der schnellen Perfusion eingebracht. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wurden pro Zelle die Ca^{2+} -Level unter basalen Bedingungen, sowie unter 0,3 μM , 1 μM und 3 μM SEA0400 für je 4 Minuten aufgezeichnet und ausgewertet. Im Anschluss an die 1 Hz Stimulation erfolgte während jeder Konzentrationsstufe die Applikation von 20 Feldstimuli mit einer Frequenz von 0,125 Hz, während derer die Proarrhythmie evaluiert wurde (siehe Kapitel 4.4, Seite 50). Die systolische Kalzitropie bzw. der gemessene Ca^{2+} -Transient wurde als Quotient aus der Ca^{2+} -gebundenen und der Ca^{2+} -ungebundenen Indo-1-Konformation gebildet und entweder als absolute oder als relative zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationsänderung in Bezug zur basalen Ca^{2+} -Konzentration der jeweiligen Zelle angegeben. Die Kalzitropie ist nicht mit der Inotropie gleichzusetzen, da keine Aussagen zur Kontraktionskraft erhoben werden. Sie ist jedoch neben der Ca^{2+} -Sensitivierung und -Desensitivierung ein Modulator der Inotropie (zur Übersicht siehe (Klinke et al. 2005)).

4.3.2 Ergebnisse zur Bestimmung der Kalzitropie

Bei einer Konzentration von 3 μM zeigten die Kardiomyozyten eine vermehrte Hyperkontraktilität mit Zelltod, weswegen diese Konzentration nicht in die Auswertung des systolischen Ca^{2+} -Levels einging.

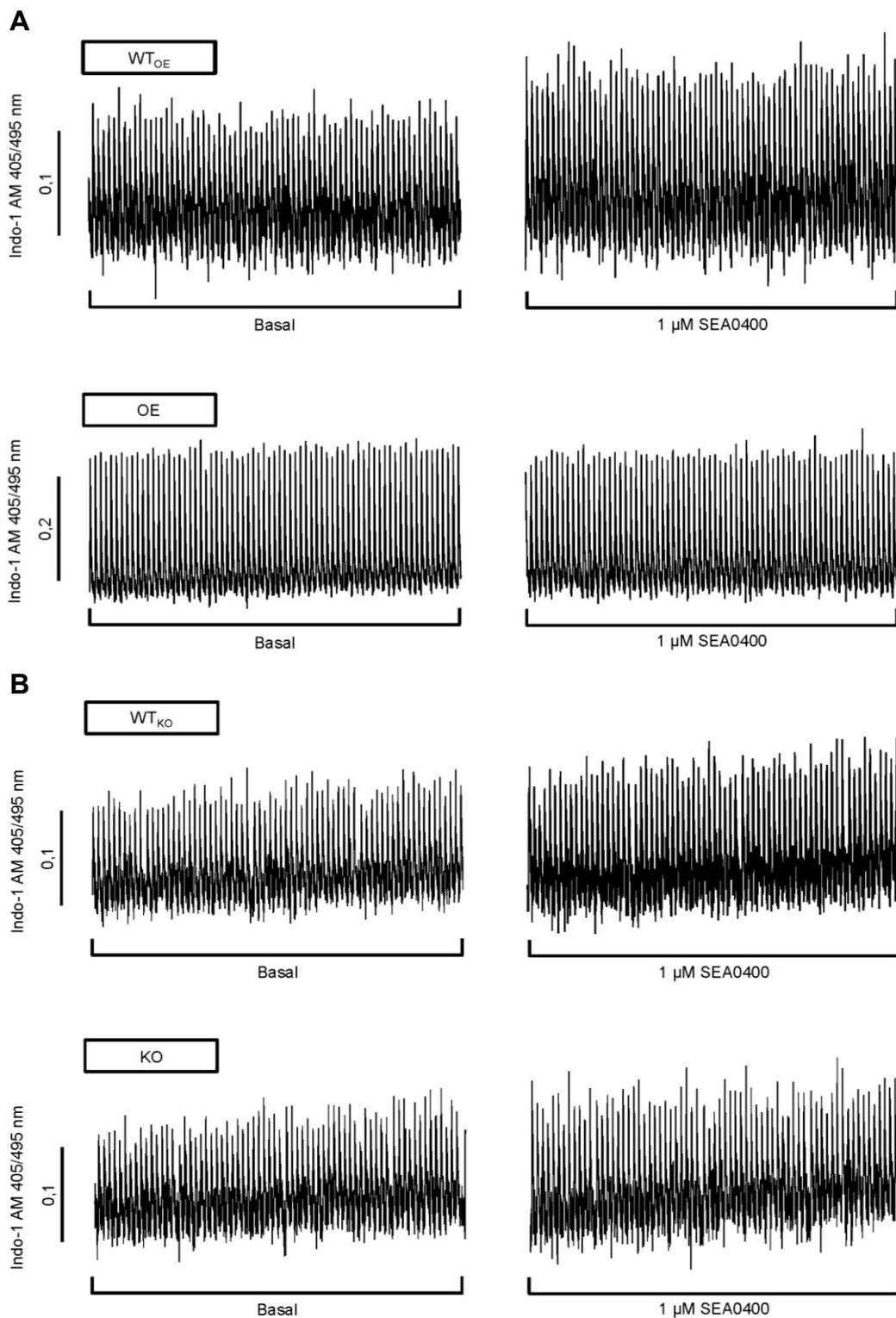


Abb. 12: Einfluss von SEA0400 auf die systolische Kalzitropie I. Repräsentative Darstellung der Indo-1 AM Fluoreszenz bei 1 Hz Feldstimulation unter basalen Bedingungen und 1 μ M SEA0400 in **a** OE, **b** KO und deren korrespondierenden Wildtypen.

Unter basalen Bedingungen stellte sich im OE ein signifikant größerer Ca^{2+} -Transient als im WT_{OE} dar (systolische Kalzitropie Basal; WT_{OE}: $0,086 \pm 0,008$, $n=27$; OE: $0,134 \pm 0,012$,

n=27; p=0,0012 WT_{OE} vs. OE). Dieser Befund divergiert von Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe, in denen eine identische Kalzitropie zwischen OE und WT_{OE} gezeigt wurde (Pott et al. 2012). Im KO und WT_{KO} bestand kein Unterschied in der gemessenen Ca²⁺-Amplitude (systolische Kalzitropie Basal; WT_{KO}: 0,317±0,019, n=19; KO: 0,339±0,027, n=19; p=0,5103 WT_{KO} vs. KO) (Abb. 12).

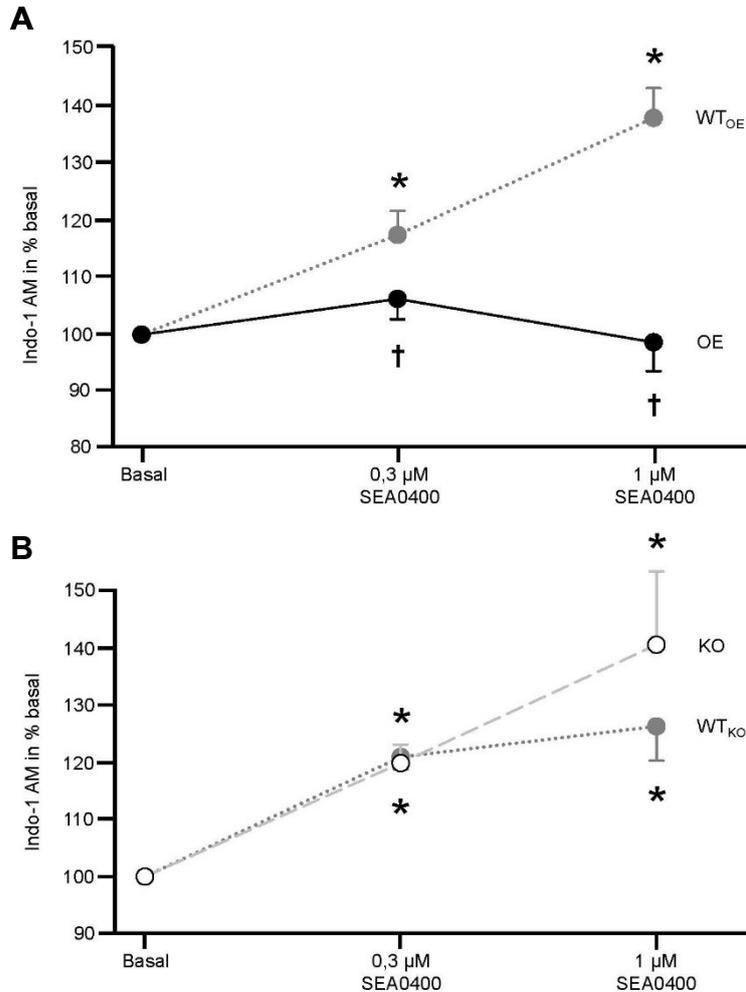


Abb. 13: Einfluss von SEA0400 auf die systolische Kalzitropie II. Quantifizierung des relativen Anstiegs der systolischen Kalzitropie unter Einfluss von 0,3 μM und 1 μM SEA0400 im Vergleich zur Abwesenheit von SEA0400 in **a** OE, **b** KO und deren korrespondierenden Wildtypen.

*=p<0.05 SEA0400 vs. Basal; †=p<0.05 OE vs. WT_{OE}

Die systolische Kalzitropie erhöhte sich unter SEA0400 konzentrationsabhängig im WT_{OE}, KO und WT_{KO} (relativer Anstieg der systolischen Kalzitropie unter SEA0400 in % vs. Basal; 0,3 μM: WT_{OE}: 117±4, n=27, p=0,0003 vs. Basal; WT_{KO}: 121±2, n=18, p<0,0001 vs. Basal; KO: 120±3, n=19, p<0,0001 vs. Basal; 1 μM: WT_{OE}: 138±5, n=23, p<0,0001 vs. Basal; WT_{KO}: 126±6, n=16, p=0,0005 vs. Basal; KO: 141±13, n=9,

p=0,0134 vs. Basal), nicht jedoch im OE (relativer Anstieg der systolischen Kalzitropie unter SEA0400 in % vs. Basal; 0,3 μ M: OE: 106 \pm 4, n=27, p=0,0904 vs. Basal; 1 μ M: OE: 99 \pm 5, n=23, p=0,7969 vs. Basal) (Abb. 13). Der relative Anstieg des Ca²⁺-Transienten war zwischen KO und korrespondierendem WT_{KO} bei 0,3 μ M (p=0,7874) und 1 μ M SEA0400 nicht unterschiedlich (p=0,2639). Im Vergleich von OE und WT_{OE} zeigte sich jedoch bei 0,3 μ M (p=0,0485) und 1 μ M SEA0400 (p<0,0001) ein deutlicher Unterschied, da eine positive Kalzitropie nur im WT_{OE} zu beobachten war.

4.4 Bestimmung der Proarrhythmie in Ab- und Anwesenheit von SEA0400

4.4.1 Protokoll zur Bestimmung der Proarrhythmie

Die Ca²⁺-Epifluoreszenz-Messung ermöglicht die Aufzeichnung von spontanen Ca²⁺-Freisetzungen (sCR), welche durch vorzeitige Kontraktionen entstehen und somit ein Maß für die zelluläre Arrhythmie darstellen. Zur Erfassung möglicher anti- oder proarrhythmische Eigenschaften von SEA0400 wurden isolierte Kardiomyozyten einem Protokoll mit abrupten Wechseln der Stimulationsfrequenz unterzogen, um spontane Ca²⁺-Freisetzungen zu provozieren. Eine spontane Ca²⁺-Freisetzung wurde als jeder nicht feldstimulierte Aufstrich der Ca²⁺-Konzentration über das diastolische Ca²⁺-Level definiert. Pro Zelle wurde das Protokoll jeweils unter basalen Bedingungen und anschließend in Gegenwart von 0,3 μ M, 1 μ M und 3 μ M SEA0400 wiederholt. Die Messung wurde mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Indo-1 AM durchgeführt. Jede Zelle wurde jeweils 4 min mit 1 Hz feldstimuliert, gefolgt von 20 Feldstimuli mit 0,125 Hz. Die Auswertung von spontanen Ca²⁺-Freisetzungen erfolgte während der Stimulation mit 0,125 Hz. Die spontanen Ca²⁺-Freisetzungen wurden für jede experimentelle Bedingungen über das Protokoll ausgezählt und auf sämtliche gemessenen Zellen eines Genotyps gemittelt (sCRs/Zelle). Unter 3 μ M SEA0400 traten zunehmend anhaltende Hyperkontraktionen mit Zelltod auf, die keine verlässliche Auswertung spontaner Ca²⁺-Freisetzungen erlaubten.

4.4.2 Ergebnisse zur Bestimmung der Proarrhythmie

In Abwesenheit von SEA0400 traten im OE signifikant mehr spontane Ca²⁺-Freisetzungen auf als im WT_{OE} (sCRs/Zelle Basal; WT_{OE}: 0,1 \pm 0,1, n=27; OE: 12,5 \pm 3,8, n=27; p=0,0020 WT_{OE} vs. OE) (Abb. 14).

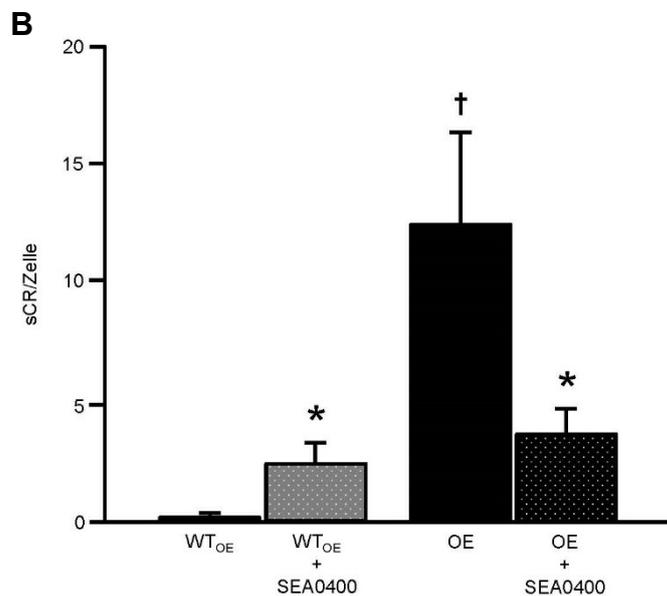
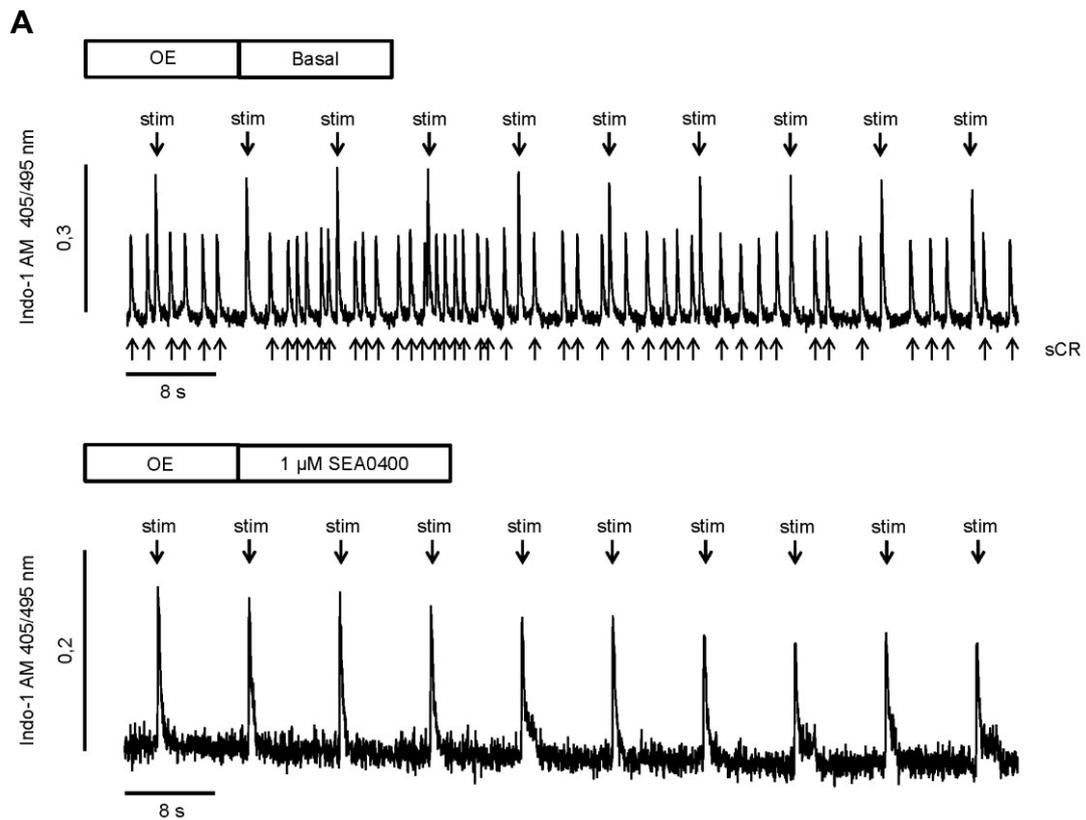


Abb. 14: Einfluss von SEA0400 auf die sCRs/Zelle in OE. **a** Repräsentative Darstellung von Indo-1 AM Ca²⁺-Transienten in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400 im OE während Stimulation mit 0,125 Hz. Pfeile markieren spontane, „stim“ feldstimulierte Transienten. **b** Quantifizierung der Häufigkeit von sCRs/Zelle in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400.

*=p<0.05 SEA0400 vs. Basal

†=p<0.05 KO vs. WT_{KO}

Der KO zeigte tendenziell, nicht jedoch signifikant weniger spontane Ca²⁺-Freisetzungen als der WT_{KO} (sCRs/Zelle Basal; WT_{KO}: 1,3±1,0, n=19; KO: 0,2±0,2, n=19; p=0,2867 WT_{KO} vs. KO) (Abb. 15).

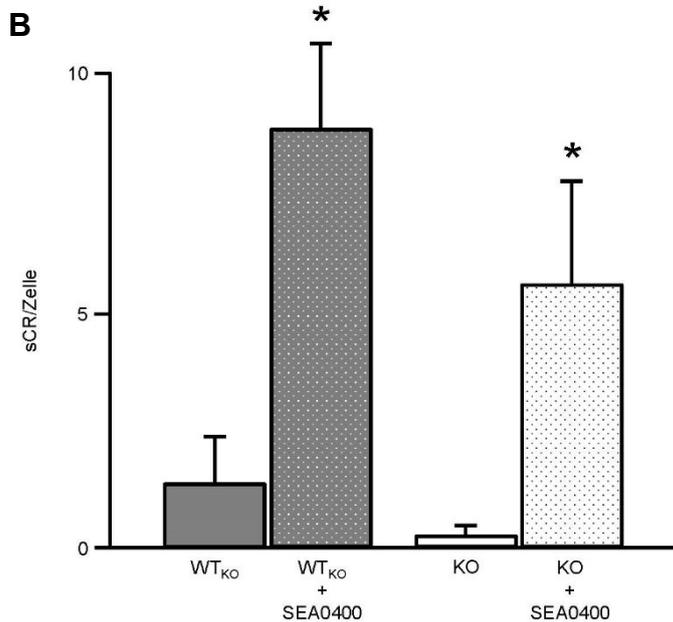
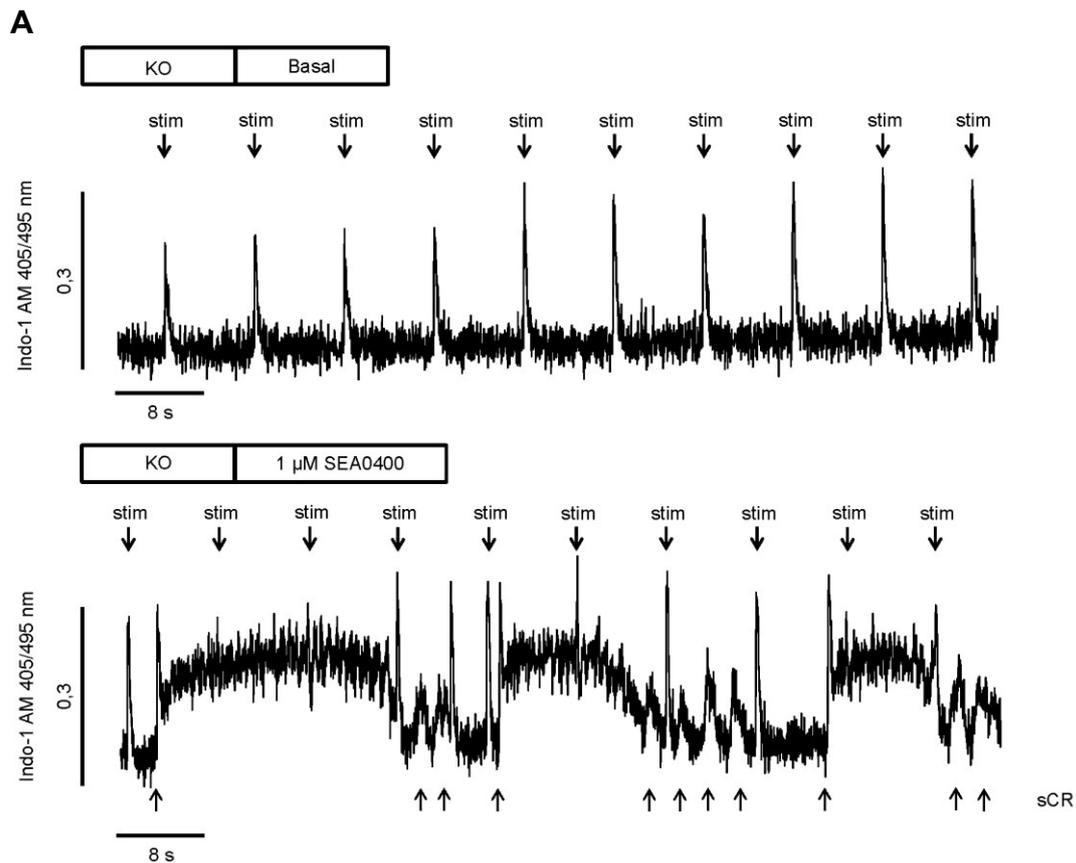


Abb. 15: Einfluss von SEA0400 auf die sCRs/Zelle in KO. **a** Repräsentative Darstellung von Indo-1 AM Ca²⁺-Transienten in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400 im KO während Stimulation mit 0,125 Hz. Pfeile markieren spontane, „stim“ feldstimulierte Transienten. **b** Quantifizierung der Häufigkeit von sCRs/Zelle in Ab- und Anwesenheit von 1 μM SEA0400.

*=p<0.05 SEA0400 vs. Basal

Die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca²⁺-Freisetzungen war im OE signifikant erhöht und im KO tendenziell, aber nicht signifikant verringert (Fraktion der Zellen mit sCRs Basal; WT_{OE}: 7%, n=27; OE: 63%, n=27; p<0,001 WT_{OE} vs. OE; WT_{KO}: 21%, n=19; KO: 5%, n=19; p=0,34 WT_{KO} vs. KO) (Abb. 16). Diese Befunde sind konsistent mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015).

1 μM SEA0400 führte zu einer Reduktion der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen im OE (sCRs/Zelle; 0,3 μM : OE: $8,3 \pm 2,0$, $n=27$, $p=0,2488$ vs. Basal; 1 μM : OE: $3,7 \pm 1,0$, $n=23$, $p=0,0165$ vs. Basal). Im WT_{OE} zeigte sich hingegen eine Zunahme der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen (sCRs/Zelle; 0,3 μM : WT_{OE} : $0,7 \pm 0,4$, $n=27$, $p=0,1612$ vs. Basal; 1 μM : WT_{OE} : $2,4 \pm 0,8$, $n=22$, $p=0,0123$ vs. Basal) (Abb. 14). Im Vergleich zwischen den Genotypen stellten sich im OE unter 0,3 μM SEA0400 noch signifikant mehr spontane Ca^{2+} -Freisetzungen als im WT_{OE} dar ($p=0,0003$), während unter 1 μM SEA0400 kein Unterschied zwischen den Genotypen observiert wurde ($p=0,3346$).

Im KO und im korrespondierenden WT_{KO} zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Ca^{2+} -Freisetzungen durch SEA0400 (sCRs/Zelle; 0,3 μM : WT_{KO} : $3,4 \pm 1,2$, $n=18$, $p=0,0118$ vs. Basal; KO: $6,1 \pm 1,9$, $n=19$, $p=0,0077$ vs. Basal; 1 μM : WT_{KO} : $8,8 \pm 1,9$, $n=17$, $p=0,0003$ vs. Basal; KO: $5,5 \pm 2,2$, $n=8$, $p=0,0418$ vs. Basal) (Abb. 15). Keine Differenz bestand zwischen KO und dessen korrespondierendem WT_{KO} bei 0,3 μM ($p=0,2486$) und 1 μM SEA0400 ($p=0,3057$).

Die Fraktion derjenigen Zellen, die spontane Ca^{2+} -Freisetzungen aufwiesen, stieg im WT_{OE} , WT_{KO} und KO unter Applikation von SEA signifikant an (Fraktion der Zellen mit sCRs unter SEA0400; 0,3 μM : WT_{OE} : 19%, $n=27$, $p=0,420$ vs. Basal; WT_{KO} : 44%, $n=18$, $p=0,170$ vs. Basal; KO: 63%, $n=19$, $p<0,001$ vs. Basal; 1 μM : WT_{OE} : 41%, $n=22$, $p=0,007$ vs. Basal; WT_{KO} : 71%, $n=17$, $p=0,006$ vs. Basal; KO: 88%, $n=8$, $p<0,001$ vs. Basal) (Abb. 16). Im OE blieb der Anteil der Zellen, die spontane Ca^{2+} -Freisetzungen zeigten unverändert (Fraktion der Zellen mit sCRs unter SEA0400; 0,3 μM : OE: 78%, $n=27$, $p=0,372$ vs. Basal; 1 μM : OE: 61%, $n=23$, $p=1,000$ vs. Basal).

Besonders drastisch fiel der proarrhythmische Effekt von 1 μM SEA0400 im KO aus. Die Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle (26,1-fach) und die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen (16,6-fach) stiegen deutlich stärker an als im WT_{OE} (16,3-fach und 5,5-fach) und im WT_{KO} (6,7-fach und 3,4-fach).

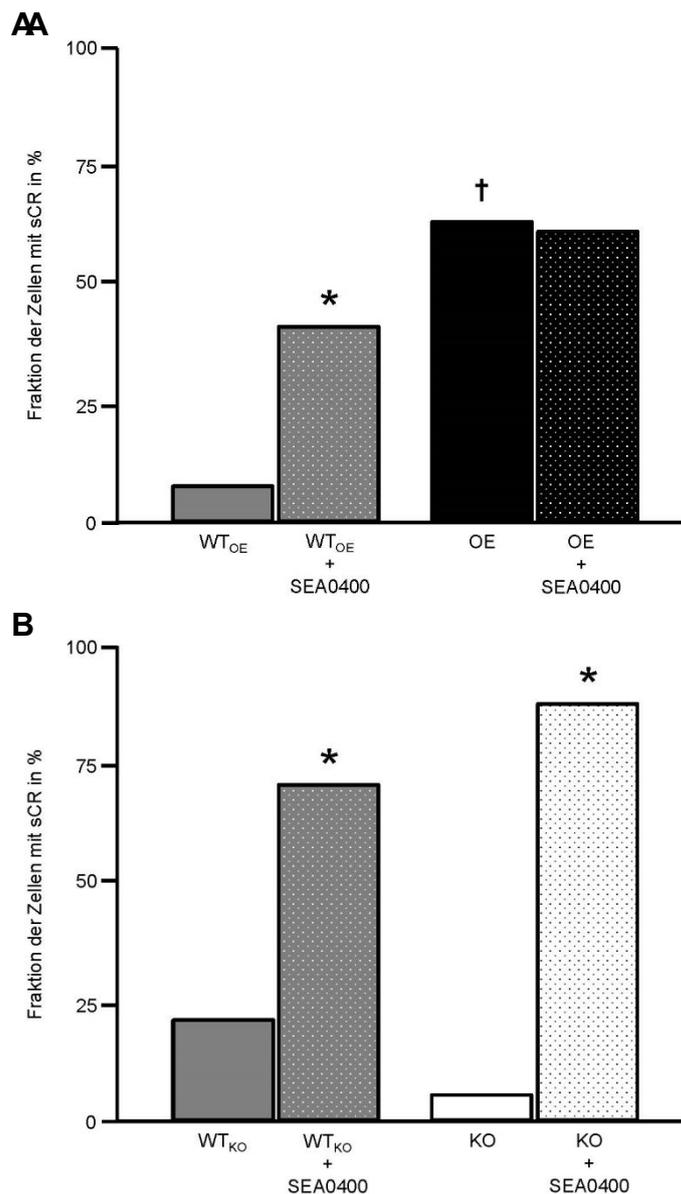


Abb. 16: Einfluss von SEA0400 auf die Fraktion der Zellen mit sCRs. Quantifizierung der Fraktion der Zellen mit sCRs in Ab- und Anwesenheit von 1 μ M SEA0400 in **a** OE, **b** KO und deren korrespondierenden Wildtypen.

*= $p < 0.05$ SEA0400 vs. Basal

†= $p < 0.05$ OE vs. WT_{OE}

Die Applikation von SEA0400 führte insbesondere bei höheren Dosen in einigen Zellen zu Hyperkontraktionen mit anschließendem videoptisch beobachtetem Zelltod. Nach einem Ca^{2+} -Aufstrich in der Indo-1 AM Fluoreszenz, im Sinne eines feldstimulierten Ca^{2+} -Transienten oder einer spontanen Ca^{2+} -Freisetzung, kam es dabei nicht zum Absinken der Ca^{2+} -Konzentration auf das diastolische Niveau, sondern zu erneuten Ca^{2+} -Konzentrationserhöhungen mit einer Oszillationsfigur (Abb. 17). Dieses Phänomen wurde besonders häufig im KO beobachtet (Aufreten von anhaltenden Ca^{2+} -Hyperkontraktionen mit Zelltod unter SEA0400 in % der Zellen: 1 μ M: WT_{OE}: 15%, n=27; OE: 15%, n=27; WT_{KO}: 11%, n=19; KO: 56%, n=18; 3 μ M: WT_{OE}: 37%, n=27; OE: 26%, n=27; WT_{KO}: 53%, n=17; KO: 89%, n=18). Das Vorkommen von Zellen mit anhaltenden Hyperkontraktionen und Zelltod war zwischen OE und WT_{OE} weder bei 1 μ M ($p=1,000$) noch bei 3

μM SEA0400 ($p=0,559$) signifikant unterschiedlich, jedoch im KO gegenüber dem WT_{KO} signifikant erhöht (1 μM SEA0400: $p=0,005$; 3 μM SEA0400: $p=0,027$).

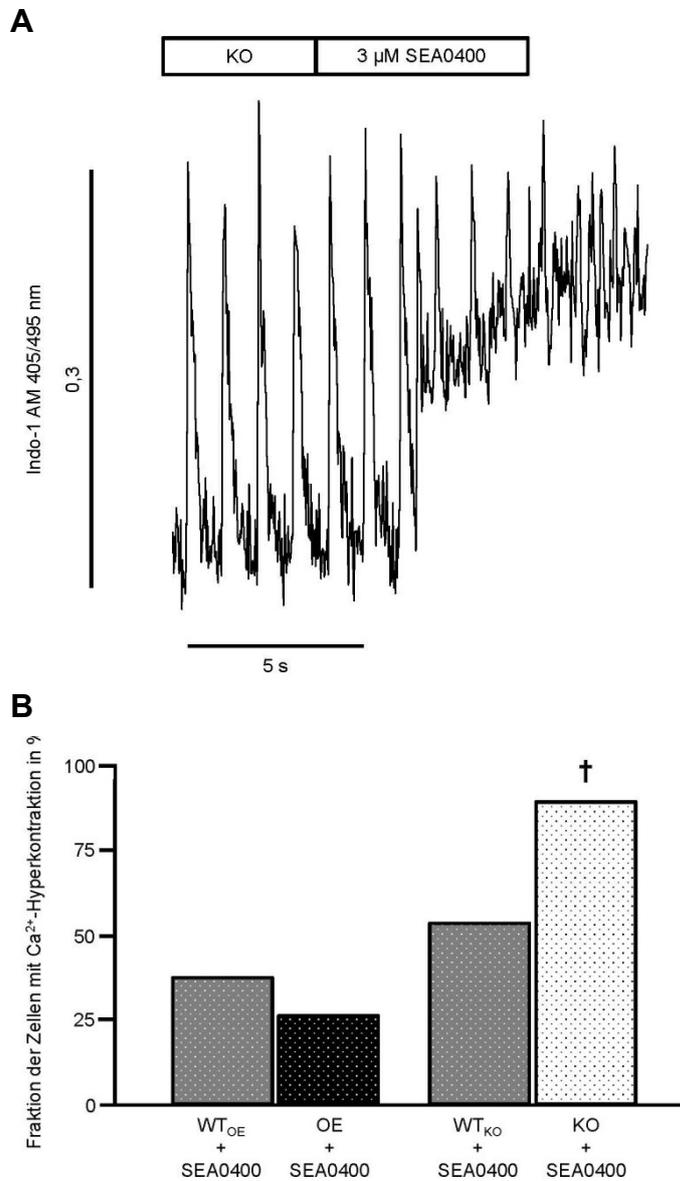


Abb. 17: SEA0400 und Ca²⁺-Hyperkontraktionen. **a** Repräsentatives Indo-1 AM Ca²⁺-Tracing mit einer beginnenden Ca²⁺-Hyperkontraktion im KO unter 3 μM SEA0400. **b** Quantifizierung der Fraktion der Zellen, welche unter 3 μM SEA0400 Ca²⁺-Hyperkontraktionen aufwies.

†= $p<0.05$ KO vs. WT_{KO}

In den Koffeinstoß-Experimenten (siehe Kapitel 4.2, Seite 42) wurde in einigen Zellen das Auftreten von einem oder multiplen Wiederaufstrichen im abfallenden Schenkel der Koffein-induzierten Ca²⁺-Amplitude beobachtet (Abb. 18). Diese Oszillationen traten besonders häufig und ausgeprägt im OE auf. Während keine einzige Oszillation im KO beobachtet wurde, stellten sich diese auch in einigen Zellen des WT_{OE} und WT_{KO} dar. Hier wurde jedoch im Gegensatz zum OE zumeist nur ein singulärer, wesentlich kleinerer Wiederaufstrich der Fluo-4 AM Fluoreszenz beobachtet (Auftreten von Oszillationen im abfallenden Schenkel des Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten in % der Zellen Basal:

WT_{OE}: 14%, n=42; OE: 65%, n=37; p<0,001 WT_{OE} vs. OE; WT_{KO}: 13%, n=24; KO: 0%, n=26; p=0,103 WT_{KO} vs. KO). Unter 1 μ M SEA0400 sank die Fraktion der Zellen mit Oszillationen im OE auf 33% (p=0,029). In den beiden Wildtypen und im KO wurde das Auftreten von Oszillationen durch 1 μ M SEA0400 nicht signifikant beeinflusst (WT_{OE}: 24%, n=25, p=0,341 vs. Basal; WT_{KO}: 0%, n=24, p=0,234 vs. Basal; KO: 4%, n=24, p=0,480 vs. Basal).

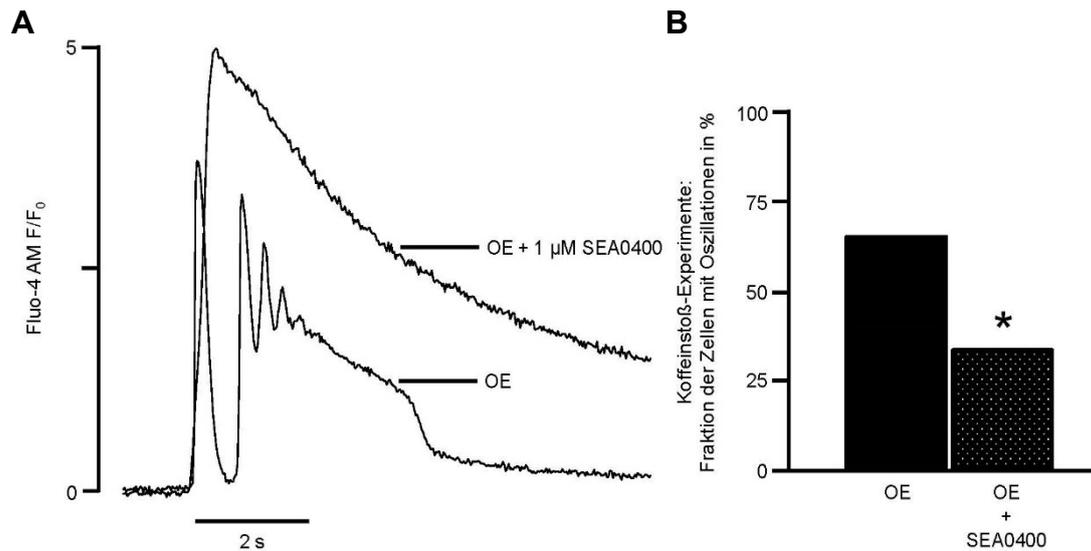


Abb. 18: Koffein-induzierte Ca²⁺-Transienten und Oszillationen. **a** Repräsentative Fluo-4 AM F/F₀ Koffein-induzierte Ca²⁺-Transienten mit Oszillationen während der NCX1-getragenen Abfallkinetik der Ca²⁺-Konzentration im OE unter basalen Bedingungen und ohne Oszillationen in Gegenwart von 1 μ M SEA0400. **b** Quantifizierung der Fraktion der Zellen im OE, die Wiederaufstriche zeigten, in Ab- und Anwesenheit von 1 μ M SEA0400.

*=p<0.05 SEA0400 vs. Basal

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte von SEA0400 auf die Kalzitropie und die Arrhythmogenese in Abhängigkeit zur NCX1-Expression untersucht. NCX1 gilt als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der pharmakologischen Behandlung von Herzrhythmusstörungen. Da Veränderungen der NCX1-Expression bei Herzinsuffizienz- und Vorhofflimmer-Patienten bekannt sind, sind diese Beobachtungen von unmittelbarer Relevanz für einen möglichen zukünftigen Einsatz von NCX1-Antagonisten in der Behandlung von Herzrhythmusstörungen.

5.1 Der Einfluss von SEA0400 auf die NCX1-Aktivität in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression

Die Beantwortung der Frage, ob SEA0400 tatsächlich einen hemmenden Effekt auf die NCX1-Aktivität hat, und wenn ja, ob dieser in allen Genotypen zu beobachten ist, ist eine Grundvoraussetzung für die Interpretation der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten Effekte von SEA0400 auf die Arrhythmogenese und die Kalzitropie.

Die unter basalen Bedingungen gesteigerte bzw. verminderte NCX1-Aktivität im OE (Adachi-Akahane et al. 1997; Reuter et al. 2004; Roos et al. 2007; Pott et al. 2012) und KO (Jordan et al. 2010, Bögeholz et al. 2015) konnte durch die entsprechend akzelerierte bzw. prolongierte Abfallkinetik des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abb. 10, Seite 44). Ebenfalls wurde der NCX1-inhibitorische Effekt von SEA0400 auf den NCX1-Forward-Mode (Tanaka et al. 2002; Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013) durch Applikation von 1 μM in Koffeinstoß-Experimenten bestätigt. Erstmals beschreibt die vorliegende Arbeit somit, dass der hemmende Effekt von SEA0400 sowohl bei erhöhter NCX1-Expression im OE, als auch bei erniedrigter NCX1-Expression im KO zu beobachten war. Diese Befunde sind von Relevanz, da Herzrhythmusstörungen z.B. bei Herzinsuffizienz- oder Vorhofflimmer-Patienten mit einer veränderten NCX1-Expression vergesellschaftet sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten legen somit nahe, dass SEA0400 seine inhibitorische Wirkung auf den NCX1-Forward-Mode – und damit eine potentiell therapeutische Wirkung – auch bei veränderter NCX1-Expression entfaltet.

Wie auch unter basalen Bedingungen zeigte sich in Gegenwart von SEA0400 im OE eine trotz Hemmung verbleibende stärkere NCX1-Forward-Mode-Aktivität als im korres-

pondierenden WT_{OE} . Genauso war die Aktivität im KO im Vergleich zu dessen korrespondierenden WT_{KO} auch unter SEA0400 geringer. Somit scheint SEA0400 zwar in sämtlichen Genotypen die NCX1-Forward-Mode-Aktivität herabzusetzen, die genotypisch festgelegten Unterschiede in der NCX1-Aktivität aber nicht aufzuheben (siehe Abb. 10, Seite 44). Dennoch fiel die relative NCX1-Inhibition von SEA0400 am stärksten im OE- und am schwächsten im KO-Mausmodell aus (siehe 4.2.2, Seite 44). Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass SEA0400 NCX1 vornehmlich im Na^+ -abhängigen I_1 -Inaktivierungsstatus inhibiert (Iwamoto et al. 2004b) und dass die NCX1-inhibitorische Potenz von SEA0400 gleichsinnig mit der zytosolischen Na^+ -Konzentration steigt (Lee et al. 2004). Während der NCX1-vermittelten Ca^{2+} -Extrusion wird ein Ca^{2+} -Ion nach extra- und drei Na^+ -Ionen nach intrazellulär transportiert. Unter dieser Annahme ist es also denkbar, dass bei erhöhter NCX1-Expression eine gesteigerte zytosolische oder submembranöse Na^+ -Akkumulation resultiert, durch die NCX1 eher in den I_1 -Inaktivierungsstatus versetzt wird. Demzufolge könnte die NCX1-inhibitorische Potenz von SEA0400 bei erhöhter NCX1-Expression, wie beobachtet, steigen und vice versa bei verminderter NCX1-Expression sinken. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Studien nötig, die den Einfluss veränderter NCX1-Aktivität auf die zytosolische Na^+ -Konzentration mit Hilfe von Na^+ -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffen prüfen.

5.2 Der Einfluss von SEA0400 auf die SR Ca^{2+} -Beladung in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression

Eine der wichtigsten Determinanten der Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten und damit der Inotropie ist die Ca^{2+} -Beladung des SR (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Zur Interpretation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Effekte von SEA0400 auf den systolischen Ca^{2+} -Transienten ist es essentiell die Wirkung von SEA0400 auf den Füllungsgrad des SR zu bestimmen. Die Erhebung der SR Ca^{2+} -Beladung erfolgte ebenfalls in Koffeinstoß-Experimenten mit Hilfe des Einkanal Farbstoffes Fluo-4 AM, wobei die Amplitude des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten als Maß für die Beladung des SR verwendet wurde. Wie bereits erwähnt, wurde Fluo-4 AM unter den gegebenen, zwischen den Genotypen identischen experimentellen Bedingungen verwendet (siehe Kapitel 4.2.1, Seite 42). Zur methodischen Validierung der Versuchsreihe wurde die Zellgröße ventrikulärer Myozyten planimetrisch vermessen, wobei sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten (siehe Abb. 9, Seite 41). Weiterhin konnte in Vorarbeiten (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015) keine Hinweise auf eine zelluläre Hypertrophie

gezeigt werden. Unter diesen Bedingungen ist der Direktvergleich der Transientenamplituden auch unter Verwendung eines nicht-ratiometrischen Farbstoffes zwischen verschiedenen Zellen möglich, da Unterschiede aufgrund der Zellgröße unwahrscheinlich erscheinen.

Unter basalen Bedingungen stellte sich im OE und KO, sowie deren korrespondierenden Wildtypen kein Unterschied in der SR Ca^{2+} -Beladung dar. Diese Befunde stimmen mit Vorarbeiten an den KO und OE Modellen überein (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015). In allen Genotypen stieg die SR Ca^{2+} -Beladung bei Applikation von 1 μM SEA0400 in gleichem Maße an (siehe Abb. 11, Seite 46).

Durch die Betrachtung der SR Ca^{2+} -Beladung unter basalen Bedingungen und SEA0400-Applikation wird der Unterschied zwischen einer chronischen und einer akuten NCX1-Modifikation deutlich. Die chronische Veränderung der NCX1-Expression durch genetische Manipulation führt zu einer Anpassung der Ca^{2+} -Aufnahme über den L-Typ- Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}). Die Aktivität von I_{Ca} ist im OE-Modell erhöht, um einen Ca^{2+} -Verlust durch die vermehrt NCX1-getragene Ca^{2+} -Extrusion auszugleichen (Pott et al. 2007a; Pott et al. 2012). Umgekehrt ist die I_{Ca} -Aktivität im KO verringert, um eine Ca^{2+} -Überladung durch die verminderte Ca^{2+} -Extrusion auszugleichen (Pott et al. 2007b, Bögeholz et al. 2015). In den genetischen NCX1 OE- und KO-Modellen wird somit mittelfristig eine Ca^{2+} -Überladung oder -Depletion des SR vermieden. Demgegenüber scheint die, in dieser Arbeit untersuchte, akute Inhibition des NCX1-Forward-Mode durch SEA0400 einen Anstieg der SR Ca^{2+} -Beladung hervorzurufen. Offensichtlich ist unter diesen Bedingungen der transmembranöse Ca^{2+} -Influx größer als der Ca^{2+} -Efflux, was zu einer vermehrten Ca^{2+} -Wiederaufnahme durch die SERCA führen könnte und so die gesteigerte SR Ca^{2+} -Beladung erklärt.

Eine weitere Implikation dieses Befundes ist, dass die Relevanz der NCX1-Forward-Mode-Inhibition auf den Ca^{2+} -Haushalt unter den gegebenen Bedingungen größer zu sein scheint, als die des NCX1-Reverse-Mode, der – wenn durch SEA0400 gehemmt – einer Ca^{2+} -Akkumulation entgegenwirken würde. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenso eine Erhöhung der SR Ca^{2+} -Beladung durch SEA0400 zeigen, wobei dieser Effekt interessanterweise nicht in einem murinen Herzinsuffizienzmodell zum Tragen kam (Ozdemir et al. 2008). Als Grund wurde in diesem Fall das durch gesteigerte RyR2-Phosphorylierung bedingte Ca^{2+} -Leck und eine verminderte Aufnahmekapazität des SR für Ca^{2+} angeführt. Auch der OE weist eine erhöhte Expression von RyR2 und phosphoryliertem RyR2 auf (Pott et al. 2012). Es wäre demnach denkbar, dass das SR einer

gesteigerten Ca^{2+} -Dynamik unterliegt und weniger effektiv mit Ca^{2+} beladen werden kann. Jedoch bieten dafür weder die basalen noch die Koffeinstoß-Experimente mit Zugabe von SEA0400 in der vorliegenden Arbeit einen Anhaltspunkt.

5.3 Der Einfluss von SEA0400 auf die Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression

Um den Effekt von SEA0400 auf die myokardiale Inotropie zu untersuchen, wurden Ca^{2+} -Transienten mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffes Indo-1 AM aufgezeichnet. Die Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten ist ein indirekter Parameter für die Inotropie. Es konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten auch die Kontraktilität von Herzmuskelzellen zunimmt (zur Übersicht siehe (Blaustein and Lederer 1999; Klinke et al. 2005)).

a) Zunahme der Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten durch SEA0400 in Wildtyp- und KO-Zellen

SEA0400 führte in Zellen beider Wildtyp-Populationen und in KO-Zellen zu einer gesteigerten Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten (siehe Abb. 12, Seite 48 und Abb. 13, Seite 49). Diese Befunde lassen sich durch die erhöhte SR Ca^{2+} -Beladung im WT_{OE}, KO und WT_{KO} und einer damit gesteigerten Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung erklären (siehe Abb. 11, Seite 46).

SEA0400 besitzt über die Inhibition des NCX1-Forward-Mode eine Digitalis ähnliche Wirkung. Digitalis-Glykoside wirken allerdings über eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase, die zu einer zytosolischen Na^+ -Akkumulation führt und damit den NCX1-Forward-Mode inhibiert (Allen et al. 1971). Hierdurch kommt es zu einer verminderten Ca^{2+} -Extrusion und einer vermehrten Ca^{2+} -Beladung des SR. Diese Mechanismen sind für die Wirkung von Digitalis-Glykosiden experimentell nachvollzogen worden (Vemuri et al. 1989; Reuter et al. 2002b; Altamirano et al. 2006), wenn auch weiterhin NCX1-Unabhängige Mechanismen diskutiert werden (Besch and Watanabe 1978; McGarry et al. 1995; Santana et al. 1998; Sagawa et al. 2002; Nishio et al. 2002; Liu et al. 2010).

Die vorliegende Arbeit legt somit nahe, dass bei normaler NCX1-Expression, sowie im KO mit verminderter NCX1-Expression mit einem positiv inotropen Effekt zu rechnen ist. Vorangehende Studien mit positiv inotropem Effekt (Tanaka et al. 2005; Farkas et al. 2008; Ozdemir et al. 2008) stehen Ergebnisse mit neutralem Einfluss gegenüber (Nagy et al. 2004; Tanaka et al. 2007; Farkas et al. 2008; Bourgonje et al. 2013) (siehe 1.5.4,

Seite 19). Diese Diskrepanzen sind durch eine Vielzahl von Faktoren erklärbar, die hauptsächlich aus verschiedenen Versuchsaufbauten resultieren. Die Studien verwenden unterschiedliche Tiermodelle und Protokolle. Es wurden je nach Arbeit Ganzherz-Experimente mit Hilfe eines Langendorff-Setups (Farkas et al. 2008), Einzelzell-Experimente (Nagy et al. 2004; Tanaka et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013) oder Untersuchungen an Herzmuskelfasern durchgeführt (Tanaka et al. 2007), die jeweils verschiedene Parameter beurteilten. Zudem ist in Abhängigkeit zur Spezies der Anteil von NCX1 an der Ca^{2+} -Elimination unterschiedlich ausgeprägt. In ventrikulären Kaninchen-Kardiomyozyten wird die Ca^{2+} -Elimination zu 70% von SERCA und zu 28% von NCX1 getragen, während die mitochondriale Ca^{2+} -ATPase und die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase nur einen geringen Anteil beitragen (Bers et al. 1996). Ähnliche Ergebnisse liegen für Hunde, Meerschweinchen und Menschen vor (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Im Gegensatz dazu ist NCX1 zu lediglich 7% bei Ratten (Bassani et al. 1994a) und zu 9% bei Mäusen an der Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol beteiligt (Li et al. 1998), wobei der Anteil der SERCA höher liegt. Entsprechend dieser Befunde ist es möglich, dass die SEA0400 vermittelte Inhibition der Ca^{2+} -Transport Kapazität nach Extrazellulär Spezies-abhängig unterschiedlich stark auf den myozytären Ca^{2+} -Haushalt wirkt. Bisher konnte für SEA0400 ein positiv inotroper Effekt in Maus-, Ratten- und Schweine-Modell nachgewiesen werden (Tanaka et al. 2005; Farkas et al. 2008; Ozdemir et al. 2008), nicht jedoch in Kaninchen-, Meerschweinchen- und Hunde-Modell (Nagy et al. 2004; Tanaka et al. 2007; Farkas et al. 2008; Bourgonje et al. 2013). Neben der abweichenden myozytären Ca^{2+} -Dynamik gibt es zwischen den Spezies zudem zahlreiche Unterschiede in der Proteinexpression, den kardialen Kontraktionseigenschaften, der Herzfrequenzreserve und der Anpassung an pathologische Geschehnisse, die ohne weiteres keine einwandfreie, Spezies-übergreifende Translation zulassen (zur Übersicht siehe (Milani-Nejad and Janssen 2014)). Neben den Spezies-abhängigen Unterschieden in der Ausprägung und der Anpassung an kardial-pathologische Prozesse können chronische Herzerkrankungen zudem die Wirkung von Medikamenten beeinflussen. Im Fall von SEA0400 wurde beobachtet, dass eine positive Inotropie in einem herzinsuffizienten Maus-Modell im Vergleich mit einem Wildtyp ausblieb (Ozdemir et al. 2008).

Der Hauptbefund dieser Studien und auch der vorliegenden Arbeit scheint jedoch zu sein, dass unter jeglichen experimentellen Bedingungen kein Anhalt für einen negativ inotropen Effekt erhoben werden konnte. Für den möglichen Einsatz von SEA0400 in

einem zukünftigen Patientenkollektiv ist dies von unmittelbarer Bedeutung, da ein negativ inotroper Effekt den Einsatz von SEA0400 als potentielles Antiarrhythmikum einschränken würde.

b) Fehlender Effekt von SEA0400 auf die Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten in OE

Anders als in den beiden Wildtypen und im KO zeigte sich im OE kein Anstieg der Transientenamplitude durch SEA0400 (siehe Abb. 12, Seite 48 und Abb. 13, Seite 49). Obwohl SEA0400 in allen Genotypen eine erhöhte SR Ca^{2+} -Beladung bedingte (siehe Abb. 11, Seite 46), kann dies offensichtlich nur in den Wildtypen und im KO, nicht aber im OE in eine gesteigerte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung übersetzt werden. Angesichts der auch im OE unter SEA0400 zunehmenden SR Ca^{2+} -Beladung scheint dieser Befund unerwartet. Eine mögliche Erklärung könnte die vermehrte spontane Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR sein, welche im OE ausgeprägter ist als im WT_{OE} (Pott et al. 2012) (siehe Abb. 14, Seite 51). Allerdings müsste dieses Argument auch für die basale Versuchsbedingung – also die Abwesenheit von SEA0400 – gelten, was in der vorliegenden Arbeit offensichtlich nicht der Fall ist. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines positiv kalzitropen Effektes im OE könnte sein, dass die vermehrte Anzahl der in der Membran exprimierten NCX1-Moleküle eine geringere Sättigung durch SEA0400 nach sich zieht. Während also in den Wildtypen und im KO die reduzierte Anzahl der NCX1-Moleküle durch SEA0400 relativ stärker gesättigt wird und somit zu einem ausgeprägten Effekt führt, könnte dies im OE nicht der Fall sein, da auch nach Bindung von SEA0400 an NCX1 genug ungebundene NCX1-Moleküle verbleiben, so dass der Effekt von SEA0400 vermindert wird. Dem steht jedoch entgegen, dass ein signifikanter Effekt von SEA0400 sowohl auf die SR Ca^{2+} -Beladung als auch auf die Proarrhythmie gemessen wurde. Somit sind weiterführende Studien nötig, um zu klären warum SEA0400 im OE im Gegensatz zu den Modellen mit verringerter oder normaler NCX1-Expression keinen positiv kalzitropen Effekt hat.

c) Die Amplitude des systolischen Ca^{2+} -Transienten in Abwesenheit von SEA0400 im OE

Als unerwarteter Nebenbefund zeigte sich die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten unter Basalbedingungen im OE signifikant größer als im WT_{OE} (siehe Kapitel 4.3.2, Seite 47). Dies steht im Gegensatz zu Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in denen kein Unterschied zwischen OE und WT_{OE} (Pott et al. 2012) gezeigt werden konnte. Reuter et al.

zeigten zudem eine reduzierte Ca^{2+} -Amplitude im OE (Reuter et al. 2004). Mögliche Gründe für die abweichenden Ergebnisse könnten sein, dass Pott et al. ein anderes Stimulationsprotokoll verwendeten. Die von Reuter et al. gemessene verringerte Amplitude des Ca^{2+} -Transienten im OE lässt sich durch das vorangeschrittene Alter der Tiere (3,5 Monate) im Vergleich zum Alter der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere (<12 Wochen) erklären. OE-Mäuse in einem Alter von 3,5 Monaten weisen, anders als die in dieser und einer der vorangehenden Arbeiten verwendeten Tiere (Pott et al. 2012), eine Hypertrophie des Myokards mit verminderter Effektivität der Erregungs-Kontraktions-Kopplung auf (Reuter et al. 2004).

Einer der Hauptfaktoren der Höhe der Ca^{2+} -Transientenamplitude ist die SR Ca^{2+} -Beladung (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Die unter basalen Bedingungen identische SR Ca^{2+} -Beladung zwischen OE und WT_{OE} erklärt somit nicht die höhere Amplitude des Ca^{2+} -Transienten im OE. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass die Fraktion des Ca^{2+} das in der Systole freigesetzt wird, im OE größer ist als im WT_{OE} . Neben der SR Ca^{2+} -Beladung wird die Menge der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung auch durch das zytosolische „Trigger“- Ca^{2+} beeinflusst, das an RyR2 bindet (zur Übersicht siehe (Fabiato 1983)). Einige Arbeiten konnten zeigen, dass je höher die Konzentration des „Trigger“- Ca^{2+} ist, desto größer ist die Fraktion des aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} (Bassani et al. 1995; Shannon et al. 2000). Vorangegangene Studien haben im OE einen adaptiv gesteigerten I_{Ca} gezeigt, der einen Anpassungsmechanismus darstellt. Einem Ca^{2+} -Verlust der Zelle wird somit durch eine vermehrte Ca^{2+} -Aufnahme entgegengewirkt (Pott et al. 2007a; Pott et al. 2012). Die unmittelbare Co-Lokalisation von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und RyR2 im dyadischen Spalt (Lederer et al. 1990) könnte im OE mit seinem amplifizierten I_{Ca} mehr „Trigger“- Ca^{2+} zur Verfügung stellen, wodurch sich die Fraktion des aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} erhöhen würde. Dies könnte die in der vorliegenden Arbeit unter Basalbedingungen gemessene Erhöhung der systolischen Transientenamplitude erklären. Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass eine erhöhte NCX1-Expression zu einer Verminderung der Ca^{2+} -Konzentration im dyadischen Spalt führt (Pott et al. 2007a; Pott et al. 2012), was dieser Hypothese entgegenstehen würde. Zudem sollte bei Gültigkeit dieser Hypothese ein ähnlicher – komplementärer Effekt – im KO zu beobachten sein, was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall ist.

Zukünftige Studien sind nötig um diese in den vorangehenden Arbeiten dokumentierten Widersprüche aufzulösen und die genannte Hypothese zu testen.

5.4 Der Einfluss von SEA0400 auf das Arrhythmie-Verhalten in Gegenwart erhöhter und erniedrigter NCX1-Expression

Zur Beurteilung der Wirkung von SEA0400 auf die Arrhythmogenese wurde die Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen unter basalen Bedingungen und SEA0400 gemessen. Spontane Ca^{2+} -Freisetzungen gelten als das funktionelle Substrat für Nachdepolarisationen des zellulären Aktionspotentials, welche wiederum Herzrhythmusstörungen induzieren (Pogwizd et al. 1999; Pott et al. 2012) (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988; Sipido et al. 2007)).

a) Wirkung von SEA0400 auf die Proarrhythmie in Zellen von OE-Mäusen

Im OE zeigten unter basalen Bedingungen mehr Zellen spontane Ca^{2+} -Freisetzungen und die Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle war im Vergleich zum WT_{OE} gesteigert (siehe Abb. 14, Seite 51 und Abb. 16, Seite 54). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe stützen den Befund einer gesteigerten Fraktion von Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen (Pott et al. 2012), wohingegen in Pott et al. eine unveränderte Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle beschrieben wurde. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch ein in der vorliegenden Arbeit andersartiges Stimulationsprotokoll erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde im OE eine signifikante Reduktion der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle (siehe Abb. 14, Seite 51) und der Koffein-induzierten Oszillationen durch SEA0400 (siehe Abb. 18, Seite 56) beobachtet. Dieser als antiarrhythmischer Effekt zu interpretierende Mechanismus durch SEA0400 wurde auch durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt. (Nagy et al. 2004; Nagasawa et al. 2005; Tanaka et al. 2007; Milberg et al. 2008; Johnson et al. 2010; Milberg et al. 2012; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013). Lediglich Ozdemir et al. beschrieben eine gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität in Maus-Kardiomyozyten (Ozdemir et al. 2008).

Spontane Ca^{2+} -Freisetzungen gelten als proarrhythmisches Substrat. Dabei aktiviert die kurzzeitig gesteigerte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration den NCX1-Forward-Mode, der Ca^{2+} nach extrazellulär transportiert und einen Einwärtsstrom generiert. Dieser Einwärtsstrom bedingt eine temporäre Nachdepolarisation des Ruhepotentials, so dass eine sogenannte „delayed Afterdepolarization“ (DAD) entsteht. Überschreitet die Membrandepolarisation dabei einen kritischen Schwellenwert, wird durch Reaktivierung von Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen nach einem alles oder nichts Prinzip ein spontanes Aktionspotential ausgelöst, das sich ebenfalls als spontane Ca^{2+} -Freisetzung abbildet (Pogwizd et al.

1999; Pott et al. 2012) (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988; Sipido et al. 2007)). Dies resultiert in getriggelter Aktivität, die für ektope ventrikuläre Tachykardien verantwortlich ist, aber auch in Form von Extrasystolen Reentry-Tachykardien induzieren kann (zur Übersicht siehe (Janse 2004)). In Anbetracht dieser mechanistischen Hypothese zur Entstehung von Nachdepolarisationen scheint der Befund einer Hemmung von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen im OE einen plausiblen antiarrhythmischen Effekt von SEA0400 abzubilden.

Das Phänomen der Oszillationen im Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten stellte sich vornehmlich im OE dar, während es nicht im KO observiert wurde. Zudem war die Oszillations-Amplitude und -Dauer im OE unter basalen Bedingungen deutlich ausgeprägter als in den anderen Genotypen, in denen lediglich singuläre Wiederaufstriche der Ca^{2+} -Konzentration im abfallenden Schenkel des Koffeinstoßes aufgezeichnet wurde. Während der Koffein-Applikation wird die Ca^{2+} -Elimination beinahe ausschließlich durch NCX1 getragen. Der NCX1-Forward-Mode führt dabei zu einer Na^+ -Akkumulation und generiert einen depolarisierenden Einwärtsstrom, der neben dem NCX1-Reverse-Mode auch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle spannungsabhängig reaktiveren könnte. In der Folge würde Ca^{2+} wieder nach intrazellulär gelangen und die kurzfristigen Wiederaufstriche im Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten bedingen. Im OE ist sowohl die NCX1- als auch die L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Aktivität gesteigert, was die in Zahl und Form ausgeprägteren Oszillationen erklären könnte. Ein umgekehrtes Bild stellt sich im KO dar. Ähnliche Befunde wurden in Patch-Clamp-Versuchen observiert (Reuter et al. 2004). Depolarisierende Spannungskommandos führten im OE zu einer oszillierenden Ca^{2+} -Konzentration, die durch den NCX1-Inhibitor Nickel unterdrückt wurden. Die Autoren vermuteten, dass der NCX1-Reverse-Mode eine SR Ca^{2+} -Überladung induziert, die die repetitiven Ca^{2+} -Freisetzungen bedingt. Da während Koffein-Applikation das SR als funktionelles Ca^{2+} -Reservoir ausgeschaltet ist, scheint unter unseren Versuchsbedingungen der transmembranöse Ca^{2+} -Transport die Ursache der Oszillationen zu sein. Da in beiden Szenarien das Auftreten von Oszillationen durch die NCX1-Inhibition verringert wurde und der WT_{OE} , WT_{KO} und KO signifikant seltener betroffen waren, ist ein NCX1-abhängiger Mechanismus wahrscheinlich.

b) Proarrhythmischer Effekt von SEA0400 in Wildtyp- und KO-Tieren

Unter basalen Bedingungen war im KO sowohl die Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle, als auch die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen tendenziell, aber nicht signifikant niedriger als im WT_{KO} (siehe Abb. 15, Seite 52 und Abb.

16, Seite 54). Diese Befunde decken sich mit einer vorangegangenen Arbeit (Bögeholz et al. 2015).

Im Gegensatz zu dem im OE beobachteten protektiven Effekt, induzierte SEA0400 im KO und in den beiden Wildtyp-Populationen keine weitere Verminderung der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen. Im Gegenteil: Sowohl die Häufigkeit der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen, als auch die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen nahm zu. Zudem stieg im KO die Anzahl der Zellen, die unter SEA0400 Hyperkontraktionen mit folgendem Zelltod aufwiesen gegenüber dem OE deutlich an (siehe Abb. 17, Seite 55). Ebenso wurden in den beiden Wildtypen mehr Zellen mit Hyperkontraktionen nach Applikation von SEA0400 beobachtet als im OE – wenn auch weniger als im KO. Diese Befunde sind angesichts der Rolle von NCX1 in der Entstehung von Herzrhythmusstörungen und der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde im OE überraschend. Es stellt sich die Frage, warum SEA0400 in Wildtyp- und KO-Zellen – also in Gegenwart normaler bzw. verminderter NCX1-Expression – einen proarrhythmischen Effekt induziert.

Der supprimierende Effekt von SEA0400 auf NCX1 wirkt unter diesen Bedingungen offenbar nicht mehr protektiv, sondern die akute Inhibition vielmehr schädigend. Ähnliche Resultate beobachteten Ozdemir et al. Nach Applikation von SEA0400 kam es, anders als in Schweine-Kardiomyozyten, in einem Mausmodell zu einer erhöhten spontanen Ca^{2+} -Aktivität (Ozdemir et al. 2008). In dieser Studie wurde, genau wie im KO und den Wildtyp-Mausmodellen der vorliegenden Arbeit, eine gesteigerte SR Ca^{2+} -Beladung gemessen. Die Autoren führten die erhöhte spontane Ca^{2+} -Aktivität auf die durch SEA0400 induzierte SR Ca^{2+} -Akkumulation zurück. Es ist bekannt, dass eine ausgeprägtere SR Ca^{2+} -Beladung die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 steigert (Lukyanenko et al. 1996) und diese zunehmende Ca^{2+} -Sensitivität in spontane Ca^{2+} -Freisetzungen übersetzt wird (Wier and Blatter 1991; Williams et al. 1992) (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Demnach scheint es plausibel, dass der Befund einer erhöhten Anfälligkeit für spontane Ca^{2+} -Freisetzungen im KO, WT_{KO} und WT_{OE} auf der SR Ca^{2+} -Akkumulation durch SEA0400 beruht.

Allerdings steigt die SR Ca^{2+} -Beladung auch im OE an, in dem SEA0400 jedoch einen antiarrhythmischen Effekt entfaltete. Trotz einer gesteigerten SR Ca^{2+} -Beladung sank die Häufigkeit von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen. Am ehesten gründen sich diese Befunde auf der unterschiedlichen NCX1-Aktivität der Genotypen. Betrachtet man die in den Kaffeinstößen gemessene Ca^{2+} -Extrusionskapazität, also die Aktivität des NCX1-

Forward-Modes, aller vier Genotypen unter SEA0400, so fällt auf, dass diese in den beiden Wildtypen und im KO auf ein Niveau sank, das deutlich geringer war als im KO unter Basalbedingungen, also in Abwesenheit von SEA0400. In diesen drei Mausmodellen mit unveränderter bzw. reduzierter NCX1-Expression resultierte ein proarrhythmisches Verhalten. Auffällig ist, dass die spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen pro Zelle und die Fraktion der Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen, relativ gesehen, am stärksten im KO anstiegen, der unter SEA0400 die geringste NCX1-Aktivität aufwies. Auch die Ca^{2+} -Extrusionskapazität des OE wurde durch SEA0400 reduziert. Dennoch war von allen vier untersuchten Mauspopulationen die unter SEA0400 gemessene residuale Ca^{2+} -Extrusion im OE immer noch am größten. Wie bereits diskutiert, verschiebt sich durch SEA0400 das Ca^{2+} -Gleichgewicht in Richtung Ca^{2+} -Influx. Ein suffizienter Ca^{2+} -Efflux ist jedoch für die myozytäre Ca^{2+} -Homöostase essentiell. Im WT_{OE} , WT_{KO} und noch stärker im KO könnte sich daher durch die Applikation von SEA0400 eine nicht zu korrigierende Ca^{2+} -Akkumulation entwickeln. Eine übermäßige Ca^{2+} -Akkumulation kann über eine gesteigerte SR Ca^{2+} -Beladung hinaus auch das diastolischen Ca^{2+} -Niveau oder die Ca^{2+} -Konzentration im dyadischen Spalt erhöhen. Dementsprechend könnte, im Sinne eines vermehrten „Trigger“- Ca^{2+} , die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 erhöht und eine Steigerung der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen ausgelöst werden. Im OE hingegen, indem eine größere Ca^{2+} -Extrusionskapazität in Gegenwart von SEA0400 verbleibt, scheint dieser Mechanismus nicht zum Tragen zu kommen.

Das vermehrte Vorkommen von Hyperkontraktionen mit Zelltod im KO unter $1 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$ SEA0400 stützt diese Hypothese ebenfalls. Die videooptisch beobachteten Hyperkontraktionen gingen mit einem oszillierenden Verlauf der ansteigenden Ca^{2+} -Konzentration einher. Die betroffenen KO-Zellen schienen somit unter SEA0400 nicht in der Lage Ca^{2+} suffizient aus dem Zytosol zu entfernen und das diastolische Ca^{2+} -Niveau wiederherzustellen. Daraus resultierten ungeordnete Kontraktionen durch repetitive Ca^{2+} -Konzentrations-Schwankungen und letztlich der Ca^{2+} -induzierte Zelltod. Dieses Phänomen trat signifikant häufiger im KO auf, der unter SEA0400 die geringste NCX1-Aktivität und damit Ca^{2+} -Extrusionskapazität aufwies. Vice versa war die Neigung zu Hyperkontraktionen unter SEA0400 am schwächsten im OE ausgeprägt.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten legen nahe, dass die Substanz SEA0400 nicht vorbehaltlos als antiarrhythmisch betrachtet werden kann. Vielmehr lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass ein antiarrhythmischer Effekt von SEA0400 ein Mindestniveau an NCX1-Expression voraussetzt. Es zeigt sich weiterhin, dass bei zu geringer NCX-Expression ein proarrhythmischer Effekt aufzutreten scheint.

Die Tatsache, dass dieser proarrhythmische Effekt auch bei normalem NCX1-Expressionsniveau in den beiden Wildtyp-Populationen beobachtet wurde, scheint zunächst im Widerspruch zu vorpublizierten Studien zu stehen, die einen neutralen oder antiarrhythmischen Effekt von SEA0400 in verschiedenen Wildtyp-Tieren zeigten. Allerdings handelt es sich bei diesen Studien nahezu ausschließlich um Experimente an höheren Säugetieren (Nagy et al. 2004; Nagasawa et al. 2005; Milberg et al. 2008; Johnson et al. 2010; Milberg et al. 2012; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013). Lediglich eine Studie verwendete ebenfalls ein Mausmodell, in dem – wie auch in der vorliegenden Arbeit – eine gesteigerte Ca^{2+} -Aktivität beobachtet wurde (Ozdemir et al. 2008). Die Ursachen der beobachteten unterschiedlichen Arrhythmie-Wirkungen von SEA0400 zwischen Mäusen und höheren Säugetieren könnten in deren Ca^{2+} -Dynamik liegen. Wie bereits beschrieben (siehe 1.3.3, Seite 6 und 5.3, Seite 60) ist der Beitrag von NCX1 und SERCA zur Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol zwischen den Spezies unterschiedlich ausgeprägt (zur Übersicht siehe (Bers 2002)). Der geringere Anteil von NCX1 an der Ca^{2+} -Elimination legt nahe, dass in Mäusen bereits unter Normalbedingungen eine nur geringe NCX1-Aktivität besteht. Eine Hemmung der NCX1-Aktivität könnte folglich eher zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung führen als in höheren Säugetieren mit einer größeren Extrusions-„Reservekapazität“.

5.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

a) Spezifität von SEA0400

Zu dem hier gezeigten Effekt von SEA0400 im OE bleibt einschränkend festzuhalten, dass SEA0400 kein absolut spezifischer NCX1-Inhibitor ist (Reuter et al. 2002a). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, eine zusätzliche Reduktion von I_{Ca} durch SEA0400 (Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013), die für sich bereits einen antiarrhythmischen Effekt hervorrufen könnte (Bourgonje et al. 2013). Obwohl die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen allenfalls eine geringe I_{Ca} -Inhibition bewirken (Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Bourgonje et al. 2013), ist ein kontaminierender Einfluss nicht auszuschließen. Dieser mögliche pleiotrope Effekt wird in der Literatur jedoch als geringer bewertet als die NCX1-Inhibition (Birinyi et al. 2005; Ozdemir et al. 2008; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013). Zudem zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit keine Reduktion systolischen Ca^{2+} -Transienten durch SEA0400, so dass die NCX1-Forward-Mode-Inhibition als relevanter einzustufen ist als die I_{Ca} -Inhibition.

b) Einfluss von spontanen Ca²⁺-Freisetzungen auf das Membranpotential

In der vorliegenden Studie wurden keine Messungen des Membranpotentials durchgeführt. Somit verbleibt eine Rest-Unsicherheit, ob die in dieser Studie beobachteten pro- bzw. antiarrhythmischen Effekte von SEA0400 tatsächlich einen Einfluss auf das Auftreten von Nachdepolarisation, spontanen Aktionspotentialen oder Rhythmusstörungen auf Ganzherzebene haben. Da die hier erfassten spontanen Ca²⁺-Freisetzungen als funktionelles Substrat für die Entstehungen von Nachdepolarisationen bzw. als Ausdruck von spontanen Aktionspotentialen mit geordneter, vorzeitiger Ca²⁺-Freisetzung gelten, ist dies jedoch anzunehmen (Pogwizd et al. 1999; Pott et al. 2012) (zur Übersicht siehe (January and Fozzard 1988; Sipido et al. 2007)). Zukünftige Studien, die den Effekt von SEA0400 auf das Membranpotential bzw. Rhythmusstörungen des ganzen Herzens an Mäusen mit veränderter NCX1-Expression erfassen, sind nötig, um dies abschließend zu klären.

c) Übertragbarkeit der Befunde auf andere Proarrhythmie-Modelle und die menschliche Herzmuskelphysiologie

Weiterhin ist die klinisch-translationale Übertragbarkeit der in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht uneingeschränkt und unkritisch möglich, da Unterschiede bezüglich der zellulären Elektrophysiologie und der Herzmuskelphysiologie im Gesamten zwischen Mensch und Maus bestehen. Die myokardiale Elektrophysiologie des Menschen unterscheidet sich von der der Maus, u.a. durch ein deutlich längeres Aktionspotential (zur Übersicht (Nerbonne 2004; Milani-Nejad and Janssen 2014)). Auch bei anderen höheren Säugetieren findet sich diese Befundkonstellation. Im Hund- und Kaninchenmodell sind dem Menschen ähnlichere elektrophysiologische Eigenschaften zu finden als in der Maus (zur Übersicht (Milani-Nejad and Janssen 2014)). Weitere Unterschiede bestehen, wie bereits erörtert, in der Ca²⁺-Dynamik zwischen Maus und höheren Säugetieren (siehe 1.3.3, Seite 6; 5.3, Seite 60 und 5.4, Seite 64). Dennoch ist die spezifische Funktion und die Membranbiophysik von NCX1 in den genannten Spezies vergleichbar (Bers 2002), so dass auch in höheren Säugetieren eine Abhängigkeit der inotropen und arrhythmogenen Wirkung von SEA0400 durch die NCX1-Expression zu erwarten ist.

Bei der Interpretation der in dieser Arbeit erhobenen Befunde ist zu beachten, dass die verwendeten Mausmodelle einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen. So findet sich im OE und WT_{OE} der genetische Hintergrund C57BL/6, im KO und WT_{KO} der gemischte Hintergrund C57BL/6 bzw. CD1. Entsprechend ist die direkte Vergleichbarkeit von OE und WT_{OE} gegenüber WT_{KO} und KO eingeschränkt, da unterschiedliche

elektrophysiologische Eigenschaften nicht ausgeschlossen werden können (Waldeyer et al. 2009). Daher wurden in der vorliegenden Studie Direktvergleiche lediglich zwischen dem jeweiligen transgenen Mausmodell und seinem korrespondierenden Wildtyp mit identischem genetischen Hintergrund angestellt.

5.6 Schlussfolgerungen

Auf der Suche nach neuen Strategien in der Behandlung von Herzrhythmusstörungen bietet sich NCX1 als experimentelles pharmakologisches Ziel an. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von isolierter, chronisch veränderter NCX1-Expression auf die Wirkung von SEA0400 untersucht. Die NCX1-Aktivität, die Kalzitropie als indirekter Parameter der Inotropie und die Rate an spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen änderten sich in Abhängigkeit von der NCX1-Expression unterschiedlich ausgeprägt. SEA0400 inhibierte in allen Genotypen den NCX1-Forward-Mode und induzierte einen Anstieg der SR Ca^{2+} -Beladung. In den beiden Wildtypen und im KO wurde dementsprechend ein positiv inotroper Effekt beobachtet, während sich der systolische Ca^{2+} -Transient im OE nicht änderte. Zudem zeigte sich ausschließlich im OE – also in Gegenwart erhöhter NCX1-Expression – ein antiarrhythmischer Effekt, während bei der niedrigeren NCX1-Expression der Wildtypen und des KO ein proarrhythmischer Effekt auftrat. In diesem Sinne legen unsere Befunde nahe, dass es für eine antiarrhythmische Wirkung von SEA0400 ein NCX1-Expressions-Optimum gibt (siehe Tab. 15, Seite 71).

Erste Studien an Tiermodellen mit SEA0400 zeigten vornehmlich positive Ergebnisse. SEA0400 entfaltete ein hauptsächlich antiarrhythmisches Wirkprofil bei unbeeinflusster Hämodynamik (Nagy et al. 2004; Nagasawa et al. 2005; Tanaka et al. 2007; Milberg et al. 2008; Johnson et al. 2010; Milberg et al. 2012; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013). Interessanterweise handelte es sich hierbei um Arbeiten an höheren Säugetieren, deren Ca^{2+} -Eliminationskapazität aus dem Zytosol weniger durch NCX1 limitiert ist. Höhere Säugetiere scheinen, mutmaßlich wegen ihrer geringeren Abhängigkeit von der NCX1-getragenen Ca^{2+} -Extrusion, weniger anfällig gegenüber den nachteiligen Effekten von SEA0400 zu sein. Darüber hinaus weisen Patienten mit Vorhofflimmern oder einer Herzinsuffizienz, die eine mögliche Zielpopulation für eine therapeutische NCX1-Inhibition sein könnten, erhöhte NCX1-Expressionslevel auf (Hasenfuss 1998; Neef et al. 2010; Voigt et al. 2012).

Folglich sollte die in dieser Studie erhobene Beobachtung eines nachteiligen Effektes von SEA0400 an Mäusen mit normalem NCX1-Expressionsniveau die Rolle von

SEA0400 als potentielles zukünftiges Therapeutikum nicht generell in Frage stellen. Weitere Studien sind nötig, um die genauen Voraussetzungen zu klären, unter denen SEA0400 einen arrhythmischen und wenn möglich positiv oder neutralen inotropen Effekt entfaltet.

NCX1-Expression	310%	100%	100%	50%
Einfluss von SEA0400	OE	WT_{OE}	WT_{KO}	KO
NCX1-Aktivität	-	-	-	-
SR Ca ²⁺ -Beladung	+	+	+	+
Systolischer Ca ²⁺ -Transient	+/-	+	+	+
Proarrhythmischer Effekt	-	+	+	++
Antiarrhythmischer Effekt	+	-	-	-

Tab. 15: Schlüsselbefunde zum Einfluss von SEA0400

6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit eine der häufigsten Todesursachen (Mendis and World Health Organization 2014), wobei insbesondere Herzrhythmusstörungen eine zentrale Bedeutung einnehmen (Bayés de Luna et al. 1989; Zheng et al. 2001; Koplan and Stevenson 2009; Go et al. 2014) (zur Übersicht siehe (Myerburg et al. 1993; Pugsley 2002)). Die Herzinsuffizienz geht mit einer erhöhten Aktivität des kardialen NCX1 einher (Hasenfuss 1998) und ist mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Herzrhythmusstörungen verbunden. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass eine erhöhte NCX1-Aktivität ein unabhängiger Faktor in der Arrhythmogenese ist (Pott et al. 2012). Daher gilt NCX1 als experimentelles pharmakologisches Ziel zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen.

SEA0400 ist ein pharmakologischer NCX1-Inhibitor. In tierexperimentellen Studien an höheren Säugetieren konnte ein vornehmlich antiarrhythmischer Effekt beobachtet werden (Nagy et al. 2004; Nagasawa et al. 2005; Tanaka et al. 2007; Milberg et al. 2008; Johnson et al. 2010; Milberg et al. 2012; Zhao et al. 2012; Bourgonje et al. 2013), während an einem Mausmodell eine proarrhythmische Wirkung resultierte (Ozdemir et al. 2008).

Um den Effekt pharmakologischer NCX1-Inhibition auf das Inotropie- und Arrhythmieverhalten in Abhängigkeit veränderter NCX1-Expression zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit NCX1-Überexpressor- und -Knockout-Mausmodelle mit erhaltener Ca^{2+} -Homöostase und ohne Zeichen der Herzinsuffizienz (Pott et al. 2012, Bögeholz et al. 2015) untersucht. Unter Verwendung der Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffe Fluo-4 AM und Indo-4 AM wurde das Kalzium-Imaging-Verfahren in elektrisch feldstimulierten ventrikuläre Kardiomyozyten eingesetzt.

In Koffeinstoß-Experimenten ging die Applikation von 1 μM SEA0400 in allen Genotypen mit einer verlangsamten Abfallkinetik des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten, also einer Inhibition der NCX1-Aktivität einher. Die SR Ca^{2+} -Beladung erhöhte sich durch Applikation von 1 μM SEA0400 in allen Mauslinien unabhängig von der NCX1-Expression. In feldstimulierten ventrikulären Myozyten wurde dies im KO, WT_{KO} und WT_{OE} dosisabhängig in einen positiv kalzitropen Effekt übersetzt, nicht jedoch im OE. Unter basalen Bedingungen war die spontane Ca^{2+} -Aktivität als proarrhythmisches Korrelat im OE höher als im WT_{OE} , während im KO im Vergleich zum WT_{KO} kein signifikanter Unterschied bestand. 1 μM SEA0400 verringerte im OE die Häufigkeit der spontanen Ca^{2+} -Aktivität. Demgegenüber stieg die spontane Ca^{2+} -Aktivität im KO, WT_{KO} und WT_{OE} unter SEA0400

an. Zusätzlich kam es vorwiegend im KO nach Applikation von 1 μM und 3 μM SEA0400 zu einer deutlichen Zunahme an Hyperkontraktionen mit folgendem Zelltod.

Die erhobenen Befunde legen nahe, dass sowohl die antiarrhythmische als auch die inotrope Wirkung von SEA0400 direkt vom Ausmaß der NCX1-Expression abhängig ist. Im proarrhythmischen Phänotyp des OE entfaltet die NCX1-Inhibition einen antiarrhythmischen Effekt. Die zusätzliche Applikation von SEA0400 bei geringerer NCX1-Aktivität in Wildtypen und insbesondere im KO wirkt hingegen proarrhythmisch. Möglicherweise wird dies insbesondere im KO durch eine zu starke Suppression der bestehenden Ca^{2+} -Extrusionskapazität durch Kombination der chronischen genetischen mit der akuten pharmakologischen NCX1-Inhibition bedingt. Unter diesen Bedingungen können die Kardiomyozyten keine suffiziente Ca^{2+} -Extrusion aufrechterhalten. In der Folge akkumuliert Ca^{2+} und wirkt als Trigger für die gesteigerte spontane Ca^{2+} -Aktivität, die letztlich in Arrhythmien und dem Ca^{2+} -induzierten Zelltod mündet.

Die vorliegende Arbeit legt somit nahe, dass SEA0400 insbesondere bei erhöhter NCX1-Expression antiarrhythmisch und inotrop neutral, bei erniedrigter NCX1-Expression jedoch proarrhythmisch und positiv inotrop wirkt. Spezies-abhängige Unterschiede müssen jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Im Gegensatz zu den hier verwendeten murinen Modellen ist es denkbar, dass der proarrhythmische Effekt von SEA0400 in höheren Säugetieren, in denen NCX1 einen größeren Anteil an der Ca^{2+} -Elimination hat, geringer ist und möglicherweise von einem antiarrhythmischen Effekt überwogen wird. Dies könnte insbesondere für Patienten mit Arrhythmie assoziierten Krankheitsbildern, die mit einer erhöhten NCX1-Expression einhergehen, wie z.B. dem Vorhofflimmern oder der Herzinsuffizienz, gelten. Weitere Studien an höheren Säugetieren sind nötig, um die genauen Voraussetzungen eines antiarrhythmischen, wenn möglich positiv oder neutralen inotropen Effekts von SEA0400 zu untersuchen, um eine günstige Wirkung in einem potentiellen Patientenkollektiv sicherzustellen.

7. Literaturverzeichnis

- Abernethy DR, Schwartz JB (1999) Calcium-Antagonist Drugs. *N Engl J Med* 341:1447–1457
- Adachi-Akahane S, Lu L, Li Z, Frank JS, Philipson KD, Morad M (1997) Calcium Signaling in Transgenic Mice Overexpressing Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *J Gen Physiol* 109:717–729
- Allen JC, Harris RA, Schwartz A (1971) The nature of the transport ATPase-digitalis complex. II. Some species differences and ouabain “exchange” characteristics. *J Mol Cell Cardiol* 3:297–300
- Altamirano J, Li Y, DeSantiago J, Piacentino V, Houser SR, Bers DM (2006) The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na⁺-Ca²⁺ exchanger function. *J Physiol* 575:845–854
- Amran MS, Hashimoto K, 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. *J Pharmacol Exp Ther* 310:83–89
- Antoons G, Vangheluwe P, Volders PGA, Bito V, Holemans P, Ceci M, Wuytack F, Caroni P, Mubagwa K, Sipido KR (2006) Increased phospholamban phosphorylation limits the force-frequency response in the MLP^{-/-} mouse with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 40:350–360
- Axelsen PH, Bassingthwaighe JB (1988) A constraint on possible stoichiometries of myocardial sodium-calcium exchange. *Basic Res Cardiol* 83:314–326
- Barry WH, Bridge JH (1993) Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation* 87:1806–1815
- Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994a) Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476:279–293
- Bassani JW, Qi M, Samarel AM, Bers DM (1994b) Contractile arrest increases sarcoplasmic reticulum calcium uptake and SERCA2 gene expression in cultured neonatal rat heart cells. *Circ Res* 74:991–997
- Bassani JW, Yuan W, Bers DM (1995) Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 268:C1313–1319

- Bayés de Luna A, Coumel P, Leclercq JF (1989) Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *Am Heart J* 117:151–159
- Bers DM (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415:198–205
- Bers DM, Bassani JWM, Bassani RA (1996) Na-Ca Exchange and Ca Fluxes during Contraction and Relaxation in Mammalian Ventricular Muscles. *Ann N Y Acad Sci* 779:430–442
- Bers DM, Despa S (2006) Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^+ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* 100:315–322
- Besch HR, Watanabe AM (1978) The positive inotropic effect of digitoxin: independence from sodium accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 207:958–965
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1993) Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73:379–385
- Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási PP (2005) Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na^+/Ca^{2+} exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:63–70
- Birinyi P, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp JG, Varró A, Nánási PP, Magyar J (2008) The Na^+/Ca^{2+} exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca^{2+} transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 78:476–484
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiol Rev* 79:763–854
- Blomström-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, Campbell WB, Haines DE, Kuck KH, Lerman BB, Miller DD, Shaeffer CW Jr, Stevenson WG, Tomaselli GF, Antman EM, Smith SC Jr, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Russell RO Jr, Priori SG, Blanc J-J, Budaj A, Burgos EF, Cowie M, Deckers JW, Garcia MAA, Klein WW, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais JCA, Oto A, Smiseth O, Trappe H-J, American College of Cardiology, American Heart Association

Task Force on Practice Guidelines, European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Supraventricular Arrhythmias (2003) ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Supraventricular Arrhythmias). *Circulation* 108:1871–1909

Bögeholz N, Muszynski A, Pott C (2012) The physiology of cardiac calcium handling. *Wien Med Wochenschr* 162:278–282

Bögeholz N, Pauls P, Bauer BK, Schulte JS, Dechering DG, Frommeyer G, Kirchhefer U, Goldhaber JI, Müller FU, Eckardt L, Pott C (2015) Suppression of Early and Late Afterdepolarizations by Heterozygous Knockout of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in a Murine Model. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 8:1210–1218

Bögeholz N (2015) Beeinflussung der Ouabain-vermittelten proarrhythmischen und inotropen Effekte durch das Expressionsniveau des Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX1): Studien an isolierten Kardiomyozyten von transgenen NCX1-Überexpressor-Mäusen. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, verteidigt am 22.10.2015

Bonow RO, Bennett S, Casey Jr DE, Ganiats TG, Hlatky MA, Konstam MA, Lambrew CT, Normand S-LT, Piña IL, Radford MJ, Smith AL, Stevenson LW, Bonow RO, Bennett SJ, Burke G, Eagle KA, Krumholz HM, Lambrew CT, Linderbaum J, Masoudi FA, Normand S-LT, Ritchie JL, Rumsfeld JS, Spertus JA (2005) ACC/AHA Clinical Performance Measures for Adults With Chronic Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to Develop Heart Failure Clinical Performance Measures) Endorsed by the Heart Failure Society of America. *J Am Coll Cardiol* 46:1144–1178

Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M (2013) Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging. *Cold Spring Harb Protoc* 2013:83-99

- Bouchard R, Omelchenko A, Le HD, Choptiany P, Matsuda T, Baba A, Takahashi K, Nicoll DA, Philipson KD, Hnatowich M, Hryshko LV (2004) Effects of SEA0400 on Mutant NCX1.1 Na⁺-Ca²⁺ Exchangers with Altered Ionic Regulation. *Mol Pharmacol* 65:802–810
- Bourgonje VJA, Vos MA, Ozdemir S, Doisne N, Acsai K, Varro A, Sztojkov-Ivanov A, Zupko I, Rauch E, Kattner L, Bito V, Houtman M, Nagel R van der, Beekman JD, Veen TAB van, Sipido KR, Antoons G (2013) Combined Na⁺/Ca²⁺ Exchanger and L-Type Calcium Channel Block as a Potential Strategy to Suppress Arrhythmias and Maintain Ventricular Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6:371–379
- Boyett MR (2009) “And the beat goes on” The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol* 94:1035–1049
- Brüggenjürgen B, Kohler S, Ezzat N, Reinhold T, Willich SN (2013) Cost effectiveness of antiarrhythmic medications in patients suffering from atrial fibrillation. *Pharmacoeconomics* 31:195–213
- Buxton AE, Lee KL, Fisher JD, Josephson ME, Prystowsky EN, Hafley G (1999) A Randomized Study of the Prevention of Sudden Death in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 341:1882–1890
- Camm AJ, Lip GYH, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, Hindricks G, Kirchhof P, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) (2012) 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 33:2719–2747
- Capucci A, Aschieri D, Villani G q. (1998) Clinical Pharmacology of Antiarrhythmic Drugs. *Drugs Aging* 13:51–70
- Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y-H, McAnulty JH, Zheng Z-J, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL (2014) Worldwide Epidemiology of Atrial Fibrillation: A Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 129:837–847
- Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA (2005) Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. *Lab Anim* 39:137–161

- Connolly SJ, Camm AJ, Halperin JL, Joyner C, Alings M, Amerena J, Atar D, Avezum Á, Blomström P, Borggrefe M (2011) Dronedronone in high-risk permanent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 365:2268–2276
- Coraboeuf E, Nargeot J (1993) Electrophysiology of human cardiac cells. *Cardiovasc Res* 27:1713–1725
- Crespo LM, Grantham CJ, Cannell MB (1990) Kinetics, stoichiometry and role of the Na–Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* 345:618–621
- Cross HR, Lu L, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E (1998) Overexpression of the Cardiac Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Increases Susceptibility to Ischemia/Reperfusion Injury in Male, but Not Female, Transgenic Mice. *Circ Res* 83:1215–1223
- Davy J-M, Herold M, Hoglund C, Timmermans A, Alings A, Radzik D, Van Kempen L (2008) Dronedronone for the control of ventricular rate in permanent atrial fibrillation: The Efficacy and safety of dRonedArone for The cOntrol of ventricular rate during atrial fibrillation (ERATO) study. *Am Heart J* 156:527.e1–527.e9
- Despa S, Bers DM (2013) Na⁺ transport in the normal and failing heart — Remember the balance. *J Mol Cell Cardiol* 61:2–10
- Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245:C1–14
- Fabiato A, Fabiato F (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 40:119–129
- Farkas AS, Acsai K, Nagy N, Tóth A, Fülöp F, Seprényi G, Birinyi P, Nánási PP, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A (2008) Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, but fails to influence the contractility of the rabbit heart. *Br J Pharmacol* 154:93–104
- Farkas AS, Makra P, Csík N, Orosz S, Shattock MJ, Fülöp F, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A (2009) The role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, INa and ICaL in the genesis of dofetilide-induced torsades de pointes in isolated, AV-blocked rabbit hearts. *Br J Pharmacol* 156:920–932
- Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Böhm M (1996) Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94:992–1002

- Gee KR, Brown KA, Chen W-NU, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium* 27:97–106
- Gialama F, Prezerakos P, Maniadakis N (2014) The cost effectiveness of implantable cardioverter defibrillators: a systematic review of economic evaluations. *Appl Health Econ Health Policy* 12:41–49
- Glitsch HG (2001) Electrophysiology of the Sodium-Potassium-ATPase in Cardiac Cells. *Physiol Rev* 81:1791–1826
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2014) Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation* 129:399–410
- Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, Olshansky B, Singh B, Collard HR, Murphy E (2007) A Practical Guide for Clinicians Who Treat Patients with Amiodarone: 2007. *Heart Rhythm* 4:1250–1259
- Harrison DC (1985) Antiarrhythmic drug classification: New science and practical applications. *Am J Cardiol* 56:185–187
- Hasenfuss G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37:279–289
- Haworth RA, Goknur AB, Hunter DR, Hegge JO, Berkoff HA (1987) Inhibition of calcium influx in isolated adult rat heart cells by ATP depletion. *Circ Res* 60:586–594
- Hilge M, Aelen J, Vuister GW (2006) Ca^{2+} regulation in the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger involves two markedly different Ca^{2+} sensors. *Mol Cell* 22:15–25
- Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol* 100:905–932

- Hohnloser SH, Crijns HJ, van Eickels M, Gaudin C, Page RL, Torp-Pedersen C, Connolly SJ (2009) Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 360:668–678
- Hohnloser SH, Woosley RL (1994) Sotalol. *N Engl J Med* 331:31–38
- Invitrogen™, Life Technologies (2010) Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters. <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/g002.pdf>. Accessed 6 Sep 2015
- Iwamoto T (2004) Forefront of Na⁺/Ca²⁺-Exchanger Studies: Molecular Pharmacology of Na⁺Ca²⁺ Exchange Inhibitors. *J Pharmacol Sci* 96:27–32
- Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T (2004a) The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. *Mol Pharmacol* 66:45–55
- Iwamoto T, Kita S, Shigekawa M (2002) [Functional analysis of Na⁺/Ca²⁺ exchanger using novel drugs and genetically engineered mice]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol Jpn* 120:91P–93P
- Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Imanaga I, Matsuda T, Baba A, Katsuragi T (2004b) Molecular Determinants of Na⁺/Ca²⁺ Exchange (NCX1) Inhibition by SEA0400. *J Biol Chem* 279:7544–7553
- Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Inoue Y, Taniguchi Y, Imanaga I, Shigekawa M (2001) Structural domains influencing sensitivity to isothiourea derivative inhibitor KB-R7943 in cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Mol Pharmacol* 59:524–531
- Iwamoto T, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M (2000) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca²⁺ affinity. *J Biol Chem* 275:38571–38580
- Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M (1996) A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 271:22391–22397
- Janse MJ (2004) Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 61:208–217

- January CT, Fozzard HA (1988) Delayed afterdepolarizations in heart muscle: mechanisms and relevance. *Pharmacol Rev* 40:219–227
- Johnson DM, Heijman J, Pollard CE, Valentin J-P, Crijns HJGM, Abi-Gerges N, Volders PGA (2010) I(Ks) restricts excessive beat-to-beat variability of repolarization during beta-adrenergic receptor stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 48:122–130
- Jordan MC, Henderson SA, Han T, Fishbein MC, Philipson KD, Roos KP (2010) Myocardial Function With Reduced Expression of the Sodium-Calcium Exchanger. *J Card Fail* 16:786–796
- Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horváth A, Acsai K, Biliczki P, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JG, Varró A, Virág L (2013) ORM-10103, a novel specific inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, decreases early and delayed afterdepolarizations in the canine heart. *Br J Pharmacol* 170:768–778
- Kettering K, Mewis C, Dörnberger V, Vonthein R, Bosch RF, Kühlkamp V (2002) Efficacy of metoprolol and sotalol in the prevention of recurrences of sustained ventricular tachyarrhythmias in patients with an implantable cardioverter defibrillator. *Pacing Clin Electrophysiol PACE* 25:1571–1576
- Kimura J, Noma A, Irisawa H (1986) Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 319:596–597
- Kimura J, Watano T, Kawahara M, Sakai E, Yatabe J (1999) Direction-independent block of bi-directional Na⁺/Ca²⁺ exchange current by KB-R7943 in guinea-pig cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 128:969–974
- Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S (2005) *Physiologie*. In: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. komplett überarbeitete Auflage. 133
- Køber L, Torp-Pedersen C, McMurray JJ, Gøtzsche O, Lévy S, Crijns H, Amlie J, Carlsen J (2008) Increased mortality after dronedarone therapy for severe heart failure. *N Engl J Med* 358:2678–2687
- Koplan BA, Stevenson WG (2009) Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death. *Mayo Clin Proc* 84:289–297
- Kupersmith J, Hoff P (1985) Occurrence and transmission of localized repolarization abnormalities in vitro. *J Am Coll Cardiol* 6:152–162

- Larbig R, Torres N, Bridge JHB, Goldhaber JI, Philipson KD (2010) Activation of reverse Na^+ - Ca^{2+} exchange by the Na^+ current augments the cardiac Ca^{2+} transient: evidence from NCX knockout mice. *J Physiol* 588:3267–3276
- Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW (1990) Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science* 248:283
- Lee C, Visen NS, Dhalla NS, Le HD, Isaac M, Choptiany P, Gross G, Omelchenko A, Matsuda T, Baba A, Takahashi K, Hnatowich M, Hryshko LV (2004) Inhibitory Profile of SEA0400 [2-[4-[(2,5-Difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline] Assessed on the Cardiac Na^+ - Ca^{2+} Exchanger, NCX1.1. *J Pharmacol Exp Ther* 311:748–757
- Levitsky DO, Nicoll DA, Philipson KD (1994) Identification of the high affinity $\text{Ca}^{(2+)}$ -binding domain of the cardiac $\text{Na}^{(+)}$ - Ca^{2+} exchanger. *J Biol Chem* 269:22847–22852
- Liao J, Li H, Zeng W, Sauer DB, Belmares R, Jiang Y (2012) Structural Insight into the Ion-Exchange Mechanism of the Sodium/Calcium Exchanger. *Science* 335:686–690
- Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998) Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274:H1335–1347
- Liu MS, Xuan YT (1986) Mechanisms of endotoxin-induced impairment in Na^+ - Ca^{2+} exchange in canine myocardium. *Am J Physiol* 251:R1078–1085
- Liu T, Brown DA, O'Rourke B (2010) Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 49:728–736
- Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, Weiss JN, Tomich JM, Philipson KD (1991) Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^{(+)}$ - Ca^{2+} exchanger. *J Biol Chem* 266:1014–1020
- Louch WE, Sejersted OM, Swift F (2010) There Goes the Neighborhood: Pathological Alterations in T-Tubule Morphology and Consequences for Cardiomyocyte Ca^{2+} Handling. *J Biomed Biotechnol* 2010:503906
- Lukyanenko V, Györke I, Györke S (1996) Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflüg Arch* 432:1047–1054

- Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR (2003) Differing cardioprotective efficacy of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 284:H903–H910
- Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A (2001) SEA0400, a Novel and Selective Inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger, Attenuates Reperfusion Injury in the in Vitro and in Vivo Cerebral Ischemic Models. *J Pharmacol Exp Ther* 298:249–256
- Matsuda T, Takuma K, Baba A (1997) Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: Physiology and Pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 74:1–20
- Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD (1993) Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3870–3874
- McGarry SJ, Scheufler E, Williams AJ (1995) Effect of R56865 on cardiac sarcoplasmic reticulum function and its role as an antagonist of digoxin at the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Br J Pharmacol* 114:231–237
- Mendis S, World Health Organization (2014) Global status report on noncommunicable diseases 2014
- Milani-Nejad N, Janssen PML (2014) Small and Large Animal Models in Cardiac Contraction Research: Advantages and Disadvantages. *Pharmacol Ther* 141:235–249
- Milberg P, Pott C, Fink M, Frommeyer G, Matsuda T, Baba A, Osada N, Breithardt G, Noble D, 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* 5:1444–1452
- Milberg P, Pott C, Frommeyer G, Fink M, Ruhe M, Matsuda T, Baba A, Klocke R, Quang TH, Nikol S, Stypmann J, Osada N, Müller FU, Breithardt G, Noble D, Eckardt L (2012) Acute inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reduces proarrhythmia in an experimental model of chronic heart failure. *Heart Rhythm* 9:570–578
- Mitra R, Morad M (1985) A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 249:H1056–H1060

- Mok N-S, Chan N-Y, Chiu AC-S (2004) Successful use of quinidine in treatment of electrical storm in Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol PACE* 27:821–823
- Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, Levine JH, Saksena S, Waldo AL, Wilber D, Brown MW, Heo M (1996) Improved Survival with an Implanted Defibrillator in Patients with Coronary Disease at High Risk for Ventricular Arrhythmia. *N Engl J Med* 335:1933–1940
- Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML (2002) Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* 346:877–883
- Mullins LJ (1977) A mechanism for Na/Ca transport. *J Gen Physiol* 70:681–695
- Mullins LJ (1981) Ca entry upon depolarization of nerve. *J Physiol (Paris)* 77:1139–1144
- Mullins LJ (1979) The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am J Physiol* 236:C103–110
- Myerburg RJ, Kessler KM, Castellanos A (1993) Sudden Cardiac Death: Epidemiology, Transient Risk, and Intervention Assessment. *Ann Intern Med* 119:1187–1197
- Nagasawa Y, Zhu B-M, Chen J, Kamiya K, Miyamoto S, Hashimoto K (2005) Effects of SEA0400, a Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in the in vivo dogs. *Eur J Pharmacol* 506:249–255
- Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Biliczki P, Acsai K, Bányász T, Nánási P, Papp JG, Varró A (2004) Selective inhibition of sodium–calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed afterdepolarization in canine heart. *Br J Pharmacol* 143:827–831
- Neco P, Rose B, Huynh N, Zhang R, Bridge JHB, Philipson KD, Goldhaber JI (2010) Sodium-calcium exchange is essential for effective triggering of calcium release in mouse heart. *Biophys J* 99:755–764
- Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010) CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca²⁺ Leak and Elevated Diastolic Ca²⁺ Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation. *Circ Res* 106:1134–1144

- Nerbonne JM (2004) Studying Cardiac Arrhythmias in the Mouse—A Reasonable Model for Probing Mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* 14:83–93
- Nerbonne JM, Guo W (2002) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13:406–409
- Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* 85:1205–1253
- Neyt M, Van Brabandt H, Devos C (2013) The cost-utility of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and critical appraisal of economic evaluations. *BMC Cardiovasc Disord* 13:78
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *Science* 250:562–565
- Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *J Biol Chem* 274:910–917
- Nishio M, Ruch SW, Wasserstrom JA (2002) Positive inotropic effects of ouabain in isolated cat ventricular myocytes in sodium-free conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2045–2053
- Ogata M, Iwamoto T, Tazawa N, Nishikawa M, Yamashita J, Takaoka M, Matsumura Y (2003) A novel and selective Na^+ / Ca^{2+} exchange inhibitor, SEA0400, improves ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Eur J Pharmacol* 478:187–198
- O'Neill SC, Donoso P, Eisner DA (1990) The role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]$ sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{caffeine}]_i$. *J Physiol* 425:55–70
- Oros A, Houtman M, Neco P, Gomez A, Rajamani S, Oosterhoff P, Attevelt N, Beekman J, Van Der Heyden M, Ver Donck L, Belardinelli L, Richard S, Antoons G, Vos M, for the CONTICA investigators (2010) Robust anti-arrhythmic efficacy of verapamil and flunarizine against dofetilide-induced TdP arrhythmias is based upon a shared and a different mode of action. *Br J Pharmacol* 161:162–175
- O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Käab S, Tunin R, Marbán E (1999) Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res* 84:562–570

- Ozdemir S, Bito V, Holemans P, Vinet L, Mercadier J-J, Varro A, Sipido KR (2008) Pharmacological Inhibition of Na/Ca Exchange Results in Increased Cellular Ca²⁺ Load Attributable to the Predominance of Forward Mode Block. *Circ Res* 102:1398–1405
- Pacifico A, Hohnloser SH, Williams JH, Tao B, Saksena S, Henry PD, Prystowsky EN (1999) Prevention of implantable-defibrillator shocks by treatment with sotalol. d,l-Sotalol Implantable Cardioverter-Defibrillator Study Group. *N Engl J Med* 340:1855–1862
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999) Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22:549–558
- Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY (1982) Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res* 50:287–293
- Philipson KD, Longoni S, Ward R (1988) Purification of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange protein. *Biochim Biophys Acta* 945:298–306
- Philipson KD, Nicoll DA (2000) Sodium-Calcium Exchange: A Molecular Perspective. *Annu Rev Physiol* 62:111–133
- Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G (1999) Ca²⁺ Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content in Isolated Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res* 85:38–46
- Podrid PJ (1995) Amiodarone: Reevaluation of an Old Drug. *Ann Intern Med* 122:689–700
- Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM (1999) Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Expression and Function in an Arrhythmogenic Rabbit Model of Heart Failure. *Circ Res* 85:1009–1019
- Pott C, Goldhaber JI, Philipson KD (2007a) Homozygous Overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger in Mice: Evidence for Increased Transsarcolemmal Ca²⁺ Fluxes. *Ann N Y Acad Sci* 1099:310–314
- Pott C, Henderson SA, Goldhaber JI, Philipson KD (2007b) Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Knock-out Mice: Plasticity of Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Ann N Y Acad Sci* 1099:270–275

- Pott C, Muszynski A, Ruhe M, Bögeholz N, Schulte JS, Milberg P, Mönning G, Fabritz L, Goldhaber JI, Breithardt G, Schmitz W, Philipson KD, Eckardt L, Kirchhof P, Müller FU (2012) Proarrhythmia in a non-failing murine model of cardiac-specific $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger overexpression: whole heart and cellular mechanisms. *Basic Res Cardiol*. 107(2):247
- Pugsley MK (2002) Antiarrhythmic drug development: Historical review and future perspective. *Drug Dev Res* 55:3–16
- Rea TD, Pearce RM, Raghunathan TE, Lemaitre RN, Sotoodehnia N, Jouven X, Siscovick DS (2004) Incidence of out-of-hospital cardiac arrest. *Am J Cardiol* 93:1455–1460
- Reeves JP, Hale CC (1984) The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* 259:7733–7739
- Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1996) Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 31:48–54
- Ren X, Philipson KD (2013) The topology of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol* 57:68–71
- Reuter H, Han T, Motter C, Philipson KD, Goldhaber JI (2004) Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: defects in excitation–contraction coupling. *J Physiol* 554:779–789
- Reuter H, Henderson SA, Han T, Matsuda T, Baba A, Ross RS, Goldhaber JI, Philipson KD (2002a) Knockout Mice for Pharmacological Screening Testing the Specificity of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange Inhibitors. *Circ Res* 91:90–92
- Reuter H, Henderson, Scott A. SA, Han T, Ross RS, Goldhaber JI, Philipson KD (2002b) The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger Is Essential for the Action of Cardiac Glycosides. *Circ Res* 90:305–308
- Roden DM (2003) Antiarrhythmic Drugs: Past, Present and Future. *Pacing Clin Electrophysiol* 26:2340–2348
- Rolf S, Bruns H-J, Wichter T, Kirchhof P, Ribbing M, Wasmer K, Paul M, Breithardt G, Haverkamp W, Eckardt L (2003) The ajmaline challenge in Brugada syndrome: diagnostic impact, safety, and recommended protocol. *Eur Heart J* 24:1104–1112
- Roos KP, Jordan MC, Fishbein MC, Ritter MR, Friedlander M, Chang HC, Rahgozar P, Han T, Garcia AJ, Maclellan WR, Ross RS, Philipson KD (2007) Hypertrophy and

- Heart Failure in Mice Overexpressing the Cardiac Sodium-Calcium Exchanger. *J Card Fail* 13:318–329
- Sääf A, Baars L, von Heijne G (2001) The internal repeats in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-related *Escherichia coli* protein YrbG have opposite membrane topologies. *J Biol Chem* 276:18905–18907
- Sagawa T, Sagawa K, Kelly JE, Tsushima RG, Wasserstrom JA (2002) Activation of cardiac ryanodine receptors by cardiac glycosides. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1118–1126
- Saksena S, Madan N (2003) Hybrid therapy of atrial fibrillation: algorithms and outcome. *J Interv Card Electrophysiol Int J Arrhythm Pacing* 9:235–247
- Santana LF, Gómez AM, Lederer WJ (1998) Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance. *Science* 279:1027–1033
- Sham JS, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H (1998) Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15096–15101
- Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM (2000) Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophys J* 78:334–343
- Shigekawa M, Iwamoto T (2001) Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchange Molecular and Pharmacological Aspects. *Circ Res* 88:864–876
- Singh BN, Connolly SJ, Crijns HJ, Roy D, Kowey PR, Capucci A, Radzik D, Aliot EM, Hohnloser SH (2007) Dronedronarone for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter. *N Engl J Med* 357:987–999
- Singh BN, Venkatesh N, Nademanee K, Josephson MA, Kannan R (1989) The historical development, cellular electrophysiology and pharmacology of amiodarone. *Prog Cardiovasc Dis* 31:249–280
- Singh BN, Williams EMV (1970) The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. *Br J Pharmacol* 39:657–667
- Sipido KR, Bito V, Antoons G, Volders PG, Vos MA (2007) Na/Ca Exchange and Cardiac Ventricular Arrhythmias. *Ann N Y Acad Sci* 1099:339–348

- Sipido KR, Maes M, Van de Werf F (1997) Low efficiency of Ca^{2+} entry through the $\text{Na}^{(+)}$ - Ca^{2+} exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode $\text{Na}^{(+)}$ - Ca^{2+} exchange. *Circ Res* 81:1034–1044
- Solaro RJ, Rarick HM (1998) Troponin and Tropomyosin Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments. *Circ Res* 83:471–480
- Steinbeck G (1992) [The pro-arrhythmia effects of anti-arrhythmia agents--theoretical and clinical aspects]. *Z Für Kardiologie* 81 Suppl 4:139–143
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994) Gene expression of the cardiac $\text{Na}^{(+)}$ - Ca^{2+} exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75:443–453
- Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Onishi M, Tanaka Y, Hamano-Takahashi A, Ota T, Kameo K, Matsuda T, Baba A (2003) Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, on myocardial ischemia–reperfusion injuries. *Eur J Pharmacol* 458:155–162
- Tanaka H, Namekata I, Takeda K, Kazama A, Shimizu Y, Moriwaki R, Hirayama W, Sato A, Kawanishi T, Shigenobu K (2005) Unique excitation–contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:526–534
- Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K (2002) Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol* 135:1096–1100
- Tanaka H, Shimada H, Namekata I, Kawanishi T, Iida-Tanaka N, Shigenobu K (2007) Involvement of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger in Ouabain-Induced Inotropy and Arrhythmogenesis in Guinea-Pig Myocardium as Revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci* 103:241–246
- Terracciano CM, Hancox JC (2013) ORM-10103: a significant advance in sodium-calcium exchanger pharmacology? *Br J Pharmacol* 170:765–767
- The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators (1989) Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N Engl J Med* 321:406–412

- The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators (1992) Effect of the antiarrhythmic agent moricizine on survival after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators. *N Engl J Med* 327:227–233
- Touboul P (2003) Dronedronone for prevention of atrial fibrillation: A dose-ranging study. *Eur Heart J* 24:1481–1487
- Vemuri R, Longoni S, Philipson KD (1989) Ouabain treatment of cardiac cells induces enhanced Na^+ - Ca^{2+} exchange activity. *Am J Physiol* 256:C1273–1276
- Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, Wehrens XHT, Dobrev D (2012) Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak and Increased Na^+ - Ca^{2+} Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation* 125:2059–2070
- Waldeyer C, Fabritz L, Fortmueller L, Gerss J, Damke D, Blana A, Laakmann S, Kreienkamp N, Volkery D, Breithardt G, Kirchhof P (2009) Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 Langendorff-perfused mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 104:523–533
- Wasserstrom JA, Vites AM (1996) The role of Na^+ - Ca^{2+} exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493 (Pt 2):529–542
- Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H (1996) A novel antagonist, No. 7943, of the Na^+ / Ca^{2+} exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 119:555–563
- Weber A, Herz R (1968) The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J Gen Physiol* 52:750–759
- Weber CR, Piacentino V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM (2002) Na^+ - Ca^{2+} exchange current and submembrane $[\text{Ca}^{2+}]$ during the cardiac action potential. *Circ Res* 90:182–189
- Wehrens XHT, Marks AR (2004) Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nat Rev Drug Discov* 3:565–574
- Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen P-S, Qu Z (2010) Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm* 7:1891–1899

- Wier WG, Blatter LA (1991) Ca^{2+} -oscillations and Ca^{2+} -waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 12:241–254
- Williams DA, Delbridge LM, Cody SH, Harris PJ, Morgan TO (1992) Spontaneous and propagated calcium release in isolated cardiac myocytes viewed by confocal microscopy. *Am J Physiol* 262:C731–742
- Williams EMV (1984) A Classification of Antiarrhythmic Actions Reassessed After a Decade of New Drugs. *J Clin Pharmacol* 24:129–147
- Yoshiyama M, Nakamura Y, Omura T, Hayashi T, Takagi Y, Hasegawa T, Nishioka H, Takeuchi K, Iwao H, Yoshikawa J (2004) Cardioprotective Effect of SEA0400, a Selective Inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger, on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J Pharmacol Sci* 95:196–202
- Zhao Z, Wen H, Fefelova N, Allen C, Baba A, Matsuda T, Xie L-H (2012) Revisiting the ionic mechanisms of early afterdepolarizations in cardiomyocytes: predominant by Ca waves or Ca currents? *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 302:H1636–H1644
- Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA (2001) Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 104:2158–2163
- Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Antman EM, Anderson JL, Hunt SA, Halperin JL, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Blanc J-J, Budaj A, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL, American College of Cardiology/American Heart Association Task Force, European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines, European Heart Rhythm Association, Heart Rhythm Society (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114:e385–484

8. Vorabpublikationen

8.1 Zeitschriftenartikel

Bögeholz N, Pauls P, Bauer BK, Schulte JS, Dechering DG, Frommeyer G, Kirchhefer U, Goldhaber JI, Müller FU, Eckardt L, Pott C (2015) Suppression of Early and Late Afterdepolarizations by Heterozygous Knockout of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in a Murine Model. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 8:1210–1218

Pott C, Bögeholz N, Pauls P, Bauer BK, Schulte JS, Frommeyer G, Dechering DG, Boknik P, Kirchhefer U, Eckardt L, Müller FU. Implications for the prognostic effect of digitalis in heart failure: Overexpression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger enhances ouabain mediated spontaneous Ca²⁺ activity but not ouabain induced positive calcitropy. Zur Publikation eingereicht.

Bögeholz N*, Schulte JS*, Kaese S*, Bauer BK, Pauls P, Dechering DG, Frommeyer G, Goldhaber JI, Kirchhefer U, Eckardt L, Müller FU, Pott C. The effects of SEA0400 on inotropy and proarrhythmia depend on the the Na⁺/Ca²⁺ exchanger function: Studies in NCX-transgenic murine models. Zur Publikation eingereicht. *Geteilte Erstautoren

8.2 Abstracts

Bauer BK, Bögeholz N, Pauls P, Schulte JS, Frommeyer G, Kaese S, Dechering D, Eckardt L, Müller FU, Pott C (2015) Pro- or antiarrhythmic effects of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor SEA0400 depend on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression level. *Clin Res Cardiol* 104, Suppl 1, P729

Bögeholz N, Bauer BK, Schulte JS, Frommeyer G, Dechering DG, Kirchhefer U, Breithardt G, Müller FU, Eckardt L, Pott C (2014) First study on arrhythmogenesis in the presence of genetically suppressed Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1) activity: A heterozygous murine NCX1 knockout model is protected against early and late afterdepolarizations. *Clinical Research in Cardiology*, 103, Suppl 1, V858

Bögeholz N, Bauer BK, Schulte JS, Milberg P, Mönnig G, Schmitz W, Eckardt L, Müller FU, Pott C (2013) Dronedarone-mediated antiarrhythmic but not inotropic effects depend on Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1) activity: Investigations in NCX1

knockout and overexpressor mice. *Clinical Research in Cardiology* 102, Suppl 1, P1031

Bögeholz N, Bauer BK, Schulte JS, Milberg P, Mönning G, Schmitz W, Eckardt L, Müller, FU, Pott C (2013) Dronedarone-mediated antiarrhythmic but not inotropic effects depend on Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1) activity: Investigations in NCX1 knockout and overexpressor mice. *European Heart Journal*, 34, Supplement 926, P5023

9. Curriculum vitae

10. Danksagungen

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Lars Eckardt und der Arbeitsgruppe um meinen Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Pott. Herr Pott hat mich zu jedem Zeitpunkt meines Promotionsvorhabens mit größtem Engagement unterstützt. Insbesondere Herr Nils Bögeholz gilt mein uneingeschränkter Dank für das Lehren wissenschaftlichen Arbeitens sowie der täglichen, herausstechenden fachlichen und menschlichen Zusammenarbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die gemeinsame Durchführung der Kalzitropie- und Arrhythmie-Versuche im OE-Mausmodell bedanken. Herrn Adam Muszynski möchte ich dafür danken, dass er schon in der Vorklinik mein Interesse für die experimentelle Kardiologie gefördert hat.

In aller Herzlichkeit möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller, der die Umsetzung dieser Arbeit erst möglich gemacht hat, bedanken. Sämtliche durchgeführten Experimente wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität durchgeführt. Als Gast im Institut wurde ich stets offen und freundlich empfangen. Besonders möchte ich mich für die großartige Unterstützung bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Boknik und Herrn Dr. med. Jan Sebastian Schulte bedanken. Ebenso möchte ich meinen Dank für die exzellente Hilfe bei statistischen Fragestellungen durch Herrn Dr. rer. nat. Matthias Seidl bekunden. Frau Stefanie Triebel und Frau Nina Nordsiek-Goda gilt der besondere Dank unserer gesamten Arbeitsgruppe für die Genotypisierung der Versuchstiere.

Bei Anne Grögler, Thilo Rattay, Raphael Weiss und unserer gesamten Gruppe möchte ich mich für die wunderbare Zeit, die kleinen und großen Weichenstellungen während und hoffentlich auch nach dem Studium bedanken.

Mein größter Dank gilt der unvergleichlichen Unterstützung und Motivation durch Ina Tröndle, meiner Eltern, Kerstin Bauer und Karsten Bauer, und meiner Großeltern, Manfred Bauer und Erika Bauer.

11. Anhang

1. Anzeige nach § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG; Seite 1
2. Anzeige nach § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG; Seite 2
3. Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs.1 Satz 4 TierSchG; Seite 1
4. Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs.1 Satz 4 TierSchG; Seite 2



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
PD Dr. med. Christian Pott
Medizinische Klinik und Poliklinik C
Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33
48149 Münster

Auskunft erteilt:
Herr Salert
Direktwahl 02361/305-3709
Fax 02361/305-3439
Fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
8.84-02.05.20.11.098
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 18.04.2011

Tierschutz;

Anzeige nach § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 Tierschutzgesetz (TSchG)

- a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508)
- b) Ihre Anzeige vom 04.03.2011, eingegangen am 12.04.2011

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Dr. Pott,

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben

„Untersuchungen zur Wirkung der kardiovaskulären Pharmaka Dronedaron und Amiodaron auf den kardialen Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (NCX) anhand von murinen Na⁺-Ca²⁺-Austauscher Knockout und Überexpressionsmodellen“

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 oder 237 bis
Haltestelle "LANUV" und 5 Min.
Fußweg oder mit Buslinie SB 20
bis Haltestelle "Hohenhorster
Weg" und 15 Min. Fußweg in
Richtung Trabrennbahn bis
Leibnizstraße

wird hiermit bestätigt.

Verantwortlicher Versuchsleiter: Herr PD Dr. med. Christian Pott

Stellvertretender Versuchsleiter: Herr Adam Muszynski

Weitere beteiligte Person: Herr Nils Bögeholz

Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 9 Abs. 1 Satz 3 des TierSchG nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 des TierSchG eingesetzt werden.

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12

Art und Zahl der Tiere: 720 Mäuse

Dauer des Versuchsvorhabens: bis zum 30.04.2013

**Ort: Institut für Pharmakologie und Toxikologie des
Universitätsklinikums Münster**

Ändern sich während des Versuchsvorhabens die von Ihnen in Ihrer Anzeige angegebenen Sachverhalte, so sind mir diese unverzüglich anzuzeigen.

Nach § 8 a Abs. 3 Tierschutzgesetz ist mir am Ende eines jeden Jahres die Zahl der durchgeführten Versuchsvorhaben sowie bei Wirbeltieren Art und Zahl der insgesamt verwendeten Wirbeltiere anzugeben.

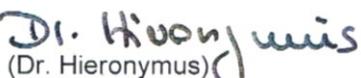
Von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr wird abgesehen, da die Tierversuche überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem Verwaltungsgericht Münster (Piusallee 38, 48147 Münster) oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


(Dr. Hieronymus)

DER
OBERBÜRGERMEISTER



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Klinik für Kardiologie
PD Dr. med. Christian Pott
Albert-Schweitzer-Campus 1, A1

48149 Münster

Amt für Gesundheit,
Veterinär- und
Lebensmittelangelegenheiten

Niederdingstraße 30 a
48155 Münster

Auskunft erteilt:
Frau Boenigk
Zimmer: 12
Telefon: 0251/384333 - 14
Telefax: 0251/384333 - 49
E-Mail:
BoenigkR@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Münster, 18.03.2013

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
28.02.2013

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39.32.6 1.3

Tierschutz

**Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs.1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes
(TierSchG) für nicht operative Eingriffe an Wirbeltieren für Herrn cand. med. Bastian Kle-
mens BAUER, geb. am 28.06.1989**

Sehr geehrter Herr Dr. Pott,

aufgrund der vorliegenden Bescheinigung über einen erfolgreich abgeschlossenen Kursus für Versuchstierkunde erteile ich Herrn Bauer eine Ausnahmegenehmigung für nicht operative Eingriffe und Behandlungen an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen. Es werden folgende Nebenbestimmungen festgelegt:

1. Für den Fall von Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Genehmigung vor.
2. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor. Insbesondere können zusätzliche Auflagen hinsichtlich der nicht operativen Eingriffe gemacht werden.
3. Diese Genehmigung ist für den Zeitraum des Hochschulstudiums von Herrn Bauer an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster befristet.

I. Begründung

Mit Schreiben vom 28.02.2013 haben Sie einen Antrag nach § 9 Abs.1 Satz 4 TierSchG für die Durchführung nicht operativer Eingriffe an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen für Herrn Bauer gestellt und entsprechende Nachweise übersandt.

Nach § 9 Abs. 1 Satz 1 Tierschutzgesetz dürfen Tierversuche nur von Personen durchgeführt werden, die die dafür erforderlichen Fachkenntnisse haben. Tierversuche an Wirbeltieren, ausgenommen Versuche nach § 8 Abs. 7 Nr. 2, dürfen nur von besonders qualifizierten Personen durchgeführt werden.

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münsterland Ost
Commerzbank Münster
Postbank Dortmund
SEB
Bankhaus Lampe Münster

Kto.-Nr. 752 (BLZ 400 501 50)
Kto.-Nr. 395 210 000 (BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 21 1 36 461 (BLZ 440 100 46)
Kto.-Nr. 1 010 305 100 (BLZ 400 101 11)
Kto.-Nr. 306 002 (BLZ 460 201 51)

IBAN: DE10400501500000000752
Deutsche Bank Münster
Deutsche Bundesbank
Volksbank Münster eG
WestLB AG

BIC: SMFT33
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 30)
Kto.-Nr. 4000 1700 (BLZ 400 000 30)
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226 (BLZ 300 500 00)

Zentrale Verbindungen

☒ Hotlinevermittlung 0251-492-0
Telefax 0251-492-7700
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de
www.muenster.de/stadt

MFB-05-58-MS / V04 / 25.09.12

Herr Bauer verfügt über kein abgeschlossenes Hochschulstudium; die Voraussetzungen nach § 9 Abs. 1 Satz 1 TierSchG liegen damit nicht vor.

Liegt eine besondere berufliche Qualifikation nicht vor, kann die Behörde Ausnahmen nach § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG zulassen, wenn der Nachweis der erforderlichen Fachkenntnisse auf andere Weise erbracht ist.

Aufgrund der mir vorliegenden Bescheinigung über einen erfolgreich abgeschlossenen Kursus für Versuchstierkunde

in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Wintersemester 2011/2012 vom 15.02.2012

des Max-Planck-Instituts für molekulare Biomedizin vom

kann ich Herrn Bauer für tierexperimentelle Tätigkeiten ohne operative Eingriffe an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen die nach dem Tierschutzgesetz erforderliche Sachkunde anerkennen.

Der Widerrufsvorbehalt wurde auf der Grundlage des § 36 Abs. 2 Verwaltungsverfahrensgesetz erlassen. Damit wird bezweckt, dass aus Gründen des Tierschutzes diese Genehmigung entschädigungslos widerrufen und so Verstößen gegen das Tierschutzgesetz wirksam begegnet werden kann. Nach Abwägung Ihres Interesses an einer uneingeschränkten Erlaubnis und dem öffentlichen Interesse an der Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes halte ich es für verhältnismäßig und zweckmäßig durch die Widerrufsvorbehalt sicherzustellen, dass die gesetzlichen Voraussetzungen, die bei der Erteilung der Erlaubnis vorliegen müssen, auch zukünftig eingehalten werden.

Eine Befristung für den Zeitraum des Hochschulstudiums der Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster ist gerechtfertigt, da nur in diesem Zusammenhang eine weitere Überprüfung der Voraussetzungen für den nicht operativen Sachkundenachweis durch die hiesige Behörde erfolgen kann.

II. Gebührenfestsetzung

Die Erteilung dieser Genehmigung ist gemäß § 8 Abs. 1 Nr. 2 des Gebührengesetzes für das Land Nordrhein-Westfalen (GebG NRW) in der Fassung der Bekanntmachung vom 23.08.1999 kostenfrei. Auf die Erstattung der entstandenen Auslagen wird verzichtet.

III. Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen der Bescheid bekanntgegeben worden ist, beim Verwaltungsgericht in Münster (Postanschrift: Postfach 8048, 48043 Münster / Hausanschrift: Piusallee 38, 48147 Münster) schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage erheben.

Den Antrag können Sie auch elektronisch und mit qualifizierter elektronischer Signatur über das Elektronische Gerichts- und Verwaltungspostfach (EGVP) beim Verwaltungsgericht Münster einreichen. Die Anforderungen an den elektronischen Rechtsverkehr sind in der Verordnung über den elektronischen Schriftverkehr bei den Verwaltungsgerichten und den Finanzgerichten im Lande Nordrhein-Westfalen vom 01.12.2010 in der aktuellen Fassung geregelt.

Die Zustellung dieses Bescheides ist ein Unterfall der Bekanntgabe eines Verwaltungsaktes.

IV. Hinweis

Die bzw. der Tierschutzbeauftragte ist über die Ausnahmegenehmigung zu informieren.

im Auftrag



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

1 Durchschrift für Herrn Bastian Klemens BAUER