

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
Prof. Dr. med. Lars S. Maier
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Antiarrhythmische Effekte der
Ryanodinrezeptorstabilisierung durch
Dantrolen im humanen Myokard**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Steffen Pabel

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
Prof. Dr. med. Lars S. Maier
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Antiarrhythmische Effekte der
Ryanodinrezeptorstabilisierung durch
Dantrolen im humanen Myokard**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Steffen Pabel

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Samuel Tobias Sossalla
2. Berichterstatter:	PD Dr. Markus Zimmermann

Datum der mündlichen Prüfung: 16.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Formelverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Hintergrund	11
1.2 Das Myokard	12
1.3 Elektromechanische Kopplung	13
1.3.1 Das Aktionspotential	13
1.3.2 Die Kontraktion	15
1.3.3 Die Relaxation	16
1.4 Regulierung der Herzaktion	17
1.4.1 Frank-Starling-Mechanismus	17
1.4.2 Kraft-Frequenz-Verhalten	18
1.4.3 Vegetative Stimulation	18
1.5 Der Ryanodinrezeptor	19
1.5.1 Aufbau und Regulation	19
1.5.2 Pathophysiologische Rolle des kardialen Ryanodinrezeptors	22
1.6 Kardiale Arrhythmien und zelluläre Arrhythmogenese	23
1.6.1 Grundlagen der Herzrhythmusstörungen	23
1.6.2 Diastolische Ca ²⁺ -Freisetzungen und zelluläre Arrhythmogenese in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern	24
1.7 Modifizierung des Ryanodinrezeptors durch Dantrolen	28
1.8 Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Pharmakologische Interventionen	31
2.1.1 Dantrolen	31
2.1.2 Isoproterenol	31
2.2 Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten	31
2.2.1 Gewinnung ventrikulärer Myokardproben	31
2.2.2 Präparation und Reinigung des ventrikulären Myokards	31
2.2.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten	32
2.3 Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten	33
2.3.1 Gewinnung atrialer Myokardproben	33
2.3.2 Präparation und Reinigung des atrialen Myokards	34
2.3.3 Isolation von atrialen Kardiomyozyten	35

2.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	37
2.4.1	Grundlagen der Konfokalmikroskopie	37
2.4.2	Der Ca ²⁺ -Farbstoff Fluo-3	38
2.4.3	Versuchsdurchführung der Konfokalmikroskopie	40
2.4.4	Auswertung der diastolischen Ca ²⁺ -Sparks	42
2.5	Patch-Clamp-Technik	42
2.5.1	Hintergrund der Patch-Clamp-Technik	42
2.5.2	Die Patch-Clamp-Anlage	43
2.5.3	Die Patchpipette und Patchelektrode	43
2.5.4	Versuchsdurchführung der Patch-Clamp-Technik	44
2.5.5	Auswertung der Aktionspotentialmessungen	47
2.6	Kontraktilitätsexperimente	47
2.6.1	Messanlage der Kontraktilitätsexperimente	47
2.6.2	Präparation und Einspannen der Muskelstreifen	48
2.6.3	Versuchsdurchführung der Muskelstreifenexperimente	49
2.6.4	Auswertung der Kontraktilitätsexperimente	50
2.7	Datenauswertung und Statistik	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Patientencharakteristika	52
3.2	Effekte von Dantrolen auf das diastolische SR Ca ²⁺ -Leck	53
3.2.1	Herzinsuffizienz	53
3.2.2	Vorhofflimmern	55
3.2.3	Vergleichende Untersuchungen des diastolischen SR Ca ²⁺ -Lecks: Sinusrhythmus und Vorhofflimmern	57
3.2.4	Effekte von Dantrolen auf das diastolische SR Ca ²⁺ -Leck im Sinusrhythmus ...	58
3.2.5	Konzentrationsabhängigkeit der kardialen Effekte von Dantrolen	59
3.3	Auswirkungen von Dantrolen auf arrhythmogene Trigger	60
3.3.1	Spontane Ca ²⁺ -Freisetzungen	60
3.3.2	Späte Nachdepolarisationen	62
3.4	Evaluation möglicher Effekte von Dantrolen auf das Aktionspotential	65
3.4.1	Aktionspotentialdauer	66
3.4.2	Aktionspotentialparameter	69
3.5	Einfluss von Dantrolen auf die Kontraktilität	71
4	Diskussion	75
4.1	Klinische Konzentration von Dantrolen	75
4.2	Antiarrhythmische Effekte von Dantrolen in der humanen Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern	75
4.3	Destabilisierung des RyR ₂ als Grundlage antiarrhythmischer Effekte von Dantrolen	78
4.3.1	Rolle des diastolischen Ca ²⁺ -Lecks beim Vorhofflimmern und Sinusrhythmus	79
4.3.2	Effekte von Dantrolen auf den „gesunden“ Ryanodinrezeptor	80
4.4	Einflüsse von Dantrolen auf das kardiale Aktionspotential	81

4.5	Effekte von Dantrolen auf die Kontraktilität	83
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis	86
	Genehmigungen	105
	Veröffentlichung und Förderung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardiales Aktionspotential.....	15
Abbildung 2: Elektromechanische Kopplung.....	17
Abbildung 3: Der kardiale Ryanodinrezeptor	20
Abbildung 4: Frühe Nachdepolarisation.....	27
Abbildung 5: Späte Nachdepolarisation.....	27
Abbildung 6: Getriggerte Aktionspotentiale.....	27
Abbildung 7: Isolierter humaner ventrikulärer Kardiomyozyt.....	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konfokalmikroskopie.....	38
Abbildung 9: Fluoreszenzemissionsspektrum von Fluo-3	39
Abbildung 10: Ca ²⁺ -Färbung eines humanen atrialen Kardiomyozyten mit Fluo-3	40
Abbildung 11: Flussdiagramm Konfokalmessung	40
Abbildung 12: Patch-Clamp Untersuchung.....	46
Abbildung 13: Messanlage für Kontraktilitätsexperimente.....	48
Abbildung 14: Humaner Myokardtrabekel.....	49
Abbildung 15: Original Line-Scans von ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz	54
Abbildung 16: Qualitative Spark-Parameter bei Herzinsuffizienz	54
Abbildung 17: Diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck bei Herzinsuffizienz.	55
Abbildung 18: Original Line-Scans von atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern	56
Abbildung 19: Qualitative Spark-Parameter bei Vorhofflimmern	56
Abbildung 20: Diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck bei Vorhofflimmern	57
Abbildung 21: Diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck Sinusrhythmus gegen Vorhofflimmern	58
Abbildung 22: Diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck bei Sinusrhythmus.....	59
Abbildung 23: Diastolisches SR Ca ²⁺ -Leck bei 1 µmol/l Dantrolen.....	60
Abbildung 24: Ca ²⁺ -Wellen bei Herzinsuffizienz.....	61
Abbildung 25: Ca ²⁺ -Wellen bei Vorhofflimmern.....	61
Abbildung 26: Späte Nachdepolarisation bei Herzinsuffizienz	63
Abbildung 27: Späte Nachdepolarisation bei Vorhofflimmern	64
Abbildung 28: Inzidenz später Nachdepolarisationen	64
Abbildung 29: Originale Aktionspotentialmessungen ventrikulärer Kardiomyozyten. ...	65
Abbildung 30: Originale Aktionspotentialmessungen atrialer Kardiomyozyten	66
Abbildung 31: Aktionspotentialdauer bei Herzinsuffizienz.....	67
Abbildung 32: Aktionspotentialdauer bei Vorhofflimmern.....	68
Abbildung 33: Aktionspotentialparameter bei Herzinsuffizienz.....	69
Abbildung 34: Aktionspotentialparameter bei Vorhofflimmern.....	70
Abbildung 35: Einzelschläge von Muskeltrabekeln	72
Abbildung 36: Systolische Kraft bei Herzinsuffizienz	72
Abbildung 37: Diastolische Kraft bei Herzinsuffizienz	73
Abbildung 38: Kontraktionskinetik bei Herzinsuffizienz	74
Abbildung 39: Relaxationskinetik bei Herzinsuffizienz	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Enzymlösung Ventrikel I	32
Tabelle 2: Enzymlösung Ventrikel II	32
Tabelle 3: Ca ²⁺ -freie Lösung.....	35
Tabelle 4: Enzymlösung Atrium I.....	35
Tabelle 5: Enzymlösung Atrium II.....	36
Tabelle 6: Feng-Lösung	36
Tabelle 7: Messtyrode für humane Zellen.....	41
Tabelle 8: Pipettenlösung für Aktionspotentialmessungen.....	44
Tabelle 9: Badlösung für Aktionspotentialmessungen	45
Tabelle 10: Krebs-Henseleit-Lösung	49
Tabelle 11: Patientencharakteristika.....	52
Tabelle 12: Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Repolarisationszeitpunkten bei Herzinsuffizienz.....	66
Tabelle 13: Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Repolarisationszeitpunkten bei Vorhofflimmern.....	68

Formelverzeichnis

Formel 1: Nernst-Gleichung	14
Formel 2: Ohmsches Gesetz.....	46
Formel 3: Berechnung des Standardfehlers	51

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AF	<i>Atrial fibrillation</i> , Vorhofflimmern
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
AM	Azetoxymethylester
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> -Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
ARVC	<i>Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy</i>
BCS	<i>Bovine calve serum</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaMKII δ	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ
CaM	Calmodulin
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
CPVT	<i>Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia</i>
DAD	<i>Delayed afterdepolarization</i>
Dan	Dantrolen
+df/dt norm.	Kraftanstiegsgeschwindigkeit, normalisiert
-df/dt norm.	Kraftabfallsgeschwindigkeit, normalisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	<i>Early afterdepolarization</i>
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
et al.	<i>Et alii</i>
E _x	Gleichgewichtspotential X
F	Faraday-Konstante
FKBP	<i>FK-binding-protein</i> , Calstabin
G	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	<i>Heart failure</i> , Herzinsuffizienz
I	Stromstärke
I _x	Ionenstrom X
KHS	Krebs-Henseleit-Lösung
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LA	Linkes Atrium
LVEDD	Linksventrikulärer endiastolischer Durchmesser
mAKAP	<i>Muscle A kinase-anchoring protein</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MH	Maligne Hyperthermie

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
NA	Noradrenalin
NCX	Na ⁺ /K ⁺ -Austauscher
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PMCA	Sarkolemmale Ca ²⁺ -ATPase
P _o	Offenheitswahrscheinlichkeit
PP1	Phosphatase 1
PP2a	Phosphatase 2a
R	Widerstand
RMP	Ruhemembranpotential
RT90%	Zeit bis zu 90% Relaxation
RyR _x	Ryanodinrezeptor X
SCD	<i>Sudden cardiac death</i> , plötzlicher Herztod
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatische-Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TTP	<i>Time to peak</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
V _{max}	Maximale Aufstrichsgeschwindigkeit
Z	Ionenwertigkeit

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen determinieren maßgeblich die Mortalität und Morbidität der westlichen Gesellschaft (Roth et al. 2015). Vor dem Hintergrund des demographischen Wandels, der zunehmenden Lebenserwartung und der besseren Akutversorgung kardialer Ereignisse nimmt die Zahl an Patienten, die eine chronische Herzinsuffizienz entwickeln, deutlich zu (Ziaeiian et al. 2016). Die Herzinsuffizienz ist durch eine eingeschränkte Lebensqualität u.a. aufgrund von Dyspnoe, Abgeschlagenheit und vermehrten Hospitalisierungsraten gekennzeichnet und mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert (Ponikowski et al. 2016). Die Prognose der Erkrankung ist schlecht: Für die chronisch stabile Herzinsuffizienz beträgt die 1-Jahres-Gesamtmortalität 7 % bei einer Hospitalisierungsrate von 44 % (Maggioni et al. 2013). Das macht die Herzinsuffizienz zur großen medizinischen und sozioökonomischen Herausforderung (Cook et al. 2014; Heidenreich et al. 2013). Pathophysiologisch kann die Herzinsuffizienz multipler Genese sein. Vornehmlich gehören hierzu ischämische Ereignisse, Pathologien der Herzklappen, Inflammation/Infektionen, Toxine/Medikamente, Rhythmusstörungen sowie verschiedene Kreislauf- oder Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. die arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus. Klinisch steht eine Kompromittierung der physiologischen Herzaktion im Vordergrund, die die systolische und/oder die diastolische Herzfunktion betreffen kann (Ponikowski et al. 2016). Während die systolische Herzinsuffizienz durch eine Abnahme des Auswurfvolumens gekennzeichnet ist, kommt es bei der diastolischen Herzinsuffizienz zu einer gestörten Füllung bei erhaltener Auswurfleistung. Während der Progredienz der Herzinsuffizienz kommt es zu verschiedenen pathophysiologischen Remodellierungsprozessen im Herzen, durch welche die Entstehung von Arrhythmien begünstigt werden kann. Ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, die zu einem plötzlichen Herztod (*sudden cardiac death*, SCD) führen können, bestimmen hierbei maßgeblich die hohe Mortalität der Herzinsuffizienz (Tomaselli et al. 2004).

Das Vorhofflimmern ist eine der häufigsten Herzrhythmusstörungen mit steigender Prävalenz und Inzidenz (Schnabel et al. 2015). Die (tachy-) arrhythmische Erregungsüberleitung auf den Ventrikel führt zu Verschlechterung der ventrikulären Funktion (Miyasaka et al. 2006). Weiterhin ist aufgrund ungerichteter Vorhofkontraktionen der geregelte Blutfluss kompromittiert und konsekutiv das Risiko von Thromben-Entstehung mit der Gefahr kardioembolischer Ereignisse erhöht. Das

Vorhofflimmern ist somit mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (Benjamin et al. 1998).

Aufgrund dieser Zusammenhänge besitzt eine adäquate antiarrhythmische Therapie kardialer Rhythmusstörungen einen beachtlichen prognostischen Stellenwert. Die bisherige, rein medikamentöse antiarrhythmische Therapie ist allerdings durch ein großes Nebenwirkungsprofil, begrenzte Indikationen und eine schlechte Verträglichkeit stark limitiert.

Die vorliegende Arbeit soll mögliche antiarrhythmische Effekte einer Modulation des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Kanals, dem Ryanodinrezeptor, durch Dantrolen im humanen Myokard erforschen. Zunächst soll jedoch in der Einleitung auf die Physiologie des Myokards und die elektromechanische Kopplung eingegangen werden. Anschließend werden die pathophysiologische Rolle des kardialen Ryanodinrezeptors und die kardiale Arrhythmogenese erörtert. Abschließend werden die Ziele und die Fragestellungen dieser Arbeit beleuchtet.

1.2 Das Myokard

Kardiomyozyten bilden die funktionelle Grundstruktur des myokardialen Gewebes. In diesen bilden Myofibrillen, bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten, den kontraktilem Apparat. Ultrastrukturell sind Herzmuskelfasern den Skelettmuskelfasern ähnlich und ebenso in Form von Sarkomeren angeordnet. Hierbei lassen sich lichtmikroskopisch helle und dunkle Banden unterscheiden (A-, H-, M-, I- und Z-Streifen). Sarkomere bilden mit einer Länge von 1,5-2,2 μm die kleinste funktionelle Untereinheit myokardialer Fibrillen und werden durch die Z-Streifen untereinander begrenzt (Bers 2001). Bei Kontraktion oder Relaxation verkürzen oder verlängern sich die Sarkomere. Herzmuskelfasern werden aufgrund dieser gleichen lichtmikroskopischen Phänotypologie auch zur quergestreiften Muskulatur gezählt.

Besonderes Merkmal des myokardialen Gewebes sind die Glanzstreifen (*disci intercalares*) und die myogene Erregbarkeit und Erregungsleitung. Glanzstreifen dienen der mechanischen Verbindung von Kardiomyozyten. *Fasciae adhaerentes* und Desmosomen sind hierbei mit verschiedenen Filamenten für die interzelluläre Verbindung bedeutend (Borrmann et al. 2006). Weiterhin sind in den Glanzstreifen Nexus (*gap-junctions*) ausgebildet. Diese Kanäle bestehen aus Connexonen und ermöglichen einen direkten Stoff- und Ionenaustausch benachbarter Zellen (Unwin et al. 1980). Die durch *gap-junctions* ermöglichte elektrische Kontinuität schließt die einzelnen Kompartimente als funktionelles Synzytium zusammen, sodass eine synchrone Myokarderregung stattfinden kann.

Voraussetzung für die myogene Erregbarkeit des Herzens ist die Ultrastruktur kardialer Myozyten. Durch Invagination der Zellmembran (Sarkolemm) entstehen transversale (T-) Tubuli. Intrazellulär bildet das sarkoplasmatische Retikulum longitudinale (L-) Tubuli. Endständig ausgeprägte Ausläufer des sarkoplasmatischen Retikulums (Zisternen) befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den T-Tubuli und bilden mit diesen sogenannte Diaden. Der Raum zwischen sarkoplasmatischem Retikulum und Sarkolemm wird diadischer Spalt genannt. Das Tubulussystem ist in ventrikulären Kardiomyozyten ausgeprägter als in atrialen Kardiomyozyten zu finden. Atriale Kardiomyozyten haben jedoch aufgrund ihrer kleineren Größe eine größere (erregbare) relative Membranoberfläche (Tidball et al. 1991). Das Sarkolemm ist eine Membran, bestehend aus einer Lipid-Doppelschicht und verschiedenen funktionellen Proteinen, die als Permeabilitätsbarriere einen elektrochemischen Gradienten gewährleistet. Verschiedene Kanalproteine übernehmen den Stoff- und Signalaustausch. Das sarkoplasmatische Retikulum ist ein großes Membrankompartiment des Myozyten und fungiert im Rahmen der elektromechanischen Kopplung als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. Vor dem Hintergrund des hohen Energiebedarfes des Herzens besteht der Kardiomyozyt weiterhin zu etwa einem Drittel aus Mitochondrien zur aeroben ATP-Generierung (Barth et al. 1992). Zudem sind Mitochondrien für den Transport von Ionen (z. B. zytosolische Ca^{2+} -Extrusion) und Metaboliten von Bedeutung. Herzmuskelzellen enthalten meist einen mittelständigen Zellkern, können aber auch zwei Kerne haben. Weiterhin enthalten sie für die Zellfunktion relevante Organellen, wie den Golgi-Apparat, Lysosomen und Peroxysomen (Bers 2001).

1.3 Elektromechanische Kopplung

1.3.1 Das Aktionspotential

Voraussetzung für die Kontraktion der Herzzelle ist ein ausgelöstes Aktionspotential. Infolge einer Depolarisation, welche über die *gap-junctions* und die Membran geleitet wird, erhöht sich das Membranpotential. Dieses liegt als Ruhemembranpotential physiologisch je nach Art der Herzmuskelzelle bei ca. -60 bis -80 mV. Maßgeblich entsteht das Ruhemembranpotential durch die Leitfähigkeit der Zellmembran gegenüber K^+ -Ionen. Diese diffundieren aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration, verursacht durch die Na^+/K^+ -ATPase, entlang des chemischen Konzentrationsgradienten aus der Zelle. Da die Leitfähigkeit der Membran bei dem Ruhemembranpotential für spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle gegenüber Na^+ sehr gering ist und sich Na^+ aufgrund der Extrusion durch die Na^+/K^+ -ATPase hauptsächlich extrazellulär befindet, diffundieren positive K^+ -Ladungen solange entlang ihres

Konzentrationsgradienten aus der Zelle (das Membranpotential wird negativer), bis der K^+ -Ausstrom aufgrund der elektrischen Spannung bzw. des elektrischen Gradienten zum Erliegen kommt. Dieses Äquilibrium oder Gleichgewichtspotential (E_K) lässt für sich jedes Ion anhand der Nernst-Gleichung definieren. Im Falle des Kaliums beträgt es ca. -89 mV (Fozzard et al. 1982; Vassalle 1987).

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

Formel 1: Nernst-Gleichung. Dargestellt ist die Nernst-Gleichung am Beispiel von Kalium. E_K =Gleichgewichtspotential für Kalium, R =ideale Gaskonstante, T =Temperatur in Kelvin, z =Wertigkeit des Ions, F =Faraday-Konstante, $[K]_o/[K]_i$ = K^+ -Konzentration außen/innen.

Aufgrund einer noch geringen (Rest-) Membranpermeabilität für andere Kationen erreicht das Ruhemembranpotential nicht ganz E_K . Um das Membranpotential der Zelle mit mehreren permeierenden Ionen zu errechnen, kann die Goldman-Gleichung verwendet werden, die zusätzlich zur Nernst-Gleichung mehrere verschiedene Ionen und deren Permeabilität miteinbezieht.

Infolge einer Depolarisation des Kardiomyozyten (z.B. Weiterleitung durch *gap-junctions*) kommt es zur Öffnung von spannungsgesteuerten (*voltage-gated*) Natriumkanälen (v. a. $Na_v1.5$, Abbildung 1). Durch die Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran für Natriumionen entsteht ein rascher, depolarisierender Natriumeinstrom (I_{Na} , Aufstrich des Aktionspotentials) in Richtung des Natrium-Gleichgewichtspotentials E_{Na} , welches ca. +70 mV beträgt. Bedingt durch die Eigenschaften der Na_v wird das kardiale Aktionspotential nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz ausgelöst. Während der nun stattfindenden Depolarisation der Zelle nimmt der elektrochemische Gradient für Na^+ ab, steigt aber für einen repolarisierenden K^+ -Ausstrom (entlang des Konzentrations- und elektrochemischen Gradienten für K^+), wodurch beim schnellen Aufstrich des Aktionspotentials E_{Na} nie vollständig erreicht wird und der *peak* des Aktionspotentials bei ca. +40 mV liegt. Infolge eines transienten K^+ -Ausstromes (I_{to}) kommt es zu einer geringen Repolarisation. Nun öffnen die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren) und Ca^{2+} -Ionen strömen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in den dyadischen Spalt (I_{CaL}). Nahezu gleiche Einwärts- und Auswärtsströme bilden nun die typische Plateau-Phase des kardialen Aktionspotentials. Infolge verschiedener repolarisierender Ströme (hauptsächlich I_{Kr} , I_{Ks}) beendet ein Abfall des Membranpotentials bis hin zum Ruhemembranpotential das Aktionspotential. Durch die Na^+/K^+ -ATPase, die unter Energieverbrauch in Form von Adenosintriphosphat (ATP) arbeitet, wird Na^+ im Austausch gegen K^+ aus dem Zytosol depletiert, sodass das Ruhemembranpotential wiederhergestellt wird (Bers 2001).

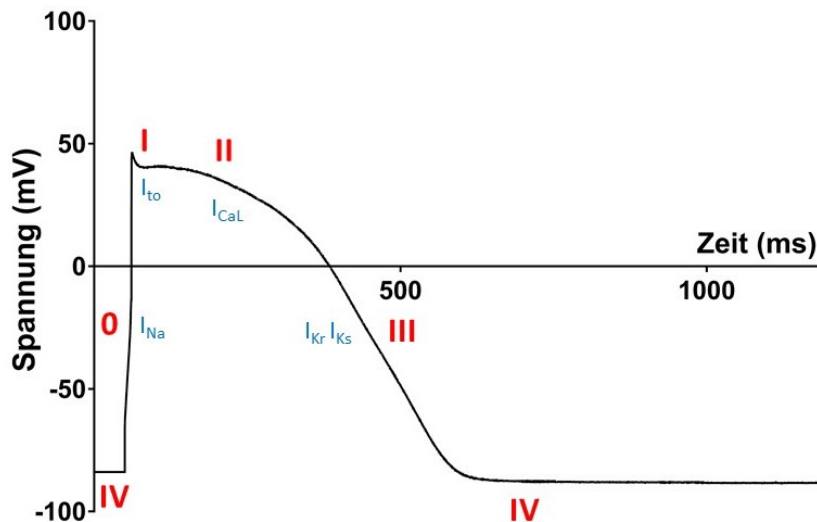


Abbildung 1: Kardiales Aktionspotential. Phase IV: Das Ruhemembranpotential von -80 mV wird durch die Na^+/K^+ -ATPase gebildet. Phase 0: Durch den schnellen Na^+ -Einstrom (I_{Na}) erfolgt der Aufstrich des Aktionspotentials. Phase I: Transiente Auswärts- K^+ -Ströme (I_{to}) führen zur dezenten Repolarisation. Phase II: Ca^{2+} -Einstrom (I_{CaL}) durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und ausgeglichene Einwärts- und Auswärtsströme (I_{Ks}) bilden das Plateau. Phase III: Durch repolarisierende K^+ -Ströme (I_{Kr} , I_{Ks}) repolarisiert die Zelle. Phase IV: Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen. Eigene Aufzeichnung eines Aktionspotentials eines humanen ventrikulären Kardiomyozyten von einem Patienten mit Herzinsuffizienz.

1.3.2 Die Kontraktion

Durch den I_{CaL} erhöht sich die Konzentration von Ca^{2+} im dyadischen Spalt. Aufgrund der räumlichen Nähe der T-Tubuli zu den sarkoplasmatischen L-Tubuli gelangt Ca^{2+} zum Ryanodinrezeptor (RyR), der Ca^{2+} -vermittelt öffnet, wodurch sarkoplasmatisches Ca^{2+} in das Zytosol strömt. Dieses Phänomen ist als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben (Fabiato 1983). Hierbei überwiegt der sarkoplasmatische Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol quantitativ deutlich dem I_{CaL} . Die diastolische Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-7} mol/l steigt auf einen systolischen Ca^{2+} -Spiegel von etwa 10^{-5} mol/l an (Kirschenlohr et al. 2000). Effektor der elektromechanischen Kopplung sind die für die Kontraktion verantwortlichen Myofilamente. Diese wandeln das chemische Signal unter Hilfe von ATP in eine mechanische Kraft um. Hierzu bindet Ca^{2+} an Troponin C, ein regulatorisches Protein, welches in Abwesenheit von Ca^{2+} die Bindungsstelle zwischen den Myofilamenten Aktin und Myosin blockiert. Durch Ca^{2+} -Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Tropomyosinkomplexes und die Aktin-Myosin-Bindungsstelle wird freigegeben (Haselgrove et al. 1973; Huxley 1973). Nach Hydrolyse des vom Myosin gebundenem ATP zu Adenosindiphosphat+Phosphatrest (ADP+P) und der Dissoziation des Phosphatrestes bindet das Myosinköpfchen am Aktinfilament. Die

Freigabe des ADP bewirkt nun ein Abknicken des Myosinköpfchens und eine Verschiebung des Aktinfilamentes. Die Filamente gleiten entsprechend der Gleitfilamenttheorie ineinander (Huxley 1969). Die dadurch entstehende Verkürzung der Myofibrille bildet die Kontraktion.

1.3.3 Die Relaxation

Die Relaxation erfolgt durch die Dissoziation der Ca^{2+} -Ionen von Troponin C aufgrund einer abfallenden zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration. Verschiedene Transportproteine katalysieren eine Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pumpt unter Verbrauch eines ATP zwei Ca^{2+} -Ionen entgegen des elektrochemischen Gradienten in das sarkoplasmatische Retikulum. Analog der quantitativ bedeutenden Rolle des sarkoplasmatischen I_{Ca} während der Systole wird durch die SERCA während der Relaxation der Großteil (im Menschen ca. 65 %) des zytosolischen Ca^{2+} wieder in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert (Bers 2001). Die SERCA wird durch das inhibitorische Protein Phospholamban in ihrer Aktivität reguliert (Reddy et al. 1996). Der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) transportiert weitere 30 % des zytosolischen Ca^{2+} aus der Zelle. Dieser sekundär aktive Antiporter transportiert entsprechend des elektrochemischen Gradienten im Austausch ein Ca^{2+} -Ion gegen drei Na^+ -Ionen. Der für die Funktion des NCX benötigte Na^+ -Gradient wird durch die Na^+/K^+ -ATPase hergestellt. Eine quantitativ geringe Rolle für die zytosolische Ca^{2+} -Elimination spielen weiterhin die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (Bassani et al. 1994).

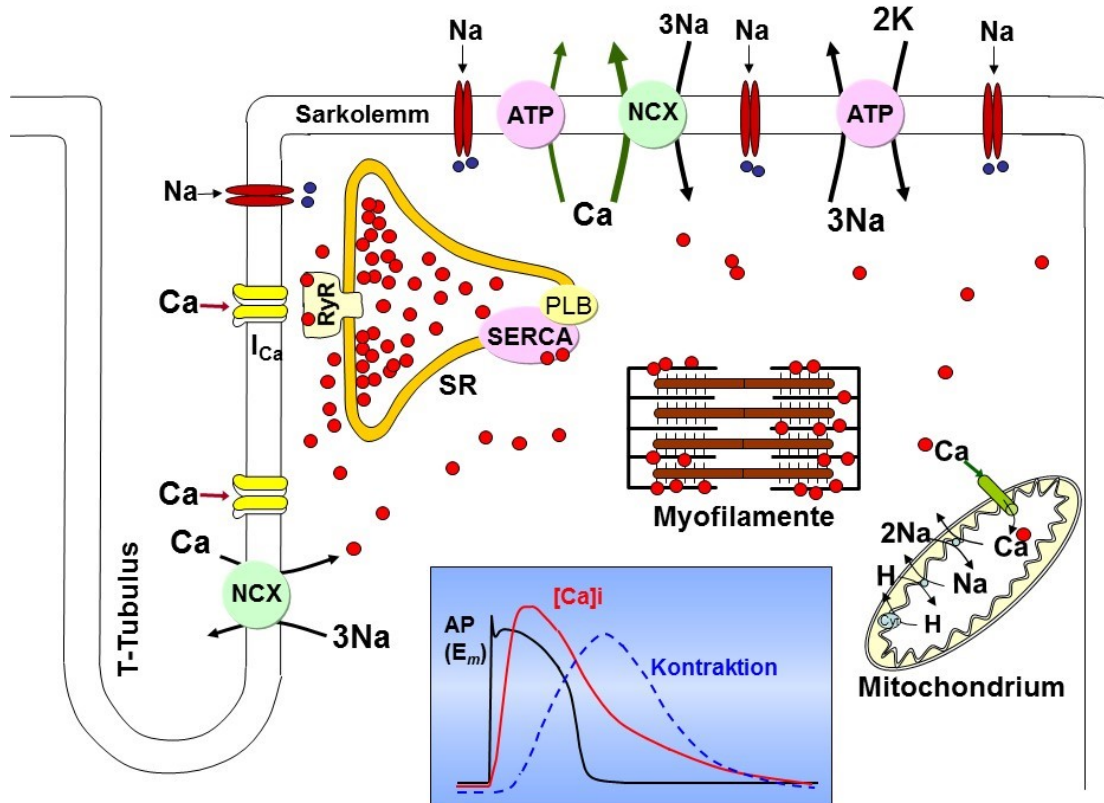


Abbildung 2: Elektromechanische Kopplung. Durch den Einstrom von Na^+ (blau) depolarisiert die Zelle und Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich. Getriggert durch den I_{Ca} öffnen die Ryanodinrezeptoren (RyR), Ca^{2+} (rot) strömt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol und kann die Myofilamente besetzen. Die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), der Na^+/K^+ -Austauscher (NCX) und Ca^{2+} -Kanäle am Mitochondrium und Sarkolemm depletieren zytosolisches Ca^{2+} . Die Na^+/K^+ -ATPase ist für die Repolarisation und das Ruhemembranpotential nötig. Weiterhin ist der zeitliche Zusammenhang von Aktionspotential (AP), Ca^{2+} -Konzentration und Kontraktion dargestellt. Modifiziert nach Bers, 2001.

1.4 Regulierung der Herzaktion

1.4.1 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet die Fähigkeit des Herzens, die eigene Kontraktionskraft an die Dehnung des Myokards bzw. das Volumen in der Herzkammer anzupassen. Eine Erhöhung des enddiastolischen Volumens (Vorlast), die durch einen erhöhten venösen Rückstrom zum Herzen oder als Folge eines verminderten Auswurfvolumens und erhöhter Nachlast entstehen kann, führt zur Dehnung der

Myofilamente. Durch diese Dehnung verbessert sich die Überlappung der Myofilamente (Gordon et al. 1966), die Sensitivität der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} nimmt zu (Hibberd et al. 1979) und die Ca^{2+} -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums wird erhöht (Allen et al. 1982). Insgesamt nimmt hierdurch die Kontraktionskraft zu (positive Inotropie). Somit ist das Myokard in der Lage, die Kontraktionskraft und damit das Schlagvolumen bis zu einer gewissen Dehnung, z. B. bei veränderten Volumina, entsprechend autonom anzupassen.

1.4.2 Kraft-Frequenz-Verhalten

Die frequenzabhängige Veränderung der Kraft wird Kraft-Frequenz-Verhalten oder entsprechend des Erstbeschreibers Bowditch-Effekt genannt. Die Abhängigkeit zwischen Kraft und Herzfrequenz verläuft beim Menschen biphasisch mit positiver Korrelation bei Frequenzen von 60 min^{-1} bis 180 min^{-1} und einem Abfall der Kraft bei höheren Frequenzen (Alpert et al. 1998). Elektrophysiologisch lässt sich das Kraft-Frequenz-Verhalten durch einen durch steigende Herzfrequenz verstärkten I_{CaL} erklären (Lemaire et al. 1998). Bei hoher Herzfrequenz steht weniger Zeit für die diastolische Ca^{2+} -Elimination zur Verfügung. Zusätzlich verringert sich die NCX vermittelte Ca^{2+} -Elimination durch eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration infolge hoher Frequenzen. Durch diese Mechanismen ist konsekutiv die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Durch die Ca^{2+} abhängige Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ) via Phospholamban wird die SERCA aktiviert, vermehrt Ca^{2+} in das SR gepumpt und somit vermehrt Ca^{2+} intrazellulär gehalten (Bers 2001). Somit steigt die Ca^{2+} -Beladung des SR, was konsekutiv zu erhöhter Kontraktionskraft führt (Brixius et al. 1999; Wier et al. 1986). Ab 180 min^{-1} Schläge wird die Kontraktionskraft durch eine verminderte Reaktivierung der Ca^{2+} -Transportproteine limitiert (Crozatier 1998).

1.4.3 Vegetative Stimulation

Neben den vorgestellten autonomen Regulierungsmechanismen wird das Herz über vegetative Nervenfasern gesteuert. Dies erfolgt vor allem über Noradrenalin (NA) der sympathischen Fasern und Acetylcholin (Ach) der parasympathischen Fasern. Es können Kontraktilität (Inotropie), Frequenz (Chronotropie), Relaxationsgeschwindigkeit (Lusitropie) und die atrioventrikuläre Überleitungsgeschwindigkeit (Dromotropie) reguliert werden.

Über eine Aktivierung stimulierender G-Proteine durch NA-Bindung an $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Adrenorezeptoren kommt es zur Aktivierung der Adenylatzyklase, die unter Verwendung

von ATP eine Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt (Bristow et al. 1988). Durch cAMP wird die Proteinkinase A (PKA) verstärkt aktiviert, welche verschiedene Zielproteine phosphoryliert. Zu diesen zählen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und Ryanodinrezeptoren (Tsien et al. 1986). Im phosphorylierten Zustand steigt deren Offenwahrscheinlichkeit (P_o) und in der Systole strömt folglich vermehrt Ca^{2+} ins Zytosol (Valdivia et al. 1995). Dieser Effekt bewirkt eine positive Inotropie. Durch Phosphorylierung von Phospholamban wird dessen hemmende Wirkung auf die SERCA vermindert, die nun vermehrt Ca^{2+} in das SR pumpt (James et al. 1989). Somit steigt die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Beladung und bei darauffolgenden Kontraktionen kann mehr Ca^{2+} freigesetzt werden, was ebenfalls positiv inotrop wirkt. Weiterhin bewirkt der gesteigerte Ca^{2+} -Rücktransport eine positive Lusitropie durch die Verkürzung der Bindungszeit von Ca^{2+} an Troponin C. Eine Steigerung der Herzfrequenz (positive Chronotropie) wird durch eine cAMP abhängige Verstärkung des Schrittmacherstromes (I_f) in spezialisierten Zellen des Sinusknotens erreicht (DiFrancesco et al. 1991). In dem nachgeschalteten Erregungszentrum, dem Atrioventrikularknoten, führt eine cAMP abhängige I_{CaL} -Verstärkung zu einer Verkürzung der Überleitungszeit von den Vorhöfen in die Kammern (positive Dromotropie).

Infolge der Aktivierung von M2-Rezeptoren durch Ach vermitteln parasymphatische Fasern ihre kardiale Wirkung größtenteils über inhibitorische G-Proteine. Diese inaktivieren die Adenylatzyklase und führen konsekutiv zu einer erniedrigten cAMP-Konzentration, wodurch die oben beschriebenen PKA vermittelten Phosphorylierungen verringert werden und Kontraktilität, Herzfrequenz, Relaxationsgeschwindigkeit und AV-Überleitungszeit abnehmen. Weiterhin aktivieren inhibitorische G-Proteine Ach-abhängige K^+ -Ströme, die besonders in den Schrittmacherzellen zur Hyperpolarisation führen (negative Chronotropie).

1.5 Der Ryanodinrezeptor

1.5.1 Aufbau und Regulation

Ryanodinrezeptoren (RyR) sind Ca^{2+} -Kanäle des SR und für die Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich. In Säugetieren sind drei Isoformen benannt. Der RyR₁ wurde im Skelettmuskel beschrieben (Takeshima et al. 1989), während der RyR₃ als neuronaler Kanal benannt wurde (Hakamata et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem RyR₂, welcher der am Herzen dominante Ryanodinrezeptor ist (Otsu et al. 1990). Eine steigende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bewirkt eine Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des RyR₂, was zur oben beschriebenen Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung führt (Meissner 1984). Aus diesem Grund nimmt der RyR₂ im Rahmen

der elektromechanischen Kopplung eine Schlüsselrolle ein und ist damit unerlässlich für die Systole. Im Folgenden soll auf den Aufbau und die Modulierungsmöglichkeiten des RyR₂ eingegangen werden, um diese im anschließenden Kapitel in den Kontext kardialer Pathologien zu setzen.

Der kardiale RyR₂ ist als Homotetramer aufgebaut, wobei jede Untereinheit eine Masse von 565 kDa besitzt. Plastisch konnte mittels Elektronenmikroskopie eine Fußstruktur des RyR₂, welche sich in den diadischen Spalt vorwölbt, beschrieben werden (Takeshima et al. 1989). Diese wird vom N-Terminus der Polypeptidkette gebildet und bestimmt maßgeblich die Kanaleigenschaften und -modulierungen. Der C-Terminus bildet eine transmembrane Struktur in der Membran des SR, bestehend aus mehreren Transmembranhelices (Du et al. 2002). In Abbildung 3 ist der Aufbau des Rezeptors verdeutlicht.

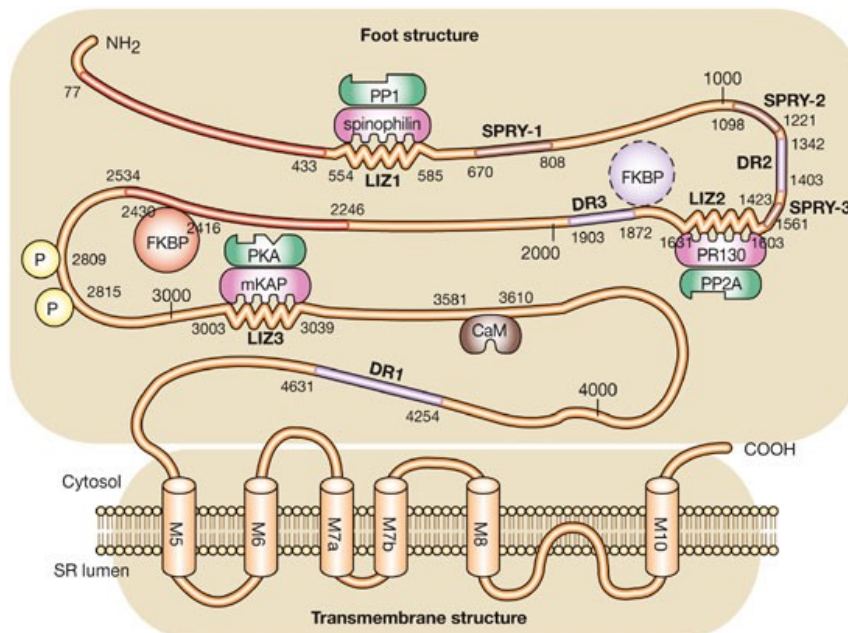


Abbildung 3: Der kardiale Ryanodinrezeptor. Der SR Ca²⁺-Kanal besteht aus einer Fußstruktur mit modulatorischen Einheiten und einer verankernden transmembranen Struktur. An der Fußstruktur binden verschiedene funktionelle Modulatoren, wie z. B. Phosphatase 1 und -2a (PP1, PP2a), sowie deren regulatorische Einheiten Spinophilin und PR130. In der Abbildung sind weiterhin die Bindungen von Proteinkinase A (PKA), mKAP, Calmodulin (CaM) und FKBP sowie die Transmembranhelices illustriert. Modifiziert nach Yano, 2006.

Wie dargestellt, besitzt der RyR₂ zahlreiche modulatorische Bindungsstellen für regulatorische Proteine, welche sich hauptsächlich an den N-terminalen, zyttoplasmatischen Strukturen befinden. Veränderungen dieser interagierenden

modulatorischen Einheiten regulieren die Konstitution des RyR₂ und sind pathophysiologisch von großer Relevanz. Grundsätzlich kann der RyR₂ durch Oxidation, Nitrosylierung, Phosphorylierungen und durch verschiedene spezifische Moleküle (v. a. ATP, Ca²⁺, und Mg²⁺) reguliert werden (Hain et al. 1995; Zalk et al. 2007). Zu den maßgeblich RyR₂ assoziierten modulatorischen Einheiten gehören die Phosphokinasen PKA und CaMKII δ . Diese regulieren über das Phosphorylieren von Serin- und Threoninresten (v. a. Ser2809, Ser2815 und Ser2030) den Rezeptor (Marx et al. 2000; Witcher et al. 1991). Hierdurch steigt die Sensitivität des RyR₂ gegenüber Ca²⁺ als Trigger-Substanz und dementsprechend erhöht sich die P₀ (Valdivia et al. 1995; Wehrens et al. 2004). Weiterhin bindet die Phosphodiesterase PDE4D3 an den RyR₂. Sie bewirkt eine Spaltung von cAMP und antagonisiert somit lokal am RyR₂ den Kinase-Effekt (Lehnart et al. 2005). Sowohl PKA als auch PDE4D3 binden über das Ankerprotein mAKAP (*muscle A kinase-anchoring protein*) am RyR₂ (Dodge et al. 2001). Weil auch die PDE4D3 von der PKA phosphoryliert und somit aktiviert wird, ergibt sich hier ein negativer Feedback-Mechanismus (Lehnart et al. 2005). Über Spinophilin und PR130, zwei weitere Ankerproteine, binden außerdem die dephosphorylierenden Proteinphosphatasen 1 und -2a am RyR₂ (Marx et al. 2001). Als weiteres wichtiges assoziiertes Protein des RyR₂ ist außerdem Calmodulin (CaM) zu nennen. Die RyR₂-Modulation durch CaM ist durch einen biphasischen Effekt auf die P₀ des RyR₂ charakterisiert, wobei der inhibitorische Effekt hier im Vordergrund steht. Somit verringert CaM die P₀ und die Öffnungszeit des RyR₂ (Meissner 1986; Xu et al. 2004). Als ähnlicher Regulator wie CaM gibt es zunehmend Evidenz, dass das Protein S100A1 auch mit dem RyR₂ interagiert und dementsprechend die elektromechanische Kopplung beeinflusst (Volkers et al. 2007). Für die Stabilität des Rezeptors sind weiterhin die Proteine Calstabin1 (FKBP12) und Calstabin2 (FKBP12.6) relevant. Sie konnten durch den immunsuppressiven Wirkstoff FK509 als *FK-binding-proteins* identifiziert werden, wurden aber aufgrund ihrer Funktion in Calstabin umbenannt (Marks 1996; Wehrens et al. 2003). Ein Fehlen von Calstabin1 im skelettalen RyR₁ führt zu einer erhöhten P₀ (Brillantes et al. 1994). Damit übereinstimmend erhöht sich die P₀ des RyR₂ ebenfalls durch die Depletion von Calstabin2 vom RyR₂ (Kaftan et al. 1996), was weiterhin zu vermehrten diastolischen Ca²⁺-Freisetzungen führt (Xin et al. 2002). Bezogen auf diesen Wirkmechanismus seien an dieser Stelle auch Arbeiten zur pharmakologischen Intervention genannt. Diese zeigen, dass JTV-519, ein 1,4-benzothiazepin Derivat, die Bindung von Calstabin2 an den RyR₂ verbessert und spontane arrhythmogene diastolische Ca²⁺-Freisetzungen verringert (Hunt et al. 2007).

1.5.2 Pathophysiologische Rolle des kardialen Ryanodinrezeptors

Verschiedene kardiale Erkrankungen sind mit einer Veränderung der Interaktionen der modulatorischen Einheiten des RyR₂ assoziiert. Dies führt zu einer Alteration der RyR₂-Konformität und destabilisiert so den Rezeptor. Hierfür ursächlich können Mutationen des Rezeptors sein. Bei dieser Erkrankungsgruppe liegt der Großteil der Mutationen zwischen zentraler C-Domäne und N-terminaler Domäne. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer pathologischen Rezeptorkonformität mit konsekutiver Destabilisierung der Domän-Beziehungen. Dadurch öffnet sich der RyR₂ auch (pathologisch) in der Diastole und setzt kleine Mengen von Ca²⁺ frei (Masafumi Yano et al. 2006). Interessanterweise zeigte sich dieser Mechanismus sowohl bei RyR₁ assoziierten Erkrankungen wie der malignen Hyperthermie (s.u.) und der Central-Core-Myopathie (McCarthy et al. 2000) als auch bei RyR₂ assoziierten Erkrankungen (Marks et al. 2002). Zu den RyR₂ assoziierten Erkrankungen gehört die katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (*catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*, CPVT) (Priori et al. 2001). Die CPVT ist angeboren und die Patienten haben trotz struktureller Unauffälligkeit des Herzens ein erhöhtes Risiko für einen SCD (Leenhardt et al. 1995). Durch die veränderte Proteinkette werden die Domän-Interaktionen innerhalb des RyR₂ abgeschwächt und der Rezeptor destabilisiert (Uchinoumi et al. 2010). Hierdurch treten während beta-adrenerger Stimulation vermehrt RyR₂ vermittelte Ca²⁺-Freisetzungen in der Diastole auf, die als arrhythmogenes Substrat der CPVT angesehen werden (George et al. 2003; Lehnart et al. 2004; Marks et al. 2002). Auch bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (*arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*, ARVC) wurden RyR₂-Mutationen beschrieben, was die pathophysiologische Rolle des RyR₂ für Arrhythmien weiter unterstreicht (Tiso et al. 2001). Jedoch hat der Großteil der ARVC- Erkrankungen seinen Ursprung hauptsächlich in veränderten Zellkontakten und nur der Subtyp 2 der ARVC ist RyR₂ assoziiert (Corrado et al. 2017; Pilichou et al. 2006; Rampazzo et al. 2002).

Die Konformationsänderung des RyR₂ ist besonders für die Herzinsuffizienz von Relevanz. Eine verminderte Calstabin-Bindung ist mit einer Destabilisierung des Rezeptors in der Herzinsuffizienz assoziiert (K Ono et al. 2000). Die in der Herzinsuffizienz präsente Hyperphosphorylierung des RyR₂ verstärkt weiterhin die Dissoziation von Calstabin, wodurch der RyR₂ weiter destabilisiert wird und arrhythmogene Ca²⁺-Freisetzungen durch den RyR₂ verstärkt werden (Marx et al. 2000). Oda et al. postulierten, dass die Voraussetzung für diese Destabilisierung des Rezeptors die gestörte Interaktion der zentralen und N-terminalen Domäne zu sein scheint. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion dieser Domänen in der Herzinsuffizienz geschwächt ist (Oda et al. 2005). Genau diese domänenabhängige

Destabilisierung konnte als zugrundeliegender Mechanismus für eine pathologisch veränderte Ca^{2+} -Homöostase in der Herzinsuffizienz bestätigt werden (M. Yano et al. 2000). In Folge konnte dieser Mechanismus auch als Ursache vermehrter Arrhythmien in der Herzinsuffizienz bestätigt werden (M Ono et al. 2010; Tateishi et al. 2009).

Auch beim Vorhofflimmern wurde eine erhöhte P_0 des RyR_2 beschrieben, die zu einer erhöhten Frequenz an spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen durch den RyR_2 führt (Hove-Madsen et al. 2004). Eine weitere Studie von Vest et al. konnte die Beobachtung der erhöhten P_0 des RyR_2 beim Vorhofflimmern bestätigen. Als möglicher Mechanismus wurde in dieser Studie ebenfalls eine Hyperphosphorylierung des RyR_2 nachgewiesen, durch die die Bindung von Calstabin2 am Rezeptor vermindert wird. Die Dissoziation von Calstabin2, welches den Rezeptor stabilisiert, führt ähnlich wie in der Herzinsuffizienz zu einem dysfunktionalen, instabilen RyR_2 (Vest et al. 2005).

Zusammengenommen besteht eine breite Evidenzbasis, dass die Domän-Interaktionen wichtig für die Konformität des RyR_2 sind und eine Abschwächung dieser im Kontext kardialer Erkrankungen zu pathologischen, arrhythmogenen Ca^{2+} -Freisetzungen führen kann (Ikemoto et al. 2002).

1.6 Kardiale Arrhythmien und zelluläre Arrhythmogenese

1.6.1 Grundlagen der Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen beschreiben eine irreguläre, tachykarde oder bradykarde Herzaktion. Ihnen liegen Veränderungen in der regelrechten Erregungsbildung und Erregungsleitung zugrunde, wodurch eine effiziente physiologische Herzaktion beeinträchtigt wird. In ausgeprägten Fällen kann durch ungerichtete Erregungen und Kontraktionen des Myokards der Blutfluss vollständig zum Erliegen kommen. Im Falle des Vorhofflimmerns wird hierdurch neben einer hämodynamischen Einschränkung vor allem die Thrombenbildung mit der Gefahr eines Insultes durch kardioembolische Ereignisse begünstigt (Wolf et al. 1991). Im Falle des Kammerflimmerns kann es zum Kreislaufversagen und Tod kommen. Wie bereits einleitend beschrieben, ist der SCD eine der gefürchtetsten Komplikationen kardialer Erkrankungen. Bezogen auf die Entstehungsmechanismen von Arrhythmien soll an dieser Stelle vornehmlich auf die elektrische Instabilität des Myokards, welches ein wichtiger Mechanismus für Vorhofflimmern und Kammerflimmern ist, eingegangen werden. Hierzu zählen Störungen der myokardialen Erregungsleitung bzw. der propagierenden Depolarisationswelle. Durch elektrisch inaktive Myokardanteile, wie z.B. durch Vernarbung nach Myokardinfarkt, kann ein Leitungshindernis für die Erregung

entstehen. Im Falle einer asymmetrischen Erregungsweiterleitung um das Hindernis, kann die Erregung wieder retrograd geleitet werden und eine Reentry- bzw. Rotoren-Bewegung ausgelöst werden, die Kammerflimmern begünstigen kann (Wagner et al. 2015). Neben der strukturell bedingten Inaktivität von Myokardanteilen, können aber auch elektrische Dysregulationen z.B. durch eine Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase, des Ruhemembranpotentials oder der Aktionspotentialdauer zu der (lokalen) Leitungsverzögerung führen und irreguläre Erregungen und Kammerflimmern hervorrufen (Weiss et al. 2005).

Weiterhin sind fokale Depolarisationen, die zur Extrasystolen führen und ebenfalls Kammertachykardien oder Kammerflimmern triggern können, von Bedeutung. Bei genauerer Untersuchung der Mechanismen der fokalen Arrhythmien zeigte sich in einer Arbeit von Pogwizd et al. unter Verwendung eines herzinsuffizienten Tiermodells, dass die Entstehungsmechanismen von ventrikulären Extrasystolen und Episoden ventrikulärer Tachykardie zu einem bedeutenden Teil auf zellulärer Ebene zu liegen scheinen (Pogwizd 1995). Dieser zellulär-getriggerte, fokale Ursprung von Arrhythmien konnte in einer dreidimensionalen elektrischen Darstellung humaner Herzen von Patienten während einer Herztransplantation bestätigt werden (Pogwizd et al. 1998). Im folgenden Kapitel soll auf diese zellulären Mechanismen der fokalen Arrhythmie eingegangen werden, die in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern an der Arrhythmogenese beteiligt sind.

1.6.2 Diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen und zelluläre Arrhythmogenese in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern

Neben dem systolischen Ca^{2+} -Transienten, der über CICR die Kontraktion der Zelle vermittelt, lassen sich im Kardiomyozyten mittels Ca^{2+} -Farbstoff auch lokal und zeitlich begrenzte Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) darstellen. Diese werden im Einzelnen als Ca^{2+} -Spark bezeichnet (Cheng et al. 1993). Da diese auch unter Verwendung von Ca^{2+} -freiem Extrazellulärmedium und unter Blockade aller anderen Ca^{2+} -Kanäle mit Ausnahme des RyR_2 auftreten, scheinen Ca^{2+} -Sparks RyR_2 vermittelt zu sein. Die Frequenz des Auftretens dieser Ereignisse (Ca^{2+} -Spark-Frequenz) korreliert direkt mit der P_0 des RyR_2 , die wiederum durch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird (Cannell et al. 1994; Cheng et al. 2008; Cheng et al. 1993). Da durch Spark-Ereignisse das SR kumulativ Ca^{2+} in der Diastole verliert, wird vom diastolischen SR Ca^{2+} -Leck gesprochen. Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich analog dazu, dass die Amplitude der systolischen Ca^{2+} -Transienten nach diastolischen Ca^{2+} -Spark-Ereignissen vermindert waren (Allen et al. 1985).

In verschiedenen experimentellen Studien wurde beschrieben, dass das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in der Herzinsuffizienz (Ai et al. 2005; Shannon et al. 2003) und beim Vorhofflimmern (Hove-Madsen et al. 2004; Neef et al. 2010; Voigt et al. 2012) erhöht und somit für die Pathophysiologie der Erkrankungen relevant ist.

Hierzu zählt eine Einschränkung der systolischen und diastolischen Myokardfunktion. Als Folge des SR Ca^{2+} -Lecks wird in der Herzinsuffizienz durch einen erhöhten Ca^{2+} -Verlust während der Diastole der Ca^{2+} -Gehalt des SR verringert (Lindner et al. 1998). Folglich steht in der folgenden Systole weniger Ca^{2+} für die Kontraktion zur Verfügung, was sich in einer Reduzierung der systolischen Ca^{2+} -Transienten und einer Erhöhung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration widerspiegelt (Beuckelmann et al. 1992). Infolgedessen nimmt die Kontraktionskraft ab und das Kraft-Frequenz-Verhalten wird invers (Pieske et al. 1995; Pieske et al. 1999). Neben dem diastolischen SR Ca^{2+} -Leck trägt allerdings auch die Herunterregulierung der SERCA in der Herzinsuffizienz zu diesem Effekt bei (Hasenfuss et al. 1994; Mercadier et al. 1990). Schlussendlich resultiert aus verminderter systolischer Ca^{2+} -Ausschüttung und erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegeln eine systolische und diastolische Dysfunktion in der Herzinsuffizienz (Hasenfuss et al. 2002). In diesem Zusammenhang konnte interessanterweise gezeigt werden, dass eine Verringerung des SR Ca^{2+} -Lecks die diastolische Funktion verbessern kann (Sacherer et al. 2012). Auch beim Vorhofflimmern sind Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase beschrieben, die möglicherweise mit einem erhöhten SR Ca^{2+} -Leck assoziiert sind. So gibt es Evidenz, dass beim Vorhofflimmern auch eine zytosolische Ca^{2+} -Überladung auftritt (Goette et al. 1996). Während beim humanen Vorhofflimmern der Ca^{2+} -Gehalt des SR nicht verändert zu sein schien (Neef et al. 2010), postulierte eine tierexperimentelle Arbeit hingegen einen verminderten SR- Ca^{2+} -Gehalt beim Vorhofflimmern. Als Resultat der veränderten Ca^{2+} -Homöostase beim Vorhofflimmern zeigte sich eine kontraktile Dysfunktion (Greiser et al. 2009).

Neben den genannten Folgen des diastolischen Ca^{2+} -Lecks für die kontraktile Funktion ist vor allem die Arrhythmogenität des Ca^{2+} -Lecks von besonderer (klinischer) Relevanz. Durch ein vermehrtes RyR_2 vermitteltes Ca^{2+} -Leck aus dem SR während der Diastole erhöht sich, wie schon oben beschrieben, die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Diastole. Hierdurch werden konsekutiv verschiedene Ionenströme aktiviert, durch die ein arrhythmogener transienter Einwärtsstrom (*transient inward current*, I_{ti}) entstehen kann, der Arrhythmien triggern kann (Kass et al. 1978). Der I_{ti} wird zum einen durch einen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Strom ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) generiert (Zygmunt 1994; Zygmunt et al. 1998). Dieser stellt ein durch Ca^{2+} aktivierter Auswärtsstrom dar und führt durch die Cl^- -Depletion zur Depolarisation (Kawano et al. 1995). Weiterhin ist als Grundlage des I_{ti} ein unselektiver Kationeneinstrom beschrieben, der zur Depolarisation beitragen kann (Guinamard et al.

2004). Von größter Bedeutung für die Generation des I_{ti} scheint aber der Kationenaustausch durch den NCX zu sein. In Überprüfungen des Anteils des NCX am I_{ti} in verschiedenen Spezies zeigte sich, dass der NCX-Strom prozentual hauptverantwortlich für den I_{ti} zu sein scheint (Fedida et al. 1987; Schlotthauer et al. 2000). Aufgrund der NCX vermittelten passiven Ca^{2+} -Extrusion werden ein Ca^{2+} -Ion aus- und drei Na^+ -Ionen in die Zelle transportiert (Reeves et al. 1984). Durch die Verschiebung der positiven Nettoladung in die Zelle wirkt der NCX elektrogen (Reeves et al. 1980). Hierbei arbeitet der Kanal im sogenannten Vorwärtsmodus. Da der Ionenaustausch passiv ist, kann es unter veränderten Bedingungen (z. B. bei erhöhter zytosolischen Na^+ -Konzentration) auch zum Ca^{2+} -Einstrom und Na^+ -Ausstrom kommen. Der Kanal befindet sich in diesem Fall im Rückwärtsmodus (Leblanc et al. 1990). Die NCX-Aktivität zeigte sich interessanterweise sowohl in der humanen Herzinsuffizienz (Hasenfuss et al. 1999; Studer et al. 1994) als auch im humanen Vorhofflimmern (Voigt et al. 2012) erhöht. Folglich erhöht sich die NCX vermittelte Ca^{2+} -Extrusion und damit auch der I_{ti} . Der I_{ti} kann zu einer Depolarisation der Zelle führen, durch die nach einem Aktionspotential Nachdepolarisationen entstehen können. Fallen diese Nachdepolarisationen in die Phase der Repolarisation (Phase II und III des Aktionspotentials), so entsteht eine frühe Nachdepolarisation (*early afterdepolarization*, EAD, Abbildung 4). Bei einer Nachdepolarisation nach abgeschlossener Repolarisation der Zelle wird von einer späten Nachdepolarisation (*delayed afterdepolarization*, DAD, Abbildung 5) gesprochen. Der Ursprung der EADs liegt neben spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen (LH Xie et al. 2009) weiterhin in Veränderungen der Aktionspotentialdauer anderer Genese, z. B. durch Medikamente, die die Repolarisation verlängern, oder durch angeborene (Kanal-) Erkrankungen wie das Long-QT-Syndrom (Roden 1993). DADs sind analog des oben erläuterten Mechanismus mit erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegeln assoziiert (Fozzard 1992). In Übereinstimmung mit der erhöhten NCX-Aktivität in Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern ist, verglichen mit gesunden Herzen, auch eine erhöhte Inzidenz von Nachdepolarisation in der Herzinsuffizienz (Vermeulen et al. 1994) bzw. der Herzhypertrophie (Aronson 1981) und beim Vorhofflimmern (Voigt et al. 2012) beschrieben worden. Bezüglich der DAD-Generation ist anzuführen, dass sich die Inzidenz von arrhythmogenen Nachdepolarisationen durch beta-adrenerge Stimulation erhöht (Belardinelli et al. 1983; Priori et al. 1990).

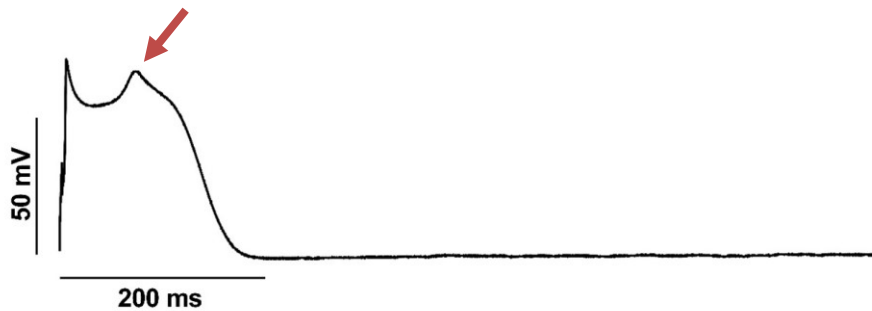


Abbildung 4: Frühe Nachdepolarisation. Aufgenommenes originales Aktionspotential eines isolierten humanen atrialen Kardiomyozyten, stimuliert mit 1 Hz. Während der Repolarisation erfolgt eine frühe Depolarisation (EAD, roter Pfeil). Das Aktionspotential ist insgesamt entsprechend verlängert. Eigene Messung.



Abbildung 5: Späte Nachdepolarisation. Originale Aktionspotentialmessung eines isolierten murinen Kardiomyozyten (0.5 Hz Stimulation). Nach abgeschlossener Repolarisation erfolgt eine Nachdepolarisation, die sich als späte Nachdepolarisation (DAD, roter Pfeil) darstellt. Eigene Aufzeichnung.

Wenn die Nachdepolarisation ein gewisses Schwellenpotential überschreitet, kann ein Aktionspotential ausgelöst werden, was in diesem Falle als getriggerte Aktivität (*triggered activity*, Abbildung 6) bezeichnet wird (Wit et al. 1983).

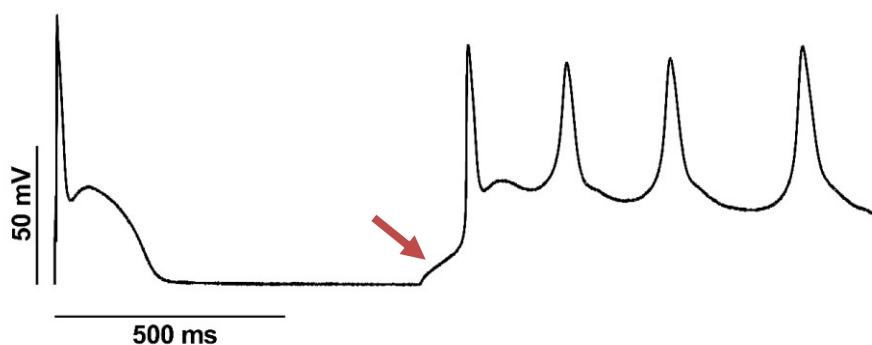


Abbildung 6: Getriggerte Aktionspotentiale. Aufgenommenes originales Aktionspotential einer murinen Herzmuskelzelle bei einer Stimulation von 1 Hz. Nach vollständiger Repolarisation erfolgt eine initiale späte Nachdepolarisation (roter Pfeil). Durch diese wird ein Aktionspotential getriggert, welches zu Arrhythmien führt. Eigene Aufnahme.

Die Ca^{2+} -Leck/DAD induzierte Arrhythmie als eine elektrophysiologische Grundlage der Arrhythmie-Entstehung findet ihre direkte klinische Translation durch die CPVT. Die CPVT ist, wie in Kapitel 1.5.2 ausgeführt, mit einem destabilisierten RyR_2 und erhöhtem diastolischen SR Ca^{2+} -Leck vergesellschaftet (Marks et al. 2002). Laut einer Studie von Nam et al. sind DADs entsprechend Grundlage für die Arrhythmogenese in der CPVT: mittels niedrigdosiertem Koffein, das die P_0 des RyR_2 erhöht, und Isoprenalin wurden in einem CPVT-Modell DADs stimuliert. Durch das vermehrte Auftreten propagierender Aktionspotentiale wurden in der Folge Extrasystolen und Arrhythmien im gesamten Herzen ausgelöst (Nam et al. 2005). Die ventrikulären Arrhythmien bei der CPVT können somit als assoziiertes klinisches Korrelat für die Ca^{2+} -Leck/DAD induzierte Arrhythmieentstehung durch destabilisierte RyR_2 angesehen werden und verdeutlichen die Relevanz der internen Destabilisierung des Rezeptors für die Erforschung einer antiarrhythmischen Pharmakotherapie.

1.7 Modifizierung des Ryanodinrezeptors durch Dantrolen

Dantrolen (1-(((5-(4-Nitrophenyl)-2-Furanyl)-Methylidenamino)-2,4-Imidazolidin-dion) ist ein lipophiles Hydantoinderivat (Krause et al. 2004). Dantrolen war initial ein als Muskelrelaxans erforschtes Medikament (Dykes 1975). Bekannt ist Dantrolen heute allerdings als kausales und empfohlenes Erstlinienmedikament bei der Behandlung der malignen Hyperthermie (Glahn et al. 2010). Die maligne Hyperthermie ist ein hauptsächlich durch Inhalationsanästhetika und depolarisierende Muskelrelaxantien (v. a. Succinylcholin) induzierter lebensbedrohlicher Zustand, bei dem es durch die Öffnung skelettmuskulärer RyR_1 und konsekutiv exzessiver Ca^{2+} -Freisetzung zur Hyperthermie und Stoffwechselentgleisung kommt (Mickelson et al. 1996). Als Ursache für die maligne Hyperthermie wurde ein instabiler Ryanodinrezeptor beschrieben, dessen Ursachen hauptsächlich Punktmutationen im N-Terminus und im zentralen Teil der Proteinkette sind (McCarthy et al. 2000). Durch akute Gabe von Dantrolen kann dieser lebensbedrohliche Zustand unterbrochen werden (Harrison 1975; Kolb et al. 1982). Weiterhin wird Dantrolen, wie eingangs beschrieben, als Muskelrelaxanz bei Patienten mit Spastik eingesetzt (Ketel et al. 1984).

Die Pathomechanismen von MH und CPVT in Form einer RyR_2 -Destabilisierung durch Punktmutationen innerhalb des Rezeptors sind ähnlich. Durch die Studie von Oda et al. wurde gezeigt, dass gestörte Domän-Interaktionen und ein konsekutiv destabilisierter Rezeptor mit erhöhter Suszeptibilität für diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen, auch in der Herzinsuffizienz, relevant sind (Oda et al. 2005). Dies erlaubt somit die Frage nach möglichen Effekten von Dantrolen auf den kardialen RyR_2 . Interessanterweise konnte

auch eine Bindungsstelle für Dantrolen am RyR₂ beschrieben werden (Paul-Pletzer et al. 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dantrolen die instabilen und defekten Domäninteraktionen innerhalb des Rezeptors eines herzinsuffizienten Tiermodells stabilisiert. Hierbei verbessert Dantrolen besonders die kritische Interaktion zwischen der N-terminalen Kette (Domäne 1-600) und dem C-Terminus (Domäne 2000-2500) der Proteinkette entscheidend und überführt den Rezeptor dadurch aus einem *unzipped-state* in einen *zipped-state*. Interessanterweise bewirkte Dantrolen in dieser Studie keine Effekte auf nicht pathologisch veränderte RyR₂ gesunder Kardiomyozyten, was eine isolierte Wirkung von Dantrolen auf destabilisierte Rezeptoren im *unzipped-state* suggeriert (Kobayashi et al. 2009). Diese Beobachtungen wurden durch Daten bestätigt, nach denen Dantrolen die Effekte des Peptids DPc10, welches eine Destabilisierung des RyR₂ entsprechend der CPVT imitiert, vermindert (Uchinoumi et al. 2010) und dysregulierte Domänbindung wiederherstellt (Seidel et al. 2015). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Anwesenheit von CaM beim stabilisierenden Effekt von Dantrolen auf den Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Oo et al. 2015).

Eine tierexperimentelle Arbeit konnte darauf aufbauend in funktionellen Untersuchungen Effekte von Dantrolen auf Kardiomyozyten herzinsuffizienter Kaninchen beschreiben, bestehend aus einer Reduktion des arrhythmogenen diastolischen SR Ca²⁺-Lecks. Auch in dieser Studie betraf die Wirkung Dantrolens nur die „kranken“ Zellen aus dem Herzinsuffizienz-Modell (Maxwell et al. 2012).

1.8 Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit

Das diastolische SR Ca^{2+} -Leck durch eine RyR_2 Destabilisierung kann zur getriggerten Aktivität führen und stellt somit einen potenten Pathomechanismus für fokale Arrhythmien in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern dar. In der Herzinsuffizienz erhöht es die Gefahr für Kammerflimmern und einen SCD, beim Vorhofflimmern scheint es an der Initiierung und Perpetuation der Arrhythmie beteiligt zu sein. Beide kardialen Pathologien tragen zur erheblichen Mortalität kardialer Erkrankungen bei. Aus diesem Grund könnte das diastolische SR Ca^{2+} -Leck durch eine RyR_2 Destabilisierung ein vielversprechendes Ziel antiarrhythmischer Therapieansätze sein. Vorarbeiten suggerieren, dass Dantrolen im Tiermodell den kardialen RyR_2 stabilisieren könnte.

Das Ziel dieser Arbeit ist, Dantrolen und den Effekt der RyR_2 -Stabilisierung als antiarrhythmischen Therapieansatz im humanen Myokard bei Patienten mit Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern oder Sinusrhythmus zu untersuchen. Weiterhin sollen die pharmakodynamischen Effekte von Dantrolen auf die elektromechanische Kopplung im humanen Myokard charakterisiert werden.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

- (1) Verringert Dantrolen das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz und Patienten mit Vorhofflimmern?
- (2) Wie verhält sich dieser Effekt in „gesunden“ Kardiomyozyten?
- (3) Gibt es eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Effekte?
- (4) Lässt sich eine mögliche Reduktion des Ca^{2+} -Lecks in eine Verminderung der I_{ti} vermittelten zellulären arrhythmogenen Trigger übersetzen?
- (5) Verändert Dantrolen durch Beeinflussung des RyR_2 andere elektrophysiologische Eigenschaften oder die Aktionspotentialdauer der Kardiomyozyten?
- (6) Verändert Dantrolen durch Beeinflussung des RyR_2 die Kontraktilität des humanen Myokards?

2 Material und Methoden

2.1 Pharmakologische Interventionen

2.1.1 Dantrolen

Dantrolen (Molekülformel: $C_{14}H_{10}N_4O_5$, molekulare Masse: 314,257 g/mol; 14663-23-1, Sigma-Aldrich, USA) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einer finalen Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ oder 10 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Isolierte Zellen und zu untersuchendes Gewebe wurden für 30 min vor der Messung mit Dantrolen inkubiert. Die Kardiomyozyten der Kontrollgruppe wurden mit der entsprechenden DMSO Konzentration, die zur Lösung von Dantrolen verwendet wurde, behandelt.

2.1.2 Isoproterenol

Isoproterenol (51-30-9, Sigma-Aldrich, USA) ist ein selektiver β -Rezeptor-Agonist und wurde zur beta-adrenergen Stimulation der Kardiomyozyten (siehe Kapitel 1.4.3) in einer Konzentration von 100 nmol/l verwendet. Analog zur Intervention mit Dantrolen wurden die Zellen für 30 min vor der Messung mit Isoproterenol inkubiert.

2.2 Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten

2.2.1 Gewinnung ventrikulärer Myokardproben

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Ventrikelpuben konnten im Rahmen einer Kooperation mit dem Transplantationszentrum Bad Oeynhausen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz während der Herztransplantation gewonnen werden. Ganze explantierte Herzen oder einzelne Myokardproben dieser wurden nach Entnahme in Custodiol (1414711, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Deutschland) bei 4°C transportiert. Die Verwendung der humanen Myokardproben für die Forschung erfolgte entsprechend der Deklaration von Helsinki. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen lag für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ventrikulären Proben vor (Nr. 31/9/00).

2.2.2 Präparation und Reinigung des ventrikulären Myokards

Für die Kardiomyozyten-Isolation wurde eine etwa 2x2 cm große Probe aus dem linksventrikulären Myokard präpariert. Fibrotische Areale und Fett wurden entfernt. In einer Petrischale konnte das Myokard nun in ca. 1x1 mm große Stückchen

gewebeschonend geschnitten werden. Die Transportlösung wurde anschließend abgenommen und durch 20 ml Joklik-MEM-Lösung (A1539, AppliChem, USA), die auf einen pH-Wert von 7,4 (bei 37°C) titriert wurde, ersetzt. Zur Reinigung des Gewebes wurde diese für zwei weitere Zyklen durch 10 ml Joklik-MEM-Lösung ausgetauscht.

2.2.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten

Nach dem Waschen der Gewebestückchen und Abnahme der Lösung wurde das Myokard in ein Rührgefäß gegeben, welches durch ein an ein Wasserbad angeschlossenes Perfusionssystem auf 37°C eingestellt wurde. In diesem wurde das Gewebe für 45 min in der Enzymlösung Ventrikel I inkubiert.

Tabelle 1: Enzymlösung Ventrikel I

Substanz	Menge	
Collagenase Typ II (M2C13334, Worthington, USA)	0,015 g	
370 u/mg		gelöst in 20 ml Joklik-MEM-Lösung
Trypsin 2,5% (15090-046, Gibco, USA)	2 ml	

Nach 45 min Digestionszeit wurde anschließend die Lösung verworfen und die Gewebestückchen mit der Enzymlösung Ventrikel II versetzt.

Tabelle 2: Enzymlösung Ventrikel II

Substanz	Menge	
Collagenase Typ II Worthington (M2C13334, Worthington, USA)	0,0154 g	
370 u/mg		gelöst in 10 ml Joklik-MEM-Lösung

Nach weiteren 5-10 min wurde die Lösung, die schon Zellen enthalten konnte, abgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei einer relativen Zentrifugalkraft von 81,63 g zentrifugiert. Auf die verbliebenen Gewebestückchen wurde für einen weiteren Verdau erneut Enzymlösung Ventrikel II gegeben. Nach der

Zentrifugation wurde die Enzymlösung bis auf das Zellpellet abgenommen. Zu diesem wurde nun eine mit BCS (*bovine calve serum*, 10 %; F2442, Sigma Aldrich, USA) versetzte Joklik-MEM-Lösung zum Stoppen der enzymatischen Digestion hinzugegeben. Mittels Tropfenausstrich auf einem Objektträger wurde das Vorhandensein von Kardiomyozyten mikroskopisch untersucht und der Grad des Gewebeverdaus abgeschätzt. Gegebenenfalls wurden noch weitere Verdauschritte bis zum Erscheinen von abgrenzbaren quergestreiften und morphologisch intakten Kardiomyozyten (siehe Abbildung 7) durchgeführt. Bei einer nach morphologischen Maßstäbe qualitativ und quantitativ sehr guten Kardiomyozyten-Isolation wurde die Zellsuspension für die funktionellen Messungen weiterverwendet.



Abbildung 7: Isolierter humaner ventrikulärer Kardiomyozyt.

2.3 Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten

2.3.1 Gewinnung atrialer Myokardproben

Ein großer Teil der Operationen in der Herz-/Thorax-Gefäßchirurgie sind Operationen am ruhenden Herzen. Hierzu zählen insbesondere Bypass-Operationen sowie verschiedene Rekonstruktionen oder Ersatzoperationen der Atrioventrikular- oder Semilunarklappen. Hierfür wird der künstliche reversible Herzstillstand durch eine Kardioplegie-Lösung induziert. Um die Kreislauffunktionen zu gewährleisten, wird die Herz-Lungen-Maschine eingesetzt. Diese übernimmt den Gasaustausch, die Pumpfunktion und die Temperaturregelung, während der Operateur am ruhenden Herzen operieren kann. Im Rahmen der Operationstechnik beim Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine und im weiteren Verlauf der Operation wird atriales Gewebe resiziert. In Kooperation mit der Herzchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen konnten atriale Proben bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses der Patienten nach Aufklärung durch den Herzchirurgen für die experimentelle Forschung akquiriert werden. Beim Kanülieren des rechten Vorhofes zum Anschluss der Herz-Lungen-Maschine an das venöse System wird der endige Teil des rechten Herzohrs resiziert, um ein Ostium für die Kanüle zu schaffen. Durch diese Resektion wurden ca. 100-600 mg große Proben rechter Vorhöfe gewonnen.

Eine bedeutende Komplikation von Vorhofflimmern ist die Thrombembolie. Durch die ungerichteten Kontraktionen verschwindet ein schneller gerichteter Blutfluss und es wird, vor allem im Herzohr, die Entstehung von Thromben begünstigt. Bei Herzoperationen von Patienten mit Vorhofflimmern kann deshalb bei klinischer Indikation das linke Herzohr entfernt werden, um der Thrombenbildung entgegenzuwirken. Durch Freigabe des Resektates zur experimentellen Forschung konnten ca. 300-1200 mg große Proben linker Vorhöfe für diese Arbeit gewonnen werden. Schlussendlich konnten auch aus den oben beschriebenen explantierten Herzen atriale Gewebeproben gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus diesen Herzen linksatriale Proben von Patienten mit Vorhofflimmern präpariert. Direkt nach Entnahme der Gewebeprobe im Operationssaal wurde diese in gekühltem Custodiol (4°C) zügig in das Labor transportiert. Die Forschung erfolgte entsprechend der Deklaration von Helsinki. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen lag für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vorhofproben vor (Nr. 14/9/11, 21/10/00). Sowohl linkes als auch rechtes Vorhofgewebe wurde untersucht.

2.3.2 Präparation und Reinigung des atrialen Myokards

Für die Präparation wurde die Myokardprobe mit der Transportlösung in eine Petrischale gegeben, in der nun das Myokard freipräpariert und von Fett, Bindegewebe und Thromben gereinigt werden konnte. Das Gewicht der zu isolierenden Vorhofprobe wurde hierbei zwischen 200-600 mg gehalten.

Die gereinigte Gewebeprobe wurde in einer Petrischale mit 20 ml Ca^{2+} -freier Lösung (Tabelle 3) bei 4°C in 1-2 mm große Stücke geschnitten und anschließend in ein erwärmtes Rührgefäß gegeben. Die Suspension wurde während der Zellisolation konstant auf 37,7°C gehalten. Die Gewebestückchen wurden in der Lösung unter Sauerstoffbegasung und leichtem Rühren mithilfe eines Rührstäbchens gewaschen. Hierbei wurde alle 3 min die Ca^{2+} -freie Lösung ausgetauscht, indem die Lösung vorsichtig aus dem Rührgefäß durch ein Zellsieb pipettiert wurde. Das im Isolationsgefäß verbliebene Gewebe wurde zügig mit 20 ml frischer Ca^{2+} -freier Lösung versetzt. Nach 9 min Waschzeit war die Reinigung der Probe abgeschlossen.

Tabelle 3: Ca²⁺-freie Lösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,551	10
NaCl	58,44	100
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,47	5
Taurin	125,15	50
MOPS	209,26	5
Glucose	180,16	20

Die Ca²⁺-freie Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 (Raumtemperatur) titriert.

2.3.3 Isolation von atrialen Kardiomyozyten

Nachdem das Gewebe gereinigt war, wurde die Ca²⁺-freie Lösung abgenommen und 20 ml Enzymlösung Atrium I zu den Gewebestückchen in das Isolationsgefäß gegeben.

Tabelle 4: Enzymlösung Atrium I

Substanz	Gewicht [g]	
Collagenase Typ I (M2C13334, Worthington, USA)	0,0154	
370 u/mg		gelöst in 20 ml Ca ²⁺ -freier Lösung
Proteinase, bacterial (P8038, Sigma Aldrich, USA)	0,0080	
Type XXIV, 7.0-14.0 u/mg		

Nach 10 min Verdauzeit wurden 40 µl 10mM Ca²⁺Cl₂-Lösung in das Rührgefäß gegeben, sodass die Suspension eine Ca²⁺-Konzentration von 0,02 mM erreichte. Nach weiteren 35 min Verdauzeit war der erste Verdauenschritt abgeschlossen. Die Enzymlösung Atrium I wurde abgenommen und durch Enzymlösung Atrium II ersetzt.

Tabelle 5: Enzymlösung Atrium II

Substanz	Gewicht [g]
Collagenase Typ I Worthington (M2C13334, USA)	0,0154
370 u/mg	gelöst in 20 ml Ca ²⁺ -freier Lösung

Unmittelbar nach Zugabe der Ca²⁺-freien Lösung wurden nochmals 40 µl 10 mM Ca²⁺Cl₂-Lösung in das Rührgefäß pipettiert. Die Gewebeerzeugung in der Enzymlösung Atrium II wurde nun nach ca. 5 min mittels Tropfenausstrich auf einem Objektträger unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Hierbei war die Anwesenheit von isolierten Zellen und anderer Zellbestandteile bzw. Zelltrümmer maßgeblich, um den Grad der Verdauung abzuschätzen. Dieser zweite Verdauungsschritt wurde nach maximal 10 min Verdauzeit individuell beendet. Die Gewebesuspension wurde durch ein Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die im Zellsieb enthaltenen Gewebereste wurden in 20 ml Feng-Lösung wieder zurück in das Rührgefäß überführt.

Tabelle 6: Feng-Lösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration
KCl	74,551	20 mM
KH ₂ PO ₄	136,09	10 mM
D-Glucose	180,16	10 mM
L-Glutaminsäure	147,1	70 mM
DL-β-Hydroxybutyrsäure	126,09	10 mM
Taurin	125,15	10 mM
EGTA	380,35	10 mM
Albumin		1%

Die Feng-Lösung wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 7,0 (Raumtemperatur) titriert.

Um weitere Zellen mechanisch aus dem Zellverband zu lösen, wurden die Gewebereste nun mit einer 25 ml Pipette in der Feng-Lösung auf- und abpipettiert. Anschließend wurde die zweite Gewebesuspension durch das Zellsieb in ein zweites Falcon-Röhrchen überführt. Die Falcon-Röhrchen wurden bei einer relativen Zentrifugalkraft von 81,63 g

für 7 min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun mit einer Pasteurpipette bis auf die Zellpellets abgenommen werden. Zur zeitlichen Überbrückung bis zur Messung wurde 1 ml Feng-Lösung auf das Zellpellet gegeben. Abschließend erfolgte die Ca^{2+} -Beladung der Zellen mittels 10 mM $\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ -Lösung. Hierfür wurde in drei Schritten nach jeweils 10 min die Ca^{2+} -Konzentration auf eine Endkonzentration von 0,5 mM erhöht. Abschließend erfolgte eine morphologische Beurteilung der isolierten Kardiomyozyten. Nur Zellsuspensionen, die Zellen mit regelrechter Querstreifung, intakter Membran und physiologischer Granulierung enthielten, wurden der elektrophysiologischen Messung zugeführt.

2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

2.4.1 Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Der Vorteil der Konfokalmikroskopie im Vergleich zur Lichtmikroskopie liegt in einer höheren Auflösung, die durch einen besseren Kontrast erreicht werden kann. Dies wird durch die Verwendung von Lochblenden und einen speziellen Aufbau von Linsen ermöglicht, wodurch nicht das ganze Präparat, sondern nur ein begrenzter Ausschnitt angeregt und abgebildet wird.

Zunächst wird eine Lichtquelle als begrenzter Anregungsausschnitt auf das Präparat fokussiert. Durch die Verwendung einer Lochblende kann ein möglichst kleiner Quellfleck erzeugt und anschließend durch ein Linsensystem auf das Präparat fokussiert werden (Abbildung 8). Je kleiner der (beugungslimitierte) Fokuspunkt im Präparat ist, desto höher ist hierbei die Auflösung. Zusätzlich zur Fokusebene werden jedoch auch Strukturen ober- und unterhalb der Fokusebene (Z-Achse) angeregt. Durch die Verwendung einer zweiten Lochblende, die konfokal zur Fokusebene im Präparat positioniert ist, werden emittierte Signale aus den anderen Ebenen entlang der Z-Achse abgeschnitten und nur das emittierte Signal aus der Fokusebene wird durchgelassen. Hierdurch wird zusätzlich auch die Fokustiefe vermindert.

Durch die hohe Emission im Fokuspunkt bei gleichzeitig ausgeblendeten Hintergrundsignalen wird ein hoher Kontrast erreicht, was der entscheidende Vorteil der Konfokalmikroskopie ist. Hierdurch wird eine höherauflösende dreidimensionale Rekonstruktion des Präparates ermöglicht. Das vollständige Gesamtbild entsteht daher erst durch serielles „Abrastern“ des Präparates.

In dieser Arbeit wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss AG, Deutschland) mit einem Argon-Laser mit einer definierten Anregungswellenlänge von 485 nm verwendet. Der Vorteil einer Anregung mittels

Laserstrahl wie bei dieser Methode liegt in der stärkeren Fokussierung aufgrund des monochromatischen Laserlichtes, sodass kleinere Bereiche ausgeleuchtet werden können. Nach Anregung wird das von der Probe emittierte Laserlicht, nachdem es durch einen dichroitischen Spiegel gefiltert wurde, von einem Photomultiplier (PMT) registriert und in seiner Signalintensität verstärkt. Anschließend wird das Signal durch einen Analog-Digital-Wandler prozessiert, welcher die elektrische Spannung in ein digitales Signal umwandelt.

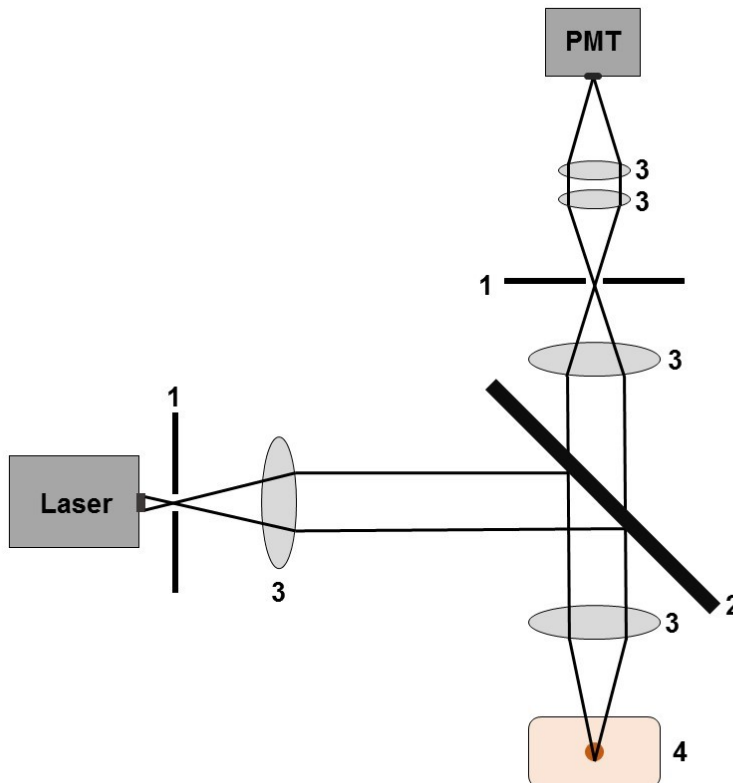


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konfokalmikroskopie. Der Anregungsstrahl wird durch eine Lochblende (1), den dichroitischen Spiegel (2) und eine Anordnung von Linsen (3) auf das Präparat (4) fokussiert. Der dichroitische Spiegel reflektiert das Exzitationslicht auf das Präparat. Das emittierte Licht hingegen wird nicht reflektiert, sondern durch ein Linsensystem fokussiert und trifft auf den Photomultiplier (PMT). Durch die Verwendung bzw. Verkleinerung der Lochblenden wird der Kontrast des Bildes erhöht. Lochblenden und Bildpunkt sind gleichzeitig im Fokus (=konfokal).

2.4.2 Der Ca^{2+} -Farbstoff Fluo-3

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie gehört zur Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Moleküle durch einen Laser in einer definierten Wellenlänge in einen angeregten Zustand versetzt, den sie durch die Emission von Licht in einer anderen bestimmten Wellenlänge wieder verlassen. Das emittierte Licht ist

energieärmer und hat dementsprechend eine längere Wellenlänge als das Anregungslicht (Stokes-Verschiebung). Durch einen Filter (hier der dichroitische Spiegel) kann so Anregungslicht blockiert werden, während das Emissionslicht transmittiert wird. Durch fluoreszierende Farbstoffe (Fluochrome), die nur an spezifischen Zielstrukturen binden, können diese in der Zelle sichtbar gemacht werden.

Für die Messungen der diastolischen Ca^{2+} -Sparks wurde in dieser Arbeit der Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 (F1242, Thermo Fischer Scientific, USA) in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ verwendet. Fluo-3 gehört zu den nicht-ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen und hat ein festes Absorptionsmaximum (488 nm) und Emissionsmaximum (525 nm). Bei den nicht-ratiometrischen Farbstoffen wie Fluo-3 ist das größere Verhältnis des Signals zur Hintergrundfluoreszenz von Vorteil. Hierbei verstärkt sich die Fluoreszenzemission in Abhängigkeit zur steigenden Ionenkonzentration (siehe Abbildung 9). Durch Bindung an Ca^{2+} -Ionen vervielfacht Fluo-3 seine Fluoreszenzintensität, sodass die Fluoreszenzamplitude mit der Ca^{2+} -Konzentration korreliert.

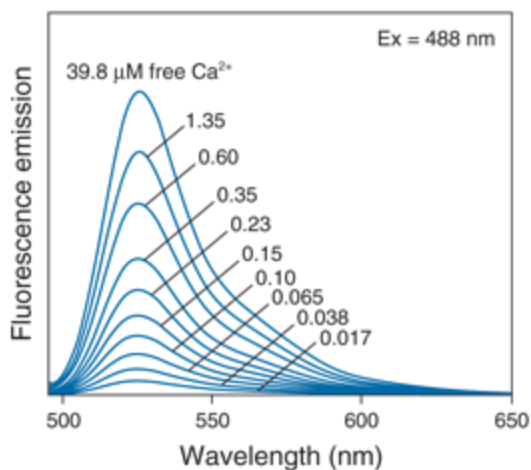


Abbildung 9: Fluoreszenzemissionsspektrum von Fluo-3. Dargestellt ist das Fluoreszenzspektrum des nicht-ratiometrischen Farbstoffes Fluo-3 in Abhängigkeit zur Ca^{2+} -Konzentration. Ex: Exzitationswellenlänge (© Thermo Fisher Scientific).

Im Gegensatz dazu besitzen ratiometrische Farbstoffe die Eigenschaft, ihre Absorptions- oder Emissionsmaxima bezogen auf die Wellenlänge in Abhängigkeit von Ca^{2+} zu ändern (sog. Spektralshift).

Fluo-3 ist an Azetoxymethylester (AM) gekoppelt, wodurch der Stoff lipophile Eigenschaften erhält und membranpermeabel ist. Durch die intrazelluläre Abspaltung des Esterrestes wird der Farbstoff hydrophil und impermeabel, sodass sich Fluo-3 in der Zelle anreichert und auch nach extrazellulärem Lösungswechsel in der Zelle verbleibt.

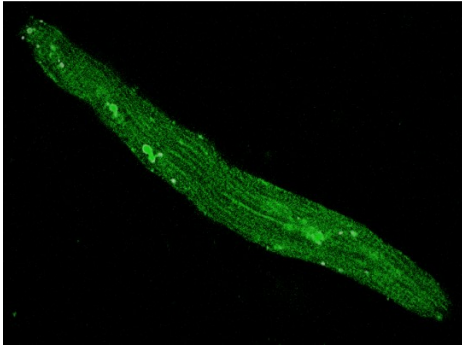


Abbildung 10: Ca^{2+} -Färbung eines humanen atrialen Kardiomyozyten mit Fluo-3 unter Verwendung des LSM 5 Pascal (Carl Zeiss AG, Deutschland).

2.4.3 Versuchsdurchführung der Konfokalmikroskopie

Die Zellsuspension mit den frisch isolierten atrialen/ventrikulären Kardiomyozyten wurde in Messkammern (IonOptix, USA) aufgetragen. Diese bestanden aus einem Plastikgehäuse und einem Glasplättchen, welches den Boden bildete. Für die Messung mussten die Zellen stabil in einer Ebene sein und nach mehrmaligem Lösungswechsel sicher in der Messkammer verbleiben. Hierzu wurde der Glasboden der Kammer mit 4 μl Laminin (L2020, Sigma Aldrich, USA) beschichtet, welches die Zelladhäsion am Messkammerboden gewährleistete. Nachdem ca. 500 μl der Zellsuspension in die Kammer gegeben wurden, wurde 30 min bis zur Sedimentation und Adhäsion der Kardiomyozyten am Boden der Messkammer abgewartet (Abbildung 11). Nun wurde die Lösung der Zellsuspension vorsichtig mit einem Gewebetuch abgenommen und durch 200 μl Farbstofflösung (10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-3, 1 mmol/l Ca^{2+}) ersetzt und für 30 min inkubiert, um eine genügende Farbstoffbeladung sicherzustellen. Anschließend wurde auch die Farbstofflösung mit dem restlichen extrazellulären Farbstoff entnommen und durch 500 μl Messtyrode (\pm Dantrolen oder DMSO, 2 mmol/l Ca^{2+} , Tabelle 7) ersetzt.

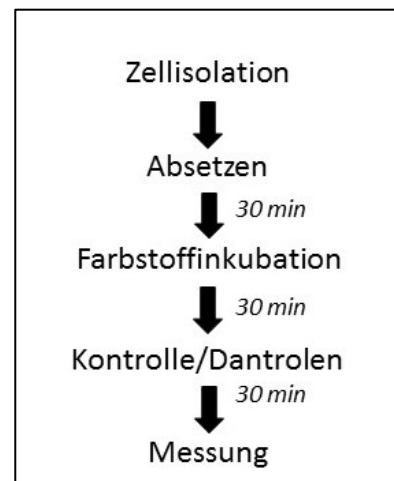


Abbildung 11: Flussdiagramm Konfokalmessung.

Tabelle 7: Messtyrode für humane Zellen

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,551	4
NaCl	58,44	136
MgCl ₂	95,21	1,6
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,33
NaHCO ₃	84,01	4
HEPES	238,31	10
Glucose	180,16	10
CaCl ₂	238,31	2

Die Messtyrode wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,40 (Raumtemperatur) titriert.

Die Versuchstyrode wurde für 30 min in der Messkammer inkubiert, um der Zelle vor dem Start der Messung Zeit zur Adaptation an die Experimentierlösung zu geben und eine angemessene Behandlungszeit mit Dantrolen sicherzustellen. Weiterhin wurde durch die Inkubationszeit eine ausreichende Deesterifizierung des nun intrazellulären Farbstoffes gewährleistet. Die einzelnen Inkubationsschritte nach dem Absetzen der Zellen erfolgten lichtgeschützt und bei Raumtemperatur. Die Messkammer wurde nun an die Messvorrichtung des Konfokalmikroskopes (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss AG, Deutschland) angebracht und mit der Stimulationselektrode des Stimulators (Myopacer, IonOptix, USA) verbunden.

Zur Messung diastolischer Ca²⁺-Sparks wurden in der Kammer lichtmikroskopisch und funktionell intakte Zellen ausgewählt. Mittels *frame-scan* („Flächen-Scan“) wurde vor der Ca²⁺-Sparkmessung die ganze Zelle in einer Aufnahme auf einer Ebene gescannt und eine angemessene Signalintensität und -verteilung geprüft. Vor der Messung wurde der Kardiomyozyt zur suffizienten Beladung des SR mit Ca²⁺ für 10 s unter Feldstimulation bei 1 Hz stimuliert. Die eigentliche Messung erfolgte als *line-scan* („Linien-Scan“). Hier wurde ein extranukleärer Ort entlang einer Linie (entspricht der schmalen Kante eines rechteckigen Scanbildes; siehe Abbildung 15) innerhalb der Zelle unidirektional direkt nach dem letzten systolischen Ca²⁺-Transienten über 7,68 s gescannt (lange Kante). Bei den verwendeten Einstellungen mit einer Pixeltiefe von 12-bit und einer Scanbreite (entspricht Linienlänge) von 38,4 µm entstehen 512 Pixel pro Linie. Die Scanzeit der Zellen außerhalb der eigentlichen Registrierung wurde möglichst kurzgehalten, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu reduzieren. Die Ca²⁺-Sparkmessungen wurden bei

Raumtemperatur durchgeführt. Die Einstellung, Durchführung und Dateierfassung der Messung erfolgten durch die zum Mikroskop zugehörige Software (Carl Zeiss AG, Deutschland).

2.4.4 Auswertung der diastolischen Ca²⁺-Sparks

Die erstellten *line-scans* wurden mit dem Programm Image-J (National Institutes of Health, USA) unter Verwendung des Sparkmaster-Moduls quantitativ und qualitativ ausgewertet. Die Ca²⁺-Sparkfrequenz wurde aus der Anzahl Spark bezogen auf Scanbreite und -Fläche ($\times 100\mu\text{m}^{-1}\times\text{s}^{-1}$) errechnet. Das gesamte diastolische SR Ca²⁺-Leck wurde aus dem Produkt von Sparkbreite (μm), Sparkdauer (ms), Amplitude des Fluoreszenzsignals (F/F_0) und Sparkfrequenz gebildet. Da das diastolische SR Ca²⁺-Leck dimensionslos ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Änderung des diastolischen Ca²⁺-Lecks in der Interventionsgruppe gegenüber den Kontrollzellen normalisiert und in % \pm SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Die Frequenz der diastolischen Ca²⁺-Wellen wurde analog der Sparkfrequenz errechnet.

2.5 Patch-Clamp-Technik

2.5.1 Hintergrund der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt es dem Untersucher, elektrische Ströme an der Membran lebender exzitabler Zellen zu messen (Neher et al. 1976). Hierzu wird eine Mikropipette (Patchpipette), die eine Messelektrode enthält, von nur wenigen μm Durchmesser eng auf einen Membranausschnitt (Patch) aufgesetzt. Eine zweite extrazelluläre Elektrode bildet die Erdungselektrode. Um Leckströme zu reduzieren, muss die Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran sehr eng sein, was durch einen hohen Widerstand im Giga-Ohm-Bereich zwischen Patchpipette und Extrazellularraum erreicht wird (Sigworth et al. 1980). Durch physikalische oder chemische Reizung der Zellmembran kann diese im definierten Membranausschnitt durchbrochen werden und intrazelluläre Potentiale können aufgenommen werden. Je nach Fragestellung können nun unter Verwendung verschiedenster Techniken elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden, von der Aufnahme einzelner Kanalströme bis hin zu elektrophysiologischen Messungen der gesamten Zelle. Durch einen Verstärker wird selbst die Registrierung kleinster Ströme ermöglicht.

2.5.2 Die Patch-Clamp-Anlage

Die Patch-Clamp-Anlage bestand aus einem invertierten Lichtmikroskop (Axiovert 200/Carl Zeiss AG, Deutschland), auf dem die Messkammer platziert werden konnte. Das Mikroskop befand sich in einem Faraday'schen Käfig, um elektrische Interferenzen zu minimieren. Zur Reduktion physikalischer Störimpulse war das Mikroskop auf einen schwingungsgedämpften Tisch montiert. Am Mikroskop befand sich ein Vorverstärker (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Deutschland) mit Pipettenhalter, an dem sowohl Patchpipette als auch Elektrode (s. u.) befestigt wurden. An das Halterungssystem schloss luftdicht ein Schlauch an, über den mittels 5 ml-Spritze verschiedene (Unter-) Drücke auf die Patchpipette appliziert werden konnten. Der Vorverstärker war weiterhin mit einem Mikromanipulator (Micromanipulator 5170 / Eppendorf AG, Hamburg) verbunden und konnte durch den Mikromanipulator in seiner Position dreidimensional verändert werden. Somit wurde die Einstellung der Patchpipette in der Messkammer mikrometergenau ermöglicht. Das Signal aus dem Vorverstärker (*Probe*) wurde mittels Bessel-Filter (2,9 und 10 kHz) gefiltert und an den Hauptverstärker (*Amplifier*, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland), in dem ein Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) integriert war, zur Prozessierung weitergeleitet. Nach dem Senden der Aufzeichnung von dem *Amplifier* an den Computer wurde das Signal durch die Software „Patchmaster 2.0“ (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland) verarbeitet und auf dem Bildschirm dargestellt. Experimentierlösungen konnten über ein Superfusionssystem appliziert und durch eine Walzenpumpe aus der Messkammer abgesaugt werden.

2.5.3 Die Patchpipette und Patchelektrode

Für die Herstellung der Patchpipette wurde eine Glaskapillare aus Borsilikatglas (World Precision Instruments, USA) gewählt. Zur Herstellung der Patchpipette wurde die Glaskapillare in den Pipettenpuller (Zeitz Puller GmbH, Deutschland) eingespannt. Dieser bestand aus einer Zugvorrichtung, die die Kapillare an beiden Enden eingespannt hat, und einem Hitzefilament, das in der Mitte der Kapillare positioniert wurde. Durch Zug und Erhitzen wurden nun zwei Patchpipetten aus einer Kapillare „gezogen“. Bei der Einstellung des Pipettenpullers konnten u. a. die applizierte Hitze, die Zuggeschwindigkeit und die Zugkraft entsprechend des Zielwiderstandes der Pipette angepasst werden. Dieser korreliert negativ mit der Pipettenöffnung und sollte mit 3-5 M Ω möglichst gering gewählt werden. Zu kleine Pipettenöffnungen (mit hohem Widerstand) führen zu erhöhten Zugangswiderständen zwischen Pipette und Zelle und damit zu einer Divergenz der gemessenen Spannung (in der Pipette) und der (zu untersuchenden) Spannung in der Zelle. Hierdurch kann die Ableitung der Zellspannung

verfälscht werden. Dieses Phänomen ist besonders beim Messen von Strömen an der Zellmembran, wie z. B. einwärtsgerichteten Kationenströmen wie dem Natriumstrom, von besonderer Relevanz. Aufgrund hoher Zugangswiderstände entspricht möglicherweise die registrierte Spannung nicht dem Potential in der Zelle, sodass angelegte Depolarisationsimpulse falsch gewählt werden, was direkt die Kinetik der Kanäle verändert (Armstrong et al. 1992). Für die Messung wurde die Patchpipette mittels Einfüllhilfe (World Precision Instruments, USA) und vorgeschaltetem Filter (Sarstedt AG, Deutschland) mit Pipettenlösung gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung an das intrazelluläre Milieu angepasst war.

Tabelle 8: Pipettenlösung für Aktionspotentialmessungen

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,551	48
K-Aspartat	171,2	92
Mg-ATP	507,2	1
EGTA	380,35	0,02
GTP-Tris	886,59	0,1
Na ₂ -ATP	551,14	4
HEPES	238,31	10

Die Pipettenlösung wurde mit TRIS auf einen pH-Wert von 7,20 (Raumtemperatur) titriert.

Als Patchelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der als metallischer Leiter mit dem Vorverstärker konnektiert war und diesen mit der Pipettenlösung verband. Chlorierte Silberdrähte haben den Vorteil, dass artifizielle Übergangspotentiale (Offsetpotentiale) zwischen Elektrode und der elektrolythaltigen Pipettenlösung vermindert werden. Analog dazu war auch die Badelektrode aus chloriertem Silberdraht. Die Patchpipette wurde für die Messung mit dem offenen Ende der Kapillare über die Patchelektrode geschoben, sodass die Elektrodenspitze Kontakt zur Pipettenlösung hatte, und luftdicht am Mikromanipulator befestigt.

2.5.4 Versuchsdurchführung der Patch-Clamp-Technik

Wie in den bisher beschriebenen funktionellen Experimenten mittels Konfokalmikroskopie wurden isolierte ventrikuläre und atriale Kardiomyozyten, die sich auf dem Boden von mit 4 µl Laminin beschichteten Kammern abgesetzt hatten, für die

Patch-Clamp-Untersuchungen verwendet. Die Zellsuspensionslösung wurde gegen 500 μ l Badlösung (\pm Dantrolen oder DMSO) ausgetauscht und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Badlösung setzt sich in ihrem Elektrolytgehalt entsprechend dem physiologischen extrazellulären Milieu zusammen.

Tabelle 9: Badlösung für Aktionspotentialmessungen

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,551	4
NaCl	58,44	140
MgCl ₂	95,21	1
HEPES	238,31	10
Glucose	180,16	10
CaCl ₂	238,31	2

Die Badlösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,40 (Raumtemperatur) eingestellt.

Nach der Inkubationszeit wurde die Messkammer auf dem Mikroskop installiert. Auf die Patchpipette wurde ein leichter Überdruck gegeben, um ein Verstopfen der Spitze durch Zelldetritus zu vermeiden. Anschließend wurde die Pipettenspitze in die Lösung getaucht. Das Eintauchen der Pipette führt zum Kontakt zwischen Pipetten- und Badlösung mit konsekutiven Diffusionsvorgängen. Hierdurch entsteht ein artifizielles elektrisches Übergangspotential (*liquid junction potential*). Dieses wurde nach einem manuellen Nullabgleich durch den Verstärker abgeglichen und korrigiert. Nun wurde der angelegte Kommandospannungsimpuls angezeigt. Durch Annäherung an die Zelle mittels Mikromanipulator und gleichzeitigem Beobachten des Spannungsimpulses konnte, durch leichten Sog, die Pipette eng an die Zellmembran angebracht werden und ein *Seal* erreicht werden. Um Leckströme zu vermeiden, sollte hierbei ein hoher Widerstand im G Ω -Bereich erreicht werden, was für eine enge Abdichtung zwischen Zellmembran und Pipette spricht. Durch weiteren Sog an der Spritze wurde nun das Membranstück unter der Pipettenspitze herausgerissen, was als *Rupture* bezeichnet wird. Anhand der Spannungsantwort der Zelle auf den Kommandospannungsimpuls konnte nach dem *Rupture* beurteilt werden, ob Leckströme vorhanden waren. Für eine qualitativ gute Messung sollten die Leckströme niedrig (entspricht einem hohen Membranwiderstand in G Ω) und auch der Serienwiderstand gering sein (Hamill et al. 1981). Die Aktionspotentialmessungen erfolgten in der Current-Clamp-Einstellung, bei der das Membranpotential der Zelle als Variable untersucht wird. Hierfür wurde ein Strom

im Bereich von ca. -30 bis -80 pA durch den Untersucher angelegt, sodass die Zelle entsprechend des Ohmschen Gesetzes auf das gewebespezifische Ruhemembranpotential eingestellt werden konnte.

$$U = R \times I$$

Formel 2: Ohmsches Gesetz. U=Spannung [V], R=Widerstand [Ω], I=Stromstärke [A].

Da Zellbestandteile sich ähnlich wie ein Kondensator aufladen können, entstehen kapazitive Artefakte, die als C_{Fast} und C_{Slow} [F] bezeichnet werden. Diese können durch spätere Stromabgabe die Registrierungen beeinträchtigen. C_{Slow} entspricht hierbei der Kapazität [F] der Zellmembran, an der auch die Zellgröße abgeschätzt werden kann. Während der Messung wurden die kapazitiven Artefakte durch den Verstärker kompensiert. Nach Erreichen des Ruhemembranpotentials erfolgte die Aktionspotentialstimulation durch einen Stromimpuls von 1020 pA mit einer Dauer von 2,0-4,5 ms. Unter Stimulation wurde zuerst eine Äquilibrierungsphase abgewartet. Nach Erreichen des *steady-states* erfolgte die Registrierung der Aktionspotentiale. Für die Aktionspotentialmessungen wurden Aktionspotentiale in steigenden Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz) stimuliert. Pro Frequenz wurde in Abhängigkeit der Frequenz immer eine Serie von 20-40 Aktionspotentialen aufgenommen. Die Datenpunktakquisition erfolgte in einem Intervall von 100 μ s (20 kHz).

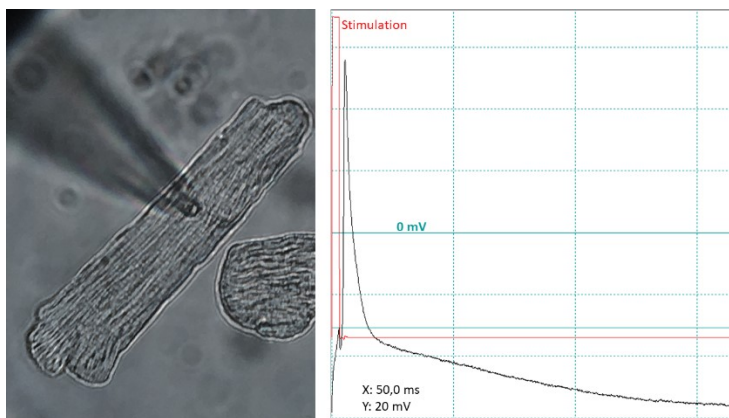


Abbildung 12: Patch-Clamp Untersuchung. In der Abbildung links stellt sich die Patchpipette (Schatten) nach erfolgreichem Seal und Rupture während einer Aktionspotentialmessung (rechts) eines isolierten Kardiomyozyten dar (angelegter Strom: -31 pA, Membranpotential: -58 mV, Membranwiderstand: 1,84 G Ω , initialer Pipettenwiderstand: 2,89 M Ω , kapazitive Eigenschaften: C_{Fast} : 5,55 pF, C_{Slow} : 185,11 pF; Serienwiderstand 8,8 M Ω , Stimulationspuls: 1020 pA über 3,0 ms). Eigene Registrierung eines murinen Kardiomyozyten unter Verwendung des HEKA-Systems (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland).

2.5.5 Auswertung der Aktionspotentialmessungen

Die durch die Software Patchmaster 2.0 erstellten Aktionspotentialmessungen wurden exportiert und mithilfe der Konvertierungssoftware ABF-Utility (Synaptosoft Inc, USA) konvertiert. Die Analyse der Aktionspotentiale erfolgte mit dem Programm LabChart (Ad Instruments, USA). Von einer Serie registrierter Aktionspotentiale wurden die letzten fünf Aktionspotentiale gemittelt und ausgewertet. Es wurden das Ruhemembranpotential [mV], die Aktionspotentialamplitude [mV] sowie die Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials [mV/s] berechnet. Außerdem wurde die Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Repolarisationszeitpunkten (10 % bis 90 %) analysiert. Um die Frequenzabhängigkeit zu untersuchen, wurden Aktionspotentiale bei steigenden Stimulationsfrequenzen ausgewertet. Die Inzidenz von späten Nachdepolarisationen wurde numerisch in der HEKA-Software erfasst. Weiterhin wurden in der Auswertung die jeweiligen Eigenschaften der Zelle während der Patch-Clamp-Untersuchung (siehe Abbildung 12) erfasst.

2.6 Kontraktilitätsexperimente

2.6.1 Messanlage der Kontraktilitätsexperimente

Die Messanlage für die Kontraktilitätsexperimente bestand aus einem Organbad, welches an ein Perfusionssystem angeschlossen war, das die ständige Lösungszirkulation gewährleistete. Die zugeführte Experimentierlösung wurde in einem doppelwandigen Zylinder durch ein zweites Zirkulationssystem, das an ein 37°C warmes Wasserbad angeschlossen war, erwärmt. Durch eine Walzenpumpe wurde die Experimentierlösung zum Organbad geleitet und auf der anderen Seite des Organbades wieder zur Rückführung in den Zylinder abgesaugt. Im Organbad befindliches Myokard wurde so ständig mit 37°C warmer Lösung umspült. Weiterhin war in dem Organbad eine Stimulationselektrode des Stimulators (Scientific Instruments, Deutschland) angebracht. Außerdem war eine gebogene Nadel im Organbad installiert, die zur Fixation von Muskeltrabekeln diente und durch eine Mikrometerschraube im Organbad vor und zurück gestellt werden konnte. Gegenüber der Fixationsnadel befand sich der Kraftabnehmer (Scientific Instruments, Deutschland). Dieser bestand aus einer feinen Drahtschlinge, in die Muskeltrabekel eingehängt werden konnten. Minimale Auslenkungen des Kraftabnehmers (Zug durch Kontraktion des Trabekels) wurden über einen Verstärker (Scientific Instruments, Deutschland) als analoges Spannungssignal an den AD-Wandler und anschließend digital an den Computer gesendet. Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm LabView (National Instruments, USA).

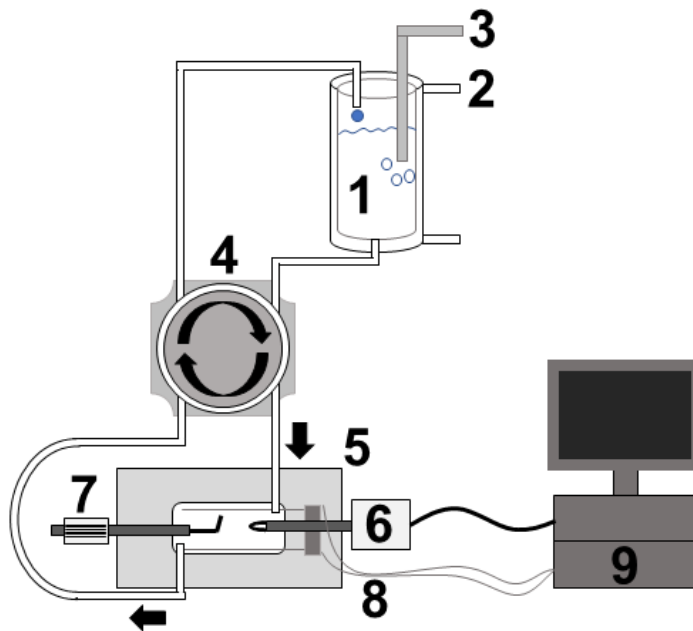


Abbildung 13: Messanlage für Kontraktilitätsexperimente. Die Experimentierlösung befindet sich in einem Zylinder (1) und wird in diesem durch ein angeschlossenes Wasserbad (2) erwärmt und mit Carbogen (3) begast. Eine Walzenpumpe (4) pumpt die Lösung in das Organbad (5), an dem sich der Kraftabnehmer (6) und die Mikrometerschraube mit Fixationsnadel (7) befinden. Gegenüber dem Lösungseinfluss wird die Experimentierlösung wieder abgesaugt und zurück in den Zylinder befördert (Pfeile). Das Myokard wird im Organbad durch Stimulationselektroden (8) stimuliert. Die Datenprozessierung und Messeinstellungen erfolgen über die Computeranlage (9).

2.6.2 Präparation und Einspannen der Muskelstreifen

Für die Muskelstreifenexperimente wurden Trabekel aus explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz präpariert. Hierbei wurden rechtsventrikuläre Trabekel verwendet, da diese meist freier von Narben und Fibrose sind. Zur Präparation wurde der rechte Ventrikel, eingelegt in Custodiol, in einer Präparationsschale unter einem Binokularmikroskop (2,5-fache Vergrößerung) fixiert. Mittels feinem Präparationsbesteck wurden rosige und nicht-verwachsene Streifen identifiziert und vorsichtig unter Vermeidung von mechanischem Stress, wie Dehnung und Stauchung, entnommen. Hierbei wurde der Trabekel unter Belassung einer T-förmigen Basis herauspräpariert. Die Streifen wurden nun in Custodiol in die Organbecken der Muskelstreifenanlage überführt. Hier wurde der Trabekel vorsichtig durch die Schlinge des Kraftabnehmers geführt, sodass die T-förmige Basis den Trabekel fest an diesem verankerte. Das dünne Ende des Trabekels wurde an einer kleinen Nadel pexiert. Mittels Mikrometerschraube lässt sich die Entfernung von Nadel zur Schlinge beim Einspannen adjustieren, hierbei ist jedoch darauf zu achten, den Streifen nicht zu dehnen oder zu

stauchen. Durch die Verwendung eines skalierten Binokulars wurden Länge, Dicke und Breite des Muskelstreifens ausgemessen, was zur Normalisierung der Kraft bezogen auf die unterschiedlichen Trabekelgrößen diente.



Abbildung 14: Humaner Myokardtrabekel. Aus dem Ventrikel eines Patienten mit Herzinsuffizienz wird ein Myokardtrabekel in-toto isoliert, in das Organbad überführt und an den Kraftabnehmer (Schlinge, rechts) sowie der Fixation (Nadel, links) befestigt. Am oberen Rand des Organbades stellt sich die Stimulationselektrode dar.

2.6.3 Versuchsdurchführung der Muskelstreifenexperimente

Für die Kontraktilitätsexperimente wurde eine Krebs-Henseleit-Lösung (KHS, siehe Tabelle 10) verwendet. Mit dieser wurden die Trabekel kontinuierlich während des Versuches superfundiert.

Tabelle 10: Krebs-Henseleit-Lösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	116,1
KCl	74,551	5
MgCl ₂ 6 H ₂ O	203,31	1,2
Na ₂ SO ₄	142,04	1,2
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	137,99	2
Glucose	180,16	10
NaHCO ₃	84,01	20
CaCl ₂	110,98	0,25

Die KHS-Lösung hatte durch ein Wärmesystem, das an ein Wasserbad angeschlossen war, eine Temperatur von 37°C und wurde kontinuierlich mit Carbogen begast, sodass ein pH-Puffersystem entstand. Nach dem Einspannen wurde das Organbad mit 100 ml

KHS-Lösung superfundiert. Um das Custodiol aus dem Messsystem auszuwaschen, wurden die ersten 50 ml der ablaufenden Lösung verworfen. Anschließend wurde der Perfusionskreislauf geschlossen und das Organbad kontinuierlich mit den verbliebenen 50 ml KHS-Lösung superfundiert. Die Trabekel wurden nun mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Die Stimulationsamplitude wurde je Streifen ca. 25 % über die Reizschwelle gelegt (ca. 6 V).

Anschließend erfolgte der Ca^{2+} -Aufbau, indem die Ca^{2+} -Konzentration der KHS-Lösung (anfangs 0.25 mmol/l) schrittweise auf 2 mmol/l gesteigert wurde.

Damit waren die Ausgangskonditionen des Experimentes hergestellt, weshalb nun die Werte der diastolischen Kraft genullt wurden. Zur Äquilibration erfolgte eine Einschlagphase des Streifens von 20-40 min. Um eine Vergleichbarkeit der Muskelstreifen zu erzielen, wurden alle Streifen bei maximaler Dehnung bei gleichzeitiger maximaler Kraftentwicklung gemessen (Maximum der durch den Frank-Starling-Mechanismus vermittelten Kraftentwicklung; siehe Kapitel 1.4.1). Hierzu wurden die Streifen langsam und kontinuierlich mittels Mikrometerschraube gedehnt. Anhand des Kontraktionsverhaltens wurde die Entwicklung des Frank-Starling-Mechanismus beobachtet, d. h. es erfolgte eine stärkere Zunahme der entwickelten Kraft (T_{dev}) im Vergleich zur diastolischen Spannung (T_{dia}) bis zur maximalen Länge (L_{max}). Die Normalisierung der Streifen bezogen auf ihre Größe und die Untersuchung der Streifen unter jeweiligen L_{max} -Bedingungen gewährleisteten die Vergleichbarkeit der Experimente.

Nach dem Dehnen erfolgte eine weitere Äquilibrationsphase, bis die Trabekelkontraktionen einen *steady-state* erreicht hatten. Die Aufnahmen der Kontraktionsparameter erfolgten in Form von gemittelten Speicherpunkten. Vor pharmakologischer Intervention wurde unter *steady-state* Bedingungen ein Kontroll-Speicherpunkt gesetzt. Nun wurde Dantrolen oder DMSO zur extrazellulären Lösung gegeben und für 30 min inkubiert. So konnten die Effekte von Dantrolen mit der jeweiligen *baseline* sowie mit dem paarig gemessenen Kontrolltrabekel verglichen werden. Nach 30 min Inkubation wurden die Kontraktionsparameter bei 1 Hz gemessen. Für die Untersuchung des Kraft-Frequenz-Verhaltens (siehe Kapitel 1.4.2) wurde die Frequenz schrittweise auf 2 Hz und 3 Hz erhöht.

2.6.4 Auswertung der Kontraktilitätsexperimente

In dem Programm Labview wurde das Kontraktilitätsexperiment als Gesamtversuch (*Chart-Datei*) und in Form der einzelnen gemittelten Speicherpunkte (*Average-Datei*) aufgezeichnet. Die Zugkraft wurde auf die ermittelten Trabekelparameter normalisiert

und in mN/mm^2 angegeben. Zur Untersuchung der Kontraktilität wurden die entwickelte Kraft und die diastolische Spannung aufgezeichnet. Weiterhin wurden Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit anhand der Kontraktionskurven der gemittelten Kraftschläge errechnet und bezogen auf die entwickelte Kraft normalisiert. Dazu wurde die Zeit bis zur Kontraktion (*time to peak*, TTP) und bis zur 90%igen Relaxation (RT90) ebenfalls anhand der Kontraktionskurven ausgewertet.

2.7 Datenauswertung und Statistik

Die Auswertung der Daten und die Kalkulation der Statistik erfolgten mit Excel (Microsoft, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Alle Ergebnisse werden als Mittelwert±Standardfehler (SEM) präsentiert. Der Standardfehler wurde gemäß Formel 3 berechnet.

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

Formel 3: Berechnung des Standardfehlers (SEM). σ^2 = Varianz, σ = Standardabweichung, n = Stichprobengröße.

Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet. Im Falle von Longitudinaldaten erfolgte die Auswertung durch eine Zwei-Wege-Varianzanalyse (2-way ANOVA) und Bonferroni-post-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$, ****- $p < 0,0001$).

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Die klinischen Charakteristika der Patienten, deren Proben in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Da zum Teil nicht immer alle Parameter in der Klinik erhoben wurden, konnten die Myokardproben jedoch nicht immer vollständig klinisch charakterisiert werden. Insgesamt sind linksventrikuläre Gewebeproben von 19 Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, 12 atriale Myokardproben von Patienten mit Vorhofflimmern und 7 atriale Myokardproben von Patienten mit Sinusrhythmus in die finale Ergebnisauswertung dieser Arbeit eingegangen.

Parameter	Vorhofflimmern	Sinusrhythmus	Herzinsuffizienz
Patientenzahl	12	7	19
Männliches Geschlecht (%)	58,3	80,0	76,5
Alter (MW±SEM, Jahre)	70,4±1,5	68,8±4,7	53,2±2,2
Ejektionsfraktion (MW±SEM, %)	48,9±3,2	52±7,1	21,4±1,4
LA Durchmesser (MW±SEM, mm)	55,1±4,8	n.a.	48,0±1,6
LVEDD (MW±SEM, mm)	50,2±2,6	n.a.	63,9±2,3
Herzfrequenz (MW±SEM, /min)	70,1±3,8	74±3,6	78,0±6,3
Ischämische Herzerkrankung (%)	58,3	100,0	57,9
Diabetes (%)	16,7	0	10,5
ACE-Inhibitor (%)	58,3	60,0	55,6
β-Blocker (%)	83,3	100,0	88,9
Diuretika (%)	66,7	20,0	88,9
Digoxin (%)	16,7	0,0	27,8
Katecholamine (%)	0,0	0,0	16,7
Amiodaron (%)	8,3	0,0	38,9
AT1-Blocker (%)	25,0	40,0	33,3
Aldosteron-Antagonisten (%)	33,3	20,0	66,7
PDE-Inhibitoren (%)	0,0	0,0	11,1
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker (%)	25,0	0,0	11,1
Statine (%)	66,7	100,0	50,0

Tabelle 11: Patientencharakteristika. Dargestellt sind die klinischen Parameter (n-Zahl, Mittelwert±SEM oder n-Zahl (%)) der Patienten mit Vorhofflimmern, Sinusrhythmus oder Herzinsuffizienz, deren Myokardproben in dieser Arbeit untersucht wurden. LA: linksatrial; LVEDD linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser.

3.2 Effekte von Dantrolen auf das diastolische SR Ca²⁺-Leck

Das diastolische SR Ca²⁺-Leck beschreibt spontane Ca²⁺-Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) während der Diastole, die zelluläre Arrhythmien triggern können. Die Ca²⁺-Freisetzungen lassen sich mittels Konfokalmikroskopie unter Verwendung eines Ca²⁺-Farbstoffes (hier Fluo-3) als Sparks darstellen. Wie eingangs beschrieben, ist das diastolische SR Ca²⁺-Leck unter pathologischen Bedingungen wie der Herzinsuffizienz und dem Vorhofflimmern erhöht (Shannon et al. 2003; Voigt et al. 2012). Um zu untersuchen, ob Dantrolen durch eine RyR₂-Stabilisierung das diastolische SR Ca²⁺-Leck verringern kann, wurden entsprechend humane Kardiomyozyten (\pm Dantrolen) mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Anhand der in einem Line-Scan ausgewerteten Spark-Parameter, bestehend aus Spark-Frequenz, Spark-Amplitude, Spark-Breite und Spark-Dauer, wurde das diastolische SR Ca²⁺-Leck berechnet. Durch die Charakterisierung der diastolischen Ca²⁺-Sparks und die Errechnung des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks lassen sich Effekte auf die P_O des RyR₂ und somit auf die zelluläre Arrhythmogenität ableiten. Die Effekte von Dantrolen wurden in Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz oder von Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Weiterhin wurde auch „gesundes Myokard“ von Patienten mit Sinusrhythmus evaluiert. Außerdem wurde das native diastolische SR Ca²⁺-Leck in der Pathologie des Vorhofflimmerns und des Sinusrhythmus verglichen. Abschließend wurde zur Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Dantrolen die Substanz auch in geringerer Konzentration in der Herzinsuffizienz untersucht.

3.2.1 Herzinsuffizienz

In isolierten Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (n=6) zeigte sich, dass Dantrolen (10 μ mol/l) die diastolischen Ca²⁺-Sparks qualitativ und quantitativ vermindert. Ca²⁺-Sparks, die in mit Dantrolen behandelten Zellen (n=94) auftraten, zeigten im Vergleich zur Kontrolle (n=83) eine Reduktion der Spark-Amplitude (1,35 \pm 0,01 vs. 1,50 \pm 0,02, p<0,05), der Spark-Breite (1,40 \pm 0,06 gegen 2,10 \pm 0,09 μ m, p<0,05) und der Spark-Dauer (16,33 \pm 0,75 vs. 26,18 \pm 1,42 ms, p<0,05, Abbildung 16). Die Frequenz der diastolischen Ca²⁺-Sparks betrug 1,00 \pm 0,14 \times 100 μ m⁻¹ \times s⁻¹ in der Kontrolle und war in Dantrolen behandelten Zellen auf 0,67 \pm 0,10 \times 100 μ m⁻¹ \times s⁻¹ signifikant reduziert (Kontrolle: 83 Zellen vs. Dantrolen: 94, p<0,05, Abbildung 17A). Als Folge der signifikanten Reduktion von Spark-Größe und -Frequenz zeigte sich, dass auch das gesamt errechnete diastolische SR Ca²⁺-Leck durch Dantrolen um 68,7 \pm 22,7 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert war (Kontrolle: 83 Zellen vs. Dantrolen: 94, p<0,05, Abbildung 17B). Zur Veranschaulichung dieser Daten

sind repräsentative Originalaufnahmen (Line Scans) entsprechender Zellen in Abbildung 15 dargestellt.

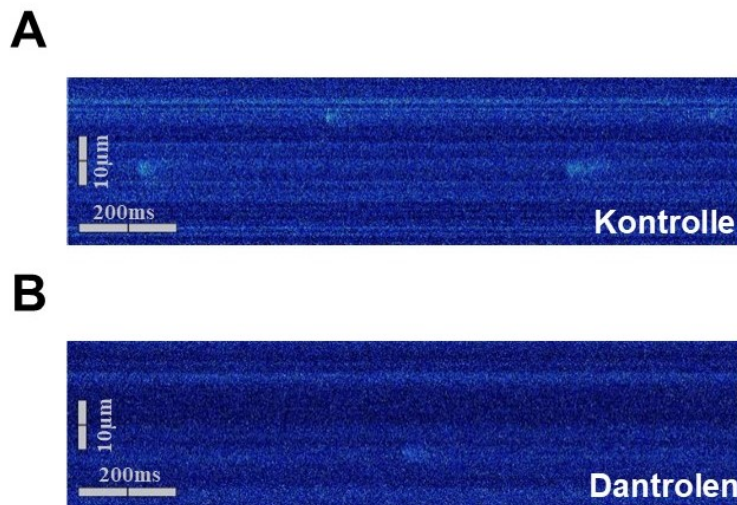


Abbildung 15: Original Line-Scans von ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz. (A) Scan einer Zelle unter Kontrollbedingungen und **(B)** einer mit Dantrolen behandelten Zelle, in denen sich diastolische Ca^{2+} -Sparks als kurze Ereignisse mit höherer Fluoreszenzamplitude darstellen.

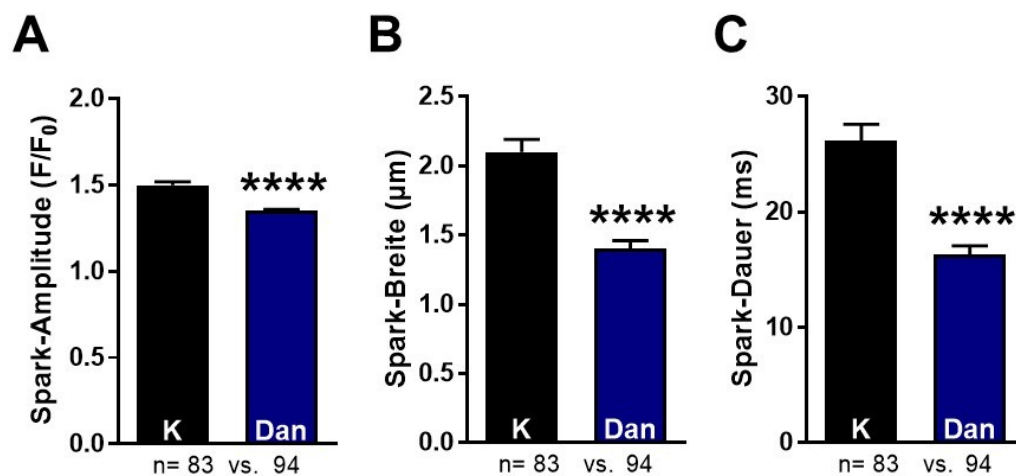


Abbildung 16: Qualitative Spark-Parameter bei Herzinsuffizienz. Dargestellt sind **(A)** Spark-Amplitude, **(B)** Spark-Breite und **(C)** Spark-Dauer der gemessenen Ca^{2+} -Sparks in isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

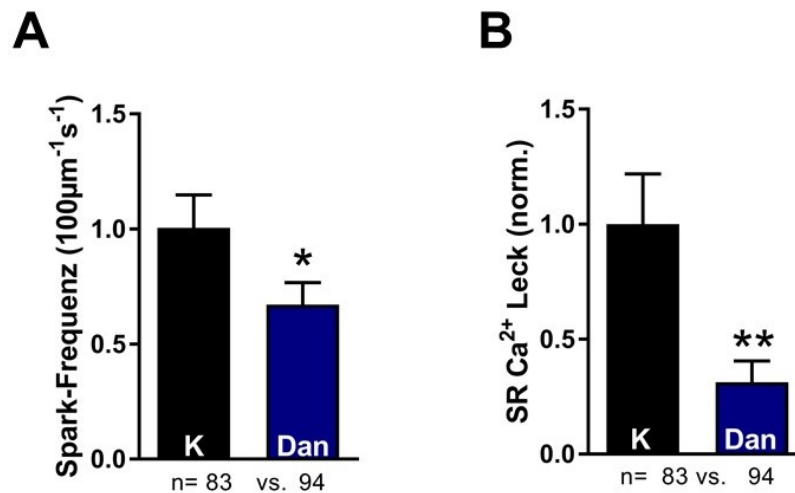


Abbildung 17: Diastolisches SR Ca²⁺-Leck bei Herzinsuffizienz. Dargestellt sind die Ca²⁺-Spark-Frequenz (A) und das normalisierte diastolische SR Ca²⁺-Leck (B) in isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.2.2 Vorhofflimmern

In atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern (n=7) konnte mittels Konfokalmikroskopie ebenfalls eine Reduzierung der Ca²⁺-Sparks durch Dantrolen (10 µmol/l) gezeigt werden. Bei der qualitativen Spark-Auswertung zeigte sich durch Dantrolen (n=122) verglichen mit Kontrolle (n=120) eine signifikante Reduktion der Spark-Amplitude (1,53±0,04 gegen 1,63±0,03, p<0,05), Spark-Breite (1,51±0,11 gegen 2,05±0,09 µm, p<0,05) und der Spark-Dauer (14,77±1,15 gegen 21,14±1,14 ms, p<0,05, Abbildung 19). Analog dazu war die Frequenz von diastolischen Ca²⁺-Sparks durch Dantrolen signifikant von 0,75±0,12×100 µm⁻¹×s⁻¹ in der Kontrolle auf 0,37±0,07×100 µm⁻¹×s⁻¹ in der Dantrolen-Gruppe reduziert (Kontrolle: n=122 Zellen vs. Dantrolen: 120, p<0,05, Abbildung 20A). Auch das gesamt errechnete diastolische SR Ca²⁺-Leck war in diesen Zellen um 56,0±28,0 % verringert (p<0,05, Abbildung 20B). Diese Befunde sind anhand der originalen Line-Scans in Abbildung 18 illustriert.

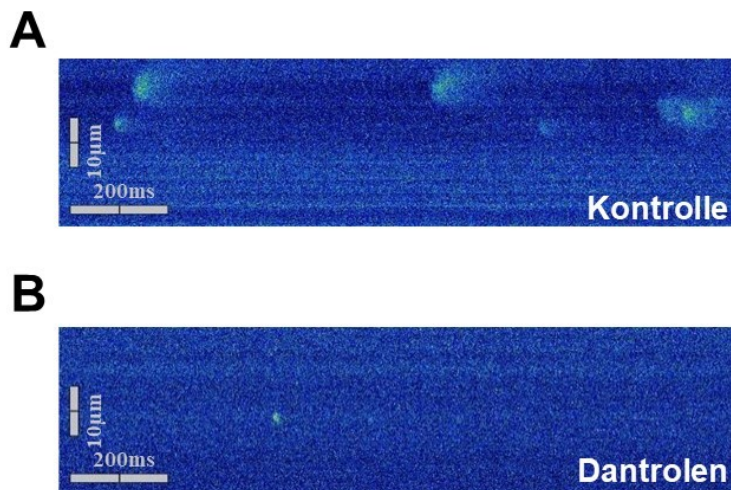


Abbildung 18: Original Line-Scans von atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern. (A) Kontrolle und (B) mit Dantrolen behandelte Zellen.

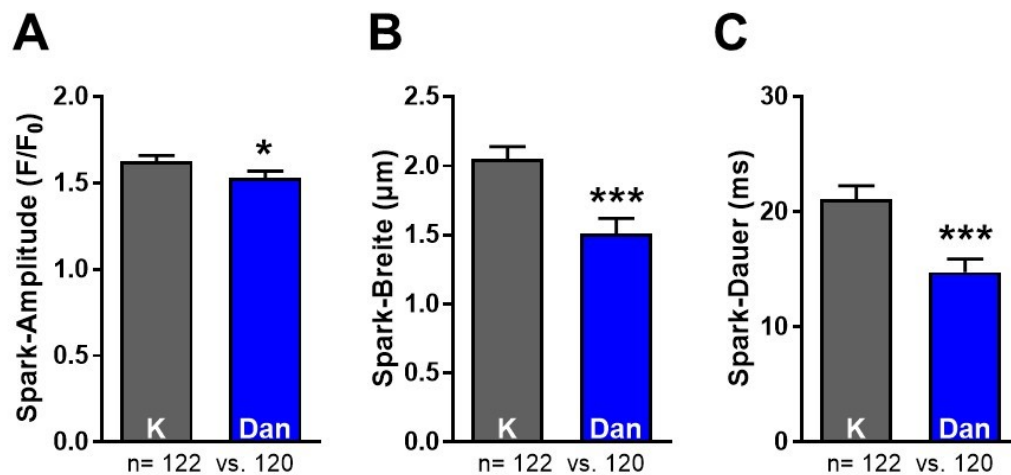


Abbildung 19: Qualitative Spark-Parameter bei Vorhofflimmern. Dargestellt sind (A) Spark-Amplitude, (B) Spark-Breite und (C) Spark-Dauer der Ca²⁺-Sparks in isolierten atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern unter Kontrollbedingungen (K) oder nach Dantrolen-Exposition (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

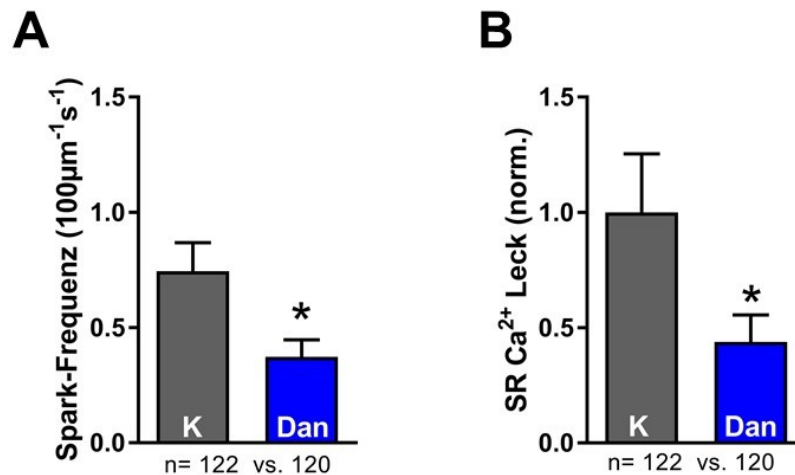


Abbildung 20: Diastolisches SR Ca²⁺-Leck bei Vorhofflimmern. Aufgetragen sind Ca²⁺-Spark-Frequenz (**A**) und das normalisierte, gesamt errechnete diastolische SR Ca²⁺-Leck (**B**) in isolierten atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.2.3 Vergleichende Untersuchungen des diastolischen SR Ca²⁺-Lecks: Sinusrhythmus und Vorhofflimmern

Weiterhin wurden die gemessenen Zellen der Kontrollgruppen beider Pathologien verglichen. In Zellen von Patienten mit Sinusrhythmus wurde eine Spark-Frequenz von $0,46 \pm 0,09 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ beobachtet. Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern zeigten mit einer basalen Spark-Frequenz von $0,78 \pm 0,12 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ eine starke Tendenz hinsichtlich erhöhter Spark-Frequenz (Sinusrhythmus: 131 Zellen/7 Patienten vs. Vorhofflimmern: 132/8, $p=0,05$, Abbildung 21A). Das gesamt errechnete diastolische SR Ca²⁺-Leck war im Sinusrhythmus gegenüber dem Vorhofflimmern um $88,70 \pm 34,17 \%$ vermindert (Sinusrhythmus: 119 Zellen/6 Patienten vs. Vorhofflimmern: 132/8, $p<0,05$, Abbildung 21B). Somit konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern ein erhöhtes diastolisches SR Ca²⁺-Leck aufweisen.

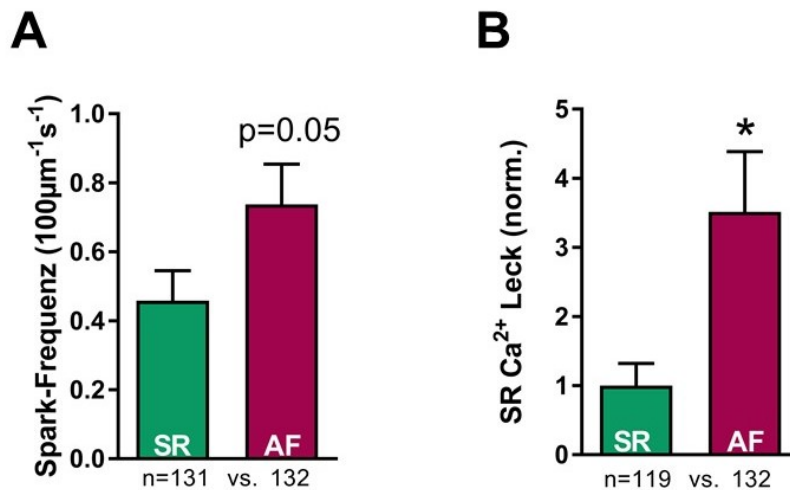


Abbildung 21: Diastolisches SR Ca^{2+} -Leck Sinusrhythmus gegen Vorhofflimmern. Dargestellt sind Ca^{2+} -Spark-Frequenz (A) und das normalisierte, gesamt errechnete diastolische SR Ca^{2+} -Leck (B) in isolierten atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus (SR, grün) und Vorhofflimmern (AF, rot). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.2.4 Effekte von Dantrolen auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck im Sinusrhythmus

Aufgrund der vergleichenden Befunde von Vorhofflimmern und Sinusrhythmus und der Annahme einer damit assoziierten RyR_2 -Destabilisierung beim Vorhofflimmern stellt sich nun die Frage, inwiefern Dantrolen das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in „gesunden“ Zellen beeinflusst. Hierzu wurde rechtsatriales Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus isoliert und analysiert. Gesundes Ventrikelgewebe konnte aus ethischen Gründen nicht gewonnen werden. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich im Sinusrhythmus eine Spark-Frequenz von $0,69 \pm 0,16 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, die gegenüber der Spark-Frequenz von Dantrolen-exponierten Zellen ($0,61 \pm 0,12 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) nicht signifikant verändert war (Kontrolle: 64 Zellen/3 Patienten vs. Dantrolen: 64/3, $p=0,69$, Abbildung 22A). Auch das gesamt errechnete diastolische SR Ca^{2+} -Leck war nicht durch Dantrolen verändert (Kontrolle: 64 Zellen/3 Patienten vs. Dantrolen: 64/3, $p=0,95$, Abbildung 22B).

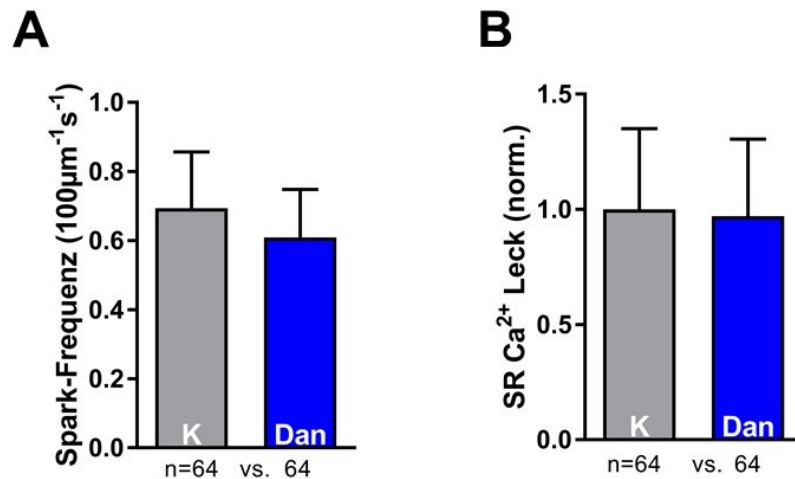


Abbildung 22: Diastolisches SR Ca^{2+} -Leck bei Sinusrhythmus. Abgebildet sind Ca^{2+} -Spark-Frequenz (A) und das normalisierte, gesamt errechnete diastolische SR Ca^{2+} -Leck (B) in isolierten atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

Somit hatte Dantrolen in dieser Studie keinen Einfluss auf das SR Ca^{2+} -Leck von atrialen Kardiomyozyten von rhythmologisch gesunden Patienten mit Sinusrhythmus, was möglicherweise auf eine Abhängigkeit der Effekte von einer pathologischen RyR_2 -Destabilisierung schließen lässt.

3.2.5 Konzentrationsabhängigkeit der kardialen Effekte von Dantrolen

Vorarbeiten zu den Effekten von Dantrolen auf den kardialen RyR zeigten in Tiermodellen auch Wirkungen von geringeren Dantrolen-Konzentrationen als den hier verwendeten $10\mu\text{mol/l}$. Aufgrund der methodischen Schwierigkeit der Arbeit mit humanen Proben war es nicht möglich, anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve die Effekte von Dantrolen im humanen Myokard extensiv zu analysieren. Dennoch wurden neben den Auswirkungen der o. g. klinischen Konzentration die Effekte von $1\mu\text{mol/l}$ Dantrolen auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht. In den untersuchten Kardiomyozyten betrug in der Kontrollgruppe die Spark-Frequenz $0,88\pm 0,22\times 100\mu\text{m}^{-1}\times\text{s}^{-1}$. Die Ca^{2+} -Spark-Frequenz von Kardiomyozyten der Dantrolengruppe war mit einer Frequenz von $0,80\pm 0,22\times 100\mu\text{m}^{-1}\times\text{s}^{-1}$ nicht signifikant verändert (Kontrolle: 39 Zellen/6 Patienten vs. Dantrolen: 39/6, $p=0,81$, Abbildung 23A). Auch das diastolische SR Ca^{2+} -Leck war nicht signifikant durch Dantrolen beeinflusst (Kontrolle: 39 Zellen/6 Patienten vs. Dantrolen: 39/6, $p=0,58$, Abbildung 23B).

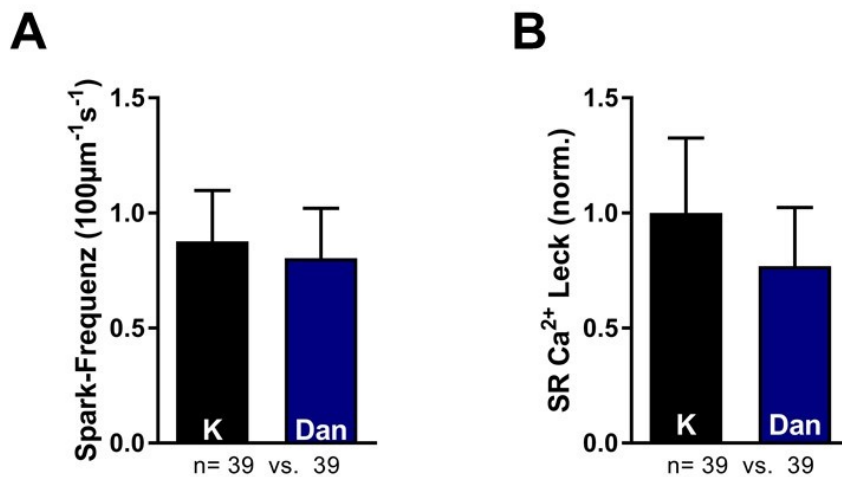


Abbildung 23: Diastolisches SR Ca²⁺-Leck bei 1 µmol/l Dantrolen. Aufgetragen sind die Spark-Frequenz in der Kontrolle (K) vs. Dantrolen (Dan, 1 µmol/l) (**A**) und das diastolische SR Ca²⁺-Leck (**B**) in Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz. Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.3 Auswirkungen von Dantrolen auf arrhythmogene Trigger

3.3.1 Spontane Ca²⁺-Freisetzungen

Spontane diastolische Ca²⁺-Wellen und sind massive SR Ca²⁺-Freisetzungen durch die propagierende, wellenartige Öffnung mehrerer lokaler Ca²⁺-Freisetzungseinheiten während der Diastole, die einen potenten proarrhythmogenen Mechanismus darstellen (Fujiwara et al. 2008). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern eine RyR₂-Stabilisierung durch Dantrolen neben lokal und zeitlich begrenzten Ca²⁺-Sparks auch die Frequenz von spontanen diastolischen Ca²⁺-Wellen, die in der Zelle propagieren, beeinflusst. In ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte sich nach Behandlung mit Dantrolen eine Frequenz von diastolischen Ca²⁺-Wellen von $0,05 \pm 0,01 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, die im Vergleich zur Kontrolle ($0,10 \pm 0,02 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) signifikant vermindert war (Kontrolle: n=102 Zellen/6 Patienten vs. Dantrolen: 109/6, p<0,05, Abbildung 24). Die dargestellten Originalabbildungen veranschaulichen diese Beobachtungen.

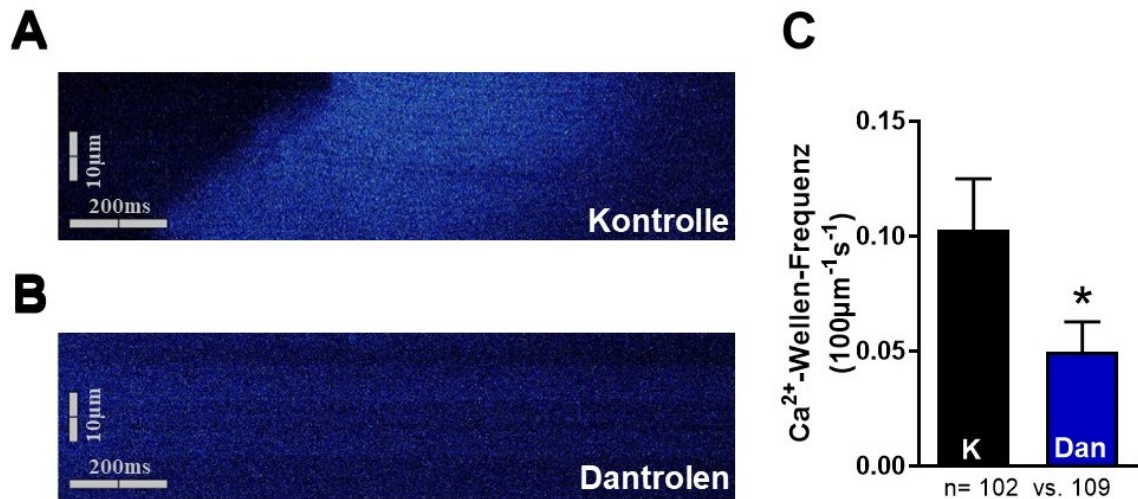


Abbildung 24: Ca²⁺-Wellen bei Herzinsuffizienz. Originale Line-Scans mit spontanen diastolischen Ca²⁺-Wellen von ventrikulären Kardiomyozyten nach (A) Kontrolle und (B) Dantrolen. (C) Mittlere Frequenz von spontanen diastolischen Ca²⁺-Wellen in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

In isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern zeigte sich eine Basalfrequenz von diastolischen Ca²⁺-Wellen von $0,07 \pm 0,04 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Obwohl ein Trend hinsichtlich einer Wave-Reduktion nach Dantrolen auf $0,05 \pm 0,02 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ beobachtet wurde, zeigte sich beim Vorhofflimmern bei niedriger basaler Ca²⁺-Wellen-Frequenz und einem hohen Standardfehler keine signifikante Änderung der Wave-Frequenz durch Dantrolen (Kontrolle: n=138 Zellen/8 Patienten vs. Dantrolen: 135/8, p=0,58).

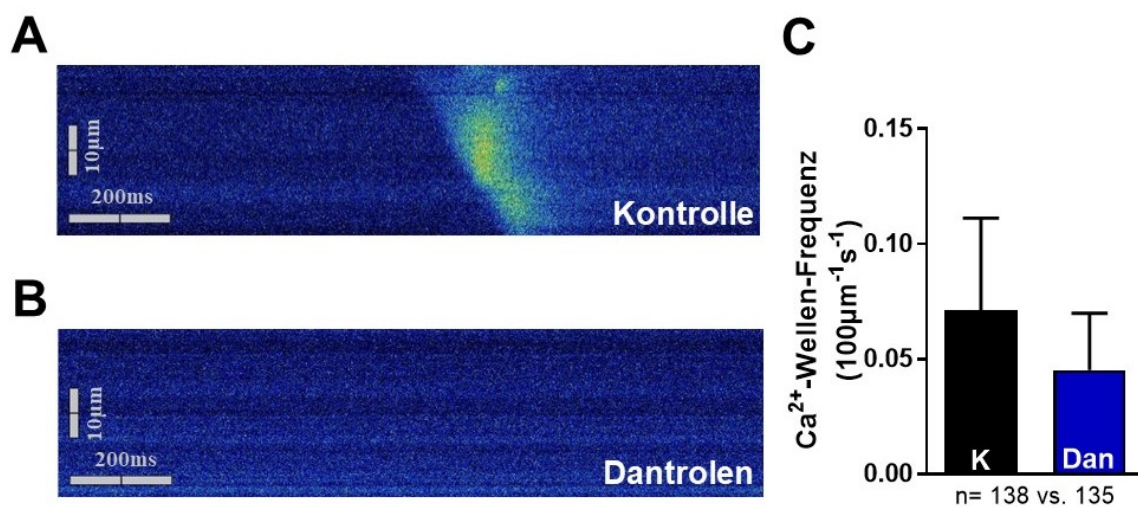


Abbildung 25: Ca²⁺-Wellen bei Vorhofflimmern. Dargestellt sind originale Line-Scans von spontanen diastolischen Ca²⁺-Wellen in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern nach (A) Kontrolle (K) und (B) Dantrolen (Dan) sowie (C) die Mittelwerte der Ca²⁺-Wellen-Frequenz. Unter der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.3.2 Späte Nachdepolarisationen

Bisher konnte demonstriert werden, dass Dantrolen das diastolische SR Ca^{2+} -Leck vermindert und arrhythmogene diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen reduziert. Der Austausch von Ca^{2+} gegen Na^+ durch den NCX kann durch die Erzeugung eines I_{ti} zur Depolarisation und somit zu Arrhythmien der Zelle führen. Deshalb wurden mittels Patch-Clamp-Experimenten Aktionspotentiale bei 0,5 Hz gemessen und die Inzidenz von spontanen Aktionspotentialen sowie frühen und späten Nachdepolarisationen in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern, sowie mögliche Effekte von Dantrolen, untersucht. In den gemessenen Kardiomyozyten waren die späten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*, DADs) die vorherrschende und häufigste zelluläre Arrhythmieform. Deshalb wurde die Inzidenz von DADs im Rahmen der Evaluation möglicher antiarrhythmischen Effekte von Dantrolen analysiert. In Aktionspotentialmessungen von Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz wurde, zur Veranschaulichung in Abbildung 26 dargestellt, eine Inzidenz von späten Nachdepolarisationen von $6,2 \pm 1,4/\text{min}$ festgestellt. Unter Dantrolen war diese signifikant auf $0,6 \pm 0,3/\text{min}$ reduziert (Kontrolle: $n=16$ Zellen/7 Patienten vs. Dantrolen: $19/7$, $p < 0,05$, Abbildung 28A).

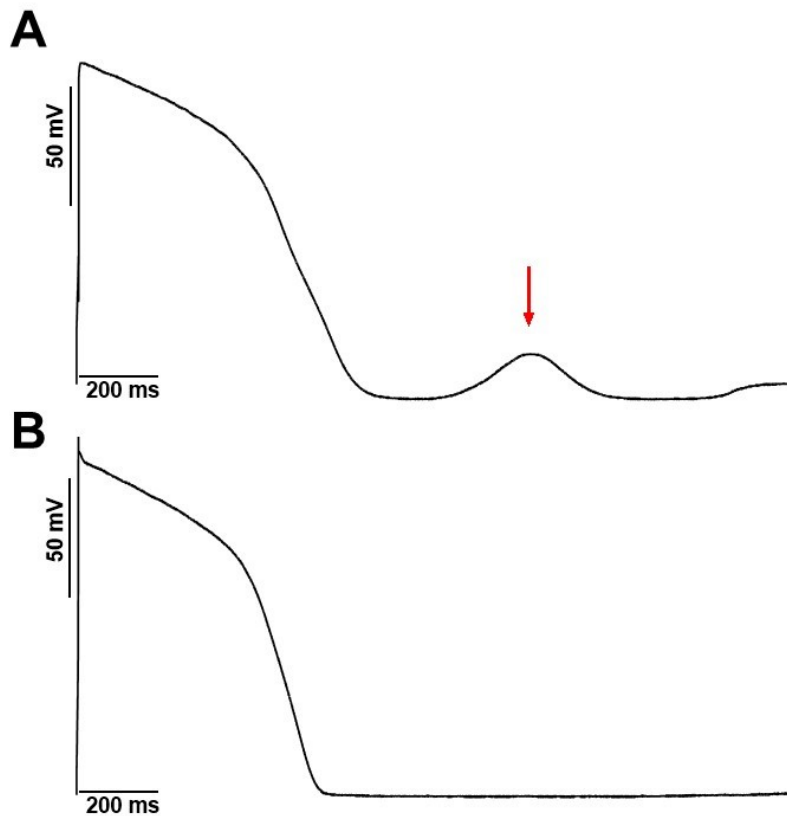


Abbildung 26: Späte Nachdepolarisation bei Herzinsuffizienz. Aktionspotentialmessungen ventrikulärer Kardiomyozyten bei 0,5 Hz nach Kontrolle (**A**) oder Dantrolen (**B**). Eine späte Nachdepolarisation, die unter Kontrollbedingungen auftrat, ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Auch in Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern, deren Aktionspotentiale repräsentativ in Abbildung 27 dargestellt sind, zeigte sich in der Dantrolen-Gruppe eine verminderte Inzidenz an späten Nachdepolarisationen ($3,0 \pm 1,2/\text{min}$) im Vergleich zur Kontrolle, in der $8,6 \pm 1,9$ späte Nachdepolarisationen pro min beobachtet wurden (Kontrolle: $n=12$ Zellen/6 Patienten vs. Dantrolen: $14/6$, $p < 0,05$, Abbildung 28B).

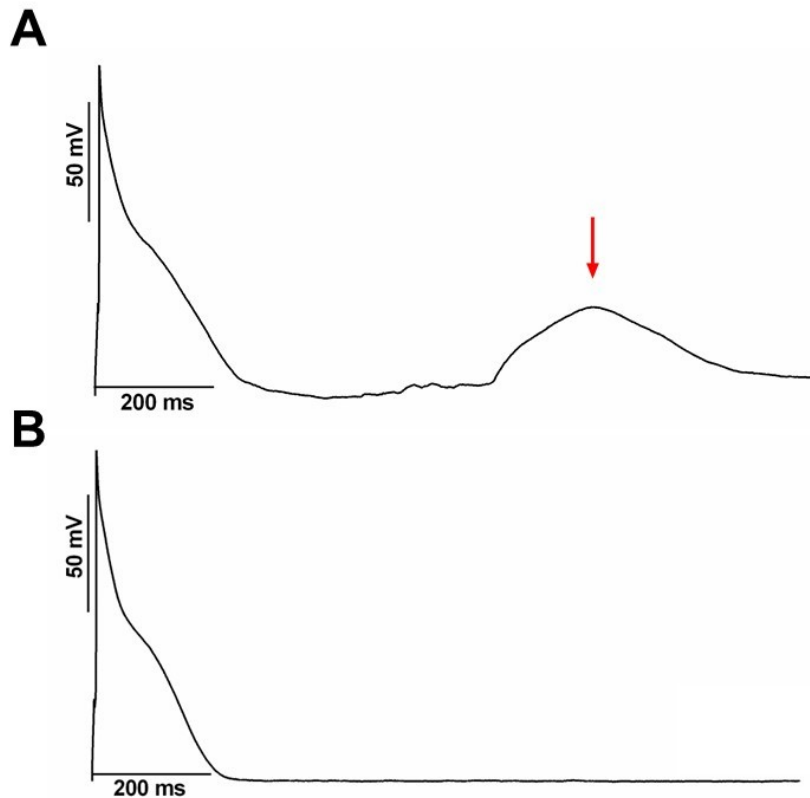


Abbildung 27: Späte Nachdepolarisation bei Vorhofflimmern. Illustriert sind Aktionspotentialmessungen bei 0,5 Hz von Kontrolle (A) und Dantrolen (B) mit Auftreten einer späten Nachdepolarisation in der Kontrollmessung (roter Pfeil).

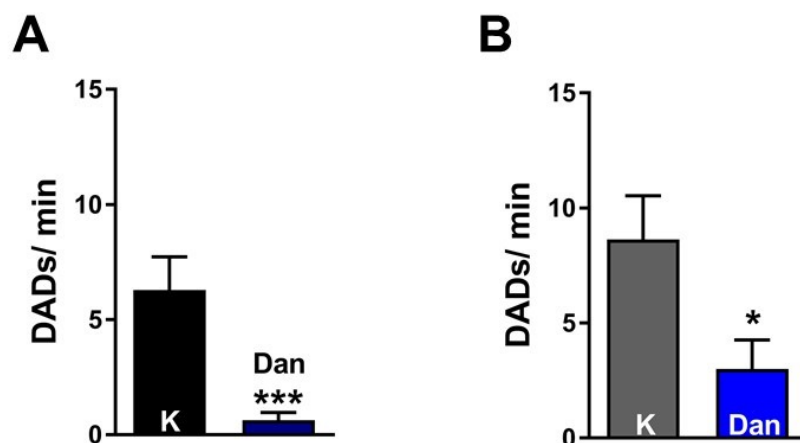


Abbildung 28: Inzidenz später Nachdepolarisationen. In Abbildung (A) ist die Inzidenz von späten Nachdepolarisationen (DADs) pro Minute von Kontrolle (K) gegen Dantrolen (Dan) in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz abgebildet. (B) DADs/min in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern nach Kontrolllösung oder Dantrolen.

3.4 Evaluation möglicher Effekte von Dantrolen auf das Aktionspotential

Die Beeinflussung der elektrischen Reizentstehung und -weiterleitung ist ein kritischer Aspekt antiarrhythmischer Pharmakotherapie. Veränderungen von Eigenschaften des Aktionspotentials können selbst arrhythmogen wirken. Mögliche Einflüsse von Dantrolen auf die zellulären elektrophysiologischen Eigenschaften und das Aktionspotential wurden deshalb mittels Patch-Clamp-Experimenten untersucht. Die Versuche wurden in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (n=7 Patienten; Dantrolen: 19 Zellen, Kontrolle: 13) und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern (n=6 Patienten; Dantrolen: 14 Zellen, Kontrolle: 12) durchgeführt. Es wurden hierbei die Aktionspotentialdauer zu verschiedenen Repolarisationszeitpunkten (v. a. bei 90%iger Repolarisation), Ruhemembranpotential, Aktionspotentialamplitude und maximale Aufstrichgeschwindigkeit überprüft.

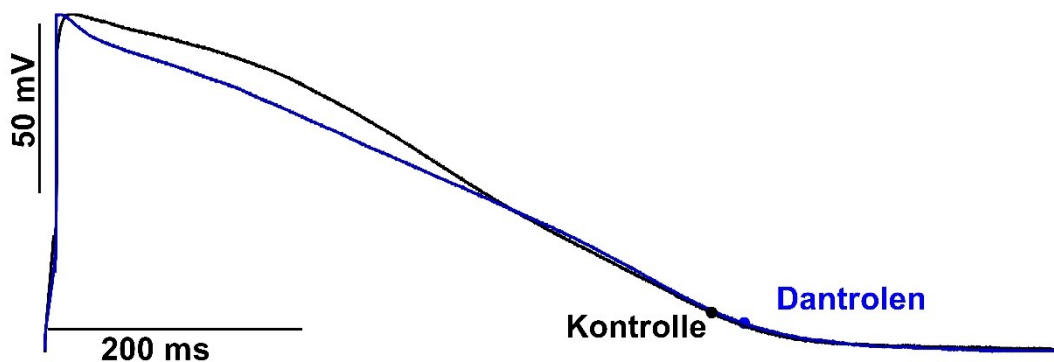


Abbildung 29: Originale Aktionspotentialmessungen ventrikulärer Kardiomyozyten. Dargestellt sind repräsentative Aktionspotentiale in Zellen von Patienten mit Herzinsuffizienz nach Kontrolle (schwarz) oder Dantrolen (blau). Die eingezeichneten Punkte kennzeichnen die Aktionspotentialdauer bei 90%iger Repolarisation (APD₉₀).

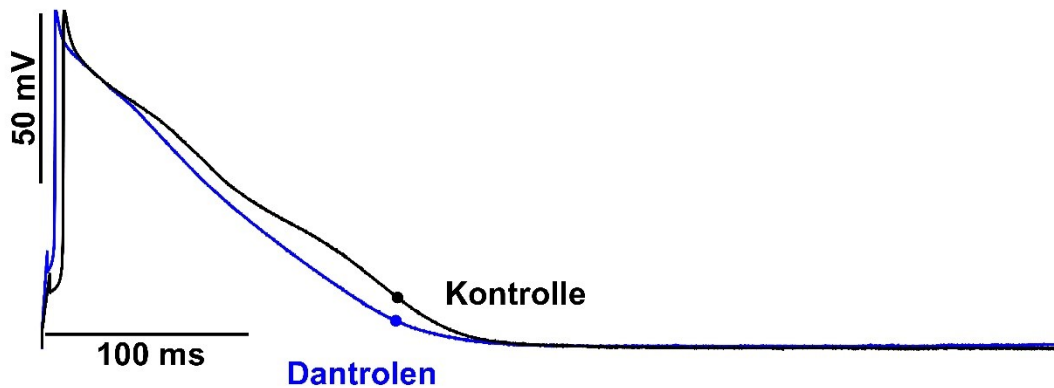


Abbildung 30: Originale Aktionspotentialmessungen atrialer Kardiomyozyten. Abgebildet sind zwei repräsentative Aktionspotentiale in Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern nach Kontrolle (schwarz) oder Dantrolen (blau). Die eingezeichneten Punkte kennzeichnen die Aktionspotentialdauer bei 90%iger Repolarisation (APD_{90}).

3.4.1 Aktionspotentialdauer

Pharmaka, die die Aktionspotentialdauer verändern, können im Sinne eines erworbenen Long-QT Syndroms Herzrhythmusstörungen begünstigen. Aus diesem Grund wurde zur weiteren elektrophysiologischen Charakterisierung von Dantrolen im humanen Myokard mögliche Einflüsse von Dantrolen auf die Aktionspotentialdauer (APD) zu verschiedenen Zeitpunkten der Repolarisation untersucht. In Abbildung 29 sind repräsentative Aktionspotentiale von Kardiomyozyten der Herzinsuffizienzgruppe (\pm Dantrolen) aufgetragen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Repolarisation (30, 50, 70 und 90 %) zeigten sich keine signifikanten Effekte von Dantrolen auf die APD in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (Tabelle 12).

APD bei 1 Hz	Kontrolle	Dantrolen	P
APD_{30} (MW \pm SEM, ms)	231,5 \pm 26,6	232,8 \pm 29,4	0,98
APD_{50} (MW \pm SEM, ms)	370,4 \pm 32,9	376,7 \pm 38,3	0,91
APD_{70} (MW \pm SEM, ms)	470,2 \pm 39,8,	476,8 \pm 44,2	0,92
APD_{90} (MW \pm SEM, ms)	553,3 \pm 43,3	555,7 \pm 47,3	0,97

Tabelle 12: Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Repolarisationszeitpunkten bei Herzinsuffizienz. Dargestellt sind die Effekte von Dantrolen auf die Aktionspotentialdauer (APD) von ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz zu verschiedenen Zeitpunkten der Repolarisation (%).

Für die Untersuchung der Frequenzabhängigkeit der APD ist weiterhin in Abbildung 31 die APD bei nahezu vollständiger (90%iger) Repolarisation (APD_{90}) bei 0,5 und 1 Hz dargestellt. In der Dantrolen-Gruppe betrug die APD_{90} bei 0,5 Hz $623,6 \pm 52,5$ ms und wich somit nicht signifikant von der APD_{90} der Kontrollzellen ab ($657,3 \pm 64,7$ ms, $p=0,68$). Auch bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wurden keine signifikanten Unterschiede in der APD_{90} zwischen Kontrolle ($533,3 \pm 43,3$ ms) und Dantrolen ($555,7 \pm 47,3$ ms, $p=0,97$) beobachtet.

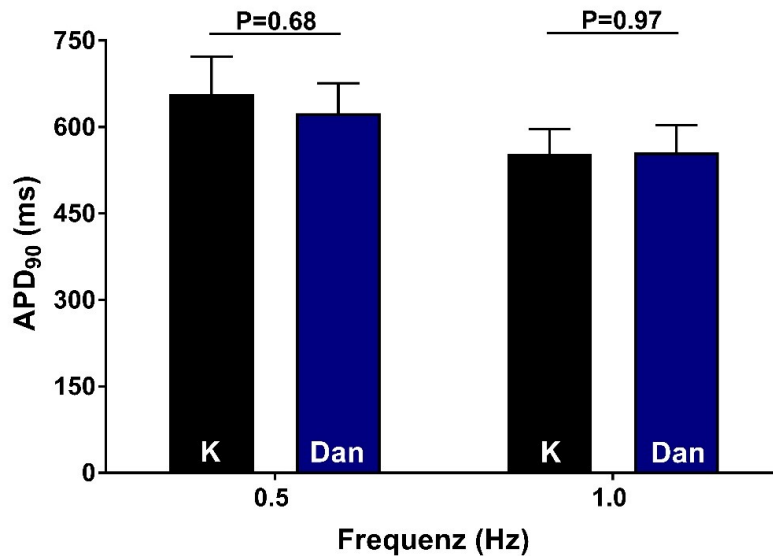


Abbildung 31: Aktionspotentialdauer bei Herzinsuffizienz. Abgebildet sind die Mittelwerte der Aktionspotentialdauer bei 90%iger Repolarisation (APD_{90}) bei 0,5 und 1 Hz von Kontrolle (K) und Dantrolen (Dan).

Wie in den originalen Aktionspotentialen in Abbildung 30 repräsentativ für die Messungen von atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern dargestellt, zeigten sich auch beim Vorhofflimmern keine signifikanten Unterschiede der Aktionspotentialdauer zwischen Kontrolle und Dantrolen (Tabelle 13, Abbildung 32).

APD bei 1 Hz	Kontrolle	Dantrolen	P
APD ₃₀ (MW±SEM, ms)	28,9±5,2	26,6±3,9	0,73
APD ₅₀ (MW±SEM, ms)	56,5±10,8	54,5±9,5	0,89
APD ₇₀ (MW±SEM, ms)	117,8±19,1	125,0±17,2	0,78
APD ₉₀ (MW±SEM, ms)	172,4±24,22	196,8±22,8	0,47

Tabelle 13: Aktionspotentialdauer zu unterschiedlichen Repolarisationszeitpunkten bei Vorhofflimmern. Dargestellt sind die Effekte von Dantrolen auf die Aktionspotentialdauer (APD) von atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern zu verschiedenen Zeitpunkten der Repolarisation (%).

Auch bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen zeigten sich keine akuten Effekte von Dantrolen auf die APD₉₀ von atrialen Kardiomyozyten. Bei 0,5 Hz wurde eine APD₉₀ von 174,8±27,4 ms beobachtet, die sich gegenüber einer gemessenen APD₉₀ von 200,6±23,5 ms in Dantrolen-exponierten Zellen nicht signifikant unterschied ($p=0,48$). Die APD₉₀ war auch bei 1 Hz und bei 2 Hz (Kontrolle: 168,5±20,6 ms; Dantrolen: 186,4±19,0 ms) nicht signifikant durch Dantrolen verändert (Abbildung 32).

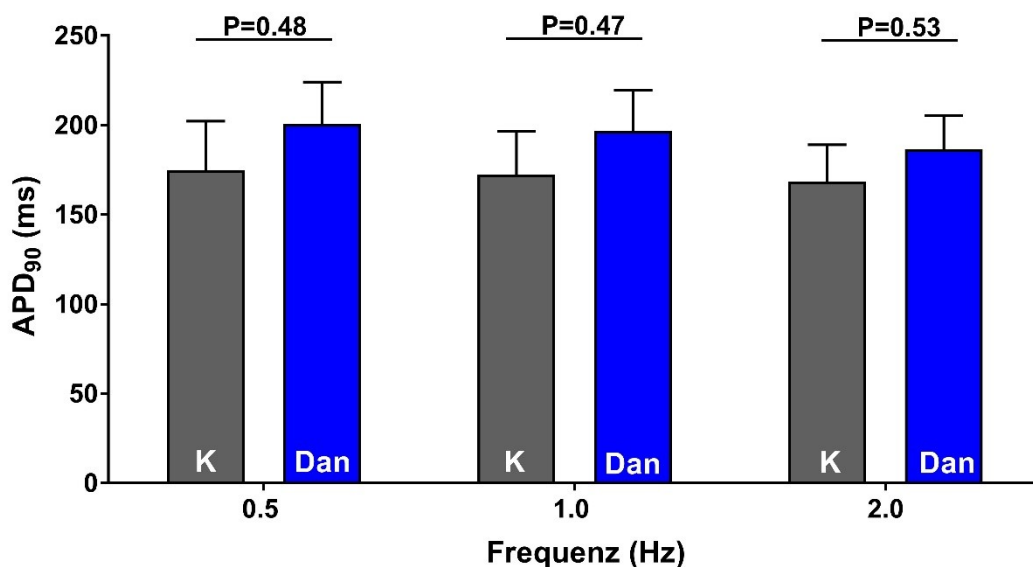


Abbildung 32: Aktionspotentialdauer bei Vorhofflimmern. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Aktionspotentialdauer von atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern bei 90%iger Repolarisation (APD₉₀) bei 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan).

3.4.2 Aktionspotentialparameter

Zur näheren Evaluation von Dantrolen in isolierten humanen Herzzellen wurden weitere elektrophysiologische Determinanten der zellulären Elektrophysiologie untersucht. Patch-Clamp-Untersuchungen (1 Hz) zeigten, dass das Ruhemembranpotential ventrikulärer Kardiomyozyten in der Kontrolle ($-79,7 \pm 3,7$ mV) gegenüber Dantrolen nicht verändert war ($-80,5 \pm 0,8$ mV, $p=0,24$). Auch die Aktionspotentialamplitude (Kontrolle: $130,2 \pm 2,2$ gegen Dantrolen: $131,0 \pm 1,8$ mV, $p=0,7$) und Aufstrichsgeschwindigkeit (Kontrolle: $182,4 \pm 14,0$ gegen Dantrolen: $201,2 \pm 10,6$ mV/ms, $p=0,62$) waren nicht durch Dantrolen alteriert (Abbildung 33).

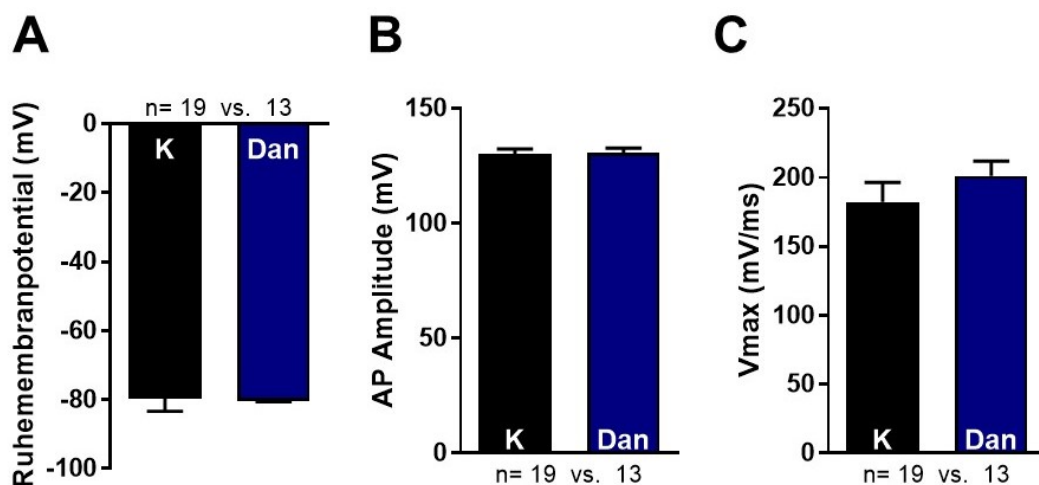


Abbildung 33: Aktionspotentialparameter bei Herzinsuffizienz. (A) Ruhemembranpotential, (B) Aktionspotentialamplitude und (C) maximale Aufstrichsgeschwindigkeit (Vmax) von ventrikulären Zellen von Patienten mit Herzinsuffizienz bei einer Stimulation von 1 Hz nach Dantrolen (Dan) oder Kontrolle (K). An der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

Auch in isolierten atrialen Kardiomyozyten (stimuliert mit 1 Hz) von Patienten mit Vorhofflimmern zeigte eine Behandlung mit Dantrolen keine Effekte auf Ruhemembranpotential (Kontrolle: $-74,3 \pm 3,4$ gegen Dantrolen: $-79,1 \pm 3,3$ mV, $p=0,32$), Aktionspotentialamplitude (Kontrolle: $128,7 \pm 2,8$ gegen Dantrolen: $134,3 \pm 2,3$ mV, $p=0,14$) oder Aufstrichsgeschwindigkeit (Kontrolle: $225,2 \pm 11,4$ mV/ms gegen Dantrolen: $241,4 \pm 5,0$ mV/ms, $p=0,23$), wie in Abbildung 34 dargestellt.

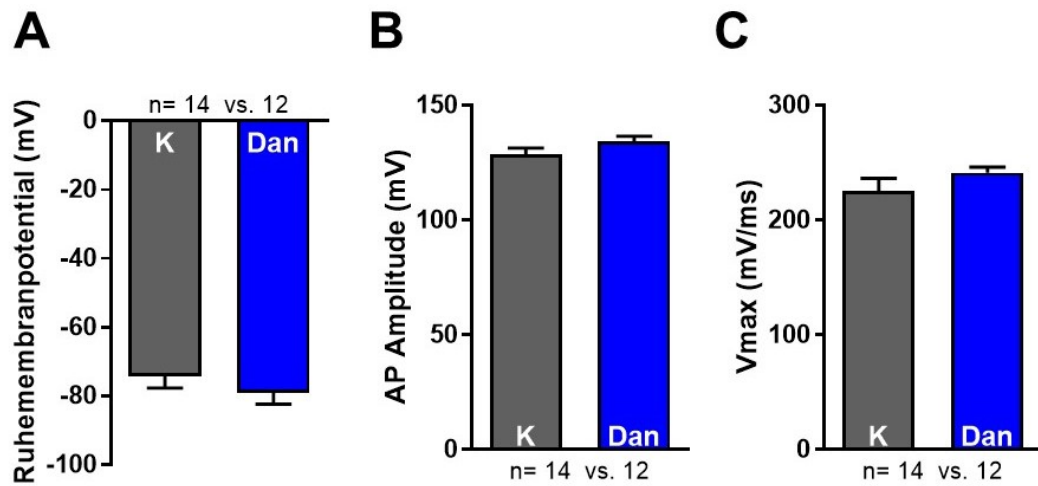


Abbildung 34: Aktionspotentialparameter bei Vorhofflimmern. (A) Ruhemembranpotential, **(B)** Aktionspotentialamplitude und **(C)** maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}) von atrialen Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern nach Exposition mit Dantrolen (Dan) oder Kontrolle (K) bei einer Stimulation von 1 Hz. An der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

3.5 Einfluss von Dantrolen auf die Kontraktilität

Die antiarrhythmische Therapie ist oftmals durch kompromittierende Effekte auf die systolische Kraft des Myokards eingeschränkt (Ponikowski et al. 2016). Aus diesem Grund wurden mögliche Einflüsse der RyR₂-Modulierung durch Dantrolen auf die systolische Kontraktilität untersucht. Aber auch die diastolische Steifheit ist in diesem Zusammenhang von Relevanz. Ein erhöhtes diastolisches SR Ca²⁺-Leck und eine folglich erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentration können durch die Bindung an Troponin und konsekutives Entblocken von Aktin für die Querbrückenbindung die diastolische Steifheit des Myokards erhöhen (Moss et al. 2004). Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit mögliche Effekte von Dantrolen auf die Kontraktilität von Muskelstreifen, präpariert aus terminal insuffizienten Herzen, untersucht.

Hierfür wurden die entwickelte Kraft (entspricht der systolischen Kraftamplitude) und die diastolische Kraft (entspricht der diastolischen Spannung) nach Behandlung mit Dantrolen oder Kontrollmedium untersucht (Abbildung 35). Muskelstreifen unter Kontrollbedingungen entwickelten bei einer Stimulation von 1 Hz eine Kraft von $6,3 \pm 2,8$ mN/mm². Dantrolen-behandelte Muskelstreifen waren mit einer entwickelten Kraft von $5,6 \pm 1,7$ mN/mm² (Kontrolle: n= 5 Streifen/5 Herzen vs. Dantrolen: 5/5, p=0,32) nicht signifikant unterschiedlich. Bei Betrachtung der diastolischen Kraft (1 Hz) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe ($1,4 \pm 0,6$ mN/mm²) und der Dantrolengruppe ($1,1 \pm 0,4$ mN/mm²; Kontrolle: n= 5 Streifen/5 Herzen vs. Dantrolen: 5/5, p=0,21). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 36 für die entwickelte Kraft und in Abbildung 37 für die diastolische Kraft dargestellt. Auch bei Betrachtung von höheren Frequenzen im Rahmen des Kraft-Frequenz-Verhaltens (Kapitel 1.4.2) zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Kontraktilität durch Dantrolen.

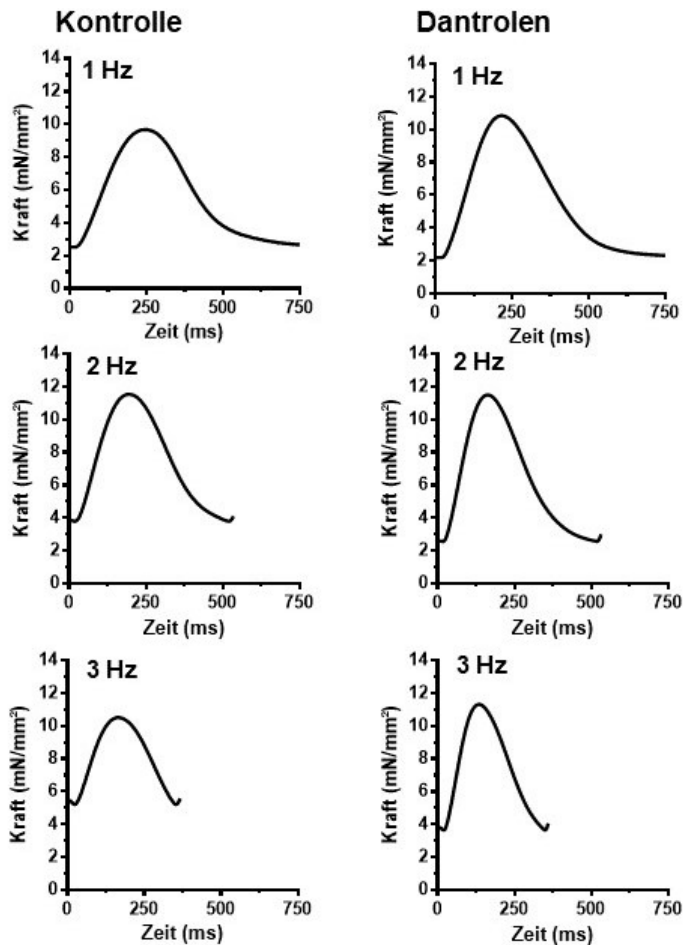


Abbildung 35: Einzelschläge von Muskeltrabekeln. Dargestellt sind Einzelschläge isometrisch schlagender ventrikulärer Trabekel aus explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nach Kontrolle (links) oder Dantrolen (rechts) bei steigenden Frequenzen (1, 2, 3 Hz von oben nach unten).

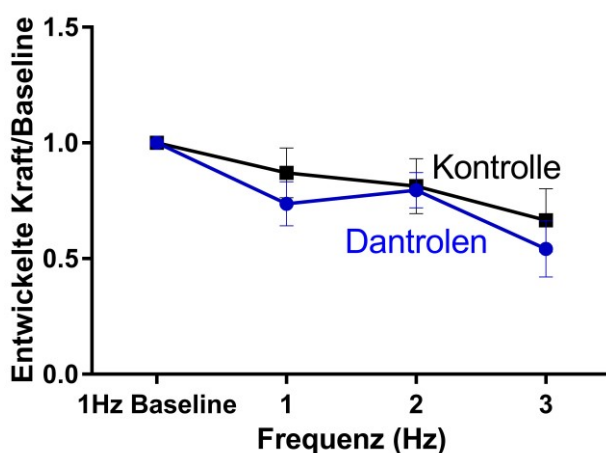


Abbildung 36: Systolische Kraft bei Herzinsuffizienz. Einflüsse von Dantrolen auf die entwickelte Kraft: Nach einer Äquilibrationsphase (Baseline bei 1 Hz) ist die normierte entwickelte Kraft von Kontrolle (schwarz) und Dantrolen (blau) bei steigenden Frequenzen (1, 2 und 3 Hz) dargestellt. Die dargestellten Mittelwerte (\pm SEM) sind zur besseren Vergleichbarkeit zur jeweiligen Baseline normalisiert.

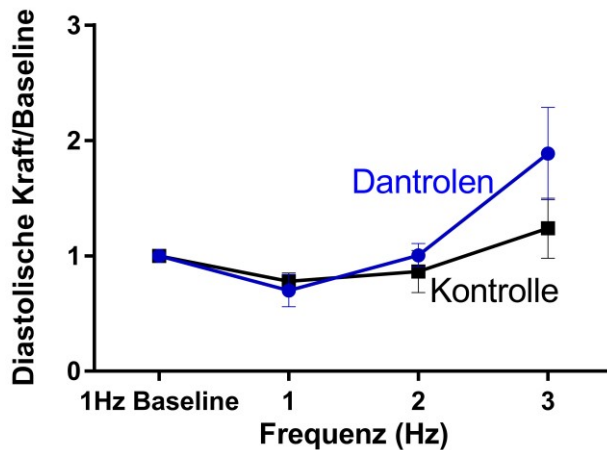


Abbildung 37: Diastolische Kraft bei Herzinsuffizienz. Gezeigt wird die normierte diastolische Kraft zur Baseline (1 Hz) von Dantrolen-behandelten Streifen (blau) gegen Kontrolle (schwarz) bei steigenden Frequenzen (1, 2 und 3 Hz) von Trabekeln von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Gruppen sind die dargestellten Mittelwerte (\pm SEM) zur jeweiligen Baseline normalisiert.

Eine Modulation des RyR_2 kann die CICR und damit auch die Kinetik der systolischen Kontraktion beeinflussen. Außerdem ist eine Beeinträchtigung der Relaxation für viele kardiale Erkrankungen mit diastolischer Dysfunktion von klinischer Relevanz. Aus diesem Grund wurden neben der systolischen und diastolischen Kraft auch mögliche Einflüsse von Dantrolen auf die Kinetik von Kontraktion und Relaxation bei einer Stimulation von 1 Hz untersucht. Die Kontraktionszeit bis zum Amplitudenmaximum (*time to peak*, TTP) betrug in der Dantrolengruppe $249,2 \pm 24,36$ ms und war gegenüber $226,4 \pm 40,05$ ms in der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (Kontrolle: $n=5$ Streifen/5 Herzen vs. Dantrolen: $5/5$, $p=0,64$; Abbildung 38A). Auch die Kontraktionsgeschwindigkeit ($+df/dt$) zeigte keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen Kontrolle ($8,28 \pm 1,17$ mN/mm²×s) und Dantrolen ($6,73 \pm 0,65$ mN/mm²×s, $p=0,28$; Abbildung 38B).

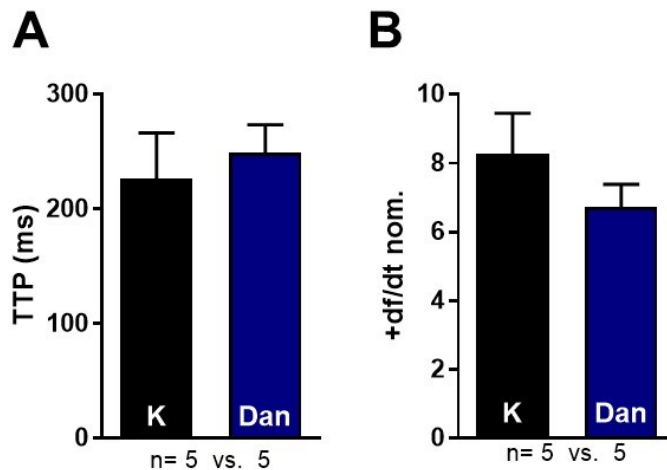


Abbildung 38: Kontraktionskinetik bei Herzinsuffizienz. (A) Zeit bis zum Amplitudenmaximum (*time to peak*, TTP) und **(B)** Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt) von Trabekeln aus Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz bei einer Stimulation von 1 Hz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). An der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

Zur Evaluation der Relaxation wurde die Zeit bis zur 90%igen Repolarisation (RT90 %) und Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt) analysiert. Die RT90 % zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle (332,0±46,03 ms) und Dantrolen (390,0±42,68 ms, Kontrolle: n= 5 Streifen/5 Herzen vs. Dantrolen: 5/5, p=0,38; Abbildung 39A). Ebenso nicht statistisch relevant verändert war die Relaxationsgeschwindigkeit (Kontrolle: -4,53±0,67 mN/mm²×s) durch Dantrolen (-3,95±0,40 mN/mm²×s, Kontrolle: n= 5 Streifen/5 Herzen vs. Dantrolen: 5/5, p=0,48; Abbildung 39B).

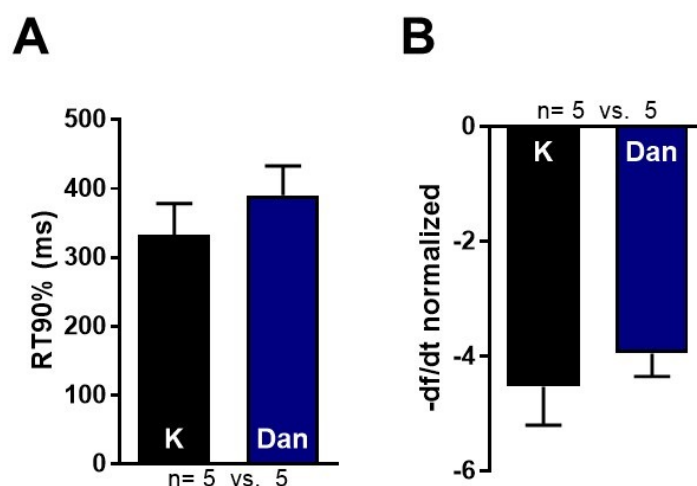


Abbildung 39: Relaxationskinetik bei Herzinsuffizienz. (A) Zeit bis zur 90%igen Repolarisation (RT90 %) und **(B)** Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt) von humanem terminal insuffizientem Myokard bei einer Stimulation von 1 Hz nach Kontrolle (K) oder Dantrolen (Dan). An der X-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgeführt.

4 Diskussion

4.1 Klinische Konzentration von Dantrolen

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig antiarrhythmische Effekte von Dantrolen in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern und in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz. Die verwendete Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen ist als klinisch relevante Konzentration vorbeschrieben und wurde für einen suffizienten Behandlungseffekt bei Patienten mit maligner Hyperthermie gewählt (Flewellen et al. 1983; Loke et al. 1998). Weiterhin wurde die zur dieser Plasmakonzentration korrespondierende Dosis durch eine multizentrische Studie hinsichtlich ihrer klinischer Sicherheit und Wirksamkeit überprüft (Kolb et al. 1982). Bisherige Vorarbeiten in induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit CPVT haben sich ebenfalls auf die im Menschen vorbeschriebene Konzentration fokussiert und konnten eine zelluläre Wirksamkeit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen zeigen (Jung et al. 2012; Penttinen et al. 2015). Ausführliche Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Dantrolen waren im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der methodischen Schwierigkeiten in der Arbeit mit humanem Myokard und der limitierten interindividuellen Vergleichbarkeit der Patienten, die stets paarige Messungen notwendig macht (Dantrolen vs. Kontrolle), nur begrenzt möglich. Neben der untersuchten klinisch relevanten Konzentration, konnten keine Effekte von Dantrolen bei einer niedrigeren Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck humaner Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden. Jedoch gibt es Arbeiten im Tiermodell mit unterschiedlichen interventionsexperimentellen Ansätzen, die eine mögliche Wirksamkeit auch von geringeren Dantrolen-Konzentrationen suggerieren (Domeier et al. 2014; Maxwell et al. 2012). Zusammengenommen erscheint daher für die zukünftige klinisch-translationalen Untersuchungen der Substanz die weitere Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls auch die Beachtung geringerer Dantrolen-Konzentrationen mit dem Ziel eines günstigen Wirkungs-/Nebenwirkungs-Profiles angebracht.

4.2 Antiarrhythmische Effekte von Dantrolen in der humanen Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern

In ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern ist das diastolische SR Ca^{2+} -Leck pathologisch erhöht (Ai et al. 2005; Hove-Madsen et al. 2004; Neef et al. 2010; Shannon

et al. 2003; Voigt et al. 2012). Neben der RyR₂-Oxidation und Nitrosylierung sind maßgebliche Grundlagen hierfür die Hyperphosphorylierung des RyR₂ durch PKA und CaMKII δ sowie eine Destabilisierung der Domän-Interaktionen. Durch beide Mechanismen wird der Rezeptor destabilisiert und die P₀ erhöht (Fischer et al. 2013; Marx et al. 2000; Shan et al. 2012; M. Yano et al. 2000). Entsprechend wurden geschwächte Domän-Interaktionen als Grundlage für diastolische Ca²⁺-Freisetzungen identifiziert (Shtifman et al. 2002). Neben den bekannten Effekten von Dantrolen auf den skelettmuskulären RyR₁ konnten Voruntersuchungen eine Stabilisierung des kardialen RyR₂ durch Dantrolen zeigen. Interessanterweise bewirkte Dantrolen hierbei vor allem Effekte auf einen destabilisierten Rezeptor im sogenannten *unzipped-state* (Kobayashi et al. 2009). Kobayashi et al. beschrieben als mechanistische Grundlage eine Stabilisierung der Domän-Interaktionen, die unter pathologischen Konditionen wie der Herzinsuffizienz oder der CPVT gestört sind (Kobayashi et al. 2009). Damit einhergehend wurde gezeigt, dass Dantrolen die Bindung der N-terminalen Kette im Falle eines destabilisierten Rezeptors verbessert und konsekutiv die Kanalfunktion wiederherstellen kann (Seidel et al. 2015). Die vorliegende Arbeit liefert die erste Evidenz, dass Dantrolen in der humanen Herzinsuffizienz und im humanen Vorhofflimmern die Inzidenz von proarrhythmogenen diastolischen Ca²⁺-Freisetzungen vermindert. Weiterhin sind auch Ca²⁺-Spark-Parameter (Amplitude, Breite und Länge) und das gesamte errechnete diastolische SR Ca²⁺-Leck in beiden Pathologien signifikant durch Dantrolen reduziert. Die Destabilisierung des RyR₂ und eine konsekutiv erhöhte P₀ können neben lokal und zeitlich begrenzten diastolischen Ca²⁺-Sparks auch zu synchronisierten großen diastolischen Ca²⁺-Freisetzungen führen, die sich als propagierende diastolische Ca²⁺-Wellen oder vorzeitige Ca²⁺-Transienten darstellen (Sato et al. 2011). Aufgrund der großen irregulären Ca²⁺-Freisetzungen kann sich die zytosolische Ca²⁺-Konzentration lokal erhöhen und somit Arrhythmien triggern (Landstrom et al. 2017). Durch RyR₂-Stabilisierung mittels Dantrolen kann die vorliegende Arbeit eine signifikante Verminderung der Frequenz von diastolischen Ca²⁺-Wellen in Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zeigen. Beim Vorhofflimmern konnten bei sehr niedriger basalen Raten von Ca²⁺-Wellen im Rahmen der verwendeten Stichprobengröße keine signifikanten Effekte detektiert werden.

Diese Befunde im menschlichen Myokard werden durch Vorarbeiten an Tiermodellen gestärkt. In herzinsuffizienten Tiermodellen führte Dantrolen zu einer verminderten Suszeptibilität gegenüber diastolischen Ca²⁺-Wellen und verminderte somit den typischerweise vorliegenden SR Ca²⁺-Verlust (Kobayashi et al. 2009; Maxwell et al. 2012). In der Studie von Kobayashi et al. waren analog zur vorliegenden Arbeit als Grundlage der Reduktion des Ca²⁺-Lecks die Ca²⁺-Spark-Parameter (Amplitude, Breite,

Länge) ebenfalls durch Dantrolen vermindert (Kobayashi et al. 2009). Weiterhin konnte auch in gealterten Mäusen gezeigt werden, dass Dantrolen das Auftreten diastolischer Ca^{2+} -Sparks reduziert und folglich den SR Ca^{2+} -Gehalt erhöht (Domeier et al. 2014). Außerdem wurde Dantrolen auch bei induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit CPVT untersucht. Grundlegend für diese Erkrankung ist die RyR_2 -Destabilisierung durch Mutationen, vor allem zwischen C- und N-Terminus (Uchinoumi et al. 2010). Jung et al. beschrieben, dass Dantrolen den in dieser Erkrankung defekten RyR_2 in induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit CPVT stabilisiert und so das diastolische SR Ca^{2+} -Leck und zelluläre Arrhythmien vermindert (Jung et al. 2012). Diese Befunde stützen die Ergebnisse dieser Arbeit, die mit klinischem Fokus erstmals die Reduktion des Ca^{2+} -Lecks in Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz durch Dantrolen belegt. Zusätzlich konnte eine bisher noch unbekannte Wirkung der RyR_2 -Stabilisierung durch Dantrolen auf das SR Ca^{2+} -Leck beim Vorhofflimmern nachgewiesen werden.

Durch vermehrte diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern kann sich konsekutiv die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöhen. Durch die elektrogene Ca^{2+} -Depletion via NCX kann ein depolarisierender (Ein-)Strom entstehen (I_{ti}). Dieser kann die Zelle depolarisieren und so späte Nachdepolarisationen oder spontane Aktionspotentiale triggern (Kass et al. 1978). Die Synchronisation von zellulären Arrhythmien kann zu spontanen Aktionspotentialen und Arrhythmien im Gesamtgewebeverband führen (Y Xie et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Patch-Clamp-Technik in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern eine signifikante Verminderung der zellulären Arrhythmien durch Dantrolen gezeigt werden. Diese betraf vor allem die späten Nachdepolarisationen (DADs). Diese Ergebnisse liefern somit weitere Evidenz für die antiarrhythmischen Eigenschaften von Dantrolen in der humanen Herzinsuffizienz und im humanen Vorhofflimmern und zeigen außerdem die mechanistische Translation vermehrter lokaler diastolischer Ca^{2+} -Freisetzungen (Ca^{2+} -Sparks und Ca^{2+} -Wellen) hin zu Arrhythmien auf Ganzzell-Ebene. In Vorarbeiten im Tiermodell und in einem CPVT-Modell wurde ebenfalls eine Reduktion von zellulären arrhythmogenen Triggern beschrieben. In-vitro verringerte Dantrolen in einem durch tachykarde Stimulation induzierten herzinsuffizienten Tiermodell die Inzidenz von DADs (Kobayashi et al. 2009), was ebenfalls in einem humanen CPVT-Modell bestätigt werden konnte (Jung et al. 2012).

Zelluläre Nachdepolarisationen und getriggerte Aktionspotentiale können zur Depolarisation der Zellen führen und somit auch im Gewebeverband propagieren, wodurch ventrikuläre Extrasystolen getriggert werden können (Nam et al. 2005). Diese

können durch repetitive Automatie selbst oder durch Induktion (z.B. R auf T-Phänomen) weitere Herzrhythmusstörungen wie z.B. Kammertachykardien oder auch Kammerflimmern begünstigen und die Pumpfunktion des Herzens verschlechtern (Santoro et al. 2014; Takemoto et al. 2005). Somit scheint die fokale, zellulär getriggerte Aktivität entscheidend für die Entstehung von Arrhythmien im Gewebeverband zu sein.

Antiarrhythmische Effekte von Dantrolen auf die Extrasystolie und ventrikuläre Rhythmusstörungen im Gewebeverband konnten in Vorarbeiten nachgewiesen werden. In in-toto präparierten Kaninchenherzen, die mittels Langendorff-Perfusions-System (retrograde Herzperfusion durch Kanülierung der Aorta) untersucht wurden, zeigten sich durch Dantrolen eine Reduzierung der Extrasystolie und eine verminderte Induzierbarkeit von Kammerflimmern (Chou et al. 2014). Dantrolen führte konsekutiv auch in-vivo in einem Tiermodell mit Kammerflimmern zu einem signifikant verbesserten Überleben (Zamiri et al. 2014). Interessanterweise konnten auch erste klinischen Daten eine Reduktion von Extrasystolen in CPVT Patienten durch Dantrolen nachweisen (Penttinen et al. 2015). Neben dem Nachweis der vorteilhaften Effekte von Dantrolen in-vivo, belegen diese Arbeiten zusätzlich auch die Bedeutung des SR Ca^{2+} -Lecks als Mechanismus für Herzrhythmusstörungen.

Zusammengenommen liefert die vorliegende Arbeit, aufbauend auf breite mechanistische und funktionelle Evidenz, erstmalig die Translation in das humane Myokard von Patienten mit klinisch manifester Herzinsuffizienz und von Patienten mit Vorhofflimmern. Diese Befunde könnten nun eine Grundlage für die weitere (klinische) Erforschung von Dantrolen als antiarrhythmische Substanz in diesen Erkrankungen bieten.

4.3 Destabilisierung des RyR₂ als Grundlage antiarrhythmischer Effekte von Dantrolen

Zur Differenzierung der Effekte von Dantrolen in Abhängigkeit von der RyR₂-Destabilisierung erfolgte eine Untersuchung im „gesunden“ atrialen Myokard von Patienten mit Sinusrhythmus. Um diese Entität im Kontext kardialer Pathologien richtig einzuordnen, wurden vorher vergleichende Untersuchungen zwischen atrialen Sinusrhythmus- und Vorhofflimmer-Kardiomyozyten durchgeführt. Da keine gesunden humanen Ventrikelpuben akquiriert werden konnten, erfolgte diese Untersuchung nur auf der Ebene des atrialen Gewebes.

4.3.1 Rolle des diastolischen Ca²⁺-Lecks beim Vorhofflimmern und Sinusrhythmus

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das diastolische SR Ca²⁺-Leck in isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern, verglichen mit Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus, erhöht ist. Die Inzidenz der diastolischen Ca²⁺-Sparks zeigte eine starke Tendenz hinsichtlich einer vermehrten Spark-Frequenz beim Vorhofflimmern ($p=0.05$). Diese Ergebnisse reihen sich in bisher bestehende Evidenz ein. Im Rahmen der arrhythmogenen Mechanismen des Vorhofflimmerns wurde die Rolle des Ca²⁺-Haushalts bzw. des Ca²⁺-Lecks ebenfalls in humanen Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus oder Vorhofflimmern untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die P_O des RyR₂ beim Vorhofflimmern als ein charakteristischer proarrhythmogener Mechanismus (*electrical remodelling*) erhöht und folglich das diastolische SR Ca²⁺-Leck verstärkt ist (Neef et al. 2010; Voigt et al. 2014; Voigt et al. 2012). Diese Befunde wurden ebenfalls von einer weiteren Arbeitsgruppe beschrieben, die zudem noch eine höhere Frequenz des I_{ti} postuliert hat (Hove-Madsen et al. 2004). Dieser Mechanismus resultierte in einer höheren Inzidenz von DADs im Vergleich zum Sinusrhythmus (Voigt et al. 2012). Neben den genannten Arbeiten, die eine erhöhte P_O des humanen RyR₂ beim Vorhofflimmern gezeigt haben, unterstreichen auch weitere Arbeiten im Tiermodell mechanistisch die Rolle des Ca²⁺-Lecks für die Pathogenese des Vorhofflimmerns. Hierbei konnte eine vermehrte Aktivität der CaMKII δ , die über eine Phosphorylierung des RyR₂ das diastolische SR Ca²⁺-Leck induziert, mit dem Auftreten von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht werden (Chelu et al. 2009). Bei der Untersuchung des Ca²⁺-Stoffwechsel in der atrialen Tachykardie zeigte eine weitere Arbeit hingegen auch kontrastierende Beobachtungen. Die Autoren beschrieben in einem Kaninchen-Modell eine Verminderung beziehungsweise eine Supprimierung des Ca²⁺-Stoffwechsel, sodass die arrhythmogenen Ca²⁺-Freisetzungen qualitativ vermindert werden und die Zelle somit vor der erhöhten P_O „geschützt“ sind (Greiser et al. 2014). Die Untersuchungen des Ca²⁺-Stoffwechsels in dieser Arbeit fanden allerdings nach fünf Tagen artifiziell stimulierter atrialen Tachykardie statt, wodurch ein Vergleich zum klinischen Phänotyp des humanen Vorhofflimmerns, der in den oben genannten Studien untersucht wurde, limitiert ist.

Als Folge von zellulären Nachdepolarisationen und getriggerten Aktionspotentialen können im Falle einer Weiterleitung und einer synchronisierten Aktivität ganzer Zellverbände die für das Vorhofflimmern typischen lokalen ektopten Erregungen ausgebildet werden, die auch als *ectopic firing* beschrieben sind (Iwasaki et al. 2011). Hierdurch können Reentry Mechanismen und eine sich perpetuierende Arrhythmie hervorgerufen werden. Der Mechanismus der zellulären getriggerten Aktivität konnte

entsprechend in-vivo als eine Ursache der atrialen Tachykardie identifiziert werden (Stambler et al. 2003). Weiterhin wurde in einem *CREM*-Tiermodell (*cAMP Response element modulator*) mit Vorhofflimmern das diastolische SR Ca^{2+} -Leck in-vitro und in-vivo als kausale Ursache der Progression einer ektopten atrialen Arrhythmie zum permanentem Vorhofflimmern beschrieben (Li et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein erhöhtes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern bestätigt werden. Diese Ergebnisse ermöglichten nun im nächsten Schritt eine Evaluation der Ryanodinrezeptor-stabilisierung durch Dantrolen im Kontext der kardialen Pathologien.

4.3.2 Effekte von Dantrolen auf den „gesunden“ Ryanodinrezeptor

In dieser Studie wurden schließlich die Effekte von Dantrolen in Myokard von Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern verglichen, um die RyR_2 -Modulation durch Dantrolen in humanem Gewebe auf funktioneller Ebene genauer zu differenzieren. In der Pathogenese des Vorhofflimmerns scheinen destabilisierte Domän-Interaktionen maßgeblich an den proarrhythmischen Alterationen im Vergleich zum Sinusrhythmus beteiligt zu sein. Entsprechend ließ sich bei einem CPVT-Modell mit destabilisierten RyR_2 leichter Vorhofflimmern auslösen (Shan et al. 2012). Auch eine Destabilisierung des Rezeptors durch eine Mutation in Junktophilin-2 führte in einer weiteren Arbeit zum Vorhofflimmern, dessen Grundlagen eine Destabilisierung des RyR_2 und vermehrte diastolische Ca^{2+} -Freisetzungen waren (Beavers et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante antiarrhythmische Effekte durch die RyR_2 -Stabilisierung mittels Dantrolen in vitro im humanen Vorhofflimmern demonstriert. In vergleichenden Untersuchungen in Myokard von Patienten mit Sinusrhythmus gegen Vorhofflimmern zeigte sich, wie oben ausgeführt, ein vermindertes diastolisches SR Ca^{2+} -Leck im Sinusrhythmus. Jedoch zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit keine Effekte von Dantrolen auf das diastolische SR Ca^{2+} -Leck und die Frequenz von diastolischen Ca^{2+} -Sparks in Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus. Somit scheint eine relevante basale RyR_2 -Destabilisierung für die Effekte von Dantrolen notwendig zu sein. Analog zu diesen Befunden im humanen Myokard zeigten auch experimentelle Arbeiten in Tiermodellen eine Abhängigkeit der Dantrolen-Effekte von einer vorliegenden Destabilisierung des RyR_2 . So konnten keine Einflüsse von Dantrolen auf Rezeptoren, die sich im *zipped-state* befanden, beschrieben werden, wohingegen, wie bereits ausgeführt, signifikante Effekte im Herzinsuffizienz-Modell beobachtet wurden (Kobayashi et al. 2009). Während Dantrolen weiterhin in gealterten Mäusen das SR Ca^{2+} -Leck verminderte, wurden hingegen keine Effekte in jungen Mäusen beobachtet (Domeier et al. 2014). Diese tierexperimentellen Vorarbeiten stützen somit die Beobachtungen der vorliegenden

Arbeit im humanen Myokard. Geschwächte Domän-Interaktionen, die in kardialen Pathologien wie der Herzinsuffizienz und dem Vorhofflimmern beschrieben sind, scheinen somit „notwendig“ für die stabilisierenden Effekte durch Dantrolen zu sein, da unter „gesunden“-Bedingungen keine Effekte beobachtet wurden. Dies erhöht die klinische Attraktivität von Dantrolen als Antiarrhythmikum, das nur einen für die Arrhythmie relevanten Mechanismus zum Ziel zu haben scheint.

4.4 Einflüsse von Dantrolen auf das kardiale Aktionspotential

Das kardiale Aktionspotential ist ein kritischer Parameter für die Erregungsausbreitung und die Repolarisation im Herzen. Antiarrhythmische Therapieansätze, die durch ihre Effekte auf die zelluläre Elektrophysiologie das Aktionspotential verändern, sind deshalb häufig in ihrem Einsatz limitiert. Besonders durch Veränderungen der Aktionspotentialdauer (APD) durch z.B. Einflüsse auf repolarisierende Ionenströme (z.B. I_{Kr}) durch verschiedene Antiarrhythmika wie Sotalol oder Amiodaron (beide Klasse III nach Vaughan Williams), können diese selbst arrhythmogen wirken (Sanguinetti et al. 2006). Eine Verlängerung der APD kann die QT-Zeit im Sinne eines erworbenen Long QT-Syndroms verlängern. Im Falle einer verzögerten Repolarisation, deren örtliche Ausbreitung möglicherweise unregelmäßig konfiguriert ist (*Dispersion*), kann die Erregung auf schon repolarisiertes, nicht-refraktäres Myokard treffen und eine Re-Entry Bewegung auslösen (Antzelevitch 2005). Zusätzlich wird durch eine Verlängerung der APD die Wahrscheinlichkeit für EADs erhöht (Davidenko et al. 1989). Als Folge können Rhythmusstörungen getriggert werden, aus denen potentiell lebensbedrohliche ventrikuläre Torsades de pointes Tachykardien entstehen können. Auch Klasse I-A Antiarrhythmika, wie Flecainid, das durch Na^+ -Kanal-Inhibition antiarrhythmische Eigenschaften entwickelt, kann verlängernde Effekte auf die APD aufweisen (Wang et al. 1990). In der entsprechenden klinischen Evaluation der Substanz in der CAST-Studie zeigte sich eine Erhöhung der Mortalität durch Klasse I Antiarrhythmika bei Verwendung bei Patienten nach Herzinfarkt (Echt et al. 1991). Aufgrund dieser Limitationen der gegenwärtig klinisch verfügbaren antiarrhythmischen Substanzen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit von zentraler Bedeutung, mögliche Einflüsse von Dantrolen auf das Aktionspotential zu evaluieren. Besonders die Untersuchung der APD von ventrikulären Kardiomyozyten, die maßgeblich die QT-Zeit determiniert, ist an dieser Stelle von klinischer Relevanz. Daher erfolgte eine erstmalige Evaluation der Effekte von Dantrolen (10 $\mu\text{mol/l}$) in ventrikulären humanen Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern. Es konnten keine signifikanten Effekte durch Dantrolen auf die APD von ventrikulären Kardiomyozyten und atrialen Kardiomyozyten detektiert werden. Dies betraf in beiden

Fällen sowohl die Dauer bis zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Repolarisation (APD₃₀, APD₅₀, APD₇₀ und APD₉₀) als auch die APD bei verschiedenen Frequenzen (1, 2 und 3 Hz). Weiterhin waren auch die Aktionspotentialamplitude (APA), die maximale Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max}) und das Ruhemembranpotential (RMP) nicht signifikant in der Dantrolen-Gruppe verändert.

Der zugrundeliegende Mechanismus der Effekte von Dantrolen bestehend aus einer Stabilisierung des RyR₂ würde überdies, bei fehlender Beeinflussung sarkolemmaler Ionenströme keine primären Effekte auf das Aktionspotential erwarten lassen. Während in älteren Arbeiten Effekte von Dantrolen auf das kardiale Aktionspotential kontrovers diskutiert wurden, gibt es wenig neue Evidenz zu dem Thema. Vorbeschrieben ist in einer Tierstudie eine konzentrationsabhängige Verlängerung der APD, die erst bei höheren Konzentrationen von Dantrolen bei 17.5-35.1 µmol/l zum Tragen kamen, wohingegen 8.8 mmol/l Dantrolen keine signifikanten Effekte auf die Repolarisationsdauer hatten (Salata et al. 1982). Diese Ergebnisse stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit 10 µmol/l Dantrolen. Weiterhin wurden in einer Studie von Chou et al. unter Verwendung des Langendorff-Perfusionssystems zusätzlich zu den antiarrhythmischen Untersuchungen die Effekte von Dantrolen auf die APD in Kaninchenherzen untersucht. In dem Modell wurde Kammerflimmern durch einen artifiziellen Myokardinfarkt induziert. Als Grundlage der beobachteten antiarrhythmischen Eigenschaften von Dantrolen in der Studie (reduzierte Induzierbarkeit von Kammerflimmern) wurde eine Verlängerung der APD postuliert. Laut der Autoren sei die APD in dem untersuchten Kammerflimmer-Modell verkürzt und werde durch Dantrolen bei einer Konzentration von 10 µmol/l verlängert. Diese Ergebnisse wurden der I_{CaL}-Inhibition durch Dantrolen zugeschrieben, durch die die zytosolische Ca²⁺-Konzentration gesenkt werden würde (Chou et al. 2014). Die Autoren zeigten jedoch nicht die postulierte APD-Verkürzung in dem artifiziell kranken Tiermodell, sodass das Fehlen der gesunden Kontrolle die Interpretation der Dantrolen-Effekte limitiert. Ebenso wurde die als Mechanismus postulierte I_{CaL}-Inhibition durch Dantrolen, die die Effekte von Dantrolen auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration konträr der aktuellen Evidenz einem ganz anderen Mechanismus zuordnen würde, nicht untersucht. In einer weiteren Arbeit wurde in in-vivo behandelten Ratten (ca. 6 µmol/l Dantrolen) gezeigt, dass Dantrolen die durch Isoprenalin verlängerte APD verkürzt und die elektrophysiologische Eigenschaften bezogen auf Arrhythmien stabilisiert (Liu et al. 2015). Die Diskrepanz der verschiedenen Arbeiten deutet darauf hin, dass möglicherweise das zugrundeliegende Krankheitsmodell für die beobachteten Effekte relevant ist. Während im Tiermodell pathologische Zustände, z. B. durch Koronararterienligatur oder beta-adrenerge Stimulation, simuliert werden, wurde in

dieser Arbeit der Fokus auf humanes Myokard gelegt. Weiterhin unterscheidet sich die Physiologie der elektromechanischen Kopplung, z.B. im Rahmen der Ionenkanalexpression, verschiedener Tierspezies elementar vom Menschen, was die Anwendung solcher Befunde sehr limitieren kann (Bers 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten in verschiedenen menschlichen Gewebeentitäten keine signifikanten Effekte der klinischen Konzentration von Dantrolen auf das Aktionspotential feststellen. Diese Untersuchungen in humanem Myokard, welches die multifaktoriellen pathologischen Vorgänge der jeweiligen Erkrankung im Menschen widerspiegelt, erscheint deshalb für die weitere (klinische) Untersuchung der Substanz relevant. Die neutralen Effekte von Dantrolen auf die APD sind somit für den Einsatz der Substanz als antiarrhythmische Therapiemöglichkeit von translationaler Bedeutung.

4.5 Effekte von Dantrolen auf die Kontraktilität

Viele antiarrhythmisch eingesetzte Substanzen haben negativ inotrope Effekte und sind bei Patienten mit reduzierter Pumpfunktion mitunter mortalitätserhöhend und kontraindiziert (Ponikowski et al. 2016). Die Evaluation möglicher Effekte von Dantrolen auf humanes Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ergab keine signifikante Veränderung der systolischen oder diastolischen Kraft sowie der Kontraktionskinetik. Auch im Rahmen der Kraft-Frequenz-Beziehung, die das Kontraktionsverhalten bei steigenden Frequenzen beschreibt und damit wichtig für die kontraktile Übersetzung positiver chronotroper Reize ist, zeigte Dantrolen keine signifikante Beeinflussung der Kontraktilität. In einer tierexperimentellen Arbeit mit Hunde- und Katzenmodellen wurde vorbeschrieben, dass höhere Konzentrationen von Dantrolen (17,5 $\mu\text{mol/l}$ und 35,1 $\mu\text{mol/l}$) negativ inotrope Effekte auf das Myokard hätten (Salata et al. 1983), die ebenso in einer weiteren tierexperimentellen Arbeit mit 20 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen beobachtet wurden (Hiraoka et al. 1985). Konträr dazu postulierten andere Arbeiten von Tiermodellen (teilweise mit Konzentrationen von 300 $\mu\text{mol/l}$), dass Dantrolen positiv inotrope Effekte mit zeitlich biphasischer Komponente zeige (Hatae et al. 1980; Meszaros et al. 1981). Vor dem Hintergrund der konträren Evidenz wurde Dantrolen (42 $\mu\text{mol/l}$) in einem Langendorff-Modell untersucht. In diesem konnten die Autoren keine signifikanten negativ inotropen Effekte feststellen (Gollan et al. 1979). Die Unterschiede der (Tier-) Modelle mit den zugehörigen Diskrepanzen in der Physiologie der elektromechanischen Kopplung, die Divergenzen in der Methodik und vor allem Unterschiede in den verwendeten Konzentrationen erschweren die Vergleichbarkeit und die klinische Einordnung der experimentellen Arbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurde exklusiv humanes Ventrikelmyokard zu Evaluation der Effekte von Dantrolen verwendet. Mit dem Ergebnis der neutralen Effekte auf die systolische Kraft von 10 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen

ließen sich Befunde aus tierexperimentellen Arbeiten nicht in humanem Myokard reproduzieren. Somit scheint Dantrolen in dieser Konzentration keine nachteiligen Effekte auf die systolische Kontraktilität von Trabekeln von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zu haben.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit keine Effekte von 10 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen auf die diastolische Kraft von isolierten ventrikulären Trabekeln beobachtet. Eine Reduzierung des diastolischen Ca^{2+} -Lecks ließe jedoch durch eine konsequente Verminderung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration eine Reduktion der diastolischen Spannung erwarten, die auch bei steigenden Frequenzen auftreten könnte. Jedoch können mögliche weitere Faktoren, die durch eine verbesserte Ca^{2+} -Homöostase nicht beeinflusst werden, Ursache einer erhöhten diastolischen Spannung sein. Hierzu könnte eine Veränderung der Herzstruktur durch Fibrose mit konsekutiv erhöhter diastolischer Steifigkeit zählen. Weiterhin wird die diastolische Steifigkeit auch von der Regulation der Myofilamente und ihrer modulatorischen Proteine beeinflusst (Hamdani et al. 2013). Aufgrund der multifaktoriell bedingten, pathologisch erhöhten Steifigkeit des terminal insuffizienten Myokards, könnte daher, auch bei einer Verbesserung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Dantrolen, die diastolische Steifigkeit der Präparationen unbeeinflusst bleiben. Da 10 $\mu\text{mol/l}$ Dantrolen signifikante antiarrhythmische Effekte im humanen Myokard zeigen und die Kraft der Myokardtrabekel nicht nachteilig beeinflusst wird, scheint diese Konzentration somit auch im Hinblick auf die kardiale Kontraktilität vorteilhaft zu sein.

5 Zusammenfassung

Kardiale Arrhythmien bestimmen maßgeblich die hohe Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen. Der kardiale Ryanodinrezeptors 2 (RyR₂) ist pathophysiologisch für die zelluläre Arrhythmogenese in der Herzinsuffizienz und beim Vorhofflimmern bedeutsam. Eine Destabilisierung des RyR₂ kann zu zellulären Ca²⁺-Freisetzungen führen, die Arrhythmien triggern können.

Die vorliegende Arbeit hat mögliche antiarrhythmische Effekte der RyR₂-Stabilisierung durch Dantrolen in isolierten humanen ventrikulären Herzzellen von Patienten mit Herzinsuffizienz, sowie in atrialen Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern oder Sinusrhythmus untersucht. Mittels Konfokalmikroskopie unter Verwendung des Ca²⁺-Farbstoffes Fluo-3 konnte nachgewiesen werden, dass Dantrolen (10 µmol/l) arrhythmogene diastolische Ca²⁺-Freisetzungen in ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz und in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern vermindert. Unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik wurde konsekutiv die Inzidenz von zellulären Nachdepolarisationen, die durch die elektrogene Ca²⁺-Depletion entstehen können, untersucht. Diese zellulären arrhythmogenen Trigger, welche typischerweise vermehrt bei Herzinsuffizienz und bei Vorhofflimmern auftreten, waren in Dantrolen-behandelten Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz oder Vorhofflimmern signifikant supprimiert. Mittels Konfokalmikroskopie wurden in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus, bei denen keine RyR₂-Destabilisierung vorbeschrieben ist, basal weniger diastolische Ca²⁺-Freisetzungen als in Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern beobachtet. Im Gegensatz zum Vorhofflimmern zeigten sich jedoch keine Effekte von Dantrolen auf diastolische Ca²⁺-Freisetzungen in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus. Hierdurch wird ein selektiver antiarrhythmischer Wirkmechanismus von Dantrolen, der sich auf destabilisierte, „kranke“ RyR₂ beschränkt, suggeriert. Abschließend zeigte Dantrolen keine Effekte auf die Aktionspotentialdauer oder auf die Kontraktilität von ventrikulären Myokardtrabekeln aus humanen Herzen. Dies stellt einen Vorteil der Substanz gegenüber zahlreich negativ inotrop wirkenden Antiarrhythmika dar.

Diese Arbeit konnte somit erstmals antiarrhythmische Eigenschaften der RyR₂-Stabilisierung mittels Dantrolen im menschlichen Myokard demonstrieren und diese in den Kontext kardialer Pathologien einordnen. Zugleich konnten Einflüsse von Dantrolen auf das kardiale Aktionspotential und die Kontraktilität des Myokards ausgeschlossen werden. Mit dem Nachweis der antiarrhythmischen Effekte im humanen Myokard liefert diese Arbeit eine translationale Grundlage für die weitere (klinische) Erforschung von Dantrolen zur Behandlung von kardialen Arrhythmien.

6 Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure; *Circ Res* 97, 1314-1322

Allen DG, Eisner DA, Pirolo JS, Smith GL (1985): The relationship between intracellular calcium and contraction in calcium-overloaded ferret papillary muscles; *J Physiol* 364, 169-182

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

Alpert NR, Leavitt BJ, Littleman FP, Hasenfuss G, Pieske B, Mulieri LA (1998): A mechanistic analysis of the force-frequency relation in non-failing and progressively failing human myocardium; *Basic Res Cardiol* 93, 23-32

Antzelevitch C (2005): Role of transmural dispersion of repolarization in the genesis of drug-induced torsades de pointes; *Heart Rhythm* 2, S9-15

Armstrong CM, Gilly WF (1992): Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping; *Methods Enzymol* 207, 100-122

Aronson RS (1981): Afterpotentials and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension; *Circ Res* 48, 720-727

Barth E, Stammer G, Speiser B, Schaper J (1992): Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man; *J Mol Cell Cardiol* 24, 669-681

Bassani RA, Bassani JW, Bers DM (1994): Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems; *J Physiol* 476, 295-308

Beavers DL, Wang W, Ather S, Voigt N, Garbino A, Dixit SS, Landstrom AP, Li N, Wang Q, Olivotto I, Dobrev D, Ackerman MJ, Wehrens XHT (2013): Mutation E169K in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization; *J Am Coll Cardiol* 62, 2010-2019

Belardinelli L, Isenberg G (1983): Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes; *Circ Res* 53, 287-297

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

Bers D (2001): Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force; 2nd Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure; *Circulation* 85, 1046-1055

Borrmann CM, Grund C, Kuhn C, Hofmann I, Pieperhoff S, Franke WW (2006): The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk; *Eur J Cell Biol* 85, 469-485

Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR (1994): Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein; *Cell* 77, 513-523

Brixius K, Pietsch M, Schwinger RH (1999): The intracellular Ca(2+)-homeostasis influences the frequency-dependent force-generation in man; *Basic Res Cardiol* 94, 152-158

Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ (1994): Spatial non-uniformities in [Ca²⁺]_i during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes; *Biophys J* 67, 1942-1956

Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Muller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME, Valderrabano M, Dobrev D, Wehrens XH (2009): Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice; *J Clin Invest* 119, 1940-1951

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

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993): Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle; *Science* 262, 740-744

Chou CC, Wen MS, Lee HL, Chang PC, Wo HT, Yeh SJ, Wu D (2014): Dantrolene suppresses ventricular ectopy and arrhythmogenicity with acute myocardial infarction in a langendorff-perfused pacing-induced heart failure rabbit model; *J Cardiovasc Electrophysiol* 25, 431-439

Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP (2014): The annual global economic burden of heart failure; *Int J Cardiol* 171, 368-376

Corrado D, Link MS, Calkins H (2017): Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy; *N Engl J Med* 376, 61-72

Crozatier B (1998): Force-frequency relations in nonfailing and failing animal myocardium; *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1, 46-50

Davidenko JM, Cohen L, Goodrow R, Antzelevitch C (1989): Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarizations, and triggered activity in canine Purkinje fibers; *Circulation* 79, 674-686

DiFrancesco D, Tortora P (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP; *Nature* 351, 145-147

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD (2001): mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module; *Embo J* 20, 1921-1930

Domeier TL, Roberts CJ, Gibson AK, Hanft LM, McDonald KS, Segal SS (2014): Dantrolene suppresses spontaneous Ca²⁺ release without altering excitation-contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307, H818-829

Du GG, Sandhu B, Khanna VK, Guo XH, MacLennan DH (2002): Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1); *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16725-16730

Dykes MH (1975): Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (Dantrium); *Jama* 231, 862-864

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

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum; *Am J Physiol* 245, C1-14

Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ (1987): The arrhythmogenic transient inward current i_{TI} and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes; *J Physiol* 392, 523-542

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Forster A, Schmitto JD, Gummert J, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S (2013): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology; *Circulation* 128, 970-981

Flewellen EH, Nelson TE, Jones WP, Arens JF, Wagner DL (1983): Dantrolene dose response in awake man: implications for management of malignant hyperthermia; *Anesthesiology* 59, 275-280

Fozzard HA (1992): Afterdepolarizations and triggered activity; *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2, 105-113

Fozzard HA, Sheu SS (1982): The resting potential in heart muscle; *Adv Myocardiol* 3, 125-133

Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T (2008): Burst emergence of intracellular Ca²⁺ waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the Na⁺-Ca²⁺ exchanger: simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular Ca²⁺ in the heart; *Circ Res* 103, 509-518

George CH, Higgs GV, Lai FA (2003): Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes; *Circ Res* 93, 531-540

Glahn KP, Ellis FR, Halsall PJ, Muller CR, Snoeck MM, Urwyler A, Wappler F (2010): Recognizing and managing a malignant hyperthermia crisis: guidelines from the European Malignant Hyperthermia Group; *Br J Anaesth* 105, 417-420

Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ (1996): Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms; *Circulation* 94, 2968-2974

Gollan F, McDermott J (1979): Effect of the skeletal muscle relaxant dantrolene sodium on the isolated, perfused heart; *Proc Soc Exp Biol Med* 160, 42-45

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

Greiser M, Kerfant BG, Williams GS, Voigt N, Harks E, Dibb KM, Giese A, Meszaros J, Verheule S, Ravens U, Allessie MA, Gammie JS, van der Velden J, Lederer WJ, Dobrev D, et al. (2014): Tachycardia-induced silencing of subcellular Ca²⁺ signaling in atrial myocytes; *J Clin Invest* 124, 4759-4772

Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, Nattel S, Allessie MA, Dobrev D, Schotten U (2009): Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation; *J Mol Cell Cardiol* 46, 385-394

Guinamard R, Chatelier A, Demion M, Potreau D, Patri S, Rahmati M, Bois P (2004): Functional characterization of a Ca²⁺-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes; *J Physiol* 558, 75-83

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

Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K (1992): Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain; *FEBS Lett* 312, 229-235

Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2013): Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction; *Cardiovasc Res* 97, 464-471

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches; *Pflugers Arch* 391, 85-100

Harrison GG (1975): Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium; *Br J Anaesth* 47, 62-65

Haselgrove JC, Huxley HE (1973): X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle; *J Mol Biol* 77, 549-568

Hasenfuss G, Pieske B (2002): Calcium cycling in congestive heart failure; *J Mol Cell Cardiol* 34, 951-969

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

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999): Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium; *Circulation* 99, 641-648

Hatae J, Ohba M, Kawata H (1980): Effects of dantrolene sodium on the excitation-contraction coupling of the mammalian and amphibian cardiac muscle; *J Mol Cell Cardiol* 12, 857-867

Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC, Ikonomidis JS, Khavjou O, Konstam MA, Maddox TM, Nichol G, Pham M, Pina IL, Trogon JG (2013): Forecasting the

impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association; *Circ Heart Fail* 6, 606-619

Hibberd MG, Jewell BR (1979): Length-dependence of the sensitivity of the contractile system to calcium in rat ventricular muscle; *J Physiol* 290, 30-31

Hiraoka M, Kinoshita H, Kawano S (1985): Action of dantrolene sodium on electrical and mechanical activity of guinea-pig ventricular muscles; *Jpn J Physiol* 35, 123-138

Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genis A, Roura S, Rodriguez Font E, Aris A, Cinca J (2004): Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes; *Circulation* 110, 1358-1363

Hunt DJ, Jones PP, Wang R, Chen W, Bolstad J, Chen K, Shimoni Y, Chen SR (2007): K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca²⁺ release and [3H]ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association; *Biochem J* 404, 431-438

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

Huxley HE (1973): Muscular contraction and cell motility; *Nature* 243, 445-449

Ikemoto N, Yamamoto T (2002): Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors; *Front Biosci* 7, 671-683

Iwasaki YK, Nishida K, Kato T, Nattel S (2011): Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management; *Circulation* 124, 2264-2274

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum; *Nature* 342, 90-92

Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, Iop L, Storch U, Bellin M, Dorn T, Ruppenthal S, Pfeiffer S, Goedel A, Dirschinger RJ, Seyfarth M, Lam JT, Sinnecker D, Gudermann T, et al. (2012): Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; *EMBO Mol Med* 4, 180-191

Kaftan E, Marks AR, Ehrlich BE (1996): Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle; *Circ Res* 78, 990-997

Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R (1978): Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres; *J Physiol* 281, 187-208

Kawano S, Hirayama Y, Hiraoka M (1995): Activation mechanism of Ca(2+)-sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes; *J Physiol* 486, 593-604

Ketel WB, Kolb ME (1984): Long-term treatment with dantrolene sodium of stroke patients with spasticity limiting the return of function; *Curr Med Res Opin* 9, 161-169

Kirschenlohr HL, Grace AA, Vandenberg JI, Metcalfe JC, Smith GA (2000): Estimation of systolic and diastolic free intracellular Ca²⁺ by titration of Ca²⁺ buffering in the ferret heart; *Biochem J* 346, 385-391

Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M (2009): Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor; *J Am Coll Cardiol* 53, 1993-2005

Kolb ME, Horne ML, Martz R (1982): Dantrolene in human malignant hyperthermia; *Anesthesiology* 56, 254-262

Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, Weisshorn R, Wappler F (2004): Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments; *Anaesthesia* 59, 364-373

Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT (2017): Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias; *Circ Res* 120, 1969-1993

Leblanc N, Hume JR (1990): Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum; *Science* 248, 372-376

Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P (1995): Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients; *Circulation* 91, 1512-1519

Lehnart SE, Wehrens XH, Laitinen PJ, Reiken SR, Deng SX, Cheng Z, Landry DW, Kontula K, Swan H, Marks AR (2004): Sudden death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak; *Circulation* 109, 3208-3214

Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR (2005): Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias; *Cell* 123, 25-35

Lemaire S, Piot C, Leclercq F, Leuranguer V, Nargeot J, Richard S (1998): Heart rate as a determinant of L-type Ca²⁺ channel activity: mechanisms and implication in force-frequency relation; *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1, 51-59

Li N, Chiang DY, Wang S, Wang Q, Sun L, Voigt N, Respress JL, Ather S, Skapura DG, Jordan VK, Horrigan FT, Schmitz W, Muller FU, Valderrabano M, Nattel S, et al. (2014): Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model; *Circulation* 129, 1276-1285

Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ (1998): Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure; *J Mol Cell Cardiol* 30, 743-749

Liu T, Shi SB, Qin M, Huang CX (2015): Effects of Dantrolene Treatment on Ventricular Electrophysiology and Arrhythmogenesis in Rats With Chronic beta-Adrenergic Receptor Activation; *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 20, 414-427

Loke J, MacLennan DH (1998): Malignant hyperthermia and central core disease: disorders of Ca²⁺ release channels; *Am J Med* 104, 470-486

Maggioni AP, Dahlstrom U, Filippatos G, Chioncel O, Crespo Leiro M, Drozd J, Fruhwald F, Gullestad L, Logeart D, Fabbri G, Urso R, Metra M, Parissis J, Persson H, Ponikowski P, et al.

(2013): EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot); *Eur J Heart Fail* 15, 808-817

Marks AR (1996): Cellular functions of immunophilins; *Physiol Rev* 76, 631-649

Marks AR, Priori S, Memmi M, Kontula K, Laitinen PJ (2002): Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; *J Cell Physiol* 190, 1-6

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembliit N, Marks AR (2001): Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers; *J Cell Biol* 153, 699-708

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts; *Cell* 101, 365-376

Maxwell JT, Domeier TL, Blatter LA (2012): Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca²⁺ release in heart failure; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H953-963

McCarthy TV, Quane KA, Lynch PJ (2000): Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease; *Hum Mutat* 15, 410-417

Meissner G (1984): Adenine nucleotide stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sarcoplasmic reticulum; *J Biol Chem* 259, 2365-2374

Meissner G (1986): Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum; *Biochemistry* 25, 244-251

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990): Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure; *J Clin Invest* 85, 305-309

Meszaros J, Kecskemeti V, Szegi J (1981): Effect of dantrolene sodium on the transmembrane potentials and contractility of guinea pig atrial myocardium; *Eur J Pharmacol* 74, 181-188

Mickelson JR, Louis CF (1996): Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects; *Physiol Rev* 76, 537-592

Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna W, Seward JB, Iwasaka T, Tsang TS (2006): Incidence and mortality risk of congestive heart failure in atrial fibrillation patients: a community-based study over two decades; *Eur Heart J* 27, 936-941

Moss RL, Razumova M, Fitzsimons DP (2004): Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease; *Circ Res* 94, 1290-1300

Nam GB, Burashnikov A, Antzelevitch C (2005): Cellular mechanisms underlying the development of catecholaminergic ventricular tachycardia; *Circulation* 111, 2727-2733

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schondube 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

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

Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ohkusa T, Ikeda Y, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M (2005): Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure; *Circulation* 111, 3400-3410

Ono K, Yano M, Ohkusa T, Kohno M, Hisaoka T, Tanigawa T, Kobayashi S, Kohno M, Matsuzaki M (2000): Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca²⁺ release in heart failure; *Cardiovasc Res* 48, 323-331

Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, et al. (2010): Dissociation of calmodulin

from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca(2+) release in heart failure; *Cardiovasc Res* 87, 609-617

Oo YW, Gomez-Hurtado N, Walweel K, van Helden DF, Imtiaz MS, Knollmann BC, Laver DR (2015): Essential Role of Calmodulin in RyR Inhibition by Dantrolene; *Molecular Pharmacology* 88, 57-63

Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH (1990): Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum; *J Biol Chem* 265, 13472-13483

Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG, Ma J, Parness J (2005): Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor; *Biochem J* 387, 905-909

Penttinen K, Swan H, Vanninen S, Paavola J, Lahtinen AM, Kontula K, Aalto-Setälä K (2015): Antiarrhythmic Effects of Dantrolene in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Replication of the Responses Using iPSC Models; *PLoS One* 10, e0125366

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

Pieske B, 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

Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Baucé B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2006): Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; *Circulation* 113, 1171-1179

Pogwizd SM (1995): Nonreentrant mechanisms underlying spontaneous ventricular arrhythmias in a model of nonischemic heart failure in rabbits; *Circulation* 92, 1034-1048

Pogwizd SM, McKenzie JP, Cain ME (1998): Mechanisms underlying spontaneous and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy; *Circulation* 98, 2404-2414

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC; *Eur Heart J* 37, 2129-2200

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

Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danielli GA (2001): Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; *Circulation* 103, 196-200

Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA, Danielli GA (2002): Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; *Am J Hum Genet* 71, 1200-1206

Reddy LG, Jones LR, Pace RC, Stokes DL (1996): Purified, reconstituted cardiac Ca²⁺-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; *J Biol Chem* 271, 14964-14970

Reeves JP, Hale CC (1984): The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system; *J Biol Chem* 259, 7733-7739

Reeves JP, Sutko JL (1980): Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles; *Science* 208, 1461-1464

Roden DM (1993): Early after-depolarizations and torsade de pointes: implications for the control of cardiac arrhythmias by prolonging repolarization; *Eur Heart J* 14 Suppl H, 56-61

Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M, Murray CJ (2015): Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013; *Circulation* 132, 1667-1678

Sacherer M, Sedej S, Wakula P, Wallner M, Vos MA, Kockskamper J, Stiegler P, Sereinigg M, von Lewinski D, Antoons G, Pieske BM, Heinzel FR (2012): JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca(2+)(+) leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium; *Br J Pharmacol* 167, 493-504

Salata JJ, Jalife J (1982): Effects of dantrolene sodium on the electrophysiological properties of canine cardiac Purkinje fibers; *J Pharmacol Exp Ther* 220, 157-166

Salata JJ, Wasserstrom JA, Jalife J (1983): Dantrolene sodium: Effects on isolated cardiac tissues; *J Mol Cell Cardiol* 15, 233-243

Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006): hERG potassium channels and cardiac arrhythmia; *Nature* 440, 463-469

Santoro F, Di Biase L, Hranitzky P, Sanchez JE, Santangeli P, Perini AP, Burkhardt JD, Natale A (2014): Ventricular fibrillation triggered by PVCs from papillary muscles: clinical features and ablation; *J Cardiovasc Electrophysiol* 25, 1158-1164

Sato D, Bers DM (2011): How does stochastic ryanodine receptor-mediated Ca leak fail to initiate a Ca spark?; *Biophys J* 101, 2370-2379

Schlotthauer K, Bers DM (2000): Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials; *Circ Res* 87, 774-780

Schnabel RB, Yin X, Gona P, Larson MG, Beiser AS, McManus DD, Newton-Cheh C, Lubitz SA, Magnani JW, Ellinor PT, Seshadri S, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (2015): 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study; *Lancet* 386, 154-162

Seidel M, Thomas NL, Williams AJ, Lai FA, Zissimopoulos S (2015): Dantrolene rescues aberrant N-terminus intersubunit interactions in mutant pro-arrhythmic cardiac ryanodine receptors; *Cardiovasc Res* 105, 118-128

Shan J, Xie W, Betzenhauser M, Reiken S, Chen BX, Wronska A, Marks AR (2012): Calcium leak through ryanodine receptors leads to atrial fibrillation in 3 mouse models of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; *Circ Res* 111, 708-717

Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM (2003): Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure; *Circ Res* 93, 592-594

Shtifman A, Ward CW, Yamamoto T, Wang J, Olbinski B, Valdivia HH, Ikemoto N, Schneider MF (2002): Interdomain interactions within ryanodine receptors regulate Ca²⁺ spark frequency in skeletal muscle; *J Gen Physiol* 119, 15-32

Sigworth FJ, Neher E (1980): Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells; *Nature* 287, 447-449

Stambler BS, Fenelon G, Shepard RK, Clemo HF, Guiraudon CM (2003): Characterization of sustained atrial tachycardia in dogs with rapid ventricular pacing-induced heart failure; *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 499-507

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994): Gene expression of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure; *Circ Res* 75, 443-453

Takemoto M, Yoshimura H, Ohba Y, Matsumoto Y, Yamamoto U, Mohri M, Yamamoto H, Origuchi H (2005): Radiofrequency catheter ablation of premature ventricular complexes from right ventricular outflow tract improves left ventricular dilation and clinical status in patients without structural heart disease; *J Am Coll Cardiol* 45, 1259-1265

Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, et al. (1989): Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor; *Nature* 339, 439-445

Tateishi H, Yano M, Mochizuki M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M (2009): Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca²⁺ leak in failing hearts; *Cardiovasc Res* 81, 536-545

Tidball JG, Cederdahl JE, Bers DM (1991): Quantitative analysis of regional variability in the distribution of transverse tubules in rabbit myocardium; *Cell Tissue Res* 264, 293-298

Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2001): Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2); *Hum Mol Genet* 10, 189-194

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

Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC (1986): Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists; *J Mol Cell Cardiol* 18, 691-710

Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M (2010): Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor; *Circ Res* 106, 1413-1424

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

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation; *Science* 267, 1997-2000

Vassalle M (1987): Contribution of the Na⁺/K⁺-pump to the membrane potential; *Experientia* 43, 1135-1140

Vermeulen JT, McGuire MA, Opthof T, Coronel R, de Bakker JM, Klopping C, Janse MJ (1994): Triggered activity and automaticity in ventricular trabeculae of failing human and rabbit hearts; *Cardiovasc Res* 28, 1547-1554

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

Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XHT, Nattel S, Dobrev D (2014): Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation; *Circulation* 129, 145-156

Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, Wehrens XH, 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

Volkers M, Loughrey CM, Macquaide N, Remppis A, DeGeorge BR, Jr., Wegner FV, Friedrich O, Fink RH, Koch WJ, Smith GL, Most P (2007): S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes; *Cell Calcium* 41, 135-143

Wagner S, Maier LS, Bers DM (2015): Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death; *Circ Res* 116, 1956-1970

Wang ZG, Pelletier LC, Talajic M, Nattel S (1990): Effects of flecainide and quinidine on human atrial action potentials. Role of rate-dependence and comparison with guinea pig, rabbit, and dog tissues; *Circulation* 82, 274-283

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR (2004): Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor; *Circ Res* 94, 61-70

Wehrens XH, Marks AR (2003): Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease; *Trends Biochem Sci* 28, 671-678

Weiss JN, Qu Z, Chen PS, Lin SF, Karagueuzian HS, Hayashi H, Garfinkel A, Karma A (2005): The dynamics of cardiac fibrillation; *Circulation* 112, 1232-1240

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

Wit AL, Rosen MR (1983): Pathophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias; *Am Heart J* 106, 798-811

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

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991): Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study; *Stroke* 22, 983-988

Xie LH, Weiss JN (2009): Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, 997-1002

Xie Y, Sato D, Garfinkel A, Qu Z, Weiss JN (2010): So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue; *Biophys J* 99, 1408-1415

Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, Collier ML, Deng KY, Jeyakumar LH, Magnuson MA, Inagami T, Kotlikoff MI, Fleischer S (2002): Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy; *Nature* 416, 334-338

Xu L, Meissner G (2004): Mechanism of calmodulin inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor); *Biophys J* 86, 797-804

Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M, Noguchi N, Takasawa S, Okamoto H, Matsuzaki M (2000): Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca²⁺ leak through ryanodine receptor in heart failure; *Circulation* 102, 2131-2136

Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M (2006): Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia; *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3, 43-52

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

Zamiri N, Masse S, Ramadeen A, Kusha M, Hu X, Azam MA, Liu J, Lai PF, Vigmond EJ, Boyle PM, Behradfar E, Al-Hesayen A, Waxman MB, Backx P, Dorian P, et al. (2014): Dantrolene improves survival after ventricular fibrillation by mitigating impaired calcium handling in animal models; *Circulation* 129, 875-885

Ziaeeian B, Fonarow GC (2016): Epidemiology and aetiology of heart failure; *Nat Rev Cardiol* 13, 368-378

Zygmunt AC (1994): Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes; *Am J Physiol* 267, 1984-1995

Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM (1998): INaCa and ICl(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells; *Am J Physiol* 275, 1979-1992

Genehmigungen

Die Verwendung von Abbildung 3: „Der kardiale Ryanodinrezeptor“ erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Der Abdruck der Abbildung 9: „Fluoreszenzspektrum von Fluo-3“ erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific.

Der Verwendung der eigenen bereits in dem Journal *Heart Rhythm* publizierten Daten und Abbildungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Veröffentlichung und Förderung

Diese Arbeit wurde auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) und der European Society of Cardiology (ESC) im Rahmen von Postervorträgen und freien Vorträgen präsentiert und diskutiert.

Teile dieser Dissertation sind bereits in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Hartmann N*, **Pabel S***, Herting J, Schatter F, Renner A, Gummert J, Schotola H, Danner BC, Maier LS, Frey N, Hasenfuss G, Fischer TH, Sossalla S (2017): Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes; Heart Rhythm 14, 412-419

*** geteilte Erstautorenschaft**

Die Publikation wurde weiterhin im Rahmen eines Editorials von Prof. Dr. Bers behandelt:

Bers DM (2017): Stabilizing ryanodine receptor gating quiets arrhythmogenic events in human heart failure and atrial fibrillation; Heart Rhythm 14, 420-421

Die Entstehung dieser Arbeit wurde durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) unterstützt. Die Präsentationen der erhobenen Daten auf Kongressen wurde durch Stipendien des Deutschen Zentrums für Herz- und Kreislauferkrankungen (DZHK), der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), sowie der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) ermöglicht