

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

**Untersuchung pro-arrhythmogener
Mechanismen in Kardiomyozyten und Fibroblasten**
-
**Der Einfluss des leukozytären Enzyms
Myeloperoxidase**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Alina Sobhani
aus Berlin

promoviert am
27. Juli 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin oder Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Winkels

2. Gutachterin oder Gutachter: Privatdozent Dr. med. F. Nguemo

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. rer. nat. Anna Klinke

Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Holger Winkels

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der Hauptteil der in dieser Arbeit angegebenen Experimente ist nach entsprechender Anleitung durch Dr. Martin Mollenhauer und Dr. Anna Klinke von mir selbst ausgeführt worden. Die Experimente, die durch andere Personen ausgeführt worden sind, werden im Folgenden benannt und werden in der Arbeit klar kenntlich gemacht.


Die Isolation der murinen Kardiomyozyten, die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe des IonOptix-Systems und die Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe der IonWizard-Software wurden von Herrn Dr. Martin Mollenhauer ausgeführt. Die statistische Auswertung mit Hilfe von Excel und GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad) und die Formulierung und Interpretation der Ergebnisse wurden von mir ausgeführt. Die Antragsnummer für die Tötung der FVB/N Mäuse zur Isolation der Kardiomyozyten lautet Az 84-02.04.2015.A459.

Die Differenzierung und Inkubation der iPSCM erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Deniz Bartsch aus dem *KurianLab*. Das Ernten der inkubierten Zellen und alle weiteren experimentellen Schritte wurden von mir durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 02.01.2023

Unterschrift:.....

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mich während der Erstellung der Doktorarbeit auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Rudolph für das Thema, die gute Betreuung und die Möglichkeit zur Promotion im Labor der Experimentellen Kardiologie danken. Herrn Prof. Dr. Winkels danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und das sorgfältige Korrekturlesen.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Anna Klinke und Herrn Dr. Martin Mollenhauer für die intensive fachliche Betreuung und Anleitung im Labor, die zahlreichen Gespräche mit sehr hilfreichen Anregungen und die Begutachtung meiner Arbeit sehr bedanken.

Weiterhin danke ich Kashish Manchanda und Simon Geißen für die praktische Unterstützung in der Laborarbeit und für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Bei meiner Großmutter Gudrun Sobhani und meiner Schwester Mona Sobhani bedanke ich mich sehr für das Korrekturlesen der Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Tahere und Bidjan Sobhani, meiner Tante Anja Spengler, meinen Großeltern Rezwane & Dieter Spengler und Gudrun & Farhad Sobhani und meinen Freunden für die ausdauernde Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Meiner Schwester Mona gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Aufbau Myokard	3
2.2 Elektromechanik	4
2.2.1 Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem	4
2.2.2 Aktionspotential der Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards	5
2.2.3 Aktionspotential der Schrittmacherzellen und normale Automtizität	6
2.2.4 Elektromechanische Kopplung und Calciumhomöostase	7
2.3 Allgemeine Arrhythmogenese	11
2.3.1 Abnormale Automtizität	11
2.3.2 Getriggerte Aktivität und Nachdepolarisationen	11
2.3.3 Reentry	13
2.4 Postischämische Arrhythmogenese	14
2.4.1 Akute postischämische Arrhythmogenese	14
2.4.2 Langfristige postischämische Arrhythmogenese	19
2.5 Myeloperoxidase	25
2.5.1 Bildungsort	25
2.5.2 Struktur	25
2.5.3 Funktionen der MPO	26
2.6 Myeloperoxidase und postischämische Arrhythmogenese	29
2.6.1 MPO und akute postischämische Veränderungen	29
2.6.2 MPO und langfristige postischämische Arrhythmogenese	29
2.7 Fragestellung	32
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Zellkultur	33
3.1.1 HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten	33
3.1.2 Induzierte pluripotente Stammzell-Kardiomyozyten	35
3.1.3 Isolation muriner Kardiomyozyten	37
3.2 IonOptix	38
3.2.1 Inkubation der Zellen mit Fura-2 und MPO	38
3.2.2 Experimenteller Ablauf	38
3.2.3 Aufnahme der Calciumkonzentration	39
3.2.4 Analyse der Calciumtransienten	39
3.2.5 Zählung der arrhythmischen Ereignisse	40
3.3 Westernblot	42
3.3.1 Inkubation	42
3.3.2 Ernte und Probenvorbereitung	43

3.3.3 Blotten und Aufnahme der Proteinbanden	44
3.3.4 Analyse	46
3.4 Immunfluoreszenz	47
3.4.1 Inkubation	47
3.4.2 Fixierung und Permeabilisierung	47
3.4.3 Färbung	47
3.4.4 Aufnahme und Analyse	48
3.5 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden-Array	48
3.5.1 Voruntersuchungen	48
Um eine Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden-Array mit adäquater Erregungsweiterleitung zu erstellen, führten wir einige Voruntersuchungen durch, die im Folgenden näher beschrieben werden.	48
3.5.2 Messung des elektrischen Konduktionsprofils	49
3.6 Statistische Analysen	52
4. ERGEBNISSE	53
4.1 Calciumhomöostase der Kardiomyozyten	53
4.1.1 Intrazelluläre Calciumkonzentration und Anzahl arrhythmischer Ereignisse	53
4.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Regulatoren der Calciumhomöostase	57
4.2 Transdifferenzierung der Fibroblasten	65
4.2.1 Transdifferenzierung über die p38 MAPK	65
4.2.2 Kollagen	67
4.3 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array	68
4.3.1 Voruntersuchungen	68
4.3.2 Elektrisches Konduktionsprofil der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur	71
5. DISKUSSION	73
5.1 Calciumhomöostase der Kardiomyozyten	74
5.1.1 Intrazelluläre Calciumkonzentration und Anzahl arrhythmischer Ereignisse	74
5.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Regulatoren der Calciumhomöostase	76
5.1.3 Synopse der Effekte der MPO auf die Calciumhomöostase	80
5.2 Transdifferenzierung der Fibroblasten	82
5.2.1 Transdifferenzierung über die p38 MAPK	82
5.2.2 Kollagen	84
5.3 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array	85
5.3.1 Voruntersuchungen	86
5.3.2 Elektrisches Konduktionsprofil der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur	87
5.4 Ausblick	90
6. LITERATURVERZEICHNIS	92

7. ANHANG	109
7.1 Abbildungsverzeichnis	109
7.2 Tabellenverzeichnis	114

Abkürzungsverzeichnis

A

AP *Aktionspotential*
APD *Aktionspotentialdauer*
α-SMA *alpha-smooth muscle actin*
ATP *Adenosintriphosphat*

B

BCA *Bicinchoninsäure*
BSA *Bovines Serumalbumin*

C

Ca-CaM *Calcium-Calmodulin*
CaMKII *Calcium-Calmodulin-abhängige
Proteinkinase II*
cAMP *Cyclisches Adenosinmonophosphat*
CASQ2 *Calsequestrin 2*

D

DAD *delayed afterdepolarization*
DTT *Dithiothreitol (DTT)*

E

EAD *early afterdepolarization*

G

G6PDH *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*

H

HBSS *Hanks Balanced Salt Solution*
HCN-Kanälen *hyperpolarization-activated cyclic
nucleotide-gates cation channel*
HOCl *hypochlorige Säure*

I

I/R *Ischämie/Reperfusion*
ICAM *intercellular adhesion molecule*
iPSC *induzierte pluripotente Stammzellen*

iPSCM *induced pluripotent stem cell-derived
cardiomyocytes*

L

L-Typ VOCC *L-type voltage operated calcium
channel*

M

MMP *Matrix-Metalloproteasen*
MPO *Myeloperoxidase*

N

NCX *Natrium-Calcium-Austauscher*

P

PBS *Phosphat-gepufferte Salzlösung*
PI *Permanente Ischämie*
PKA *Proteinkinase A*
PLN *Phospholamban*

R

RNS *Reaktive Stickstoffspezies*
RyR *Ryanodin-Rezeptor*

S

SDS PAGE *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
gel electrophoresis*
SERCA *Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen
und endoplasmatischen Retikulums*
SR *Sarkoplasmatisches Retikulum*

T

TIMP *tissue inhibitor of metalloproteinase*

W

WT *Wildtyp*

1. Zusammenfassung

Die ventrikuläre Tachykardie ist eine häufige Komplikation und Todesursache in der akuten Phase und langfristig in Folge eines Myokardinfarkts¹ mit nur wenigen Therapiemöglichkeiten, was die Notwendigkeit der Forschung in diesem Bereich unterstreicht.

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die postischämisch zur Arrhythmogenese führen. Diese werden durch veränderte elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten während akuter Ischämie und im Rahmen des postischämischen Remodelings ausgelöst. In der akuten Phase spielen insbesondere Störungen der Calciumhomöostase eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Arrhythmien². Im Rahmen des langfristigen postischämischen, pro-arrhythmogenen Remodelings kommt es zur Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten mit nachfolgenden elektrophysiologischen Veränderungen, welche die Arrhythmogenese fördern³.

Nach einem Myokardinfarkt infiltrieren Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten das geschädigte und umliegende Gewebe und sezernieren dort unter anderem das Enzym Myeloperoxidase (MPO). MPO katalysiert die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies und ist eine Komponente der angeborenen Immunantwort. Neuere Forschungsarbeiten zeigen, dass MPO insbesondere über posttranslationale Modifikationen auch in der Regulation der Zellhomöostase und Entstehung inflammatorischer und pro-arrhythmogener Prozesse eine zentrale Rolle spielt⁴. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass MPO-Defizienz das Auftreten postischämischer Arrhythmien reduziert⁵. Ziel dieser Arbeit war es, die zugrundeliegenden Mechanismen, die den pro-arrhythmogenen Effekt der MPO bedingen, zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von MPO auf die Calciumhomöostase in unterschiedlichen Kardiomyozyten-Zelllinien untersucht. Dabei konnte eine Veränderung des Calciumtransienten und ein aktivierender Effekt auf die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), einen wichtigen Regulator der Calciumhomöostase, beobachtet werden. In 3T3-Fibroblasten wurde der Effekt von MPO auf die Transdifferenzierung untersucht, indem die Phosphorylierung der p38 MAPK und die Kollagenproduktion analysiert wurde. Auch hier konnte ein aktivierender Effekt von MPO auf die p38 MAPK festgestellt werden, der jedoch nicht zu einer vermehrten Kollagenproduktion führte. Insgesamt scheint MPO aktivierende Effekte auf Kardiomyozyten und Fibroblasten auszuüben. Da sich die Zellen in vivo im Zellverband befinden, erstellten wir ein Modell einer Kokultur aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array, um in Zukunft die funktionelle Konsequenz der gezeigten Effekte auf das elektrische Konduktionsprofil untersuchen zu können.

Das vorliegende Projekt und vorangehende Untersuchungen weisen darauf hin, dass MPO ein wichtiger Mediator in der Entstehung postischämischer ventrikulärer Arrhythmien zu sein scheint. In Zukunft ist die Durchführung weiterer Untersuchungen nötig, um robuste Befunde bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen der pro-arrhythmogenen Eigenschaften der MPO zu erhalten.

Gemeinsam mit klinischen Studien, die MPO-Inhibitoren untersuchen, soll die Arbeit einen potentiell neuen Therapieansatz zur Reduktion der postischämischen Arrhythmie-Entstehung aufzeigen.

2. Einleitung

Der plötzliche Herztod ist die häufigste Todesursache nach einem akuten Myokardinfarkt. Die am häufigsten während eines plötzlichen Herztodes dokumentierten Rhythmen sind anhaltende ventrikuläre Tachyarrhythmien (zu schneller und unregelmäßiger Herzschlag), die in Kammerflimmern ausarten. Ein Drittel der Fälle ist Folge eines akuten Myokardinfarkts. Bei 80% der Patienten, die an einem arrhythmischen Ereignis bzw. einem plötzlichen Herztod verstarben, bestand eine koronare Herzerkrankung^{6,7}.

Ein Myokardinfarkt führt zur Infiltration von Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, die unter anderem Myeloperoxidase (MPO) sezernieren. MPO wurde bis vor kurzem ausschließlich als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen. Kürzlich gemachte Beobachtungen weisen darauf hin, dass MPO auch eine wichtige Rolle in der Entstehung vaskulär-inflammatorischer Prozesse spielt und bei der Regulation der zellulären Homöostase mitwirkt^{4,5}. MPO wurde kürzlich als ein Mediator der postischämischen Arrhythmogenese entschlüsselt⁵. Es stellt sich die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen, die die pro-arrhythmogenen Eigenschaften der MPO bedingen. Diese Frage soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Für das Verständnis der Arrhythmogenese ist es wichtig, zunächst die physiologische Elektromechanik des Herzens zu kennen. Diese wird im ersten Teil der Einleitung erläutert. Anschließend wird auf die allgemeine und postischämische Arrhythmogenese eingegangen, um dann auf die bisher beschriebene Rolle und die zugrundeliegenden Mechanismen der MPO in der postischämischen Arrhythmogenese zu kommen.

2.1 Aufbau Myokard

Um eine regelmäßige und koordinierte Kontraktion des Herzens sicherzustellen, müssen die Zellen, aus denen das Myokard besteht, aufeinander abgestimmt zusammenarbeiten. Das Herzgewebe besteht aus unterschiedlichen Zellarten, zu denen Kardiomyozyten, Fibroblasten, Leukozyten, Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen gehören⁸.

Kardiomyozyten, aus denen das Volumen des Herzgewebes hauptsächlich besteht, sind erregbare Muskelzellen, die elektrisch über *gap junctions* gekoppelt sind und so ein funktionelles Synzytium bilden⁹. *Gap junctions* sind Zellkanäle und ermöglichen einen direkten zytoplasmatischen Austausch von Ionen und niedermolekularen Proteinen zwischen zwei Zellen. Sie werden durch das Aneinanderfügen von zwei Connexonen benachbarter Zellen gebildet, wobei jedes Connexon aus sechs Connexinen besteht. Connexine sind Proteine mit vier transmembran-Domänen und intrazellulären N- und C-Termini. Connexin43 stellt die häufigste kardiale Unterform im Ventrikel dar. Die Aktivität der *gap junctions* wird durch Veränderungen der Spannung, der Calciumkonzentration, des pH-Wertes, der Phosphorylierung und durch Proteininteraktionen reguliert¹⁰. Die Kontraktion der einzelnen Kardiomyozyten wird durch elektrische Impulse ausgelöst. Durch die elektrische Kopplung ist es möglich, dass die Erregung einer einzigen Zelle im Vorhof oder Ventrikel in kurzer Zeit durch das gesamte Myokard geleitet und zur Erregung und damit Kontraktion des gesamten Herzens führen kann¹¹. Die Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards werden durch Reizweiterleitung erregt. Kardiomyozyten des Erregungsbildungs- und -

leitungssystems besitzen die Fähigkeit, selbstständig Impulse zu bilden und ermöglichen so die regelmäßige Kontraktion des Myokards ohne Bedarf an äußerer Stimulation¹².

Neben den Kardiomyozyten befinden sich im Herzen weitere Zellpopulationen, die für die physiologische Funktion der Elektromechanik ebenfalls essenziell sind. Dazu gehören vor allem Fibroblasten¹³, welche gemeinsam mit den Kardiomyozyten in die Extrazellulärmatrix eingebettet sind. Kardiale Fibroblasten sind über das gesamte Herz verteilt und befinden sich zwischen den Kardiomyozyten. Die Hauptfunktion der Fibroblasten ist die Erhaltung der Homöostase der Extrazellulärmatrix, die ein Gerüst für die Kardiomyozyten bildet. Kardiale Fibroblasten produzieren und degradieren Komponenten der Extrazellulärmatrix, die unter anderem Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen beinhalten. Weiterhin spielen sie eine essenzielle Rolle in der myokardialen Reaktion auf Veränderungen in mechanischen, elektrischen und biochemischen Signalwegen. Sie sezernieren parakrine Faktoren, die die Funktion der Kardiomyozyten, Endothelzellen und Immunzellen regulieren¹⁴.

Die kardiale Extrazellulärmatrix besteht aus strukturellen, matrizellulären und adhäsiven Proteinen, die ein Gerüst für die Kardiomyozyten und auch Teil biochemischer Signalwege sind. So können Modulationen der Extrazellulärmatrix zu drastischen Veränderungen der kardialen Funktion führen. Kollagen Typ I und III sind die primären Strukturproteine des kardialen Interstitiums¹⁵ und werden von Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert und sezerniert. Die Degradation der Kollagene wird durch die sogenannten Matrix-Metalloproteasen (MMP), die unter anderem auch von Fibroblasten produziert und sezerniert werden, vermittelt. Deren Expression und Funktion werden streng kontrolliert, um das Gleichgewicht der Extrazellulärmatrix -Synthese und -Degradation aufrecht zu erhalten^{8,14}.

2.2 Elektromechanik

2.2.1 Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem

Die Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems können selbstständig elektrische Impulse bilden (Automatizität). Als primärer Schrittmacher dient der Sinusknoten, der zwischen der Vena cava superior und dem rechten Vorhof lokalisiert ist und Impulse mit einer Frequenz von 60-80/min ausbildet. Nachdem der Sinusknoten einen Impuls auslöst, wandert dieser rasch durch den gesamten Vorhof und führt zu dessen Kontraktion. Der elektrische Impuls wird anschließend im AV-Knoten verlangsamt, wodurch ausreichend Zeit für die Füllung der Ventrikel zur Verfügung gestellt wird. Der AV-Knoten dient als sekundärer Schrittmacher und kann bei Aussetzen des Sinusknotens Impulse mit einer Frequenz von 40-60/min bilden.

Die Ausbreitung des Impulses nimmt anschließend nach Erreichen des His-Bündels erneut an Geschwindigkeit zu. Dieses durchquert als einziger Muskelstrang den Anulus fibrosus, der Vorhof und Ventrikel elektrisch trennt. Auch das His-Bündel hat eine Eigenfrequenz und kann als tertiärer Schrittmacher mit einer Frequenz von 20-30 Schlägen/min fungieren. Das His-Bündel teilt sich in einen rechten und zwei linke Tawara-Schenkel auf. An der Herzspitze teilen sich die Tawara-Schenkel weiter in Purkinje-Fasern auf, die die letzte Strecke des Erregungsleitungssystems darstellen und die Erregung auf die Ventrikel übertragen¹⁶.

Der elektrische Impuls, generiert durch das Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem, wird wie beschrieben durch die Zellen des gesamten

Herzens weitergeleitet und führt zur elektrischen Erregung jeder einzelnen Zelle. Die elektrische Erregung induziert eine vorübergehende Veränderung des Membranpotentials, das Aktionspotential.

2.2.2 Aktionspotential der Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards

Das kardiale Aktionspotential (AP) bezeichnet eine kurz anhaltende Änderung des Membranpotentials über der Zellmembran und entsteht durch Ionenströme, die aufgrund von sich zu unterschiedlichen Zeiten öffnenden und schließenden Ionenkanälen zeitlich abgestimmt sind. Das Aktionspotential wird in fünf Phasen aufgeteilt (siehe Abbildung 1), diese sind jeweils durch spezifische Ionenströme und Potentiale gekennzeichnet. Zunächst wird das AP der Zellen des Arbeitsmyokards näher beschrieben, anschließend wird auf die Besonderheiten des APs in Schrittmacherzellen eingegangen.

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Ionen über der Membran entsteht eine Potentialdifferenz zwischen dem intra- und extrazellulären Raum und somit das Ruhemembranpotential. Die intrazelluläre Spannung ist normalerweise negativ in Relation zur extrazellulären Spannung. Je nach Zellart liegt das Ruhemembranpotential zwischen -50 und -90 mV. Durch den Impuls von Schrittmacherzellen kommt es über *gap junctions* zunächst zur initialen Depolarisation des Membranpotentials der umliegenden Zellen. Depolarisation bezeichnet eine Verminderung des Ruhemembranpotentials durch eine Umverteilung der intra- und extrazellulären Ionen. Die initiale Depolarisierung löst die Öffnung von spannungsaktivierten schnellen Natriumkanälen aus. Der darauf folgende Natriumeinstrom in die Zelle bedingt eine weitere Verminderung des Membranpotentials und die Öffnung weiterer Natriumkanäle. Durch den nun schnellen und starken Natriumeinstrom kommt es zur raschen Depolarisation bis zu einem Membranpotential von ca. +30 mV (Phase 0). Die Depolarisation verursacht das Schließen der Natriumkanäle und die Öffnung von Kaliumkanälen, was zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle und zur frühen Repolarisation (Phase 1) der Membran führt. Durch die Depolarisation werden ebenfalls spannungsgesteuerte Calciumkanäle (*L-type voltage operated calcium channel*, L-Typ VOCC) aktiviert. Weiterhin wird der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) durch die hohe intrazelluläre Natriumkonzentration aktiviert. Beides führt zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. In der Phase 2, dem Plateau, entsteht eine Balance zwischen dem Calciumeinstrom und Kaliumausstrom. Nach Inaktivierung der Calciumkanäle dominiert der Kaliumausstrom und die Membran repolarisiert weiter (Phase 3)^{17,18}, bis das Ruhemembranpotential (Phase 4) wieder erreicht ist. Kurz nachdem eine Zelle erregt wurde, kann sie temporär nicht erneut erregt werden, sie ist refraktär. Die absolute Refraktärzeit ist durch die Inaktivierung aller Natriumkanäle verursacht. Während der relativen Refraktärzeit sind einige Natriumkanäle noch inaktiviert, andere sind wieder aktivierbar. Die Refraktärzeit wird meist mit der Länge des APs gleichgesetzt¹⁹.

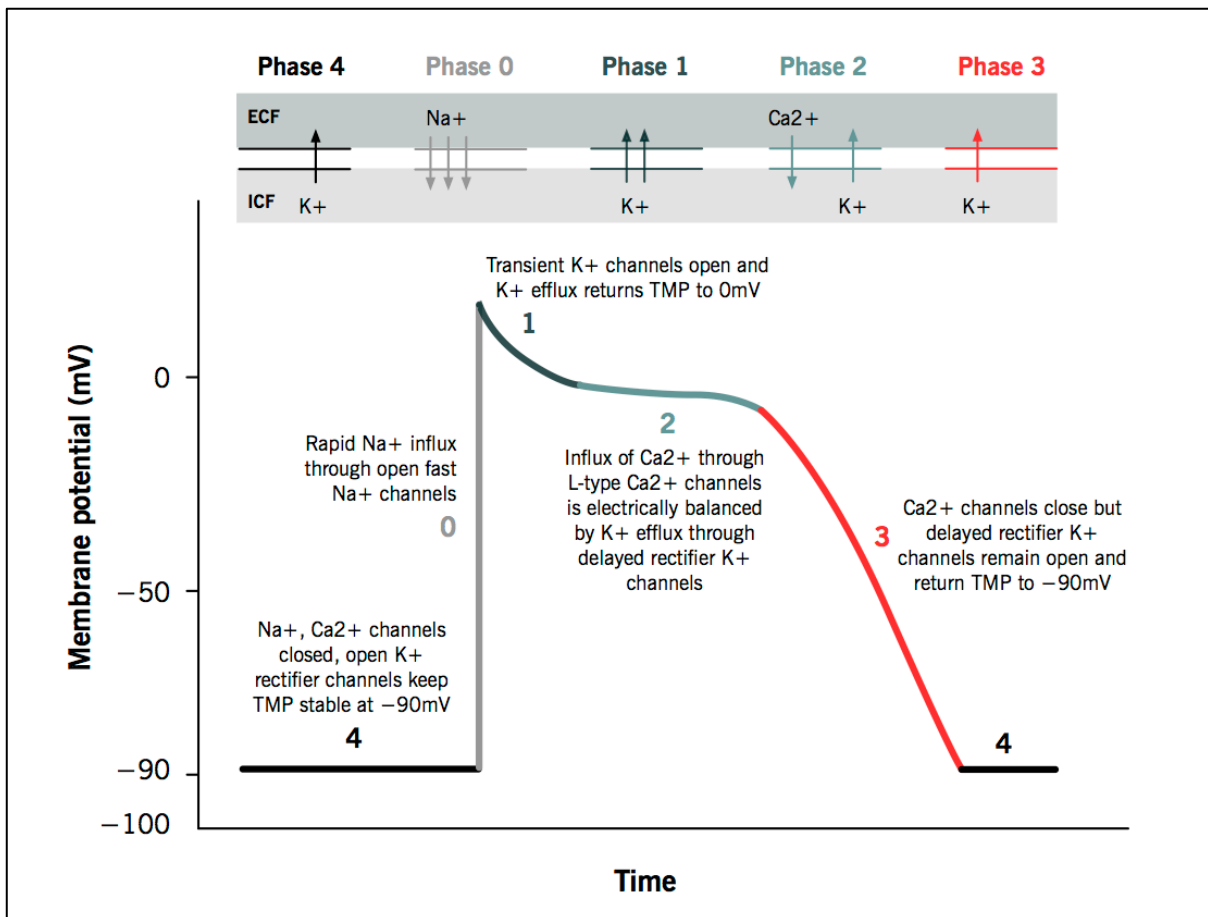


Abbildung 1 Kardiales Aktionspotential. Die Abbildung zeigt die fünf Phasen des kardialen Aktionspotentials mit den entsprechenden Ionenströmen²⁰.

2.2.3 Aktionspotential der Schrittmacherzellen und normale Automatizität

Schrittmacherzellen unterscheiden sich von anderen Kardiomyozyten durch die Fähigkeit der automatischen Aktionspotentialgenerierung¹⁸. Während der Diastole (Phase 4), ist das Membranpotential in ventrikulären Zellen fast konstant. In Schrittmacherzellen entstehen spontane diastolische Depolarisationen (instabile Phase 4), die Aktionspotentiale auslösen¹⁹. Spontane diastolische Depolarisationen werden durch die Aktivierung von *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel* (HCN-Kanälen) durch Hyperpolarisation ausgelöst. Die Aktivierung der Kanäle führt zu einem Einstrom von Kalium und Natrium (Schrittmacher-Strom) und somit zur Depolarisation. Der Aufstich des Aktionspotentials wird durch einen Calciumeinstrom bedingt. Die Repolarisation geschieht durch den Ausstrom von Kalium¹⁷. Der Anstieg der Schrittmacherdepolarisationen ist im Sinusknoten am steilsten, der normalerweise die Herzfrequenz bestimmt. Durch die Weiterleitung des Aktionspotentials, das im Sinusknoten initiiert wurde, werden physiologisch die Ersatzschrittmacher in anderen Regionen des Herzens inhibiert¹⁹.

Die reguläre Kontraktion des Herzens setzt eine Umwandlung der elektrischen Aktivierung (Erregung) in mechanische Kraft (Kontraktion) voraus. Dieser Vorgang wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet und erfordert eine koordinierte Bewegung der Calciumionen auf Ebene der Kardiomyozyten²¹.

2.2.4 Elektromechanische Kopplung und Calciumhomöostase

Sobald das Aktionspotential an der jeweiligen Zelle ankommt, führt die entstehende Depolarisierung der Membran zur Öffnung von L-Typ VOCC und somit zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. Durch die hohe intrazelluläre Natriumkonzentration während der Depolarisation wird der NCX aktiviert, was ebenfalls einen Calciumeinstrom in die Zelle zur Folge hat. Das einströmende Calcium bewirkt eine noch größere Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), dem intrazellulären Hauptspeicherort für Calcium²². Die Freisetzung von Calcium aus dem SR geschieht über einen speziellen Calciumkanal, den Ryanodin-Rezeptor (RyR)²³. Dieses Phänomen wird als Calcium-induzierte Calciumfreisetzung bezeichnet. Das erhöhte Calcium im Zytosol löst über die Bindung an Troponin C die Kontraktion der Myofilamente aus. Während der Diastole beginnt die Relaxation sobald der intrazelluläre Calciumspiegel sinkt, was durch die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), die unter ATP-Verbrauch das zytosolische Calcium zurück in das SR pumpt, bewerkstelligt wird. Weiteres Calcium wird über den NCX im Austausch gegen Natrium aus der Zelle transportiert. Trägt man die intrazelluläre Calciumkonzentration gegen die Zeit auf, so erhält man den Calciumtransienten.

Die ventrikulären Zellen besitzen Invaginationen des Sarkolemm, die sogenannten T-Tubuli, welche eine hohe Menge an L-Typ VOCC enthalten und gemeinsam mit dem SR die Dyaden formen. Die Dyaden ermöglichen einen homogenen Calciumtransienten über die gesamte Zelle während der elektromechanischen Kopplung²¹.

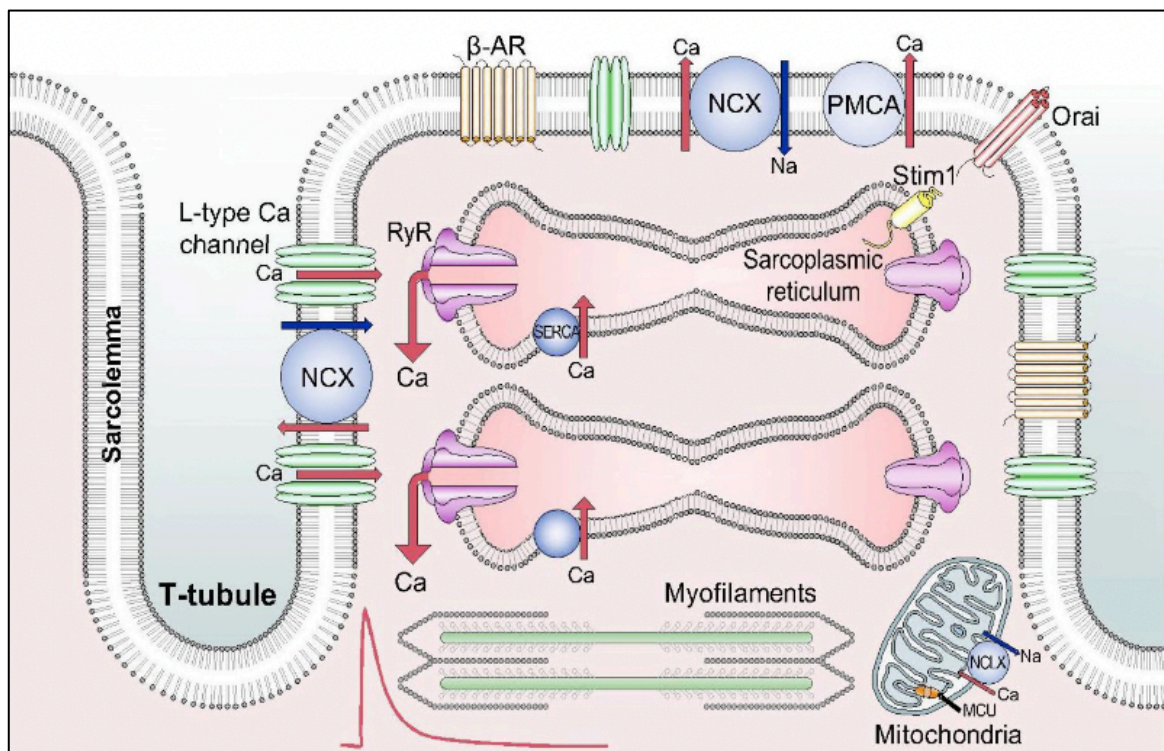


Abbildung 2 Beteiligte Strukturen der elektromechanischen Kopplung. Die schematische Übersicht zeigt die Oberflächenmembran, die T-Tubuli, das SR und Mitochondrien sowie verschiedene Ionenkanäle und -transporter, die im Text erwähnt sind. β -AR steht für β -Adrenorezeptor; Ca, Calcium; MCU, mitochondrialer Calcium-Uniporter; NCX, Natrium-Calcium-Austauscher; PMCA, Plasmamembran-Calcium-ATPase; RyR, Ryanodin-Rezeptor²⁴.

Elektromechanische Kopplung und die Calciumhomöostase beruhen auf dem Zusammenspiel mehrerer Rezeptoren, Enzyme und Ionenkanäle (siehe Abbildung 1), deren Aktivität reguliert werden muss. Als Antwort auf eine Sympathikusaktivierung und Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Proteinkinase A (PKA), welche durch cAMP aktiviert wird, phosphoryliert und aktiviert die Calciumtransporter L-Typ VOCC, RyR und SERCA. Die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Redox-Modifikationen bei erhöhtem zellulärem oxidativem Stress sind weitere wichtige Modulatoren der Calciumhomöostase^{23,25,26}.

L-Typ VOCC

Der L-Typ VOCC besteht aus einem makromolekularen Proteinkomplex, der porenbildende Proteine ($\alpha 1$ -Untereinheit) und regulierende Proteine ($\alpha 2\delta$ -, β -, γ -Untereinheit und Calmodulin (CaM)) beinhaltet. Die $\alpha 1$ -Untereinheit besitzt vier homologe Domänen mit jeweils sechs transmembranösen Segmenten, die den Spannungssensor und die Kanalöffnung beinhalten. Der C-Terminus ist von besonderer Bedeutung für die Interaktion mit Signalproteinen und die Entschlüsselung von lokalen Calciumsignalen. Der Calciumkanal öffnet sich spannungsabhängig während der Depolarisation und führt zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. Der Kanal wird durch Proteinkinasen wie PKA und CaMKII sowie durch die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A reguliert. PKA phosphoryliert den N-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit und steigert den Calciumeinstrom durch den L-Typ VOCC durch Erhöhung der Aktivierbarkeit und der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. CaMKII potenziert den Calcium-Influx durch Phosphorylierung des C-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit. CaMKII ist dauerhaft an die $\alpha 1$ -Untereinheit gebunden und wird nur aktiv, wenn Calcium an Calmodulin der CaMKII gebunden ist. Die schnelle Dephosphorylierung des Kanals wird durch die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A bewerkstelligt. Die Inaktivierung des Kanals wird durch Repolarisation und Calcium selbst im Rahmen eines negativen Feedbacks ausgelöst (Calcium-abhängige Inaktivierung). Dabei spielt CaM, das dauerhaft an dem C-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit gebunden ist, eine bedeutende Rolle. Calcium bindet an Apo-CaM (CaM ohne gebundenes Calcium) und bildet einen Calcium-Calmodulin (Ca-CaM)-Komplex, der den Kanal inaktiviert. Interessanterweise kann Ca-CaM die Aktivität des Kanals ebenfalls erhöhen.

Die Eigenschaft für diese duale Regulation wird durch zwei Calcium-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität im C- und N-Terminus von CaM ermöglicht. Die Bindungsstelle im C-Terminus ist hoch-affin und detektiert lokale Calciumerhöhungen, die Bindungsstelle im N-Terminus ist niedrig-affin und detektiert eine Erhöhung des globalen Calciums. So kann CaM Calcium aus unterschiedlichen Ursprüngen detektieren. Calcium, das während der elektromechanischen Kopplung initial durch den Kanal strömt und zu einer lokalen Calciumerhöhung führt, bindet CaM am C-Terminus und führt zur Potenzierung des Calciumeinstroms. Sobald die globale Calciumkonzentration erhöht ist, bindet Calcium ebenfalls an den N-Terminus von CaM und terminiert so einen weiteren Calciumeinstrom durch den L-Typ VOCC^{27,28}.

Der Calciumkanal kann durch Redox Modifikationen reguliert werden, die $\alpha 1$ -Untereinheit besitzt über zehn Cysteinreste und eine Modulation der Kanalaktivität durch Oxidation der Thiolgruppen ist beschrieben²⁹.

Ryanodin-Rezeptor

Der Ryanodin-Rezeptor ist ein makromolekularer Proteinkomplex mit einer tetramerschen Formation von vier RyR Monomeren, gepaart mit einer Vielzahl an regulatorischen Proteinen. Es gibt drei Unterformen, wobei RyR2 primär in kardialen Myozyten exprimiert wird und dort für die Freilassung von Calcium aus dem SR zuständig ist. Eine Bindung von Calcium an den Rezeptor verändert die Konformation des Kanals und führt zu einem Calciumausstrom aus dem SR^{28,26}.

RyRs werden indirekt durch L-Typ VOCCs (Calcium-induzierte Calciumfreisetzung) und direkt durch verschiedene Ionen, kleine Moleküle und Proteine, wie zum Beispiel Calcium, Magnesium, PKA, FK506 *binding protein* (FKBP), CaM, CaMKII und Calsequestrin 2 reguliert³⁰.

Im Lumen des SR interagiert RyR mit Calsequestrin 2 (CASQ2), dem wesentlichen intra-SR Calciumspeicherprotein des Herzmuskels. CASQ2 erhält die freie Calciumkonzentration im SR zwischen 100-500 μM . CASQ2 wechselt abhängig von der luminalen Calciumkonzentration reversibel zwischen monomerischer und oligomerischer Form. Es wird angenommen, dass CASQ2 als Oligomer vorliegt und hauptsächlich als Calciumpuffer dient, wenn das SR mit Calcium gesättigt ist. Wenn RyRs öffnen und die luminal Calciumkonzentration sinkt, löst sich Calcium von CASQ2 und das oligomerische Protein dissoziiert. Das CASQ2 Monomer bindet an RyR und inhibiert die Kanalaktivität^{28,31}.

Weiterhin ist CaM ein wichtiger Regulator des RyR, der in seiner calciumgebundenen (Ca-CaM) und calciumungebundenen (apoCaM) Form an den C-Terminus des Rezeptors bindet^{28,32,33}. ApoCaM fungiert als partieller Agonist, wohingegen Ca-CaM ein Inhibitor des RyR und der Calciumfreisetzung aus dem SR ist³⁰.

FKBP12 und FKBP12.6 sind weitere Proteine, die mit RyR interagieren. Der kardiale RyR2 bindet vor allem FKBP12.6 mit einer höheren Affinität. FKBP12.6 stabilisiert das koordinierte *Gating* der Untereinheiten innerhalb eines Tetramers und erleichtert so den Übergang des Kanals von vollständiger Öffnung bis zum vollständigen Schluss. Weiterhin verschiebt FKBP12.6 die calciumabhängige Kanalöffnung zu höheren Calciumkonzentrationen. Die Dissoziation von FKBP12.6 führt zu einer erhöhten Calciumfreisetzung aus dem SR³⁰.

Andere Proteine des makromolekularen Komplexes regulieren den Grad der posttranslationalen Modifikationen des RyR. Zum Beispiel modifizieren Proteinkinasen, wie PKA und CaMKII, und Proteinphosphatasen, wie PP1 und PP2A, die Phosphorylierung des Kanals³⁴⁻³⁶. Phosphorylierungen an Ser-2809 oder Ser-2814 durch CaMKII erhöht die Aktivität von RyR, Phosphorylierungen durch die PKA erhöhen die Sensibilität für Calcium³⁰.

Weiterhin kann die Aktivität des RyR durch Redox Modifikationen verändert werden. RyR2 besitzt ungefähr 90 Cysteinreste pro Untereinheit, davon befinden sich 20 im reduzierten Zustand und stellen somit potenzielle Ziele für verschiedenste Redox Modifikationen wie zum Beispiel S-Nitrosylation, S-Gluthationylation und Disulfidbrückenbildung dar²⁹. Viele in vitro Untersuchungen zeigen, dass Moleküle wie NO, H₂O₂ und Hydroxyl-Radikale Redox-abhängige Veränderungen der RyR Aktivität verursachen. Die funktionelle Konsequenz der Modifizierungen hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Im Allgemeinen wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 und damit die SR-Calciumfreisetzung durch oxidierende Bedingungen erhöht, wohingegen reduzierende Reagenzien diese Effekte rückgängig machen²⁹.

SERCA

SERCA besteht aus einem makromolekularen Proteinkomplex, die häufigste kardiale Unterform ist SERCA2a. Diese ist zuständig für die Aufnahme zytosolischen Calciums in das SR. SERCA wird hauptsächlich durch die regulatorische Untereinheit Phospholamban (PLN) reguliert. Im dephosphorylierten Zustand bindet PLN an SERCA und inhibiert diese. Durch PKA oder CaMKII phosphoryliertes PLN kann aufgrund einer Konformationsänderung nicht an SERCA binden. Dies führt zur Aufhebung der Inhibierung und Calciumaufnahme in das SR^{21,28,37,38}. SERCA wird weiterhin über Redox Modifikationen reguliert. Dabei werden zum Beispiel Cysteine oxidiert oder Tyrosine nitriert. Es wird vermutet, dass niedrige Konzentrationen an ROS die SERCA Aktivität reversibel erhöhen, wohingegen hohe Konzentrationen zur Inaktivierung durch irreversible oxidative Modifizierungen führen können. Das Wissen über die Redox Regulation von SERCA2a und die funktionelle Konsequenz solcher Modifikationen ist aktuell limitiert²⁹.

Natrium-Calcium-Austauscher

Der NCX schleust im Vorwärtsmodus ein Calciumion aus der Zelle und drei Natriumionen in die Zelle ein. Bei hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen kann der Austauscher in den Rückwärtsmodus wechseln und Calcium in die Zelle einschleusen. Der NCX wird hauptsächlich durch die intrazellulären Ionenkonzentrationen von Calcium und Natrium und durch das Membranpotential reguliert. Das Umkehrpotential liegt bei -20 mV ³⁹. Der NCX kann durch die PKA phosphoryliert²⁸ und durch Redox Modifikationen reguliert werden. Das Protein besitzt neun transmembranöse Domänen mit intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten aus verschiedenen Domänen, die eine wichtige Rolle in der Funktion spielen. Die NCX-Aktivität wird signifikant durch ROS erhöht²⁹.

CaMKII

Die häufigste Unterform der CaMK im Myokard ist CaMKII. Diese besteht aus 12 Untereinheiten und nimmt die Form zweier gestapelter Hexamere an⁴⁰. Jedes Monomer besitzt eine katalytische und eine Bindungsdomäne für Ca-CaM. Im Zentrum befindet sich jeweils eine autoregulatorische Region, die unter anderem die Ca-CaM-Bindungsstelle beinhaltet. Diese Region reguliert den Aktivierungsstatus über die Bindung von Ca-CaM^{41,42}. CaMKII ist eine Serin/Threonin-spezifische Phosphokinase und ist zuständig für die Feinabstimmung der intrazellulären Calciumkonzentration, insbesondere in Bezug auf die elektromechanische Kopplung in den Kardiomyozyten⁴². Die Proteinkinase kann den L-Typ VOCC phosphorylieren und dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen^{43,44}. RyR2 wird durch CaMKII an Ser2809 und Ser2814 phosphoryliert, was zu einem erhöhten Ausstrom von Calcium aus dem SR in das Zytosol führt⁴⁵⁻⁴⁷. Wie bereits erwähnt, phosphoryliert CaMKII ebenfalls PLN an Thr17, was zu einer erhöhten Calciumaufnahme in das SR durch SERCA führt^{48,49}. Die katalytische Domäne wird sterisch durch die autoregulatorische Region blockiert. Die Bindung von Ca-CaM an die CaMKII-Monomere induziert eine Konformationsänderung und die katalytische Region wird zugänglich⁵⁰. Sobald ein CaMKII-Monomer in den aktiven Status übergeht, werden die regulatorischen Domänen der anderen CaMKII-Monomere für eine Autophosphorylierung (an Thr286 oder Thr287, je nach Isoform) frei und das aktivierte CaMKII-Monomer kann weitere Monomere phosphorylieren. Diese Autophosphorylierung verhindert die Reassoziierung der katalytischen und autoinhibitorischen Regionen und führt zu einer Aktivierung der CaMKII, die auch nach

der Dissoziation von Ca-CaM anhält^{41,51}. ROS können die CaMKII über die Oxidierung von Met281/282 in der regulatorischen Domäne aktivieren. Diese posttranslationale Modifikation erfordert zur initialen Aktivierung ebenfalls die Bindung der Ca-CaM und verläuft dann analog zur Autophosphorylierung unabhängig von Ca-CaM ab⁵².

2.3 Allgemeine Arrhythmogenese

Kardiale Arrhythmie ist definiert als eine Abweichung von der normalen Herzfrequenz und/oder -rhythmus, die nicht physiologisch erklärbar ist. Die Mechanismen, die zu kardialen Arrhythmien führen, sind in zwei Hauptkategorien aufgeteilt⁵³:

1. Vermehrte oder abnormale Impulsgenerierung
 - a. Abnormale Automtizität
 - b. Getriggerte Aktivität durch Nachdepolarisationen
2. Störungen der Erregungsleitung
 - a. Reentry

2.3.1 Abnormale Automtizität

Automtizität ist die Eigenschaft kardialer Zellen spontane Aktionspotentiale zu generieren. Eine abnormale Automtizität kann inner- oder außerhalb der Schrittmacherzellen entstehen.

Eine erhöhte Automtizität in Schrittmacherzellen kann eine erhöhte Rate an Entladungen von Aktionspotentialen zur Folge haben¹⁸. Das kann durch drei Mechanismen erfolgen: eine Verschiebung des Schwellenpotentials ins Negative, eine Verschiebung des maximalen diastolischen Potentials ins Positive oder eine erhöhte Frequenz an Phase 4 Depolarisationen. Diese Veränderungen können eine Erhöhung der Herzfrequenz bedingen. Dies kann auf physiologischer, das heißt auf Grund eines erhöhten Sympathikotonus, oder pathologischer Grundlage, zum Beispiel bei Ischämie oder Elektrolytstörungen, entstehen^{18,54}.

Unter physiologischen Bedingungen generieren atriale und ventrikuläre Zellen keine diastolischen Depolarisationen oder Automtizität. Die genannten Zellen können diese Charakteristika jedoch entwickeln, wenn sie depolarisiert sind. Dies resultiert in repetitiver Impulsgenerierung, ein Phänomen das *depolarization-induced automaticity* genannt wird. Die diastolische Depolarisation führt zur Aktivierung von Natriumkanälen und zur Entstehung eines Aktionspotentials⁵³.

2.3.2 Getriggerte Aktivität und Nachdepolarisationen

Depolarisationen, die während eines kardialen Aktionspotentials auftreten und deren Manifestation von vorausgehender transmembranöser Aktivität abhängig ist, werden als Nachdepolarisationen bezeichnet. Nachdepolarisationen, die in Phase 2 oder Phase 3 des Aktionspotentials auftreten, werden frühe Nachdepolarisationen (*early afterdepolarization*, EAD) genannt. In Phase 4 auftretende Aktionspotentiale werden als späte Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarization*, DAD) bezeichnet. Wenn die Amplitude der Nachdepolarisationen das Schwellenpotential erreicht, wird ein Aktionspotential ausgelöst. Diese getriggerten Ereignisse führen zu Extrasystolen, welche wiederum zu Arrhythmien führen können⁵³.

Frühe Nachdepolarisationen

Frühe Nachdepolarisationen treten meist bei verlängerter Dauer des Aktionspotentials auf, bei denen die Amplitude des Einstroms größer als die des Ausstroms ist. Folgende Veränderungen können ursächlich für ein verlängertes Aktionspotential sein: eine Zunahme des späten Natriumeinstroms, eine Zunahme des Calciumeinstroms durch den L-Typ VOCC und den NCX oder eine Abnahme des Kaliumausstroms (siehe Abbildung 3).

Zwei Hauptmechanismen für die Entstehung von EADs in Phase 2 und 3 bei verlängerter Aktionspotentialdauer (APD) wurden beschrieben. Zum einen können Depolarisationen den L-Typ VOCC erneut reaktiveren⁵⁵, wenn dieser wieder aktivierbar ist. Die Erholungsrate des L-Typ VOCC wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Die erneute Aktivierung des Kanals während Phase 2 oder Phase 3 kann über einen vermehrten Calciumeinstrom zur weiteren Depolarisation der Membran und schließlich zum Aktionspotential und damit einer EAD führen. Die Verlängerung der APD begünstigt die erneute Aktivierung des Calciumeinstroms und somit die Entstehung von EADs. Zum anderen können spontane Calciumfreisetzungen aus dem SR in Phase 2 und Phase 3 zur Aktivierung des NCX führen, was in einer Membrandepolarisation resultiert (siehe Abbildung 3). Spontane Freisetzungen aus dem SR entstehen vor allem bei Calciumüberladung der Zelle^{56,57}. EADs können jedoch auch bei verkürzter APD in Phase 3 des Aktionspotentials auftreten⁵⁸. Bei verkürzter APD und normaler Calciumtransientdauer, was vor allem bei Ischämie auftritt, bleibt die intrazelluläre Calciumkonzentration während der Repolarisation der Zelle erhöht. Unter normalen Bedingungen sind die APD und die Dauer des Calciumtransienten ähnlich. Diese pathologische Divergenz der Aktionspotential- und Calciumtransientdauer führt zu einem vulnerablen Fenster für die Entstehung von EADs über die Aktivierung der NCX². Im Vergleich zu anderen Mechanismen der Entstehung von EADs handelt es sich hierbei nicht um eine spontane, sondern um die normale Calciumfreisetzung aus dem SR. Diese Art von EADs wird *Late Phase 3 EAD* genannt⁵⁹.

Die jeweiligen Mechanismen resultieren in der Veränderung des Membranpotentials, welche zur Öffnung spannungsaktivierter Natriumkanäle führt und somit ein Aktionspotential auslöst¹⁸.

Späte Nachdepolarisationen

Späte Nachdepolarisationen können nach vollständiger Repolarisation in Phase 4 auftreten und werden bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration beobachtet. Diese entsteht durch eine spontane Calciumfreisetzung aus dem SR und führt über die Aktivierung von Calcium-sensitiven Strömen (zum Beispiel des Natrium-Calcium-Austauscher-Stroms) zur Depolarisation der Membran. Wenn diese Depolarisation stark genug ist, kommt es zum Aktionspotential und damit zur getriggerten Aktivität (siehe Abbildung 3). Frühe und späte Nachdepolarisationen ähneln sich im Entstehungsmechanismus, der Unterschied liegt hauptsächlich im Zeitpunkt der Entstehung in Bezug auf das Aktionspotential¹⁸.

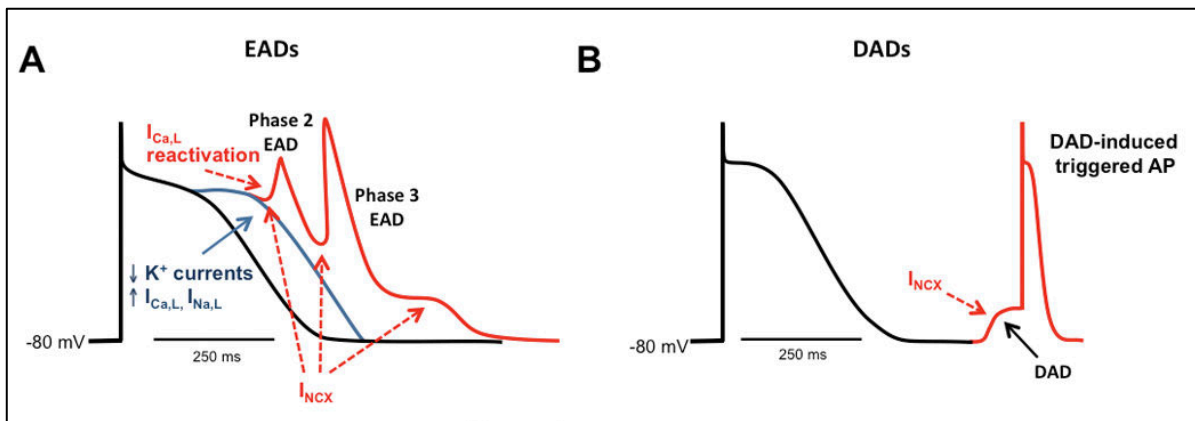


Abbildung 3 Getriggerte Aktivität. Getriggerte Aktivität wird primär durch (A) frühe Nachdepolarisationen während Phase 2 und 3 oder (B) späte Nachdepolarisationen während der Phase 4 verursacht. $I_{Ca,L}$ bezeichnet den L-Typ Calcium-Strom; $I_{Na,L}$, späten Natriumstrom; und I_{NCX} , Natrium-Calcium-Austauscher-Strom²¹.

2.3.3 Reentry

Der Reentry Mechanismus unterscheidet sich grundsätzlich von den Mechanismen der abnormalen Automtizität und der getriggerten Aktivität. Ein Reentry tritt auf, wenn eine Aktivierungswelle um ein anatomisches oder funktionelles Hindernis kreist und den Ursprungsort nach vergangener Refraktärzeit reaktiviert. Die Zellen erholen sich abwechselnd von der Erregung und können durch die nächste Wellenfront wieder erregt werden⁵³.

Drei Kriterien sind beschrieben, die für die Identifizierung eines kreisenden Reentrys genutzt werden:

1. Ein Areal mit unidirektionalem Block muss existieren.
2. Die Erregungswelle bewegt sich auf einem bestimmten Pfad, kommt zum Ursprungsort zurück und beschreitet dann erneut denselben Pfad.
3. Die Unterbrechung der Erregungswelle an einem beliebigen Punkt des Pfades würde zur Beendigung der kreisenden Bewegung führen.

Ein kreisendes Reentry kann nur stattfinden, wenn die Erregung in einem alternativen Leitungsweg signifikant verlangsamt wird, damit die Refraktärzeit in dem Gewebe proximal des unidirektionalen Blocks beendet werden kann und somit eine erneute, kreisende Erregungsleitung stattfinden kann^{18,60}. Der Erfolg beziehungsweise Misserfolg eines Reentrys wird durch die Leitungsgeschwindigkeit und die Refraktärzeit bestimmt. Die Erregung bewegt sich dabei wellenartig fort, wobei die Depolarisation des Aktionspotentials die Wellenfront und das Ende der Welle die Repolarisation darstellt⁶¹. Die Länge der Erregungswelle ist durch das Produkt der Leitungsgeschwindigkeit und der Refraktärperiode gegeben⁶² und muss kleiner als die anatomische Länge des Reentry-Kreises sein, damit das Reentry erfolgreich ist. Dabei wird angenommen, dass das Ende der Refraktärperiode mit dem Ende des Aktionspotentials zusammenfällt¹⁸.

Ein Reentry kann einerseits um fibrotische Areale (anatomisches Hindernis) und andererseits um Areale mit veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften

(funktionelles Hindernis) kreisen⁶³. Der unidirektionale Block, auf den ein vorzeitiger Impuls trifft, wird durch eine räumliche Dispersion der Refraktärzeiten verursacht. Diese Dispersion wiederum kann durch unterschwellige EADs und DADs und durch Veränderungen in der Calciumhomöostase entstehen⁶⁴ (siehe Abbildung 4). Weiterhin wird das Gewebe, das sich im Zentrum des Kreises befindet, durch elektrotonische Einflüsse der depolarisierenden Wellenfront über dem Schwellenpotential gehalten und somit ist unerregbar. Die Erregungswelle kann so weiterhin um das funktionelle Hindernis kreisen⁶⁴. Bei diesem Mechanismus ist der Reentry-Kreis ausschließlich durch die elektrophysiologischen Eigenschaften des Gewebes definiert¹⁸.

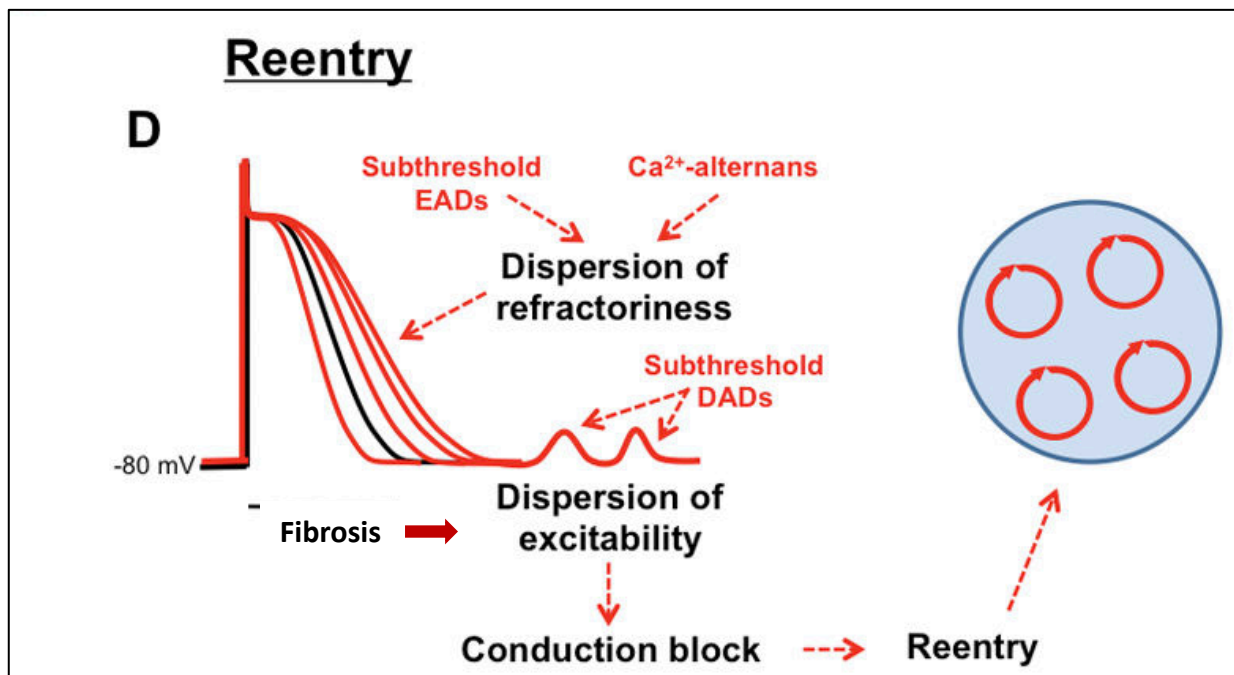


Abbildung 4 Reentry. Die Entstehung eines Reentrys erfordert einen Leitungsblock, der unter anderem durch die Dispersion der Refraktärzeiten verursacht werden kann (funktionelles Hindernis). Der Leitungsblock kann ebenfalls durch ein anatomisches Hindernis gebildet werden. $I_{Ca,L}$ bezeichnet den L-Typ Calcium-Strom; $I_{K,Ca}$, den calciumabhängigen Kaliumstrom. Modifizierte Abbildung aus Landstrom et al²¹.

2.4 Postischämische Arrhythmogenese

Ventrikuläre Arrhythmien sind die Haupttodesursache nach einem Myokardinfarkt⁶. Ein akuter Myokardinfarkt verursacht langfristige strukturelle und funktionelle Veränderungen über Tage bis Wochen als auch sehr frühe funktionelle Ionenkanalveränderungen innerhalb Minuten bis Stunden durch intrazelluläre Azidose, Kaliumverlust und Membranschädigung. Diese Veränderungen bilden die Grundlage für die Mechanismen der Arrhythmogenese⁶⁵.

2.4.1 Akute postischämische Arrhythmogenese

2.4.1.1 Akute pro-arrhythmogene Veränderungen während des Myokardinfarkts

Die akuten Veränderungen, die während einer Ischämie auftreten, sind hauptsächlich funktionell. Dazu gehören die Verminderung des Sauerstoffangebots, ein Abfall von Adenosintriphosphat (ATP) und Kreatinphosphat, eine erhöhte Konzentration an ROS unter anderem durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten^{26,29}, sowie

strukturelle Veränderungen der Zellmembran und Veränderungen der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen. Dabei erhöht sich der extrazelluläre Kaliumspiegel sowie die intrazelluläre Natrium- und Calciumkonzentration, was mit einer intra- und extrazellulären Azidose einhergeht^{2,57}. Weiterhin akkumulieren Katecholamine im Gewebe⁶⁶. Diese Veränderungen beeinflussen die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen und wirken dadurch proarrhythmogen^{65,66}.

Azidose

Durch die erhöhte CO₂-Retention und Protonenproduktion bei Ischämie fällt der pH-Wert intra- und extrazellulär ab⁶⁷. Die Azidose inhibiert eine Vielzahl an Ionenkanälen. Insbesondere der NCX wird durch saure pH-Bereiche inhibiert^{68,69}.

Kalium

Unter normalen Bedingungen ist die Kaliumkonzentration intrazellulär hoch und extrazellulär niedrig. Ein passiver Ausstrom wird durch aktives Einschleusen von Kalium in die Zelle durch die Natrium-Kalium-Pumpe kompensiert. Während der akuten Ischämie steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration durch vermehrten Ausstrom und verminderten Einstrom in die Zelle⁷⁰. Während des Infarkts steigt das ADP/ATP-Verhältnis und die ATP-vermittelte Verhinderung des Kaliumausstroms versagt^{2,66}. Der geringe Einstrom ist unter anderem auf eine verminderte Funktion der Natrium-Kalium-Pumpe bei abfallendem ATP zurückzuführen. Gleichzeitig kann die Natrium-Kalium-Pumpe durch die β -adrenerge Stimulation der Katecholamine phosphoryliert und aktiviert werden⁶⁶. Es gibt also gegensätzliche Einflüsse auf die Natrium-Kalium-Pumpe.

Natrium

Während der Ischämie steigen intrazelluläre Natriumlevel vermittelt durch verminderten aktiven Transport aus der Zelle und erhöhten passiven Einstrom an^{2,57}.

Calciumhomöostase

Im Folgenden wird der Einfluss der Ischämie auf die molekularen Spieler der Calciumhomöostase, die intrazelluläre Calciumkonzentration und den Calciumtransienten während der elektromechanischen Kopplung beschrieben.

L-Typ VOCC

Während des Myokardinfarktes kommt es zur Hypoxie. Fearon et al. zeigten, dass der L-Typ VOCC bei Hypoxie inhibiert wird. Dabei wird angenommen, dass diese Inhibition über bisher ungeklärte Redox-Modifikationen des Kanals geschieht^{26,71,72}. Weiterhin besteht eine erhöhte Konzentration an ROS, die die α -Untereinheit des Kanals oxidieren und so zu einer Verminderung der Aktivität führen können²². Gleichzeitig führt oxidativer Stress zur Oxidierung und folgender Aktivierung der Proteinkinasen CaMKII und PKA^{52,73}, die jeweils den L-Typ VOCC über eine Phosphorylierung aktivieren und so zu einem vermehrten Calciumeinstrom führen^{43,44}. H₂O₂ erhöht den Calciumeinstrom durch den L-Typ VOCC, durch Inhibition der CaMKII wurde dieser Effekt reduziert. Das weist darauf hin, dass der Effekt auf den L-Typ VOCC unter oxidativen Bedingungen eher Phosphorylierungs-, also CaMKII-, abhängig ist⁷⁴. Welcher dieser gegensätzlichen Effekte unter oxidativem Stress überwiegen ist bisher unklar²⁶. Weitere beschriebene Effekte auf den L-Typ VOCC während der Ischämie sind eine erhöhte Sensibilität für die β -adrenerge Stimulation, die zu vermehrter

Phosphorylierung und Aktivierung des Kanals führt^{75,76}. Der Abfall der ATP-Konzentration und die Azidose haben eine Verminderung des Calciumeinstroms durch den L-Typ VOCC zur Folge^{2,77-79}. Die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration während Ischämie inhibiert den Kanal über das bereits beschriebene negative Feedback^{27,28}.

Ryanodin-Rezeptor

Auch hier kann zwischen einer direkten oxidativen Modifikation des RyRs und einer Phosphorylierung durch aktivierte Proteinkinasen unter erhöhter ROS Konzentration unterschieden werden²⁶. Oxidativer Stress und erhöhte Konzentrationen von ROS führen über Oxidation des Kanals (S-Glutathionylation) zu einer Erhöhung der RyR-Aktivität und einem vermehrtem Leck von Calcium aus dem SR⁸⁰. Die Aktivierung der Proteinkinasen CaMKII und PKA unter oxidativen Bedingungen führt über die Phosphorylierung des RyRs ebenfalls zu dessen Aktivierung und einer erhöhten Calciumfreisetzung und intrazellulären diastolischen Calciumlecks aus dem SR^{81-85,25,86,87}. Weiterhin ist beschrieben, dass die Sensibilität des RyRs für Calcium durch die Azidose und den ATP-Verlust herabgesetzt wird⁸⁸. Die Anzahl der verfügbaren RyRs sinkt während der Ischämie⁸⁹. Auch hier ist noch unklar, welche Mechanismen während der Ischämie überwiegen.

SERCA

Die Funktion der SERCA ist von der ATP-Konzentration und dem Funktionszustand von PLN abhängig. Je länger die Ischämie andauert, desto mehr wird die Aktivität der SERCA über den ATP-Verlust und die Dephosphorylierung von PLN durch Proteinphosphatasen vermindert^{90,91}. Dies steht im Kontrast zu dem Effekt der oxidierten PKA und CaMKII, die PLN phosphorylieren und somit eine Aktivierung der SERCA verursachen⁹². Durch Nitrosylierung von Cysteinresten während der Ischämie wird die Aktivität der Pumpe formal erhöht, dieser Effekt ist jedoch limitiert². Es kommt auch hier zu gegensätzlichen Effekten während der Ischämie.

Natrium-Calcium-Austauscher

In Homöostase arbeitet der NCX im Vorwärtsmodus, wobei er ein Calciumion aus der Zelle aus- und drei Natriumionen in die Zelle einschleust. Während der Ischämie arbeitet der NCX im Rückwärtsmodus, was zu einer verminderten Calciumextrusion aus der Zelle und somit zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt²⁶. Eine erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration und die Depolarisation führen zum Wechsel in den Rückwärtsmodus aufgrund einer veränderten Antriebskraft^{39,93}. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration stimuliert den NCX und bewirkt somit einen gegensätzlichen Effekt zur Natrium-induzierten Inaktivierung⁵⁷. Modifikationen des NCX durch Redox-Modifikationen und Phosphorylierungen durch die PKA werden angenommen, aber die Effekte auf die Funktion des NXC bleiben unklar^{26,94}. Es konnte gezeigt werden, dass NCX durch eine erhöhte Konzentration an intrazellulären ROS aktiviert wird⁹⁵⁻⁹⁷.

CaMKII

CaMKII ist während kardialer Ischämie erhöht aktiv. Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel eine erhöhte Calciumkonzentration, eine Azidose, erhöhte Level an ROS, führen zur CaMKII Aktivierung^{42,52,98}. Die relative Gewichtung der unterschiedlichen Stimuli und der Einfluss der posttranslationalen Modifikationen auf den Aktivierungsstatus der CaMKII während Ischämie ist nicht vollständig untersucht.

CaMKII aktiviert ihrerseits weitere Regulatoren der Calciumhomöostase, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben.

Intrazelluläre Calciumkonzentration

Während akuter Ischämie übersteigt der Calciumeinstrom den Calciumausstrom aufgrund von reduzierter Calciumentfernung aus dem Zytosol durch verminderte NCX-Aktivität (und letztlich Calciuminflux bei Arbeiten des NCX im Rückwärtsmodus) und erhöhtem Calciumfluss in die Zelle. Dies führt zur Erhöhung der diastolischen Calciumkonzentration während akuter Ischämie^{2,99}.

Die Zunahme der Calciumkonzentration wird verstärkt durch Reduktion der Calciumaufnahme in das SR, sowie durch Azidose-bedingte Dissoziation von Protein-gebundenem Calcium^{2,26,57}.

Calciumtransient während elektromechanischer Kopplung

Im Rahmen der Ischämie wird während der elektromechanischen Kopplung in der Systole vermindert Calcium aus dem SR freigesetzt, was zu einer verzögerten Zunahme und reduzierten Amplitude des Calciumtransienten führt. Gleichzeitig kommt es zur verzögerten Abnahme des Calciumtransienten, obwohl die Dauer des Calciumtransienten meist erhalten ist. Angesichts der verkürzten APD während Ischämie ist die erhaltene Dauer des Calciumtransienten teilweise auf eine verminderte Kinetik des RyR zurückzuführen. Eine verminderte Rate der Calciumfreisetzung verzögert indirekt die Wiederaufnahme in das SR, was durch die Abnahme der SERCA Aktivität verstärkt wird. Es wird angenommen, dass sich der Calciumgehalt des SRs nicht verändert, was darauf hindeutet, dass die Freisetzung und die Wiederaufnahme von Calcium gleichermaßen beeinträchtigt sind².

Connexine

Während der akuten Ischämie kommt es durch eine Reduktion der *gap junctions* zwischen benachbarten Kardiomyozyten zur elektrischen Entkopplung, die Zellen bilden kein elektrisches Synzytium mehr. Eine Dephosphorylierung der Connexine führt zu deren Translokation aus den *gap junctions* in intrazelluläre Pools. Weitere Mechanismen, die eine Entkopplung während der Ischämie bedingen, werden durch die ansteigenden intrazellulären Calciumkonzentration und Azidose vermittelt¹⁰⁰.

2.4.1.2 Elektrophysiologische Folgen der akuten pro-arrhythmogenen Veränderungen

Die beschriebenen Veränderungen der Ionenströme durch die Ischämie führen zur Veränderung des Aktionspotentials und folglich zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen. Die pro-arrhythmogenen Veränderungen sind besonders in der Grenzzone sehr heterogen⁵⁷ und bilden die Grundlage für die Entstehung von Arrhythmien¹⁹.

Aktionspotential

Das Ruhemembranpotential steigt aufgrund der erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration in Richtung Depolarisation an. Weiterhin ist als Mechanismus für die Depolarisation die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beschrieben⁶⁶.

Je mehr die Kaliumkonzentration extrazellulär ansteigt, desto stärker wird die Anstiegsrate (dV/dt) und die Amplitude des Aktionspotentials vermindert. Dies ist

durch die Inhibition der Natriumkanäle bedingt. Diese wird einerseits indirekt durch Depolarisation bei erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration und intrazellulärer Calciumkonzentration und andererseits direkt durch die Azidose, die bei erhöhter Kaliumkonzentration zunimmt, bedingt¹⁹. Die Repolarisation wird hauptsächlich durch den Kaliumausstrom bestimmt. Durch den vermehrten Kaliumausstrom wird die Repolarisation bei Ischämie verkürzt¹⁹, was insgesamt zur Verkürzung der APD² führt. Die inhomogene extrazelluläre Kaliumkonzentration führt zu unterschiedlich starken Veränderungen des Ruhemembranpotentials und der APD⁶⁶.

Refraktärzeit und Erregbarkeit

Obwohl die APD verkürzt ist, ist die effektive Refraktärzeit der Zellen bei Ischämie verlängert. Dieses Phänomen wird als Postrepolarisations-Refraktärität bezeichnet und beruht auf der Inhibition der Natriumkanäle. Die Erregbarkeit der Zellen ist also vermindert und es kommt zu einem funktionellen Leitungsblock^{19,57}. Durch die Inhomogenität der extrazellulären Kaliumkonzentration besteht eine Dispersion der Refraktärzeiten, das heißt, die Differenz zwischen der kürzesten und längsten Refraktärzeit ist im ischämischen Myokard erhöht⁶⁶.

Leitungsgeschwindigkeit

Die Leitungsgeschwindigkeit ist proportional zur Anstiegsrate (dV/dt) des Aktionspotentials. Wenn Kanäle, die zuständig für den Aufstrich des Aktionspotentials sind, inhibiert oder in ihrer Öffnungskinetik verlangsamt sind, wird die Leitungsgeschwindigkeit verringert. In den meisten Herzzellen ist die Anstiegsrate des Aktionspotentials von dem Natriumeinstrom abhängig. Die Natriumkanäle werden direkt durch die Azidose und indirekt über die Hyperkaliämie und die intrazelluläre Calciumkonzentration inhibiert, was den Aufstrich und die Amplitude des Aktionspotentials vermindert und die Leitungsgeschwindigkeit verlangsamt¹⁹. Zusätzlich wird die Leitungsgeschwindigkeit durch eine fortschreitende Funktionseinschränkung der *gap junctions* aufgrund der Azidose verlangsamt^{2,57}.

All diese Veränderungen geschehen nicht einheitlich über das Infarktgebiet. Besonders an der Grenzzone kommt es zu heterogenen Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften⁵⁷.

2.4.1.3 Akute pro-arrhythmogene Veränderungen und Arrhythmogenese

Während der akuten Ischämie treten Arrhythmien in zwei Phasen auf. Die erste Phase (1a) tritt im Durchschnitt 2-10 Minuten nach Okklusion auf, während die zweite Phase (1b) nach 20-40 Minuten auftritt. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Arrhythmogenese in den beiden Phasen unterscheiden sich².

Die Arrhythmien der Phase 1a sind meist nicht letal und präsentieren sich als ventrikuläre Tachykardien. Die durch die Ischämie verringerte Wellenlänge der Erregung (= APD x Leitungsgeschwindigkeit) fördert die Entstehung von Reentry-Kreisläufen. Diese entstehen hauptsächlich in der Grenzzone, in der abnormale Impulse durch erweiterte Kreise oder mehrere Wellenfronten um eine Region mit Leitungsblock wandern. Der Anteil an ektopischen Erregungen ist eher gering².

Die in der Phase 1b auftretenden Arrhythmien werden als primäre Ursache des plötzlichen Herztodes beschrieben, da sie häufig zu Kammerflimmern führen. Der Mechanismus der Genese ist weniger klar. In Phase 1b ist der Anteil an ektopischen Erregungen größer als in Phase 1a, wahrscheinlich aufgrund einer Kombination aus depolarisierenden Einflüssen durch erhöhte Katecholaminspiegel, intrazellulärer

Erhöhung der Calciumkonzentration und zunehmender zellulärer Entkopplung. Gleichzeitig besteht eine erhöhte Neigung, dass die getriggerte Aktivität aufgrund der zunehmenden Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit zu einem Reentry führt².

Abnormale Automatizität

Durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wird die spontane Aktivität der Schrittmacherzellen und Purkinjefasern erhöht. Die Aktivierungskurve des Schrittmacher-Stroms ist in die positive Richtung verschoben^{101,102}, was die Rate der diastolischen Depolarisationen erhöht⁵⁷.

Getriggerte Aktivität und Nachdepolarisationen

Die veränderte APD und die erhöhte Calciumkonzentration können über die bereits beschriebenen Mechanismen zur Entstehung von EADs und DADs führen. Da es während der Ischämie zur Verkürzung der APD kommt, spielt insbesondere der Mechanismus der *Late Phase 3 EAD* eine wichtige Rolle². Auch der spontane Calciumleck aus dem SR kann zur Entstehung von EADs und DADs führen⁵⁷.

Weiterhin können EADs während der Repolarisation unabhängig von Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration durch elektrotonische Interaktionen zwischen Regionen mit variierender APD auftreten. Dies ist während regionaler Ischämie von Bedeutung, da räumliche Heterogenitäten der APD zwischen ischämischem und gesundem Gewebe existieren².

Reentry

Die Voraussetzungen für die Entstehung eines Reentrys werden durch die Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften während der Ischämie erfüllt. Die heterogene Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit, die Dispersion der Refraktärzeiten und die unterschiedlichen Erregungszustände der Zellen führen zu Bereichen mit Leitungsblock, um die Impulse kreisen können. Spontane frühzeitige Depolarisationen können in der Grenzzone blockiert und um Bereiche mit Leitungsblöcken weitergeleitet werden. Die Wellenfront kann retrograd das Gewebe proximal des Blocks erneut erregen. Während eines Kammerflimmerns waren mehrere Reentry-Wellen zu beobachten, die um unabhängige Bereiche mit vorübergehendem funktionellen Leitungsblock kreisten^{19,66}.

2.4.2 Langfristige postischämische Arrhythmogenese

2.4.2.1 Langfristige pro-arrhythmogene Veränderungen nach Myokardinfarkt

Der nekrotische Zelltod während eines Myokardinfarkts erfordert einen koordinierten zellulären Prozess, der eine adäquate Wundheilung und Narbenbildung im Bereich des Infarkts sicherstellt. Dieser Prozess lässt sich in drei Phasen aufteilen: die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Reifung³. Für die korrekte Heilung ist das zeitliche Fortschreiten und die jeweilige Beendigung der inflammatorischen und proliferativen Phase nötig. Wenn eine der Phasen exzessiv oder nicht adäquat beendet wird, kommt es im umliegenden nicht-infarzierten Gewebe zu einem langfristigen strukturellen und funktionellen kardialen Remodeling mit pro-arrhythmogenen Eigenschaften^{3,14,103,104}.

Inflammatorische Phase

Die inflammatorische Phase beginnt kurz nach dem Myokardinfarkt. Die Verletzung des Gewebes aktiviert das angeborene Immunsystem über die Freisetzung von Zytokinen und induziert so eine Leukozyteninfiltration, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die Leukozyten sind für die Entfernung der abgestorbenen Zellen und der Extrazellulärmatrix des geschädigten Gewebes mittels Phagozytose und Proteolyse zuständig und schaffen so Platz für eine weitere Zellinfiltration und späteres Narbengewebe³. Während dieser Phase sezernieren Makrophagen eine hohe Menge an pro-inflammatorischen Zytokinen, vor allem TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie Proteasen einschließlich MMPs^{3,14,104}. Diese Zytokine und Proteasen führen zu elektrophysiologischen Veränderungen der Kardiomyozyten und tragen so zum pro-arrhythmogenen Remodeling bei³. Zu den am besten dokumentierten elektrophysiologischen Veränderungen in der Grenzzone gehören eine Reduktion des repolarisierenden Kaliumausstroms^{105,106}, eine Störung des intrazellulären Calciumhandlings¹⁰⁷ und eine reduzierte Anzahl und Lateralisierung von Connexin43^{108,109}.

Kalium

Kaliumkanäle ermöglichen den Kaliumausstrom aus der Zelle, der in Kardiomyozyten insbesondere für die Repolarisation von großer Bedeutung ist. Eine Vielzahl an Kaliumkanälen ist nach einem Myokardinfarkt in der Grenzzone herunterreguliert, mit der Folge einer beeinträchtigten Repolarisation. Der genaue Mechanismus der Herunterregulierung ist bisher nicht bekannt⁶⁵.

Calcium und Calciumhomöostase

Veränderungen der Calciumhomöostase können durch den Infarkt an sich im Infarktareal oder durch das postischämische Remodeling im nicht infarzierten Gewebe auftreten⁶⁵. Der Calciumeinstrom durch den L-Typ VOCC ist in den Zellen der Grenzzone vermindert⁶⁵, wodurch die Amplitude des intrazellulären Calciumtransienten vermindert ist¹¹⁰. Die Erholung der Kanäle ist verlangsamt⁶⁵. Die Expression von SERCA ist herunterreguliert¹¹⁰, gleichzeitig bleibt der NCX unverändert^{65,107}. Die geringere Menge an SERCA geht mit einer verminderten Calciumaufnahme in das SR¹¹⁰ und einer verlängerten Rückbildung des Calciumtransienten einher⁶⁵. Insgesamt kommt es zur Verminderung der systolischen intrazellulären Calciumkonzentration, der Erhöhung der diastolischen Calciumkonzentration, der Verminderung der Calciumkonzentration im SR und zur Verlängerung des intrazellulären Calciumtransienten. Überlebende Zellen der Grenzzone zeigen deutliche Veränderungen der subzellulären Calciumhomöostase mit einer erhöhten Rate an spontanen Calciumfreisetzungen aus dem SR^{3,65,111}.

Natrium

Die Aufstrichgeschwindigkeit und Amplitude des Aktionspotentials ist in Zellen der Grenzzone reduziert, was auf einen veränderten Natriumeinstrom hindeutet⁶⁵. Veränderungen des Natriumstroms kommen durch eine verminderte Dichte der Kanäle, beschleunigter Inaktivierung und verlangsamer Reaktivierung zustande. Insgesamt ist die Kinetik des spannungsabhängigen Natriumkanals in ischämischen Zellen verändert¹¹². Eine leichte Erhöhung des Natriumeinstroms kann durch eine Beschleunigung des Einbaus der Natriumkanäle in die Zellmembran durch die PKA erreicht werden¹¹³. Es kommt also zu gegensätzlichen Effekten.

Connexin43

Nach einem Infarkt kommt es früh zu Veränderungen der Anzahl, Größe und zu einer Umverteilung der *gap junctions* in dem Bereich der Grenzzone¹¹⁴. Die Anzahl und die Größe der Connexine nehmen ab¹¹⁵. Die Anzahl der Zellen, mit denen eine Kardiomyozyte gekoppelt ist, sinkt von 11 auf 6^{115,116}. Die Umverteilung der Connexine ist heterogen. Sie zeigt sich in Bereich der Grenzzone in einer starken Abnahme (um 75%) der Seit-zu-Seit-Kopplung und in der epikardialen Grenzzone in einer weniger starken Abnahme (um 22%) der End-zu-End-Kopplung zwischen Kardiomyozyten¹¹⁵. Normalerweise konzentrieren sich *gap junctions* in den Glanzstreifen an den Enden der Kardiomyozyten. Im erkrankten Myokard sind die *gap junctions* räumlich nicht mehr auf die Glanzstreifen beschränkt und die Dichte der *gap junctions* an der lateralen Seite nimmt zu (Lateralisierung)¹¹⁷. In der abgeheilten Infarktzone existiert eine heterogene Verteilung der *gap junctions*: neben Arealen mit einer hohen Anzahl an *gap junctions*, befinden sich Areale mit einer niedrigen Anzahl an *gap junctions*¹¹⁷. Kürzlich konnte ein Mechanismus der Connexin43 Degradation identifiziert werden: Im Zuge des postischämischen Remodelings baut MMP-7 Connexin43 ab. Die Konzentration der MMPs ist während eines Myokardinfarktes durch die einhergehende Inflammation erhöht^{3,103}. Weiterhin tragen TNF- α und IL-1 β Signaling zur Internalisierung und Lateralisierung der Connexine bei³.

Die Umverteilung der Connexine und die Entkopplung der Zellen findet bereits vor dem fibrotischem Remodeling statt und ist somit nicht ausschließlich durch eine physikalische Zelltrennung durch Narbengewebe verursacht^{65,114}. In der proliferativen Phase kommt es zusätzlich zur Entkopplung der Kardiomyozyten durch Fibrosestränge zwischen den Zellen¹¹⁸.

Proliferative Phase

Ungefähr drei bis fünf Tage nach dem Myokardinfarkt nehmen die pro-inflammatorischen Signale und es kommt zur Hochregulation von anti-inflammatorischen und pro-fibrotischen Signalen¹⁰⁴. Dies kennzeichnet den Beginn der proliferativen Phase der Heilung. Während die Anzahl der Immunzellen und die Spiegel von TNF- α und IL-1 β abnehmen, kommt es zum Anstieg von TGF- β und IL-10. TGF- β wird als latente Form in der Extrazellulärmatrix gespeichert und kann durch verschiedene Stimuli schnell freigesetzt und aktiviert werden. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem ROS, matrizelluläre Proteine, Proteasen und Integrin-vermittelte Interaktionen^{104,119}. Weiterhin wird TGF- β durch Thrombozyten, Leukozyten und Fibroblasten im Infarktgebiet synthetisiert und sezerniert¹²⁰. Neben TGF- β spielen Faktoren wie Angiotensin II, Endothelin und ROS eine wichtige Rolle im pro-fibrotischen Signaling¹⁴.

Transdifferenzierung Fibroblasten zu Myofibroblasten

TGF- β ist der meist untersuchte pro-fibrotische Wachstumsfaktor^{120,121}, welcher die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten stimuliert^{3,122}. Weiterhin verursachen mechanischer Stress, Hormone und andere Wachstumsfaktoren die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten^{14,123}.

Ein wichtiger Signalweg, den TGF- β aktiviert und der für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist, ist über p38 MAPK vermittelt. Die pharmakologische Inhibition der p38 MAPK zeigte sich protektiv bezüglich der Fibrosebildung nach Myokardinfarkt¹²⁴.

Myofibroblasten sind Zellen, die Charakteristika von Fibroblasten und glatten Muskelzellen besitzen und nicht in gesundem Myokard vorhanden sind.

Myofibroblasten können migrieren und kontrahieren. Diese Fähigkeiten ergeben sich aus der Expression von *alpha-smooth muscle actin* (α-SMA) und *non-muscle myosin*⁸. Weiterhin sind Myofibroblasten durch eine hohe Proliferationsrate, die Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen, insbesondere von Kollagen, und pro-fibrotischen Faktoren wie TGF-β und Angiotensin II¹¹⁷ charakterisiert^{3,125}. Eine wichtige Rolle für das Remodeling spielt die Produktion von MMPs und *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs) durch Myofibroblasten⁸. MMPs spielen während der inflammatorischen und proliferativen Phase eine wichtige Rolle. Myofibroblasten sind entscheidend für die Ausbildung einer Narbe, jedoch führen die Eigenschaften der Myofibroblasten zu erhöhter Menge und veränderter Qualität der Extrazellulärmatrix^{8,126}. Im Infarktareal befindliche Myofibroblasten fördern über die Sekretion von pro-fibrotischen Faktoren die Transdifferenzierung und Infiltration weiterer Myofibroblasten in das Infarktgebiet¹²³. Die Rolle der Myofibroblasten in dem pro-arrhythmogenen Remodeling lässt sich in zwei Kategorien aufteilen: die Fibrose und die Myofibroblasten-Kardiomyozyten-Kopplung³.

Fibrose

Myofibroblasten produzieren eine hohe Anzahl von interstitiellen Kollagenen, insbesondere Kollagen I und III. Die Kollagendeposition ist entscheidend für eine zunehmende Zugfestigkeit und die Vorbeugung einer Wandruptur¹²⁷. Der größte Schaden nach einem Infarkt ist meist nicht der nekrotische Verlust von Kardiomyozyten, sondern das folgende Remodeling in nicht-infarzierten Gebieten der Ventrikel. Der Verlust der Kardiomyozyten wird durch eine kompakte Fibrose im Infarktareal ersetzt. Das Remodeling führt jedoch zur interstitiellen Fibrose in ungeschädigtem Herzgewebe³. Im Rahmen einer überschießenden proliferativen Phase sezernieren aktivierte Myofibroblasten im Infarktareal hohe Mengen an pro-fibrotischen Faktoren, die sich möglicherweise in weitentfernte Gebiete des Myokards verteilen und zu einer Aktivierung und Proliferation von dortigen Fibroblasten mit anschließend erhöhter Kollagenproduktion führen. Ein weiterer fördernder Faktor ist der erhöhte mechanische Stress in der nicht-infarzierten Wand, der unter anderem zur Aktivierung von TGF-β führt^{3,14}.

Myofibroblasten-Kardiomyozyten-Kopplung

Kardiomyozyten und Myofibroblasten können direkt und indirekt über parakrine Mediatoren, die Extrazellulärmatrix, elektrische Modulatoren und mechanische Verbindungen miteinander kommunizieren⁸. Die elektrische Interaktion zwischen Kardiomyozyten und Myofibroblasten geschieht über *gap junctions*, hauptsächlich Connexin43¹¹⁷. Dadurch, dass Myofibroblasten ein positiveres Ruhemembranpotential besitzen, führt die elektrische Kopplung zu elektrophysiologischen Veränderungen der Kardiomyozyten und trägt so zur Arrhythmogenese bei¹²⁸. Durch die Lateralisierung der Connexine der Kardiomyozyten ist die Wahrscheinlichkeit für die Kopplung mit Myofibroblasten erhöht¹²⁹.

Reifung

Die Reifungsphase ist durch die Apoptose der Entzündungs- und reparativen Zellen und die Reifung des Narbengewebes durch Vernetzung der Kollagenfasern gekennzeichnet³.

2.4.2.2 Elektrophysiologischen Folgen der langfristigen pro-arrhythmogenen Veränderungen

Aktionspotential

Myofibroblasten besitzen ein positiveres Membranpotential als Kardiomyozyten¹³⁰. Durch die Kopplung von Kardiomyozyten und Fibroblasten werden die Kardiomyozyten depolarisiert und das Ruhemembranpotential ins Positive verschoben¹³⁰. Die dauerhafte Depolarisierung inhibiert die Natriumkanäle in an Fibroblasten-gekoppelten Kardiomyozyten. Diese Inhibition und der reduzierte Natrium- und Calciumeinstroms führen zu einer verminderten Anstiegsrate (dV/dt) und Amplitude des Aktionspotentials⁶⁵. Durch eine signifikante Reduktion der Dichte der Kaliumkanäle bei gleichbleibender Kinetik kommt es zu einer verlangsamten Repolarisation, welche zu einer erhöhten Dauer des Aktionspotentials führt. Der zeitliche Verlauf der Repolarisation und damit der APD ist im Grenzzonenbereich sehr heterogen¹¹⁸.

Refraktärzeit

Durch Reduktion der Kaliumkanäle verlängert sich die Repolarisation und damit auch die Refraktärzeit. Da die Veränderung der Kaliumkanäle heterogen ist, kommt es zur Dispersion der Refraktärzeiten. Weiterhin besteht durch die Inaktivierung und Herunterregulierung von Natriumkanälen eine Post-Repolarisierungs-Refraktärität^{3,65}.

Erregbarkeit

Durch die verlängerte Refraktärzeit und Inhibition sowie geringere Verfügbarkeit von Natriumkanälen ist die Erregbarkeit des Gewebes im Grenzzonenbereich des Infarkts sehr heterogen und bis hin zum unidirektionalen Block vermindert^{65,112}.

Leitungsgeschwindigkeit

Die Leitungsgeschwindigkeit ist durch zwei Mechanismen prominent herabgesetzt. Zum einen sind Natrium- und Calciumkanäle inhibiert, wodurch die verminderte Anstiegsrate des Aktionspotentials zu einer verminderten Leitungsgeschwindigkeit führt⁶⁵. Zum anderen erhöht die Degradation und Umverteilung von Connexinen im Zusammenspiel mit interstitieller Fibrose den intra- und extrazellulären Widerstand¹¹⁴, wodurch die Leitungsgeschwindigkeit reduziert wird. Das Remodeling trägt so über verschiedene Mechanismen zur inhomogenen Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit bei^{115,117}.

Erregungsleitung

Nach einem Myokardinfarkt kommt es nicht nur zur Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit, sondern auch zu einer diskontinuierlichen Erregungsweiterleitung im Bereich des Infarkts und der Grenzzone. Die inhomogenen Erregungszustände der Zellen können zu funktionellen unidirektionalen Leitungsblöcken und einer diskontinuierlichen Erregungsleitung führen⁶⁵. Die beschriebene Degradation und Umverteilung der Connexine führt über die Entkopplung der Kardiomyozyten zur diskontinuierlichen Weiterleitung der Erregung^{8,115}. Durch die besonders starke Abnahme der lateralen Kopplung in der Grenzzone kommt es vor allem zu einem transversalen Leitungsblock⁶⁵. Dies geschieht ebenfalls durch fibrotische Septen zwischen den Zellen, die meist die laterale Kopplung zwischen den Kardiomyozyten unterbrechen^{3,117}. Große nicht-

erregbare fibrotische Areale können einen unidirektionalen Leitungsblock darstellen und so die Erregungsleitung umlenken³.

Anisotropie des Gewebes

Anisotropie ist die Eigenschaft der Richtungsabhängigkeit. In kardialem Gewebe ist die Leitungsgeschwindigkeit anisotrop, dabei wird ihre Orientierung durch die Ausrichtung der Kardiomyozyten bestimmt. Die maximale Geschwindigkeit wird parallel zur Ausrichtung der Kardiomyozyten (longitudinale Leitungsgeschwindigkeit) und die langsamste Geschwindigkeit senkrecht zur Ausrichtung der Kardiomyozyten (transversale Leitungsgeschwindigkeit) beobachtet. Die Zellform und -größe, Zellerregbarkeit, myokardiale Fibrose und die Verteilung der *gap junctions* beeinflussen die anisotrope Erregungsleitung¹³¹. Nach einem Myokardinfarkt wird die Gewebsanisotropie durch die Reduktion und Umverteilung der *gap junctions* und die entstehende interstitielle Fibrose erhöht⁶⁵.

2.4.2.3 Langfristige pro-arrhythmogene Veränderungen und Arrhythmogenese

Die beschriebenen langfristigen pro-arrhythmogenen elektrophysiologischen Veränderungen nach Myokardinfarkt bilden die Grundlage für die Entstehung der postischämischen Arrhythmien. Ein abnormaler Automatismus, die getriggerte Aktivität und das Reentry spielen in der Arrhythmogenese im Rahmen des postischämischen Remodelings eine bedeutende Rolle^{65,117,118}. Die allgemeinen Mechanismen der Arrhythmogenese wurden bereits beschrieben, im Folgenden werden spezifisch die postischämischen Veränderungen mit den allgemeinen Arrhythmogenese-Mechanismen verknüpft.

Abnormale Automatizität

Die heterozelluläre Kopplung zwischen Kardiomyozyten und Myofibroblasten fördert die Entstehung eines abnormalen Automatismus über die Erhöhung des Ruhemembranpotentials beziehungsweise die partielle Depolarisation der Kardiomyozyten^{117,132,133}. Spontane ektopische Aktivität wurde besonders an den lateralen Enden der Kardiomyozyten-Stränge beobachtet. Die Neigung zur ektopischen Aktivität wird höchstwahrscheinlich durch die Dichte der Myofibroblasten beeinflusst¹¹⁷. Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Schrittmacher-Strom in hypertrophierten Kardiomyozyten und somit das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen erhöht ist¹¹⁸.

Getriggerte Aktivität

Ein weiterer Mechanismus für ventrikuläre Arrhythmien im Rahmen des postischämischen Remodelings ist die getriggerte Aktivität durch frühe Nachdepolarisationen. Die verlängerte Dauer des Aktionspotentials ist als wichtiger Faktor dafür beschrieben^{65,118}. Die Störung der Calciumhomöostase mit spontanen Calciumfreisetzungen aus dem SR kann EADs auslösen. Weiterhin fördert die Kopplung zwischen Kardiomyozyten und Myofibroblasten die Entstehung von EADs. Ebenfalls wurde das positivere Membranpotential der Myofibroblasten als wichtigster Faktor identifiziert¹¹⁷. Getriggerte Aktivität durch DADs ist ein weiterer Mechanismus, der zu Arrhythmien im postischämischen Herzen führen kann. DADs entstehen vor allem in Kardiomyozyten mit verlängerter APD, erhöhten intrazellulären Calciumspiegeln und spontanen Calciumfreisetzungen aus dem SR während der Phase 4 des Aktionspotentials^{65,118}.

Die Entkopplung der Kardiomyozyten erleichtert die Entstehung getriggelter Aktivität. Die physiologische Erregungsleitung ist von einem Energieausgleich zwischen einer depolarisierten Region, *source*, und der benachbarten repolarisierten Region, *sink*, abhängig. In normal gekoppelten Kardiomyozyten minimieren die umgebenden Kardiomyozyten die Spannungsdifferenz und unterdrücken so die Weiterleitung von EADs und DADs. Eine Störung des sogenannten *source-to-sink* Effekts durch die Entkopplung der Kardiomyozyten ermöglicht die Weiterleitung von EADs oder DADs^{134,135}.

Reentry

Das funktionelle und strukturelle Remodeling auf Gewebs- und Zellebene erhöht die Neigung zur Arrhythmogenese über den Reentry Mechanismus. Die Heterogenität der Aktionspotentialdauer resultiert in einer Dispersion der Refraktärität und Erregbarkeit, was ein kritisches Substrat für die Entwicklung von kreisenden Erregungsweiterleitungen ist. Die Veränderungen der Refraktärität und Erregbarkeit in den Zellen der Grenzzone können zu einem funktionellen unidirektionalen Block führen^{65,112}. Große elektrisch inaktive Fibroseareale bilden ein anatomisches Hindernis, um das die Erregungsleitung kreisen kann^{115,117}. Die reduzierte Leitungsgeschwindigkeit der Erregung und die diskontinuierliche Erregungsweiterleitung durch die Degradation der Connexine, Veränderungen der Ionenströme, die interstitielle Fibrose und Myofibroblasten-Kardiomyozyten-Kopplung stellen weitere wichtige Faktoren für die Entstehung von Reentry-Kreisläufen dar. Ein transversaler Leitungsblock bei verminderter Seit-zu-Seit-Kopplung fördert das anisotropische Reentry⁶⁵.

2.5 Myeloperoxidase

2.5.1 Bildungsort

Die Myeloperoxidase ist eine Häm-Peroxidase, die sich hauptsächlich in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Monozyten befindet^{4,136,137}. In Makrophagen wurde MPO ebenfalls lokalisiert, diese Zellen haben jedoch die Fähigkeit verloren MPO zu synthetisieren, sodass die Aufnahme über Endozytose von Neutrophilen beziehungsweise MPO geschieht⁴. Das Enzym wird in azurophilen Granula gespeichert und nach Aktivierung der Zellen in Phagosomen oder direkt in den Extrazellulärraum sezerniert^{138,139}.

2.5.2 Struktur

MPO wird zunächst als präpro-MPO von den myeloischen Zellen synthetisiert und anschließend durch posttranslationale Modifikationen prozessiert¹⁴⁰. Das reife Enzym besteht aus zwei identischen Monomeren, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Dabei besteht jedes Monomer aus einer schweren (55-64 kDa) und einer leichten (10-15 kDa) Untereinheit. Das molekulare Gewicht der MPO liegt somit bei ca. 140 kDa⁴.

Die überwiegende Form der Sekundärstruktur ist die α -Helix. Die Monomere bestehen jeweils aus einem zentralen Kern aus fünf Helices und der Häm-Struktur. Vier dieser Helices stammen aus der großen Untereinheit, während sich die fünfte aus der kleinen Untereinheit ableitet. Der Rest der großen Untereinheit faltet sich in vier separate Domänen und eine offene Schleife, die den zentralen Kern umgeben. Die kleine

Untereinheit wickelt sich um die Oberfläche der großen Untereinheit, wobei nur die Helixstruktur bis zum inneren Kern vordringt und einen Teil dessen bildet⁴. Die Häm-Struktur besitzt ein dreiwertiges Eisen-Ion und ist ein Derivat des Protoporphyrins IX mit kovalenten Bindungen zwischen den Methylgruppen der Pyrrolringe A und C und den Proteinresiduen Glutamin242 und Asparagin94. Dies ist charakteristisch für alle Peroxidasen der Säugetiere. Spezifisch für MPO ist die Sulfoniumionen-Bindung zwischen einem Schwefelatom von Methionin243 und einem Kohlenstoffatom des Pyrrolrings A. Dieses Merkmal scheint verantwortlich für die Chlorinierungseigenschaft zu sein¹⁴¹. Aufgrund hoher Arginin und Lysin Anteile ist MPO unter physiologischen pH Bedingungen stark kationisch¹⁴².

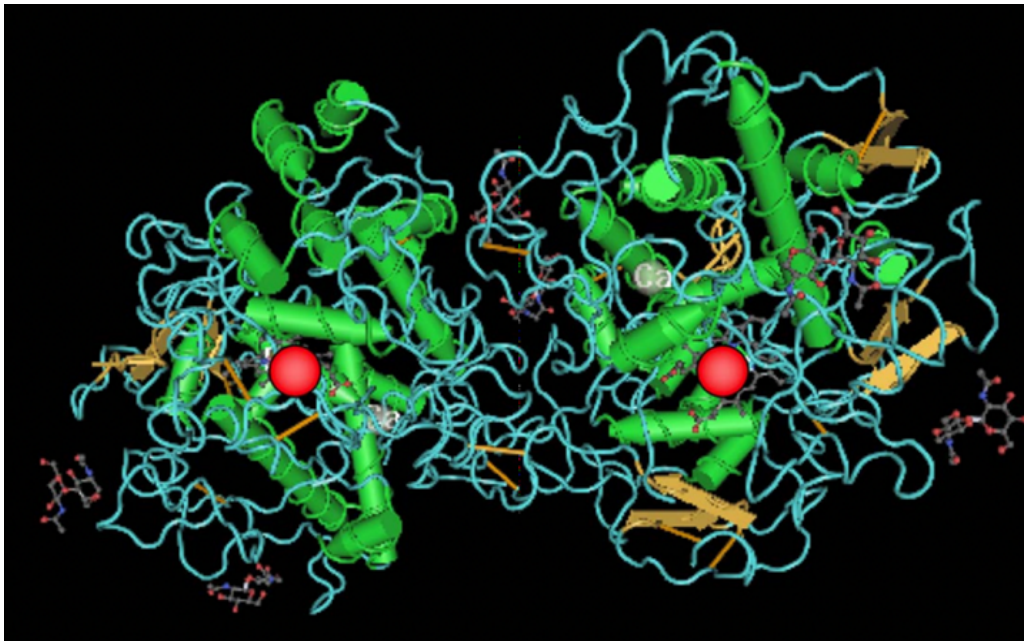


Abbildung 5 Dreidimensionale Struktur der Myeloperoxidase. Häm-Moleküle (rot), α -Helices (grün), β -Faltblatt-Strukturen (gelb)⁴.

2.5.3 Funktionen der MPO

Molekulare Wirkweise der MPO

Das sogenannte komplette MPO-System besteht aus der MPO, ihrem Hauptsubstrat H_2O_2 und oxidierbaren Kofaktoren. Dieses System kann grundsätzlich in den Halogenierungs- und Peroxidasezyklus eingeteilt werden⁴. In ihrem Grundzustand enthält MPO das dreiwertige Eisen-Ion, *Ferric MPO* (siehe Abbildung 6). Dieses wird unter Reduktion von H_2O_2 zu H_2O zu einem vierwertigen Eisenion oxidiert, wodurch das sehr reaktive *MPO-Compound I* entsteht. Dieser Komplex kann über zwei unterschiedliche Wege in den Grundzustand zurückgeführt werden.

Zum einen reagiert der *MPO-Compound I* mit oxidierbaren Molekülen wie Halogeniden (Chlor, Brom) oder Pseudohalogeniden (Thiocyanat) und führt so zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies⁴ (Halogenierungszyklus, siehe Abbildung 6). Beispielsweise wird Chlor aufgrund der hohen Verfügbarkeit in physiologischen Flüssigkeiten zu hypochloriger Säure (HOCl) oxidiert. Dabei gibt der *MPO-Compound I* in einem Schritt zwei Elektronen ab und besitzt anschließend ein zweiwertiges Eisenion¹⁴³. HOCl ist ein starkes Oxidans und besitzt eine starke mikrobizide Wirkung. Aus HOCl können weitere reaktive Oxidantien hervorgehen, wie zum Beispiel molekulares

Chlor¹⁴⁴. HOCl kann Tyrosinreste in zum Beispiel Signalproteinen, Lipiden und Glykoproteinen chlorinieren¹³⁴.

Neben der Oxidation von Halogeniden kann das *MPO-Compound I* über zwei sukzessive Elektronenübertragungen in den Grundzustand der MPO zurückgeführt werden (Peroxidasezyklus, siehe Abbildung 6). Das *MPO-Compound I* kann verschiedene organische und anorganische Substrate, wie zum Beispiel aromatische Aminosäuren und Indol-Derivate, oxidieren, wodurch das *MPO-Compound II* entsteht, welches nicht mit Halogeniden reagieren kann. Die Reduktion des *Compound II* in den MPO-Grundstatus ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Peroxidasezyklus und kann durch Superoxid-Anionen und Ascorbinsäure, die in Neutrophilen in großer Quantität vorhanden ist, beschleunigt werden⁴. Durch die Oxidation der genannten Substrate entstehen radikale Zwischenprodukte, die mit Stickstoffmonoxid reagieren und zur Entstehung von reaktivem Stickstoffdioxid führen können¹⁴⁵. Das entstandene Stickstoffdioxid ist hochreaktiv und führt zur Nitrierung von Tyrosinresten¹⁴⁶.

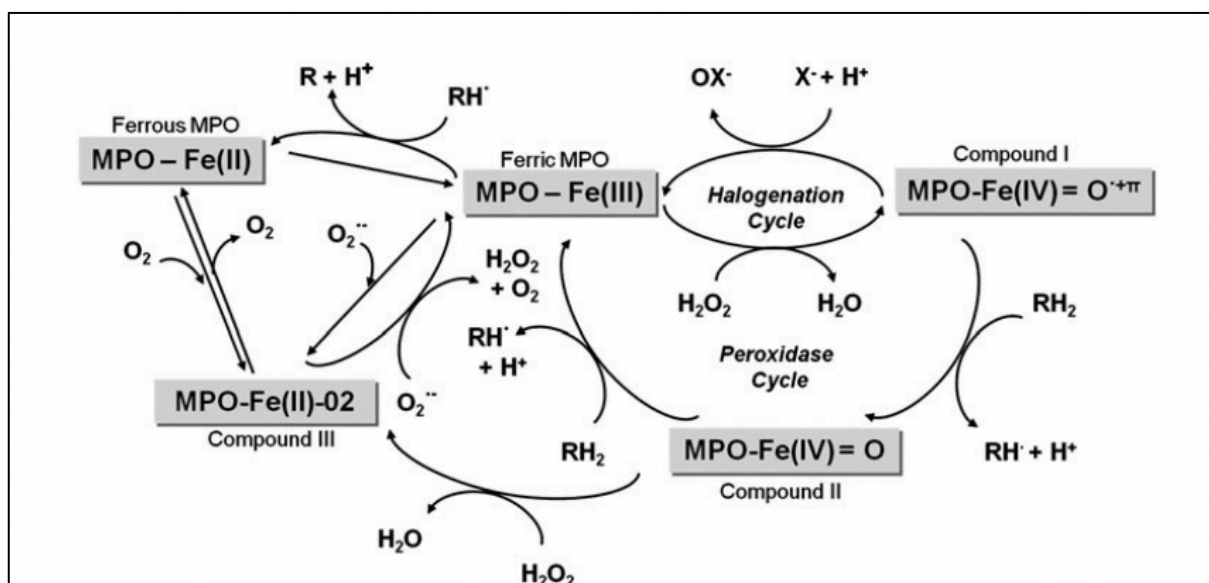


Abbildung 6 Schematische Übersicht der katalytischen Aktivität der MPO. Ferric MPO reagiert mit H_2O_2 und bildet so den Compound I, welcher über zwei Wege zurück zum Ferric MPO reduziert werden kann. Entweder über den Halogenierungszyklus (Halogenation Cycle) mit einer einzelnen Übertragung von zwei Elektronen, wobei HOCl generiert wird, oder über den Peroxidasezyklus (Peroxidase Cycle) mit zwei getrennten Übertragungen von jeweils einem Elektron über die Formation des Compound II. Außerhalb der katalytischen Zyklen gibt es zwei weitere Redoxstatus der MPO, die ferrous MPO und Compound III. H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; O_2^- , Superoxidationion; O_2 , Dioxygen; OX^- , Hypo(pseudo-)halogenige Säure (zum Beispiel hypochlorige Säure); RH^\bullet , Substratradikal; RH_2 , oxidierbares Substrat; X^- , (Pseudo-)Halogenide (zum Beispiel Chlorid)¹⁴⁷.

MPO wird hauptsächlich in den Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert und bei deren Aktivierung in den Extrazellulärraum oder die Phagosomen sezerniert, um dort gegen phagozytierte Pathogene zu wirken. Obwohl die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies eine wirksame mikrobizide Strategie der Immunzellen darstellt, wurde kürzlich angezweifelt, dass das MPO-System für die erfolgreiche Pathogenabwehr absolut erforderlich sei¹⁴². Eine MPO-Defizienz beim Menschen führt lediglich zu milder, erhöhter Infektanfälligkeit zusammen mit weiteren Erkrankungen wie Diabetes mellitus^{148,149}.

Forschungsarbeiten aus den letzten Jahren zeigen, dass MPO eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und Regulation inflammatorischer Vorgänge unabhängig von ihrer Bedeutung im Rahmen der angeborenen Immunantwort spielt⁴. Viele Erkrankungen

mit inflammatorischer Reaktion gehen mit einer Erhöhung des MPO-Plasmaspiegels einher¹⁵⁰, dabei konnten direkte und indirekte Verknüpfungen zur enzymatischen Aktivität von MPO beobachtet werden. Kürzlich wurden entdeckt, dass MPO weiterhin immunmodulatorische Funktionen unabhängig der enzymatischen Aktivität besitzt¹⁴⁷.

MPO-bedingte posttranslationale Funktionen

Über Chlorinierungen von Tyrosinresten kann MPO Proteine posttranslational modifizieren, wodurch ihre physiologische Funktion beeinflusst wird⁴. Dies führt zur Beeinträchtigung der myokardialen Funktion durch Veränderung von Signalkaskaden, Proteinexpression, Apoptose, Zellwachstum und von weiteren wichtigen Zellfunktionen¹³⁴. Eine der am ausführlichsten untersuchten Reaktionen ist die Stickstoffdioxid vermittelte Oxidation von Tyrosin, eine posttranslationale Modifikation, die nicht nur ein Marker für oxidativen Stress darstellt, sondern in der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt⁴. Die MPO-abhängige Nitrierung von Proteinen¹⁵¹ fördert zum Beispiel Apoptose von Kardiomyozyten. Eine weitere Konsequenz der Stickstoffmonoxid (NO)-Oxidierung ist die Beeinträchtigung der Endothelfunktion¹³⁴. Im Mittelpunkt eines der wichtigsten Signalkaskaden in der Gefäßwand steht vasodilatativ wirkendes NO, welches von den Endothelzellen synthetisiert wird und anschließend den subendothelialen Bereich passiert, wo es glatte Muskelzellen funktionell verändert. Durch den erhöhten NO-Verbrauch durch MPO kommt es zur Veränderung des Gefäßtonus¹⁵².

Chlorinierung, Nitrierung und andere MPO-induzierte oxidative Modifikationen des Gewebes stören die physiologische Funktion der myokardialen Komponenten und des Endothels. Neben der Fähigkeit von MPO reaktive Spezies zu generieren, kann es durch die starke kationische Ladung an Proteine binden und diese so direkt beeinflussen¹³⁴. Unabhängig ihrer katalytischen Funktion fördert MPO die Adhäsion von Leukozyten an Migration durch die Endothelzellschicht und unterstützt so die Rekrutierung der Leukozyten in entzündetes Gewebe. Die positive Ladung der MPO schafft einen Ladungsausgleich zwischen der negativ geladenen Glykokalix der Endothelzellen und der Granulozyten¹⁵³. Das leukozytäre β -Integrin bindet an endotheliales Immunglobulin ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-1/2. Diese Bindung ist Voraussetzung für die spätere Durchwanderung der Leukozyten¹⁵⁴. Dabei spielt insbesondere das CD11b/CD18 β -Integrin eine wichtige Rolle in Bezug auf die kardiale Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und damit die Akkumulation von MPO im Gewebe¹⁵⁵. Weiterhin kann MPO über Bindung an das CD11b/CD18 β -Integrin Granulozyten direkt aktivieren¹⁵¹. Dies resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung zellulärer Proteine, der Aktivierung von intrazellulären Proteintyrosin-Kinasen und der verstärkten Degranulation der Granulozyten. Weiterhin kommt es zur erhöhten Expression der CD11b-Integrine auf der Zelloberfläche und somit zur vermehrten Rekrutierung in das Gewebe^{4,156,157}. Weiterhin steigert Hypothiocyanit (HOSCN), ein Hauptprodukt der MPO, die Ausbildung endothelialer Adhäsionsmoleküle (zum Beispiel ICAM) und unterstützt so die Rekrutierung von Leukozyten¹⁵⁸.

Produkte der MPO reagieren mit Stickstoffmonoxid und vermindern so die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid. Das verminderte Vorhandensein dieses Inhibitors der Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen trägt ebenfalls zur vermehrten Rekrutierung von Leukozyten durch die MPO bei¹⁵⁹. Aktive und inaktive MPO aktiviert murine Makrophagen und stimuliert die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-8^{160,161}. Übereinstimmend wurden im Mausmodell erhöhte TNF- α Spiegel nach intravenöser MPO- Injektion gemessen¹⁶².

Im folgenden Abschnitt wird die Funktion von MPO im Rahmen der postischämischen Arrhythmogenese beschrieben.

2.6 Myeloperoxidase und postischämische Arrhythmogenese

Im Rahmen von Untersuchungen des kardialen postischämischen proarrhythmogenen Remodelings wurde MPO als wichtiger Mediator entschlüsselt. Nach einem Infarkt sind die MPO-Spiegel im Infarktareal durch die erwähnte Infiltration von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, erhöht. Neutrophile Granulozyten infiltrieren schnell in das ischämische Myokard. Bereits 60 Minuten nach Verschluss der Arterie kommt es zur signifikant erhöhten Zunahme der Zellen und von MPO in dem geschädigten Areal¹⁹. Eine erhöhte Anzahl an inflammatorischen Zellen und MPO-Konzentration im Infarktgewebe konnte für mindestens 14 Tage beobachtet werden¹⁶³. So wirkt MPO auf akute und langfristige postischämische Veränderungen. Die spezifische Rolle der MPO in der Entstehung postischämischer Arrhythmien ist Gegenstand aktueller Forschung. Im Folgenden werden die bereits beschriebenen Beobachtungen bezüglich der akuten und langfristigen Veränderungen nach einem Myokardinfarkt zusammengefasst.

2.6.1 MPO und akute postischämische Veränderungen

Calciumhomöostase

Der Einfluss der MPO auf die Calciumhomöostase in Kardiomyozyten ist bisher wenig untersucht worden. Es ist beschrieben, dass von der MPO generierte ROS SERCA in Endothelzellen inhibiert und so die Calciumhomöostase in diesen Zellen stören kann¹⁶⁴. Fukui et al. beobachteten in murinen ventrikulären Kardiomyozyten eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration nach Behandlung mit HOCl¹⁶⁵. Hammerschmidt et al. untersuchten den Effekt von HOCl auf den Calciumeinstrom durch den L-Typ VOCC in murinen ventrikulären Kardiomyozyten und detektierten eine Verminderung des *Peaks* führte. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch unklar¹⁶⁶. Die Wirkung von MPO auf andere Regulatoren der kardialen Calciumhomöostase wie den RyR, das PLN, den NCX und die CaMKII wurde bisher nicht untersucht.

2.6.2 MPO und langfristiges postischämische Arrhythmogenese

Postischämische linksventrikuläre Funktion und Ventrikelgröße

In Untersuchungen am Mausmodell stellten Askari et al. bei MPO-defizienten Tieren postischämisch eine verminderte Leukozyteninfiltration in das Myokard, eine besser erhaltene linksventrikuläre Funktion und eine reduzierte Dilatation des Ventrikels im Vergleich zu Wildtypen fest¹⁶⁷. Übereinstimmend machten Vasilyev et al. die Beobachtung, dass MPO im Mausmodell die Infarktgröße kaum beeinträchtigte, jedoch die linksventrikuläre Funktion und das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt negativ beeinflusste¹⁶⁸. Ali et al. untersuchten die Effekte eines MPO-Inhibitors nach Myokardinfarkt in Mäusen und konnten einen positiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion, das enddiastolische Volumen und die linksventrikuläre Hypertrophie erkennen¹⁶³. Diese Ergebnisse stärken die Hypothese bezüglich des Zusammenhangs zwischen MPO und dem postischämischen kardialen Remodeling. Im Mausmodell konnten Rudolph et al. und Mollenhauer et al. pro-arrhythmogene Effekte von MPO auf das atriale und ventrikuläre Myokard beobachten^{5,169}.

Vorhofflimmern

In Mäuseherzen korrelierte die erhöhte MPO-Ablagerung im Vorhof mit einer erhöhten Anzahl an Vorhofflimmern-Episoden¹³⁴. Rudolph et al. zeigten im Mausmodell, dass MPO als pro-fibrotischer Mediator für Vorhofflimmern agiert. MPO-defiziente Mäuse wiesen eine geringere Empfindlichkeit für Vorhofflimmern nach zweiwöchiger Angiotensin-II-Behandlung zur Leukozytenaktivierung als Wildtyp (WT)-Mäuse auf. Weiterhin zeigten MPO-defiziente Mäuse keine Verlangsamung und Inhomogenität der Erregungsleitung, geringere kardiale Fibrose und MMP-Aktivität im Gegensatz zu WT-Mäusen. Analog wurden bei Menschen mit Vorhofflimmern höhere MPO- Plasma- und Gewebekonzentrationen gemessen als bei Menschen ohne Vorhofflimmern¹⁶⁹. Mollenhauer et al. untersuchten die Rolle der MPO in der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien nach Ischämie in WT- und MPO-defizienten Mäusen⁵. Dafür wurde der R. interventricularis anterior für 30 Minuten ligiert und anschließend für sieben Tage (Ischämie/Reperfusion = I/R) reperfundiert oder einer permanenten ligiert (permanente Ischämie (PI)). Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst.

Leukozyten-Infiltration

WT-Mäuse zeigten erhöhte MPO-Plasmalevel nach I/R und PI im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen. Die MPO Akkumulation post Infarkt war dabei von der Migration neutrophiler Granulozyten in das Infarktareal abhängig⁵. WT-Mäuse wiesen eine vermehrte Infiltration von Neutrophilen im Vergleich zu MPO-defizienten Mäusen in das infarzierte Herz auf⁵. Dies liegt an der Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen durch MPO^{153,157} und der Aktivierung von Makrophagen durch MPO mit erhöhter Zytokinproduktion¹⁶². Übereinstimmend beschreiben Ali et al. eine verminderte Rekrutierung von pro-inflammatorischen Zellen bei Behandlung mit einem MPO-Inhibitor nach Myokardinfarkt in Mäusen¹⁶³.

Ventrikuläre Tachykardien

Um den Einfluss der MPO auf die Empfindlichkeit des Ventrikels auf VT nach kardialer Ischämie zu untersuchen, wurden elektrokardiographische Aufnahmen an Tag 7 nach I/R beziehungsweise Tag 21 nach PI aufgenommen. Diese zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit für die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien nach Stimulation durch vermehrte und verlängerte VT-Episoden in WT- im Vergleich zu MPO-defizienten Mäusen. MPO-defiziente Mäuse wiesen weiterhin eine verminderte spontane Entwicklung von ventrikulären Tachykardien im Vergleich zu WT-Mäusen nach I/R und PI⁵.

Erregungsleitung

Epikardiale Messungen der elektrischen Aktivität an spontan schlagenden und stimulierten Herzen nach Ischämie zeigten eine geringere Verlangsamung und Heterogenität der elektrischen Erregungsleitung in der Perinfarktzone von MPO-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT⁵. Die Messungen wurden an anästhesierten Mäusen in Rückenlage nach Thorakotomie mit Hilfe eines 32-Mikroelektroden Arrays durchgeführt.

Fibroblasten-zu-Myofibroblasten-Transdifferenzierung

Im Vergleich zu WT-Mäusen befanden sich weniger Myofibroblasten in der Infarkt- und Perinfarktregion der Herzen von MPO-defizienten Mäusen sieben Tage nach I/R und fünf Tage nach PI. In vitro transdifferenzierten isolierte, primäre Fibroblasten in Myofibroblasten nach MPO Behandlung. Die Effizienz der Transdifferenzierung war

ebenso stark wie mit der Positivkontrolle *platelet-derived growth factor*. Weiterhin führte die Behandlung mit MPO zur erhöhten Produktion und Deposition von Kollagen Typ I im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten.

In einer Kokultivierung isolierter Fibroblasten mit isolierten WT-Leukozyten induzierte eine erhöhte Transdifferenzierungsrate der Fibroblasten verglichen mit Fibroblasten, die mit Leukozyten aus MPO-defizienten Mäusen kultiviert wurden. Mechanistisch phosphorylierte MPO die p38 MAPK in isolierten Fibroblasten, welche ein Induktor der Transdifferenzierung ist⁵.

Fibrose

MPO-defiziente Mäuse zeigten eine geringere Fibrosebildung und Kollagendeposition im linken Ventrikel im Vergleich zu WT-Mäusen sieben Tage nach I/R und 21 Tage nach PI. Die erhöhte Kollagendeposition in WT-Mäusen lässt sich auf eine erhöhte Anzahl von Myofibroblasten zurückführen⁵. Weiterhin spielen MMPs und TIMPs eine wichtige Rolle in der Entstehung der Fibrose. MPO-generierte ROS aktivieren MMPs und inaktivieren TIMPs. Insbesondere HOCl aktiviert MMPs auf transkriptionaler (über die MAPK) und posttranslationaler Ebene (über Oxidation) und inaktiviert TIMPs auf posttranslationaler Ebene (über Oxidation). Eine Aktivierung von MMPs geht mit erhöhter Fibrosebildung einher. MPO trägt so über die Aktivierung der Kollagenproduktion und der MMPs mit folgend erhöhtem Umsatz der Extrazellulärmatrix zur Entstehung der Fibrose bei^{134,170,171}.

Connexin43

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Connexin43 nicht in der Infarktzone bei WT- und MPO-defizienten Mäusen vorhanden ist. In der Periinfarktzone der WT-Mäuse kam es zu einer Reduktion von Connexin43 nach I/R im Gegensatz zu MPO-defizienten Mäusen. In beiden Modellen, I/R und PI, waren die mRNA-Level von Connexin43 in WT- und MPO-defizienten Mäusen ähnlich, was auf eine posttranslationale Regulation durch MPO Aktivität hinweist. Weiterhin war MMP-7 in der Grenzzone der WT-Mäuse wesentlich aktiver im Vergleich zu MPO-defizienten Mäusen nach I/R⁵. MMP-7 kann Connexin43 abbauen¹⁰³. Fu et al. identifizierten, dass pro-MMP-7 durch MPO generiertes HOCl in aktives MMP-7 umgewandelt wird¹⁷². Mollenhauer et al. konnte in isolierten WT-Kardiomyozyten nach MPO-Inkubation eine Degradation von Connexin43 feststellen. Dieser Effekt war durch einen MMP7-Inhibitor partiell reversibel. Mithilfe von *induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes* (iPSCM) und HL-1 Kardiomyozyten konnte ein Zusammenhang zwischen der MPO-abhängigen Aktivierung der MMP-7 und Degradation von Connexin43 gezeigt werden⁵.

MPO-Plasmalevel

Äquivalent zu den aus Tiermodellen und Zellkultur gewonnenen Erkenntnissen korrelierten MPO-Plasmalevel bei Menschen mit der Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien, plötzlichem Herztod und/oder mit Implantierbarem Kardioverter-Defibrillator⁵. Nach Rekanalisation eines Gefäßes im Rahmen eines Myokardinfarktes konnten erhöhte MPO-Plasmaspiegel gemessen und ein erhöhter Verbrauch von Stickstoffmonoxid bei Applikation von H₂O₂ auf die entsprechenden Plasmaproben beobachtet werden¹⁷³.

2.7 Fragestellung

Im Mausmodell konnte MPO als Mediator der postischämischen Arrhythmogenese entschlüsselt werden⁵. Mehrere zentrale Mechanismen, die den pro-arrhythmogenen Effekt der MPO bedingen, sind unzureichend verstanden und erfordern weitere Analysen, um die Mechanismen zu entschlüsseln.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der weiteren Aufklärung dieser Mechanismen in der Zellkultur. Dabei sollen im ersten Teil der Arbeit Effekte der MPO auf Kardiomyozyten und Fibroblasten diskriminiert und gezielt subzelluläre Mechanismen und arrhythmogene Signalkaskaden entschlüsselt werden.

Die Zielsetzung des zweiten Teils der Arbeit ist die Erstellung eines repräsentativen Modells einer Kokultur aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array, um in Zukunft die funktionelle Konsequenz der in Teil 1 gezeigten Effekte der MPO auf das elektrische Konduktionsprofil der Kokultur untersuchen zu können.

Folgende Fragestellungen ergeben sich daraus:

Teil 1

1. Effekt der MPO auf Kardiomyozyten
 - a) Zeigt MPO einen Effekt auf die Calciumhomöostase und die Anzahl an arrhythmischen Ereignissen in primären murinen Kardiomyozyten?
 - b) Zeigt MPO einen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität wichtiger Regulatoren der Calciumhomöostase (CaMKII, RyR und PLN) in HL-1 und iPS- Kardiomyozyten?
2. Effekt der MPO auf Fibroblasten
 - a) Induziert MPO die Transdifferenzierung von 3T3-Fibroblasten zu Myofibroblasten über die Aktivierung der p38 MAPK?
 - b) Zeigt MPO einen Effekt auf die Kollagenproduktion und -deposition in 3T3-Fibroblasten?

Teil 2

3. Modell einer Kokultur aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array
 - a) Etablierung der Kokultur auf dem Mikroelektroden Array
 - b) Unterscheidet sich das elektrische Konduktionsprofil der Kokultur von dem der reinen Kardiomyozytenkultur?

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Alle Materialien und Geräte wurden mit 70% Ethanol desinfiziert oder autoklaviert, bevor sie zum Einsatz kamen. In Ruhezeiten erfolgte die Bestrahlung der Sicherheitswerkbank mit UV-Licht. Die Morphologie, das Wachstum der Zellen und Hinweise auf eine bakterielle Kontamination wurden täglich lichtmikroskopisch untersucht. Die Zellzählung und Messung der Zellvitalität erfolgte mithilfe eines automatischen Zellzählers nach Angaben des Herstellers (*TC20 Automated Cell Counter, BioRad*).

3.1.1 HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten

Die Kultivierung der HL-1 Zellen wurde nach dem Protokoll von Claycomb et al. und den Herstellerangaben durchgeführt^{174,175}. Die Kultivierung der 3T3 Zellen wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt¹⁷⁶.

Splitten und Aussäen

Zellen wurden in T75 *Flasks* kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz nach ca. drei Tagen wurden die Zellen auf neue *Flasks* aufgeteilt. Dafür erfolgte zunächst ein zweimaliges Waschen mit 3 ml erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, *ThermoFisher #10010023*) pro T75 *Flask*. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 3 ml 0,05% Trypsin und 0,5 mM EDTA in HBSS (*Sigma Aldrich #SM-2002*) für eine Minute im Inkubator inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde lichtmikroskopisch beurteilt und gegebenenfalls durch dosiertes Klopfen der *Flasks* gegen die Bank unterstützt. Durch Zugabe von 10 ml supplementiertem Medium (siehe Tabelle 1) wurde das Trypsin inaktiviert. Der Inhalt des *Flasks* wurde in ein 50 ml *Falcon* überführt und für fünf Minuten bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in neuem aufgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in vorbereitete *Flasks* oder Kulturplatten mit 12 ml beziehungsweise 2 ml Medium hinzugegeben. Die *Flasks* und Kulturplatten für HL-1 Zellen wurden zuvor mit einer Gelatin/Fibronectin-Lösung beschichtet (siehe unten).

HL-1 Kardiomyozyten

T75 *Flask*: 3-4 Mio Zellen in 15 ml

6-Well-Platte: 1 Mio Zellen pro Well in 3 ml

Chamber slide: 200.000 Zellen in 1 ml

3T3 Fibroblasten

T75 *Flask*: 2-3 Mio Zellen in 15 ml

6-Well-Platte: 1 Mio Zellen pro Well in 3 ml

Chamber slide: 200.000 Zellen in 1 ml

Mediumwechsel

HL-1 Kardiomyozyten

Der Mediumwechsel mit 15 ml supplementiertem Claycomb-Medium (siehe Tabelle 1) pro T75 *Flask* erfolgte unter der Woche täglich. An Wochenenden erfolgte er an einem der beiden Tage.

3T3 Fibroblasten

Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage mit 15 ml supplementiertem DMEM (siehe Tabelle 1) pro T75 *Flask*. An Wochenenden wurde kein Mediumwechsel durchgeführt.

Gelatin/Fibronectin Coating

Zur Unterstützung der Adhäsion der HL-1 Kardiomyozyten wurden die *Flasks* mit einer Gelatin/Fibronectin Lösung (siehe Tabelle 1) für mindestens eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Kurz vor Zugabe der Zellen wurde die Lösung abgesaugt und aufgewärmtes Medium hinzugegeben.

Auftauen

In Vorbereitung für das Auftauen der Zellen (HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten) wurden 10 ml Medium in einem 50 ml *Falcon* erwärmt. Anschließend wurde das *Vial* mit den gefrorenen Zellen für zwei Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, die aufgetaute Zellsuspension zu dem vorbereiteten Medium hinzugegeben und für fünf Minuten bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 5 ml neuem Medium resuspendiert und zu 10 ml Medium einer vorbereiteten (ggf. mit Gelatin/Fibronectin-gecoateten) T75 *Flask* hinzugegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach vier Stunden.

Einfrieren

Die ersten Schritte des Einfrierens entsprachen denen des Splittens. Vor der Zentrifugation wurden die Zellen mit Hilfe des Zellzählers nach Instruktionen des Herstellers (*TC20 Automated Cell Counter, BioRad*) gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert bei einer Konzentration von 3 Millionen Zellen in 1,5 ml. Diese wurden in *Vials* überführt, die in einer Einfrierhilfe mit einer Temperatursenkung von 1°C/min zunächst bei -80°C über Nacht und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Material

Tabelle 1 Material Zellkultur HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten

Material	Hersteller
HL-1 Kardiomyozyten	<i>Sigma Aldrich #SCC065</i>
NIH 3T3 Fibroblasten	<i>Sigma Aldrich #93061524</i>
3T3 Medium	
500ml DMEM+GlutaMAX	<i>Gibco #10566016</i>
50ml <i>Fetal calf serum</i> (FCS)	
5 ml Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	<i>Gibco #15140122</i>

HL-1 Medium	
43,5 ml Claycomb	<i>Sigma Aldrich #51800C</i>
5ml <i>Fetal bovine serum</i> (FBS)	
500µl Norepinephrin 10mM	<i>Sigma Aldrich #A0937</i>
500µl L-Glutamin 200mM	<i>Sigma Aldrich #G7513</i>
500µl Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	<i>Gibco #15140122</i>
Gelatin-Fibronectin Coating	
200ml 0,02% Gelatin	
1mg Fibronectin	<i>Sigma Aldrich #F1141</i>
HL-1 Einfriermedium	
95% FCS	
5% Dimethylsulfoxid	<i>Sigma Aldrich #276855</i>
3T3-Einfriermedium	
70% Basalmedium	
20% FBS	
10% Dimethylsulfoxid	<i>Sigma Aldrich #276855</i>

3.1.2 Induzierte pluripotente Stammzell-Kardiomyozyten

Die Differenzierung und Bereitstellung der *human umbilical vein endothelial cells derived induced pluripotent stem cells* (HUVEC iPSC) erfolgte in Kooperation mit AG Kurian. Die folgende Beschreibung der Methode ist entsprechend aus dem etablierten Protokoll der AG Kurian entnommen.

Splitten und Aussäen

Humane pluripotente Stammzellen wurden auf *Matrigel* beschichteten *6-Well* Platten in jeweils 2 ml FTDA Medium kultiviert. Um die Zellen als Monolayer zu erhalten, wurden subkonfluente Kulturen mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase (*Merck #SCR005*) für 10-15 Minuten bei 37°C behandelt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe eines äquivalenten Volumens DMEM-F12 Medium ohne Wachstumsfaktoren gestoppt. Die Zellen wurden gezählt und die gewünschte Anzahl an Zellen für zwei Minuten bei 200xg zentrifugiert. Nach der Resuspension in vollem FTDA Medium mit 10 µM Y27632, wurden die Zellen auf neue Platten übertragen. Pro *Well* wurden 350.000-400.000 beziehungsweise 250.000-300.000 iPSC ausgesät, um nach drei beziehungsweise vier Tagen nach Aussaat die Konfluenz zu erreichen.

Mediumwechsel

Das Medium wurde täglich gewechselt, dabei wurde das Volumen des Mediums an die steigende Zellzahl angepasst, zum Beispiel 2 ml FTDA Medium für das Aussäen, 2,5 ml an Tag 1, 3 ml an Tag 2 und 3,5 ml an Tag 3.

Kardiale Differenzierung

Die Bildung von schlagenden Kardiomyozyten wurde unter definierten Bedingungen in einem zweiseitigen Protokoll erreicht. Humane pluripotente Stammzellen wurden als Monolayer kultiviert und bei Konfluenz geerntet. Nach dem Ablösen der Zellen mit Accutase wurden 500.000 Zellen pro *Well* einer mit *Matrigel* beschichteten *24-Well*-

Platte in 1,8 ml mit Wachstumsfaktoren supplementiertem ITS Medium (siehe Tabelle 2) ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung sicherzustellen, wurden die Platten kreuzförmig bewegt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie in den Inkubator transferiert wurden. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit 1,5 ml TS Medium (siehe Tabelle 2) ausgetauscht. Während der Stunden 40-48 der Differenzierung wurde das TS Medium mit 2 µM IWP-2 (*Santa Cruz #sc-252928*) für weitere 48 Stunden ergänzt. Nach der Behandlung mit IWP-2 wurden die Zellen in TS Medium kultiviert, bis Kontraktionen ab Tag 7-8 der Differenzierung beobachtet werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium zu 2% FCS (siehe Tabelle 2) gewechselt. An Tag 10-14 der Differenzierung wurden nicht-kontrahierende Bereiche manuell entfernt und kontrahierende Monolayers für 25 Minuten bei 37°C mit 10x TrypLE (*ThermoFisher # A12177-01*) und 10 µM Y27632 abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Hinzugabe von dreifachem Knockout-DMEM (siehe Tabelle 2) Volumen gestoppt und eine Einzelzellsuspension wurde durch vorsichtiges Pipettieren mit 10 ml Zellkulturpipetten erhalten. Die Zellsuspensionen wurden in 1-2 Volumina Knockout-DMEM verdünnt, um die Enzymkonzentration zu verringern. Nach kurzer Zentrifugation für zwei Minuten bei 200xg wurden die Zellen in 2% FCS Medium mit 10µM Y27362 resuspendiert. 300.000 – 400.000 Zellen wurden pro *Well* einer mit Gelatin beschichteten *24-Well*-Platte ausgesät.

Matrigel Coating

Matrigel wurde in einem Verhältnis von 1:3 in eiskaltem Knockout-DMEM verdünnt und anschließend in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren. Für das Coating wurden die Aliquots in 24 ml eiskaltem Knockout-DMEM unter kontinuierlichem Pipettieren aufgetaut (finale Verdünnung 1:75). Auf eine vorgekühlte *24-Well*-Platte wurden 75 µl des verdünnten Matrigels mit 225 µl eiskaltem Knockout-DMEM weiter verdünnt. Die Kulturplatten wurden dann bei Raumtemperatur über Nacht und bei 4°C für weitere 24 Stunden vor Benutzung inkubiert. Die maximale Aufbewahrungsdauer bei 4°C betrug vier Wochen.

Material

Tabelle 2 Material Zellkultur induzierte pluripotente Stammzell-Kardiomyozyten

Material	Hersteller
ITS Medium	
Knockout DMEM	<i>Life Technologies #10829-018</i>
1x Penicillin/Streptomycin/Glutamin	<i>Life Technologies #10378-016</i>
1x ITS Zusatz	<i>Corning #354350</i>
10 µM Y-27632	<i>Tocris #1254</i>
25 ng/ml FGF2	<i>Peprtech #100-18B</i>
1-2 ng/ml BMP4	<i>R&D 314-BP-010</i>
1-2 µM CHIR99021	<i>Axon #1386</i>
TS Medium	
Knockout DMEM	<i>Life Technologies #10829-018</i>
1x Penicillin/Streptomycin/Glutamin	<i>Life Technologies #10378-016</i>
1x TS Zusatz	
250 µM 2-Phospho-L-Ascorbic Acid	<i>Sigma Aldrich #49752</i>
TS Zusatz (100x)	

5,5 µg/ml Transferrin	<i>Sigma Aldrich #T8158</i>
6,7 ng/ml Sodium Selenite	<i>Sigma Aldrich #S5261</i>
in 100 ml sterilem PBS gelöst	<i>Millipore #BSS-1006-B</i>
2% FSC Medium	
Knockout DMEM	<i>Life Technologies #10829-018</i>
1x Penicillin/Streptomycin/Glutamin	<i>Life Technologies #10378-016</i>
2% FCS	<i>Biowest #S1810-500</i>

3.1.3 Isolation muriner Kardiomyozyten

Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte freundlicherweise durch Dr. Mollenhauer. Die folgende Beschreibung der Methode wurde entsprechend dem Protokoll von Mollenhauer et al.⁸⁶ und Vettel et al.¹⁷⁷ entnommen.

Ventrikuläre Myozyten wurden aus 8 - 12 Wochen alten männlichen FVB/N Mäusen isoliert. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentothal (150mg/kg) anästhesiert, anschließend wurde das Herz rasch entnommen und in kalte calciumfreie Tyrodelösung gegeben. Die ascendierende Aorta wurde kanüliert und das Herz mit oxygenierter calciumfreier Tyrodelösung bei 37°C für vier Minuten perfundiert. Für die enzymatische Dissoziation wurde das Herz mit calciumfreier Tyrodelösung, supplementiert mit *Liberase (Thermolysin Medium) Research Grade (Roche Diagnostics, #5401127001)*, für zehn Minuten bei 37°C perfundiert. Anschließend wurde das Herz in Tyrodelösung, supplementiert mit 0,2 mmol/l Calciumchlorid und 5 mg/ml Bovinem Serumalbumin (BSA) geführt.

Die Ventrikel wurden vom Vorhof getrennt, in kleine Stücke geschnitten und mithilfe einer Pipette kleingerieben, um die Myozyten zu verteilen. Ventrikuläre Myozyten wurden mithilfe einer Gaze gefiltert. Anschließend sedimentierten die Zellen über einen Zeitraum von zehn Minuten. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in Tyrodelösung supplementiert mit 0,5 mmol/l Calciumchlorid und 5mg/ml BSA resuspendiert. Dieser Prozess wurde einmalig wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in Tyrodelösung supplementiert mit 1mmol/l Calciumchlorid resuspendiert. Frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten wurden auf eine mit Laminin (10 µg/ml) beschichtete 35 mm Kulturplatte ausgesät und bei 37°C bis zur Benutzung aufbewahrt.

Material

Tyrodelösung (in mmol/l)

5,4 KCl; 121,6 NaCl; 5 Na-pyruvate; 4,013 NaHCO₃; 0,8 NaH₂PO₄; 1,0 CaCl₂; 1,8 MgCl₂; in Glucose 5 HEPES gelöst; pH 7.4 with NaOH

3.2 IonOptix

Die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration wurden freundlicherweise von Dr. Mollenhauer durchgeführt. Die im Folgenden beschriebene Durchführung wurde dem Protokoll in ⁸⁶ entnommen.

Mit dem IonOptix-System lassen sich Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in einzelnen Kardiomyozyten untersuchen. Dafür wird mittels eines digital aufgenommenen Livebildes der Calciumgehalt detektiert und quantifiziert. Die zytosolische Calciumkonzentration wurde mithilfe des ratiometrischen fluoreszierenden Calciumindikators Fura-2 dargestellt. Fura-2 ist einer der bekanntesten Calciumindikatoren, der freies intrazelluläres Calcium binden kann. Fura-2 besitzt zwei Anregungspeaks bei 340 nm und 380 nm und einen Emissionspeak bei 512 nm. Das Verhältnis der Emissionen durch Anregung mit 340 nm und 380 nm, die Fura-2-Ratio, verändert sich in Abhängigkeit von der Calciumbindung und zeigt so Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration an¹⁷⁸.

3.2.1 Inkubation der Zellen mit Fura-2 und MPO

Alle Experimente wurden bei 37°C innerhalb von sechs Stunden nach Zellisolierung durchgeführt. Zellen für die Analysen wurden anhand folgender Kriterien ausgesucht: stabförmig, ohne Membranbläschen, keine hyperkontraktilen Zonen, keine spontanen Kontraktionen und stabile Kontraktionsamplituden bei 1 Hz. Die isolierten Kardiomyozyten wurden 20 Minuten lang mit 5 µM Fura-2 inkubiert. Auf dreimaliges Waschen der Zellen mit Tyrodelösung folgte eine 10-minütige Inkubationszeit bei 37°C zur Erholung der Zellen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten lang mit 5 µg/ml MPO in Tyrodelösung inkubiert gefolgt von 20 mM H₂O₂ für fünf Minuten. Unbehandelte Kontrollzellen wurden mit Tyrodelösung für 15 Minuten inkubiert.

3.2.2 Experimenteller Ablauf

Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden nach der Inkubation mit MPO/H₂O₂ beziehungsweise Tyrodelösung stimuliert (20 V, 4 ms). Zunächst wurde eine Minute lang mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert, um ein Gleichgewicht des zellulären Calciumtransienten zu erreichen. Es folgte eine 20 Sekunden lange Burst-Stimulation mit 4 Hz. Nach einer ein-minütigen Stimulation mit 0,4 Hz erfolgte eine erneute Burst-Stimulation mit 4 Hz für 40 Sekunden. Anschließend wurde erneut mit 0,4 Hz für eine Minute stimuliert (siehe Abbildung 7).

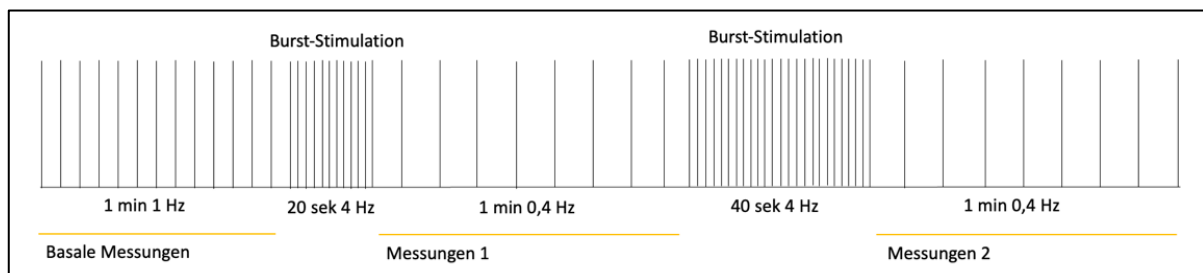


Abbildung 7 Stimulationsprotokoll. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. min steht für Minute, sek für Sekunde, Hz für Hertz.

3.2.3 Aufnahme der Calciumkonzentration

Die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgten bei Stimulation mit 0,4 Hz nach der ersten und zweiten Burst-Stimulation (siehe Abbildung). Als Index für die Calciumkonzentration wurde die Fura-2-Ratio F340/F380 genutzt. Diese wurde mit Hilfe eines Spektrofluorimeters, das mit einem Video-Erkennungssystem verbunden war, aufgenommen. Die Aufnahmen der Fura-2 Ratio erfolgten bei 512 nm nach Anregung bei 340 und 380 nm.

3.2.4 Analyse der Calciumtransienten

Veränderungen der Calciumkonzentration können mithilfe der IonWizard Software in Echtzeit beobachtet und graphisch dargestellt werden. Weiterhin erlaubt die Software eine Offline-Analyse. Dafür ermittelt sie aus dem Signal der Kamera Fluoreszenztransienten, welche anhand mathematischer Algorithmen in unterschiedliche Abschnitte zerlegt werden. Es wurden jeweils zehn Calciumtransienten gemittelt, um einen repräsentativen Transienten für eine Zelle zu erstellen. Aus diesem errechnet die Software folgende Parameter, die den Calciumtransienten charakterisieren (siehe Tabelle 3 und Abbildung 8). Hier wurden ausschließlich Calciumtransienten berücksichtigt, die durch das Pacing ausgelöst wurden.

Tabelle 3 Definition und biologische Relevanz Parameter Calciumtransient

Parameter (Einheit)	Definition (oben) und biologische Relevanz (unten)
<i>peak height</i>	Maximale Auslenkung des Transienten Maximale Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration während des Calciumeinstroms in die Zelle bei Erregung
<i>time to x% peak (ms)</i>	Zeit bis zum Erreichen von x% des Peaks Zeit bis zum Erreichen von x% der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration während des Calciumeinstroms in die Zelle bei Erregung
<i>time to peak (ms)</i>	Zeit bis zum Erreichen des Peaks Zeit bis zum Erreichen der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration während des Calciumeinstroms in die Zelle bei Erregung
<i>time to x% baseline (ms)</i>	Zeit bis zum Erreichen von x% der Baseline Zeit bis zum Erreichen von x% der basalen intrazellulären Calciumkonzentration während des Calciumausstroms aus der Zelle in den Extrazellulärraum und das SR

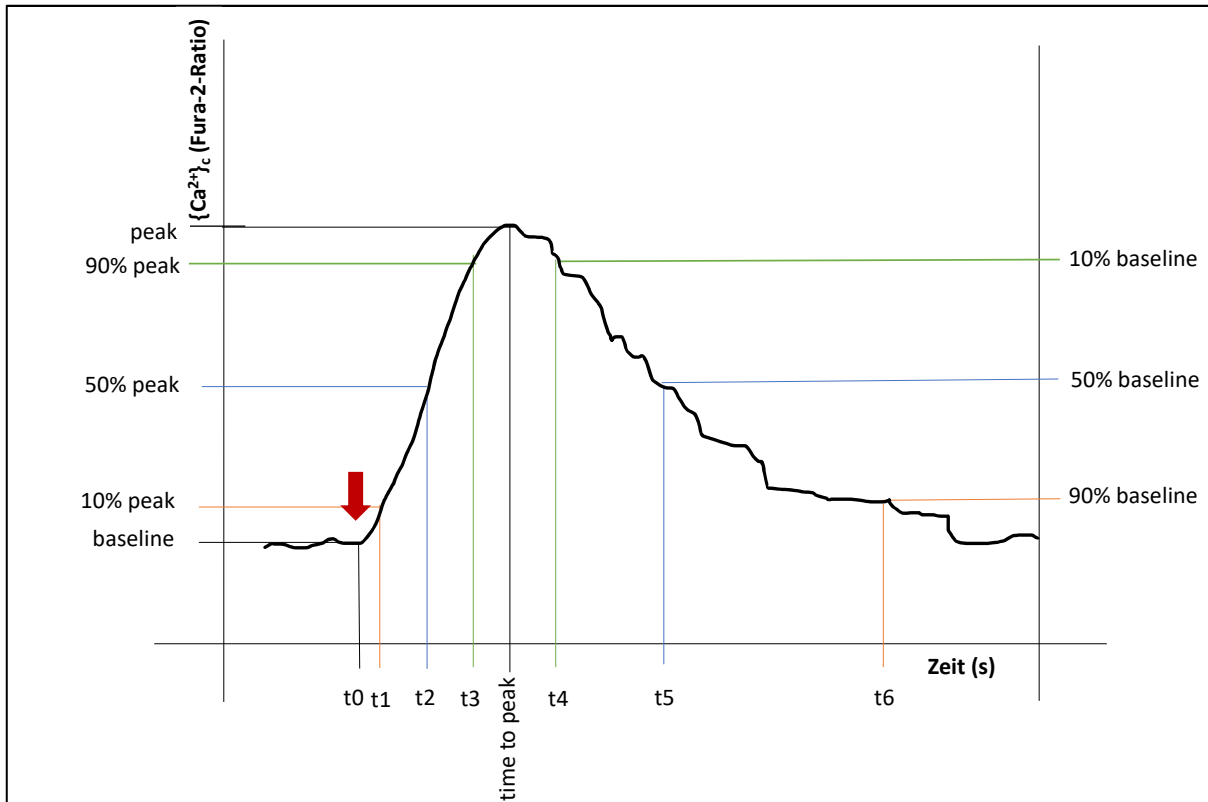


Abbildung 8 Parameter des Calciumtransienten. Schematische Darstellung eines Calciumtransienten und der gemessenen Parameter. t_0 bezeichnet den Zeitpunkt der Stimulation; t_1 , time to 10% Peak; t_2 , time to 50% Peak; t_3 , time to 90% Peak; t_4 , time to 10% Baseline; t_5 , time to 50% Baseline; t_6 time to 90% Baseline. Der rote Pfeil kennzeichnet den Stimulationspunkt.

3.2.5 Zählung der arrhythmischen Ereignisse

Die Anzahl der arrhythmischen Ereignisse nach der ersten und zweiten Burst-Stimulation wurde durch die Zählung von irregulären Calciumtransienten bestimmt. Dazu gehörten Calciumtransienten, die außerhalb des Pacings ohne Stimulation auftraten, Calciumtransienten mit Doppelpeak und Flimmerepisoden der intrazellulären Calciumkonzentration (siehe Abbildung 9).

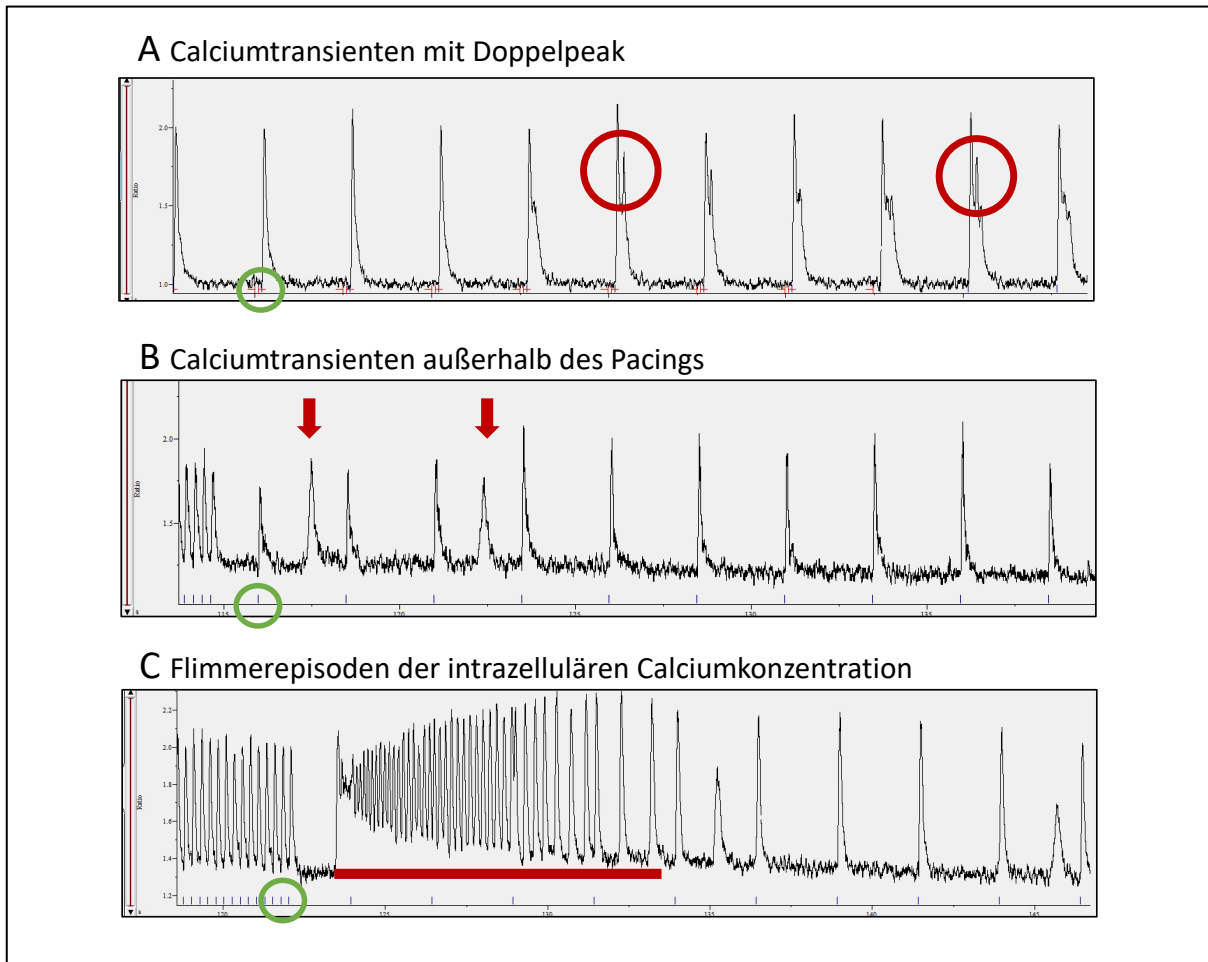


Abbildung 9 Arrhythmische Ereignisse. Screenshots der Software IonWizard mit unterschiedlichen arrhythmischen Ereignissen. A) Die roten Kreise markieren beispielhaft Calciumtransienten mit Doppelpeaks. B) Die roten Pfeile markieren Calciumtransienten, die außerhalb des Pacings auftraten. C) Der rote Strich markiert eine Flimmerepisode der intrazellulären Calciumkonzentration. Externe Stimulationen werden durch kleine Striche auf der x-Achse angezeigt (siehe grüner Kreis).

Material

Tabelle 4 Material IonOptix

Material/Gerät	Hersteller
Mehrkomponentensystem	<i>IonOptix LLC, MA, USA</i>
Lichtquelle	
Invertiertes Mikroskop	
Hochgeschwindigkeitskamera	
Photomultiplier mit Cell Framing Adapter	
Fluorescence System Interface	
Stimulator	
PC mit Software IonWizard	
MPO	<i>Planta Natural Products #700-03-001</i>
H ₂ O ₂	<i>Sigma Aldrich #H1009</i>

3.3 Westernblot

Die Probenvorbereitung und die Durchführung der Westernblots wurden nach Standardprotokollen durchgeführt, wie durch Mollenhauer et al. beschrieben⁵.

3.3.1 Inkubation

Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und inkubiert für Westernblot-Untersuchungen (Aussaat siehe Abschnitt Zellkultur).

HL-1 Kardiomyozyten

Der Tag der Aussaat wurde als Tag 0 festgelegt. An Tag 4 wurden *Starving*, Inkubation und Ernte durchgeführt. Im Rahmen des *Starvings* wurden die Zellen für eine Stunde mit 1 ml 0,5% FBS/*Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS, Gibco #14025050) pro Well einer 6-Well-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Kardiomyozyten unter folgenden Bedingungen inkubiert.

Keine Behandlung: 0,5% FBS/HBSS 1 ml pro Well
Isoprenalin: 100 nM Isoprenalin in 0,5% FBS/HBSS 1 ml pro Well
H₂O₂: 80 µM H₂O₂ in 0,5% FBS/HBSS 1 ml pro Well
MPO: 5µg MPO + 20 µM H₂O₂ in 0,5% FBS/HBSS 1 ml pro Well

Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils n=2 pro Bedingung durchgeführt.

3T3 Fibroblasten

Der Tag der Aussaat wurde als Tag 0 festgelegt. An Tag 1 wurde das *Starving* der Zellen mit 1 ml 0,1% FBS/DMEM pro Well einer 6-Well-Platte abends begonnen. An Tag 2 wurde das *Starving* beendet und es erfolgte die Inkubation unter folgenden Bedingungen.

Keine Behandlung: 10% FBS/DMEM 1 ml pro Well
TGF-β: 6ng in 10% FBS/DMEM 1 ml pro Well
H₂O₂: 100 µM H₂O₂ in 10% FBS/DMEM 1 ml pro Well
MPO: 10µg MPO + 40 µM H₂O₂ in 10% FBS/DMEM 1 ml pro Well

Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils n=1-2 pro Bedingung durchgeführt.

iPSCM

An Tag 14-20 der Differenzierung der iPSCM wurden die Zellen unter folgenden Bedingungen inkubiert.

Keine Behandlung: 5% FCS/Knockout-DMEM 1 ml pro Well
Isoprenalin: 100 nM Isoprenalin in 5% FCS/Knockout-DMEM 1 ml pro Well
H₂O₂: 80 µM H₂O₂ in 5% FCS/Knockout-DMEM 1 ml pro Well
MPO: 5µg MPO + 20 µM H₂O₂ in 5% FCS/Knockout-DMEM 1 ml pro Well
Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils n=3 pro Bedingung durchgeführt.

Zusammensetzung der Inkubationsmedien

Inkubationsmedium HL-1

HBSS mit 0,5% FBS

Inkubationsmedium 3T3

DMEM+GlutaMAX mit 1% beziehungsweise 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

Inkubationsmedium iPSCM

Knockout-DMEM mit 5% FCS, 1x Penicillin/Streptomycin/Glutamin und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren

Material

Tabelle 5 Material Westernblot Inkubation

Material	Hersteller
MPO	<i>Planta Natural Products #700-03-001</i>
H ₂ O ₂	<i>Sigma Aldrich #H1009</i>
TGF-β	<i>Abcam #ab50036</i>
Isoprenalin	<i>Abcam #ab120710</i>

3.3.2 Ernte und Probenvorbereitung

Die Ernte der Zellen aus 6-Well-Platten erfolgte zu den jeweiligen Zeitpunkten wie folgt:

HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten

Zellen wurden zweimal in den *Wells* mit HBSS gewaschen und mit flüssigem Stickstoff für 30 Sekunden schockgefroren. Anschließend wurden 500 µl Ernte Puffer (Zusammensetzung siehe unten) pro *Well* hinzugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den *Wells* gelöst. Die Zell-Puffer-Gemische aus den einzelnen *Wells* wurden jeweils in *Eppendorf Tubes* pipettiert und für 15 Minuten in einen 4°C kalten Schüttler gestellt. Alle fünf Minuten wurden die Proben zusätzlich auf einem Vortex durchmischt. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und weiterverarbeitet. 20 µl des Überstandes wurden für Bicinchoninsäure (BCA)-Assays verwendet. 150 µl des Überstandes wurden mit 50 µl 4xLaemmli-DTT für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

iPSCM

Das Inkubationsmedium wurde mit 1 ml PBS pro *Well* ausgetauscht. Mit der Pipettenspitze wurden die Zellen vorsichtig gelöst und in *Eppendorf Tubes* überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 90 Sekunden bei 300xg. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C gelagert. Nachdem alle Proben geerntet waren, wurde jeweils 100 µl Ernte Puffer zu den Pellets gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben 15 Minuten lang auf dem Schüttler bei 4°C und 300 rpm inkubiert. Nach erneutem Vortexen erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C. Anschließend wurde der Überstand entnommen. 10 µl wurden für die BCA-

Assays verwendet, 90 µl wurden mit 30 µl 4xLaemmli-DTT für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Zusammensetzung der Puffer

Ernte Puffer

RIPA Puffer

10 ml Homogenisierungs-Puffer

100 µl NP-40

100 mg Na-Desoxycholat

+ 1 Tbl Phospho-Stop

+ 1 Tbl Protease Inhibitor

4x-Laemmli-DTT-Puffer

126 mM Tris; 40% Glycerin; 8% SDS; 0,04% Bromphenolblau -> pH 6,8
in 450 µl Aliquots + 50 µl Dithiothreitol (DTT)

Material

Tabelle 6 Material Westernblot Probenvorbereitung

Material/Gerät	Hersteller
Phospho-Stop	<i>Roche #04906837001</i>
Protease Inhibitor	<i>Roche #04693116001</i>
BCA-Kit	<i>Thermofisher #23225</i>
BCA-Gerät	<i>Multititrierplatten-Photometer Multiskan FC, Thermofisher</i>
BCA-Software	<i>Skant Software, Thermofisher</i>

3.3.3 Blotten und Aufnahme der Proteinbanden

Für die Durchführung der Westernblots wurde das Westernblot System von *Peqlab* genutzt. Zunächst wurden unterschiedlich prozentige Trenngele gegossen je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins gegossen. Für die Untersuchung der CaMKII wurde ein 12%iges SDS PAGE-, Phospholambans ein 15%iges SDS PAGE-, des Ryanodinrezeptors ein 6%iges TRIS ACETAT- und der p38 MAPK ein 12%iges SDS PAGE- Gel verwendet.

Das gegossene Trenngel und Sammelgel mit Taschen für die Proben wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden Proben und Marker in die Taschen geladen. Mittels des BCA-Assays wurde ein Gesamtproteingehalt von 30 µg Protein pro Tasche ermittelt.

Nach Beladung der Gele wurde das System auf Eis und in den Kühlraum bei 4°C gestellt. Für die ersten 20 Minuten wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt, die anschließend auf 100 V beziehungsweise 120 V erhöht wurde. Die Laufzeit wurde durch das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine bestimmt: CaMKII und p38 MAPK vier Stunden, RyR sechs Stunden und PLN drei Stunden.

Nachdem die Proteine auf dem Gel der Größe nach getrennt waren, wurden sie auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Dafür wurde das Gel direkt neben der Membran zwischen Filterpapier und Schwämmen angeordnet. Für zwei Stunden wurde eine Stromstärke von 1 Ampere angestellt, die zur Übertragung der Proteine

auf die Membran diente. Das Blotsystem wurde während des Blottvorgangs auf Eis in den Kühlraum bei 4°C gestellt.

Die Membran mit den übertragenen Proteinen wurde anschließend für eine Stunde mit 5% BSA/TBST bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geblockt. Es wurde zunächst das phosphorylierte und anschließend das gesamte Zielprotein untersucht. Die Inkubation mit dem primären Antikörper für das phosphorylierte Protein in 5% BSA/TBST erfolgte über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C (Verhältnis der primären Antikörper: p-CaMKII 1:1000, p-PLN 1:5000, p-RyR 1:5000, p-p38 MAPK 1:1000). Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper in 5% BSA bzw. Milchpulver/TBST bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert (Verhältnis des sekundären Antikörpers: 1:10000). Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit Femto- und *enhanced chemiluminescent* (ECL)-Substrat (*ThermoFisher #34095* und *GE Healthcare #28980926*). Die Aufnahmen der Proteinbanden wurden mit dem *Fusion FX (Vilber Lourmat) Imaging System* durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt (*Stripping*). Dies erfolgte durch die Inkubation mit destilliertem Wasser für fünf Minuten, gefolgt von 0,2 M Natronlauge für zwei bis acht Minuten, erneut destilliertem Wasser für fünf Minuten und TBST für fünf Minuten. Es folgte eine erneute 30-minütige Inkubation der Membran mit 5% BSA/TBST und die Inkubation des primären und sekundären Antikörpers für das gesamte Zielprotein (Verhältnis der primären Antikörper: CaMKII 1:1000, RyR: 1:1000, PLN: 1:2000, p38 MAPK: 1:1000; Verhältnis des sekundären Peroxidase-markierten Antikörpers 1:10000).

Die Entwicklung der Membran und Aufnahme der Banden erfolgte wie beschrieben. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der *Image J* Software.

Zusammensetzung der Gele und Puffer

SDS PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

12% (15%) Trenngel

8,6 ml (7,1 ml) Aqua dest; 5 ml (5 ml) 4x Trennpuffer; 6 ml (7,5 ml) Acrylamid; 200 µl (200 µl) APS; 20 µl (20 µl) TEMED

4x Trennpuffer

90,85g Tris Base; 1,5g EDTA -> mit HCl auf pH 8,8; 10 ml SDS 20%; ad. 500 ml A. dest

Sammelgel

6,4 ml Aqua dest; 2,4 ml 4x Sammelpuffer; 1 ml Acrylamid; 100 µl APS; 10 µl TEMED

4x Sammelpuffer

30,3g Tris Base; 1,5g EDTA -> mit HCl auf pH 6,8; 10 ml SDS 20%; ad. 500 ml A dest

10x Laufpuffer

30,2g Tris Base; 144,0g Glycin; 7,44g EDTA; 30 ml 20% SDS; ad. 1000 ml A. dest

Blotpuffer

12,12g Tris Base; 57,5g Glycin; 800ml Methanol; 20 ml SDS 20%; ad. 4000ml A. dest

10x TBS (TBST)

24,2g Tris Base; 80g NaCl -> mit HCl auf pH 7,6; ad. 1000 ml A. dest (+ Tween für TBST)

TRIS ACETAT

6% Trenngel (Sammelgel)

11,8 ml (6,5 ml) A. dest; 3 ml (0,9 ml) 40% Acrylamid; 5 ml (2,5 ml) 0,8M TAE Puffer; 200 µl (100 µl) APS; 20 µl (10 µl) TEMED

0,8 M TAE Puffer

48,4g TrisBase; 7,4g Na₂EDTA; 21,4 ml 100% Essigsäure -> pH 7; ad. 500 ml A. dest

20x Laufpuffer

89,6g Tricin; 60,6g TrisBase; 50 ml SDS 20%; ad. 500ml A. dest (bei 4°C lagern)

Blotpuffer

10% Methanol, sonst wie bei SDS PAGE (siehe oben)

Material

Tabelle 7 Material Westernblot Blotten

Antikörper	Hersteller
CaMKII	<i>Abcam #ab52476</i>
p-CaMKII	<i>Abcam #ab171095</i>
RyR	<i>Lifespan Bio #LS-C330906</i>
p-RyR	<i>Badrilla #A010-31</i>
PLN	<i>Badrilla #A010-14</i>
p-PLN	<i>Badrilla #A010-13</i>
p38 MAPK	<i>Cell signaling #9212S</i>
p-p38 MAPK	<i>Cell signaling #9211S</i>
Peroxidase labeled anti-rabbit IgG (H+L)	<i>Vector #PI-1000-1</i>
Peroxidase labeled anti-mouse IgG (H+L)	<i>Vector #PI-2000-1</i>

3.3.4 Analyse

Alle im Westernblot untersuchten Proteine wurden bezüglich des Phosphorylierungsstatus analysiert. Dafür wurde jeweils das Verhältnis der Intensität zwischen phosphoryliertem und gesamtem Protein derselben Probe berechnet. Anschließend wurden die Werte der unterschiedlichen Bedingungen auf die Kontrollbedingung normalisiert, indem alle Werte durch den Mittelwert der Kontrollgruppe dividiert wurden.

3.4 Immunfluoreszenz

Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde nach Standardprotokollen durchgeführt, wie bereits durch Mollenhauer et al. beschrieben⁵.

3.4.1 Inkubation

Um Immunfluoreszenzfärbungen für die Analyse der Kollagenproduktion durchzuführen, wurden Fibroblasten auf *Chamber slides* ausgesät. Der Tag der Aussaat wurde als Tag 0 definiert. An Tag 1 wurden Zellen über Nacht (Start am Abend) mit 0,1% FBS/DMEM mit 1 ml pro Chamber gestarvt. An Tag 2 erfolgte die Inkubation mit den folgenden Bedingungen für 36 Stunden:

Keine Behandlung: 1 ml Vollmedium pro *Chamber*

TGF- β : 6 ng TGF- β in 1 ml Vollmedium pro *Chamber*

MPO: 10 μ M MPO + 40 μ M H₂O₂ in 1 ml Vollmedium pro *Chamber*

3.4.2 Fixierung und Permeabilisierung

Nach 36 Stunden erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml 4,0% Formaldehyd (methanol-frei) pro *Chamber* für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimalig gewaschen und anschließend mit 300 μ l 0,1% Triton X-100/PBS pro *Chamber* für 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert.

3.4.3 Färbung

Nach Blocken mit 300 μ l 10% Goat serum/0,1% Triton X-100/PBS pro *Chamber* für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für Kollagen in 300 μ l 10% Goat serum/0,1% Triton X-100/PBS bei 4°C über Nacht (Verhältnis 1:500). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in 300 μ l 10% Goat serum/0,1% Triton X-100/PBS pro *Chamber* für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (Verhältnis 1:100). Nach dreimaligem Waschen erfolgte der Counterstain mit Dapi in 300 μ l PBS pro *Chamber* für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln (Verhältnis 1:10.000). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die *Chambers* entfernt und die gefärbten Zellen mit *Coverslips* bedeckt.

Material

Tabelle 8 Material Immunfluoreszenz Färbung

Material	Hersteller
Kollagen I	Abcam #ab34710
Alexa Fluor-594 chicken-anti-rabbit IgG	Invitrogen #A-21442

3.4.4 Aufnahme und Analyse

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000E (*Keyence, Osaka, Japan*) durchgeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit *Adobe Photoshop*. Zur Analyse der Kollagenkonzentration wurde die Intensität des Signals im roten Kanal gemessen.

3.5 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden-Array

3.5.1 Voruntersuchungen

Um eine Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden-Array mit adäquater Erregungsweiterleitung zu erstellen, führten wir einige Voruntersuchungen durch, die im Folgenden näher beschrieben werden.

3.5.1.1 Lichtmikroskopische Beurteilung der Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten

Die Erstellung der Kokultur erfolgte durch das gemeinsame Aussäen von HL-1 Kardiomyozyten und 3T3 Fibroblasten. Bevor die Kokultur auf den Mikroelektroden-Array ausgesät wurde, erfolgte zunächst eine lichtmikroskopische Beurteilung der Kokultur in *6-Well*-Platten zur Ermittlung folgender Fragestellungen.

Ermittlung des geeigneten Zeitpunktes zur Aufnahme des elektrischen Konduktionsprofils nach Aussaat der Zellen

Die Kokultur wurde von Tag 1 bis Tag 7 nach Aussaat täglich bezüglich der Konfluenz und der einheitlichen Kontraktionen lichtmikroskopisch beurteilt.

Ermittlung des geeigneten Verhältnisses von Kardiomyozyten zu Fibroblasten für die Aussaat auf das Mikroelektroden-Array

Die Kardiomyozyten und Fibroblasten wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (100:0 bis 50:50) auf die *6-Well*-Platten ausgesät und lichtmikroskopisch untersucht. Dabei wurde beurteilt, bei welchem Verhältnis an Tag 5 Kardiomyozyten wie im gesunden Herzgewebe einheitlich kontrahieren können und nicht durch Fibroblasten-Tepiche unterbrochen wurden.

Ermittlung des adäquaten Kulturmediums für die Kokultur

Das Wachstum der Zellen wurde bei Nutzung unterschiedlicher Kulturmedien beurteilt. Es wurden jeweils supplementiertes Claycomb Medium (für HL-1 Kardiomyozyten) und supplementiertes DMEM (für 3T3 Fibroblasten) verwendet.

Ermittlung der adäquaten Art des Aussäens

Die Kardiomyozyten und Fibroblasten wurden gemeinsam beziehungsweise hintereinander (zunächst die Kardiomyozyten, nach einer Stunde die Fibroblasten) ausgesät und bezüglich des Zellwachstums und der Zellverteilung beurteilt.

3.5.1.2 Lichtmikroskopische und elektrophysiologische Beurteilung der reinen Kardiomyozytenkultur und der Kokultur auf dem Mikroelektroden Array

Nach den Untersuchungen der Kokultur in *6-Well*-Platten erfolgten lichtmikroskopische und elektrophysiologische Beurteilungen der reinen Kardiomyozytenkultur und der Kokultur auf dem Mikroelektroden Array.

Ermittlung des angemessenen Volumens, in dem die Zellen ausgesät werden

Wir untersuchten unterschiedliche Volumina mit Zellen um das optimale Volumen zu identifizieren, welches den gesamten Array bedeckte ohne zu verlaufen. Die Literatur beschreibt eine deutlich erhöhte Signalstärke bei der Konzentration der Zellen in einem fokalen Tropfen¹⁷⁹.

Ermittlung der adäquaten Zelldichte bei Aussaat

250.000, 500.000 und 1 Million Zellen wurden in 5 µl Medium ausgesät und täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Ziel war ein konfluenter schlagender Zellteppich an Tag 5.

Ermittlung des geeigneten Zeitpunktes für die Zugabe des restlichen Kulturmediums

Das sehr geringe Volumen bei der Zellaussaat wurde um 1 ml Medium pro *Well*, welches den Mikroelektroden Array enthielt, ergänzt. Das Zellwachstum und die Zellvitalität wurden nach Zugabe des Mediums direkt im Anschluss an die Aussaat, nach 15 Minuten und einer Stunde lichtmikroskopisch beurteilt.

Ermittlung des geeigneten Zeitpunktes zur Aufnahme des elektrischen Konduktionsprofils nach Aussaat der Zellen

Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Beurteilung in der *6-Well*-Platte wurde die Kokultur von Tag 1 bis Tag 7 elektrophysiologisch bezüglich der Amplitudenhöhe der gemessenen Feldpotentiale analysiert.

Ermittlung des geeigneten Verhältnisses von Kardiomyozyten zu Fibroblasten für die Aussaat auf das Mikroelektroden-Array

Die elektrophysiologische Beurteilung bezüglich der Homogenität der Erregungsleitung wurde an Tag 5 bei unterschiedlichen Verhältnissen von Kardiomyozyten zu Fibroblasten (90:10 bis 99:1) durchgeführt.

3.5.2 Messung des elektrischen Konduktionsprofils

Durch die Ergebnisse der bisherigen Versuche konnten wir eine Kokultur mit adäquater Erregungsweiterleitung auf dem Mikroelektroden Array erstellen, deren elektrisches Konduktionsprofil wir anschließend mit dem der reinen Kardiomyozytenkultur verglichen haben. Die Messung und Auswertung des elektrischen Konduktionsprofils der Zellen wird im Folgenden beschrieben.

3.5.2.1 Aufbau des Mikroelektroden Arrays

Um das elektrische Konduktionsprofil der Zellen zu messen, wurden diese auf ein Feld von 120 Mikroelektroden ausgesät. Diese Mikroelektroden sind in einem 12 x 12

Raster angeordnet, wobei jeweils sechs Elektroden an den Ecken nicht zur Messung genutzt werden (siehe Abbildung 10). Die Mikroelektroden besitzen einen Durchmesser von 30 μm und sind jeweils 200 μm voneinander entfernt. Dieser Aufbau erlaubt eine Aufzeichnung der elektrischen Aktivität der Zellen in Echtzeit über mehrere Tage.

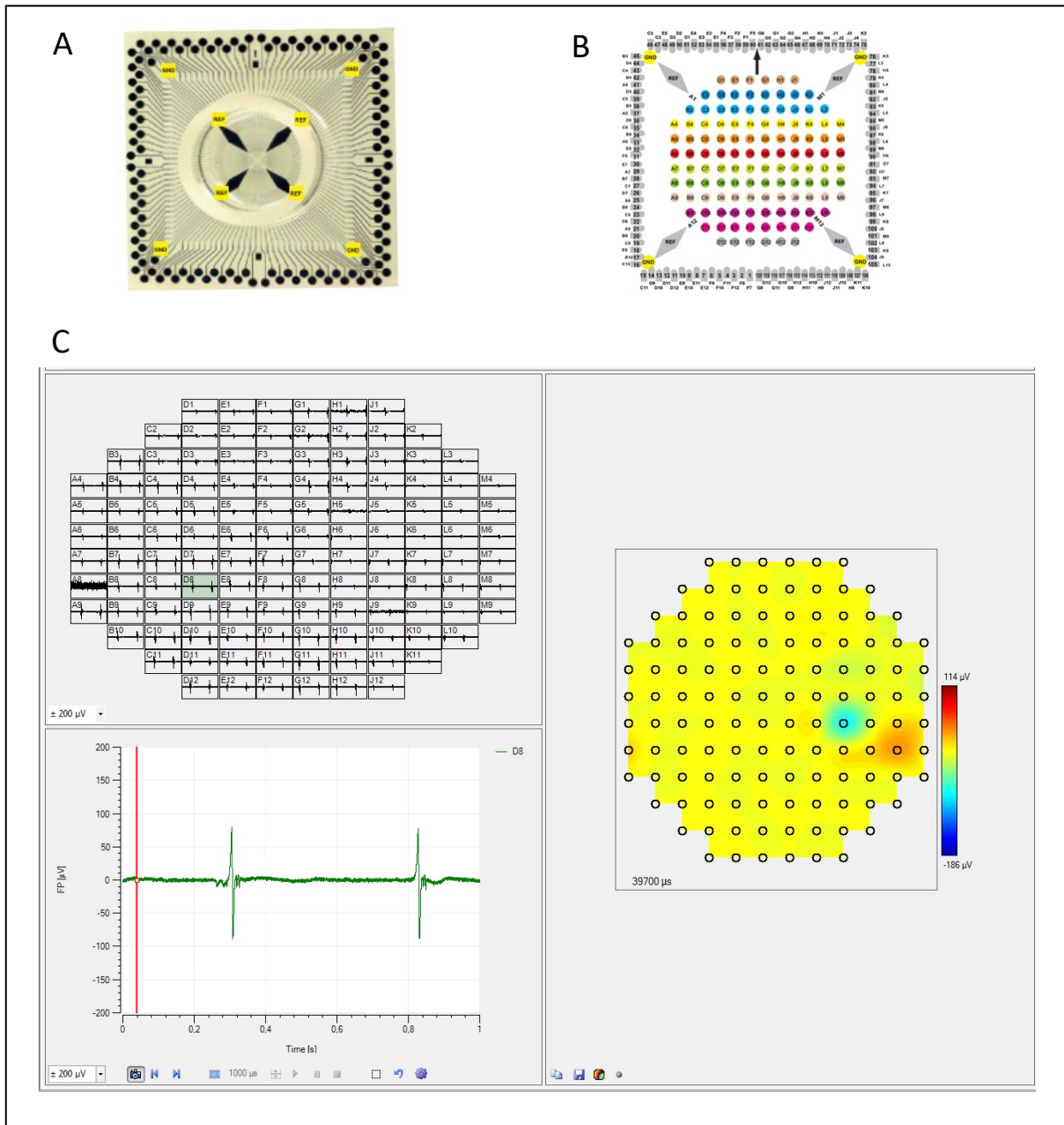


Abbildung 10 Übersicht des Mikroelektroden Arrays und der elektrophysiologischen Parameter. Abbildung (A) zeigt beispielhaft eine Glasplatte, die das Mikroelektroden Array enthält. In Abbildung (B) ist die Anordnung der Mikroelektroden gezeigt. (C) zeigt einen Screenshot der Cardio2D Software, in dem die Feldpotentiale der gesamten Kanäle, ein Feldpotential eines einzelnen Kanals einer Mikroelektrode und die Aktivierungskarte gezeigt werden. Abbildungen (A) und (B) sind aus Multi Channel Systems¹⁸⁰ entnommen.

3.5.2.2 Aufnahme und Analyse des elektrischen Konduktionsprofils

Mit einem 128-Kanal computerassistierten Aufnahmesystem wurden die Feldpotentiale aufgenommen, wie von Mollenhauer et al. beschrieben⁵. Dabei wurde

eine Abtastrate von 25 kHz genutzt. Die gewonnenen Signale wurden *band-pass*-gefiltert (50 Hz) und mit einer 12-bit Auflösung und einem Signalbereich von 20 mV digitalisiert. Es wurden jeweils die ersten Ableitungen der unipolaren Feldpotentiale evaluiert. Die maximale Steigung dV/dt der Aktivierung wurde als Zeitpunkt der lokalen Aktivierung durch spontane Stimulation definiert¹⁸¹.

Die digitalisierten Daten wurden mit der Software Cardio2D+ analysiert. Dafür wurden folgende Einstellungen benutzt:

HB-Detection

Minimum Rise Time: 100 μ s

Maximum Rise Time: 10 ms

Detection Deadtime: höchstmöglicher Wert, jedoch langsamer als Beat-Beat-Intervall

Min/Max Search: +/- 50ms

HB-Timestamp: Maximum Slope

2D

Minimum Cluster Channels: 90

Max. Propagation Time: 500 ms

3.5.2.3 Auswertung mit Excel

Die erhaltenen Daten wurden gemäß Mollenhauer et al. und Lammers et al. mit einer benutzerprogrammierten Software (Excel) ausgewertet^{86,182}. Zunächst wurden die Latenzen der Erregungsleitung zwischen den Elektroden (reziproke Leitungsgeschwindigkeit) für alle benachbarten Elektroden berechnet. Von jeweils vier benachbarten Elektroden wurde die höchste Latenz (lokales Maximum) in einem *phase map* dargestellt. Aus dieser *phase map* wurden folgende Parameter, die die Erregungsleitung des Zellteppichs charakterisieren, errechnet.

Mittelwert Geschwindigkeit

Von den gemittelten Latenzen aus den *phase maps* wurde der reziproke Wert gebildet zum Erhalt der mittleren Geschwindigkeit der Erregungsleitung.

Median Geschwindigkeit

Analog zum Mittelwert wurde der reziproke Wert des Medians der Latenzen aus den *phase maps* berechnet, um den Median der Geschwindigkeiten zu erhalten.

Absolute Inhomogenität

Die absolute Inhomogenität ist die Differenz zwischen der 5. und 95. Perzentile und somit von der Leitungsgeschwindigkeit abhängig.

Inhomogenitätsindex

Der Inhomogenitätsindex $(P5-P95)/P50$ wurde als geschwindigkeitsunabhängiger Faktor der Leitungsinhomogenität berechnet.

Anhand dieser Parameter wurden die elektrischen Konduktionsprofile der reinen Kardiomyozytenkultur und der Kokultur charakterisiert und miteinander verglichen.

Ausschluss von Messungen/Elektroden

Messungen wurden aus der Berechnung ausgeschlossen, wenn die Erregungsleitung nicht über das gesamte Mikroelektroden Array gelaufen ist (erkennbar in der Software) oder wenn überwiegend schwache Signale (optische Beurteilung der Signale in der Software) vorhanden waren. Einzelne Mikroelektroden, die nicht-analysierbare Signale erhielten, wurden automatisch von der Software ausgeschlossen (weiße Kreise).

Material

Tabelle 9 Material Mikroelektroden Array

Gerät	Hersteller
Multielektroden Array	<i>Multichannel Systems, Reutlingen, Germany</i>
Cardio2D/Cardio2D+ Software	<i>Multichannel Systems, Reutlingen, Germany</i>

3.6 Statistische Analysen

Alle erhobenen Daten wurden mit GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad) analysiert. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test stichprobenartig auf Normalverteilung getestet. Die normalverteilten Daten wurden unter Benutzung des Unpaired Students T-Test oder ANOVA einfaktorierter Varianzanalysen analysiert. Als Posthoc Test wurde der Tukey's Multiple Comparison Test benutzt. Ein P-Wert < 0.05 wird als statistisch relevant angesehen. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Calciumhomöostase der Kardiomyozyten

4.1.1 Intrazelluläre Calciumkonzentration und Anzahl arrhythmischer Ereignisse

Kleinste Veränderungen der Calciumhomöostase in Kardiomyozyten stellen eine wichtige Ursache der Arrhythmogenese insbesondere während der akuten Ischämie dar. Um die Frage zu beantworten, ob MPO die Calciumhomöostase in Kardiomyozyten verändert, analysierten wir den Einfluss der MPO auf den zytosolischen Calciumtransienten und die basale Calciumkonzentration in isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten anhand ratiometrischer Fluoreszenz-Bildgebung. Weiterhin untersuchten wir den Effekt der MPO auf die Anzahl der arrhythmischen Ereignisse.

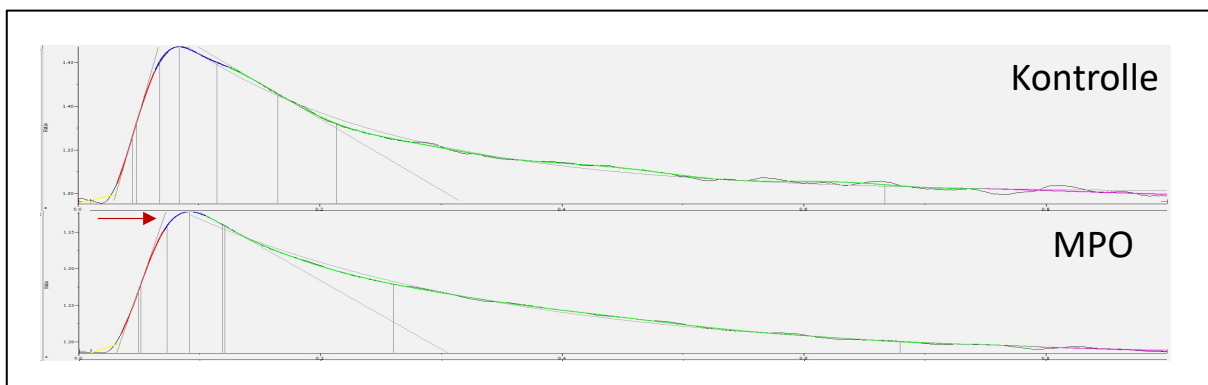


Abbildung 11 Effekt der MPO auf den Calciumtransienten in isolierten murinen Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt Calciumtransienten, die aus zehn Messungen einer Zelle gemittelt wurden. Der obere Calciumtransient wurde aus den Messungen nach 15 Minuten Inkubation in Tyrodelösung gemittelt, der untere Calciumtransient aus den Messungen nach 15 minütiger Inkubation mit 5 µg/ml MPO und 20 µM H₂O₂. Auf der Y-Achse ist die Fura-2-ratio abgebildet, auf der X-Achse die Zeit. Der Pfeil zeigt auf den signifikant verzögerten Calciumpeak.

4.1.1.1 Calciumtransient und arrhythmische Ereignisse in isolierten Kardiomyozyten nach zweiter Burst-Stimulation

Nach der zweiten Burst-Stimulation (Stimulation 20 Sekunden 4 Hz, 1 Minute 0,4 Hz, 40 Sekunden 4 Hz und anschließende Messungen 1 Minute bei 0,4 Hz; siehe Abbildung 7 „Messungen 2“) lässt sich ein Effekt der MPO auf die Zeit bis zum Erreichen des Peaks des Calciumtransienten beobachten (siehe Abbildung 11). Die *Time to 50% Peak* und *Time to Peak* sind in den mit MPO behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant verlängert. Die *Time to 50% Peak* der Kontrolle beträgt 34,9 ± 2,8 ms im Vergleich zu 38,6 ± 4,5 ms bei MPO-Inkubation (p=0,04). Die *Time to Peak* der Kontrolle beträgt 71,9 ± 7,5 ms im Vergleich zu 82,3 ± 9,5 ms bei MPO-Inkubation (p=0,02; siehe Abbildung 11). Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration während der Erregung ist also mit MPO um 10,5 ± 4,1 ms verlängert. Die Zeit bis zum Erreichen der *Baseline* nach dem *Peak* ist unverändert. Die *Time to 50% Baseline* der Kontrolle beträgt 251,9 ± 37,1 ms im Vergleich zu 236,4 ± 33,1 ms bei MPO-Inkubation (p=0,3). Die *Time to 90% Baseline* der Kontrolle beträgt 628,2 ± 146,8 ms im Vergleich zu 578,4 ± 148,6 ms bei MPO-Inkubation (p=0,5; siehe Abbildung 11).

Es lässt sich kein Unterschied in der basalen Calciumkonzentration (*Fura-2-ratio* der Kontrolle 1,24 +/- 0,07 im Vergleich zur *Fura-2-ratio* bei MPO-Inkubation 1,26 +/- 0,1 ; p=0,6) und der maximalen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (*Peak height Fura-2-ratio* der Kontrolle 0,19 +/- 0,05 im Vergleich zur *Peak height Fura-2-ratio* bei MPO-Inkubation 0,22 +/- 0,1; p=0,6) zwischen den mit MPO behandelten und den unbehandelten Zellen beobachten (siehe Abbildung 12). Die mit MPO behandelten Zellen zeigen mit 4,64 +/- 5,6 arrhythmischen Ereignissen eine erhöhte Empfindlichkeit für Arrhythmien im Vergleich zur Kontrolle mit 1,44 +/- 2,3 arrhythmischen Ereignissen. Dieser numerisch relevante Unterschied zeigte keine statistische Signifikanz (p=0,1; siehe Abbildung 12).

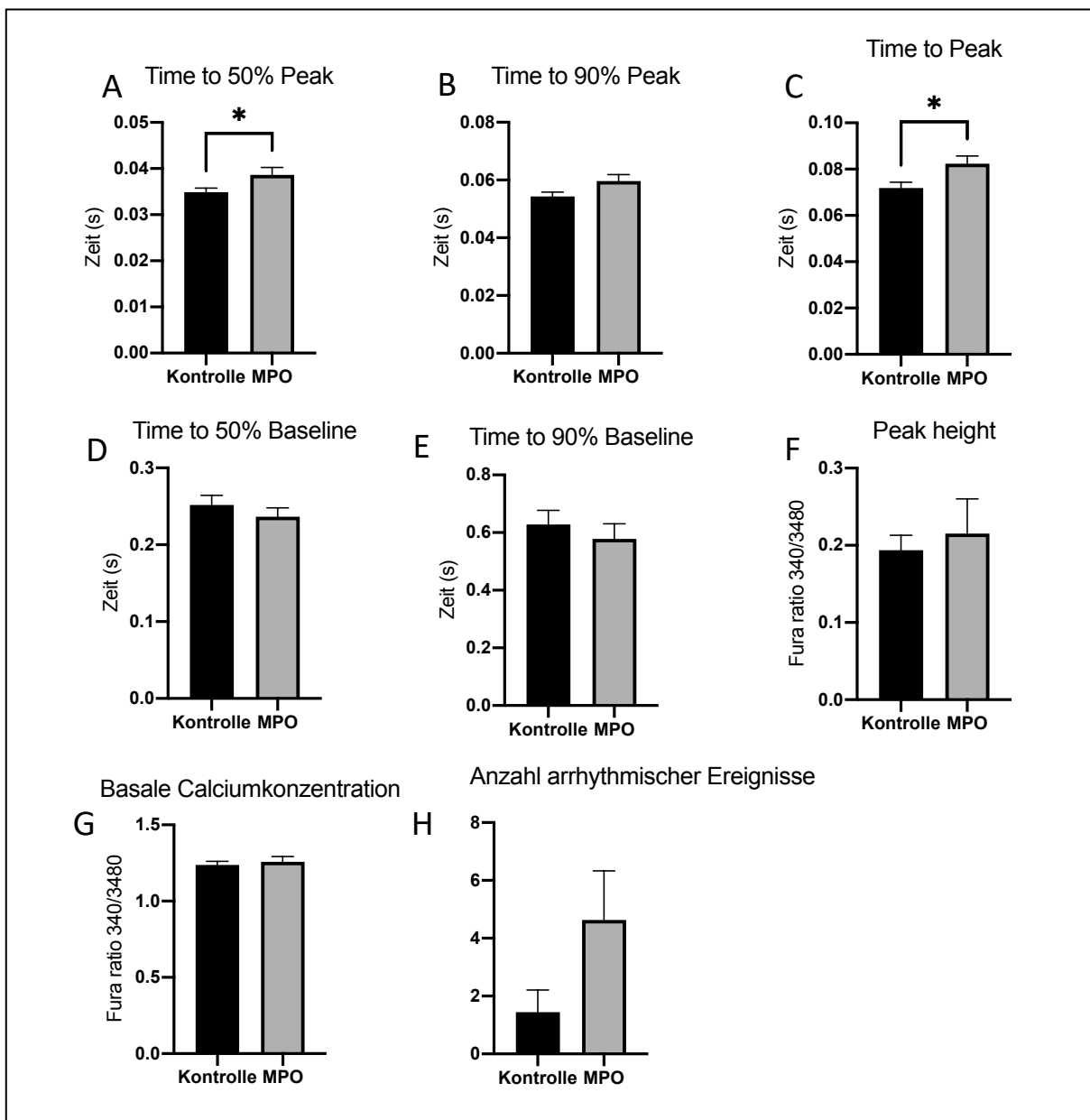


Abbildung 12 Einfluss MPO auf Calciumtransient Parameter nach zweiter Burst-Stimulation. Die Abbildung zeigt den Einfluss der MPO auf verschiedene Parameter des Calciumtransienten. Isolierte murine Kardiomyozyten wurden mit 5 µg/ml MPO und 20 µM H₂O₂ beziehungsweise Tyrodelösung für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation für 20 Sekunden bei 4 Hz, 1 Minute bei 0,4 Hz, 40 Sekunden bei 4 Hz. Im nächsten Schritt wurden die Calciumtransienten bei einer Stimulation

über 1 Minute bei 0,4 Hz gemessen (siehe Abbildung 7 „Messungen 2“). Als Index für die Calciumkonzentration wurde die Fura-2-Ratio F340/F380 genutzt. (A) zeigt die Time to 50% Peak mit einem signifikanten Unterschied zwischen der MPO- und Kontrollgruppe. (B) zeigt die Time to 90% Peak ohne einen signifikanten Unterschied. (C) stellt die Time to Peak mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen dar. In (D) und (E) sind die Time to 50% beziehungsweise 90% Baseline gezeigt, jeweils ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In (F) ist die Peak height dargestellt, die sich zwischen den beiden Gruppen nicht unterscheidet. (G) zeigt die basale Calciumkonzentration, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied. (H) zeigt einen numerisch relevanten, statistisch nicht signifikanten Effekt mit vermehrten arrhythmischen Ereignissen bei MPO-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. $n = 9$ (MPO) beziehungsweise $n = 10$ (Kontrolle) Kardiomyozyten aus drei Wildtyp FVBN Mäusen; $*p < 0,05$; Student-t-test für ungepaarte Stichproben; dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.1.1.2 Calciumtransient und arrhythmische Ereignisse in isolierten Kardiomyozyten nach erster Burst-Stimulation

In Zellen nach der ersten Burst-Stimulation (Stimulation 20 Sekunden 4 Hz und anschließende Messungen 1 Minute bei 0,4 Hz; siehe Abbildung 7 „Messungen 1“) lässt sich kein signifikanter Unterschied in den Charakteristika der Calciumtransienten zwischen MPO- und Kontrollbehandlung feststellen. MPO zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die basale Calciumkonzentration im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die Empfindlichkeit für die Entstehung arrhythmischer Ereignisse wurde durch MPO in den Zellen nach der ersten Burst-Stimulation nicht verändert (siehe Abbildung 13).

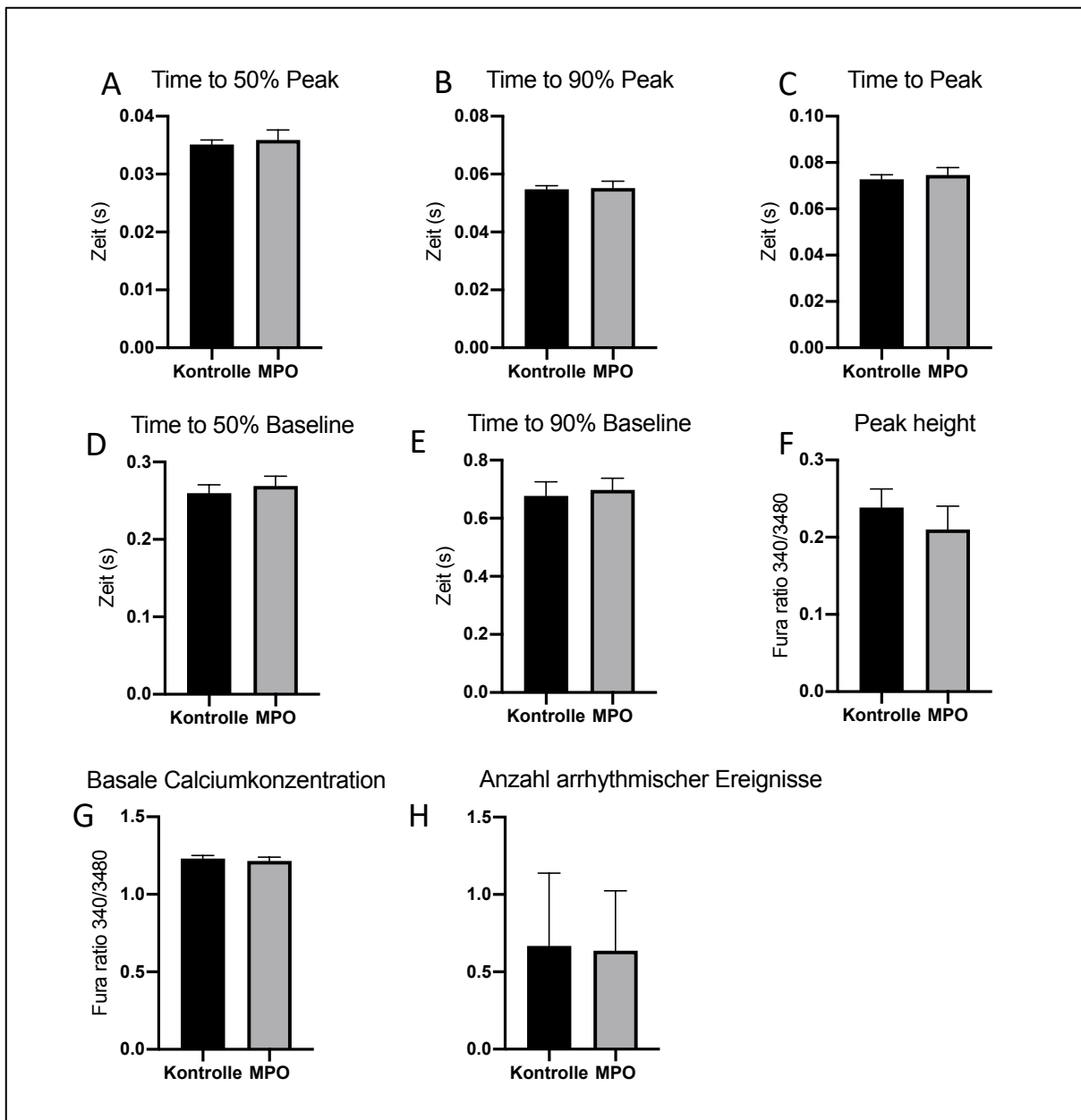


Abbildung 13 Einfluss MPO auf Calciumtransient Parameter nach erster Burst-Stimulation. Die Abbildung zeigt den Einfluss der MPO auf verschiedene Parameter des Calciumtransienten. Isolierte murine Kardiomyozyten wurden mit 5 $\mu\text{g/ml}$ MPO + 20 μM H_2O_2 beziehungsweise Tyrodelösung für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die kurze Stimulation für 20 Sekunden bei 4 Hz. Im nächsten Schritt wurden die Calciumtransienten bei einer Stimulation 1 Minute bei 0,4 Hz gemessen (siehe Abbildung 7 „Messungen 1“). Als Index für die Calciumkonzentration wurde die Fura-2-Ratio F340/F380 genutzt. (A) zeigt die Time to 50% Peak, (B) zeigt die Time to 90% Peak, (C) stellt die Time to Peak dar. In (D) und (E) sind die Time to 50% beziehungsweise 90% Baseline gezeigt. In (F) ist die Peak height dargestellt. (G) zeigt die basale Calciumkonzentration. (H) zeigt die Anzahl an arrhythmischen Ereignissen bei MPO-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Bezüglich aller Parameter zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Inkubationsbedingungen. $n=10$ Kardiomyozyten aus drei Wildtyp FVBN Mäusen; Student-t-test für ungepaarte Stichproben; dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Regulatoren der Calciumhomöostase

Weiterhin wurde untersucht, ob MPO einen Effekt auf wichtige Regulatoren der Calciumhomöostase in Kardiomyozyten zeigt. Dafür wurden posttranslationale Veränderungen der CaMKII, des RyR und von PLN in HL-1 - und iPS- Kardiomyozyten analysiert.

4.1.2.1 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII in HL-1 Kardiomyozyten

Zunächst untersuchten wir den Einfluss der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII im Vergleich zu H₂O₂ und Isoprenalin in HL-1 Kardiomyozyten. Eine vermehrte Aktivität der CaMKII kann über die Phosphorylierung ihrer Zielproteine zu einer Störung der Calciumhomöostase mit erhöhter Empfindlichkeit für die Entstehung von Arrhythmien führen²⁵. Die enzymatische Aktivität der CaMKII kann direkt gemessen werden. Alternativ wurde die Autophosphorylierung des Enzyms an Thr286 beziehungsweise Thr287 untersucht werden, da diese mit der Aktivierung der CaMKII assoziiert ist⁸⁷. Je nach gewebesabhängiger Isoform befindet sich die Autophosphorylierungsstelle an Thr286 oder Thr287. Die Untersuchung der von uns untersuchten Phosphorylierungsstelle Thr286 in kardialen Zellen ist in der Literatur beschrieben^{87,183}.

Nach zweistündiger MPO-Inkubation von HL-1 Kardiomyozyten wurde eine numerisch erhöhte CaMKII-Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten HL-1 Kardiomyozyten beobachtet. Dabei zeigte sich eine Zunahme der CaMKII-Phosphorylierung um 32% im Vergleich zur Kontrollbedingung. In der ANOVA einfaktoriellen Varianzanalyse aller Bedingungen zeigte sich keine statistische Relevanz ($p=0,1$) bezüglich dieses Unterschieds. In dem Einzelvergleich der MPO-Inkubation und der Kontrollbedingung mithilfe des Student-t-test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,02$; siehe Abbildung 14). Nach 30 Minuten und sechs Stunden zeigte sich kein Effekt der MPO auf CaMKII-Phosphorylierung.

Isoprenalin, ein β -adrenerger Stimulator, führte nach 30 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der CaMKII-Phosphorylierung um 52% im Vergleich zur Kontrolle. H₂O₂ als reaktive Sauerstoffspezies und Substrat von MPO führte zu einer numerischen, jedoch statistisch nicht signifikanten Zunahme der CaMKII-Phosphorylierung nach 30 Minuten (relative CaMKII-Phosphorylierung $1,25 \pm 0,46$) und zwei Stunden (relative CaMKII-Phosphorylierung $1,2 \pm 0,27$).

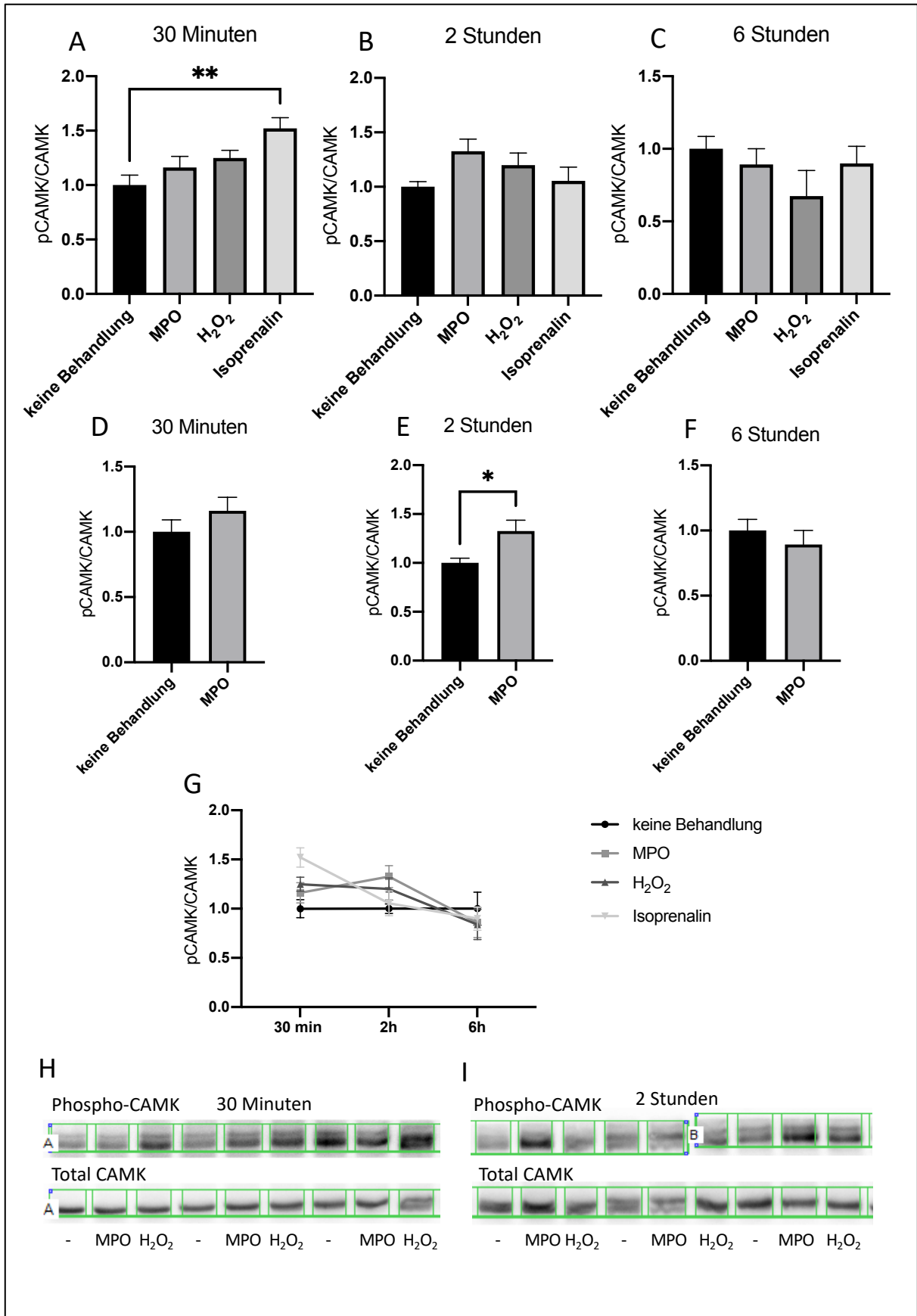


Abbildung 14 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII in HL-1 Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung der CaMKII in HL-1 Kardiomyozyten nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden Inkubation mit 5 µg MPO + 20 µM

H₂O₂, 80 µM H₂O₂ und 100 nM Isoprenalin. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Westernblot untersucht. (A) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach 30 Minuten mit signifikantem Unterschied zwischen Isoprenalin und Kontrolle. (B) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach zwei Stunden mit einem numerisch relevanten, statistisch nicht signifikanten Effekt in Richtung vermehrter Phosphorylierung bei MPO-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. (C) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach sechs Stunden ohne signifikante Unterschiede. (D) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach 30 Minuten ohne Unterschied zwischen MPO und Kontrolle. (E) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach zwei Stunden mit signifikantem Unterschied zwischen MPO und Kontrolle. (F) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach sechs Stunden ohne Unterschied zwischen MPO und Kontrolle. (G) Zeitverlauf der relativen CaMKII-Phosphorylierung. (H) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte CaMKII nach 30 Minuten. (I) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte CaMKII nach zwei Stunden. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=6 biologische Replikate aus 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,5, **p<0,01; (A)-(C) und (G) ANOVA einfaktorische Varianzanalyse; (D)-(F) Student-t-test für ungepaarte Stichproben; (A)-(G) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.1.2.2 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus des RyRs in HL-1 Kardiomyozyten

Ein weiterer relevanter molekularer Spieler der Calciumhomöostase, den wir in HL-1 Zellen untersuchten, ist der Ryanodin-Rezeptor, welcher von CaMKII spezifisch an Ser2814 phosphoryliert wird⁴⁵. Eine vermehrte Phosphorylierung des RyRs durch die CaMKII kann zum Calciumleck aus dem SR mit erhöhter Empfindlichkeit für Arrhythmien führen^{25,81,87}.

Nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden zeigten sich keine Effekte der MPO, H₂O₂ und Isoprenalin auf den Phosphorylierungsstatus des RyRs (siehe Abbildung 15).

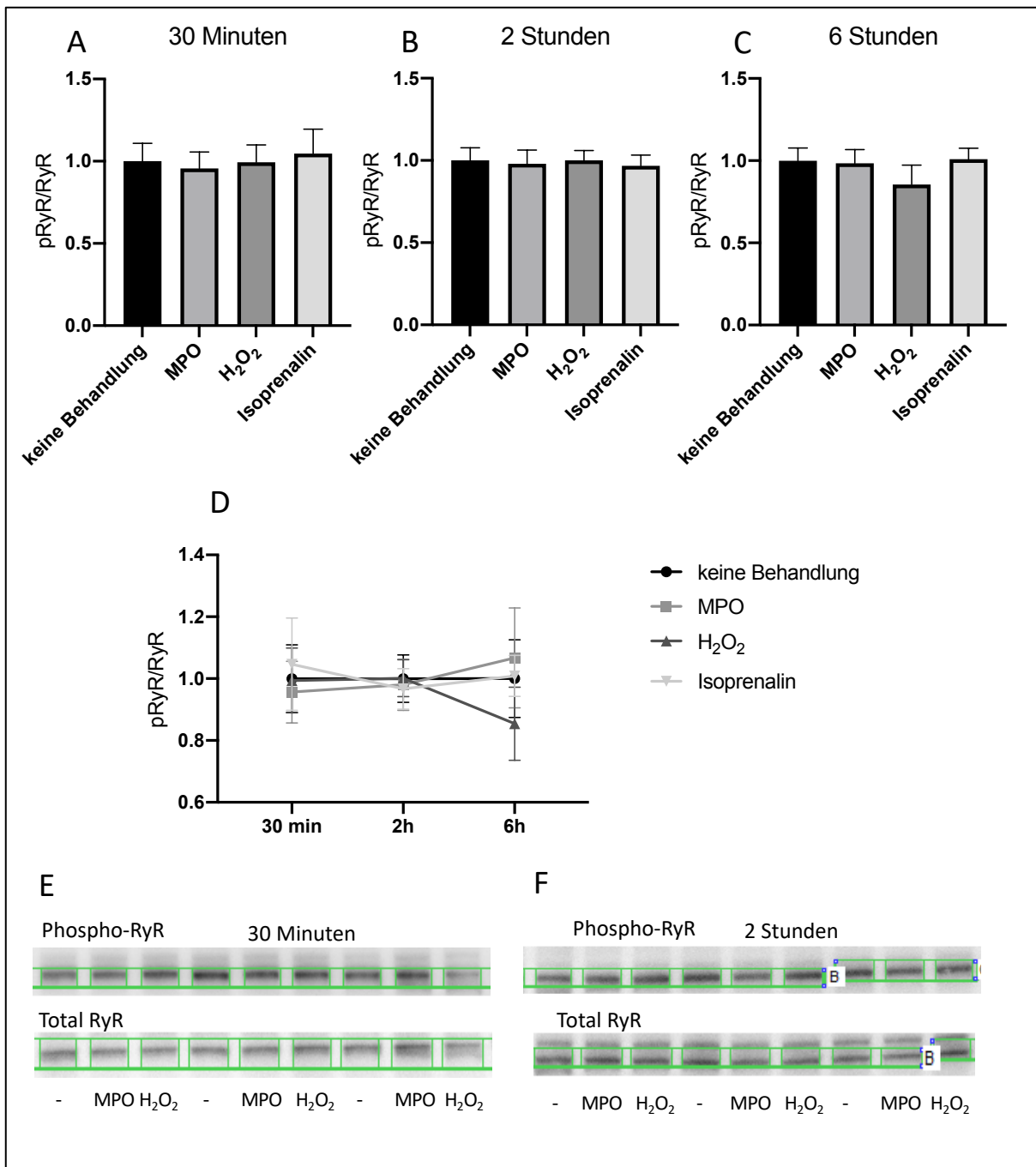


Abbildung 15 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus des RyRs in HL-1 Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung des RyRs in HL-1 Kardiomyozyten nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden mit 5 µg MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ und 100 nM Isoprenalin. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Westernblot untersucht. (A) Relative Phosphorylierung des RyRs nach 30 Minuten, (B) Relative Phosphorylierung des RyRs nach zwei Stunden, (C) Relative Phosphorylierung des RyRs nach sechs Stunden. (D) Zeitverlauf der relativen RyR-Phosphorylierung. Zu allen Inkubationszeitpunkten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen. (E) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte RyR nach 30 Minuten. (F) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte RyR nach zwei Stunden. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=6 biologische Replikate aus 3 unabhängigen Experimenten; (A)-(D) ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse; (A)-(D) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.1.2.3 Effekt der MPO auf den PLN Phosphorylierungsstatus in HL-1 Kardiomyozyten

Als weiteren Regulator der Calciumhomöostase und als Zielprotein der CaMKII untersuchten wir den Phosphorylierungsstatus von PLN. Hier analysierten wir ebenfalls die Phosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Stelle Thr17⁴⁸. Eine erhöhte Phosphorylierung von PLN würde über die Dissoziation von der SERCA zu einer erhöhten Aktivität dieser Calciumpumpe und einem vermehrten Transport von Calcium in das SR führen²⁸. Eine vermehrte Calciumfüllung des SRs bei erhöhter CaMKII Aktivität ist in Hinblick auf die Arrhythmogenese ungünstig, da mehr Calcium entweichen kann.

Wir konnten keinen Effekt auf die PLN-Phosphorylierung durch MPO, H₂O₂ oder Isoprenalin zu den untersuchten Zeitpunkten beobachten (siehe Abbildung 16).

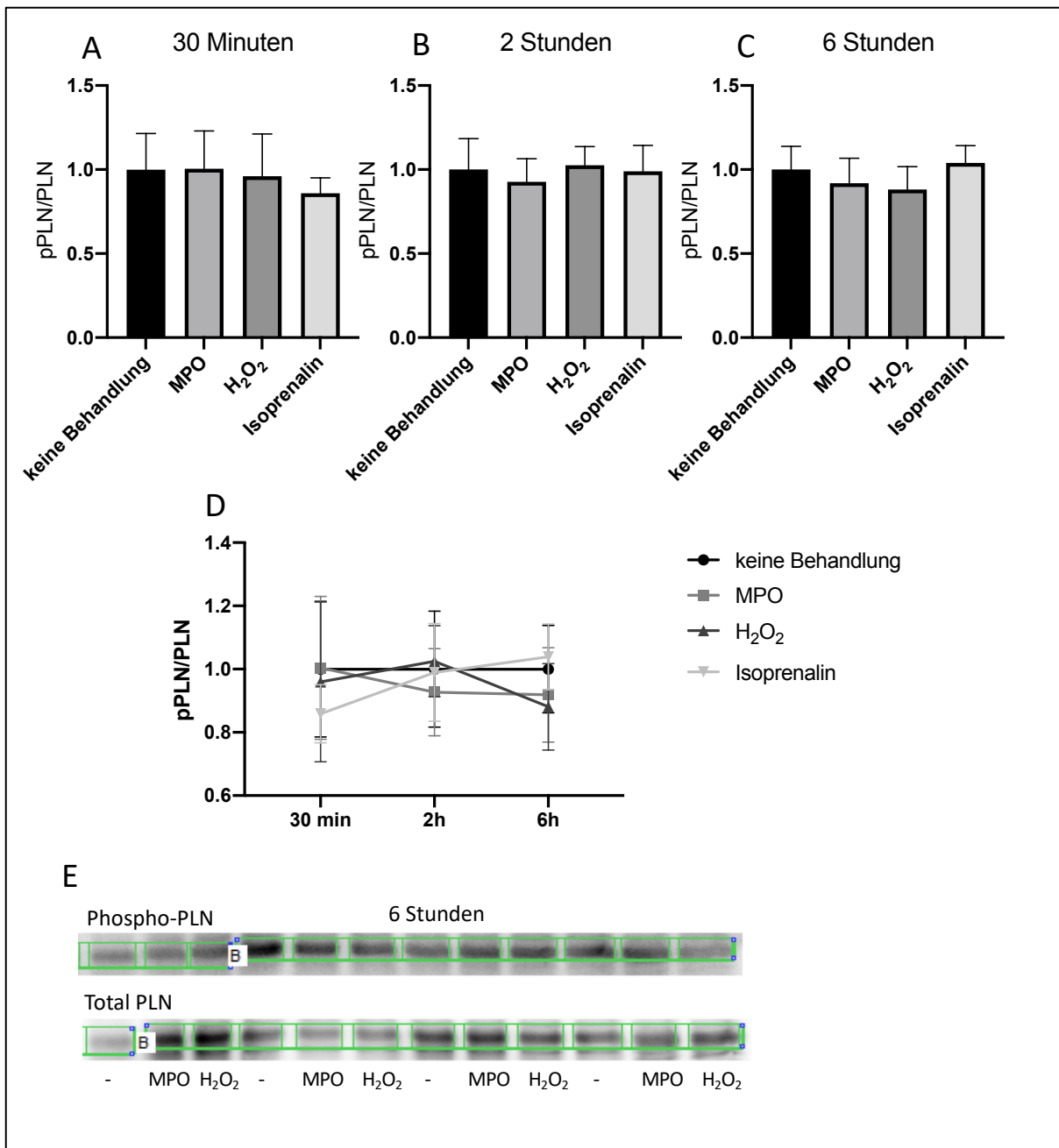


Abbildung 16 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus von PLN in HL-1 Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung von PLN in HL-1 Kardiomyozyten nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden Inkubation mit 5 μg MPO + 20 μM H₂O₂, 80 μM H₂O₂ und 100 nM Isoprenalin. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Westernblot untersucht. (A) Relative Phosphorylierung von PLN nach 30 Minuten, (B) Relative Phosphorylierung von PLN nach zwei Stunden, (C) Relative Phosphorylierung von PLN nach sechs Stunden. (D) Zeitverlauf der relativen PLN-Phosphorylierung. Zu allen Inkubationszeitpunkten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen. (E) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte PLN nach sechs Stunden. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=6 biologische Replikate aus 3 unabhängigen Experimenten; (A)-(D) ANOVA einfaktorielles Varianzanalyse; (A)-(D) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.1.2.4 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII und des RyRs in iPS-Kardiomyozyten

Neben den HL-1 Kardiomyozyten untersuchten wir den Phosphorylierungsstatus der CaMKII und des RyRs in iPS-Kardiomyozyten. Nach 30-minütiger Inkubation mit Isoprenalin zeigte sich eine erhöhte CaMKII-Phosphorylierung. Sonst ließ sich keine vermehrte Phosphorylierung der CaMKII und des RyRs durch die verschiedenen Bedingungen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten beobachten. Nach sechs Stunden zeigte sich sogar ein Abfall der CaMKII-Phosphorylierung bei MPO- und H₂O₂-Inkubation (siehe Abbildung 17 und 18).

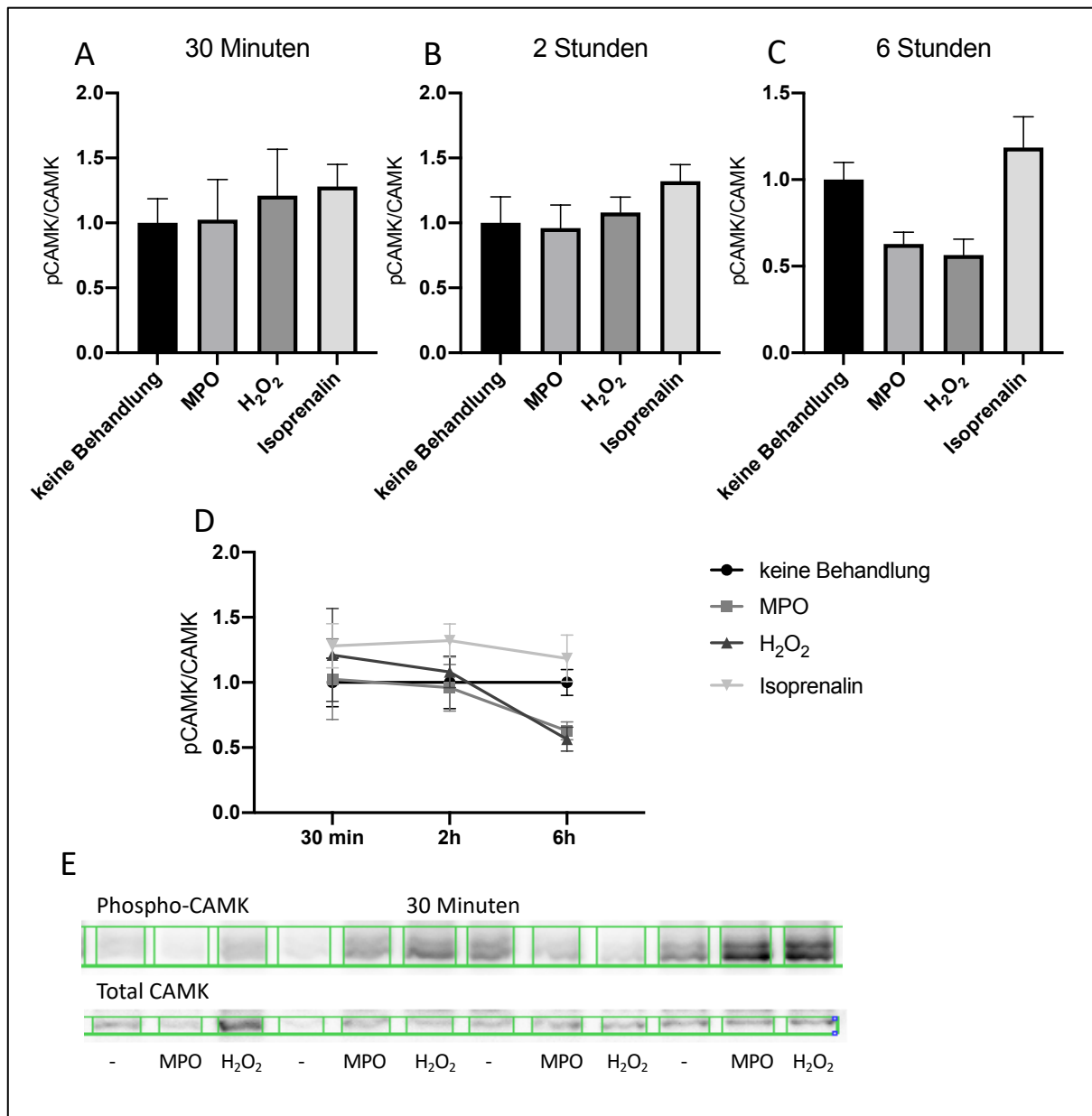


Abbildung 17 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII in iPS-Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung der CaMKII in iPS-Kardiomyozyten nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden Inkubation mit 5 µg MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ und 100 nM Isoprenalin. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Westernblot untersucht. (A) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach 30 Minuten mit Effekt durch Isoprenalin. (B) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach zwei Stunden ohne signifikanten Unterschied zwischen

den Bedingungen. (C) Relative Phosphorylierung der CaMKII nach sechs Stunden ohne signifikante Unterschiede. (D) Zeitverlauf der relativen CaMKII-Phosphorylierung. (E) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte CaMKII nach 30 Minuten. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=6 biologische Replikate aus 2 unabhängigen Experimenten; (A)-(D) ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse; (A)-(D) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

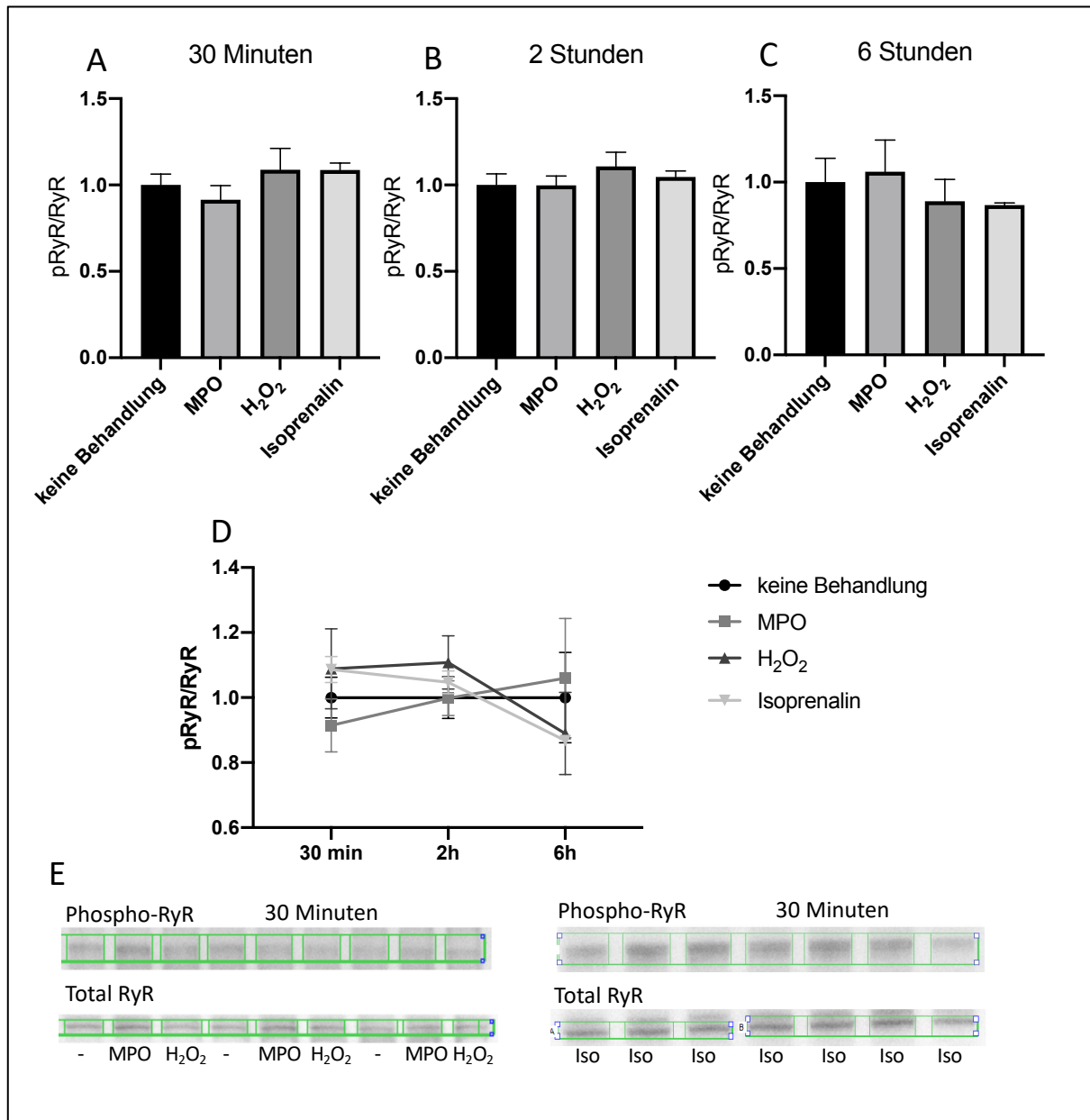


Abbildung 18 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus des RyRs in iPS-Kardiomyozyten. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung des RyRs iPS-Kardiomyozyten nach 30 Minuten, zwei Stunden und sechs Stunden Inkubation mit 5 µg MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ und 100 nM Isoprenalin. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Westernblot untersucht. (A) Relative Phosphorylierung des RyRs nach 30 Minuten, (B) Relative Phosphorylierung des RyRs nach zwei Stunden, (C) Relative Phosphorylierung des RyRs nach sechs Stunden. (D) Zeitverlauf der relativen RyR-Phosphorylierung. Zu allen Inkubationszeitpunkten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen. (E) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte RyR nach 30 Minuten. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=6 biologische Replikate aus 2 unabhängigen Experimenten; (A)-(D) ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse; (A)-(D) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

Zusammenfassend zeigt MPO nach zwei Stunden einen numerisch relevanten, statistisch nicht signifikanten Effekt auf die CaMKII-Phosphorylierung an der Autophosphorylierungsstelle Thr286 in HL-1 Kardiomyozyten, der jedoch in iPS-Kardiomyozyten nicht beobachtet werden konnte. Ein Effekt der MPO auf die Phosphorylierung des RyRs und von PLN an den CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen Ser2814 beziehungsweise Thr17 konnte in beiden Zelllinien nicht beobachtet werden.

Isoprenalin erhöhte 30-minütiger Inkubation CaMKII-Phosphorylierung in HL-1 Zellen, was nach zwei und sechs Stunden nicht mehr zu beobachten war. In iPSCM führte Isoprenalin nach 30 Minuten zu einer erhöhten numerisch relevanten, statistisch nicht signifikanten CaMKII-Phosphorylierung. H₂O₂ zeigte zu den von uns untersuchten Zeitpunkten keinen Effekt auf die Phosphorylierungen der unterschiedlichen Regulatoren in beiden Zelllinien.

4.2 Transdifferenzierung der Fibroblasten

Im Herzgewebe befinden sich die Kardiomyozyten im Zellverband mit weiteren Zellen, unter anderem mit Fibroblasten. Neben Veränderungen der Kardiomyozyten führen auch Veränderungen der Fibroblasten im Herzgewebe zur Entstehung von Arrhythmien. Die Rolle der aktivierten Fibroblasten (Myofibroblasten) im proarrhythmogenen Remodeling lässt sich in zwei Kategorien aufteilen: die vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen mit folglich Fibrose und die Myofibroblasten-Kardiomyozyten-Kopplung³. Wir untersuchten den Einfluss der MPO auf die Transdifferenzierung und die Produktion eines Extrazellulärmatrix-Proteins (Kollagen I) der 3T3-Fibroblasten näher.

4.2.1 Transdifferenzierung über die p38 MAPK

Die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten geschieht über die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges. Im Hinblick auf die Erstellung der Kokultur aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten untersuchten wir den Effekt der MPO auf die Aktivierung beziehungsweise die Transdifferenzierung der 3T3-Fibroblasten, indem wir den Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK analysierten.

Nach 15 Minuten Inkubation der Fibroblasten wurde eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK bei Inkubation mit MPO und bei Inkubation mit H₂O₂ im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. MPO führte dabei zu einer relativen Phosphorylierung von 1,7 +/- 0,56 (p=0,1) und H₂O₂ von 1,8 +/- 0,26 (p=0,09) im Vergleich zu 1,0 +/- 0,19 der Kontrolle. Die Positivkontrolle TGF-β zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung der p38 MAPK nach 15 Minuten (relative Phosphorylierung 1,09 +/- 0,06; p=0,9; siehe Abbildung 19).

Nach 30 Minuten führte H₂O₂ zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung der p38 MAPK im Vergleich zur Kontrolle. Die relative MAPK-Phosphorylierung mit H₂O₂ betrug 2,4 +/- 0,85 im Vergleich zu 1,0 +/- 0,26 bei der Kontrolle (p=0,01). Eine signifikante Zunahme der MAPK-Phosphorylierung durch MPO (relative Phosphorylierung 1,24 +/- 0,12 ; p=0,8) und TGF-β (relative Phosphorylierung 1,38 +/- 0,3; p=0,7) bei 30 Minuten zeigte sich nicht (siehe Abbildung 19).

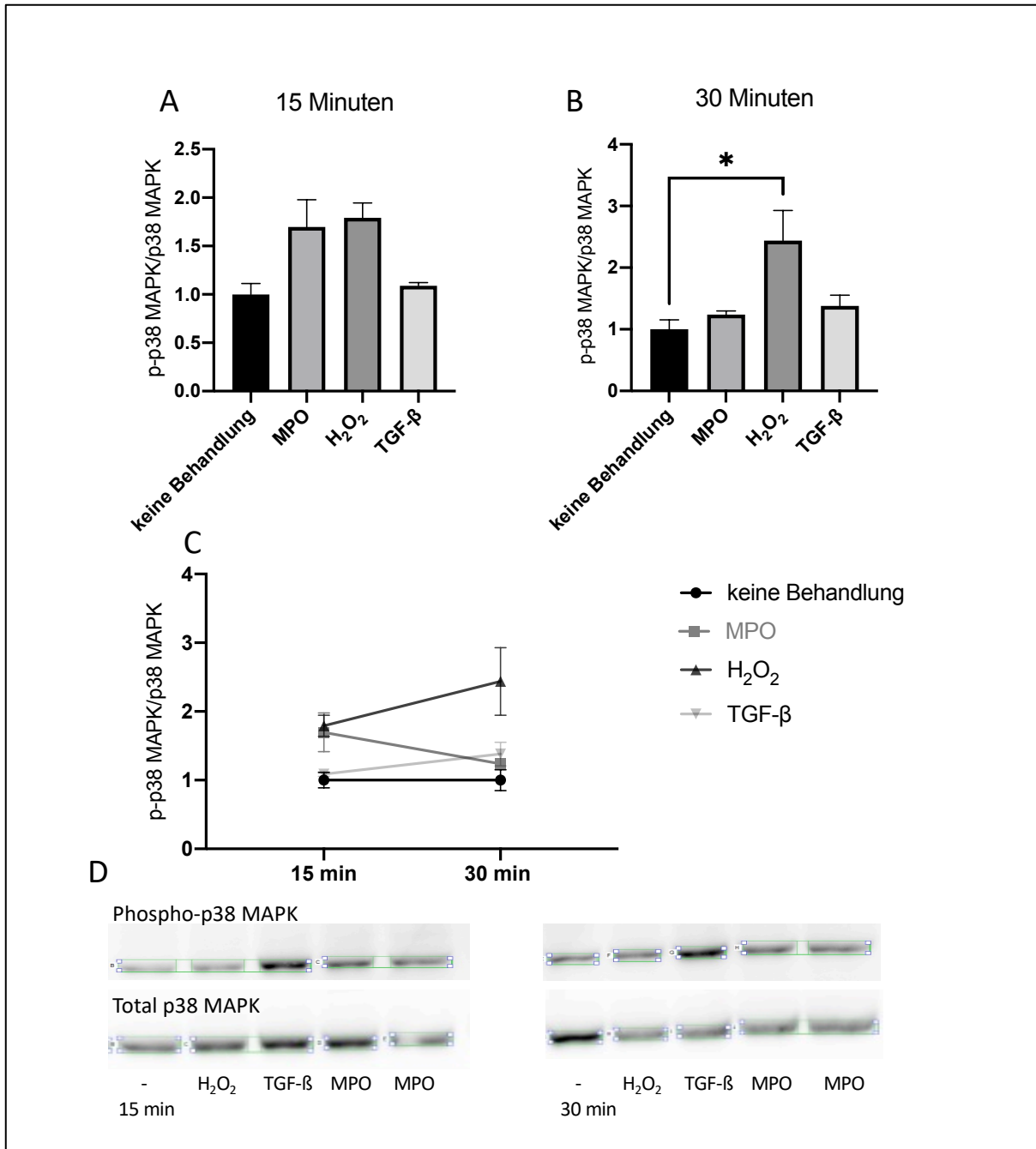


Abbildung 19 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK. Die Abbildung zeigt die relative Phosphorylierung der p38 MAPK nach 15 und 30 Minuten Inkubation von 3T3-Fibroblasten mit 10 µg MPO + 40 µM H₂O₂, 100 µM H₂O₂ und 6 ng/ml TGF-β. (A) Relative Phosphorylierung der p38 MAPK nach 15 Minuten mit numerisch relevantem, statistisch nicht signifikantem Effekt bei MPO und H₂O₂ in Richtung vermehrter Phosphorylierung. (B) Relative Phosphorylierung der p38 MAPK nach 30 Minuten mit signifikanter Erhöhung der Phosphorylierung bei H₂O₂. (C) Zeitverlauf der relativen p38 MAPK-Phosphorylierung. (D) Repräsentative Westernblots für totale und phosphorylierte p38 MAPK nach 15 und 30 Minuten. Die grünen Kästchen um die Proteinbanden definieren die Bereiche, die densitometrisch ausgewertet wurden. n=4 (MPO) beziehungsweise n=3 (keine Behandlung, H₂O₂, TGF-β) biologische Replikate aus 3 unabhängigen Experimenten; *p<0,05; (A)-(D) ANOVA einfaktorielles Varianzanalyse; (A)-(D) dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

4.2.2 Kollagen

Myofibroblasten sezernieren im Vergleich zu Fibroblasten eine erhöhte Menge an Extrazellulärmatrix-Proteinen, insbesondere Kollagen I. Die Produktion von Kollagen I in 3T3-Fibroblasten nach MPO Behandlung wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Nach 36-stündiger Inkubation mit TGF- β zeigte sich bei zwei biologischen Replikaten eine starke Zunahme der Kollagenproduktion im Vergleich zur Kontrolle.

Bei MPO-Inkubation ließ sich kein Einfluss auf die Kollagenproduktion zu diesem Zeitpunkt beobachten (siehe Abbildung 20).

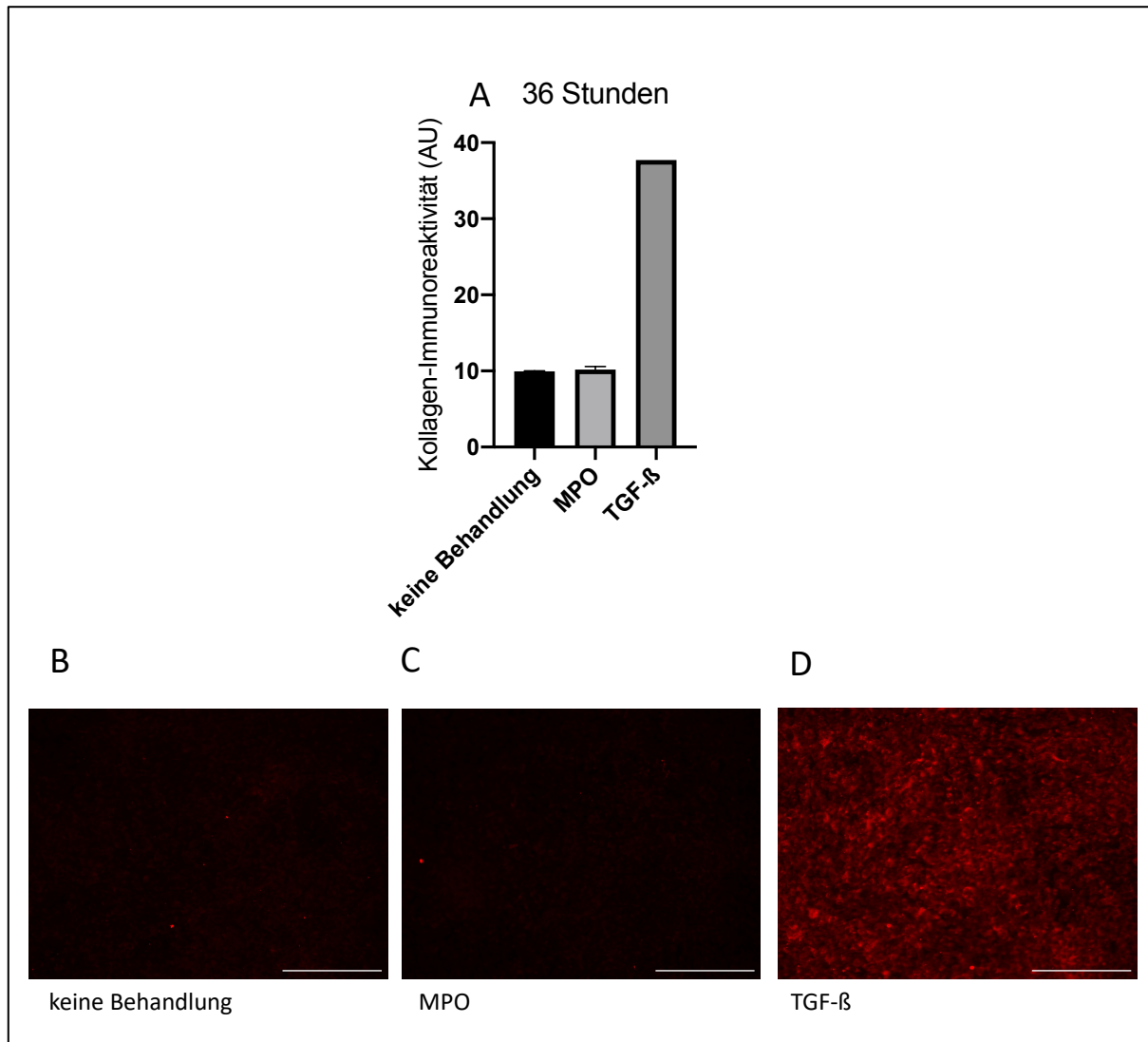


Abbildung 20 Effekt der MPO auf die Kollagendeposition. Die Abbildung zeigt die Kollagendeposition nach 36 Stunden Inkubation von 3T3-Fibroblasten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MPO + 40 μM H_2O_2 und 6ng/ml TGF- β . (A) Kollagendeposition nach 36 Stunden bei unterschiedlichen Bedingungen mit einer numerisch hochrelevanten Erhöhung bei TGF- β -Inkubation. (B) Repräsentatives Bild der Kollagendeposition ohne Behandlung. (C) Repräsentatives Bild der Kollagendeposition bei Inkubation mit MPO. (D) Repräsentatives der Bild der Kollagendeposition bei TGF- β Inkubation. (A) $n=2$ biologische Replikate für die Bedingungen keine Behandlung und MPO, $n=1$ biologisches Replikat für die Bedingung TGF- β , dargestellt als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Maßstabbalken 200 μm .

4.3 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array

Das letzte Ziel der Arbeit war die Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array, um zukünftig die funktionelle Konsequenz der gezeigten Effekte durch MPO auf das elektrische Konduktionsprofil zu untersuchen. Dabei sollten die Zellen elektrisch koppeln und ein physiologisches elektrisches Konduktionsprofil aufweisen, um so bestmöglich das Herzgewebe in vitro zu repräsentieren.

4.3.1 Voruntersuchungen

4.3.1.1 Lichtmikroskopische Beurteilung der Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten

Es wurden HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten in unterschiedlichen Verhältnissen in 6-Well-Platten ausgesät und täglich lichtmikroskopisch hinsichtlich Zellwachstum und Zellverteilung beurteilt.

Lichtmikroskopisch konnte Tag 5 als der Tag identifiziert werden, an dem die benachbarten Kardiomyozyten am stärksten und einheitlich kontrahierten. Ab Tag 6 überwucherten die Fibroblasten die Kardiomyozyten. Weiterhin stellte sich die Frage nach dem optimalen Zellverhältnis bei der Zellaussaat für ein adäquates Verhältnis bei der Messung. In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Chen et al. schien ein Verhältnis von 90:10 Kardiomyozyten zu Fibroblasten bei Aussaat lichtmikroskopisch am Tag 5 ein guter Ausgangspunkt für das Aussäen auf das Mikroelektroden-Array zu sein¹⁸⁴ (siehe Abbildung 21). Bei einem Verhältnis von 70:30 und 80:20 bildeten sich bis Tag 5 große Fibroblasten-Teppiche, welche die benachbarten einheitlich kontrahierenden Kardiomyozyten unterbrachen.

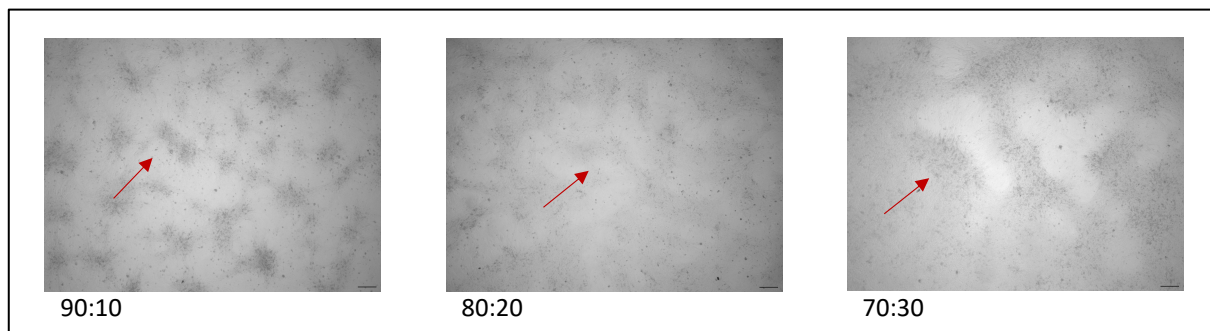


Abbildung 21 Lichtmikroskopische Beurteilung unterschiedlicher Verhältnisse der Kokultur. Gezeigt sind drei lichtmikroskopische Bilder mit unterschiedlichen Verhältnissen der HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten, aufgenommen an Tag 5 nach Aussaat. Man kann erkennen, dass die mit Pfeilen versehenen Fibroblastenteppiche bei steigender Fibroblastenanzahl größer werden. 90:10 steht für 90% Kardiomyozyten und 10% Fibroblasten, 80:20 für 80% Kardiomyozyten und 20% Fibroblasten, 70:30 für 70% Kardiomyozyten und 30% Fibroblasten. Maßstab: 200 µm.

Weiterhin konnten wir lichtmikroskopisch feststellen, dass unter Nutzung von supplementiertem Claycomb Medium die Viabilität und die Anzahl kontrahierender Kardiomyozyten deutlich erhöht war im Vergleich zu dem DMEM Medium.

Ob die Zellen gemeinsam oder hintereinander ausgesät werden sollten, klärten wir als letzten Punkt in der 6-Well-Platte. Lichtmikroskopisch konnte kein Unterschied im

Zellwachstum und in der Zellverteilung festgestellt werden, daher wurde fortan gemeinsam ausgesät.

4.3.1.2 Lichtmikroskopische und elektrophysiologische Beurteilung der reinen Kardiomyozytenkultur und der Kardiomyozyten-Fibroblasten Kokultur auf dem Mikroelektroden Array

Nach diesen Untersuchungen wurde das Volumen zur Zellaussaat auf der Elektrode bestimmt. Dabei zeigten sich 5 µl als angemessen, da der gesamte Mikroelektroden Bereich ohne Verlaufen abgedeckt wurde. Ein größeres Volumen führte zur Ausbreitung des Zell-Medium-Gemisches über den Bereich Mikroelektroden Arrays hinaus und so zu einer zu geringen Anzahl an Zellen auf den Mikroelektroden. Weiterhin wurde die bei der Aussaat benötigte Zellzahl bestimmt, sodass am Messtag ein konfluenter Zellteppich ausgebildet wurde. Eine Anzahl von 250.000 Zellen in 5 µl zeigte sich nach lichtmikroskopischer Beurteilung als angemessen und führte zu einem konfluenten, einheitlich kontrahierenden Zellteppich an Tag 5. Diese Anzahl an Zellen wurde von Mollenhauer et al. und Wells et al. ebenfalls für Messungen auf dem Mikroelektroden Array genutzt^{5,179}. Da die Zellen in einem geringen Volumen ausgesät wurden, musste nach einem bestimmten Zeitabstand restliches Medium hinzugefügt werden. Nach einem Zeitfenster von einer Stunde ohne Medium deuteten die lichtmikroskopischen und elektrophysiologischen Beurteilungen darauf hin, dass die Zellen gestorben sind. Direkt nach dem Aussäen hafteten die Zellen noch nicht auf dem Mikroelektroden Array und schwammten bei Hinzugabe des Mediums weg. Ein Abstand von 15 Minuten zwischen dem Aussäen der Zellen und dem Hinzufügen des Mediums wurde als optimal identifiziert.

Die Fragen bezüglich des Tags der Messung und des adäquaten Verhältnisses bei Aussaat beurteilten wir zusätzlich zu der lichtmikroskopischen Beurteilung durch elektrophysiologische Messungen auf dem Mikroelektroden Array. An Tag 5 zeigten sich gut messbare elektrische Signale, dargestellt durch die Amplitudenhöhe der Feldpotentiale. An den vorherigen Tagen zeigten noch nicht alle Zellen ausreichende elektrische und einheitliche Aktivität, welche an späteren Tagen abnahm (siehe Abbildung 22). Die Beurteilung durch die Analyse der elektrischen Signale stimmte mit der lichtmikroskopischen Beurteilung überein.

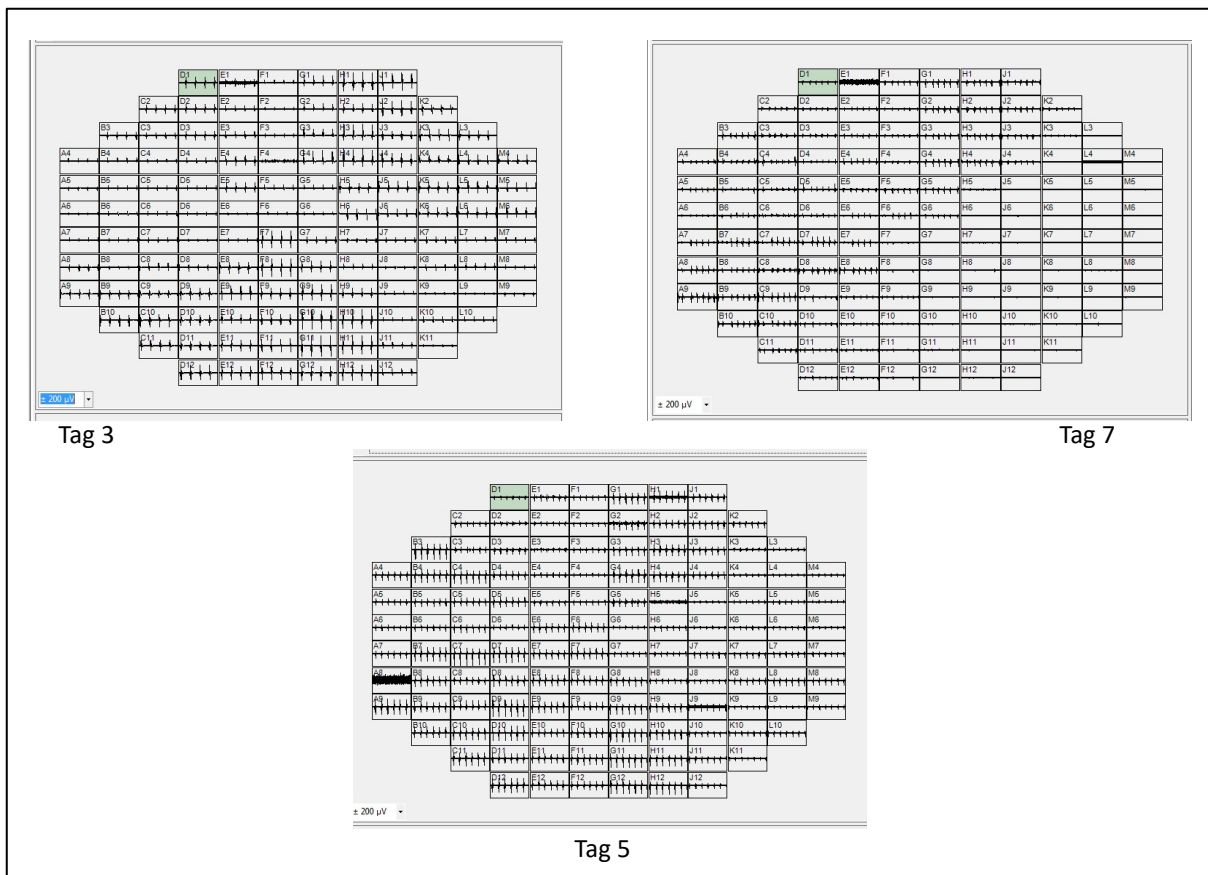


Abbildung 22 Elektrophysiologische Beurteilung der reinen Kardiomyozytenkultur an verschiedenen Tagen. Gezeigt sind drei Screenshots, in denen jeweils die Feldpotentiale der gesamten Kanäle der reinen Kardiomyozytenkultur an unterschiedlichen Tagen abgebildet sind. Die Aufnahme zeigt einen Zeitraum von 5 Sekunden. Von Tag 3 bis Tag 5 lässt sich eine Zunahme der Stärke der Feldpotentiale (dargestellt durch die Amplitudenhöhe) und der Anzahl an Kanälen mit Signalen beobachten. Von Tag 5 bis Tag 7 zeigt sich eine Abnahme der Stärke der Feldpotentiale und der Anzahl an Kanälen mit Signalen.

Bei einem Verhältnis von 90:10 und 95:5 wurde die elektrische Erregungsweiterleitung auf dem Mikroelektroden Array durch die Fibroblasten stark unterbrochen. Ein Verhältnis von 99:1 bei Aussaat stellte sich als adäquat dar, die Erregungsleitung konnte über den gesamten Mikroelektroden Array laufen (siehe Abbildung 23). Das Zellverhältnis verschob sich zu Gunsten der Fibroblasten am Tag der Messung aufgrund der höheren Wachstumsrate.

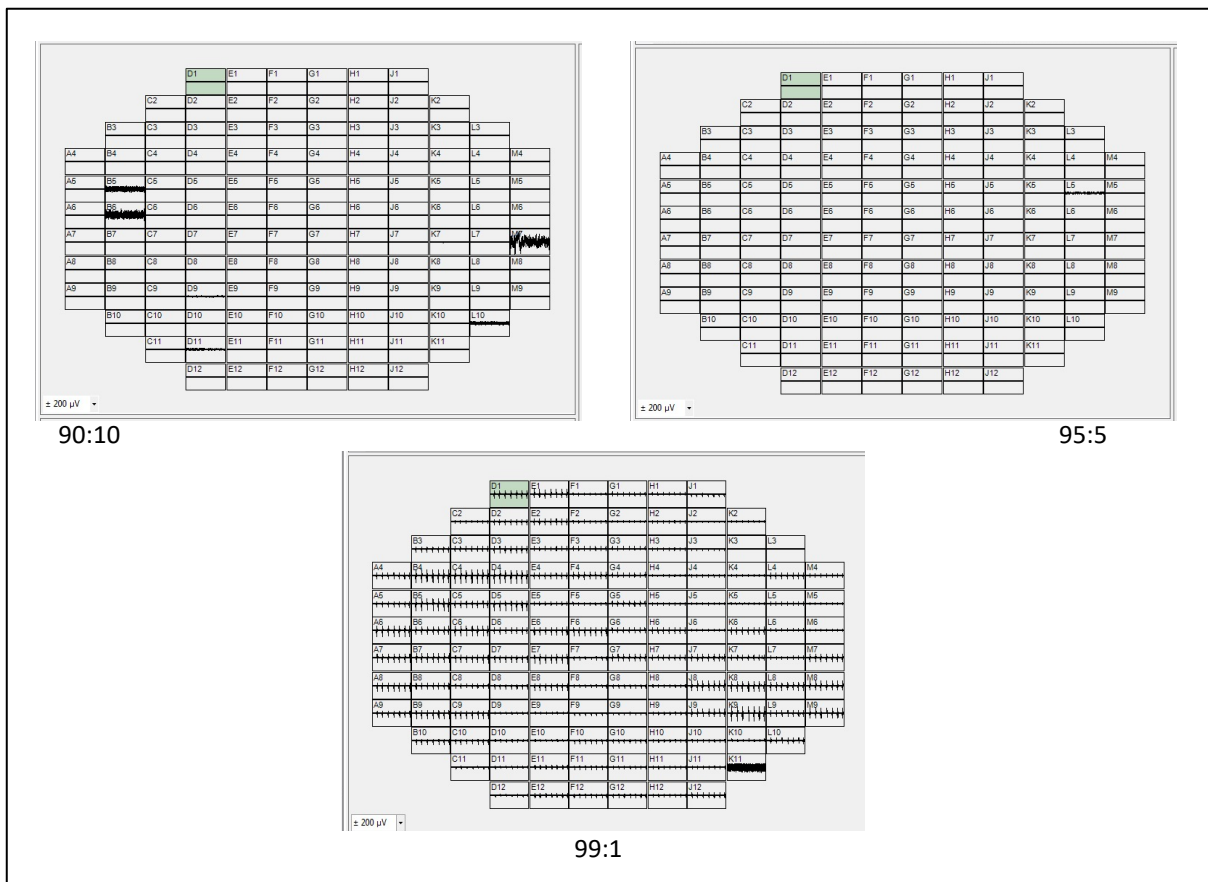


Abbildung 23 Elektrophysiologische Beurteilung unterschiedlicher Verhältnisse der Kokultur. Gezeigt sind drei Screenshots der gesamten Feldpotentiale von Kokulturen aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten mit unterschiedlichen Verhältnissen an Tag 5. Die Aufnahme zeigt einen Zeitraum von 5 Sekunden. Erst ab einem Verhältnis von 99:1 lassen sich elektrische Signale detektieren. 90:10 steht für 90% Kardiomyozyten und 10% Fibroblasten, 95:5 für 95% Kardiomyozyten und 5% Fibroblasten, 99:1 für 99% Kardiomyozyten und 1% Fibroblasten.

4.3.2 Elektrisches Konduktionsprofil der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur

Nachfolgend wurde in der Kokultur aus 99% HL-1 Kardiomyozyten und 1% 3T3-Fibroblasten bei Aussaat und der reinen HL-1 Kardiomyozytenkultur das elektrische Konduktionsprofil anhand verschiedener Parameter charakterisiert. Zu diesen Parametern gehören der Inhomogenitätsindex, die absolute Inhomogenität, der Mittelwert und der Median der Geschwindigkeit (siehe Methodenteil Abschnitt 3.5.2.3 für genaue Definitionen).

Die Kokultur zeigte eine leichte, statistisch nicht-signifikante Erhöhung der Inhomogenität, ausgedrückt durch den Inhomogenitätsindex und die absolute Inhomogenität, im Vergleich zur Kardiomyozyten Reinkultur. Der mittlere Inhomogenitätsindex betrug $4,4 \pm 3,3$ in der Kokultur im Vergleich zu $1,9 \pm 0,3$ in der reinen Kardiomyozytenkultur ($p=0,1$). Der mittlere Wert der absoluten Inhomogenität in der Kokultur war bei 1480 ± 1106 s/m im Vergleich zu 480 ± 78 s/m in der Kardiomyozytenkultur ($p=0,05$).

Weiterhin zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Verlangsamung der medianen Leitungsgeschwindigkeit ($p=0,14$). Der Mittelwert der Geschwindigkeit war signifikant verlangsamt in der Kokultur ($p=0,02$) im Vergleich zur Reinkultur. Der durchschnittliche

Median der Geschwindigkeit in der Kokultur lag bei 3,3 +/- 1,0 mm/s im Vergleich zu 4,1 +/- 0,5 mm/s in der Kardiomyozytenkultur. Der Mittelwert der Geschwindigkeiten in der Kokultur lag bei 2,4 +/- 1,2 mm/s im Vergleich zu 3,9 +/- 0,5 mm/s in der Kardiomyozytenkultur.

Zusammenfassend ist das elektrische Konduktionsprofil zwischen der Kokultur und der reinen Kardiomyozytenkultur zum größten Teil nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 24).

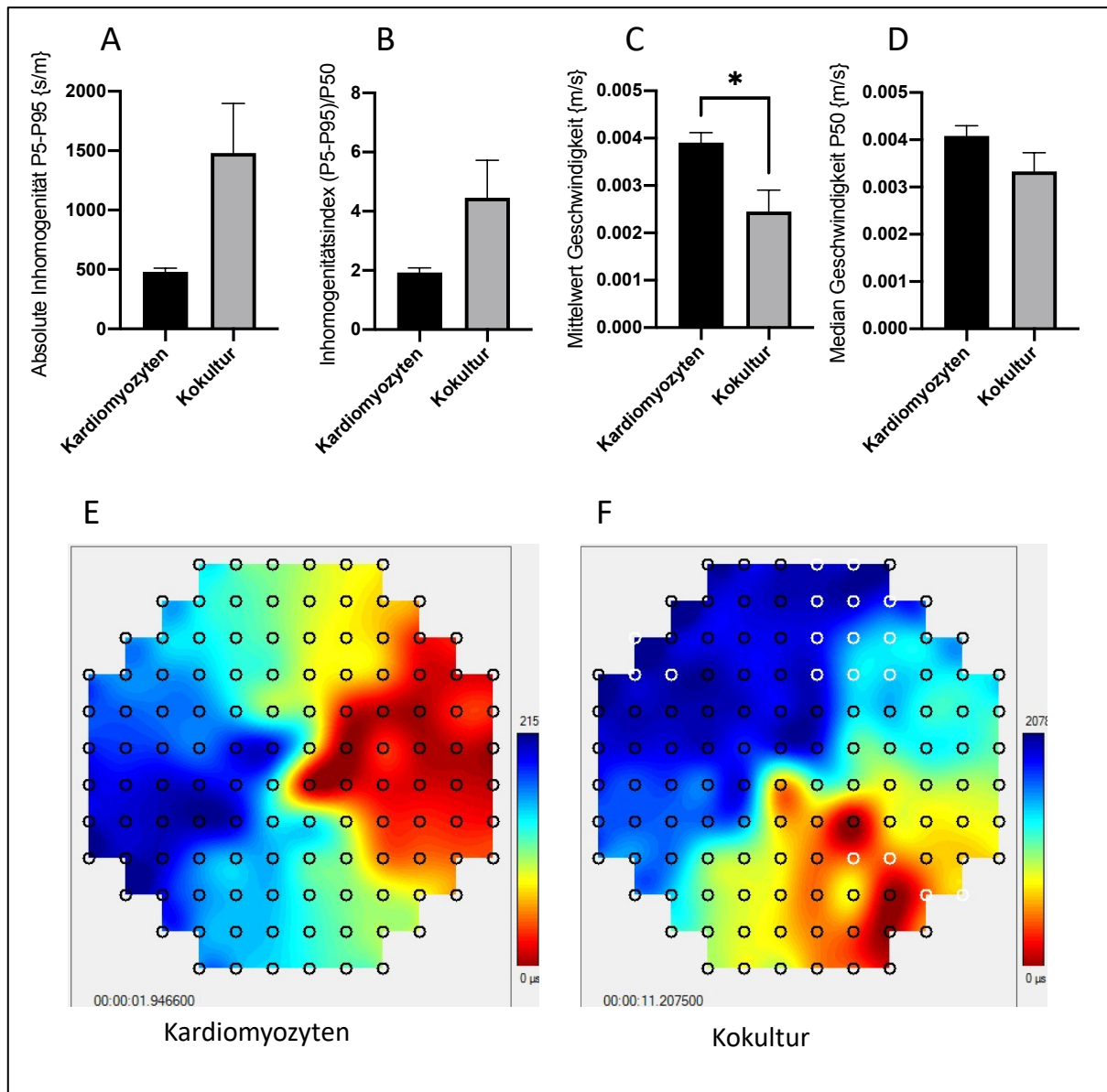


Abbildung 24 Elektrisches Konduktionsprofil der reinen Kardiomyozytenkultur und der Kokultur aus 99% HL-1 Kardiomyozyten und 1% 3T3-Fibroblasten bei Aussaat. (A) Die absolute Inhomogenität zeigt eine nicht signifikant erhöhte Inhomogenität der Kokultur. (B) Der Inhomogenitätsindex zeigt ebenfalls eine nicht signifikant erhöhte Inhomogenität der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur. (C) Gezeigt ist der Mittelwert der Geschwindigkeit mit einem signifikanten Unterschied zwischen Kokultur und Kardiomyozytenkultur. (D) Gezeigt ist der Median der Geschwindigkeit ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kulturen. (E) Repräsentative Aktivierungskarte der reinen Kardiomyozytenkultur. (F) Repräsentative Aktivierungskarte der Kokultur aus 99% HL-1 Kardiomyozyten und 1% 3T3-Fibroblasten bei Aussaat. (A)-(D) n=6 (reine Kardiomyozytenkultur) beziehungsweise 7 (Kokultur) biologische Replikate aus 4 (reine Kardiomyozytenkultur) beziehungsweise 5 (Kokultur) unabhängigen Experimenten; *p<0,05; Student-t-test für ungepaarte Stichproben; dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardfehler.

5. Diskussion

Nach einem akuten Myokardinfarkt ist der plötzliche Herztod eine häufige Todesursache^{6,7}. Der Infarkt verursacht strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzens⁶⁵. Zu den akuten Veränderungen gehört insbesondere die Störung der Calciumhomöostase der Kardiomyozyten². Die langfristigen Veränderungen entstehen im Rahmen des postischämischen kardialen Remodelings, wobei insbesondere die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten mit nachfolgender Fibrose und Kardiomyozyten-Myofibroblasten-Kopplung von großer Bedeutung ist³. Die funktionellen und strukturellen Veränderungen während der akuten Ischämie und dem langfristigen postischämischen Remodeling führen zur Veränderung der Morphologie des Aktionspotentials, der Refraktärzeit, der Erregbarkeit und der Leitungsgeschwindigkeit. Diese veränderte Elektrophysiologie bildet ein Substrat für die allgemeinen Mechanismen der Arrhythmie-Entstehung, wie die abnormale Automatizität, die getriggerte Aktivität mit Nachdepolarisationen und das Reentry^{19,53}.

Nach einem Myokardinfarkt kommt es durch proinflammatorische Signale (Chemokine, Zytokine, apoptotische Zellen) zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet. Neutrophile sezernieren unter anderem MPO in das geschädigte und umliegende Gewebe. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass MPO neben seiner Rolle als Teil des angeborenen Immunsystems ein wichtiger Mediator des postischämischen pro-arrhythmogenen Remodelings ist. MPO-defiziente Mäuse entwickelten nach einem Myokardinfarkt seltener Arrhythmien als WT-Mäuse. Mehrere zugrundeliegende Mechanismen der pro-arrhythmogenen MPO-Effekte wurden entschlüsselt, die jedoch noch nicht in Gänze verstanden sind⁵. Das Ziel dieser Arbeit war es, die zugrundeliegenden Mechanismen, die den pro-arrhythmogenen Effekt der MPO bedingen, genauer zu analysieren. Dafür wurde der Effekt der MPO auf pro-arrhythmogene Signalwege in Kardiomyozyten und Fibroblasten untersucht und ein Modell einer Kardiomyozyten-Fibroblasten-Kokultur auf einem Mikroelektroden Array erstellt, das in Zukunft der Analyse der entschlüsselten Effekte auf das elektrische Konduktionsprofil der Kokultur dienen soll.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. In Kardiomyozyten wurde der Effekt der MPO auf die Calciumhomöostase untersucht.
 - a. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass MPO das Erreichen der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration während der Erregung durch externe Stimulation verzögert und zu vermehrten arrhythmischen Ereignissen in primären murinen Kardiomyozyten führt. Eine Veränderung der basalen Calciumkonzentration durch MPO zeigte sich nicht.
 - b. Weiterhin konnte ein Effekt der MPO auf die Phosphorylierung der CaMKII in HL-1 Zellen beobachtet werden. Nach zwei Stunden MPO-Inkubation zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung an der Autophosphorylierungsstelle Thr286, die mit vermehrter Aktivität assoziiert ist. MPO hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung an den CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen des RyRs (Ser2814) und von PLN (Thr17).

2. In 3T3-Fibroblasten wurde der Effekt der MPO auf die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten analysiert.
 - a. Es zeigte sich moderat erhöhte Phosphorylierung der für die Fibroblasten-Transdifferenzierung wichtige p38 MAPK nach 15-minütiger MPO-Inkubation.
 - b. Nach 36 Stunden MPO-Inkubation ließ sich in 3T3-Zellen keine vermehrte Kollagendeposition beobachten.
3. Es wurde ein Modell einer 2D-Kardiomyozyten-Fibroblasten-Kokultur auf einem Mikroelektroden Array erstellt, das in Zukunft die Untersuchung des funktionellen Effektes der MPO auf das elektrische Konduktionsprofil ermöglicht. Die Analyse des elektrischen Konduktionsprofils der Kokultur zeigte eine nur leicht erhöhte Inhomogenität und leicht verminderte Geschwindigkeit im Vergleich zu der reinen Kardiomyozytenkultur.

5.1 Calciumhomöostase der Kardiomyozyten

Während akuter Ischämie kann es durch die Bildung von pro-arrhythmogenen Substraten zu arrhythmischen Ereignissen kommen¹⁸⁵. Zu den Faktoren, die die Vulnerabilität für Arrhythmien während akuter Ischämie erhöhen, gehören vor allem in der Gruppe der in Phase 1b auftretenden Arrhythmien eine erhöhte Konzentration an Katecholaminen und eine Störung der Calciumhomöostase in den Kardiomyozyten der ischämischen Grenzzone²¹.

Um den Effekt der MPO auf die zelluläre Calciumhomöostase zu untersuchen, wurde der intrazelluläre Calciumgehalt und der Calciumtransient mittels fluorometrischer Messungen analysiert. Weiterhin wurden wichtige Regulatoren der Calciumhomöostase (CaMKII, RyR und PLN) bezüglich Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen untersucht.

5.1.1 Intrazelluläre Calciumkonzentration und Anzahl arrhythmischer Ereignisse

Eine Erhöhung der basalen Calciumkonzentration durch MPO konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Fukui et al. beobachteten eine Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration in murinen ventrikulären Kardiomyozyten bei Inkubation mit HOCl¹⁶⁵. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die in unseren Versuchen durch MPO generierte Konzentration an HOCl niedriger ist als bei direkter Gabe von 100µM HOCl.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zwar vorliegt, diese aber durch die Betrachtung der *globalen* Calciumkonzentration nicht sichtbar gemacht werden kann, da sich die Erhöhung der Calciumkonzentration nur in kleinen Bereichen der Zelle, den sogenannten Mikrodomänen, abspielt. Mikrodomänen sind definiert als durch Calcium ausgelöste Signalereignisse, die an spezifischen Orten in der Zelle stattfinden¹⁸⁶. Zu den Mikrodomänen gehören zum Beispiel der Spalt zwischen dem Sarkolemm entlang der T-Tubuli und der junktionalen SR-Membran, in dem sich L-Typ VOCCs und RyRs in hoher Konzentration und unmittelbarer Nähe befinden. Die Calciumkonzentration im junktionalen Spalt ist höher und zeigt ein schnelleres Anfluten im Vergleich zum restlichen Zytosol^{187,188}. In Zukunft sollte die Calciumkonzentration zum Beispiel

mithilfe eines fluoreszierenden Calciumsensors und eines Konfokalmikroskops innerhalb der Mikrodomänen analysiert werden. Die Calciumkonzentration des SRs wurde hier nicht ermittelt. Diese ist in Hinblick einer möglichen Erhöhung interessant, da sie spontane Calciumfreisetzungen und somit die Entstehung von EAD/DADs begünstigt⁵⁷. In zukünftigen weiterführenden Experimenten sollte daher die Analyse der SR -Calciumkonzentration angestrebt werden, zum Beispiel durch Verwendung von Koffein zur Stimulation der SR- Entleerung (siehe Mollenhauer et al.⁸⁶).

Bei genauerer Untersuchung der einzelnen Calciumtransienten konnte in isolierten Kardiomyozyten nach zweiter Burst-Stimulation eine signifikante Verzögerung des Erreichens der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration (dargestellt durch die *Time to 50% Peak* und *Time to Peak*) bei MPO-Inkubation beobachtet werden. Die maximale Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (dargestellt durch die *Peak height*) und die Zeit bis zum Erreichen von 90% der basalen intrazellulären Calciumkonzentration während des Calciumausstroms aus der Zelle (dargestellt durch die *Time to 50% und 90% Baseline*) blieben unverändert. Der Calciumeinstrom in die Zelle wird demnach durch MPO verändert, der Calciumausstrom aus der Zelle wird nicht durch MPO verändert.

Für den Aufstieg des Calciumtransienten sind der L-Typ VOCC und der RyR verantwortlich. Zu den beschriebenen Veränderungen während der Ischämie gehören eine verminderte Aufstrichsrate des Calciumtransienten und die verminderte Kinetik des L-Typ VOCCs und des RyRs, was zu der beobachteten Verzögerung des Calciumpeaks passt. Hammerschmidt et al. beschreiben einen verminderten *Peak* des Calciumstroms durch den L-Typ VOCC in murinen ventrikulären Kardiomyozyten bei Inkubation mit HOCl¹⁶⁶.

Nach der zweiten Burst-Stimulation zeigte sich in isolierten murinen Kardiomyozyten nicht nur ein verzögerter Calciumpeak, sondern auch eine erhöhte Anzahl arrhythmischer Ereignisse nach MPO-Inkubation, was eine Relevanz der Veränderung des Calciumtransienten vermuten lässt.

Eine geringe Imbalance der Calciumhomöostase einer Kardiomyozyte kann zu elektrischen Störungen und damit zu Arrhythmien auf Gewebesebene führen¹⁸⁹. Der verzögerte Calciumpeak durch MPO könnte den beschriebenen Mechanismus der *Late Phase 3 EAD* verstärken, in dem er dazu beiträgt, dass eine relativ zu hohe Calciumkonzentration bei bereits niedrigem Membranpotential durch die kurze APD bei Ischämie entsteht. MPO könnte auf diese Weise eine relevante Veränderung der Calciumhomöostase im Rahmen der Arrhythmogenese bewirken. Diese Relevanz besteht bisher nur theoretisch in ischämischen Zellen mit verkürzter APD.

Die arrhythmischen Ereignisse könnten auch durch spontane Calciumlecks aus dem SR unabhängig von dem veränderten Calciumtransienten im Rahmen der elektromechanischen Kopplung ausgelöst werden.

Da der direkte Zusammenhang zwischen der Calciumkonzentration, dem Membranpotential der Zelle (und damit der APD) und den arrhythmischen Ereignissen in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, lässt sich darüber keine genauere Aussage treffen. Weiterhin wurde in den Analysen nicht zwischen den verschiedenen Arten von arrhythmischen Ereignissen (siehe Abbildung im Methodenteil; Doppelpeak, Transient außerhalb des Pacings und Flimmern der intrazellulären Calciumkonzentration) differenziert.

Mehrere Mechanismen tragen zur Entstehung von EADs und DADs bei, die jedoch nicht alle ausreichend verstanden sind. Relevante Faktoren in der Entstehung von EADs und DADs sind Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration und der Amplitude des Calciumtransienten mit gleichzeitigen Veränderungen der APD, der Beat-to-Beat Variabilität der APD, der Morphologie des Aktionspotentials und des Plateaupotentials, des Membranstroms und der tatsächlichen Verfügbarkeit von L-Typ VOCCs. Ungeachtet des zugrundeliegenden Mechanismus der EAD- und DAD-Entstehung entsteht eine getriggerte Aktivität, wenn der depolarisierende Effekt der EAD beziehungsweise DAD auf das Membranpotential ausreicht, um die spannungsgesteuerten Natriumkanäle zu aktivieren¹⁸⁹. Trotz anhaltender Fortschritte in diesem Forschungsbereich bleibt das Verständnis der mechanistischen Verbindung zwischen Störungen der zellulären Calciumhomöostase und der Entstehung kardialer Arrhythmien unzureichend¹⁹⁰.

Zusammenfassend führt MPO in zweifach Burst-stimulierten Zellen zu einer Störung der Calciumhomöostase und einer erhöhten Anzahl an arrhythmischen Ereignissen der intrazellulären Calciumkonzentration. Ob und durch welchen Mechanismus diese Störung der Calciumhomöostase die Ursache für die arrhythmischen Ereignisse ist, muss in Zukunft geklärt werden. Der Zusammenhang zwischen (verändertem) Calciumtransienten, Membranpotential und den verschiedenen Arten der arrhythmischen Ereignisse sollte differenziert analysiert werden. Weiterhin sollte die Relevanz der arrhythmischen Ereignisse der intrazellulären Calciumkonzentration in Zusammenhang mit der Kontraktion der Zelle beurteilt werden. Um die funktionelle Konsequenz der MPO Effekte auf die einzelnen Calciumkanäle zu diskriminieren, sollten diese in weiteren IonOptix-Untersuchungen nach MPO-Inkubation stimuliert beziehungsweise inhibiert werden.

5.1.2 Posttranslationale Modifikationen der Regulatoren der Calciumhomöostase

Erhöhte Aktivität der CaMKII spielt eine kritische Rolle in der Entstehung von kardialen Pathologien, insbesondere auch von Arrhythmien²⁶. In mehreren Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der CaMKII im Rahmen eines Myokardinfarktes zur Reduktion von ventrikuläre Arrhythmien führt²⁵. Der anti-arrhythmische Effekt der CaMKII-Inhibition wurde ebenfalls im Rahmen der ischämischen Herzkrankheit untersucht. Erhöhte Level von oxidiertem CaMKII wurden in einem etablierten Tiermodell mit Arrhythmien nach Myokardinfarkt beobachtet¹⁸⁷. Weiterhin zeigen Simulationen, dass eine Überaktivität der CaMKII ein arrhythmogenes Substrat nach einem Myokardinfarkt darstellt, während die Inhibition der CaMKII das *Calciumhandling* und die Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals im ischämischen Grenzgebiet verbessert^{191,192}. Sag et al. beobachteten ebenfalls, dass die erhöhte Aktivität der CaMKII zur Arrhythmogenese bei Mäusen beiträgt und die CaMKII-Inhibition kardiale Arrhythmien in vivo und in vitro reduziert¹⁹³.

CaMKII fördert Arrhythmien über Veränderungen der SR-Aufnahme und -Freilassung von Calcium. Eine Hyperphosphorylierung des RyRs an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser2814 führt zur vermehrten Calciumfreisetzung aus dem SR, was die Entstehung von Nachdepolarisationen fördert²⁵. Ein weiteres Zielprotein der CaMKII ist PLN. Dessen Hyperphosphorylierung an der CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstelle Thr17 führt zu erhöhter SERCA Aktivität, somit zu vermehrtem Zurückpumpen von Calcium in das SR und Erhöhung der

Calciumkonzentration des SR²⁵. Eine erhöhte Calciumkonzentration des SRs ist im Rahmen einer erhöhten CaMKII Aktivität bezüglich der Entstehung von Nachdepolarisationen nachteilig²⁵. Die Bindung von Ca-CaM mit folgender Konformationsänderung ist Voraussetzung für die Aktivierung der CaMKII⁵⁰. Nach Exposition der katalytischen Region durch Bindung von Ca-CaM kann die CaMKII durch Autophosphorylierung oder Oxidierung unabhängig von der Bindung von Ca-CaM aktiv bleiben^{41,51,52}.

5.1.2.1 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII in HL-1 Kardiomyozyten

Um den Einfluss der MPO auf die Aktivierung der CaMKII zu untersuchen, wurde der Status der Autophosphorylierung der CaMKII in Anwesenheit von MPO im Vergleich zu H₂O₂ und Isoprenalin analysiert. Eine vermehrte Autophosphorylierung ist mit erhöhter Aktivität assoziiert⁸⁷. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bereits nach 30 Minuten Inkubation mit MPO+H₂O₂ ein leichter Anstieg der CaMKII-Phosphorylierung nach in HL1 Zellen zu beobachten ist, welcher nach 2 Stunden signifikant ist. Nach sechs Stunden zeigt sich kein Effekt mehr. CaMKII Aktivierung kann dabei über ROS und insbesondere HOCl erfolgen, welche eine Oxidation mit anschließender Autophosphorylierung der CaMKII bewirken⁸⁶.

Neben dem Einfluss der MPO auf die Phosphorylierung der CaMKII, wurde untersucht, ob H₂O₂, als Vertreter unspezifischer reaktiver Sauerstoffspezies, und Isoprenalin, als Induktor der β -adrenergen Stimulation, in HL-1 Kardiomyozyten zur Veränderung des Phosphorylierungsstatus der CaMKII führten. Nach 30-minütiger und zweistündiger Inkubation mit H₂O₂ zeigte sich in HL-1 Zellen eine moderat erhöhte CaMKII-Phosphorylierung. Xie et al. zeigten in isolierten murinen ventrikulären Kardiomyozyten indirekt über die Inhibition der CaMKII, dass oxidativer Stress in Form von H₂O₂ zur Aktivierung der CaMKII führt. Dabei wurde der Phosphorylierungs- bzw. Oxidierungsstatus nicht untersucht¹⁹⁴.

Übereinstimmend mit der Literatur konnte die Autophosphorylierung und Aktivierung von CaMKII durch β -adrenerge Stimulation gezeigt werden^{25,87,195,196}. Behandlung mit Isoprenalin erhöhte nach 30 Minuten signifikant die CaMKII-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Nach zwei und sechs Stunden zeigte sich kein Unterschied mehr. Inhibition der CaMKII konnte Isoprenalin-induzierte Arrhythmien in hypertrophen Mäuseherzen reduzieren¹⁹⁷. In der Literatur wird meist durch indirekte *Readouts*, zum Beispiel durch die vermehrte Phosphorylierung von Zielproteinen an CaMKII-spezifischen Stellen, gezeigt, dass die β -adrenerge Stimulation zur Aktivierung der CaMKII führt. Der genaue Mechanismus, durch den die β -adrenerge Stimulation die CaMKII aktiviert, ist noch nicht ausreichend verstanden⁸⁷.

5.1.2.2 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus des RyRs und PLN in HL-1 Kardiomyozyten

Anschließend wurde der direkte Effekt von MPO, H₂O₂ und Isoprenalin auf die Phosphorylierung von Zielproteinen der CaMKII untersucht, die wichtig für die Regulation der Calciumhomöostase sind.

Da CaMKII-Phosphorylierung nach zweistündiger MPO+H₂O₂ Inkubation erhöht war, wurde hypothetisiert, dass RyR und PLN ebenfalls phosphoryliert waren als CaMKII Ziele. Die Behandlung mit MPO, H₂O₂ und Isoprenalin hatte keinen Effekt auf den

Phosphorylierungsstatus des RyRs und von PLN an den CaMKII-spezifischen Phosphorylierungsstellen.

Inkubation mit H₂O₂ zeigte hier nur eine moderat erhöhte CaMKII-Phosphorylierung, sodass eine ebenfalls marginale Veränderung der Phosphorylierung der CaMKII Ziele RyR und PLN nicht verwundert.

Isoprenalin führt über den β -adrenergen Signalweg und PKA zu einer vermehrten Phosphorylierung von PLN und des RyR. Da sich die Phosphorylierungsstellen zwischen CaMKII und PKA unterscheiden, kann hierzu keine Aussage getroffen werden⁸⁷. Eine vermehrte Phosphorylierung des RyRs und von PLN wurde bei erhöhter CaMKII-Phosphorylierung durch Isoprenalin nach 30 Minuten erwartet in Analogie zu Mollenhauer et al., die eine vermehrte Phosphorylierung von PLN und des RyRs nach 10 Minuten Isoprenalin-Inkubation bei vermehrter CaMKII-Aktivität in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten beobachteten⁸⁶. Diese Beobachtung konnte unter den Inkubationsbedingungen in dieser Arbeit nicht gemacht werden.

Die Effekte der MPO, von H₂O₂ und Isoprenalin auf die CaMKII in HL-1 Zellen unter diesen Inkubationsbedingungen erscheinen nicht ausreichend, um eine Veränderung der Phosphorylierungsmuster in Zielproteinen der CaMKII beobachten zu können.

Die HL-1 Zelllinie ist eine kardiale Myozytenzelllinie, die in Passage gehalten werden kann und dabei die Fähigkeit zu kontrahieren wie auch differenzierte kardiale morphologische, biochemische und elektrophysiologische Eigenschaften beibehält. Die Zellen stammen von einem atrialen Kardiomyozytentumor in AT-1 Mäusen ab. Die ultrastrukturellen Eigenschaften der HL-1 Zellen sind typisch für embryonale atriale Kardiomyozyten, die keine T-Tubuli besitzen. Ebenso ähnelt das Muster der Genexpression dem adulter atrialer Myozyten. Immunhistochemische Färbungen weisen auf eine Verteilung von herzspezifischen Markern hin, die der Verteilung in atrialen Kardiomyozyten entspricht¹⁷⁴.

Das Fehlen der T-Tubuli führt zu einer veränderten elektromechanischen Kopplung. T-Tubuli bilden den ultrastrukturellen Rahmen, der L-Typ VOCCs und RyRs räumlich nah aneinander bringt, um die calciuminduzierte Calciumfreisetzung zu erleichtern. CaMKII ist in der Umgebung der Membran der T-Tubuli in hohen Mengen vorhanden. Die Gegenwart der CaMKII in direkter Nähe zu L-Typ VOCCs und RyRs dient der Koordinierung und Förderung der physiologischen Aktivierung dieser Regulatoren der Calciumhomöostase. Die Mikrodomäne der T-tubulären Membranen ist ein Epizentrum für die Entstehung von Arrhythmien²⁵. Es ist vorstellbar, dass die ultrastrukturellen Unterschiede, vor allem das Fehlen der T-Tubuli, zur Veränderung der Lokalisation der CaMKII in Bezug auf die untersuchten Proteine in HL-1 Zellen führt. Weiterhin ist CaMKII nicht durch Ankerproteine an ihre Targets gebunden, sondern identifiziert Targets durch das Erkennen von Regionen, die der eigenen autoinhibitorischen Region ähneln²⁵. Voraussetzung dafür ist die räumliche Nähe der CaMKII zu ihren Zielproteinen. Die veränderte Ultrastruktur mit womöglich größerer Entfernung zwischen der CaMKII und ihren Zielproteinen kann gegebenenfalls den fehlenden Effekt der CaMKII auf den RyR und PLN erklären. Es wird deutlich, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane ventrikuläre Kardiomyozyten limitiert ist.

5.1.2.3 Effekt der MPO auf den Phosphorylierungsstatus der CaMKII und des RyRs in iPS-Kardiomyozyten

Weiterhin wurde der Effekt der MPO auf die CaMKII und den RyR in iPS-Kardiomyozyten untersucht. Ebenfalls konnten hier keine starken Effekte durch MPO, H₂O₂ oder Isoprenalin auf die CaMKII-Phosphorylierungsmuster gezeigt werden. Isoprenalin erhöhte CaMKII-Phosphorylierung moderat nach 30 Minuten, was zu der Beobachtung in HL-1 Zellen passt, wo sich ein signifikanter Unterschied zeigte.

Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) können aus adulten humanen Hautfibroblasten erzeugt werden und besitzen eine bemerkenswerte selbsterneuernde Kapazität und das Potential zu echten Kardiomyozyten zu differenzieren. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass iPSCM einen unreifen Phänotyp aufzeigen¹⁹⁸. Die Kinetik des Calciumhandlings in iPSCM scheint relativ langsam zu sein und wird durch einen U-förmigen Calciumtransienten charakterisiert, was auf einen nicht vollständig entwickelten Mechanismus der Calcium-induzierten Calciumfreisetzung in den Zellen hinweist. iPSCM weisen ein unterentwickeltes SR und keine T-Tubuli auf, was die Eigenschaften des Calciumhandlings verändert¹⁹⁹. Das Fehlen der T-Tubuli führt, wie erwähnt, zur räumlichen Separation des L-Typ VOCC und RyRs. Es wurde gezeigt, dass die Expression der RyR und SERCA im Vergleich zu embryonalen Stammzellen signifikant erniedrigt ist²⁰⁰. Weiterhin wurden räumliche Inhomogenitäten bezüglich des Calciumtransienten innerhalb der Zelle beobachtet: der Anstieg von Calcium in der Peripherie ist schneller als in der Zellmitte, was durch fehlende T-Tubuli zu erklären ist¹⁹⁹. Eine detaillierte Charakterisierung der iPSCM zeigte, dass sie molekulare, elektrophysiologische, metabolische, mechanische und ultrastrukturelle Eigenschaften besitzen, die mit denen primärer humanen Kardiomyozyten übereinstimmen, jedoch ebenfalls diverse funktionelle Charakteristika aufzeigen, die eher fetalen Kardiomyozyten ähneln¹⁹⁹.

Wie bei HL-1 Zellen unterscheiden sich Ultrastruktur und die elektrophysiologischen Eigenschaften der iPS-Kardiomyozyten von humanen nativen Kardiomyozyten. Das beschriebene unreife Calciumsignaling in iPSCM könnte eine mögliche Erklärung für fehlende Effekte nach MPO Behandlung sein. Die geringe Expression von RyR erschwert die Untersuchung dieses Proteins. Bei der Differenzierung der iPS-Kardiomyozyten entsteht eine heterogene Population aus atrialen, ventrikulären und nodalen Zellen. Native atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten zeigen Unterschiede bezüglich molekularer und funktioneller Eigenschaften¹⁹⁹.

Weiterhin ist es möglich, dass iPS-Zellen trotz sorgfältiger Durchführung der Differenzierung nicht ausreichend differenziert waren. Im Rahmen der manuellen Entfernung von nicht-kontrahierenden Zellen konnten einige Zellen übersehen worden sein, was eine unreine Kardiomyozytenkultur zur Folge hätte und eventuelle Effekte abschwächte.

Die Untersuchungen der Calciumregulatoren wurden in zwei unterschiedlichen Kardiomyozytenkulturen durchgeführt. Ein Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften unterschiedlicher Kardiomyozytenkulturen zeigte deutliche Unterschiede. HL-1 Zellen weisen eine deutlich langsamere Leitungsgeschwindigkeit und eine kürzere Feldpotentialdauer als iPS-Kardiomyozyten auf¹⁷⁹. Die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien erklären möglicherweise, warum die Ergebnisse der Analyse der posttranslationalen Modifikationen der Calciumhomöostase-Regulatoren in HL-1 Zellen und iPSCM nicht vollständig übereinstimmen.

Bei der Untersuchung von Phosphorylierungen muss beachtet werden, dass diese Modifikationen typischerweise transient sind und durch vielfache physiologische und pathologische Faktoren moduliert werden können²⁰¹. Eine transiente Erhöhung der Phosphorylierung kann vorgelegen haben, die durch die gewählten Messpunkte hier nicht erfasst werden konnte.

Zusammenfassend zeigt MPO einen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus an der Autophosphorylierungsstelle Thr286 und damit die Aktivität der CaMKII nach zwei Stunden. Dieser Effekt sollte in zukünftigen weiterführenden Untersuchungen genauer analysiert werden. Zusätzlich zum Phosphorylierungsstatus sollte der Oxidierungsstatus der CaMKII, der ebenfalls mit ihrer Aktivität assoziiert ist, analysiert werden, da MPO über die Generierung von ROS wirkt. Der Effekt von MPO auf die CaMKII sollte ebenfalls durch die direkte Messung CaMKII-Aktivität analysiert werden, wie durch Mollenhauer et al. beschrieben⁸⁶. Weiterhin sollte der Effekt der MPO auf posttranslationale Modifikationen und die Kinetik der weiteren Regulatoren der Calciumhomöostase (L-Typ VOCC, RyR, PLN) untersucht werden, insbesondere auch im Hinblick auf mögliche Erklärungen und zugrundeliegende Mechanismen der beobachteten Veränderung des Calciumtransienten. Um die erwähnten Limitationen der von uns genutzten Zelllinien zu vermeiden, könnten die zukünftigen Untersuchungen in primären isolierten murinen Kardiomyozyten oder in der humanen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 durchgeführt werden.

5.1.3 Synopse der Effekte der MPO auf die Calciumhomöostase

Bei der gemeinsamen Betrachtung der Effekte der MPO auf die zytosolische Calciumkonzentration nach 15 Minuten und auf die Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen der CaMKII, RyR und PLN nach 30 Minuten fällt auf, dass diese übereinstimmen. MPO zeigte keinen Effekt auf die basale Calciumkonzentration der isolierten Zellen, was mit der nicht erhöhten Phosphorylierung der CaMKII nach 30 Minuten MPO-Inkubation korreliert. RyR ist gemeinsam mit L-Typ VOCC verantwortlich für den Aufstieg des Calciumtransienten. Die nicht erhöhte Phosphorylierung und Aktivierung des RyR nach 30 Minuten MPO-Inkubation passt mit der beobachteten Verzögerung des *Peaks* zusammen. Die verminderte Aktivität des RyR könnte durch eine geringere Verfügbarkeit oder eine geringere Calciumsensibilität verursacht werden. PLN, als wichtiger Regulator der SERCA, ist gemeinsam mit dem NCX zuständig für den Abfall des Calciumtransienten. Die Beobachtung, dass die unveränderte Phosphorylierung von PLN vorliegt, was zu einer vermehrten Aktivität der SERCA und so zu einem schnelleren Erreichen der Baseline führen würde, spiegelt sich in der Morphologie des Calciumtransienten wider, die keine Veränderung der *Time to 90% Baseline* zeigt. Da MPO einen Effekt auf die Phosphorylierung der CaMKII nach zwei Stunden zeigt, wäre es interessant, in Zukunft den Effekt der MPO auf den Calciumtransienten und die basale Calciumkonzentration nach zwei Stunden zu analysieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist es von großer Bedeutung, einige methodische Limitationen zu beachten, die im Folgenden erläutert werden.

In dieser Arbeit wurde die Calciumhomöostase der Kardiomyozyten untersucht, ein sehr sensibles System, das durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem der Energiemetabolismus der Zelle, der pH-Wert und die Redox Homöostase der Zelle. Die Verfügbarkeit von ATP beeinflusst die Funktion verschiedener Pumpen; unter anderem ist SERCA-Aktivität ATP-abhängig²⁸.

Eine Azidose führt zur Ablösung von Protein-gebundenen Calciumionen² und zur Inhibition einiger Ionenkanäle^{68,69}. Eine Disbalance zwischen ROS Produktion und Antioxidantien kann zur oxidativen Modifikation von Regulatoren der Calciumhomöostase führen und diese stören²⁹. Da Kardiomyozyten unterschiedlich stark kontrahieren und so in unterschiedlichem Maße Energie verbrauchen, unterscheiden sich die genannten Faktoren von Zelle zu Zelle. So kann die Calciumhomöostase zwischen einzelnen Zellen variieren. Da die zelluläre Calciumkonzentration die Aktivierung der CaMKII über Ca-CaM-Bindung beeinflusst⁵⁰, können bereits leichte Schwankungen der Calciumkonzentrationen die CaMKII-Aktivierung beeinflussen.

In den Experimenten dieser Arbeit haben wir den Einfluss der MPO untersucht, die hauptsächlich Effekte über die Generierung von ROS bewirkt. Für die Wirkung von ROS ist die Redox Homöostase der Zellen von großer Bedeutung. Der Redoxstatus des intrazellulären Milieus wird durch eine Vielzahl von Redox-aktiven Verbindungen kontrolliert. ROS und reaktive Stickstoffspezies (RNS) werden als die relevantesten Redox-aktiven Moleküle angesehen. Endogene Quellen für ROS sind die mitochondriale Elektronentransportkette, die Xanthinoxidase und die NAD(P)H-Oxidase²⁰². Die Hauptelemente der antioxidativen Strategien stellen Glutathion, NAD⁺/NADH, Thioredoxin, die Superoxiddismutase und die Katalase dar²⁰². Effekte von ROS werden durch deren Produktionslevel und Kompartiment-spezifische antioxidative Pools beeinflusst²⁹. Aufgrund der spezifischen Lokalisation von Enzymen, die die zytosolische Redox Homöostase regulieren, scheint es, dass die Redox Regulation in zytosolischen Kompartimenten stattfindet, die jeweils unterschiedliche Redox Status besitzen²⁰². Die Produktion von ROS und antioxidativen Pools ist vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig. Mitochondrien stellen ATP unter Sauerstoffverbrauch her (oxidative Phosphorylierung). Bei erhöhter kardialer Arbeitslast wird die glykolytische ATP-Generierung erhöht. Die metabolische Verschiebung zur Glykolyse ist von wichtiger Bedeutung für den Redoxstatus der Kardiomyozyten. Die Veränderung des Energiestoffwechsels führt zu Veränderungen in der Aktivität und Verfügbarkeit von verschiedensten Proteinen, wie zum Beispiel der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), welche zur Generierung von NADPH beiträgt. NADPH ist essentiell für die Erhaltung des antioxidativen Glutathions. G6PDH übt eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Redoxstatus, der Calciumhomöostase und der kontraktile Funktion der Zelle aus²⁹. Das Verhältnis von NADH/NAD⁺ ist abhängig von Veränderungen des Zellmetabolismus und kann als Indikator des metabolischen Status einer Zelle interpretiert werden²⁰². Es wird klar, dass die Balance zwischen Redoxstatus der Zelle und Zellmetabolismus wichtiger ist als oxidativer Stress per se. Je nachdem wie stark und schnell die hier untersuchten Zellen kontrahierten, lagen unterschiedliche metabolische Zustände und somit auch unterschiedliche zelluläre antioxidativen Möglichkeiten vor.

Zusätzlich weist die Untersuchung von ROS-abhängigen Modifikationen von intrazellulären Signalwegen weitere relevante experimentelle Limitationen auf. Aufgrund der hohen Reaktivität der ROS besitzen diese eine sehr limitierte Diffusionsweite mit einer Reichweite von wenigen Nanometern²⁰². Die einmalige Gabe von MPO mit H₂O₂ beziehungsweise H₂O₂ übt aufgrund der Flüchtigkeit der ROS gegebenenfalls nur kurzzeitig einen Effekt auf die Zellen aus. In zukünftigen Versuchen könnte dieser Problematik durch die wiederholte Gabe von MPO mit H₂O₂ beziehungsweise H₂O₂ entgegengewirkt werden.

Die Ergebnisse hier weisen darauf hin, dass MPO einen Effekt auf die Calciumhomöostase zu haben scheint. Dies zeigt sich in der Verzögerung des Erreichens des Calciumpeaks, der erhöhten Anzahl an arrhythmischen Ereignissen und der vermehrten CaMKII-Phosphorylierung nach zwei Stunden MPO-Inkubation. Es bleibt offen, wie genau die Veränderungen zur Arrhythmogenese beitragen und welche Mechanismen den Beobachtungen zugrunde liegen. Weiterhin werden die Limitationen der in vitro Methoden deutlich. Um robuste Befunde bezüglich des Effekts der MPO auf die Calciumhomöostase in Kardiomyozyten zu erhalten, sind weitere Analysen notwendig, für die einige Beispiele genannt wurden.

5.2 Transdifferenzierung der Fibroblasten

Nach einem Myokardinfarkt kann es im umliegenden nicht-infarzierten Gewebe zu einem langfristigen strukturellen und funktionellen kardialen Remodeling mit proarrhythmogenen Eigenschaften kommen, wenn die Phasen der Wundheilung exzessiv verlaufen oder nicht beendet werden^{3,14,103,104}. Im Rahmen der Wundheilung kommt es in der proliferativen Phase zur Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten sezernieren hohe Mengen an proinflammatorischen und pro-fibrotischen Faktoren sowie Extrazellulärmatrix-Proteinen (Kollagen, Laminin, Fibronectin, MMPs, TIMPs^{123,124}). Dies führt zu einer disproportionalen Zunahme und Veränderung der Qualität der Extrazellulärmatrix bis hin zur Fibrose. Die Fibrose erhöht die Empfindlichkeit des Myokards für Arrhythmien⁸. Es wird deutlich, dass die Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten eine wichtige Rolle in der Entstehung postischämischer Arrhythmien spielt.

5.2.1 Transdifferenzierung über die p38 MAPK

In Mäusen verhindert der Verlust des Gens für die p38 MAPK die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die nachfolgende Fibrose nach Ischämie. Transgene Mäuse mit aktivierter p38 MAPK hingegen entwickeln eine kardiale interstitielle und perivaskuläre Fibrose als Folge einer erhöhten Anzahl an Myofibroblasten. Pharmakologische Inhibitoren der p38 MAPK Aktivität reduzieren das fibrotische Remodeling in erkrankten Herzen²⁰³. Diese Studien zeigen, dass die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten unter anderem über eine Aktivierung des p38 MAPK Signalweges induziert wird²⁰⁴.

Wie andere Mitglieder der MAPK Familie wird die p38 MAPK durch eine duale Phosphorylierung von Thr und Tyr in einer Thr-Gly-Tyr Sequenz aktiviert²⁰⁵.

Eine Aktivierung kann unter anderem über TGF- β , ROS, inflammatorische Zytokine, Hormone, mechanischen Stress und Angiotensin II¹²³ erfolgen, wobei TGF- β der bestuntersuchte Induktor der Transdifferenzierung ist. In isolierten murinen kardialen Fibroblasten wurde gezeigt, dass MPO p38 MAPK aktiviert und so die Transdifferenzierung der Fibroblasten induziert⁵.

Aktivierte MAP-Kinasen übertragen ein Signal von der Zellmembran auf den Nukleus und regulieren die Genexpression. So resultiert die Aktivierung der p38 MAPK in Fibroblasten in einer veränderten transkriptionalen Regulation von Genen, welche die Zellproliferation und die Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen kontrollieren^{123,204}.

Es stellte sich die Frage, ob MPO auch in 3T3-Fibroblasten einen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK im Vergleich zu TGF- β und H₂O₂ zeigt, da diese Zellreihe für die Erstellung der Kokultur benutzt wurde.

Inkubation mit MPO für 15 Minuten erhöhte die Phosphorylierung der p38 MAPK in 3T3 Fibroblasten stark, nach 30 Minuten zeigte sich kein Effekt mehr. Mollenhauer et al. konnten anhand von Immunfluoreszenzfärbungen eine erhöhte Anzahl an Myofibroblasten in Herzen von WT-Mäusen im Vergleich zu Herzen von MPO-defizienten Mäusen beobachten. In vitro wurde gezeigt, dass MPO nach 15-minütiger Inkubation eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK in isolierten Fibroblasten induzierte und über diesen Mechanismus zur Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten führt⁵.

Andere Studien zeigten in Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen und dermalen Fibroblasten eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK nach 15- bis 30-minütiger Inkubation mit HOCl, einem wichtigen Effektor der MPO. Auch die Inkubation mit MPO, H₂O₂ und Chlorid und folglich kontinuierlicher Produktion von HOCl führte zur Aktivierung der p38 MAPK. Wie genau HOCl p38 MAPK aktiviert, ist unverständlich²⁰⁵.

ROS spielen eine wichtige Rolle in der Progression der Fibrose¹⁴. H₂O₂ initiiert Phosphorylierungskaskaden, die unter anderem zur Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen führen. Ein Effekt dieser Phosphorylierungen ist die Aktivierung der MAPK. In murinen isolierten Kardiomyozyten führte eine Inkubation mit H₂O₂ relativ schnell zur Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAPK^{205,206}. Dies konnte ebenfalls in HeLa-Zellen beobachtet werden^{205,207}. In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte hier nach 30 Minuten H₂O₂-Inkubation eine signifikante Erhöhung der p38 MAPK- Phosphorylierung in 3T3- Fibroblasten gezeigt werden. Nach 15 Minuten zeigte sich bereits ein numerisch relevanter Effekt.

Einer der bestuntersuchten pro-fibrotischen Faktoren und Induktoren der Fibroblasten-Transdifferenzierung in vivo und in vitro ist TGF- β ^{122,203}. Während der pro-fibrotischen Phase nach einem Myokardinfarkt sind Konzentrationen an aktivem TGF- β erhöht. Latente, im Myokard gespeicherte TGF- β -Formen werden durch unterschiedliche Stimuli aktiviert. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem ROS, matrizelluläre Proteine, Proteasen und Integrin-vermittelte Interaktionen^{104,119}. Weiterhin sezernieren infiltrierende Leukozyten und Fibroblasten vermehrt TGF- β ¹²⁴. Es konnte keine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK nach 15 beziehungsweise 30 Minuten Inkubation mit TGF- β in 3T3-Fibroblasten beobachtet werden. TGF- β übt seine Effekte über die Bindung an seinen konstitutiv aktiven Typ II Rezeptor (T β RII) an der Zelloberfläche aus. Dieser rekrutiert und phosphoryliert den Typ I Rezeptor (T β RI), auch ALK5 benannt¹²⁰. Zu den intrazellulären Signalwegen gehören die Smad-abhängige Regulation der Genexpression und die Aktivierung Smad- unabhängiger Signalkaskaden inklusive dem MAPK-Signaling¹⁴. Insbesondere wurde das Smad-unabhängige Signaling über die TGF- β aktivierte Kinase TAK1 und die p38 MAPK als Treiber der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten identifiziert^{14,124,203}. Ebenfalls ist der ALK5/Smad3 Signalweg (Smad-abhängig) ebenfalls von kritischer Bedeutung in der Pathogenese der postischämischen Fibrose^{14,121}.

Hier wurde ausschließlich die p38 MAPK im Smad-unabhängigen Signalweg untersucht, der Smad-abhängige Signalweg wird hier nicht erfasst. Mögliche Erklärungen für den fehlenden Effekt von TGF- β auf die Phosphorylierung der p38 MAPK werden in Zusammenschau mit der Kollagenproduktion weiter unten erläutert.

5.2.2 Kollagen

Myofibroblasten sezernieren eine erhöhte Menge an Extrazellulärmatrix-Proteinen, insbesondere Kollagen I^{123,124}. Es wurde der Einfluss der MPO und TGF- β auf die Kollagenproduktion in 3T3-Zellen nach 36 Stunden mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die 36-stündige Inkubation mit MPO zeigte keinen Unterschied bezüglich der Kollagenproduktion in 3T3-Fibroblasten. Mollenhauer et al. zeigten anhand von Kollagenfärbungen, dass MPO-defiziente Mäuse nach einem Myokardinfarkt eine geringere interstitielle Fibrose außerhalb der Infarkt Narbe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen entwickelten. Weiterhin wurde in vitro eine signifikante Zunahme von Kollagen Typ I im Vergleich zu unbehandelten isolierten Fibroblasten nach 36 Stunden MPO Inkubation beobachtet⁵. MPO führte in 3T3- und isolierten Fibroblasten zur Erhöhung der Phosphorylierung der p38 MAPK (in isolierten Fibroblasten signifikant, in 3T3-Fibroblasten nicht signifikant erhöhte Phosphorylierung). Dies resultiert in isolierten Fibroblasten im Gegensatz zu 3T3-Fibroblasten in einer erhöhten Kollagenproduktion.

Yang et al. zeigten kürzlich in 3T3-Fibroblasten, dass Baicalein zur Verminderung der Kollagenproduktion führt. Baicalein förderte über die Erhöhung von miR-29 die Phosphorylierung der p38 MAPK und es wurde vermutet, dass die vermehrte Phosphorylierung zu einer verminderten Kollagenproduktion in 3T3-Fibroblasten führt²⁰⁸. Hier wird ein gleichzeitiges Auftreten einer vermehrten Phosphorylierung der p38 MAPK und verminderter Kollagenproduktion in 3T3-Fibroblasten beschrieben, wie es in dieser Arbeit ebenfalls bei MPO-Inkubation beobachtet wurde.

Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Experiment liefert eine mögliche Erklärung für das Ergebnis dieser Arbeit. Adulte murine kardiale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit H₂O₂ inkubiert, anschließend wurden die mRNA Level von Kollagen und Fibronectin bestimmt. Die mRNA Level von Kollagen waren erniedrigt und die von Fibronectin erhöht, was auf einen selektiven transkriptionalen Effekt auf die Kollagensynthese hinweist²⁰⁹. MPO könnte möglicherweise in 3T3-Fibroblasten ebenfalls einen selektiven transkriptionalen Effekt bewirken. So könnte sich die Aktivierung der 3T3-Fibroblasten, gezeigt durch Phosphorylierung der p38 MAPK, in einer reduzierten Kollagensynthese und vermehrten Synthese anderer Extrazellulärmatrix-Proteine ausdrücken.

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass der Effekt der MPO auf die Aktivierung der p38 MAPK in 3T3-Fibroblasten unter diesen Inkubationsbedingungen zu schwach ist, um einen Effekt auf die Zielproteine zu bewirken.

Es konnte eine signifikant erhöhte Kollagenproduktion nach 36-stündiger Inkubation mit TGF- β beobachtet werden. In der Literatur ist beschrieben, dass TGF- β über verschiedene Signalwege (siehe oben) die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert. Biernacker et al. zeigten, dass TGF- β die Kollagen-Gentranskription über den Smad3-abhängigen Signalweg stimuliert²¹⁰. Yang et al. zeigten in 3T3 Fibroblasten eine erhöhte Produktion von Kollagen I und III nach TGF- β -Inkubation²¹¹. Die Beobachtung in dieser Arbeit stimmt mit diesen Beschreibungen überein. Die ausbleibende erhöhte Phosphorylierung von p38 MAPK nach 15 beziehungsweise 30 Minuten TGF- β Behandlung zeigt, dass die beschriebenen TGF- β Effekte auf die Phosphorylierung der p38 MAPK zu einem hier nicht erfassten Zeitpunkt geschieht. Wang et al. zeigten kürzlich eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK in 3T3-Fibroblasten nach Inkubation mit TGF- β , definierten jedoch den Messpunkt nicht näher²¹². Im Vergleich zu H₂O₂, das relativ schnelle Effekte zeigt,

wirkt TGF- β als Wachstumsfaktor eher langsam. Es ist wichtig zu beachten, dass Phosphorylierungen transiente Veränderungen sind, die durch viele Faktoren beeinflusst werden²⁰¹. Weiterhin ist es möglich, dass TGF- β die Transdifferenzierung von 3T3-Fibroblasten zu Myofibroblasten über einen p38 MAPK-unabhängigen Signalweg induziert. Dafür kommt zum Beispiel der oben erwähnte Smad-abhängige Signalweg in Frage. Die Aktivierung der hier untersuchten Fibroblasten durch TGF- β , unabhängig von dem zugrundeliegenden Signalweg, zeigt sich in der erhöhten Kollagenproduktion und -sekretion nach 36 Stunden.

MPO scheint die Transdifferenzierung der 3T3-Fibroblasten über die Phosphorylierung der p38 MAPK zu induzieren. Die Aktivierung der 3T3-Fibroblasten durch MPO zeigt sich jedoch nicht in einer vermehrten Kollagenproduktion unter den vorliegenden Inkubationsbedingungen. Der Effekt der MPO auf die Kollagenproduktion sollte in Zukunft unter anderen Inkubationsbedingungen untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass MPO über die Aktivierung der p38 MAPK einen Effekt auf die Produktion anderer Proteine der Extrazellulärmatrix, wie zum Beispiel Fibronectin bewirkt. In zukünftigen weiterführenden Versuchen sollte der Einfluss der MPO auf die Produktion von Fibronectin in 3T3-Fibroblasten zum Beispiel anhand von Westernblot-Untersuchungen bestimmt werden. Obwohl es keine Studien gibt, die direkt die funktionelle Rolle von Fibronectin im Herzen untersuchen, lassen Beobachtungen im Mausmodell vermuten, dass Fibronectin-assoziierte Unterbrechungen der Kardiomyozyten-Interaktion ähnlich wie Kollagen nachteilige Effekte auf die kardiale Elektrophysiologie und Funktion ausüben^{8,213}. Weiterhin sollte der Effekt der MPO auf inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine, die durch die p38 MAPK reguliert werden, untersucht werden. α -SMA ist ein anerkannter Marker zur Identifizierung von Myofibroblasten, der ebenfalls untersucht werden könnte.

Neben der Fibrosebildung tragen Myofibroblasten über einen weiteren Mechanismus zur postischämischen Arrhythmogenese bei: die Kardiomyozyten-Myofibroblasten-Kopplung mittels Connexin43, die zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften führt^{8,128}. Es bleibt offen, ob 3T3-Fibroblasten nach der durch MPO induzierten Transdifferenzierung mit Kardiomyozyten koppeln und auf diese Weise pro-arrhythmogen wirken. Es ist vorstellbar, dass diese interzelluläre Kopplung über die Connexin43-Degradation durch MPO beeinflusst wird.

5.3 Erstellung eines Modells einer Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array

Störungen der Calciumhomöostase in Kardiomyozyten und der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit folgender Fibrose und Kardiomyozyten-Myofibroblasten-Kopplung sind wichtige Substrate für die postischämische Arrhythmogenese. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MPO einen aktivierenden Effekt auf diese Prozesse in Kardiomyozyten und Fibroblasten ausübt. Bisher wurden die Effekte der MPO auf einzelne Zelltypen untersucht, in vivo befinden sich die Zellen jedoch im Zellverband und interagieren direkt und indirekt miteinander. Das letzte Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines Modells einer Kokultur aus HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array, um in Zukunft die funktionelle Konsequenz der gezeigten Aktivierung der Zellen durch MPO auf das elektrische Konduktionsprofil untersuchen zu können.

Mikroelektroden Arrays können Leitungsmuster analysieren und sind eine weit anerkannte Methode, um die Elektrophysiologie von reinen Zellkulturen oder Kokulturen aus verschiedenen Zelltypen zu charakterisieren^{31,194}. Im Gegensatz zu in vivo Modellen erlauben in vitro Modelle leitungsfähige und -unfähige Zellen unter reproduzierbaren und gut kontrollierten Bedingungen zu untersuchen²¹⁴. Obwohl diese in vitro Modelle keine in vivo Charakteristika nachahmen können, bieten Kardiomyozytenkulturen klare Vorteile für elektrophysiologische Untersuchungen im Vergleich zu in vivo und ex vivo Alternativen. Die Vorbereitungen sind relativ einfach und bieten eine hohe Durchsatsrate¹⁷⁹. Für die Versuche dieser Arbeit wurden die bereits beschriebene Kokultur von HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten¹⁸⁴ verwendet. Wird eine Mischung aus Kardiomyozyten und Fibroblasten auf eine Zellkulturplatte ausgesät, entsteht eine zufällige und nicht-gemusterte 2D-Verteilung der Zellen. Die Auswirkungen der direkten und indirekten Interaktionen zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten können in vitro durch verschiedene *Readouts* gemessen werden⁸.

Das Ziel war die Erstellung einer nicht-gemusterten 2D-Kokultur aus HL-1-Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf einem Mikroelektroden Array, um ein elektrophysiologisches *Readout* zu ermöglichen.

5.3.1 Voruntersuchungen

Bevor das elektrische Konduktionsprofil der Kokultur charakterisiert werden konnte, mussten einige Fragen durch Voruntersuchungen geklärt werden.

Tag der Messung

Durch lichtmikroskopische und elektrophysiologische Beurteilungen (siehe Methoden- und Ergebnisteil) wurde Tag 5 nach Aussaat als geeigneten Tag für die elektrophysiologischen Messungen identifiziert. Dies stimmt mit Erkenntnissen, die bereits in der Literatur beschrieben sind, überein^{5,179}. Rother et al. beschreiben, dass ein quasi-stationärer Status der Impedanz, ein Hinweis auf die Bildung eines elektrisch gekoppelten Zellteppichs, erreicht wurde, nachdem die Zellen mehr als vier Tage auf Elektroden ausgesät waren²¹⁵. Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Passend zu diesen Beobachtungen beschreiben Meiry et al. eine Zunahme der Erregungsleitungsgeschwindigkeit einer Kardiomyozytenkultur auf einem Mikroelektroden Array bis Tag 5 mit nachfolgender Abnahme bis Tag 8 nach Aussaat. Interessanterweise korrelierte dieses Muster mit der Expression von Connexin43. Nach Tag 5 kam es zur Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit und der Anzahl der Connexine. Höchstwahrscheinlich resultiert die elektrische Konfluenz aus der Bildung von *gap junctions* zwischen den benachbarten Kardiomyozyten. Meiry et al. nahmen an, dass der entscheidende Reiz für die interzelluläre Kopplung der physikalische Kontakt zwischen den Zellen ist. Sobald dieser Kontakt eintritt, wird ein Prozess initiiert, der über die Synthese und Mobilisation von *gap junction* Proteinen zur Einrichtung von funktionsfähigen *gap junctions* führt²¹⁶. Dies stimmt mit Claycomb et al. überein, welche Kopplung und synchronisierte Kontraktion in HL-1 Kardiomyozyten bei Erreichen der Konfluenz observierten¹⁷⁴.

Verhältnis

Elektrophysiologische Untersuchungen bei einem Aussaatverhältnis 90:10 zeigten Unterbrechungen der Erregungsleitung. Es konnte festgestellt werden, dass ein Verhältnis von 99:1 bei Aussaat eine adäquate Reizweiterleitung an Tag 5 ermöglichte.

Verhältnisse mit höherem Fibroblastenanteil haben die Reizweiterleitung stark unterbrochen und zeigten nur an wenigen Elektroden detektierbare Signale. Chen et al. entwickelten eine Methode zur Bestimmung der *purity-conduction*-Beziehung in Kokultursystemen mit unterschiedlichen Volumenanteilen. Mit abnehmendem Kardiomyozyten-Fibroblasten Verhältnis nahm die Gleichmäßigkeit des Erregungsleitungsmusters deutlich ab. In dem 2D-Kokultur-System beobachteten Chen et al. Unterbrechungen der gleichmäßigen Erregungsleitung bereits bei Verhältnissen von 90:10. Während die reine Kardiomyozyten-Kultur eine homogene Erregungsleitung zeigte, demonstrierten 80:20 und 70:30 Kokulturen ein Verhalten zwischen gleichmäßiger Erregung und isolierten spontanen Kontraktionen. Die 50:50 Kokultur zeigte ausschließlich isolierte spontane Kontraktionen, ausgedrückt durch Signale in einzelnen Kanälen ohne Zeichen einer homogenen Erregungsleitung. Obwohl einzelne unabhängige elektrische Signale noch bei relativ niedrigem Cm-Fb Verhältnis aufgenommen werden konnten, reagierte das Erregungsleitungsmuster sehr sensibel auf eine geringe Anzahl an Fibroblasten^{184,214}. Da Fibroblasten und Kardiomyozyten unterschiedliche Proliferationsraten besitzen, besteht am Tag der Messung theoretisch ein anderes Verhältnis als bei Aussaat. Das genaue Verhältnis unserer Kokultur an Tag 5 wurde hier nicht näher bestimmt. Die lichtmikroskopische Beurteilung des Verhältnisses und der Verteilung der beiden Zellarten der Kokultur in 6-Well-Platten und die elektrophysiologische Beurteilung der Reizweiterleitung unterschiedlicher Verhältnisse der Kokultur an Tag 5 bestätigen, dass das in dieser Arbeit gewählte Verhältnis bei Aussaat zu einem adäquaten Verhältnis am Messtag führt. In weiteren Versuchen können Immunfluoreszenzfärbungen der Kokultur in *Chamber Slides* durchgeführt werden, um das Verhältnis der Zellen am Tag der Messung genauer benennen zu können.

Medium

Neben der Identifizierung des geeigneten Verhältnisses und Messtags wurde als Medium das Claycomb Medium ausgewählt. Kardiomyozyten kontrahierten mit supplementiertem Claycomb Medium im Vergleich zu DMEM-Medium stärker, da dieses Norepinephrin enthielt, das die Zellen zur Kontraktion benötigen¹⁷⁴.

5.3.2 Elektrisches Konduktionsprofil der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur

Um die Erregungsleitung der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur zu beurteilen, wurden *Phase Maps* erstellt, aus denen Parameter errechnet und das elektrische Konduktionsprofil charakterisiert werden konnten.

Die Verwendung lokaler Maxima zwischen benachbarten Elektroden weist folgende Vorteile auf: Der exakte Leitungsweg und die Richtung der Weiterleitung müssen nicht bekannt sein; eine Überschätzung der lokalen Leitungsgeschwindigkeit wird vermieden; der Fokus liegt auf Bereichen mit geringer effektiver Leitungsgeschwindigkeit und kleine Inhomogenitätsbereiche, die die gesamte Erregungsleitung nicht verzerren, können leicht detektiert werden¹⁸². Die Parameter zur Interpretation des elektrischen Konduktionsprofils beinhalten den Inhomogenitätsindex, die absolute Inhomogenität und den Mittelwert und Median der Leitungsgeschwindigkeit. Anhand dieser Parameter kann die Inhomogenität der Erregungsleitung quantifiziert und die Vulnerabilität für Arrhythmien abgeschätzt werden, ohne eine Arrhythmie zu induzieren¹⁸².

5.3.2.1 Beurteilung der Kardiomyozytenkultur

Im Folgenden wird das Konduktionsprofil der reinen HL-1 Kardiomyozytenkultur anhand von bisher beschriebenen Charakterisierungen in der Literatur beurteilt.

In dieser Arbeit konnte eine mittlere Geschwindigkeit von 0,4 cm/s gemessen werden. Diese war unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bedingungen ähnlich zu der bereits in der Literatur beschriebenen Leitungsgeschwindigkeit von HL-1 Zellen (0,8 cm/s). Interessanterweise fallen die Leitungsgeschwindigkeiten unterschiedlicher Kardiomyozytenarten auf Mikroelektroden Arrays sehr unterschiedlich aus. Im Vergleich zu iPSCM (17 cm/s) und NRVM (24 cm/s) zeigen HL-Zellen eine deutlich langsamere Leitungsgeschwindigkeit¹⁷⁹.

Die absolute Inhomogenität wurde als die Differenz zwischen der 5. und 95. Perzentile der *Phase Map* berechnet. Die absolute Inhomogenität drückt die Reichweite der maximalen Unterschiede der Aktivierungszeiten aus. Die absolute Inhomogenität wird von der Leitungsgeschwindigkeit und dem Grad der lokalen Inhomogenität der Erregungsleitung beeinflusst¹⁸². Die absolute Inhomogenität unserer HL-1 Zellen betrug 500 s/m. Mollenhauer et al. zeigten eine absolute Inhomogenität von 20 s/m bei iPSCM⁵. Da es sich um verschiedene Zellarten mit sehr unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten handelt, ist dieser Unterschied erwartbar.

Um weiterhin die räumliche Verteilung der Erregungsleitung unabhängig von der durchschnittlichen Leitungsgeschwindigkeit zu quantifizieren, wurde der Inhomogenitätsindex (P5-P95/P50) berechnet¹⁸². Die HL-1 Zellen in dieser Arbeit zeigten einen ähnlichen Inhomogenitätsindex wie iPSCM in Analysen von Mollenhauer et al. (HL-1: 2; iPSCM: 2,5)⁵. Da dieser Wert unabhängig von der Geschwindigkeit ist, zeigen die Zellen trotz unterschiedlicher Leitungsgeschwindigkeiten einen ähnlichen Wert. Das spricht für eine homogene Weiterleitung in der reinen Kardiomyozytenkultur.

5.3.2.2 Vergleich der Kokultur und der Kardiomyozytenkultur

Der Inhomogenitätsindex und die absolute Inhomogenität unterschied sich zwischen Kardiomyozytenkultur und Kokultur nicht, wobei die absolute Inhomogenität fast signifikant unterschiedlich war (P-Wert 0,05). Lammers et al. beschreiben, dass eine gleichzeitige Zunahme des Inhomogenitätsindex und der absoluten Inhomogenität für eine Zunahme der wahren Inhomogenität sprechen. Eine Zunahme der absoluten Inhomogenität bei gleichbleibendem Inhomogenitätsindex spricht für eine generelle Verlangsamung der Erregungsleitung¹⁸². Daraus lässt sich schließen, dass die Erregungsleitung in der Kokultur im Vergleich zur reinen Kardiomyozytenkultur verlangsamt ist, ohne dass die wahre Inhomogenität stark zugenommen hat. Die Ähnlichkeit der elektrischen Konduktionsprofile der Kokultur und der Kardiomyozytenkultur zeigt sich weiterhin durch einen fehlenden signifikanten Unterschied der Mediane der Leitungsgeschwindigkeiten. Die Mittelwerte der Geschwindigkeiten unterscheiden sich signifikant. Dabei zeigt sich eine langsamere Geschwindigkeit in der Kokultur. Der Median ist ein Ausreißer bereinigter Mittelwert, das heißt einzelne Ausreißer haben weniger Einfluss auf den Median als auf den Mittelwert²¹⁷. Dies erklärt, warum sich die Mediane der Kokultur und Kardiomyozytenkultur im Gegensatz zu den Mittelwerten nicht signifikant unterscheiden. Die leichte Verlangsamung der mittleren Geschwindigkeit in der Kokultur stimmt mit der Interpretation des Inhomogenitätsindex und der absoluten Inhomogenität überein.

Zusammenfassend ist das elektrische Konduktionsprofil zwischen der Kokultur und der reinen Kardiomyozytenkultur zum größten Teil nicht signifikant unterschiedlich, dies spricht für eine Kokultur mit relativ homogener Erregungsleitung.

5.3.2.3 Beurteilung des Modells der Kokultur auf dem Mikroelektroden Array

Wie erwartet, schwanken die Werte der untersuchten Parameter in der Kokultur etwas stärker als in der reinen Kardiomyozytenkultur. Es ist vorstellbar, dass es durch die nicht-gemusterte Verteilung von Kardiomyozyten und Fibroblasten zufällig zu einer Aggregation von Fibroblasten kommt, die zu einem lokalen Leitungsblock mit lokal verlangsamter Geschwindigkeit führt. Das wirkt sich auf die gemessenen Werte aus und kann so zu Schwankungen führen. Vor allem die absolute Inhomogenität und der Mittelwert der Geschwindigkeiten reagieren sensibel auf lokale Blocks zwischen Mikroelektroden innerhalb der Kokultur. Da der Median Ausreißer bereinigt ist, schwankt dieser in unseren Untersuchungen der Kokultur weniger. Insgesamt befinden sich die beobachteten Schwankungen im Rahmen und sind erwartet. Anhand der vorliegenden Untersuchungen ist es nicht möglich zu beurteilen, ob die lokalen Leitungsblocks Ausdruck aggregierter Fibroblasten, einer fehlenden Adhärenz von Kardiomyozyten oder von Fehlmessungen der Mikroelektroden sind. Eine Untersuchung der Korrelation der Zellverteilung auf dem Mikroelektroden Array mit dem jeweiligen elektrischen Konduktionsprofil ist schwierig, da die Zellen auf dem Mikroelektroden Array nicht gefärbt werden können. Um die Zellverteilung auf dem Mikroelektroden Array genauer zu untersuchen, könnte man in Zukunft gegebenenfalls die HL-1 Kardiomyozyten mit einem grün fluoreszierendem Protein Marker durch einen lentiviralen Vektor transfizieren, wie von Chen et al. beschrieben¹⁸⁴. Bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht könnte man so die Zellenlinien voneinander unterscheiden.

Um die Kokultur weiterhin zu optimieren, könnten proliferationshemmende Agenzien zur Reduktion des überschießenden Wachstums der Fibroblasten eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung primärer Kardiomyozyten und Fibroblasten, die möglicherweise eine optimierte Kopplung aufweisen. Einen großen Nachteil stellt dabei jedoch ein erheblich erhöhter Arbeitsaufwand zur Gewinnung der Zellen dar.

Es gilt zu beachten, dass in vitro Modelle keine in vivo Charakteristika nachahmen können. Dies wird unter anderem durch den Unterschied der Leitungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zellen deutlich. Typische Leitungsgeschwindigkeiten in ventrikulären Herzschnitten aus Mäusen und Menschen betragen ungefähr 60-75 cm/s und sind damit um einiges höher als die der Zellen aus dieser Arbeit. Zusätzlich zu den inhärenten Unterschieden zwischen immortalisierten Kardiomyozyten und adulter humaner Elektrophysiologie reflektiert die langsamere Leitungsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten in vitro möglicherweise eine mehr desorganisierte und polymorphe Natur dieser Zellen¹⁷⁹. Trotzdem überwiegen die Vorteile wie die Reproduzierbarkeit und Kontrollierbarkeit der Bedingungen, die einfache Vorbereitung und die hohe Durchsatzrate, die dazu führen, dass diese Methode ein weit anerkanntes Modell ist, um Effekte auf die Elektrophysiologie zu untersuchen^{31,194}.

In dieser Arbeit konnte ein reproduzierbares Modell einer Kokultur auf einem Mikroelektroden Array hergestellt werden. Im Vergleich der Kokultur mit der reinen Kardiomyozytenkultur konnte wie gewünscht ein ähnliches elektrisches Konduktionsprofil ohne Unterbrechung der homogenen Erregungsleitung mit einzelnen lokalen Ausnahmen am ehesten durch Fibroblastenaggregationen

beobachtet werden. Wie erwartet, zeigte sich in der Kokultur durch die Anwesenheit von Fibroblasten eine leicht erniedrigte Leitungsgeschwindigkeit und erhöhte Inhomogenität, die sich jedoch nicht signifikant von der Kardiomyozytenkultur unterscheiden haben.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MPO aktivierende pro-arrhythmische Effekte auf Kardiomyozyten und Fibroblasten auszuüben scheint. Gleichzeitig wird in dieser Arbeit deutlich, dass noch weitere Untersuchungen erforderlich sind, um robuste Befunde bezüglich dieser Effekte zu erhalten.

Im Rahmen der Diskussion wurden bereits innerhalb der einzelnen Abschnitte detaillierte Ideen für zukünftige Untersuchungen benannt, im Folgenden werden die wichtigsten zusammengefasst und durch allgemeinere Ideen ergänzt.

Der Effekt der MPO auf die Calciumhomöostase sollte in weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

Der verzögerte Calciumpeak sollte in Zusammenhang mit dem Membranpotential der Zelle und den arrhythmischen Ereignissen der intrazellulären Calciumkonzentration genauer analysiert werden, um die mechanistische Verbindung zwischen gestörter Calciumhomöostase und Arrhythmie-Entstehung aufzuklären. Die Relevanz der jeweiligen Arten der arrhythmischen Ereignisse der Calciumtransienten (Doppelpeak des Calciumtransienten, Calciumtransient außerhalb des Pacings, Flimmern der Calciumkonzentration) sollte in Zukunft analysiert und in Zusammenhang mit der Kontraktion der Zelle beurteilt werden.

In dieser Arbeit wurde der Phosphorylierungsstatus der CaMKII analysiert, in Zukunft sollte der Effekt der MPO auf die CaMKII durch Messung des Oxidierungsstatus, der ebenfalls mit ihrer Aktivität assoziiert ist, und der CaMKII-Aktivität analysiert werden.

Weiterhin ist insbesondere die Analyse des Effekts der MPO auf posttranslationale Modifikationen und die Kinetik des L-Typ VOCCs und RyRs von großem Interesse, da Veränderungen dieser Kanäle den verzögerten Calciumpeak erklären könnten.

Ebenfalls stellt sich die Frage, ob MPO einen Effekt auf andere Ionenströme wie zum Beispiel den Natrium- oder Kaliumstrom ausübt und auf diese Weise die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen verändert. Die Frage nach dem Einfluss der MPO auf die Kinetik von Ionenkanälen und Ionenströmen könnte in zukünftigen Untersuchungen zum Beispiel mittels der Patch-Clamp-Technik analysiert werden.

Es bleibt offen, ob MPO in 3T3-Fibroblasten auf andere Zielproteine der p38 MAPK als Kollagen wirkt. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher der Effekt der MPO auf die Fibronectin- und Zytokinproduktion analysiert werden. Es ist möglich, dass diese Proteine die Kardiomyozyten-Interaktionen stören und so zur Arrhythmogenese beitragen.

In dieser Arbeit wurde der Effekt der MPO auf die Kardiomyozyten-Myofibroblasten-Kopplung in der Kokultur nicht untersucht. Da die Kopplung ein wichtiges pro-arrhythmogenes Substrat darstellt, sollte zukünftig eine entsprechende Analyse zum Beispiel mittels Immunfluoreszenzfärbungen angestrebt werden. Der von Mollenhauer et al. gezeigte pro-arrhythmogene Mechanismus der Connexin43-Degradation durch MPO sollte ebenfalls in der Kokultur analysiert werden.

In Zukunft sollte die funktionelle Konsequenz der gezeigten aktivierenden pro-arrhythmogenen Effekte der MPO auf HL-1 Kardiomyozyten und 3T3-Fibroblasten auf das elektrische Konduktionsprofil der Kokultur untersucht werden. Durch die oben

beschriebenen Parameter, die das elektrische Konduktionsprofil charakterisieren, kann der Effekt der MPO auf die Vulnerabilität für Arrhythmien abgeschätzt werden. Nachdem diese Mechanismen auf Zellebene genauer analysiert worden sind, sollten diese im Mausmodell und in humanem ex vivo Gewebe validiert werden.

MPO erweist sich in vorangehenden Projekten und auch in dieser Arbeit als ein wichtiger Mediator für die Entstehung postischämischer Arrhythmien und bietet möglicherweise in naher Zukunft einen potentiell neuen Therapieansatz für die Reduktion von Arrhythmien nach Myokardinfarkt. Erste MPO-Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien untersucht²¹⁸. Dabei müssen die vielfältigen Interaktionen der MPO beachtet und die unerwünschten oder schädlichen Effekte einer Hemmung der MPO, besonders im Rahmen der immunologischen Funktion, bedacht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Soejima K, Stevenson WG, Maisel WH, Sapp JL, Epstein LM. Electrically unexcitable scar mapping based on pacing threshold for identification of the reentry circuit isthmus: feasibility for guiding ventricular tachycardia ablation. *Circulation* 2002; 106(13): 1678-83.
2. Baumeister P, Quinn TA. Altered Calcium Handling and Ventricular Arrhythmias in Acute Ischemia. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2016; 10s1: CMC.S39706.
3. Francis Stuart SD, De Jesus NM, Lindsey ML, Ripplinger CM. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2016; 91: 114-22.
4. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111(1): 16-26.
5. Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circulation Research* 2017; 121(1): 56-70.
6. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(5): e247-346.
7. Steiner HA, Hasin Y. Risk Reduction Strategies for Sudden Cardiac Death in Acute Myocardial Infarction. *US Cardiology Review* 2011; 8(1): 56-8.
8. Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2016; 94: 22-31.
9. Cascio WE, Yang H, Muller-Borer BJ, Johnson TA. Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *Journal of Electrocardiology* 2005; 38(4 Suppl): 55-9.
10. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Comprehensive Physiology* 2012; 2(3): 1981-2035.
11. Dhein S. Cardiac Gap Junctions: Physiology, Regulation, Pathophysiology and Pharmacology: Karger Medical and Scientific Publishers; 1998.
12. Park DS, Fishman GI. The Cardiac Conduction System. *Circulation* 2011; 123(8): 904-15.

13. Kohl P, Camelliti P. Cardiac myocyte-nonmyocyte electrotonic coupling: implications for ventricular arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2007; 4(2): 233-5.
14. Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research* 2016; 365(3): 563-81.
15. Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2016; 93: 175-85.
16. Park DS, Fishman GI. Development and Function of the Cardiac Conduction System in Health and Disease. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 2017; 4(2).
17. Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J* 1994; 21(1): 30-41.
18. Tse G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Journal of Arrhythmia* 2016; 32(2): 75-81.
19. Botting JH, Curtis MJ, Walker MJ. Arrhythmias associated with myocardial ischaemia and infarction. *Molecular Aspects of Medicine* 1985; 8(4): 307-422.
20. Ikonnikov G, Yelle D. Physiology of cardiac conduction and contractility. McMaster Pathophysiology Review (MPR). <http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility/> (zuletzt abgerufen am 02. April 2021)
21. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res* 2017; 120(12): 1969-93.
22. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868): 198-205.
23. Heijman J, Voigt N, Wehrens XH, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5: 30.
24. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research* 2017; 121(2): 181-95.
25. Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circulation Research* 2012; 110(12): 1661-77.
26. Köhler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2014; 73: 92-102.
27. Shaw RM, Colecraft HM. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* 2013; 98(2): 177-86.
28. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2011; 3(11): a004242.

29. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2011; 50(7): 777-93.
30. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2(11): a003996.
31. Chen H, Valle G, Furlan S, et al. Mechanism of calsequestrin regulation of single cardiac ryanodine receptor in normal and pathological conditions. *Journal of General Physiology* 2013; 142(2): 127-36.
32. McCauley MD, Wehrens XHT. Ryanodine receptor phosphorylation, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and life-threatening ventricular arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21(2): 48-51.
33. Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annual Review of Physiology* 2005; 67: 69-98.
34. Shan J, Kushnir A, Betzenhauser MJ, et al. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2010; 120(12): 4388-98.
35. Heijman J, Ghezelbash S, Wehrens XH, Dobrev D. Serine/Threonine Phosphatases in Atrial Fibrillation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2017; 103: 110-20.
36. Chiang DY, Lebesgue N, Beavers DL, et al. Alterations in the interactome of serine/threonine protein phosphatase type-1 in atrial fibrillation patients. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65(2): 163-73.
37. Gustavsson M, Verardi R, Mullen DG, et al. Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110(43): 17338-43.
38. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation Research* 2012; 110(12): 1646-60.
39. Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CNW, Coronel R, Fiolet JWT. $[Na^+]_i$ and the driving force of the Na^+/Ca^{2+} -exchanger in heart failure. *Cardiovascular Research* 2003; 57(4): 986-95.
40. Chao LH, Stratton MM, Lee IH, et al. A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca^{2+} /calmodulin- dependent kinase II holoenzyme. *Cell* 2011; 146(5): 732-45.
41. Hudmon A, Schulman H. Structure–function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical Journal* 2002; 364(3): 593-611.

42. Beckendorf J, Van Den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Research in Cardiology* 2018; 113(4).
43. Koval OM, Guan X, Wu Y, et al. CaV1.2 β -subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(11): 4996-5000.
44. Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *Journal of Cell Biology* 2005; 171(3): 537-47.
45. Van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, et al. Ryanodine Receptor Phosphorylation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice With Heart Failure. *Circulation* 2010; 122(25): 2669-79.
46. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research* 2004; 94(6): e61-e70.
47. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(17): 11144-52.
48. Mattiazzi A, Kranias E. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5(5).
49. Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(28): 13333-41.
50. Rosenberg OS, Deindl S, Sung R-J, Nairn AC, Kuriyan J. Structure of the Autoinhibited Kinase Domain of CaMKII and SAXS Analysis of the Holoenzyme. *Cell* 2005; 123(5): 849-60.
51. Lai Y, Nairn AC, Gorelick F, Greengard P. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84(16): 5710-4.
52. Erickson JR, Joiner M-LA, Guan X, et al. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell* 2008; 133(3): 462-74.
53. Antzelevitch C, Burashnikov A. Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Cardiac Electrophysiology Clinics* 2011; 3(1): 23-45.

54. Jalife J, Delmar M, Anumonwo J, Berenfeld O, Kalifa J. Basic Cardiac Electrophysiology for the Clinician. 2nd ed: John Wiley & Sons; 2011.
55. January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circulation Research* 1989; 64(5): 977-90.
56. Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan CVL, Ralph Role of Na⁺:Ca²⁺ Exchange Current in Cs⁺-Induced Early Afterdepolarizations in Purkinje Fibers. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 1994; 5(11): 933-44.
57. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews* 1999; 79(3): 917-1017.
58. Patterson E, Lazzara R, Szabo B, et al. Sodium-calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47(6): 1196-206.
59. Burashnikov A, Antzelevitch C. Late-phase 3 EAD. A unique mechanism contributing to initiation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; 29(3): 290-5.
60. Aguilar M, Nattel S. The pioneering work of George Mines on cardiac arrhythmias: groundbreaking ideas that remain influential in contemporary cardiac electrophysiology. *J Physiol* 2016; 594(9): 2377-86.
61. Weiss JN, Chen PS, Qu Z, Karagueuzian HS, Garfinkel A. Ventricular fibrillation: how do we stop the waves from breaking? *Circulation Research* 2000; 87(12): 1103-7.
62. Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Archivos de Cardiologia de Mexico* 1946; 16(3): 205-65.
63. Garrey WE. The nature of fibrillary contraction of the heart. - Its relation to tissue mass and form. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1914; 33(3): 397-414.
64. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes. *Circulation Research* 1976; 39(2): 168-77.
65. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological Reviews* 2007; 87(2): 425-56.
66. Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological Reviews* 1989; 69(4): 1049-169.

67. Clarke K, Stewart LC, Neubauer S, et al. Extracellular volume and transsarcolemmal proton movement during ischemia and reperfusion: a ³¹P NMR spectroscopic study of the isovolumic rat heart. *NMR Biomed* 1993; 6(4): 278-86.
68. Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1993; 466(1): 481-99.
69. Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY. Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circulation Research* 1982; 50(2): 287-93.
70. Wilde AA, Aksnes G. Myocardial potassium loss and cell depolarisation in ischaemia and hypoxia. *Cardiovascular Research* 1995; 29(1): 1-15.
71. Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, et al. Hypoxia inhibits the recombinant alpha 1C subunit of the human cardiac L-type Ca²⁺ channel. *J Physiol* 1997; 500 (Pt 3)(Pt 3): 551-6.
72. Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G, Peers C. Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel alpha1C subunits by redox agents and hypoxia. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 3)(Pt 3): 629-37.
73. Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, et al. Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(31): 21827-36.
74. Song Y-H, Cho H, Ryu S-Y, et al. L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by H₂O₂-induced activation of CaMKII in rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 48(4): 773-80.
75. Hool LC. Evidence for the regulation of L-type Ca²⁺-channels in the heart by reactive oxygen species: mechanism for mediating pathology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2008; 35(2): 229-34.
76. Hool LC. Hypoxia increases the sensitivity of the L-type Ca(2+) current to beta-adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform. *Circulation Research* 2000; 87(12): 1164-71.
77. Noma A, Shibasaki T. Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1985; 363(1): 463-80.
78. Irisawa H, Sato R. Intra- and extracellular actions of proton on the calcium current of isolated guinea pig ventricular cells. *Circulation Research* 1986; 59(3): 348-55.
79. Kubalová Z. Inactivation of L-type calcium channels in cardiomyocytes. Experimental and theoretical approaches. *General Physiology and Biophysics* 2003; 22(4): 441-54.
80. Abramson JJ, Salama G. Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1989; 21(2): 283-94.

81. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circulation Research* 2003; 92(8): 904-11.
82. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Heart Failure. *Circulation Research* 2005; 97(12): 1314-22.
83. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, et al. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(1): 444-53.
84. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. *Cell* 2000; 101(4): 365-76.
85. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(3): 511-8.
86. Mollenhauer M, Mehrkens D, Klinke A, et al. Nitro-fatty acids suppress ischemic ventricular arrhythmias by preserving calcium homeostasis. *Scientific Reports* 2020; 10(1).
87. Grimm M, Brown JH. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 48(2): 322-30.
88. Xu L, Mann G, Meissner G. Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circulation Research* 1996; 79(6): 1100-9.
89. Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G, Mariani M. Effect of Ischemia and Reperfusion on Cardiac Ryanodine Receptors- Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Channels. *Circulation Research* 1994; 74: 271-80.
90. Braz JC, Gregory K, Pathak A, et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature Medicine* 2004; 10(3): 248-54.
91. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research* 2008; 77(2): 265-73.

92. Morris TE, Sulakhe PV. Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-Pump Dysfunction in Rat Cardiomyocytes Briefly Exposed to Hydroxyl Radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 22(1): 37-47.
93. Weber CR, Piacentino V, 3rd, Houser SR, Bers DM. Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation* 2003; 108(18): 2224-9.
94. Santacruz-Tolosa L, Ottolia M, Nicoll DA, Philipson KD. Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(1): 182-8.
95. Goldhaber JI. Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* 1996; 271(3 Pt 2): H823-33.
96. Goldhaber JI, Liu E. Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *J Physiol* 1994; 477(1): 135-47.
97. Reeves JP, Bailey CA, Hale CC. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(11): 4948-55.
98. Vila-Petroff M, Mundiña-Weilenmann C, Lezcano N, et al. Ca⁽²⁺⁾/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 49(1): 106-12.
99. Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike MM. Quantification of [Ca²⁺]_i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circulation Research* 1990; 66(5): 1255-67.
100. Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and Intracellular Redistribution of Ventricular Connexin43 During Electrical Uncoupling Induced by Ischemia. *Circulation Research* 2000; 87(8): 656-62.
101. Hagiwara N, Irisawa H. Modulation by intracellular Ca²⁺ of the hyperpolarization-activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells. *J Physiol* 1989; 409(1): 121-41.
102. Zaza A, Maccaferri G, Mangoni M, DiFrancesco D. Intracellular calcium does not directly modulate cardiac pacemaker (if) channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2004; 419: 662-4.
103. Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, et al. Matrix Metalloproteinase-7 Affects Connexin-43 Levels, Electrical Conduction, and Survival After Myocardial Infarction. *Circulation* 2006; 113(25): 2919-28.

104. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology* 2014; 11(5): 255-65.
105. Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in V_{max} and the transient outward current. *Circulation* 1992; 85(3): 1175-88.
106. Pinto JM, Boyden PA. Electrical remodeling in ischemia and infarction. *Cardiovascular Research* 1999; 42(2): 284-97.
107. Pu J, Robinson RB, Boyden PA. Abnormalities in $Ca(i)$ handling in myocytes that survive in the infarcted heart are not just due to alterations in repolarization. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000; 32(8): 1509-23.
108. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 1997; 95(4): 988-96.
109. Yao JA, Hussain W, Patel P, Peters NS, Boyden PA, Wit AL. Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. *Circulation Research* 2003; 92(4): 437-43.
110. Kim YK, Kim SJ, Kramer CM, et al. Altered excitation-contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34(1): 63-73.
111. Boyden PA, Barbhaiya C, Lee T, ter Keurs HE. Nonuniform Ca^{2+} transients in arrhythmogenic Purkinje cells that survive in the infarcted canine heart. *Cardiovascular Research* 2003; 57(3): 681-93.
112. Pu J, Boyden PA. Alterations of Na^{+} currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness. *Circulation Research* 1997; 81(1): 110-9.
113. Baba S, Dun W, Boyden PA. Can PKA activators rescue Na^{+} channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovascular Research* 2004; 64(2): 260-7.
114. Peters NS. Myocardial gap junction organization in ischemia and infarction. *Microscopic Research and Technique* 1995; 31(5): 375-86.
115. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovascular Research* 1999; 42(2): 309-17.
116. Veenstra R. Gap junction heterogeneity in reentrant ventricular tachycardia. *Cardiovascular Research* 2006; 72(2): 196-7.

117. Nguyen MN, Kiriazis H, Gao XM, Du XJ. Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis. *Comprehensive Physiology* 2017; 7(3): 1009-49.
118. Qin D, Zhang Z-H, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, El-Sherif N. Cellular and Ionic Basis of Arrhythmias in Postinfarction Remodeled Ventricular Myocardium. *Circulation Research* 1996; 79(3): 461-73.
119. Buscemi L, Ramonet D, Klingberg F, et al. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex. *Current Biology* 2011; 21(24): 2046-54.
120. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011; 51(4): 600-6.
121. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014; 71(4): 549-74.
122. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122(1): 103-11.
123. van den Borne SW, Diez J, Blankesteijn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature Reviews Cardiology* 2010; 7(1): 30-7.
124. Lighthouse JK, Small EM. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2016; 91: 52-60.
125. Howard CM, Baudino TA. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2014; 70: 19-26.
126. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; 3(5): 349-63.
127. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation Research* 2012; 110(1): 159-73.
128. Rook MB, Jongsma HJ, de Jonge B. Single channel currents of homo- and heterologous gap junctions between cardiac fibroblasts and myocytes. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 1989; 414(1): 95-8.
129. Schultz F, Swiatlowska P, Alvarez-Laviada A, et al. Cardiomyocyte–myofibroblast contact dynamism is modulated by connexin-43. *The FASEB Journal* 2019; 33(9): 10453-68.

130. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 2011; 89(4): 744-53.
131. Kotadia I, Whitaker J, Roney C, et al. Anisotropic Cardiac Conduction. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 2020; 9(4): 202-10.
132. Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circulation Research* 2007; 101(8): 755-8.
133. Askar SF, Ramkisoensing AA, Schaliij MJ, et al. Antiproliferative treatment of myofibroblasts prevents arrhythmias in vitro by limiting myofibroblast-induced depolarization. *Cardiovascular Research* 2011; 90(2): 295-304.
134. Friedrichs K, Baldus S, Klinke A. Fibrosis in Atrial Fibrillation – Role of Reactive Species and MPO. *Frontiers in Physiology* 2012; 3.
135. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2008; 1(1): 62-73.
136. Kettle AJ, van Dalen CJ, Winterbourn CC. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. *Redox Report* 1997; 3(5-6): 257-8.
137. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999; 111(5): 383-9.
138. Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *Journal of Molecular Medicine* 1998; 76(10): 661-8.
139. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology* 2000; 7(1): 53-8.
140. Furtmuller PG, Zederbauer M, Jantschko W, et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006; 445(2): 199-213.
141. Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995; 316(1): 653-6.
142. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 77(5): 598-625.
143. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2010; 48(1): 8-19.
144. Henderson JP, Byun J, Heinecke JW. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-

- chlorocytosine in bacterial RNA. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(47): 33440-8.
145. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; 296(5577): 2391-4.
 146. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391(6665): 393-7.
 147. Nussbaum C, Klinke A, Adam M, Baldus S, Sperandio M. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; 18(6): 692-713.
 148. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Annals of Internal Medicine* 1981; 95(3): 293-301.
 149. Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of Molecular Medicine* 1998; 76(10): 676-81.
 150. van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; 11(11): 2899-937.
 151. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108(12): 1759-70.
 152. Rudolph TK, Wipper S, Reiter B, et al. Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. *European Heart Journal* 2012; 33(13): 1625-34.
 153. Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 2011; 117(4): 1350-8.
 154. Zarbock A, Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 2009; 16(1): 31-42.
 155. Friedrichs K, Adam M, Remane L, et al. Induction of atrial fibrillation by neutrophils critically depends on CD11b/CD18 integrins. *PLOS ONE* 2014; 9(2): e89307.
 156. Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, Nilsson K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *Journal of Cell Science* 1997; 110 (Pt 9): 1133-9.
 157. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102(2): 431-6.

158. Wang JG, Mahmud SA, Nguyen J, Slungaard A. Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. *Journal of Immunology* 2006; 177(12): 8714-22.
159. Kubes P, Sihota E, Hickey MJ. Endogenous but not exogenous nitric oxide decreases TNF-alpha-induced leukocyte rolling. *American Journal of Physiology* 1997; 273(3 Pt 1): G628-35.
160. Grattendick K, Stuart R, Roberts E, et al. Alveolar macrophage activation by myeloperoxidase: a model for exacerbation of lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002; 26(6): 716-22.
161. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology & Cell Biology* 2001; 79(5): 502-6.
162. Lefkowitz DL, Mills K, Morgan D, Lefkowitz SS. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992; 199(2): 204-10.
163. Ali M, Pulli B, Courties G, et al. Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science* 2016; 1(7): 633-43.
164. Cook NL, Viola HM, Sharov VS, Hool LC, Schöneich C, Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and perturb Ca²⁺ homeostasis in human coronary artery endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52(5): 951-61.
165. Fukui K, Kaneda M, Takahashi E, Washio M, Doi K. Protective effects of sulfhydryl compounds on HOCl-induced intracellular Ca²⁺ increase in single rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1994; 26(4): 455-61.
166. Hammerschmidt S, Wahn H. The effect of the oxidant hypochlorous acid on the L-type calcium current in isolated ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1998; 30(9): 1855-67.
167. Askari AT, Brennan M-L, Zhou X, et al. Myeloperoxidase and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Play a Central Role in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197(5): 615-24.
168. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112(18): 2812-20.
169. Rudolph V, Andrié RP, Rudolph TK, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature Medicine* 2010; 16(4): 470-4.

170. Wang Y, Rosen H, Madtes DK, et al. Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(44): 31826-34.
171. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16(5): 558-64.
172. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(44): 41279-87.
173. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37(6): 902-11.
174. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(6): 2979-84.
175. Merck KGaA. HL-1 Cells. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und/oder ihre Tochterunternehmen. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/hl-1-cells> (zuletzt abgerufen am 18.06.2021)
176. NIH 3T3 Cell Line. NIH3T3 Cell Culture Information. NIH 3T3 Cell Line. <https://www.nih3t3.com/cell-culture-information/> (zuletzt abgerufen am 18.06.2021)
177. Vettel C, Lindner M, Dewenter M, et al. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circulation Research* 2017; 120(1): 120-32.
178. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE. Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *Journal of Visualized Experiments* 2009; (23).
179. Wells SP, Waddell HM, Sim CB, et al. Cardiomyocyte functional screening: interrogating comparative electrophysiology of high-throughput model cell systems. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2019; 317(6): C1256-C67.
180. Multi Channel Systems. 120pMEA Layout. Multi Channel Systems MCS GmbH a division of Harvard Bioscience, Inc. https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/data_sheets/120pMEA_Layout.pdf (zuletzt abgerufen am 18.06.2021)
181. Coronel R, Wilms-Schopman FJG, de Groot JR, Janse MJ, van Capelle FJL, de Bakker JMT. Laplacian Electrograms and the Interpretation of Complex Ventricular Activation

- Patterns During Ventricular Fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2000; 11(10): 1119-28.
182. Lammers WJ, Schalij MJ, Kirchhof CJ, Allessie MA. Quantification of spatial inhomogeneity in conduction and initiation of reentrant atrial arrhythmias. *American Journal of Physiology* 1990; 259(4 Pt 2): H1254-63.
 183. Chakraborty A, Pasek DA, Huang T-Q, et al. Inhibition of CaMKII Does Not Attenuate Cardiac Hypertrophy in Mice with Dysfunctional Ryanodine Receptor. *PLOS ONE* 2014; 9(8): e104338.
 184. Chen MQ, Wong J, Kuhl E, Giovannardi L, Kovacs GT. Characterisation of electrophysiological conduction in cardiomyocyte co-cultures using co-occurrence analysis. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2013; 16(2): 185-97.
 185. Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm* 2011; 8(12): 1963-8.
 186. Berridge MJ. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 2006; 40(5-6): 405-12.
 187. Despa S, Shui B, Bossuyt J, Lang D, Kotlikoff MI, Bers DM. Junctional Cleft [Ca²⁺] i Measurements Using Novel Cleft-Targeted Ca²⁺ Sensors. *Circulation Research* 2014; 115(3): 339-47.
 188. Hund TJ, Rudy Y. Rate Dependence and Regulation of Action Potential and Calcium Transient in a Canine Cardiac Ventricular Cell Model. *Circulation* 2004; 110(20): 3168-74.
 189. Kistamás K, Veress R, Horváth B, Bányász T, Nánási PP, Eisner DA. Calcium Handling Defects and Cardiac Arrhythmia Syndromes. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11.
 190. Deo M, Weinberg SH, Boyle PM. Calcium Dynamics and Cardiac Arrhythmia. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2017; 11: 1179546817739523.
 191. Christensen MD, Dun W, Boyden PA, Anderson ME, Mohler PJ, Hund TJ. Oxidized Calmodulin Kinase II Regulates Conduction Following Myocardial Infarction: A Computational Analysis. *PLOS Computational Biology* 2009; 5(12): e1000583.
 192. Hund TJ, Decker KF, Kanter E, et al. Role of activated CaMKII in abnormal calcium homeostasis and I(Na) remodeling after myocardial infarction: insights from mathematical modeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 45(3): 420-8.
 193. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, et al. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Cardiac Arrhythmogenesis in Heart Failure. *Circulation: Heart Failure* 2009; 2(6): 664-75.

194. Xie L-H, Chen F, Karagueuzian HS, Weiss JN. Oxidative Stress–Induced Afterdepolarizations and Calmodulin Kinase II Signaling. *Circulation Research* 2009; 104(1): 79-86.
195. Zhang R, Khoo MS, Wu Y, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature Medicine* 2005; 11(4): 409-17.
196. Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause E-G. The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase is activated in response to β -adrenergic stimulation and becomes Ca²⁺-independent in intact beating hearts. *FEBS Letters* 1997; 409(2): 131-6.
197. Feng Y, Cheng J, Wei B, Wang Y. CaMKII inhibition reduces isoproterenol-induced ischemia and arrhythmias in hypertrophic mice. *Oncotarget* 2017; 8(11): 17504-9.
198. Andrysiak K, Stępniewski J, Dulak J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2021.
199. Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights Into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes. *Circulation Research* 2015; 117(1): 80-8.
200. Lee Y-K, Ng K-M, Lai W-H, et al. Calcium Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reviews and Reports* 2011; 7(4): 976-86.
201. Campbell HM, Quick AP, Abu-Taha I, et al. Loss of SPEG Inhibitory Phosphorylation of Ryanodine Receptor Type-2 Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation* 2020; 142(12): 1159-72.
202. Zima A, Blatter L. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular Research* 2006; 71(2): 310-21.
203. Molkentin JD, Bugg D, Ghearing N, et al. Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation* 2017; 136(6): 549-61.
204. Turner N, Blythe N. Cardiac Fibroblast p38 MAPK: A Critical Regulator of Myocardial Remodeling. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 2019; 6(3): 27.
205. Midwinter RG, Vissers MC, Winterbourn CC. Hypochlorous acid stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway enhances cell survival. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 394(1): 13-20.
206. Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock

- protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal* 1998; 333 (Pt 3)(Pt 3): 581-9.
207. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochemical Journal* 1998; 333 (Pt 2)(Pt 2): 291-300.
 208. Yang X, Zhang C, Jiang J, Li Y. Baicalein retards proliferation and collagen deposition by activating p38MAPK-JNK via microRNA-29. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019; 120(9): 15625-34.
 209. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2001; 280(1): C53-C60.
 210. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2011; 29(5): 196-202.
 211. Yang L, Li X, Zhang S, Song J, Zhu T. Baicalein inhibits proliferation and collagen synthesis of mice fibroblast cell line NIH/3T3 by regulation of miR-9/insulin-like growth factor-1 axis. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 2019; 47(1): 3202-11.
 212. Wang D, Yan Z, Bu L, et al. Protective effect of peptide DR8 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating the TGF-beta/MAPK signaling pathway and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2019; 382: 114703.
 213. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circulation Research* 2014; 114(3): 572-86.
 214. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. Electrotonic Modulation of Cardiac Impulse Conduction by Myofibroblasts. *Circulation Research* 2006; 98(6): 801-10.
 215. Rother J, Richter C, Turco L, et al. Crosstalk of cardiomyocytes and fibroblasts in co-cultures. *Open Biology* 2015; 5(6): 150038.
 216. Meiry G, Reisner Y, Feld Y, et al. Evolution of action potential propagation and repolarization in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2001; 12(11): 1269-77.
 217. Tenny S, Hoffmann M. Median. StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470533/> (zuletzt abgerufen am 18.06.2021)
 218. Dong JQ, Varma MV, Wolford A, et al. Pharmacokinetics and Disposition of the Thiouracil Derivative PF-06282999, an Orally Bioavailable, Irreversible Inactivator of Myeloperoxidase Enzyme, Across Animals and Humans. *Drug Metabolism and Disposition* 2016; 44(2): 209-19.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 KARDIALES AKTIONSPOTENTIAL. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE FÜNF PHASEN DES KARDIALEN AKTIONSPOTENTIALS MIT DEN ENTSPRECHENDEN IONENSTRÖMEN ²⁰	6
ABBILDUNG 2 BETEILIGTE STRUKTUREN DER ELEKTROMECHANISCHEN KOPPLUNG. DIE SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ZEIGT DIE OBERFLÄCHENMEMBRAN, DIE T-TUBULI, DAS SR UND MITOCHONDRIEN SOWIE VERSCHIEDENE IONENKANÄLE UND -TRANSPORTER, DIE IM TEXT ERWÄHNT SIND. β -AR STEHT FÜR β -ADRENOREZEPTOR; CA, CALCIUM; MCU, MITOCHONDRIALER CALCIUM-UNIORTER; NCX, NATRIUM-CALCIUM-AUSTAUSCHER; PMCA, PLASMAMEMBRAN-CALCIUM-ATPASE; RYR, RYANODIN-REZEPTOR ²⁴	7
ABBILDUNG 3 GETRIGGIERTE AKTIVITÄT. GETRIGGIERTE AKTIVITÄT WIRD PRIMÄR DURCH (A) FRÜHE NACHDEPOLARISATIONEN WÄHREND PHASE 2 UND 3 ODER (B) SPÄTE NACHDEPOLARISATIONEN WÄHREND DER PHASE 4 VERSURSACHT. $I_{CA,L}$ BEZEICHNET DEN L-TYP CALCIUM-STROM; $I_{NA,L}$, SPÄTEN NATRIUMSTROM; UND I_{NCX} , NATRIUM-CALCIUM-AUSTAUSCHER-STROM ²¹	13
ABBILDUNG 4 REENTRY. DIE ENTSTEHUNG EINES REENTRYS ERFORDERT EINEN LEITUNGSBLOCK, DER UNTER ANDEREM DURCH DIE DISPERSION DER REFRAKTÄRZEITEN VERURSACHT WERDEN KANN (FUNKTIONELLES HINDERNIS). DER LEITUNGSBLOCK KANN EBENFALLS DURCH EIN ANATOMISCHES HINDERNIS GEBILDET WERDEN. $I_{CA,L}$ BEZEICHNET DEN L-TYP CALCIUM-STROM; $I_{K,CA}$, DEN CALCIUMABHÄNGIGEN KALIUMSTROM. MODIFIZIERTE ABBILDUNG AUS LANDSTROM ET AL ²¹	14
ABBILDUNG 5 DREIDIMENSIONALE STRUKTUR DER MYELOPEROXIDASE. HÄM-MOLEKÜLE (ROT), A-HELICES (GRÜN), β -FALTBLATT-STRUKTUREN (GELB) ⁴	26
ABBILDUNG 6 SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER MPO. FERRIC MPO REAGIERT MIT H_2O_2 UND BILDET SO DEN COMPOUND I, WELCHER ÜBER ZWEI WEGE ZURÜCK ZUM FERRIC MPO REDUZIERT WERDEN KANN. ENTWEDER ÜBER DEN HALOGENIERUNGSZYKLUS (HALOGENATION CYCLE) MIT EINER EINZELNEN ÜBERTRAGUNG VON ZWEI ELEKTRONEN, WOBEI HOCL GENERIERT WIRD, ODER ÜBER DEN PEROXIDASEZYKLUS (PEROXIDASE CYCLE) MIT ZWEI GETRENNTEN ÜBERTRAGUNGEN VON JEWEILS EINEM ELEKTRON ÜBER DIE FORMATION DES COMPOUND II. AUßERHALB DER KATALYTISCHEN ZYKLEN GIBT ES ZWEI WEITERE REDOXSTATUS DER MPO, DIE FERROUS MPO UND COMPOUND III. H_2O_2 , WASSERSTOFFPEROXID; O_2^- , SUPEROXIDANION; O_2 , DIOXYGEN; OX^- , HYPO(PSEUDO-)HALOGENIGE SÄURE (ZUM BEISPIEL HYPOCHLORIGE SÄURE); RH^- , SUBSTRATRADIKAL; RH_2 , OXIDIERBARES SUBSTRAT; X^- , (PSEUDO-)HALOGENIDE (ZUM BEISPIEL CHLORID) ¹⁴⁷	27
ABBILDUNG 7 STIMULATIONSprotokoll. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES EXPERIMENTELLEN ABLAUFs. MIN STEHT FÜR MINUTE, SEK FÜR SEKUNDE, HZ FÜR HERTZ.	38
ABBILDUNG 8 PARAMETER DES CALCIUMTRANSIENTEN. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES CALCIUMTRANSIENTEN UND DER GEMESSENEN PARAMETER. T_0 BEZEICHNET DEN ZEITPUNKT DER STIMULATION; T_1 , TIME TO 10% PEAK; T_2 , TIME TO 50% PEAK; T_3 , TIME TO 90% PEAK; T_4 , TIME TO 10% BASELINE; T_5 , TIME TO 50% BASELINE; T_6 TIME TO 90% BASELINE. DER ROTE PFEIL KENNZEICHNET DEN STIMULATIONSPUNKT.	40
ABBILDUNG 9 ARRHYTHMISCHE EREIGNISSE. SCREENSHOTS DER SOFTWARE IONWIZARD MIT UNTERSCHIEDLICHEN ARRHYTHMISCHEN EREIGNISSEN. A) DIE ROTEN KREISE MARKIEREN BEISPIELHAFT CALCIUMTRANSIENTEN MIT DOPPELPEAKS. B) DIE ROTEN PFEILE MARKIEREN CALCIUMTRANSIENTEN, DIE AUßERHALB DES PACINGS AUFTRATEN. C) DER ROTE STRICH MARKIERT EINE FLIMMEREPISEDE DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION. EXTERNE STIMULATIONEN WERDEN DURCH KLEINE STRICHE AUF DER X-ACHSE ANGEZEIGT (SIEHE GRÜNER KREIS).	41
ABBILDUNG 10 ÜBERSICHT DES MIKROELEKTRODEN ARRAYS UND DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN PARAMETER. ABBILDUNG (A) ZEIGT BEISPIELHAFT EINE GLASPLATTE, DIE DAS MIKROELEKTRODEN ARRAY ENTHÄLT. IN ABBILDUNG (B) IST DIE	

ANORDNUNG DER MIKROELEKTRODEN GEZEIGT. (C) ZEIGT EINEN SCREENSHOT DER CARDIO2D SOFTWARE, IN DEM DIE FELDPOTENTIALE DER GESAMTEN KANÄLE, EIN FELDPOTENTIAL EINES EINZELNEN KANALS EINER MIKROELEKTRODE UND DIE AKTIVIERUNGSKARTE GEZEIGT WERDEN. ABBILDUNGEN (A) UND (B) SIND AUS MULTI CHANNEL SYSTEMS¹⁸⁰ ENTNOMMEN.50

ABBILDUNG 11 EFFEKT DER MPO AUF DEN CALCIUMTRANSIENTEN IN ISOLIERTEN MURINEN KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT CALCIUMTRANSIENTEN, DIE AUS ZEHN MESSUNGEN EINER ZELLE GEMITTELT WURDEN. DER OBERE CALCIUMTRANSIENT WURDE AUS DEN MESSUNGEN NACH 15 MINUTEN INKUBATION IN TYRODELÖSUNG GEMITTELT, DER UNTERE CALCIUMTRANSIENT AUS DEN MESSUNGEN NACH 15 MINÜTIGER INKUBATION MIT 5 µG/ML MPO UND 20 µM H₂O₂. AUF DER Y-ACHSE IST DIE FURA-2-RATIO ABGEBILDET, AUF DER X-ACHSE DIE ZEIT. DER PFEIL ZEIGT AUF DEN SIGNIFIKANT VERZÖGERTEN CALCIUMPEAK.53

ABBILDUNG 12 EINFLUSS MPO AUF CALCIUMTRANSIENT PARAMETER NACH ZWEITER BURST-STIMULATION. DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN EINFLUSS DER MPO AUF VERSCHIEDENE PARAMETER DES CALCIUMTRANSIENTEN. ISOLIERTE MURINE KARDIOMYOZYTEN WURDEN MIT 5 µG/ML MPO UND 20 µM H₂O₂ BEZIEHUNGSWEISE TYRODELÖSUNG FÜR 15 MINUTEN INKUBIERT. ANSCHLIEßEND ERFOLGTE DIE STIMULATION FÜR 20 SEKUNDEN BEI 4 HZ, 1 MINUTE BEI 0,4 HZ, 40 SEKUNDEN BEI 4 HZ. IM NÄCHSTEN SCHRITT WURDEN DIE CALCIUMTRANSIENTEN BEI EINER STIMULATION ÜBER 1 MINUTE BEI 0,4 HZ GEMESSEN (SIEHE ABBILDUNG 7 „MESSUNGEN 2“). ALS INDEX FÜR DIE CALCIUMKONZENTRATION WURDE DIE FURA-2-RATIO F340/F380 GENUTZT. (A) ZEIGT DIE TIME TO 50% PEAK MIT EINEM SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DER MPO- UND KONTROLLGRUPPE. (B) ZEIGT DIE TIME TO 90% PEAK OHNE EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED. (C) STELLT DIE TIME TO PEAK MIT EINEM SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN GRUPPEN DAR. IN (D) UND (E) SIND DIE TIME TO 50% BEZIEHUNGSWEISE 90% BASELINE GEZEIGT, JEWEILS OHNE SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN GRUPPEN. IN (F) IST DIE PEAK HEIGHT DARGESTELLT, DIE SICH ZWISCHEN DEN BEIDEN GRUPPEN NICHT UNTERSCHIEDET. (G) ZEIGT DIE BASALE CALCIUMKONZENTRATION, EBENFALLS OHNE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED. (H) ZEIGT EINEN NUMERISCH RELEVANTEN, STATISTISCH NICHT SIGNIFIKANTEN EFFEKT MIT VERMEHRTEN ARRHYTHMISCHEN EREIGNISSEN BEI MPO-INKUBATION IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE. N= 9 (MPO) BEZIEHUNGSWEISE N=10 (KONTROLLE) KARDIOMYOZYTEN AUS DREI WILDTYP FVBN MÄUSEN; *P< 0,05; STUDENT-T-TEST FÜR UNGEPAARTE STICHPROBEN; DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.54

ABBILDUNG 13 EINFLUSS MPO AUF CALCIUMTRANSIENT PARAMETER NACH ERSTER BURST-STIMULATION. DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN EINFLUSS DER MPO AUF VERSCHIEDENE PARAMETER DES CALCIUMTRANSIENTEN.56

ABBILDUNG 14 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DER CAMKII IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN NACH 30 MINUTEN, ZWEI STUNDEN UND SECHS STUNDEN INKUBATION MIT 5 µG MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ UND 100 NM ISOPRENALIN. DER PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS WURDE MITTELS WESTERNBLOT UNTERSUCHT. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH 30 MINUTEN MIT SIGNIFIKANTEM UNTERSCHIED ZWISCHEN ISOPRENALIN UND KONTROLLE. (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH ZWEI STUNDEN MIT EINEM NUMERISCH RELEVANTEN, STATISTISCH NICHT SIGNIFIKANTEN EFFEKT IN RICHTUNG VERMEHRTER PHOSPHORYLIERUNG BEI MPO-INKUBATION IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE. (C) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH SECHS STUNDEN OHNE SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE. (D) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH 30 MINUTEN OHNE UNTERSCHIED ZWISCHEN MPO UND KONTROLLE. (E) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH ZWEI STUNDEN MIT SIGNIFIKANTEM UNTERSCHIED ZWISCHEN MPO UND KONTROLLE. (F) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH SECHS STUNDEN OHNE UNTERSCHIED ZWISCHEN MPO UND KONTROLLE. (G) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN CAMKII-PHOSPHORYLIERUNG. (H) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE CAMKII NACH 30 MINUTEN. (I) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE CAMKII NACH ZWEI STUNDEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSIOMETRISCH AUSGEWERTET

WURDEN. N=6 BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 3 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; *P<0,5, **P<0,01; (A)-(C) UND (G) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (D)-(F) STUDENT-T-TEST FÜR UNGEPAARTE STICHPROBEN; (A)-(G) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.58

ABBILDUNG 15 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DES RYRS IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN NACH 30 MINUTEN, ZWEI STUNDEN UND SECHS STUNDEN INKUBATION MIT 5 µG MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ UND 100 NM ISOPRENALIN. DER PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS WURDE MITTELS WESTERNBLOT UNTERSUCHT. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH 30 MINUTEN, (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH ZWEI STUNDEN, (C) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH SECHS STUNDEN.(D) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN RYR-PHOSPHORYLIERUNG. ZU ALLEN INKUBATIONSZEITPUNKTEN ZEIGTEN SICH KEINE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN. (E) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE RYR NACH 30 MINUTEN. (F) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE RYR NACH ZWEI STUNDEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSISOMETRISCH AUSGEWERTET WURDEN. N=6 BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 3 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; (A)-(D) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (A)-(D) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.60

ABBILDUNG 16 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON PLN IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG VON PLN IN HL-1 KARDIOMYOZYTEN NACH 30 MINUTEN, ZWEI STUNDEN UND SECHS STUNDEN INKUBATION MIT 5 µG MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ UND 100 NM ISOPRENALIN. DER PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS WURDE MITTELS WESTERNBLOT UNTERSUCHT. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG VON PLN NACH 30 MINUTEN, (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG VON PLN NACH ZWEI STUNDEN, (C) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG VON PLN NACH SECHS STUNDEN. (D) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN PLN-PHOSPHORYLIERUNG. ZU ALLEN INKUBATIONSZEITPUNKTEN ZEIGTEN SICH KEINE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN. (E) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE PLN NACH SECHS STUNDEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSISOMETRISCH AUSGEWERTET WURDEN. N=6 BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 3 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; (A)-(D) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (A)-(D) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.62

ABBILDUNG 17 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DER CAMKII IN IPS-KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII IN IPS-KARDIOMYOZYTEN NACH 30 MINUTEN, ZWEI STUNDEN UND SECHS STUNDEN INKUBATION MIT 5 µG MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ UND 100 NM ISOPRENALIN. DER PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS WURDE MITTELS WESTERNBLOT UNTERSUCHT. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH 30 MINUTEN MIT EFFEKT DURCH ISOPRENALIN. (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH ZWEI STUNDEN OHNE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN BEDINGUNGEN. (C) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER CAMKII NACH SECHS STUNDEN OHNE SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE. (D) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN CAMKII-PHOSPHORYLIERUNG. (E) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE CAMKII NACH 30 MINUTEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSISOMETRISCH AUSGEWERTET WURDEN. N=6 BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 2 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; (A)-(D) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (A)-(D) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.63

ABBILDUNG 18 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DES RYRS IN IPS-KARDIOMYOZYTEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS IPS-KARDIOMYOZYTEN NACH 30 MINUTEN, ZWEI STUNDEN UND SECHS STUNDEN INKUBATION MIT 5 µG MPO + 20 µM H₂O₂, 80 µM H₂O₂ UND 100 NM ISOPRENALIN. DER PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS WURDE MITTELS WESTERNBLOT UNTERSUCHT. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH 30 MINUTEN, (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH ZWEI STUNDEN, (C) RELATIVE

PHOSPHORYLIERUNG DES RYRS NACH SECHS STUNDEN. (D) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN RYR-PHOSPHORYLIERUNG. ZU ALLEN INKUBATIONSZEITPUNKTEN ZEIGTEN SICH KEINE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN. (E) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE RYR NACH 30 MINUTEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSIOMETRISCH AUSGEWERTET WURDEN. N=6 BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 2 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; (A)-(D) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (A)-(D) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.64

ABBILDUNG 19 EFFEKT DER MPO AUF DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS DER P38 MAPK. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER P38 MAPK NACH 15 UND 30 MINUTEN INKUBATION VON 3T3-FIBROBLASTEN MIT 10 µG MPO + 40 µM H₂O₂, 100 µM H₂O₂ UND 6 NG/ML TGF-β. (A) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER P38 MAPK NACH 15 MINUTEN MIT NUMERISCH RELEVANTEM, STATISTISCH NICHT SIGNIFIKANTEM EFFEKT BEI MPO UND H₂O₂ IN RICHTUNG VERMEHRTER PHOSPHORYLIERUNG. (B) RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG DER P38 MAPK NACH 30 MINUTEN MIT SIGNIFIKANTER ERHÖHUNG DER PHOSPHORYLIERUNG BEI H₂O₂. (C) ZEITVERLAUF DER RELATIVEN P38 MAPK-PHOSPHORYLIERUNG. (D) REPRÄSENTATIVE WESTERNBLOTS FÜR TOTALE UND PHOSPHORYLIERTE P38 MAPK NACH 15 UND 30 MINUTEN. DIE GRÜNEN KÄSTCHEN UM DIE PROTEINBANDEN DEFINIEREN DIE BEREICHE, DIE DENSIOMETRISCH AUSGEWERTET WURDEN. N=4 (MPO) BEZIEHUNGSWEISE N=3 (KEINE BEHANDLUNG, H₂O₂, TGF-β) BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 3 UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; *P<0,05; (A)-(D) ANOVA EINFAKTORIELLE VARIANZANALYSE; (A)-(D) DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.66

ABBILDUNG 20 EFFEKT DER MPO AUF DIE KOLLAGENDEPOSITION. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE KOLLAGENDEPOSITION NACH 36 STUNDEN INKUBATION VON 3T3-FIBROBLASTEN MIT 10 µG/ML MPO + 40 µM H₂O₂ UND 6NG/ML TGF-β. (A) KOLLAGENDEPOSITION NACH 36 STUNDEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN BEDINGUNGEN MIT EINER NUMERISCH HOCHRELEVANTEN ERHÖHUNG BEI TGF-β-INKUBATION. (B) REPRÄSENTATIVES BILD DER KOLLAGENDEPOSITION OHNE BEHANDLUNG. (C) REPRÄSENTATIVES BILD DER KOLLAGENDEPOSITION BEI INKUBATION MIT MPO. (D) REPRÄSENTATIVES DER BILD DER KOLLAGENDEPOSITION BEI TGF-β INKUBATION. (A) N=2 BIOLOGISCHE REPLIKATE FÜR DIE BEDINGUNGEN KEINE BEHANDLUNG UND MPO, N=1 BIOLOGISCHES REPLIKAT FÜR DIE BEDINGUNG TGF- β, DARGESTELLT ALS ARITHMETISCHES MITTEL MIT STANDARDFEHLER. MAßSTABBALKEN 200 µM.....67

ABBILDUNG 21 LICHTMIKROSKOPISCHE BEURTEILUNG UNTERSCHIEDLICHER VERHÄLTNISSE DER KOKULTUR. GEZEIGT SIND DREI LICHTMIKROSKOPISCHE BILDER MIT UNTERSCHIEDLICHEN VERHÄLTNISSEN DER HL-1 KARDIOMYOZYTEN UND 3T3-FIBROBLASTEN, AUFGENOMMEN AN TAG 5 NACH AUSSAAT. MAN KANN ERKENNEN, DASS DIE MIT PFEILEN VERSEHENEN FIBROBLASTENTEPPICHE BEI STEIGENDER FIBROBLASTENANZAHL GRÖßER WERDEN. 90:10 STEHT FÜR 90% KARDIOMYOZYTEN UND 10% FIBROBLASTEN, 80:20 FÜR 80% KARDIOMYOZYTEN UND 20% FIBROBLASTEN, 70:30 FÜR 70% KARDIOMYOZYTEN UND 30% FIBROBLASTEN. MAßSTABBALKEN 200 µM.68

ABBILDUNG 22 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE BEURTEILUNG DER REINEN KARDIOMYOZYTENKULTUR AN VERSCHIEDENEN TAGEN. GEZEIGT SIND DREI SCREENSHOTS, IN DENEN JEWEILS DIE FELDPOTENTIALE DER GESAMTEN KANÄLE DER REINEN KARDIOMYOZYTENKULTUR AN UNTERSCHIEDLICHEN TAGEN ABGEBILDET SIND. DIE AUFNAHME ZEIGT EINEN ZEITRAUM VON 5 SEKUNDEN. VON TAG 3 BIS TAG 5 LÄSST SICH EINE ZUNAHME DER STÄRKE DER FELDPOTENTIALE (DARGESTELLT DURCH DIE AMPLITUDENHÖHE) UND DER ANZAHL AN KANÄLEN MIT SIGNALEN BEOBACHTEN. VON TAG 5 BIS TAG 7 ZEIGT SICH EINE ABNAHME DER STÄRKE DER FELDPOTENTIALE UND DER ANZAHL AN KANÄLEN MIT SIGNALEN.70

ABBILDUNG 23 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE BEURTEILUNG UNTERSCHIEDLICHER VERHÄLTNISSE DER KOKULTUR. GEZEIGT SIND DREI SCREENSHOTS DER GESAMTEN FELDPOTENTIALE VON KOKULTUREN AUS HL-1 KARDIOMYOZYTEN UND 3T3-FIBROBLASTEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN VERHÄLTNISSEN AN TAG 5. DIE AUFNAHME ZEIGT EINEN ZEITRAUM VON 5 SEKUNDEN. ERST AB EINEM VERHÄLTNIS VON 99:1 LASSEN SICH ELEKTRISCHE SIGNALE DETEKTIEREN. 90:10 STEHT FÜR 90%

KARDIOMYOZYTEN UND 10% FIBROBLASTEN, 95:5 FÜR 95% KARDIOMYOZYTEN UND 5% FIBROBLASTEN, 99:1 FÜR 99% KARDIOMYOZYTEN UND 1% FIBROBLASTEN.71

ABBILDUNG 24 ELEKTRISCHES KONDUKTIONSPROFIL DER REINEN KARDIOMYOZYTENKULTUR UND DER KOKULTUR AUS 99% HL-1 KARDIOMYOZYTEN UND 1% 3T3-FIBROBLASTEN BEI AUSSAAT. (A) DIE ABSOLUTE INHOMOGENITÄT ZEIGT EINE NICHT SIGNIFIKANT ERHÖHTE INHOMOGENITÄT DER KOKULTUR. (B) DER INHOMOGENITÄTSINDEX ZEIGT EBENFALLS EINE NICHT SIGNIFIKANT ERHÖHTE INHOMOGENITÄT DER KOKULTUR IM VERGLEICH ZUR REINEN KARDIOMYOZYTENKULTUR. (C) GEZEIGT IST DER MITTELWERT DER GESCHWINDIGKEIT MIT EINEM SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN KOKULTUR UND KARDIOMYOZYTENKULTUR. (D) GEZEIGT IST DER MEDIAN DER GESCHWINDIGKEIT OHNE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN BEIDEN KULTUREN. (E) REPRÄSENTATIVE AKTIVIERUNGSKARTE DER REINEN KARDIOMYOZYTENKULTUR. (F) REPRÄSENTATIVE AKTIVIERUNGSKARTE DER KOKULTUR AUS 99% HL-1 KARDIOMYOZYTEN UND 1% 3T3-FIBROBLASTEN BEI AUSSAAT. (A)-(D) N=6 (REINE KARDIOMYOZYTENKULTUR) BEZIEHUNGSWEISE 7 (KOKULTUR) BIOLOGISCHE REPLIKATE AUS 4 (REINE KARDIOMYOZYTENKULTUR) BEZIEHUNGSWEISE 5 (KOKULTUR) UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN; *P<0,05; STUDENT-T-TEST FÜR UNGEPAARTE STICHPROBEN; DARGESTELLT SIND ARITHMETISCHES MITTEL UND STANDARDFEHLER.72

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 MATERIAL ZELLKULTUR HL-1 KARDIOMYOZYTEN UND 3T3 FIBROBLASTEN	34
TABELLE 2 MATERIAL ZELLKULTUR INDUZIERTER PLURIPOTENTER STAMMZELL- KARDIOMYOZYTEN	36
TABELLE 3 DEFINITION UND BIOLOGISCHE RELEVANZ PARAMETER CALCIUMTRANSIENT	39
TABELLE 4 MATERIAL IONOPTIX	41
TABELLE 5 MATERIAL WESTERNBLOT INKUBATION	43
TABELLE 6 MATERIAL WESTERNBLOT PROBENVORBEREITUNG	44
TABELLE 7 MATERIAL WESTERNBLOT BLOTTEN	46
TABELLE 8 MATERIAL IMMUNFLUORESCENZ FÄRBUNG	47
TABELLE 9 MATERIAL MIKROELEKTRODEN ARRAY	52