

Inauguraldissertation

**Humane organotypische Herzgewebeschnitte als
elektrophysiologisches Langzeitmodell**



durchgeführt am Institut experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie, Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Jan Wenzel

Aus dem
Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Schwaninger

Humane organotypische Herzgewebeschnitte als elektrophysiologisches Langzeitmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-aus der Sektion Naturwissenschaften-

vorgelegt von
Jan Wenzel
aus Dresden
Lübeck 2011

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Heinrich Terlau
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.10.2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Erregungsausbreitung im Herzen.....	3
2.2. Ionenkanäle und ihre Eigenschaften	5
2.3. Elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten	7
2.4. Kardiale Medikamentenentwicklung und Sicherheitspharmakologie	10
2.5. Kultivierung von Kardiomyozyten	14
2.6. Ziel der Arbeit.....	15
3. Materialien.....	17
3.1. Verwendete Geräte	17
3.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.3. Chemikalien	20
3.4. Puffer und Medien	21
4. Methoden.....	22
4.1. Herstellung von Herzgewebeschnitten	22
4.1.1. Herzen kleiner Säuger	22
4.1.2. Herzen großer Säuger	23
4.1.3. Humanes Herzgewebe	23
4.1.4. Das Schneiden des Herzgewebes	25
4.2. Kultivierung von Herzschnitten.....	25
4.3. MTT – Vitalitätsmessung	26
4.4. Vitalitätsfärbung	27
4.5. Herstellung von Paraffinschnitten und deren Färbung	27
4.6. Intrazelluläre Membranpotentialableitungen.....	28
4.6.1. Das Messprinzip	28
4.6.2. Die Messbedingungen	29
4.6.3. Frequenzabhängigkeiten und Refraktärzeit	31
4.6.4. Bestimmung der Reizleitungsgeschwindigkeit	32
4.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	32
4.7.1. RNA-Isolation und cDNA-Synthese	32

4.7.2.	Quantitative „real-time“ Reverse Transkriptions-PCR	33
4.7.3.	Primerdesign und –Optimierung	34
4.8.	Statistik	36
5.	Ergebnisse	37
5.1.	Akute myokardiale Gewebeschnitte	37
5.1.1.	Die Etablierung der Gewebeschnitttechnik	37
5.1.2.	Die Vitalität der murinen und humanen Gewebeschnitte	38
5.1.3.	Die elektrophysiologische Aktivität von Herzzellen verschiedener Spezies	39
5.1.4.	Frequenzabhängigkeit des humanen und des murinen Aktionspotentials...	41
5.1.5.	Pharmakologische Beeinflussung verschiedener Ionenströme in humanen Gewebeschnitten.....	42
5.1.6.	Geschlechtsabhängigkeit des humanen Aktionspotentials	45
5.2.	Kultivierte humane Gewebeschnitte	46
5.2.1.	Erfolg der Kultivierung	46
5.2.2.	Vitalität	47
5.2.3.	Erregungsausbreitung und Struktur.....	47
5.2.4.	Expression der wichtigsten Ionenkanäle und –Transporter.....	48
5.2.5.	Aktionspotentiale	50
5.2.6.	Elektrische Restitutionskurven und Refraktärzeit	52
5.2.7.	Pharmakologische Beeinflussung von Ionenströmen.....	53
5.2.8.	Vergleich zwischen explantiertem und Morrow-Gewebe	56
5.3.	Beeinflussung des humanen Aktionspotentials durch Pentamidin	60
6.	Diskussion	62
6.1.	Akute Gewebeschnitte	63
6.2.	Kultur der Gewebeschnitte	70
6.3.	Kultivierte Gewebeschnitte als sicherheitspharmakologisches Langzeitmodell.....	76
6.4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
7.	Literaturverzeichnis	80
8.	Anhang	97
8.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	97
8.2.	Danksagung	99
8.3.	Lebenslauf.....	100
8.4.	Veröffentlichungen	101

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten weltweit als die häufigste Todesursache. Ziel der Herz-Kreislaufforschung ist es, pathologische Veränderungen des Herzens effektiver behandeln zu können und riskante Nebenwirkungen von Medikamenten zu vermeiden. Dafür werden relevante Modellsysteme des menschlichen Herzens benötigt, da Speziesunterschiede die Reaktion der Herzzellen auf anti- und proarrhythmische Faktoren stark beeinflussen können.

Mit dieser Arbeit wird ein neues Modell zur Evaluierung von kardioaktiven Substanzen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften humaner Herzzellen vorgestellt. Therapeutisch entferntes Herzgewebe aus dem linken Ventrikel wurde benutzt, um 300 µm dicke Gewebeschnitte unter kardioplegischen Bedingungen herzustellen. Mittels einer Vitalitätsfärbung konnte festgestellt werden, dass durch die Gewinnung der Schnitte nur ein bis zwei Zellschichten an den Schnitträndern beschädigt wurden, das Innere der Schnitte aber intakt blieb. Intrazellulär abgeleitete Aktionspotentiale zeigten, dass die ventrikulären Kardiomyozyten in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt wurden und eine Reizleitungsgeschwindigkeit im Gewebe von 0,35 m/s spiegelte ein intaktes und funktionelles Synzytium der erregbaren Zellen wider. Die Form der Aktionspotentiale konnte durch physiologische und pharmakologische Einflüsse verändert werden. Unter anderem konnte die Offenwahrscheinlichkeit ATP-abhängige Kaliumkanäle durch Rilmakalim erhöht werden. Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Reaktion des Herzens auf ischämische Bedingungen. Auch die proarrhythmische Wirkung einer Blockade des repolarisierenden Kaliumkanals hERG wurde mit Dofetilid nachgewiesen. Diese Blockade kann tödlich verlaufende Arrhythmien verursachen und führte schon mehrfach dazu, dass Medikamenten die Zulassung entzogen wurde.

Nachdem die Funktionalität der akut hergestellten Herzgewebeschnitte nachgewiesen wurde, konnte eine Kultivierbarkeit über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen etabliert werden. Die Kultivierung auf einer Filtermembran führte zu einer Abnahme der Reizleitungsgeschwindigkeit und zu einer leichten Veränderung in der Aktionspotentialform. Diese Formänderung beruht möglicherweise auf einer veränderten Kalziumkanalaktivität, da die Reaktion der Zellen auf eine Blockade mit Nifedipin, einem Kalzium-Antagonisten, abnahm. Die mRNA-Expression der bedeutsamsten Ionenkanäle blieb stabil, es waren allerdings strukturelle Änderungen im Gewebe zu erkennen.

Trotz der veränderten Aktionspotentialform reagierten die Kardiomyozyten auf Rilmakalim und Dofetilid gleichbleibend stark über die gesamte Kulturdauer. Dies belegt eine funktionelle Stabilität der Ionenkanäle der Kardiomyozyten über einen langen Zeitraum. Somit können Langzeiteffekte von Ionenkanal-modulierenden Substanzen an diesen kultivierten Gewebeschnitten untersucht werden. Mit Pentamidin wurde ein klinisch eingesetztes Antiprotozokum getestet, das in mehreren Fällen zum Auftreten von ventrikulären Arrhythmien führte. In den akut hergestellten humanen Gewebeschnitten wurde kein Effekt auf das Aktionspotential festgestellt. Nach einer Kulturdauer von 7 Tagen mit Pentamidin zeigten die Kardiomyozyten starke proarrhythmogene Aktivitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Somit wurde ein neues kardiales Modellsystem entwickelt, das durch die Multizellularität, den humanen Ursprung und die Langzeitstabilität von Ionenkanälen viele Vorteile bestehender Modellsysteme in sich vereint. Die organotypischen Herzweschnitte eignen sich insbesondere für Studien zur Untersuchung neuer Substanzen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften humanen Myokards.

2 Einleitung

In den Industrienationen sind Herz-Kreislauserkrankungen die häufigste Todesursache. So starben im Jahr 2004 weltweit ca. 7,2 Millionen Menschen an den Folgen der Koronaren Herzkrankheit, die damit die häufigste Todesursache darstellt (WHO, 2008). In Deutschland waren kardiovaskuläre Erkrankungen der Grund für 56 % aller Todesfälle im Jahr 2007, der Hauptanteil davon verstarb am Herzinfarkt (Statistisches Bundesamt, 2009). Um diese Herz-Kreislauf-Erkrankungen effektiv und sicher behandeln zu können, besteht ein hoher Bedarf an neuen Strategien und Medikamenten. Das Herz und seine pathologischen Veränderungen bilden ein zentrales Zielobjekt dieser Strategien und sind deswegen Gegenstand intensiver medizinischer und biologischer Forschung.

Direkte Erkrankungen des Herzens sind oft auf eine Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Erregungssystems zurückzuführen. Im Folgenden werden diese kurz dargestellt, außerdem wird ein Überblick über kardiale Modelle in der Medikamentenentwicklung gegeben.

2.1 Erregungsausbreitung im Herzen

Das Herz ist eine Pumpe, die dafür sorgt, dass alle Zellen des Körpers mit genügend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Es bildet damit die Grundlage für jede metabolische Aktivität des Organismus. Diese Pumpe besteht in den höheren Säugetieren aus vier Kammern (Abb. 1), wobei die linke Herzhälfte den Körperkreislauf versorgt und die rechte Herzhälfte mit dem Lungenkreislauf verbunden ist.

Für die Versorgung der beiden Blutkreisläufe, werden in den Kammern Unterdrücke erzeugt, um das Blut aus den Venen anzusaugen und Überdrücke, um es in die großen arteriellen Gefäße auszuwerfen. Dieses Pumpen der Kammern wird durch Kontraktionen der Herzmuskulatur ermöglicht, die sich rhythmisch zusammenzieht und relaxiert. Der Rhythmus und die Kraftamplitude dieser Kontraktionen werden durch elektrische Aktivitäten in den Herzzellen (Aktionspotentiale) und ihre Ausbreitung reguliert. Die elektrische Gesamtaktivität des Herzens kann mit einem Elektrokardiogramm (EKG) aufgezeichnet werden und vereint die Aktivitäten der Einzelkomponenten (Abb. 1).

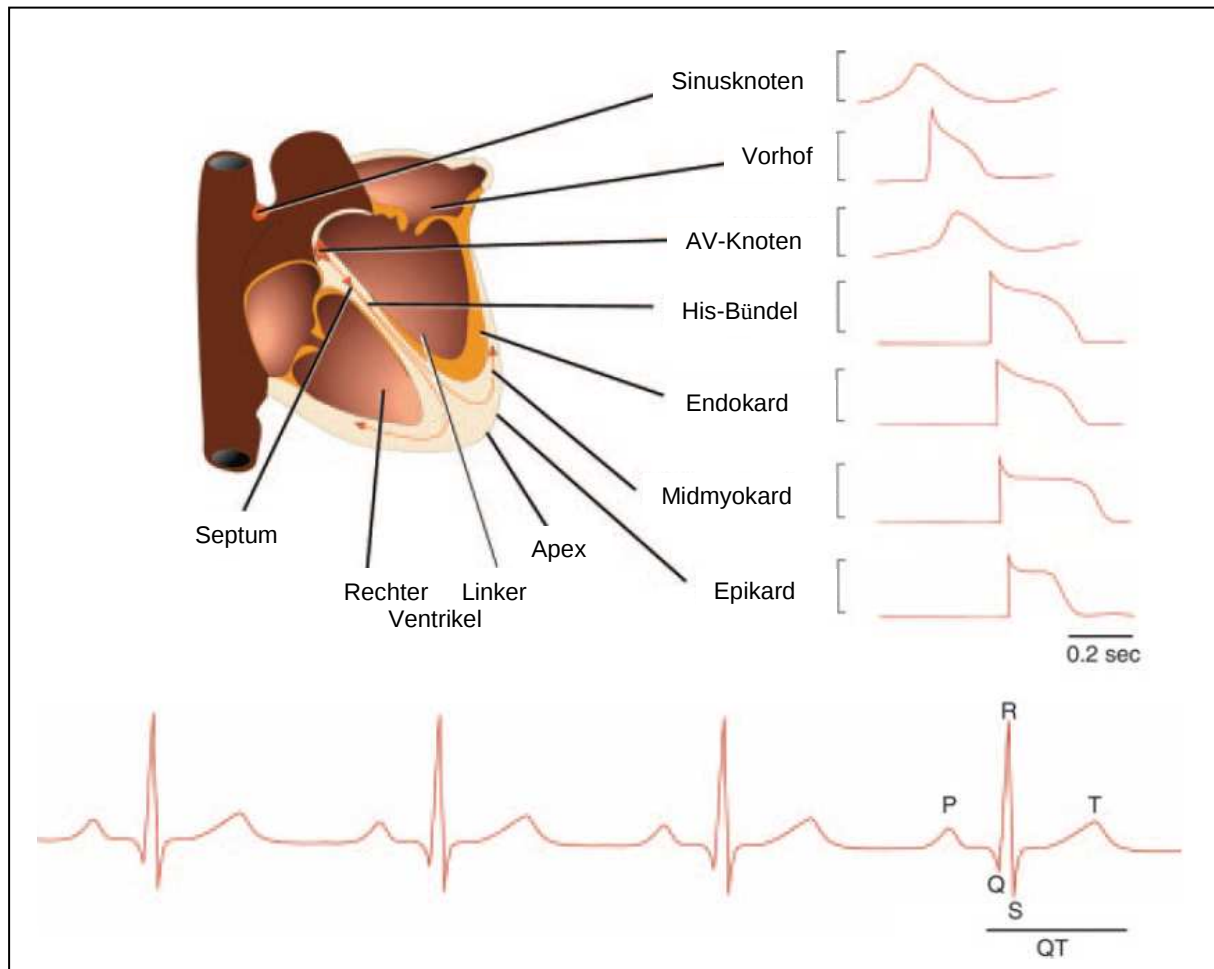


Abbildung 1: Elektrische Aktivität des Herzens. Im oberen Teil sind die verschiedenen elektrisch aktiven Strukturen des Herzens dargestellt und durch ihr charakteristisches Aktionspotential beschrieben. Im unteren Teil ist eine typische EKG-Aufnahme dargestellt und das letzte Signal zeitlich synchron zu den Aktionspotentialen aufgezeichnet (modifiziert nach Nerbonne et al., 2005).

Da die Kardiomyozyten über sogenannte „gap junctions“ elektrisch miteinander gekoppelt sind, bilden die beiden Vorhöfe, bzw. die beiden Ventrikel jeweils ein Synzytium von erregbaren Zellen. Wenn dementsprechend eine Herzzelle stimuliert ist und ein Aktionspotential entsteht, wird dieses an angrenzende Zellen übertragen und es kommt zu einer Kontraktion des gesamten Gewebekomplexes.

Der Erregungsursprung dieser elektrischen Aktivitäten liegt im Sinusknoten, der im oberen Teil des rechten Vorhofs lokalisiert ist (Abb. 1). Dieser primäre Schrittmacher des Herzens bestimmt den Zeitpunkt und die Frequenz der Erregungen. Im Sinusknoten befinden sich spezialisierte Kardiomyozyten, die keine stabile Ruhephase in ihrer elektrischen Aktivität haben und dadurch spontane Aktionspotentiale auslösen. Auch die anderen Teile des Erregungssystems haben die Fähigkeit, spontan aktiv zu werden, jedoch sind sie langsamer in ihrer Frequenz, sodass der Sinusknoten zumeist der bestimmende Rhythmusgeber ist (Boyett, 2009). Vom Sinusknoten breitet sich das elektrische Signal über beide Vorhöfe aus, sodass diese

kontrahieren können. Der Erregungsverlauf der Vorhöfe ist im EKG durch die P-Welle beschrieben (Abb. 1).

Der atrioventrikulären Knoten (AV-Knoten) stellt die einzige elektrische Verbindung zwischen Vorhöfen und Kammern dar und verlangsamt die Erregungsausbreitung. Auch der AV-Knoten hat ein Schrittmacherpotential, die Frequenz ist allerdings langsamer als die des Sinusknotens, sodass er als sekundärer Schrittmacher bezeichnet wird. Der Abstand von P-Welle bis zum Beginn der negativen Q-Zacke im EKG ist ein Ausdruck der atrioventrikulären Leitungszeit und gibt den Stimulationsbeginn der Hauptkammern vor.

Darauf folgend wird die Erregung über den rechten und den linken Tawara-Schenkel des His-Bündels und die angrenzenden Purkinjefasern zur Herzspitze getragen, von wo aus sie in die verbliebene Kammermuskulatur übergeht (Abb. 1). Dieser Ablauf ist sehr schnell, sodass innerhalb von weniger als 100 ms beide Ventrikel vollständig erregt sind. Dadurch können sich die Kammern synchron und effektiv zusammenziehen, um das Blut auszuwerfen. Es befinden sich zwar tertiäre Schrittmacherzellen im ventrikulären Gewebe, die vor allem im His-Bündel und den angrenzenden Purkinjefasern lokalisiert sind, diese haben aber eine noch langsamere Frequenz als der AV-Knoten, sodass sie unter normalen physiologischen Umständen keine Rolle spielen. Der QRS-Komplex im EKG beschreibt die ventrikuläre Erregung, wobei die Aufstiegssteilheit der R-Zacke die Schnelligkeit der ventrikulären Reizübertragung darstellt. Die ST-Strecke zeigt die Erregungsrückbildung in den Ventrikeln an und die QT-Zeit steht für die gesamte intraventrikuläre Erregungszeit (Gima et al., 2002). Da die QT-Zeit abhängig ist von der Schlagfrequenz des Herzens, wird meist die auf die Frequenz korrigierte Form angegeben (QT_c , „corrected QT“; Drew et al., 2005).

2.2 Ionenkanäle und ihre Eigenschaften

Die verschiedenen Herzzellen besitzen unterschiedliche Ionenkanäle, deren Aktivität für die elektrischen Eigenschaften und die Form der Aktionspotentiale der jeweiligen Kardiomyozyte eine wesentliche Bedeutung hat.

Ionenkanäle sind Proteine, die Ionen den Übergang über eine biologische Membran entlang ihres elektrochemischen Gradienten erlauben. Sie besitzen eine Porenregion, die von einer oder mehreren α -Untereinheiten gebildet wird und die Membran durchspannt. Zusätzlich gibt es regulatorische, akzessorische Untereinheiten die mit dem porenbildenden Protein assoziiert

sind und die Eigenschaften des Ionenkanals modifizieren. Die α -Untereinheiten bilden durch homologe oder heterologe Zusammenlagerung von zwei oder mehr Untereinheiten funktionsfähige Poren, die selektiv für eine oder mehrere Ionenarten sein können.

Es gibt Hunderte verschiedene Ionenkanäle, die sich in ihrer Selektivität, ihren physikalischen Eigenschaften, ihrer Lokalisation und ihrem Aktivierungsmechanismus unterscheiden. Für die Aktionspotentiale des Herzens sind drei Ionenarten und die damit verbundenen Ionenkanalfamilien von besonderer Bedeutung. An der Initiation des Aktionspotentials sind hauptsächlich spannungsabhängige Natriumkanäle beteiligt (Na_v). Diese bestehen, genau wie die spannungsabhängigen Kalziumkanäle (Ca_v), aus einer α -Untereinheit, die aus vier homologen Domänen besteht, welche miteinander über zytoplasmatische Aminosäureketten verbunden sind. Eine Untereinheit ist aus sechs transmembranären Segmenten aufgebaut, wobei zwischen Segment fünf und Segment sechs die Pore gebildet wird. Die Spannungsabhängigkeit wird über positiv geladene Aminosäuren in Segment 4 gewährleistet, das bei einem bestimmten Membranpotential seine Konformation verändert, woraufhin die Pore geöffnet wird. Sowohl geöffnete Natrium- als auch offene Kalziumkanäle führen unter physiologischen Bedingungen zu einem Einstrom der jeweiligen Ionen, da die intrazelluläre Konzentration von Natrium und Kalzium deutlich geringer ist als außerhalb der Zelle.

Neben spannungsabhängigen Natrium- und Kalziumkanälen bilden die Kaliumkanäle die wichtigsten Ionenkanäle im Herzen. Kaliumkanäle können sehr unterschiedliche Eigenschaften haben und werden deshalb in mehrere Familien unterteilt. Eine große Gruppe bilden die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v), die auch aus vier homologen α -Untereinheiten aufgebaut sind, die jedoch nicht miteinander verbunden sind. Bei einer Depolarisation der Membran werden diese Kanäle geöffnet und Kalium, dessen Konzentration unter physiologischen Bedingungen im Zytosol höher ist als außerhalb der Membran, strömt aus der Zelle aus, sodass das Potential repolarisiert. Eine weitere bedeutende Gruppe der Kaliumkanäle im Herzen bilden die sogenannten Einwärtsgleichrichter (K_{ir}), die spannungsunabhängig aktiviert werden können und beispielsweise die Erhaltung des Ruhemembranpotentials, eine parasymphatische Aktivierbarkeit oder die Reaktion auf Energiemangel steuern können. Die α -Untereinheiten der Einwärtsgleichrichter lagern sich ebenfalls als Tetramere zusammen, haben allerdings nur zwei statt sechs Transmembrandomänen, die alle an der Porenbildung beteiligt sind.

Weitere Ionenkanäle sind im Herzen nachgewiesen, spielen in der Ausbildung des Aktionspotentials aber eine untergeordnete Rolle. Für Übersichtsarbeiten zu diesem Thema siehe auch: Terlau et al., 1998; Wettwer et al., 2003 und Nerbonne et al., 2005.

2.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten

Um die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Gewebestrukturen im Myokard zu erfüllen, müssen die Kardiomyozyten spezialisierte elektrophysiologische Eigenschaften besitzen. In Abbildung 1 kann man den zeitlichen Verlauf der einzelnen Aktionspotentiale in Kombination mit dem Ablauf des EKGs erkennen.

Für die Weiterleitung einer elektrischen Erregung müssen sich die Zellen zunächst in einem elektrisch ruhenden Zustand befinden. In diesem Zustand, den man Ruhemembranpotential nennt, liegt eine Spannung zwischen dem Extrazellularraum und dem Zytosol an, die aufgrund der Ionenverteilung über die Membran und die selektive Permeabilität für verschiedene Ionen entsteht. Diese Spannung beträgt im Inneren der Herzzelle ungefähr -80 mV, ein Wert der im physiologischen Zustand dem Gleichgewichtspotential von Kalium sehr nahe kommt. Das ist darin begründet, dass die Zellmembran hauptsächlich für Kalium durchlässig ist, und weniger für die anderen entscheidenden Ionen Natrium und Kalzium. In den meisten Herzzellen sind dafür die Einwärtsgleichrichter („inward rectifier“) des $K_{ir2.x}$ -Typs verantwortlich, die den I_{K1} -Strom bilden und in der Ruhephase (Phase 4) geöffnet sind (Abb. 2; Nerbonne et al., 2005). Außerdem hält die Natrium-Kalium-ATPase unter Verbrauch von Energie den Ionengradienten für Natrium und Kalium aufrecht, indem drei Natriumionen aus der Zelle hinaus und zwei Kaliumionen in die Zelle hineingepumpt werden (Hilgemann et al., 2006). Im Zeitraum einer nicht vorhandenen Erregung gibt es zwischen T-Welle (Erregungsrückbildung der Ventrikel) und P-Welle (Erregungsausbreitung der Vorhöfe) im EKG eine Plateauphase, die der Diastole entspricht und in der das Blut aus den Venen nachströmen kann.

Die Schrittmacher-Zellen im Sinusknoten und im AV-Knoten bilden eine Ausnahme unter den Kardiomyozyten, denn sie haben kein stabiles Ruhemembranpotential (Abb. 1). Das ist darin begründet, dass sie deutlich weniger $K_{ir2.1}$ und zusätzlich Hyperpolarisations-aktivierte Kanäle exprimieren, die sowohl Natrium- als auch Kaliumionen passieren lassen (DiFrancesco, 2010). Durch diese Ionenselektivität liegt das Gleichgewichtspotential dieser Kanäle bei ungefähr -15 mV. Sie werden aktiviert, sobald das Membranpotential unter -45 mV absinkt und es fließt der sogenannte „funny“-Strom I_f , der eine diastolische Depolarisation zur Folge hat. Dies führt zu einer Überschreitung des Schwellenpotentials dieser Zellen, sodass ein spontanes Aktionspotential ausgelöst wird (DiFrancesco, 2010).

In Abbildung 2 sind Simulationen des menschlichen Vorhof-Aktionspotentials und des ventrikulären Aktionspotentials dargestellt und die zugrundeliegenden Ionenströme aufgezeich-

net. Nach einer extern ausgelösten Depolarisation wird ein Schwellenpotential erreicht, das nicht auf einen genauen Wert festzulegen ist und eine spannungsabhängige Öffnung des Natriumkanals $Na_v1.5$ auslöst (Abriel, 2010). Diese Öffnung bewirkt einen schnellen Einstrom von Natriumionen in die Zelle, sodass das Membranpotential weiter in Richtung des Gleichgewichtspotentials von Natrium depolarisiert (Phase 0).

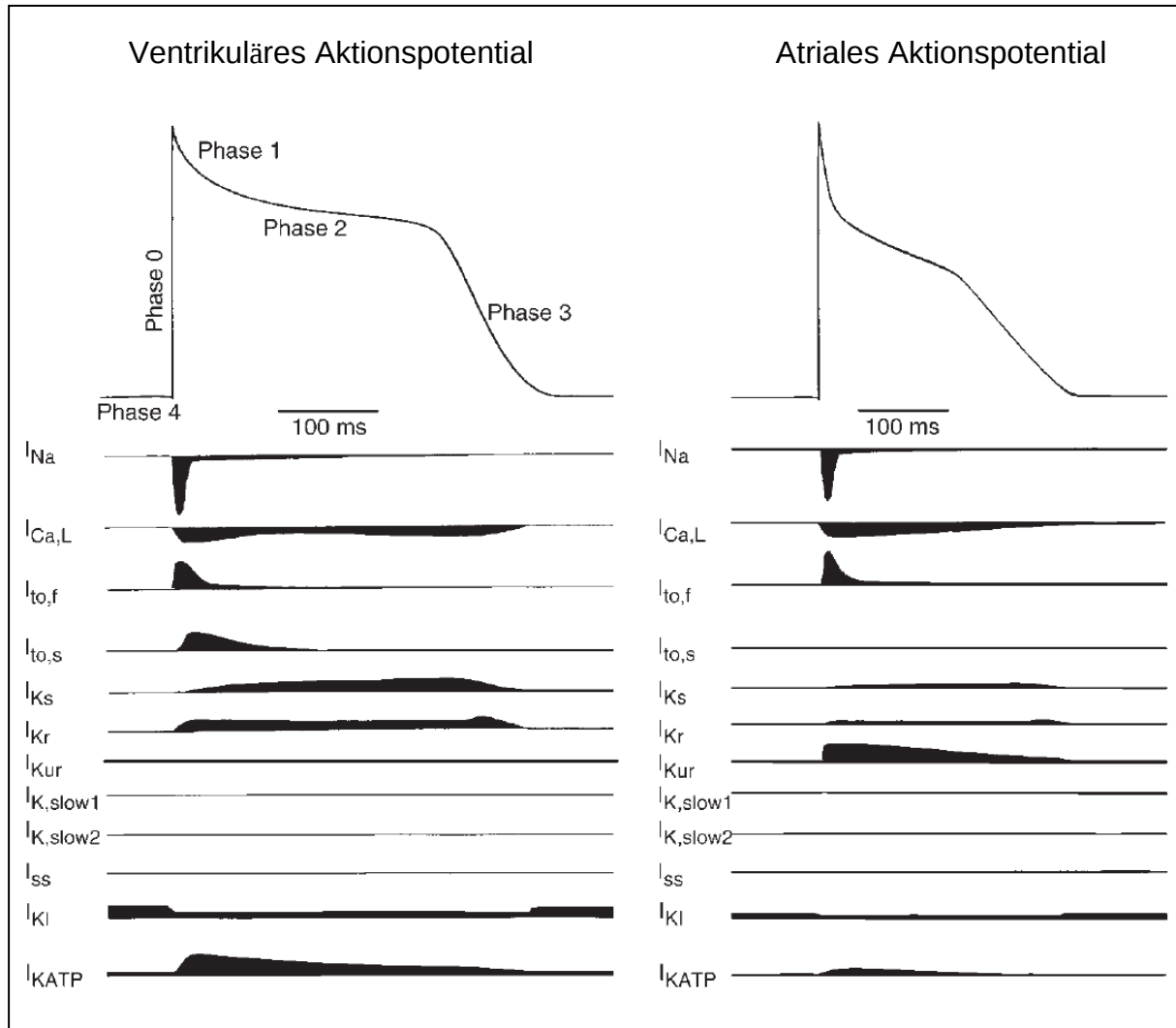


Abbildung 2: Typische Aktionspotentiale aus humanem Vorhof und Ventrikel mit den beteiligten Ionenströmen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Aktionspotentiale als Verlauf der Spannung gegen die Zeit dargestellt. Darunter sind die jeweils aktiven Ionenströme als relativer Strom gegen die Zeit dargestellt. Das Aktionspotential ist in 4 Phasen eingeteilt, in denen jeweils unterschiedliche Ionenkanäle aktiv sind. Phase 0 ist gekennzeichnet durch die schnelle Aktivierung eines Natrium-Einstroms. Nach einer kurzen schnellen Repolarisation (Phase 1) folgt Phase 2, ein Plateau, das durch ausströmende Kaliumionen und einströmende Kalziumionen im Gleichgewicht gehalten wird. Das Ende des Aktionspotentials bilden schnelle Kaliumströme (Phase 3) und das darauffolgende Ruhemembranpotential (Phase 4) wird aufgrund des aktiven Kaliumstroms I_{K1} aufrecht erhalten (Nerbonne et al., 2005).

Während dieser Natriumkanal zeitabhängig inaktiviert, werden spannungsabhängige Kaliumkanäle geöffnet, die zu einer kurzen ersten Repolarisationsphase führen (Phase 1). An diesem $I_{to,f}$ -Strom („fast recovering transient outward current“) ist hauptsächlich ein Komplex aus $K_v4.2/4.3$ - und $KChIP$ -Untereinheiten beteiligt (Niwa, 2010). Es gibt auch eine langsam reaktivierende Komponente dieses Stroms, $I_{to,s}$, die durch die porenbildende Untereinheit $K_v1.4$ gebildet wird und nur im Ventrikelgewebe aktiv ist (Abb. 2). Unterschiede im I_{to} tragen teilweise auch dazu bei, dass sich die Aktionspotentiale innerhalb der ventrikulären Wand so stark voneinander unterscheiden (Antzelevitch et al., 2001 und 2007). Eine entscheidende Rolle spielt dabei wahrscheinlich die unterschiedliche Expression der regulatorischen β -Untereinheit $KChIP$, die im Endokard, wo ein nur geringer I_{to} gemessen werden kann, auch geringer exprimiert wird (Soltysinska et al., 2009). Aufgrund dessen ist die Phase 1 im Epikard deutlich ausgeprägter als im Endokard (Abb. 1).

Nach dieser kurzen ersten Repolarisationsphase beginnt die Phase 2, in der sich ausströmende Kaliumionen und einströmende Kalziumionen das Gleichgewicht halten. Die Kalziumströme werden hauptsächlich über L-Typ-Kalziumkanäle geleitet und haben im humanen Ventrikel eine längere Öffnungszeit als im Vorhof (Benitah et al., 2010). Dadurch und durch die Unterschiede in den repolarisierenden Kaliumströmen findet man in den Kardiomyozyten des Vorhofs eine kürzere Plateauphase im Vergleich zum Ventrikel. Der Kalziumeinstrom ist der entscheidende Auslöser für die Kontraktion der Kardiomyozyten, da er in den Zellen eine Freisetzung von weiterem Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor auslöst (Bers, 2002). Diese hohe Kalziumkonzentration in der Zelle führt zu einer Aktivierung des Troponin C, welches an den kontraktilen Apparat assoziiert ist und zu einem Zusammenziehen des Aktin-Myosin-Komplexes führt. Nach der Kontraktion wird das intrazelluläre Kalzium über eine Kalzium-ATPase (SERCA2A) zurück in das sarkoplasmatische Retikulum und über den Natrium-Kalzium-Austauscher zurück in den extrazellulären Raum gepumpt (Bers, 2002).

Während der Kontraktionsphase werden auch die L-Typ-Kalziumkanäle bereits wieder geschlossen und die Wirkung der verzögerten Gleichrichter („delayed rectifier“) wird stärker (Phase 3). Der daraus resultierende I_K -Strom ist für die endgültige Repolarisation verantwortlich. Es gibt auch hier zwei Hauptkomponenten, den I_{Ks} („slowly activating“) und den I_{Kr} („rapidly activating“). Beide Ströme sind stärker im Ventrikel als im Vorhof ausgeprägt, dagegen gibt es einen weiteren Strom, der spezifisch für den Vorhof zu sein scheint und sehr schnell aktiviert (I_{Kur} , „ultra-rapidly activating“). Dieser Strom könnte zur schnelleren Repolarisation in den atrialen Kardiomyozyten im Vergleich zu den ventrikulären Zellen beitragen (Nerbonne et al., 2005). Die sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel vorkommenden ATP-

abhängigen Kaliumkanäle sind im Normalzustand nicht geöffnet und werden erst bei ATP-Mangel in der Zelle aktiviert (Nichols, 2006).

Einige der beschriebenen Strom-Komponenten, die bei der Formgebung des Aktionspotentials eine Rolle spielen, kommen in dieser Form und Funktion nur in humanem Herzgewebe vor. Die Aktionspotentiale anderer Spezies haben aufgrund unterschiedlicher Anforderungen auch andere Formen (Polder et al., 2005). Die Größe eines Tieres spielt dabei eine entscheidende Rolle, kleine Säugetiere haben eine schnellere Schlagfrequenz und müssen deswegen kürzere Aktionspotentiale haben als größere Säugetiere (Hayes et al., 1994). Die Ungleichheiten in den Aktionspotentialen sind auf Unterschiede in der Expression und der Aktivität von Ionenkanälen zurückzuführen und bedeuten auch, dass beispielsweise Mäuse auf pro- und anti-arrhythmogene Faktoren anders reagieren als Menschen (Wang et al., 1996; Zicha et al., 2003; Patel et al., 2005; Tanaka et al., 2009).

Das Aktionspotential und seine Regulation sowie die Kommunikation zwischen den Zellen der einzelnen Komponenten des Erregungssystems ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, die bisher nur partiell identifiziert wurden. Um die Physiologie und Pathologie dieses Systems ausreichend beschreiben und beeinflussen zu können, bedarf es noch weiterer experimenteller Hinweise und klinischer Verifizierungen.

2.4 Kardiale Medikamentenentwicklung und Sicherheitspharmakologie

Medikamentenentwicklung

Viele der kardiovaskulären Erkrankungen kann man derzeit noch nicht effizient und ohne komplizierte Nebenwirkungen behandeln. Deshalb wird auch im kardiovaskulären Bereich weiter an neuen Wirkprinzipien geforscht, die dann bis zur Marktreife entwickelt werden sollen. Die Entwicklung eines neuen Medikamentes kostet von den ersten Schritten bis zur Zulassung im Durchschnitt mindestens 400 Millionen US-Dollar, inklusive eingerechneter Opportunitätskosten sogar das Doppelte (DiMasi et al., 2003; Adams et al., 2010).

Um eine Substanz als neues Medikament zuzulassen, müssen präklinische und klinische Phasen der Entwicklung durchlaufen werden. Zunächst beginnt man mit der Suche nach einem passenden Wirkstoff. Dafür werden häufig Hochdurchsatzverfahren genutzt, um den Effekt auf die Zielstruktur, meist Proteine, zu analysieren. Mithilfe dieser Hochdurchsatzverfahren kann man Leitstrukturen ermitteln, die aus Substanzbibliotheken mit mehreren Millionen

Substanzen isoliert werden. Diese Leitstrukturen werden danach auf ihre Spezifität, Wirkstärke und molekulare Eigenschaften optimiert und es entstehen Substanzkandidaten. Diese müssen in den darauffolgenden Studien auf Wirksamkeit und Toxizität überprüft werden, bevor sie für die klinischen Phasen zugelassen werden (Kassel, 2004).

Präklinische Herzmodelle

Für die Untersuchung der potentiellen Wirksamkeit einer Substanz stehen je nach Fragestellung verschiedene *in vitro* und *in vivo*-Methoden zur Verfügung. Dabei werden meist Zellkulturen genutzt und in späteren Studien Tierversuche (Nattel et al., 2008; Suzuki et al., 2009; Van Deuren et al., 2009). Vor allem im Bereich der kardialen Forschung haben beide Modelle beachtenswerte Einschränkungen (Horrobin, 2003).

Die Funktion der Kardiomyozyten ist abhängig von der sie umgebenden Struktur und den benachbarten Zellen. Die Kardiomyozyten bilden untereinander ein Synzytium, das *in vitro* nicht realistisch nachgestellt werden kann. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass nicht nur die Kardiomyozyten untereinander kommunizieren, sondern auch mit den sie umgebenden Zellen in elektrischem Kontakt stehen (Kohl et al., 2005). Ein immer mehr an Bedeutung zunehmendes Beispiel sind die Fibroblasten, deren Funktion auch für die Erregungsleitung eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Gaudesius et al., 2003; Camelliti et al., 2004; Rohr, 2009; Yue et al., 2010). Alles in allem spiegeln die Zellkultur- und Einzelzell-Modelle nur wenige Aspekte der Situation *in vivo* wider und für eine klare Interpretation der Ergebnisse müssen viele Annahmen gemacht werden (Horrobin, 2003). Aufgrund der methodischen Vorteile werden allerdings auch weiterhin isolierte Kardiomyozyten und Zelllinien im Bereich der kardialen Arzneimittelentwicklung und Wirksamkeitsprüfung eingesetzt (Nattel et al., 2008).

Fortführende Studien, um die Wirksamkeit und pharmakokinetische Eigenschaften zu untersuchen beruhen in der Regel auf Tierversuchen, die meist an kleinen Säugetieren durchgeführt werden. Für die Wirksamkeitsprüfung ist es allerdings wichtig, dass die betroffenen Zielstrukturen den Strukturen im Menschen ähnlich sind. Für die Entwicklung von Antiarrhythmika beispielsweise ist es schwierig, Vorhersagen für die Wirkung im Patienten zu treffen, da die Speziesunterschiede in der Ionenkanalausstattung sehr groß sind (Zicha et al., 2003).

Für Wirksamkeitsstudien mit kardialen Zielproteinen benötigt man idealerweise ein Modell, das komplex genug ist, um die interzellulären Wechselwirkungen widerzuspiegeln und den humanen Eigenschaften sehr nahe kommt. Außerdem sollten eine hohe Anzahl von Experimenten durchführbar sein, um in kurzer Zeit viele Bedingungen testen zu können.

Sicherheitspharmakologie kardialer Nebenwirkungen

Ein zweiter wichtiger Bestandteil der präklinischen Phase sind die sicherheitspharmakologischen Untersuchungen. Dafür werden die Effekte der Substanz auf die Funktionen lebenswichtiger Organsysteme untersucht. Für den Bereich des kardiovaskulären Systems ist seit 2005 vorgeschrieben, dass jedes potentielle Medikament auf seine proarrhythmische Wirkung getestet werden muss (ICH S7B, 2005). Diese Richtlinie der ICH („International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“) wurde erarbeitet, weil man wiederholt Medikamenten die Zulassung entziehen musste, die zu sogenannten *Torsade de Pointes*-Arrhythmien und damit verbundenen Todesfällen führten (Redfern et al., 2003). Neben Antiarrhythmika, die per se einen Effekt auf die Elektrophysiologie des Herzens haben, können auch Substanzen anderer Wirkstoffgruppen diese Art der ventrikulären Tachykardie auslösen, darunter Antihistaminika, Antibiotika und Antipsychotika (Redfern et al., 2003).

Die *Torsade de Pointes*-Arrhythmien haben ihren Auslöser meist in einer Blockade des sogenannten hERG-Kalium-Kanals, die dazu führt, dass die Repolarisationsphase im ventrikulären Aktionspotential stark verlängert wird und die QT_c-Zeit im EKG ansteigt (Fenichel et al., 2004; Sanguinetti et al., 2006; Perrin et al., 2008). Diese Verlängerung führt zu einer Anhäufung von Kalzium-Ionen und dadurch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass frühe Nachdepolarisationen ausgelöst werden (Lankipalli et al., 2005). Zusätzlich gibt es Unterschiede in der Reaktion der verschiedenen Ventrikelwandschichten (Yan et al., 1998; Antzelevitch, 2008). Dabei scheinen die sogenannten M-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen, eine Population der ventrikulären Kardiomyozyten die subendokardial lokalisiert ist und aufgrund elektrophysiologischer Unterschiede von den anderen differenziert werden kann (Antzelevitch et al., 1991). Diese M-Zellen reagieren stärker auf I_{Kr}-blockierende Substanzen als die epi- und endokardialen Zellen, sodass dadurch die Unterschiede in den Aktionspotentiallängen verstärkt werden (Yan et al., 1998). Diese transmurale Dispersion zusammen mit dem Auslösen von frühen Nachdepolarisationen scheinen die Gründe für das Entstehen von *Torsade de Pointes*-Arrhythmien zu sein (Antzelevitch, 2001; Fenichel et al., 2004).

In der Richtlinie der ICH ist es zunächst vorgeschrieben, die blockierende Wirkung einer Substanz auf den hERG-Kanal zu untersuchen (ICH S7B, 2005). Dafür werden artifizielle Systeme benutzt, in denen der hERG als einzelner Ionenkanal exprimiert wird, um dessen Inhibition unabhängig von anderen Strömen untersuchen zu können. Durch diese artifiziellen Systeme

me entstehen methodische Probleme, die nicht in allen Fällen behoben werden können und oft vernachlässigt werden (Witchel et al., 2002). Zusätzlich ist die Situation in komplexeren Systemen eine andere, da verschiedene regulatorische Proteine beschrieben wurden, die die Eigenschaften dieses Ionenkanals entscheidend beeinflussen (Nerbonne et al., 2005; Thomas et al., 2006). In diesen Systemen fehlt außerdem die Möglichkeit, die Interaktionen zwischen den Zellen zu beurteilen und die Wirkung der Substanzen auf andere Ionenkanäle zu untersuchen (Martin et al., 2004). Die Aussage über eine hERG-Blockade allein reicht dementsprechend nicht aus, um eine proarrhythmische Wirkung in jedem Einzelfall vorherzusagen.

Deswegen ist weiterhin vorgeschrieben, dass die Verlängerung der QT_c -Zeit in EKG-Messungen am Tier durchgeführt werden (De Clerck et al., 2002; ICHS7B, 2005). Aber auch mit diesen Messungen können Substanzen falsch bewertet werden, wie beispielsweise Amiodaron, das trotz QT_c -Zeit-verlängernden Effektes keine proarrhythmische Wirkung entfaltet (Fenichel et al., 2004; Belardinelli et al., 2005). Sowohl in den EKG-Messungen als auch in den Einzelzell-Assays können bestimmte proarrhythmisch wirkende Effekte nicht erfasst werden. So kann beispielsweise eine Natriumkanalblockade ebenso wie eine hERG-Blockade zu ventrikulären Arrhythmien führen (Lazzara, 1996) und Einflüsse auf das Reizleitungssystem fördern die Entstehung von kreisenden Erregungen (Workman et al., 2008; Jie et al., 2010). Diese beiden und andere potentiell proarrhythmischen Mechanismen können mit den vorgeschriebenen Untersuchungen nicht aufgeklärt werden. Deshalb wurden in den letzten Jahren verschiedene Modelle beschrieben, um das Risiko von Arrhythmien *in vitro* besser abschätzen zu können. Vergleiche dieser Modellsysteme findet man in diversen Übersichtsarbeiten (Chen et al., 2005; Lawrence et al., 2008; Raschi et al., 2009; Lee et al., 2010).

Das Modell, welches die proarrhythmische Wirkung von Wirkstoffen am umfassendsten vorauszusagen scheint, ist die sogenannte ventrikuläre „wedge“-Präparation. Dafür wird ein transmurales Segment aus der Ventrikelwand oder dem Septum entfernt und arteriell perfundiert (Yan et al., 1996; Wang et al., 2008; Sicouri et al., 2010). Gleichzeitig können extrazelluläre („Pseudo-EKG“) und intrazelluläre Ableitungen aus allen drei Regionen der ventrikulären Wand aufgenommen werden, sodass die Wirkung von Substanzen auf die transmurale Dispersion dargestellt werden können. Dieses System wurde für verschiedene Spezies etabliert und auch mit humanem Ventrikel konnten Experimente durchgeführt werden (Sicouri et al., 2010; Glukhov et al., 2010). Die einzigen Nachteile dieser Methode sind die geringe Verfügbarkeit an Proben und der komplizierte Aufbau, sodass es nur wenige Labore gibt, die diese Methodik beherrschen. Durch das Messen von Aktionspotentialen ist außerdem das Auslesen weiterer Parameter möglich, die die Arrhythmogenität der Substanz beschreiben und zusammengefasst sind in der sogenannten TRIaD (Triangularisierung, „Reverse use-

dependence“, Instabilität, Dispersion; Raschi et al., 2009). All diese Faktoren beschreiben Veränderungen im Aktionspotential, die proarrhythmisch wirken, aber über die vorgeschriebenen Methoden nicht gemessen werden können (Hondeghe et al., 2005). Aktionspotentialmessungen an Präparaten, die dem menschlichen Myokard ähneln, sind dementsprechend stark zu befürworten, um den Einfluss neuer Substanzen auf die Elektrophysiologie des Herzens einschätzen zu können.

2.5 Kultivierung von Kardiomyozyten

Es gibt proarrhythmische Substanzen, die die hERG-Funktionalität beeinflussen, ohne diesen Kanal direkt zu blockieren (Ficker et al., 2003; Dennis et al., 2007; Su et al., 2011). Sie verhindern den Einbau dieses Ionenkanals in die Zellmembran, sodass der I_{Kr} reduziert und dadurch das Aktionspotential verlängert wird. Dieser Effekt wird in keiner der oben angesprochenen präklinischen Testsysteme untersucht, kann aber ebensolche Folgen haben, wie eine direkte Ionenkanalblockade. Eine Wirkung dieser Substanzen kann nur in langfristigen elektrophysiologischen Modellsystemen festgestellt und aufgeklärt werden.

Bisherige Modelle, um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Herzzellen über einen längeren Zeitverlauf zu untersuchen und zu beeinflussen, beruhen entweder auf artifiziellen Zelllinien wie beispielsweise HL-1-Zellen (Claycomb et al., 1998; White et al., 2004) oder auf embryonalen Stammzellen (Hansen et al., 2010; Dick et al., 2010; Liang et al., 2010). Um einzelne Ionenkanäle zu untersuchen, wird weiterhin die Möglichkeit der Transfektion in nicht-kardiale Zellen genutzt (Rajamani et al., 2006; Su et al., 2011).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der auf Stammzellen basierenden Modellsysteme entsprechen nur partiell den Eigenschaften der ausdifferenzierten adulten Herzzellen (Ravens, 2006; Itzhaki et al., 2006). Deshalb kann ein arrhythmogener Effekt einer Testsubstanz nur unter Vorbehalt auf das adulte Gewebe übertragen werden.

Die vorhandenen Zelllinien stammen derzeit entweder von embryonalem Rattenventrikel ab oder wurden viral immortalisiert (Kimes et al., 1976; Claycomb et al., 1998). Diese Zelllinien sind in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften bisher nur unzureichend charakterisiert und entscheiden sich deutlich von einem funktionierenden kardialen Synzytium (Mejia-Alvarez et al., 1994; Wang et al., 1999; White et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Langzeiteffekten wären primäre Kardiomyozyten. Isoliert man adulte Herzzellen und kultiviert diese unter Zellkulturbedingungen, dann

dedifferenzieren sie allerdings innerhalb der ersten Tage (Mitcheson et al., 1998; Banyasz et al., 2008). Sie verlieren sowohl ihre Kontraktilität als auch ihre typische Form (Nakamura et al., 2008; Viero et al., 2008; Hammer et al., 2010). Die Veränderungen in den Ionenkanaleigenschaften sind nur partiell beschreiben, aber es wurden starke Unterschiede im Ruhemembranpotential als auch in den Aktionspotentialen festgestellt (Mitcheson et al., 1996 und 1998). Einige essentielle Ionenströme sind in den kultivierten Kardiomyozyten verändert, darunter der des Natrium-Kalzium-Austauschers (Pabbathi et al., 2002), der des L-Typ-Kalziumkanals und der I_{K1} (Mitcheson et al., 1998; Banyasz et al., 2008).

Es konnten bisher keine Bedingungen etabliert werden, die einen elektrophysiologisch stabilen Zustand von humanen adulten Kardiomyozyten in Kultur garantieren und dadurch die langfristige Beeinflussung von Ionenkanälen *in vitro* ermöglichen.

2.6 Ziel der Arbeit

Da elektrophysiologisch relevante Langzeitmodelle des humanen Myokards bisher nicht existieren, können langfristige Effekte neuer pharmakologischer Substanzen auf die Ionenkanäle nur artifiziell untersucht werden. Dadurch können wichtige Risikomechanismen für die Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien, wie beispielsweise eine Transportblockade des hERG-Kanals, übersehen werden.

Um relevante *in vitro*-Tests für die Wirkungen neuer Substanzen auf humanes Myokard durchzuführen, wäre ein multizelluläres Präparat wünschenswert, welches man über mehrere Tage, bzw. Wochen elektrophysiologisch untersuchen kann und das Eigenschaften hat, die dem humanen Herzgewebe entsprechen.

Ziel der Arbeit war es, ein alternatives Testsystem für die Untersuchung herzwirksamer Medikamente an humanem Myokard zu etablieren und elektrophysiologisch zu beschreiben.

Zunächst sollten Gewebeschnitte aus humanen adulten Ventrikelpuben hergestellt und ihre Vitalität nachgewiesen werden. Mithilfe von intrazellulären Potentialableitungen sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften beschrieben und pharmakologisch beeinflusst werden.

Bei erfolgreicher Etablierung des akut hergestellten Gewebeschnitts war es ein weiteres Ziel, diese Schnitte über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen zu kultivieren und ihre Vitalität zu bestimmen. Auch an diesen Gewebeschnitten sollten Aktionspotentiale abgeleitet und die pharmakologische Beeinflussung spezifischer Ionenkanäle untersucht werden. Um eine mögliche Anwendung dieser neuen Technik zu demonstrieren, sollte ein langfristiger Einfluss einer proarrhythmogenen Substanz in humanem Myokard nachgewiesen werden.

3 Materialien

3.1 Verwendete Geräte

AD/DA-Wandler:	EPC 9, HEKA, Lambrecht/Pfalz
Analysenwaage:	MasterPro, Sartorius, Göttingen AE 100, Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Autoklaviergerät:	Typ 3870 ELV, Systec, Wettenberg
Brutschrank:	Typ CB 210, Binder, Tuttlingen
cDNA-Synthese:	TGradient-Cycler, Biometra, Göttingen
Chloriergerät:	ACL01, npi, Tamm
Elektronikrührer:	Combimag RCT, IKA, Staufen
Fluoreszenzlampe:	EL-6000, Leica, Wetzlar
Gel-Elektrophorese-System:	SUB-CELL System, BioRad, München
Gewebeschnitthalter:	Slice Anchor, HarvardApparatus, Holliston, US
Heizblock:	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg
Homogenisator:	Pellet Pestle Motor, Kontes, US Teflon-Aufsatz, NeoLab, Heidelberg
Infusor:	TSE-Systems, Bad Homburg
Kameras:	CellCam s/w, Phase, Lübeck
Kryotom:	CM 3050, Leica, Wetzlar
Kühlsystem:	„Minichiller“, Lauda, Lauda-Königshofen
Lampe:	KL 5120, Krüss, Hamburg
Lötkolben:	WSD50, Weller, Sparks, US
Mikromanipulator:	PatchStar, Scientifica, Uckfield, UK
Mikroskope:	Laser Scanning M.: TCS SP5, Leica, Wetzlar Aufrechtes M.: Axio Examiner, Zeiss, Jena Binokulares M.: Steni 2000, Zeiss, Jena
Organbad, Konfiguration 1:	Typ Mayflower, Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten
Organbad, Konfiguration 2:	Eigenbau, Feinwerkstatt Universität zu Lübeck
Oszilloskop:	TDS340A, Tektronix, Beaverton, OR, US
PCR-Gerät:	7000 Sequence Detection System, Applied

3. Materialien

	Biosystems, Carlsbad, CA, US
Perfusionsregler:	MPCU, Lorenz Messgeräte, Katienburg-Lindau
Peristaltische Pumpe:	Schlauchpumpe 5260, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	pMX 3000, WTW, Weilheim
Photometer:	Typ Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg Smart Spec 3000, Bio-RAD, München Typ UVICON 932, Kontron Instr., Rossdorf
Pinzetten, Scheren:	Fine Science Tools, Foster City, CA, US Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten:	Finnpipette, Thermo Fisher, Waltham, MA, US Eppendorf, Hamburg
Pipettenziehgerät:	P-2000, Sutter Instr., Novato, CA, US
Pipettierhilfe:	Typ Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
RNA-Extraktion:	ABI PRISM 6100, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, US
Schüttler:	MS1 Minishaker, IKA, Staufen
Sterilisator:	Typ 2712, Köttermann, Uetze/Hänigsen
Sterilwerkbank:	LaminAir Typ HBB 2448, Heraeus, Osterode
Stimulationselektrode:	Mini Coaxiale Stimulationselektrode, Harvard Apparatus, Holliston, US
Stimulator:	Typ T, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten Typ S, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Temperaturregelung:	Temperaturregler: eTron M, JUMO, Fulda Heizfolien, Conrad, Hirschau Netzteil: LSP 1403, Voltcraft, Conrad, Hirschau
Verstärker:	SEC 05-L, npi, Tamm
Vibratom:	VT 1200S, Leica, Wetzlar
Wasserbäder:	DC1, Haake Fisons, Karlsruhe Thermomix 1420, B. Braun, Melsungen
Zentrifugen:	C 412, Jouan, Unterhaching

3.2 Verbrauchsmaterialien

Baumwolltücher:	Zupfbox POP-UP, Kimberley-Clark, Dallas, US
Deckgläser:	quadratisch 20 x 20 mm, Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Küvetten:	K-Küvetten, Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen:	CellstarTubes 15&50 mL, Greiner Bio One, Kremsmünster, AT
Kanülen:	35 oder 70 mm, Carl Roth, Karlsruhe
Kapillaren:	GB100F-10, Science Products, Hofheim
Kultureinsätze:	PICMORG50 Cell Culture Inserts, Millipore, Billerica, MA, US
Lötzinn:	Fluitin, Küppers-Metallwerk, Bonn
Netz (Schnittfänger):	Nylon-Netz 160 µm, Millipore, Billerica, MA, US
Objektträger:	Menzel-Gläser, Braunschweig
Organhaken:	Vessel Holder 0,3 mm, Harvard Apparatus, Holliston, US
Petrischalen:	35 oder 65 mm, Greiner Bio One, Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen:	Greiner Bio One, Kremsmünster, AT Serologische Pipetten, Greiner Bio One, Kremsmünster, AT
Platindraht:	PtIr 10%, 0,1 mm, Heraeus, Hanau
Rasierklingen:	Wilkinson Sword, Solingen
Reaktionsgefäße (Eppis)	Sarstedt, Nümbrecht
Sekundenkleber:	Super Bond Gel, Kent, Willich
Silber/Silberchlorid-Pellets:	E210, Warner Instruments, Hamden, CT, US
Silberdraht:	PTFE-isoliert, Advent Research Materials, Oxford, UK
Sterilfilter:	Express PLUS-Membran, 250mL, Millipore, Billerica, US
Zellkulturplatten:	6- oder 24-Well, Greiner Bio One, Kremsmünster, AT

3.3 Chemikalien

2,3-Butandion-Monoxim:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Agarose:	Low Melt, Carl Roth, Karlsruhe RotiGarose, Carl Roth, Karlsruhe
cDNA-Synthese-Kit:	Cloned AMV First Strand Synthesis, Invitrogen, Carlsbad, US
Coomassie Brilliant Blue:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Diethylether:	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Dofetilid:	Bosche Scientific, New Brunswick, US
Fixable FarRed:	Invitrogen, Carlsbad, US
Gigasept:	Schülke & Mayr, Norderstedt
Glukose-Monohydrat:	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
HEPES:	Serva Electrophoresis, Heidelberg
HMR1098:	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Isoproterenol:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
ITS Liquid Media Suppl.:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Kaliumchlorid:	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid:	Merck, Darmstadt
Lidocain:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Magnesiumchlorid:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Medium 199:	PAA Laboratories, Pasching, AT
MTT:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Natriumchlorid:	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenkarbonat:	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat:	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid:	Merck, Darmstadt
Nifedipin:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Ortho-Phosphorsäure (80%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Paraformaldehyd:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
PCR-Kit:	SYBR green qPCR Supermix w. Rox, Invitrogen, Carlsbad, US
Penicillin/Streptomycin:	PAA Laboratories, Pasching, AT

3. Materialien

Pentamidin-Isethionat:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Phenylephrin:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Propidiumiodid:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
RBS 50:	Carl Roth, Karlsruhe
Rilmakalim:	Hoechst/Sanofi-Aventis, Frankfurt
RNA-Isolations-Kit:	RNA-Purification-Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, US
SYTO9:	Invitrogen, Carlsbad, US
Tissue-Tek O.C.T.	Gentaur, Brüssel, BE
Wasserbad-Reinigung:	BAD Stabil, NeoLab, Heidelberg

3.4 Puffer und Medien

	<i>Schneidepuffer</i>	<i>Messpuffer</i>
Natriumchlorid	136 mM	136 mM
Kaliumchlorid	5,4 mM	5,4 mM
Kalziumchlorid	0,9 mM	1,8 mM
Magnesiumchlorid	1 mM	1 mM
Natriumhydrogenphosphat	0,33 mM	0,33 mM
Glukose-Monohydrat	10 mM	10 mM
2,3-Butandion-Monoxim	30 mM	0 mM
HEPES	5 mM	0 mM
Natriumhydrogenkarbonat	0 mM	23 mM

Kulturmedium

Medium 199

Penicillin/Streptomycin 1%

ITS-Zusatz: Insulin 10 mg/L

Transferrin 5.5 mg/L

Selen 5 µg/L

4 Methoden

4.1 Herstellung von Herzgewebeschnitten

Um vitale Herzgewebeschnitte aus intaktem Myokard herzustellen, musste die jeweilige, aus verschiedenen Spezies stammende Probe bis zur Präparation möglichst schnell gekühlt und in einer kardioplegischen Lösung aufbewahrt werden. Der für die Lagerung und das Schneiden eingesetzte Puffer (Schneidepuffer) enthielt 2,3-Butandionmonoxim (BDM), eine Substanz, die unter anderem die ATPase-Aktivität des Myosins inhibiert und dessen Kalzium-Sensitivität erniedrigt. Durch diese und andere Mechanismen wird die Kontraktion und dadurch irreversible Schädigung verhindert (Xiao et al., 1995). Eine verminderte Konzentration von Kalzium-Ionen (0,9 mM) im Schneidepuffer soll die Überladung der Zellen mit Kalzium verhindern, allerdings auch Rekalzifizierungsschäden verhindern, die nach einem kompletten Kalzium-Entzug auftreten können (Piper, 2000).

4.1.1 Herzen kleiner Säuger

Für die Herzentnahme wurden die Tiere mit Inhalationsnarkotika (Diethylether oder Isofluran) betäubt und anschließend dekapitiert (Ratten) oder durch zervikale Dislokation (Mäuse) getötet. Kurz danach wurde das noch schlagende Herz entnommen und sofort in mit Sauerstoff vorbe-gas-ten und auf 4 °C abgekühlten Schneidepuffer gelegt.

Im Puffer wurden die Vorhöfe mit einer Schere abgetrennt und im Fall des Rattenherzens der rechte Ventrikel entfernt. Danach wurden die Herzen in eine mit 37 °C warmer flüssiger Low-Melt-Agarose gefüllten Petrischale gelegt und durch vorsichtiges Zusammendrücken des Ventri-kels mithilfe einer stumpfen Pinzette mit Agarose gefüllt. Die Ausrichtung der Herzen wurde da-bei so gewählt, dass die Herzspitze nach oben gerichtet war (Abb. 3), um ein Herauslösen des Gewebes aus der Agarose während des Schneidens zu verhindern. Die nachfolgenden Schritte sind in Absatz 4.1.4 beschrieben.

4.1.2 Herzen großer Säuger

Die Herzen der großen Säuger (Schwein, Rind, Ziege) wurden entnommen, kurz nachdem das Tier getötet wurde. Die Tötungsart und Prämedikation unterschied sich je nach vorher durchgeführter Operation oder Schlachtmethode. Die linke Ventrikelwand der Herzen wurde schnellstmöglich in maximal 1 cm³ große Stücke zerteilt (Abb. 3), die dann in eine Flasche mit gekühltem und vorbegastem Schneidepuffer gelegt wurden. Nach dem Transport wurden die Gewebestücke in 37 °C warmer Low-Melt-Agarose eingebettet. Die nachfolgenden Schritte sind in Absatz 4.1.4 beschrieben.

4.1.3 Humanes Herzgewebe

Humanes Herzgewebe wurde nur mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten für Versuchszwecke eingesetzt. Die Patienten wurden aufgeklärt und den Ethikanträgen für diese Studie wurde von den lokalen Ethikkommissionen aus Lübeck und Hamburg zugestimmt.

Es wurden zwei Quellen von humanem Herzgewebe genutzt. Zum einen wurde hypertrophiertes Endokardium aus dem linken Ventrikel eingesetzt, das im Rahmen eines therapeutischen herzchirurgischen Eingriffs, der sogenannten Morrow-Myektomie, in der Nähe der Herzklappe entfernt wird (Morrow et al., 1975, Abb.3). Dieses Gewebe wurde nach dem Entfernen während der Operation in Ringer-Lösung gelegt und schnellstmöglich auf Eis ins Labor transportiert. Der Transport erfolgte in der Regel innerhalb von 2 h nach Entnahme. Nachdem die Probe von Fett- oder Bindegewebsresten befreit wurde, konnte sie in 37 °C warmer Low-Melt-Agarose mit der endokardialen Seite nach unten eingebettet werden.

Die zweite Quelle für humanes Ventrikelgewebe waren explantierte Herzen, die während einer Herz- oder Herz-Lungen-Transplantation aus dem Empfänger-Körper entfernt werden. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, namentlich Herrn Dr. Tobias Deuse, wurden Teile der linken Ventrikelwand in maximal 1 cm³ große Stücke zerteilt, in Schneidepuffer gelegt und bei 4 °C gelagert. Innerhalb von zumeist 6 h wurde das Gewebe aus Hamburg nach Lübeck transportiert und mit der endokardialen Seite nach unten in 37 °C warmer Low-Melt-Agarose eingebettet. Die nachfolgenden Schritte sind in Absatz 4.1.4. beschrieben.

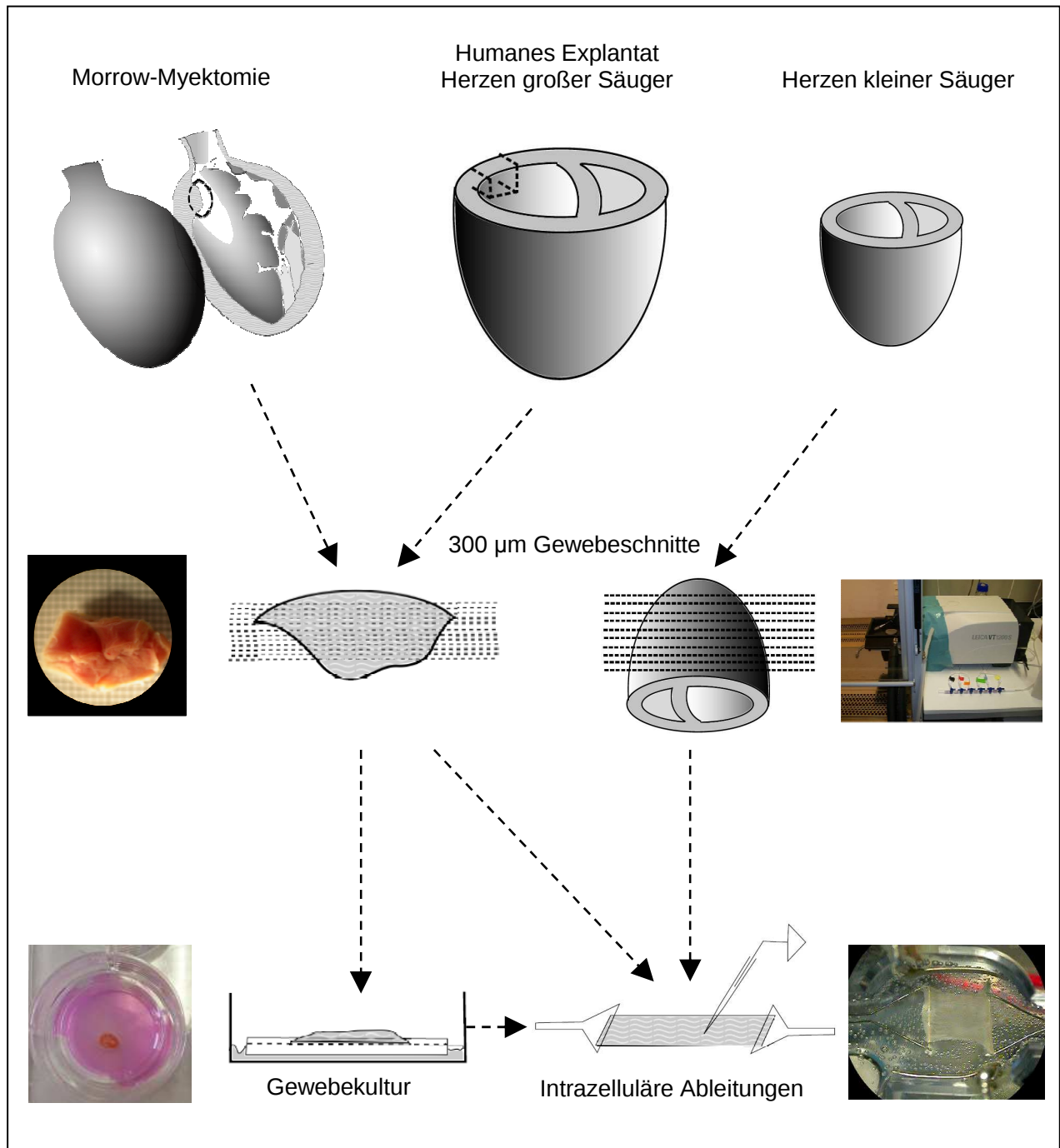


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Schnittherstellung, Kultivierung und funktionellen Messung. Ventrikuläres Myokardium aus verschiedenen Quellen (Foto: humanes Endokard aus einer Morrow-Myektomie) wurde mithilfe eines Vibratoms unter sterilen Bedingungen in 300 µm dicke Gewebeschnitte zerteilt. Danach wurden die Schnitte entweder auf einer Filtermembran kultiviert oder in einem Organbad funktionell gemessen.

4.1.4 Das Schneiden des Herzgewebes

Mit dem in Agarose eingebettetem Herzgewebe wurde für alle Proben gleich verfahren. Die Agarose wurde auf Eis ausgehärtet und ein Block mithilfe eines Skalpells um das Gewebe herum ausgeschnitten. Dieser Block wurde mit handelsüblichem Sekundenkleber (Cyanacrylat) auf den vorgekühlten Probenhalter des Vibratoms geklebt. Der Probenhalter wurde in der Probenwanne befestigt, die vorher mit Schneidepuffer befüllt wurde, welche fortwährend gekühlt und mit Sauerstoff begast wurde. Das Schneiden erfolgte mit einer handelsüblichen Rasierklinge, die vor Benutzung gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigt wurde, um Öl- oder Wachsreste zu entfernen. Nach Befestigen der Klinge im Klingenhalter wurde die Auslenkung der Klinge in Z-Achsen-Richtung gemessen und auf „0“ justiert (Vibrocheck[®]), um eine Schädigung des Gewebes durch eine mögliche Schrägstellung der Klinge zu vermeiden. Diese neue Möglichkeit der Klingengjustierung steigerte in Studien anderer Arbeitsgruppen durch eine Minderung der vertikalen Vibration bereits die Qualität von Leber- und Hirnschnitten (Geiger et al., 2002; Zimmermann et al., 2009).

Mit einer Auslenkung der Klinge von 1 mm in X-Richtung, einer Frequenz von ca. 85 Hz und einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,07 mm/s wurden 300 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese Werte beruhen teilweise auf den Erfahrungen des Herstellers und wurden teilweise optimiert. Die Gewebeschnitte wurden mithilfe eines selbstgebauten Schnittfängers aus der Wanne geholt und auf Eis in begastem Schneidepuffer für mindestens 30 min gelagert, bevor sie weiterverwendet wurden.

4.2 Kultivierung von Herzgewebeschnitten

Die Gewebeschnitte werden nach der Ruhezeit vorsichtig mit dem Schnittfänger aus dem Puffer genommen. Überschüssige Pufferlösung wurde mit einem Tuch durch das Netz des Schnittfängers abgesaugt. Der Schnitt wurde danach auf einen trockenen sterilen Kulturfilter aufgebracht. Dafür wurde der Schnittfänger umgedreht und der Schnitt leicht auf die Filtermembran aufgedrückt. Der trockene Filter saugte durch die entstandenen Kapillarkräfte die restliche Flüssigkeit und das Gewebe an, wodurch der Schnitt flach und gleichmäßig auf dem Filter lag. Dieser Filter wurde dann mit einer sterilen Pinzette in ein Well einer 6-Well-Platte gehoben, in das ca. 15 min vorher 1 mL eines Kulturmediums pipettiert wurde. Die Zeit zwischen Befüllen des Wells mit Medium und Einlegen des Filters wurde die 6-Well-Platte in den Brutschrank gestellt, um das Medium auf die

eingestellte Temperatur und den resultierenden pH-Wert zu adaptieren. Beim Einlegen des Filters in das Kulturmedium saugte sich dieser voll, wobei aber keine Flüssigkeit auf die Oberfläche des Filters gelangte. Dabei wurden Luftblasen unter dem Filter vermieden. Die 6-Well-Platte wurde in einen Brutschrank mit 37°C Temperatur und 5% CO₂ im Gasanteil gestellt. Das Medium wurde täglich gewechselt, wobei dafür der Filter mit dem darauf liegenden Gewebeschnitt mithilfe einer Pinzette in eine frisch mit 1 mL Medium vorpipettierte 6-Well-Platte gehoben wurde.

4.3 MTT – Vitalitätsmessung

Das Überleben der Gewebeschnitte wurde mithilfe eines enzymatischen Vitalitätstests untersucht. Dafür wurde 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid, kurz MTT verwendet. Dieser gelbe lösliche Farbstoff wird in die Zellen aufgenommen und durch reduzierende Enzyme in einen violetten unlöslichen Farbstoff umgewandelt (Mosmann, 1983). Da diese Enzyme abhängig sind von Reduktionsäquivalenten wie beispielsweise NADH, spiegelt die Umsetzung des Farbstoffes die Glykolyserate der Zelle wider (Berridge et al., 1993).

Nach der Präparation oder der Kultur wurden die Gewebeschnitte für zweimal 15 min bei 37 °C mit Messpuffer gewaschen und danach für 30 min mit 0,5 mg/L MTT-Reagenz im Brutschrank inkubiert. Nach einem fünfminütigem Waschschrift wurden die Gewebeschnitte für 30 min in reinem DMSO bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert und dadurch der umgesetzte Farbstoff herausgelöst. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 555 nm im Spektrophotometer gemessen und die Schnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Eine Normierung erfolgte auf die Proteinmenge des Gewebeschnittes, die nach der Bradford-Methode bestimmt wurde (Bradford, 1976). Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst für 30 min in 0,5 M Natronlauge bei 95 °C aufgelöst. Danach folgte eine Neutralisation mit 80%iger Phosphorsäure durch eine 1:1-Verdünnung. Diese Lösung wurde mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 versetzt, der proteinabhängig sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Absorption ist ein Maß für die Proteinmenge in der Probe (Rehm, 2002).

4.4 Vitalitätsfärbung

Für eine Analyse der Schädigung, die nach dem Schneiden des Gewebes auftritt wurde eine Vitalitätsfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte für 30 min in Schneidepuffer ohne BDM bei 4 °C gewaschen, um das BDM aus den Schnitten herauszuwaschen. Das BDM würde sich störend auswirken, da es strukturell einer Aminosäure ähnelt und für die Färbung ein Protein-bindender Farbstoff benutzt wurde (FarRed®). FarRed® ist nicht membrangängig, bindet dementsprechend bei intakten Zellen lediglich an die Proteine der Zellmembran. Zerstörte Zellen werden komplett durchgefärbt, da der Farbstoff ins Innere gelangt und an die zytosolischen Proteine bindet (Perfetto et al., 2006). Die Gewebeschnitte wurden für 30 min mit FarRed® (1:1000 verdünnt) bei 4 °C in mit Sauerstoff begastem Schneidepuffer inkubiert. Parallel dazu wurde Propidiumiodid (0,5 µmol/L) in die Färbelösung gegeben und ebenfalls für 30 min inkubiert. Propidiumiodid ist ein DNA-bindender Farbstoff, der nicht membrangängig ist, also die Zellkerne geschädigter Zellen anfärbt (Crissman et al., 1976). Nach der Färbung wurden die Schnitte für zweimal 5 min gewaschen (Schneidepuffer ohne BDM, 4 °C) und dann in einem Kryostat bei -18 °C in Kryomedium eingebettet. Die Ausrichtung der Schnitte erfolgte hochkant, sodass man durch das Kryoschneiden einen Querschnitt des Gewebes erzeugte. Die 16 µm dicken Kryoschnitte wurden mit Glycerol bedeckt, das 5 µmol/L Syto9® enthielt, um den Schnitt vor dem Austrocknen zu bewahren und die Zellkerne der intakten Zellen gegenzufärben (Wlodkowic et al., 2008). Diese Schnitte wurden unter einem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

4.5 Herstellung von Paraffinschnitten und deren Färbung

Um die zelluläre und subzelluläre Struktur der Gewebeschnitte strukturell zu untersuchen, wurden sie zunächst mit 4 % Formaldehyd in Messpuffer für ca. 2 h bei Raumtemperatur fixiert und in 0,4 %iger Formaldehyd-Lösung bei 4 °C gelagert. Alle folgenden Durchführungen dieser Methode wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck durchgeführt. Nach einer Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe konnte das Gewebe paraffiniert und für das Schneiden ausgerichtet werden. Nach dem Anfertigen von 4 µm dicken Schnitten mit einem Mikrotom wurden diese dann mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wobei das Hämatoxylin vor allem saure Strukturen, wie Zellkern und raues endoplasmatisches

Retikulum und das Eosin vor allem basische Strukturen wie das Zytosol anfärbt. Die angefertigten Präparate wurden nachfolgend unter einem Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

4.6 Intrazelluläre Membranpotentialableitungen

4.6.1 Das Messprinzip

Die elektrische Aktivität der Kardiomyozyten innerhalb der angefertigten Gewebeschnitte wurde mittels Aktionspotentialmessungen erfasst. Potentiale, die zwischen extrazellulärer Lösung und intrazellulärem Zytoplasma anliegen, können elektrisch gemessen werden. Dazu bringt man eine Elektrode in das innere Zellmilieu und misst die Spannung gegen eine Referenzelektrode, die sich in der umgebenden Flüssigkeit befindet.

Um die Potentiale über die Zellmembran zu messen, wurden mit einem Pipettenziehgerät Glaskapillaren gezogen, die an der Spitze unter einem Mikrometer breit waren und, wenn sie mit 2 M Kaliumchlorid gefüllt und im Messpuffer eingetaucht waren, einen Widerstand von 10-50 M Ω hatten. Die Glaskapillaren wurden auf einen Elektrodenhalter gesteckt, an dem vorher ein chlorierter Silberdraht befestigt wurde. Der Silberdraht wird chloriert, um leicht lösliche Ladungsträger erzeugen zu können und weil reines Silber toxisch auf Zellen wirken kann. Die Ladungsübertragung während der Messung des Potentials erfolgt vor allem über diese Chlorid-Ionen und die unterschiedliche Konzentrationen an Chlorid-Ionen zwischen der extrazellulären Lösung und dem Inneren der Pipette erzeugen ein sogenanntes „Junction Potential“, das elektronisch vor der Messung ausgeglichen wird („Offset“-Regelung). Als Referenzelektrode diente ein Silber/Silberchlorid-Pellet, das in die perfundierte Lösung gehängt wurde.

Der Silber/Silberchlorid-Draht der Messelektrode ist über eine Vorverstärkung mit einem Gleichspannungs-Verstärker verbunden, der einen hohen Eingangswiderstand besitzt, um einen Stromfluss über die Elektrode zu vermeiden. Die Aufnahmen erfolgten im sogenannten Brückenmodus des Verstärkers, bei dem im Verstärker ein auf „Null“ gestellter Strom konstant gehalten und dadurch das aktuell anliegende Potential gemessen wird. Über einen „Brückenausgleich“ können Spannungsunterschiede, die bei einem Stromfluss über die Pipette aufgrund ihrer Kapazität entstehen, kompensiert werden, sodass das Signal ohne Artefakt gemessen werden kann (Axon CNS Guide, 2006). Am Verstärker kann über eine Strominjektion der Widerstand der Pipette bestimmt werden, sodass man kontrollieren kann, ob die Pipette intakt und die Öffnung klein genug ist, um bei einem Anstechversuch die Zelle nicht so stark zu schädigen, dass ihre Funktion

gestört wird. Das verstärkte Gleichspannungs-Signal wurde gleichzeitig zu einem Oszilloskop zur optischen Kontrolle, zu einem Audio-Monitor im Verstärker zur akustischen Kontrolle und zum Analog-Digital-Wandler geleitet, sodass es aufgenommen werden konnte. Der Analog-Digital-Wandler überträgt die Daten auf einen PC, wo sie mit dem Programm Pulse (Version 8.8, HEKA, Lambrecht) aufgenommen wurden. Die Auswertung der Aktionspotentialparameter erfolgte mit dem Programm Chart 5 der Firma ADInstruments (Oxfordshire, Großbritannien), die Abbildungen einzelner Aktionspotentiale wurden mit IgorPro (Version 5, Wavemetrics, Lake Oswego, USA) erstellt.

4.6.2 Die Messbedingungen

Bei den Messungen der Aktionspotentiale erfolgte die Haltung der Schnitte in zwei verschiedenen Messkonfigurationen. Es konnte kein Unterschied der Messergebnisse in Abhängigkeit von den verschiedenen Konfigurationen festgestellt werden. Bei beiden wurden die Gewebeschnitte mit 4 mL/min Messpuffer perfundiert, der vor Eintritt in die Messkammer auf 37 °C vorgewärmt und mit Karbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurde. Dadurch konnten annähernd physiologische Bedingungen geschaffen werden.

Die ersten Experimente wurden in dem Organbad Mayflower[®] der Firma HSE durchgeführt (Abb. 4A) und die perfundierte Lösung über ein Wasserbad erwärmt (Konfiguration 1). Das Experiment wurde unter optischer Kontrolle mit einem Stereomikroskop durchgeführt. Der Gewebeschnitt wurde in Faserrichtung mit Sekundenkleber an zwei Bügel geklebt (Abb. 4A) und in die Haken der Kammer eingehängt.

In der zweiten Messkonfiguration wurde der Gewebeschnitt auf den Boden einer selbst konstruierten Messkammer gelegt (Abb. 4B) und durch einen Bügel mit eingespannten Nylonfäden auf dem Boden gehalten. Das Mikroskop an der zweiten Messkonfiguration war ein aufrechtes Mikroskop mit Eintauchobjektiven und die perfundierte Lösung wurde über die Beheizung des Mikroskoptisches erwärmt (Konfiguration 2).

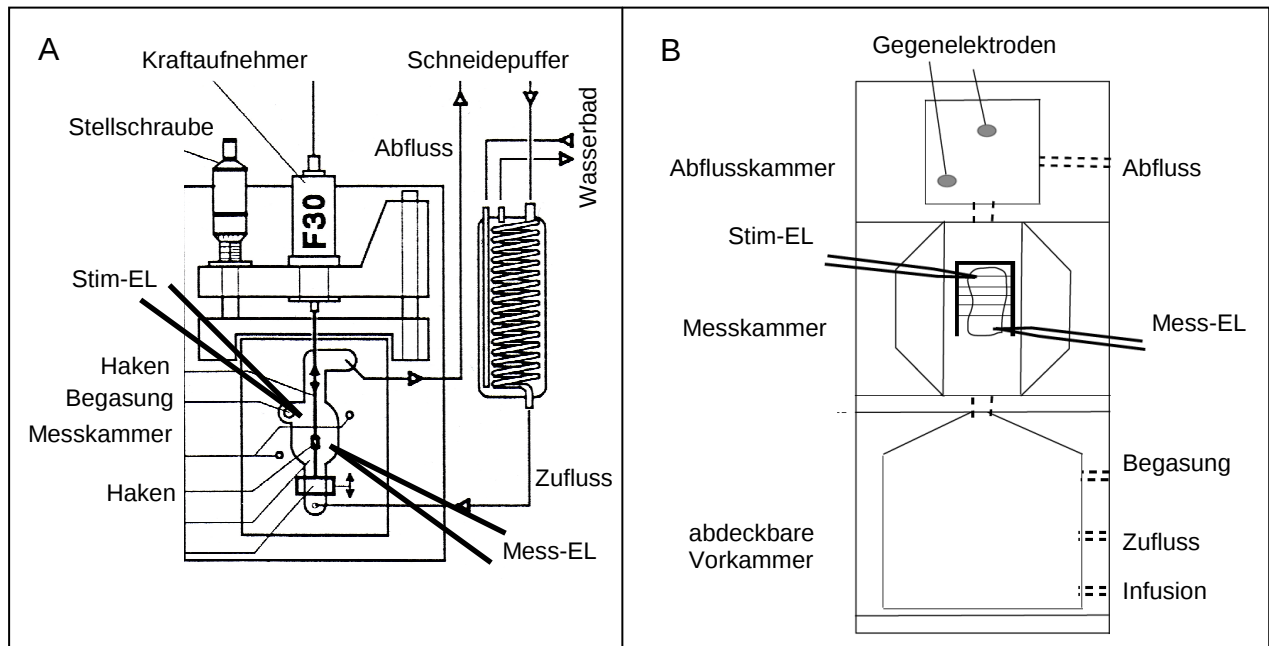


Abbildung 4: Dargestellt sind Schemata der Kammern der beiden Messkonfigurationen (A: Konfiguration 1, B: Konfiguration 2). Stim-EL: Stimulationselektrode, Mess-EL: Messelektrode.

Der Zufluss bei beiden Aufbauten erfolgte Schwerkraft-gesteuert und der Abfluss über eine Rollenpumpe. Die Mikropipette zur Messung der Spannungsänderungen wurde über einen elektronisch steuerbaren Mikromanipulator zur Zelle geführt. Mittels einer Stimulationselektrode wurden die Gewebeschnitte elektrisch stimuliert. Diese Punktstimulation erfolgte mithilfe eines elektrischen Stimulators entweder über eine Coaxial-Elektrode oder einen mit Kunststoff, Glas und einem Silikongemisch isolierten Platin-Iridium-Draht (Durchmesser: 0,1 mm). Die Stimulationselektrode wurde auf das Gewebe aufgesetzt, sodass sie direkten Kontakt zu den erregbaren Zellen hatte. Die angelegte Spannung wurde so gewählt, dass eine Kontraktion des Gewebes und ein Signal in der gemessenen Zelle zu sehen war, die Pulsdauer war jeweils 1 ms lang. Die Gewebeschnitte wurden in der Regel für eine halbe Stunde vorstimuliert, in der auch die angelegte Spannung noch angepasst wurde. Ein Experiment wurde erst begonnen, wenn das mit der Messelektrode aufgenommene Aktionspotential über mindestens zehn Minuten eine stabil Form aufwies. Eine Behandlung mit kardiowirksamen Substanzen erfolgte mithilfe eines Infusors, der eine Stammlösung der Substanz in den Zulauf der Messkammer infundierte. Die endgültige Konzentration der Substanz wurde über die Infusionsgeschwindigkeit festgelegt. Die Substanzen wurden entweder in Messpuffer oder in DMSO gelöst, wobei die DMSO-Konzentration im Bad 0,1 % nicht überschritt. Nach einem Experiment wurden die Gewebeschnitte entsorgt.

4.6.3 Frequenzabhängigkeiten und Refraktärzeit

Die elektrischen Eigenschaften des myokardialen Gewebes und seiner Zellen sind abhängig von der Häufigkeit, mit der eine Erregung stattfindet und die Aktionspotentialform ändert sich deutlich durch eine Änderung in der Stimulationsfrequenz. Diese Reaktionen können unterschieden werden in drei Kategorien. Zunächst reagieren die Zellen innerhalb einer Erregungswiederholung, die Änderungen liegen im Millisekunden- bis Sekundenbereich und sind abhängig von den Ionenkanaleigenschaften der Kardiomyozyten. Bei einer länger anhaltenden Veränderung der Stimulationsfrequenz kommt es zu einer Anpassung der Aktionspotentialform im Minuten-Bereich, die abhängig von Ionenkanaleigenschaften und intrazellulären Signalketten sein kann. Bleibt die Frequenz über Stunden und Tage verändert, treten veränderte Expressionsmuster verschiedener kardialer Proteine auf, und die Zelle beginnt, sich langfristig an diese Änderung im Metabolismus anzupassen (Goette et al., 2008; Eisner, 2009).

Die Reaktionen der Zellen auf eine Frequenzänderung konnten für den Sekunden- und Minutenbereich getestet werden. Um eine Abhängigkeit der Aktionspotentialform von dem Abstand zwischen zwei Stimuli zu zeigen, wurde eine sogenannte elektrische Rückbildungskurve (ERC, „electrical restitution curve“) aufgezeichnet. Die Präparationen wurden mit einer konstanten Grundfrequenz stimuliert. Ein zweiter Stimulus wurde gesetzt in einem Abstand von 4000 ms, der in Schritten von 500 ms auf 1000 ms verkürzt wurde. Danach wurde der Abstand von 1000 ms in Schritten von 100 ms auf 500 ms verkürzt, und schließlich von 500 ms in Schritten von 10 ms bis zum Erreichen der relativen Refraktärzeit. Dadurch konnte sowohl die Refraktärzeit bestimmt als auch eine ERC für verschiedene Aktionspotentialparameter erstellt werden.

Für eine Beeinflussung der Aktionspotentialform durch einen mittelfristigen Wechsel der Stimulationsfrequenz wurden die Gewebeschnitte jeweils so lange stimuliert, bis die Aktionspotentiale stabil in ihrer Form wurden, wobei je Schritt 5 Minuten ausreichten, bis auf die 0,25 Hz – Phase, die für 10 Minuten andauerte.

4.6.4 Bestimmung der Reizleitungsgeschwindigkeit

Wird das Gewebe elektrisch stimuliert und befindet sich die Messelektrode in der Lösung, dann wird ein so genanntes Stimulationsartefakt aufgenommen und erscheint als kurzer Peak im Spannungssignal. Die Zeit zwischen diesem Peak und dem Beginn des Aktionspotentials bezeichnet man als Latenz und sie ist abhängig von dem Abstand zwischen Mess- und Stimulationselektrode und der Geschwindigkeit, mit der der elektrische Reiz zwischen den Zellen weitergegeben wird. Den Abstand zwischen den Elektroden kann man messen und dadurch die Reizleitungsgeschwindigkeit im Gewebe errechnen.

4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die quantitative PCR kann anhand der mRNA-Menge Aufschluss darüber geben, wie hoch die Genexpression eines bestimmten Gens ist und wurde hier dafür verwendet um potentielle Änderungen im Expressionsmuster wichtiger kardialer Marker und Ionenkanäle im Kulturverlauf zu untersuchen.

4.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Gewebeschnitte wurden zu einem bestimmten Zeitpunkt der Kultur bei -80 °C eingefroren. Lysiert wurden die Zellen durch einen Hand-Homogenisator mit Teflon-Aufsatz in Lyse-Puffer. Nachdem die RNA durch eine Proteinase K-Behandlung und eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt wurde, konnte sie an einer ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert werden. Die RNA-Konzentration der Probe wurde mithilfe von photometrischen Messungen bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt und später für die Normalisierung der Expressionsmengen genutzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des Cloned AMV First-Strand Synthesis Systems für RT-PCR von Invitrogen. Dieses Kit benutzt das aus dem Avian Myeloblastosis Virus isolierte Enzym AMV Reverse Transkriptase, deren Eigenschaft einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die cDNA-Synthese ermöglicht. Mithilfe eines Oligo(dT)-Primers, der sich an die Poly(A)-Kette am 3'-Ende der mRNA anlagert, verlängert dieses Enzym diesen Primer bis ein vollständiges DNA-Transkript entstanden ist. Aus dieser einzelsträngigen

DNA wird mithilfe des gleichen Enzyms ein dazu komplementärer DNA-Strang synthetisiert, sodass Doppelstrang-DNA entsteht. Diese cDNA wurde dann bei -20 °C gelagert.

4.7.2 Quantitative „real-time“ Reverse Transkriptions-PCR

Man benötigt für die PCR zwei spezifische Primer, kurze Oligonukleotide, die zu jeweils einem Strang der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (cDNA) an den entgegengesetzten Enden komplementär sind. Weiterhin braucht man eine thermostabile DNA-Polymerase, Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Puffer und Mg^{2+} -Ionen, die als Kofaktor für die DNA-Polymerase dienen. Die PCR-Reaktion läuft in drei Schritten ab. Zunächst beginnt man mit der Denaturierung bei 95°C. Hierbei wird der Ausgangs-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten. Das darauf folgende „Annealing“ findet bei 55°C statt. Dabei hybridisieren die Einzelstränge mit den im Überschuss vorhandenen Primern. Nun werden die Primer verlängert, so dass ein Duplikat des vorherigen Komplementärstrangs entsteht und die Ausgangs-DNA verdoppelt wird. Dieses Protokoll läuft in vielen Zyklen hintereinander ab, so dass der gewünschte Sequenzabschnitts exponentiell amplifiziert wird (Mülhardt, 2003). Mithilfe eines in DNA interkalierenden Farbstoffes, in diesem Fall SYBR green 1 kann man in „Echtzeit“ die Amplifizierung der Ausgangs-DNA mitverfolgen. SYBR green I ist aufgrund der Sensitivität und Spezifität gut für diese Art der Anwendung geeignet (Morrison et al., 1998). Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird durch eine Halogenlampe angeregt und das emittierte Licht über einen Spektographen zu einer CCD-Kamera geleitet. Den Richtwert (threshold), ein festgelegter Fluoreszenzwert, legt man in die exponentielle Phase der Amplifizierung. Die einzelnen Proben benötigen unterschiedlich viele Zyklen, um diese Fluoreszenz zu erreichen, die einer bestimmten Kopienzahl entspricht und gegen eine Standardreihe bekannter Konzentrationen abgeglichen wird. Für diese Versuche wurde das Platinum[®] SYBR[®] green qPCR Supermix with Rox Kit benutzt und die PCR-Reaktion wurde in dem 7000 Sequence Detection System von AppliedBiosystems durchgeführt.

4.7.3 Primerdesign und -Optimierung

Um die Primersequenzen für bestimmte Gene zu ermitteln, benötigt man zunächst die Sequenzen der mRNA, bzw. der cDNA dieser Gene. Diese enthalten im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns mehr. Die Sequenzen wurden auf der Internetseite www.ncbi.nih.gov in Form von GenBank-Dateien gefunden und eingelesen. Mithilfe des Programms PrimerExpress von Applied Biosystems wurden Primer ausgewählt, die zwischen 18 und 25 Nukleotide lang sind und ein Amplikon erzeugen, das eine Länge von 100-150 Basenpaaren hat. Um zu prüfen, ob die ermittelten Oligonukleotide spezifisch für die jeweiligen Gene sind, wurden die Primersequenzen auf der Internetseite www.ncbi.nih.gov/BLAST eingegeben und mit der Genbank verglichen, um unerwünschte Homologien auszuschließen. Alle ermittelten und unten aufgeführten Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen (Tab. 1).

Um die Primer zu optimieren, wurde eine PCR mit neun verschiedenen Primerkonzentrationen und derselben cDNA durchgeführt. Um danach festzustellen, welche Konzentration optimal ist, wurde eine Gelelektrophorese mit den verschiedenen Produkten durchgeführt. Dafür benutzte man ein 2%iges Agarose-Gel, das mit 10mg/mL des Fluoreszenz-Farbstoffes Ethidium-Bromid versetzt wurde, sodass die DNA angefärbt wurde. Die mit einem Ladepuffer gemischten Proben wurden parallel zu einem Marker auf das Gel aufgetragen, sodass man die Größe der gelaufenen DNA-Fragmente abschätzen kann. Über die Gele wurde für 20 min bei 400 mA je nach Gelgröße eine Spannung von 140 bis 240 Volt angelegt, um die Proben optimal aufzutrennen. Danach wurden sie mit einer CCD-Kamera unter UV-Bestrahlung bei 312 nm fotografiert und ausgewertet, um die optimale Primerpaarkonzentration zu bestimmen.

Wurden die optimalen Primerbedingungen gefunden, so konnte die Konzentration des PCR-Produktes dieses Ansatzes gemessen werden, indem es mit Wasser verdünnt photometrisch gemessen wurde. Mithilfe der Konzentration konnte man einen Standard für diesen Primer herstellen, aus dem eine Standardreihe für die jeweiligen quantitativen „real-time“ PCRs hergestellt wurde.

Gen	Accession number	Sequenz (sense/antisense)	Länge des Amplikons
hABCC9	NM_005691	TGGATGCAGGCCTTGTTTTAG ACCAAAGTGGAAAAGAGGCCAT	102
hCACNA1C	NM_001129846	AAAGGCTACCTGGATTGGATCA CGTTTTTCGGTGTTGACGGA	132
hKCND3	NM_172198	GCCAGCAAGTTCACAAGCATC TTCCCTGCAATCGTCTTAGGC	100
hKCNH2	NM_172057	AAGGACAAGTATGTGACGGCG GCATGACGCAGATGGAGAAGA	114
hKCNIP	NM_014591	CACACCTGCTCGTCCCATTTA GAAGAGCCCCAAAATGCAAAGC	118
hKCNJ11	NM_000525	AAGAAAGGCAACTGCAACGTG TGAGCAATGTGTGTGGCCA	108
hKCNJ2	NM_000891	CAAAACTGAGCCATCCAGCAT TGTGGCATCTTCCCTAAGGTG	112
hSCN5A	NM_001160161	ACATGCTCATCATGTGCACCA GGTGTAATGGCGGTGAAGGT	106
hSLC8A	NM_001112801	GCTGCCCTCCTGTTTCGATTA TGAAACACGCCCAGCCATT	106

Tabelle 1: Primersequenzen. In dieser Tabelle sind die verwendeten Primer für die „real-time“ reverse Transkripta-se PCR aufgeführt, zusammen mit der Länge des Amplikons und der Accession Nummer.

4.8 Statistik

Für eine Auswertung der untersuchten Aktionspotentialparameter wurde wie folgt vorgegangen: Je Gewebeschnitt wurden mindestens drei Zellen gemessen und die Aktionspotentiale, vorausgesetzt sie waren stabil in ihrer Form, für mindestens 5 Minuten aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden mit dem Programm Chart 5 ausgewertet und je Zelle der Mittelwert aus 100 aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen berechnet. Es wurde ein Mittelwert aus den Aktionspotentialparametern der Zellen gebildet, der dann wiederum als Wert für ein „n“ stand, das die Eigenschaften eines Präparates zu diesem Zeitpunkt widerspiegelte. Die Werte unterschiedlicher Präparate wurden zusammengefasst und zusammen mit dem Standardfehler für alle Kulturzeitpunkte dargestellt. Dann wurde mithilfe eines 1-Way-ANOVA-Tests überprüft, ob signifikante Unterschiede im Lauf der Kultur für die einzelnen Parameter aufgetreten sind, das Signifikanzniveau wurde dabei auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Wurden nur zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte ein einfacher t-Test, ebenfalls mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Für die Auswertung der pharmakologischen Reaktionen der Kardiomyozyten in Kultur wurde je Präparation eine Zelle eines Gewebeschnittes an einem bestimmten Kulturzeitpunkt vor, während und nach Behandlung mit einer pharmakologischen Substanz gemessen. Es wurde der Mittelwert von jeweils 100 Aktionspotentialen vor der Behandlung und von 100 Aktionspotentialen in der stabilen Phase der Reaktion gebildet. Die Reaktion wurde durch eine Normierung auf den Wert vor Behandlung quantifiziert. Die Mittelwerte der einzelnen Präparationen wurden zusammen mit dem Standardfehler über den Kulturzeitraum dargestellt.

Für die PCR-Daten wurden alle bereits auf den RNA-Gehalt der Probe normierten Expressionsmengen der einzelnen Präparate noch einmal auf den Mittelwert aller Werte am Tag 0 der Kultur normiert und in % angegeben. Für eine Überprüfung des Einflusses der Kultur auf das Expressionsmuster wurde auch hier ein 1-Way-ANOVA angewendet. Alle statistischen Berechnungen und Darstellungen erfolgten mit dem Programm Prism (Version 5.03, GraphPad Software).

5 Ergebnisse

5.1 Akute myokardiale Gewebeschnitte

5.1.1 Die Etablierung der Gewebeschnitttechnik

Funktionelle Gewebeschnitte sind bereits seit Jahrzehnten etablierte Modellsysteme für unterschiedliche Untersuchungen verschiedener Gewebearten (Parrish et al., 1995). Vor allem im Bereich der neuronalen Forschung haben sich akute und kultivierte Hirnschnitte, insbesondere aus der neonatalen Maus, bewährt (Hajos et al., 2009; Gibbons et al., 2010). Aus diesem Grund gibt es weit entwickelte Geräte und Protokolle für die Hirnschnittpräparation, die eine wesentliche Grundlage für eine Etablierung humaner Herzschnitte waren. Weitere Vorarbeiten wurden von der Gruppe um Pillekamp geleistet, die in mehreren Arbeiten zeigen konnten, dass aus neonatalen und adulten Mäuseherzen funktionell aktive Gewebeschnitte hergestellt werden können (Pillekamp et al., 2005 und 2007; Halbach et al., 2006). Die Protokolle dieser Arbeitsgruppe wurden zunächst übernommen, wobei festgestellt wurde, dass die in dieser Studie eingesetzten Gewebeschnitte in ihrer Vitalität und Funktionalität heterogen waren. Da in den von Pillekamp und Kollegen verwendeten Protokollen Kalzium-frei geschnitten wurde (Pillekamp et al., 2005), war eine Hypothese für die mechanistische Ursache dieser Heterogenität, dass die Zellen bei erneutem Kalzium-Kontakt mit Kalzium überladen wurden. Es ist beschrieben, dass dieser Prozess zu einer irreversiblen Schädigung des kontraktilen Apparates und einer verminderten Funktion der Kardiomyozyten führen kann (Piper et al., 1992 und 2000). Auch ein schrittweise vollzogener Rekalzifizierungsprozess des Schneidepuffers brachte nur leichte Verbesserungen (nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, dass eine Kalzium-Konzentration von 0,9 mM Verbesserungen in der Funktionalität, Vitalität (Brandenburger, unveröffentlicht) und der Anstecheffizienz bei intrazellulären Ableitungen brachten (Abb. 5 A). Eine Präparation mit einem HEPES-Puffer statt mit einer Bikarbonat-gepufferten Lösung führte zu einer Erhöhung in der Ausbeute stabiler Zellen (Abb. 5 B). Ungefähr die Hälfte aller angestochenen Zellen waren für mindestens 100 Aktionspotentiale stabil messbar, wenn die Gewebeschnitte mit HEPES gepuffert wurden, während es nur ungefähr ein Drittel war, wenn der Schneidepuffer mit Bikarbonat angesetzt wurde. Durch diese Optimierungen in der Präparation der Gewebeschnitte ist es uns gelungen, die Ausbeute und die Stabilität der untersuchten Kardiomyozyten zu erhöhen.

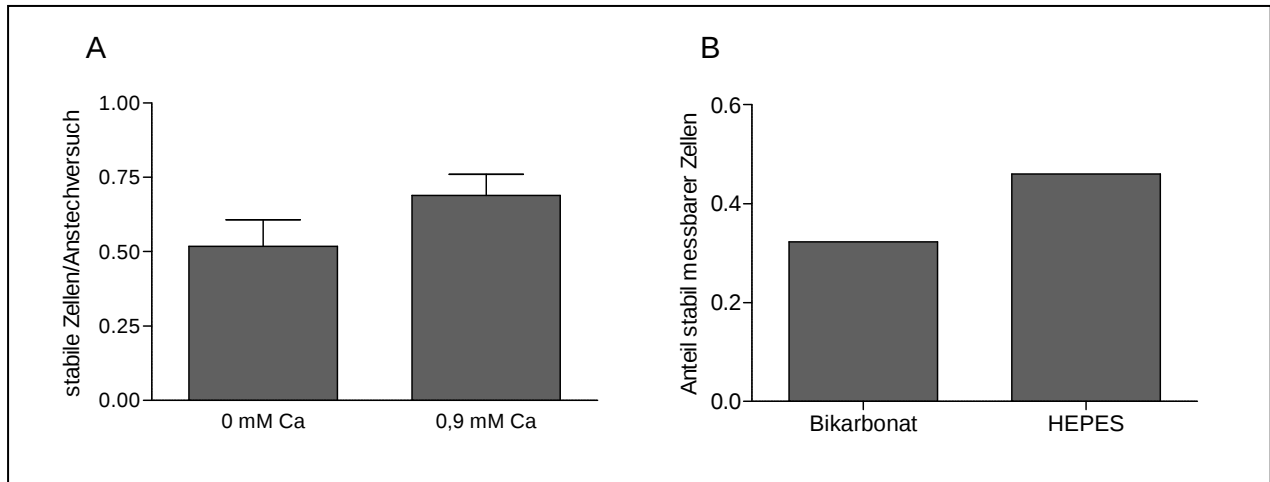


Abbildung 5: Optimierung der Schneidebedingungen. Der Zusatz von 0,9 mM Kalzium in den Schneidepuffer erhöhte den Anteil von stabil messbaren Zellen pro Anstechversuch (A), $n=6$ Schnitte aus unabhängigen Versuchen je Bedingung, $MW \pm SEM$. Die Pufferung mit HEPES und gleichzeitige Sauerstoffbegasung erhöhte den Anteil stabil messbarer Zellen am Gesamt-Zell-Anteil im Vergleich zu einer Pufferung mit Bikarbonat und Begasung mit Karbogen (B), dargestellt ist der Gesamtwert aus 5-6 unabhängigen Präparationen je Bedingung.

5.1.2 Die Vitalität der murinen und humanen Gewebeschnitte

Während der Präparation der Gewebeschnitte ist es durch das Schneiden wahrscheinlich, dass ein gewisser Anteil der Zellen geschädigt oder zerstört wird. Um den Einfluss dieser Schädigung auf die Zellen zu untersuchen, wurden die Schnitte mit Vitalitätsfarbstoffen gefärbt. FarRed ist nicht Zellmembran-gängig und färbt die Proteine an, sodass intakte Zellen nur an der Membran und geschädigte Zellen komplett gefärbt werden. Propidiumiodid färbt die Zellkerne geschädigter Zellen an und Syto9, als Kontrolle, färbt auch die Zellkerne der intakten Zellen.

In Abbildung 6 A (muriner Schnitt) und 6 D (humaner Schnitt) kann man erkennen, dass nur die Ränder der Schnitte mit FarRed gefärbt wurden, während man im Schnittinneren keine Zellen findet, die mit diesem Farbstoff gefüllt sind. Allerdings kann man bei einer Erhöhung der Sensitivität die Membranen erkennen, die aufgrund der Bindung des Farbstoffes an Membranproteine gefärbt wurden (9 B und E). Das schließt eine ungenügende Diffusion von FarRed in den Schnitt aus. Auch die Färbung mit Propidiumiodid zeigte dieses Ergebnis. Sowohl im murinen Gewebeschnitt (Abb. 9 C) als auch im humanen Gewebeschnitt (Abb. 9 F) wurden nur die Zellkerne der randständigen Zellen gefärbt, sodass man letztendlich davon ausgehen kann, dass die akut hergestellten Herzgewebeschnitte den Schneideprozess zum größten Teil überlebt haben und nur ein bis zwei Zellschichten an den Schnitträndern zerstört werden.

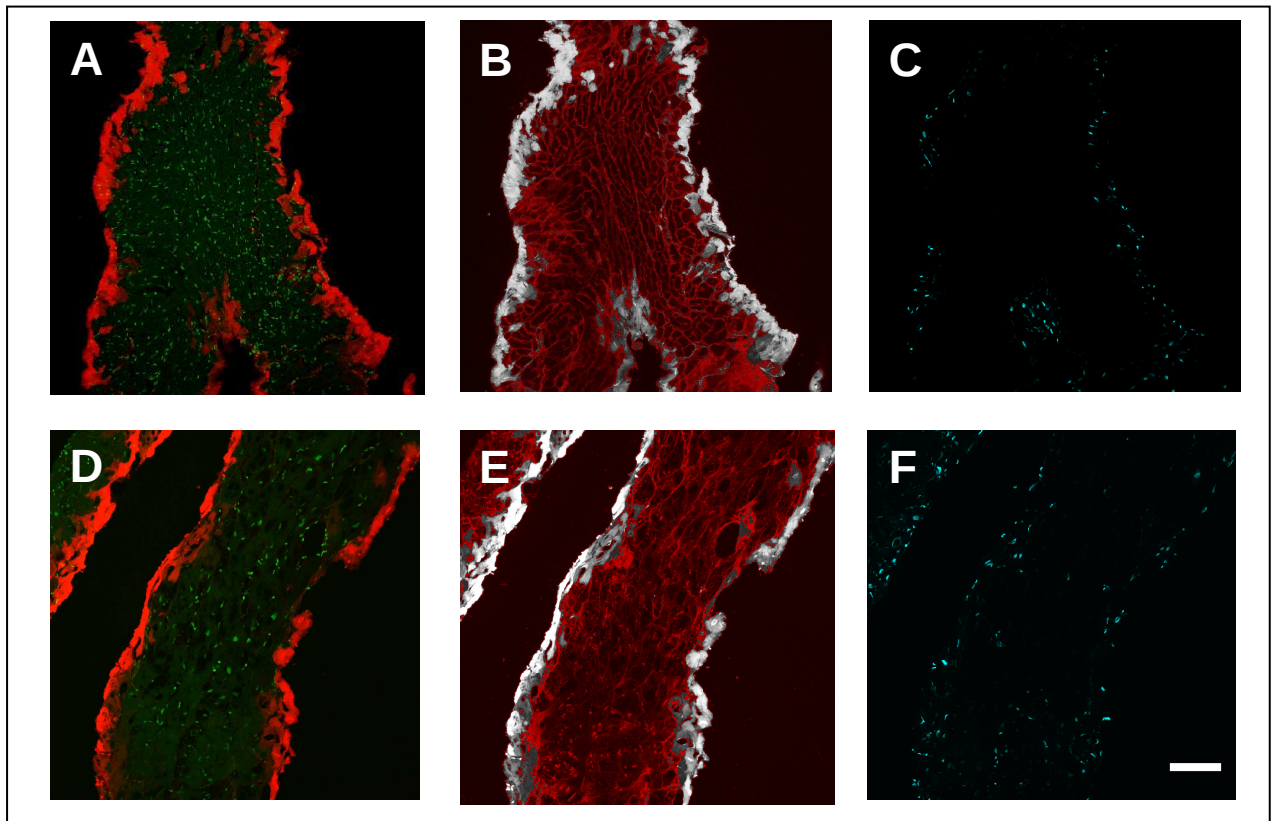


Abbildung 6: Vitalitätsfärbung akut hergestellter Herzgewebeschnitte. Eine Färbung muriner (A-C) und humaner (D-F) Gewebeschnitte mit FarRed und Propidiumiodid zeigte, dass die Schnitte nur im Randbereich zerstört wurden, während das Innere erhalten blieb. A, D: rot: FarRed, Kerngegenfärbung mit grün: Syto9. B, E: rot: FarRed mit erhöhter Sensitivität aufgenommen, weiß: FarRed im gesättigten Aufnahmebereich. C, F: cyan: Propidiumiodid-positiv gefärbte Zellkerne. Der Balken entspricht 100 µm.

5.1.3 Die elektrophysiologische Aktivität von Herzzellen verschiedener Spezies

Es konnten akute Herzgewebeschnitte aus den Ventrikeln verschiedener großer und kleiner Säugetiere hergestellt werden. Die Schnitte wurden funktionell getestet und mittels intrazellulärer Ableitungen konnten Aktionspotentiale aufgenommen werden.

Wie man in Abbildung 7 erkennen kann unterscheiden sich die Kardiomyozyten in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften deutlich. Die Aktionspotentiale von Mäusen oder Ratten waren kurz im Vergleich zu denen von großen Säugern und wiesen eine stark ausgeprägte zweite Phase auf, während im Endokard des Menschen und in der Ventrikulzelle des Rindes diese Phase nicht zu erkennen war. Die Aktionspotentiale von Ziege und Schwein waren etwas kürzer als das des Menschen aber deutlich länger als von Maus und Ratte. Eine kurze zweite Phase war vorhanden, wenn auch nicht so deutlich wie bei der Ventrikulzelle der Maus. Das Ruhemembranpotential der gemessenen Zellen war nicht abhängig von der Spezies und lag bei allen Versuchen zwischen -70

und -80 mV. Auch die Aktionspotentialamplitude lag bei allen Spezies in derselben Größenordnung von 100-120 mV. Aus allen getesteten Spezies konnten funktionelle Herzzellen gemessen werden.

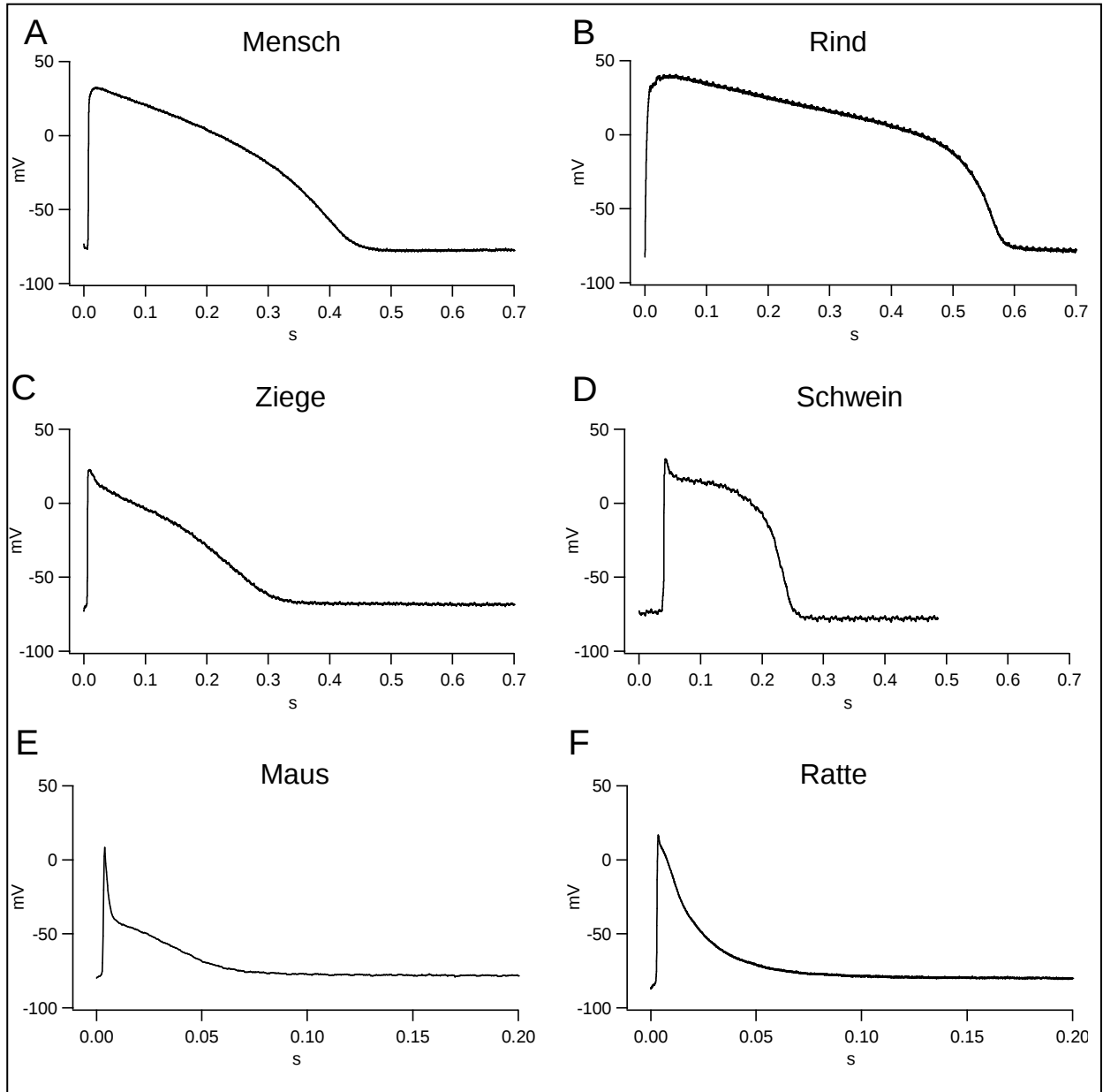


Abbildung 7: Aktionspotentiale aus Herzgewebeschnitten unterschiedlicher Spezies. Dargestellt sind exemplarische Aktionspotentiale, abgeleitet aus Gewebeschnitten des Ventrikels von Mensch (A), Rind (B), Ziege (C), Schwein (D), Maus (E) und Ratte (F). Stimuliert wurden alle Schnitte mit einer Frequenz von 1 Hz. Man beachte die unterschiedliche Zeit-Skalierung.

5.1.4 Frequenzabhängigkeit des humanen und des murinen Aktionspotentials

Die Länge des Aktionspotentials bestimmt die Refraktärzeit und ist deshalb entscheidend für die Wiedererregbarkeit des Herzwebes. Aus diesem Grund muss sich die Form des Aktionspotentials an die Stimulationsfrequenz anpassen. Diese Abhängigkeit konnte für unterschiedliche Spezies bereits in anderen Präparaten gezeigt werden (Patel et al., 2005; Eisner et al., 2009).

Bei unseren Messungen an den Gewebeschnitten zeigte sich sowohl für die murinen als auch für die humanen Präparate eine Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer von der Stimulationsfrequenz. Bei den humanen und auch bei den murinen Kardiomyozyten verkürzte sich die Länge des Aktionspotentials mit steigender Stimulationsfrequenz, aber nur bei den murinen Herzzellen verlängerte sich die erste Repolarisationsphase des Aktionspotentials bei schnelleren Frequenzen (Abb. 8).

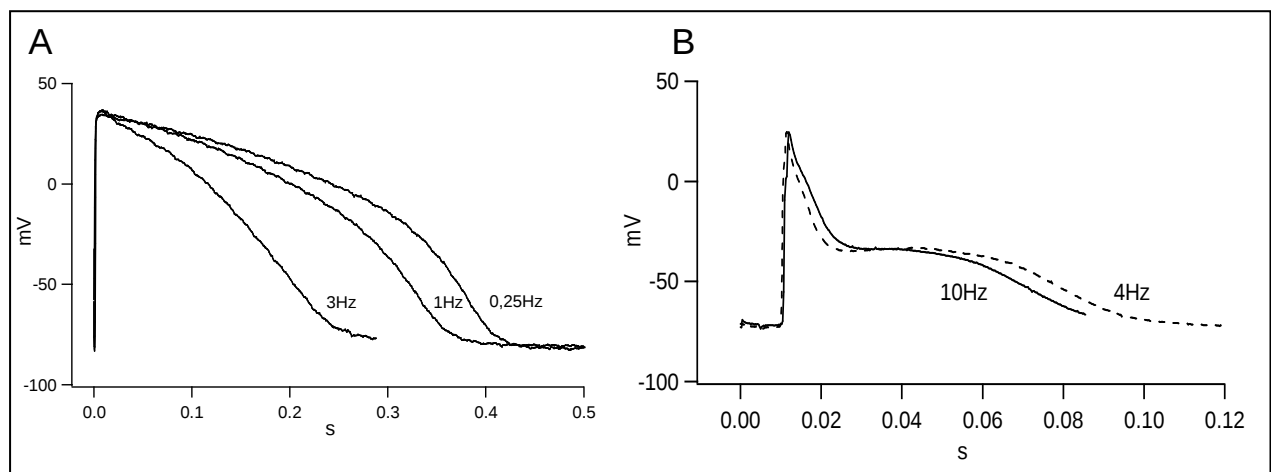


Abbildung 8: Frequenzabhängigkeit des humanen und murinen Aktionspotentials. Dargestellt sind exemplarische Aktionspotentiale aus einem humanen Gewebeschnitt (A) und einem murinen Gewebeschnitt (B) bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen. Humane Kardiomyozyten reagieren auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz mit einer Verkürzung des Aktionspotentials (A), murine ventrikuläre Aktionspotentiale werden auch kürzer bei schnellerer Stimulation, die erste Repolarisationsphase wird allerdings länger (B).

5.1.5 Pharmakologische Beeinflussung verschiedener Ionenströme in humanen Gewebeschnitten

Um die Beteiligung bestimmter Ionenströme am menschlichen endokardialen Aktionspotential im Gewebeschnitt nachzuweisen wurden verschiedene Substanzen verwendet, die einzelne Ionenkanäle blockieren oder aktivieren.

Eine Blockade des hERG-Kanals mit 1 μ M Dofetilid führte zu einer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials (Abb. 9 A, B). Erniedrigt man die Stimulationsfrequenz auf 0,1 Hz, dann potenziert sich der Effekt von Dofetilid auf die Länge des Aktionspotentials und es entwickeln sich frühe Nachdepolarisationen (Abb. 9 A, B). Auf weitere Parameter des Aktionspotentials hat Dofetilid in den getesteten Konzentrationen keine Wirkung. Gibt man dieselbe Substanz zu einem Gewebeschnitt aus dem Mäuseventrikel, sieht man keine Veränderung im APD₉₀ (80 ± 12 ms vs. 73 ± 4 ms, n=3).

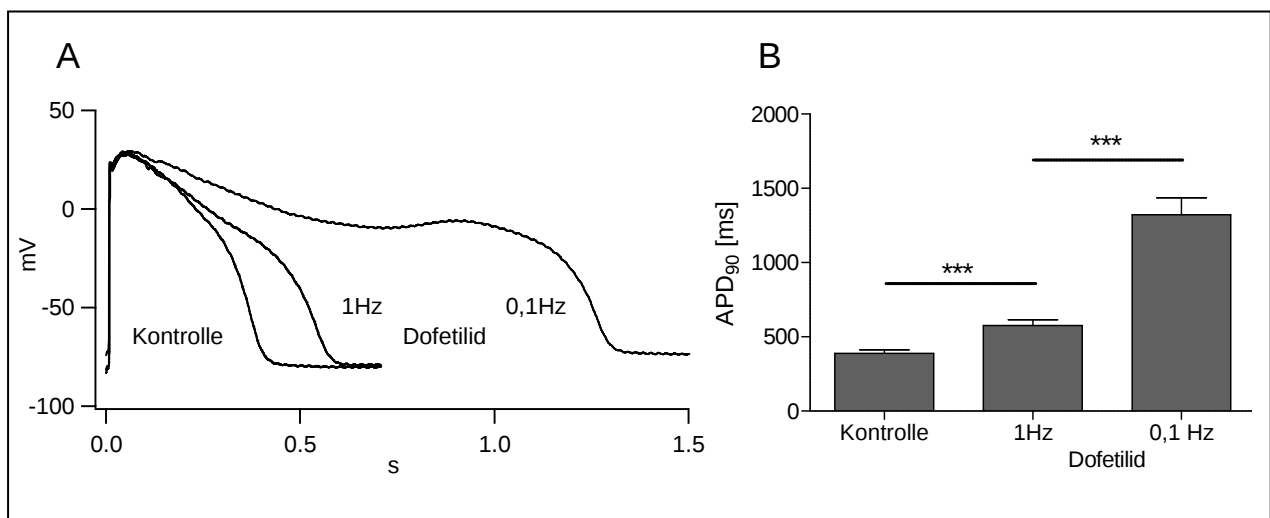


Abbildung 9: Reaktion der humanen Kardiomyozyten auf hERG-Blockade. A: Beispiel einer typischen Messung. B: statistische Auswertung des APD₉₀. Die Aktionspotentiale verlängern sich um ungefähr 50 % im Vergleich zur Kontrolle, wenn man die Gewebeschnitte mit 1 μ M Dofetilid behandelt (A, B). Erniedrigt man die Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 0,1 Hz, kommt es zu einer deutlichen Potenzierung des Effekts (A, B). MW $\pm$ SEM, n=3-10 Versuche unabhängiger Präparationen, *** steht für einen p-Wert < 0,001.

Aktiviert man ATP-abhängige Kaliumkanäle mit 1 μM Rilmakalim, dann verkürzt sich das Aktionspotential signifikant auf ca. 20 % des ursprünglichen APD_{90} -Wertes (Abb. 10 A, B). Gibt man zusätzlich 10 μM HMR1098, einen Inhibitor des sarkolemmlen ATP-abhängigen Kaliumkanals, dann wird dieser Effekt zum Teil wieder aufgehoben, ist allerdings nicht komplett reversibel.

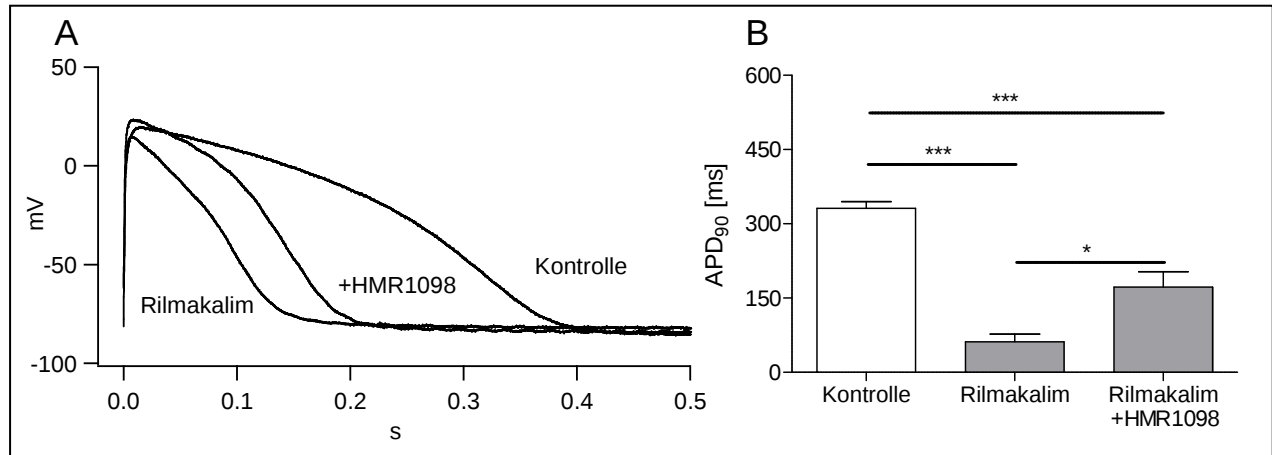


Abbildung 10: Beeinflussung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle am humanen Gewebeschnitt. A: Beispiel einer typischen Messung. B: statistische Auswertung des APD_{90} . Behandelt man die Gewebeschnitte mit 1 μM Rilmakalim, dann verkürzt sich das Aktionspotential signifikant (A, B). Gibt man zusätzlich den Inhibitor des sarkolemmlen ATP-abhängigen Kaliumkanals HMR1098, dann wird diese Verkürzung partiell reversibel (A, B). $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=6$ Versuche unabhängiger Präparationen, * steht für einen p-Wert < 0,05, *** für einen p-Wert < 0,001.

Weitere Substanzen wurden nur exemplarisch getestet und konnten deshalb nicht statistisch ausgewertet werden. Eine β -adrenerge Stimulation mit 1 μM Isoproterenol führte durch die Zunahme des intrazellulären Calcium-Spiegels zu einer Erhöhung der Plateau-Phase des Aktionspotentials (Abb. 11 A). Dagegen führte eine α -adrenerge Stimulation mit 10 μM Phenylephrin zu keiner sichtbaren Veränderung der Aktionspotentialform (Abb. 11 B).

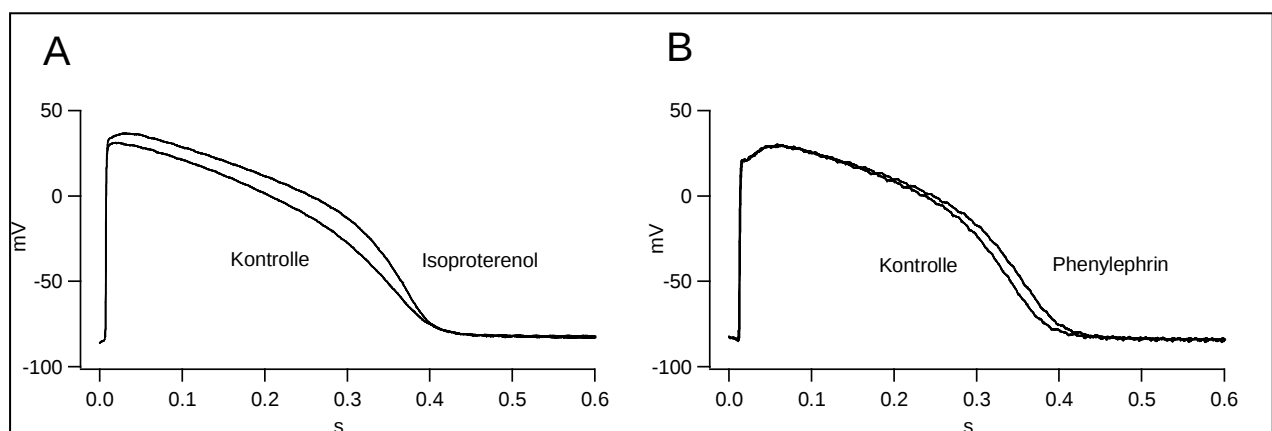


Abbildung 11: Aktivierung adrenerger Rezeptoren am humanen Aktionspotential. Behandelt man die Gewebeschnitte mit 1 μM Isoproterenol und stimuliert dadurch die β -adrenergen Rezeptoren, dann erhöht sich das Plateau des Aktionspotentials deutlich (A). Gibt man den Aktivator der α -adrenergen Rezeptoren Phenylephrin (10 μM), dann kann man keine deutlichen Effekte auf das Aktionspotential feststellen (B).

Die Gabe von Lidocain, einem Inhibitor des Natrium-Stroms in der ersten Phase des Aktionspotentials führte zu einer Konzentrations-abhängigen Reduktion der Aufstrichgeschwindigkeit (Abb. 12 A) und einer Verlängerung der Latenz zwischen Stimulationsartefakt und Beginn des Aktionspotentials um (Abb. 12 B), ein Indiz dafür, dass die Reizweiterleitung gehemmt wird.

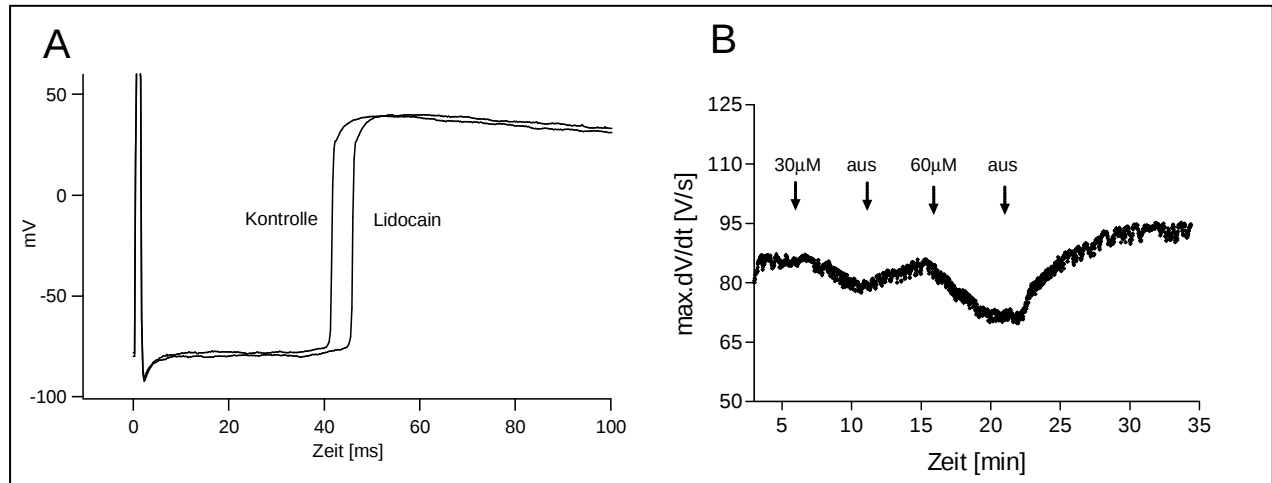


Abbildung 12: Blockade des Natriumstroms mit Lidocain an einer humanen Kardiomyozyte im akuten Gewebeschnitt. A: Dargestellt ist die erste Phase des Aktionspotentials, man erkennt das Stimulationsartefakt zu Beginn der Aufnahme und die Phase 1 des Aktionspotentials. In B sieht man die maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials, im Verlauf eines Experimentes. Behandelt man die Gewebeschnitte mit 60 µM Lidocain, dann wird die Reizweiterleitung gehemmt, zu erkennen an der Verlängerung der Latenz zwischen Stimulations-Artefakt und Beginn des Aktionspotentials (A). Die maximale Aufstrichgeschwindigkeit wird abhängig von der Konzentration reduziert (B).

5.1.6 Geschlechtsabhängigkeit des humanen Aktionspotentials

Frauen leiden häufiger an dem erworbenen Long-QT-Syndrom, eine durch äußere Faktoren verursachte Verlängerung der QT_c -Zeit im EKG, außerdem ist die basale QT_c -Zeit länger als die von Männern (Ebert et al., 1998; Jonsson et al., 2010). Es wird vermutet, dass sie aufgrund dieser Unterschiede auch eine höhere Inzidenz für das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien haben. Im Modell der humanen Gewebeschnitte konnte gezeigt werden, dass die Aktionspotentiale des Gewebes, das aus weiblichen Herzen stammt, signifikant länger sind als die Aktionspotentiale die in männlichem Gewebe gemessen wurden (APD_{90} : 425 ± 15 vs. 368 ± 13 ms, Abb. 13 A). Interessanterweise reagierten die Zellen nicht unterschiedlich auf eine hERG-Blockade mit 1 μ M Dofetilid (Abb. 13 B).

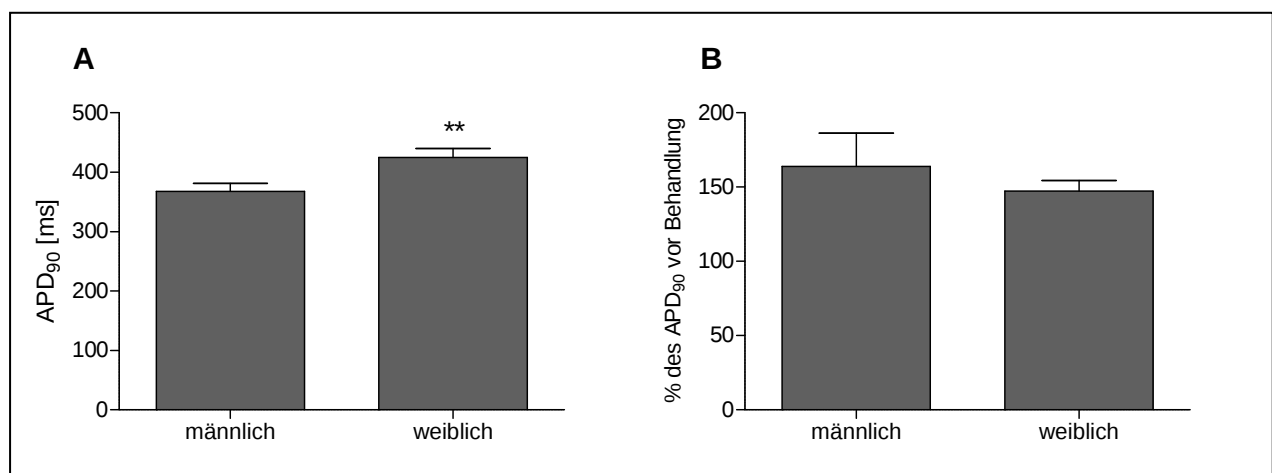


Abbildung 13: Geschlechtsabhängiger Unterschied der Aktionspotentialdauer und hERG-Reaktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte des APD_{90} der Aktionspotentiale (A) beziehungsweise die Änderung des APD_{90} nach Behandlung mit Dofetilid relativ zum Wert vor dem Experiment (B). In den Ventrikelschnitten von Frauen wurden signifikant längere Aktionspotentiale gemessen als im Gewebe von Männern (A, $n=5-6$ Gewebeschnitte unabhängiger Präparationen je Gruppe). Dagegen war die Reaktion der Zellen auf 1 μ M Dofetilid nicht unterschiedlich (B, $n=2-4$ Gewebeschnitte unabhängiger Präparationen je Gruppe). MW $\pm$ SEM, ** steht für einen p-Wert < 0,01.

5.2 Kultivierte humane Gewebeschnitte

Nachdem gezeigt wurde, dass die humanen Herzgewebeschnitte vital und elektrophysiologisch aktiv sind, sollte als nächster Schritt eine Kultivierbarkeit getestet werden, um dieses Modellsystem auch für elektrophysiologische Langzeituntersuchungen nutzen zu können. Für die Methode der Kultivierung wurde ein einfaches System verwendet, welches aus der Hirnschnittkultur bekannt ist und auf einer optimalen Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff beruht (Stoppini et al., 1991). Es wurde ein Basalmedium genutzt, das in der Kardiomyozytenkultur häufig verwendet wird, wenn man auf Serum verzichten möchte (Morgan et al., 1950; Banyasz et al., 2008). Zusätzlich wurden Insulin, Transferrin und Selen zugegeben, drei Substanzen, die in dieser Kombination Verbesserungen im Strukturerhalt kultivierter Kardiomyozyten bewirkten (Viero et al., 2008).

Es wurden Qualitätskriterien für die Form der Aktionspotentiale verwendet, damit man überlebende differenzierte Kardiomyozyten von anderen Zellen in der Kultur unterscheiden konnte. Das Ruhemembranpotential von ungefähr -80 mV und eine schnelle Aufstrichgeschwindigkeit sind die deutlichsten Unterschiede der differenzierten Herzzellen zu anderen Zellarten, beziehungsweise undifferenzierten Myozyten (Gaudesius et al., 2003; He et al., 2003).

5.2.1 Erfolg der Kultivierung

Legt man eine Grenze für die Verwendung von Kardiomyozyten für elektrophysiologische Messungen an (Ruhemembranpotential ≤ 60 mV, Aufstrichgeschwindigkeit ≥ 10 V/s), dann erhält man eine Ausbeute von 89 % für die Gewebeschnitte aus akuten Präparationen, während man nach 28 Tagen in Kultur noch 67 % der Gewebeschnitte elektrophysiologisch untersuchen konnte. Im Vergleich zur Kontraktilität ist das eine höhere Ausbeute für die Funktionalität humaner Gewebeschnitte nach 28 Tagen in Kultur (Brandenburger, unveröffentlicht).

5.2.2 Vitalität

Zunächst wurde die Vitalität mithilfe eines enzymatischen Aktivitätstests untersucht, um zu bestimmen wie groß der Teil der Gewebeschnitte ist, der die Kultur überlebt hat. Es stellte sich heraus, dass die Vitalität, bezogen auf die Proteinmenge, nach 4 Wochen in Kultur nicht abgenommen hat (Abb. 14).

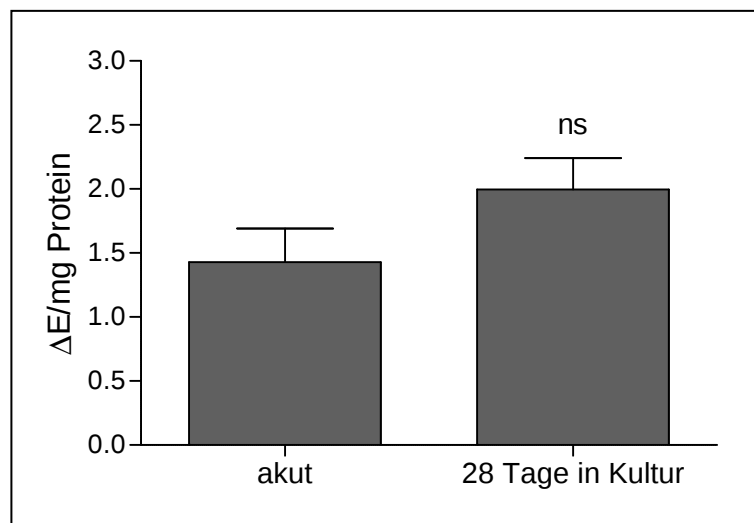


Abbildung 14: Vergleich der Vitalität von Ventrikelschnitten akut und in Kultur. Dargestellt ist das Ergebnis des MTT-Tests. Nach 4 Wochen in Kultur hat die Vitalität der Herzschnitte, gemessen mit dem MTT-Test, nicht abgenommen. n=14 Gewebeschnitte aus 5 unabhängigen Präparationen je Gruppe

5.2.3 Erregungsausbreitung und Struktur

Um die Gewebeschnitte auch nach der Kultivierung noch mit einem punktuellen Reiz stimulieren zu können, muss es ein intaktes Synzytium aus erregbaren Zellen geben, das den Reiz weiterleitet. Durch den Abstand zwischen Stimulations- und Messelektrode und der Latenz zwischen Stimulationsartefakt und Aktionspotentialbeginn konnte eine Reizleitungsgeschwindigkeit gemessen werden, die für die akut gemessenen Gewebeschnitte $0,35 \pm 0,04$ m/s betrug (n=10 Zellen aus 4 Präparationen, Abb. 15 B). Nach 4 Wochen in Kultur konnte trotz veränderter Gewebsstruktur wieder eine Erregungsausbreitung bestimmt werden, die allerdings signifikant abnahm ($0,2 \pm 0,03$ m/s, n=12 Zellen aus 3 Präparationen). Die Struktur der kultivierten Gewebeschnitte erschien auf-

gelockerter und nur ca. 10-20 % der Gewebsfläche zeigten eine typische Muskelquerstreifung (Abb. 15 A).

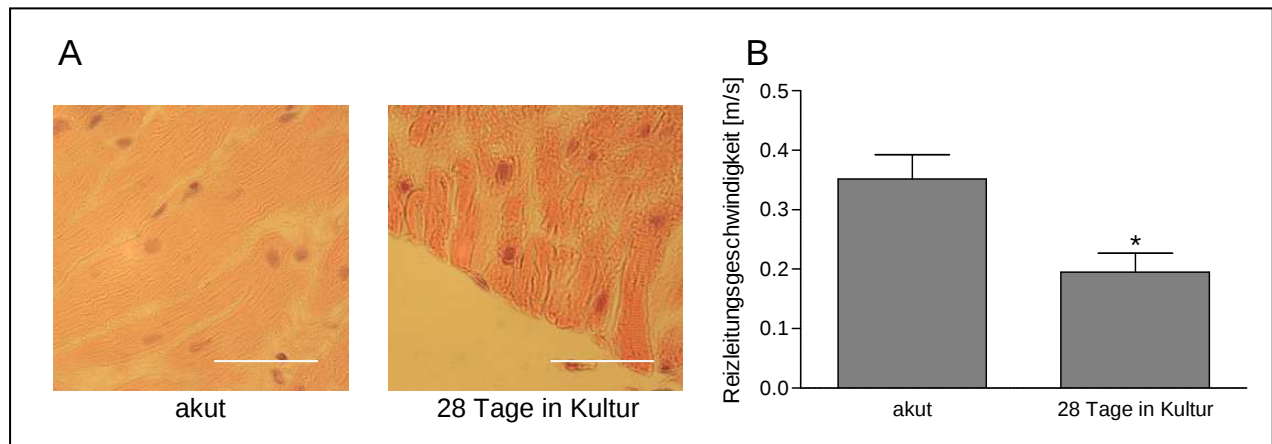


Abbildung 15: Erregungsausbreitung und Struktur nach Kultur. In A sind histologische HE-gefärbte Schnitte der Herzschnitte zu sehen. In B ist die Reizleitungsgeschwindigkeit in den Gewebeschnitten dargestellt. Die Struktur der Gewebeschnitte erscheint aufgelockert und mit größeren Abständen zwischen den Zellen (A). Quergestreifte Zellen sind auch nach 4 Wochen in Kultur noch zu erkennen. Die Erregungsausbreitung ist nach 28 Tagen signifikant erniedrigt (B). MW±SEM, n=10-12 Zellen aus 3-4 unabhängigen Präparationen. Die weiße Linie entspricht einer Länge von 50 µm.

5.2.4 Expression der wichtigsten Ionenkanäle und –Transporter

Eine wesentliche Grundlage für die Ausbildung des kardialen Aktionspotentials ist die geregelte Aktivität verschiedener Ionenkanäle. Um zu überprüfen, ob die Expression dieser Ionenkanäle durch die Kultur beeinflusst wird, wurden mRNA-Spiegel in den akuten und kultivierten Gewebeschnitten bestimmt.

Der wichtigste Kanal im humanen Ventrikel für die erste Phase des Aktionspotentials ist der $Na_v1.5$, ein spannungsabhängiger Natrium-Kanal. Die Expression der mRNA dieses Kanals wurde im Vergleich zu den akut hergestellten Gewebeschnitten trotz eines Abfalls in der ersten Phase durch die Kultur nicht signifikant verändert. Der Natrium-Kalzium-Austauscher und der wichtigste ventrikuläre Kalzium-Kanal $Ca_v1.2$ blieben unbeeinflusst in den Zellen der kultivierten Gewebeschnitte erhalten. Auch die Expression des für das Ruhemembranpotential verantwortlichen $K_{ir}2.1$ -Gens blieb konstant über den gesamten Kulturzeitraum. Die beiden Komponenten des repolarisierenden Kalium-Stroms I_{to} , $K_v4.3$ und $KChIP$, wurden in der Kultur etwas mehr bzw. weniger exprimiert, blieben statistisch aber unverändert (Abb. 16).

Den Hauptanteil des schnell repolarisierenden Kaliumstroms I_{Kr} im humanen Ventrikel trägt der hERG-Kanal, dessen Expression durch die Kultur nicht beeinflusst wurde. Ebenso die beiden

5. Ergebnisse

Hauptkomponenten des kardialen ATP-abhängigen Kaliumkanals $K_{ir}6.2$ und SUR2A waren während des gesamten Kulturzeitraums nicht anders exprimiert als im akuten Gewebeschnitt (Abb. 16).

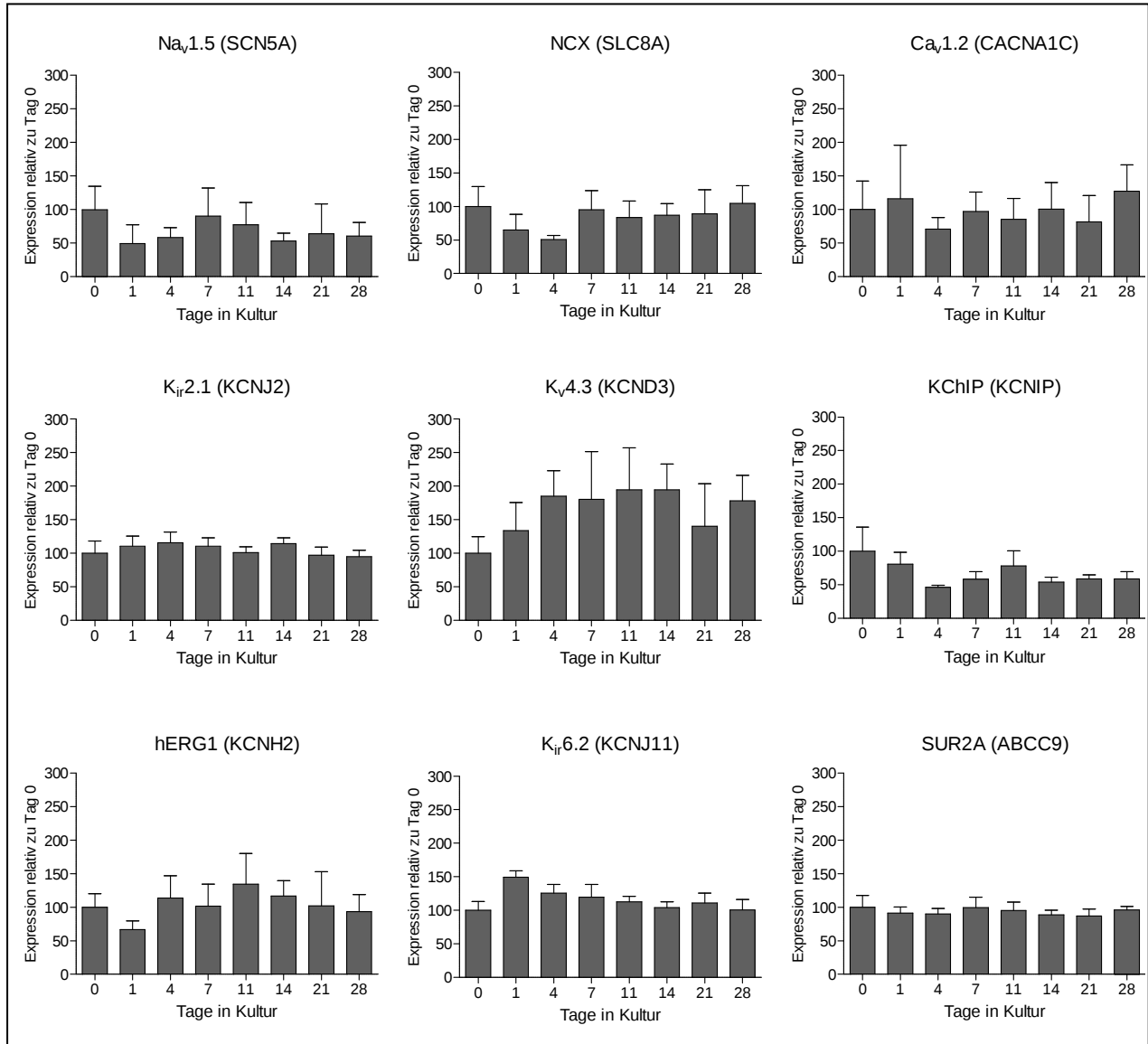


Abbildung 16: Expressionslevel wichtiger Ionenkanäle und Austauscher. Dargestellt sind die mRNA-Spiegel der einzelnen Gene, gemessen mit quantitativer PCR. Normalisiert wurde zunächst auf den Gesamt-RNA-Gehalt der jeweiligen Probe und dann auf den Mittelwert der Gewebeproben am Tag 0. MW $\pm$ SEM, n=6-8 Proben unabhängiger Präparationen.

5.2.5 Aktionspotentiale

Eine maßgebliche Eigenschaft des Herzgewebes ist seine elektrophysiologische Aktivität. Die Form der Aktionspotentiale wurde als wesentlicher Parameter für die Funktionalität der Zellen angesehen. Deshalb wurden die Kulturbedingungen so optimiert, dass die Kardiomyozyten auch nach längerer Zeit noch elektrisch stimulierbar blieben. Die Eigenschaften der Zellen wurden zunächst auf die Aktionspotentialform hin untersucht.

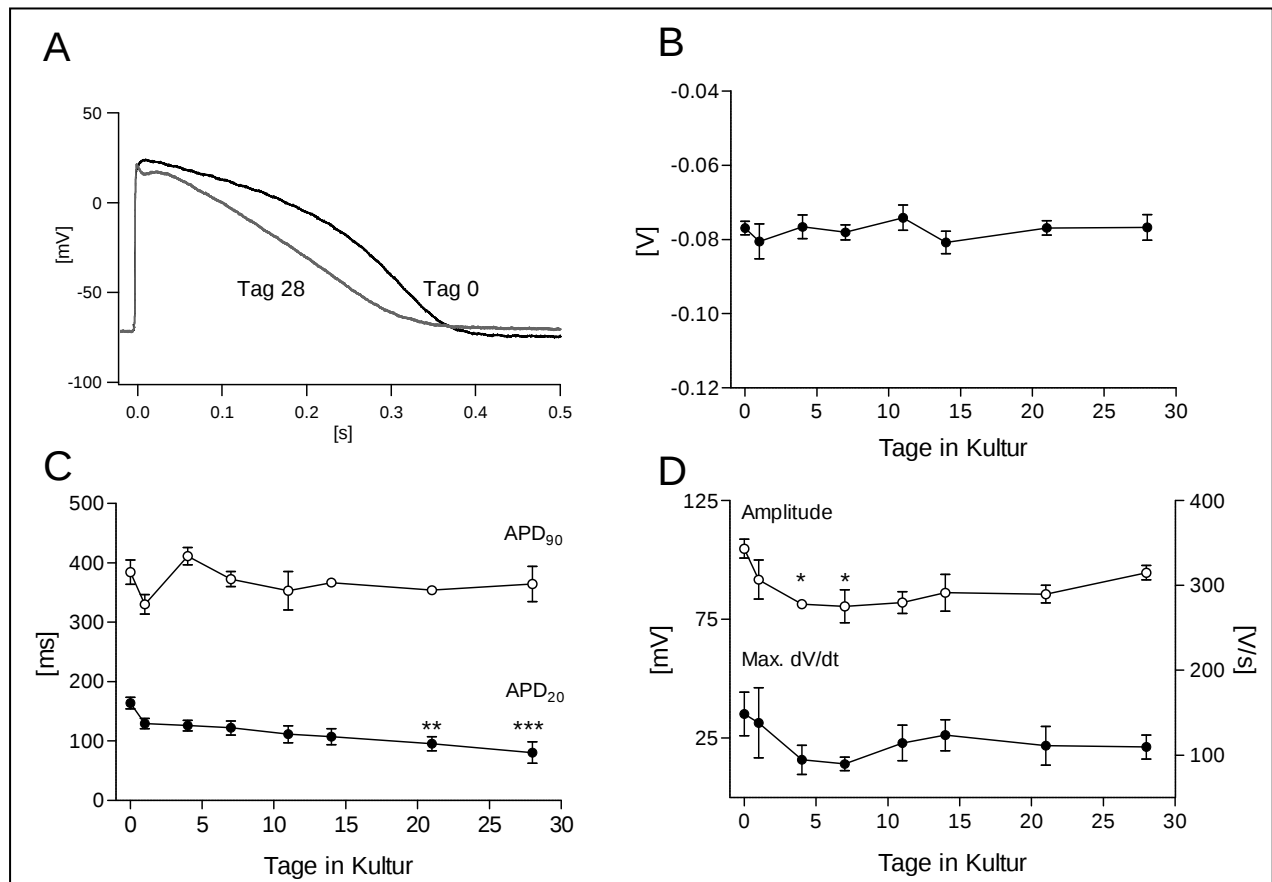


Abbildung 17: Elektrophysiologische Parameter in Kultur. A: Beispielhafte Aktionspotentiale von akuten und kultivierten Schnitte. B: Das Ruhemembranpotential über den Kulturverlauf. C: APD_{20/90} über den Kulturverlauf. D: Amplitude und maximale Aufstrichgeschwindigkeit der Aktionspotentiale über den Kulturverlauf. Die Aktionspotentialform der kultivierten Kardiomyozyten verändert sich nur in der Länge des Plateaus im Vergleich zu den akuten Gewebeschnitten (A, C). Exemplarische Aktionspotentiale sind in A dargestellt, ein Zeitverlauf der Aktionspotentialparameter wird in B, C und D gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der Zellen aus $n=5-9$ unabhängigen Gewebeschnitten pro Zeitpunkt. Die Gewebeschnitte stammen aus 10 verschiedenen Präparationen. * heißt statistisch signifikant mit $p \leq 0,05$.

Das durchschnittlich gemessene Ruhemembranpotential betrug bei Herzzellen aus akut hergestellten Herzgewebeschnitten -77 ± 2 mV, blieb während des gesamten Kulturverlaufes stabil und lag nach 4 Wochen in Kultur bei -77 ± 3 mV (Abb. 17 B). Auch die Aktionspotentialdauer veränderte sich nicht im Lauf der Kultur (Abb. 17 C, APD_{90} akut: 384 ± 20 , nach 28 Tagen: 364 ± 30 ms). Dagegen gab es einen partiellen Verlust des Plateaus, der signifikant durch die Kultur verursacht und durch das APD_{20} beschrieben wurde (Abb. 17 A und C). Nach 28 Tagen in Kultur war dieser Parameter auf 81 ± 18 ms gesunken, während er akut noch 164 ± 10 ms betrug. Die Aktionspotentialamplitude und die Aufstrichgeschwindigkeit nahmen innerhalb der ersten Woche in Kultur ab, danach allerdings wieder zu und waren nach 4 Wochen in Kultur nicht signifikant unterschiedlich zu den Parametern akut hergestellter Schnitte (Abb. 17 D; Amplitude: 105 ± 4 mV akut und 95 ± 3 mV nach 28 Tagen; Aufstrichgeschwindigkeit: 149 ± 26 V/s akut und 110 ± 14 V/s nach 28 Tagen). Auffällig ist weiterhin ein Auftreten einer schnellen ersten Repolarisationsphase bei einigen kultivierten Gewebeschnitten, die man bei akut gemessenen Kardiomyozyten nicht findet (Abb. 17 A).

5.2.6 Elektrische Restitutionskurven und Refraktärzeit

Die Wirkung einer veränderten Stimulationsfrequenz auf das Aktionspotential einer Herzzelle ist ein physiologischer Parameter, der für die Erregbarkeit des Gewebes auch bei schnell aufeinanderfolgenden Schlägen wichtig ist. Um dieses adaptive Verhalten der elektrischen Parameter quantitativ zu erfassen, wurden Experimente mit einem dynamischen Restitutionsprotokoll durchgeführt. Diesem Protokoll folgend wurde der Abstand zwischen zwei Schlägen kontinuierlich verkürzt, bis die absolute Refraktärzeit erreicht wurde. Die Refraktärzeit bei den Zellen der akuten Gewebeschnitte betrug 440 ± 20 ms ($n=15$ Zellen aus 8 unabhängigen Präparationen) und veränderte sich während der Kultur nicht (nach 28 Tagen Kultur: 414 ± 32 ms, $n=9$ Zellen aus 5 unabhängigen Präparationen).

Dagegen war die Reaktion der Zellen auf eine Verkürzung der Stimulationsperiode (S2-S1) stark unterschiedlich zwischen akuten Gewebeschnitten und denen aus Kultur. Bei den Herzzellen der akuten Schnitte wurde das Aktionspotential kontinuierlich kürzer, je kürzer der Abstand zwischen erstem und zweitem Stimulus wurde (Abb. 18 A und D). Auch das Plateau verkürzte sich in gleichem Maß wie die Länge des Aktionspotentials, zunächst langsam und je näher der Abstand der Refraktärzeit kam, desto stärker wurde die Verkürzung (Abb. 18 A, C und D). Nach 4 Wochen in Kultur allerdings wurden die Aktionspotentiale zunächst länger, je kürzer der Abstand zwischen den Stimuli wurde. Insbesondere bildete sich ein Plateau, das im Vergleich zu den akuten bei den

kultivierten stark reduziert war (Abb. 18 B und Abb. 17 A). Dieses Plateau nahm zu bis zu einem Abstand von ungefähr 500 ms zu. Danach folgte sowohl die Plateauform (Abb. 18 C) als auch die Aktionspotentiallänge (Abb. 18 D) demselben Verlauf wie die akuten Schnitte, sie verkürzten sich stärker, je näher der zweite Stimulus der Refraktärzeit kam.

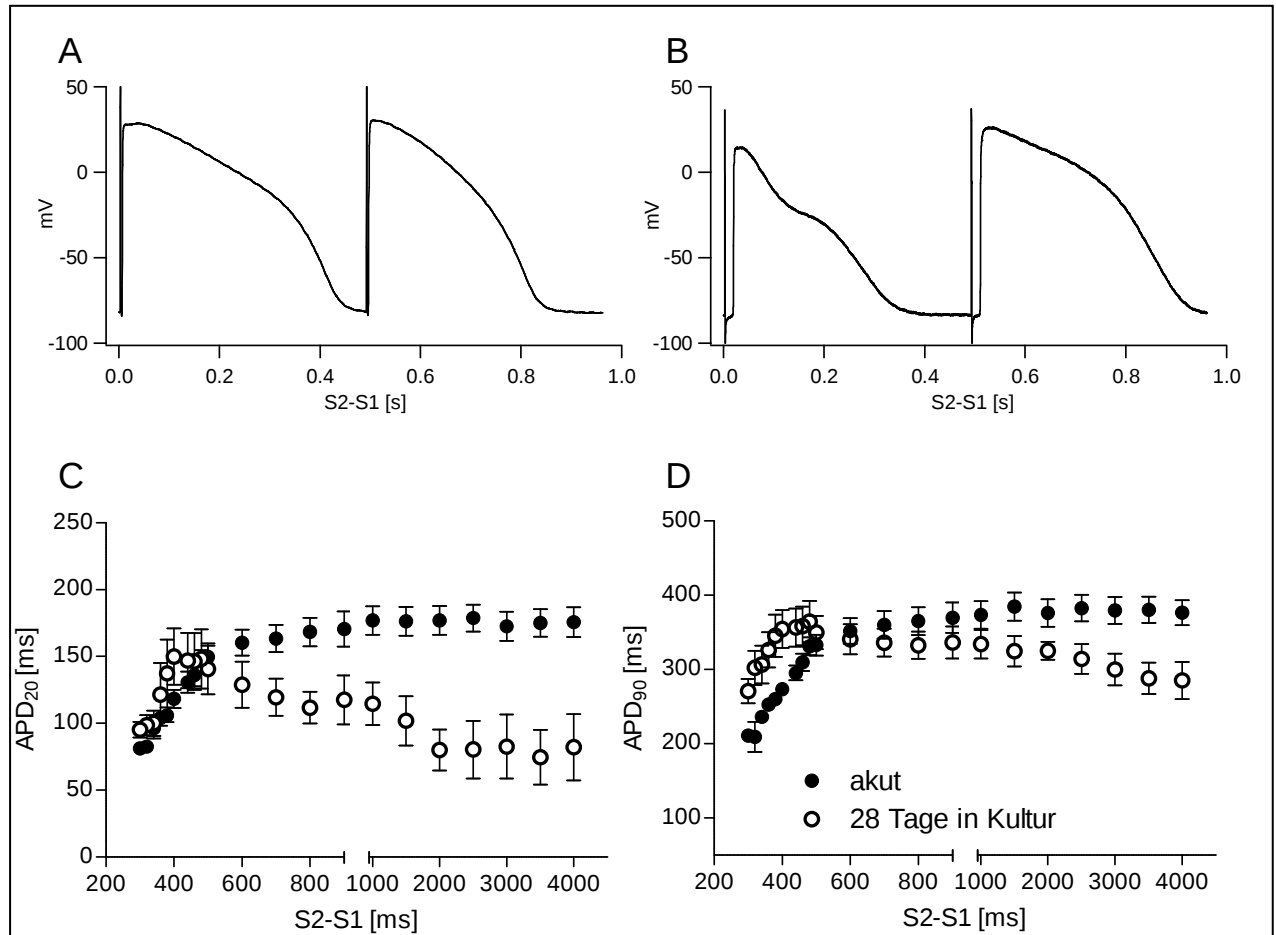


Abbildung 18: Restitution des Aktionspotentials akut und nach Kultur. Verkürzt man kontinuierlich die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Stimuli, dann kann man die Refraktärzeit messen. Davor kann man die Abhängigkeit der Aktionspotentialparameter von der Zeit zwischen zwei Aktionspotentialen (S2-S1) bestimmen. In A ist ein Beispiel am akut hergestellten Schnitt mit einem Abstand S2-S1 von 500 ms gezeigt. In B ist dasselbe gezeigt am 4 Wochen alten Gewebeschnitt. Man kann die Entstehung eines Plateaus erkennen, die abhängig ist von der Zeit zwischen zwei Stimuli (C, gezeigt am APD₂₀). Im Unterschied zum akuten Schnitt wird das Aktionspotential zunächst länger, bevor es kurz vor Erreichen der Refraktärzeit wieder kürzer wird (D, APD₉₀). Beim akut hergestellten Schnitt wird das Aktionspotential kontinuierlich kürzer, je kürzer der Abstand zwischen zwei Stimuli wird. MW±SEM, n=7-10 Zellen aus je 4-7 unabhängigen Präparationen.

5.2.7 Pharmakologische Beeinflussung von Ionenströmen

Neben der Aktionspotentialform ist das pharmakologische Verhalten der kultivierten Herzgewebeschnitte ein wichtiger Parameter zur Bestimmung ihrer physiologisch relevanten Funktionalität. Deshalb wurden zwei grundlegende Reaktionen des Herzens ausgelöst. Zunächst wurde mit 1 μM Dofetilid der hERG-Kanal geblockt, um eine der häufigsten kardialen Nebenwirkungen von Medikamenten zu simulieren. Hatte diese Reaktion eine stabile Phase erreicht, wurden die Gewebeschnitte mit 1 μM Rilmakalim behandelt. Rilmakalim öffnet ATP-abhängige Kaliumkanäle und imitiert dadurch die Reaktion der Kardiomyozyten auf Sauerstoff- und daraus resultierenden ATP-Mangel. Der Verlauf eines Beispiel-Experimentes ist in Abbildung 19 C gezeigt. Es wurde kein Unterschied in der Reaktivität auf Rilmakalim festgestellt zwischen den Zellen die mit Dofetilid vorbehandelt waren und denen die nur Rilmakalim ausgesetzt waren (nicht gezeigt).

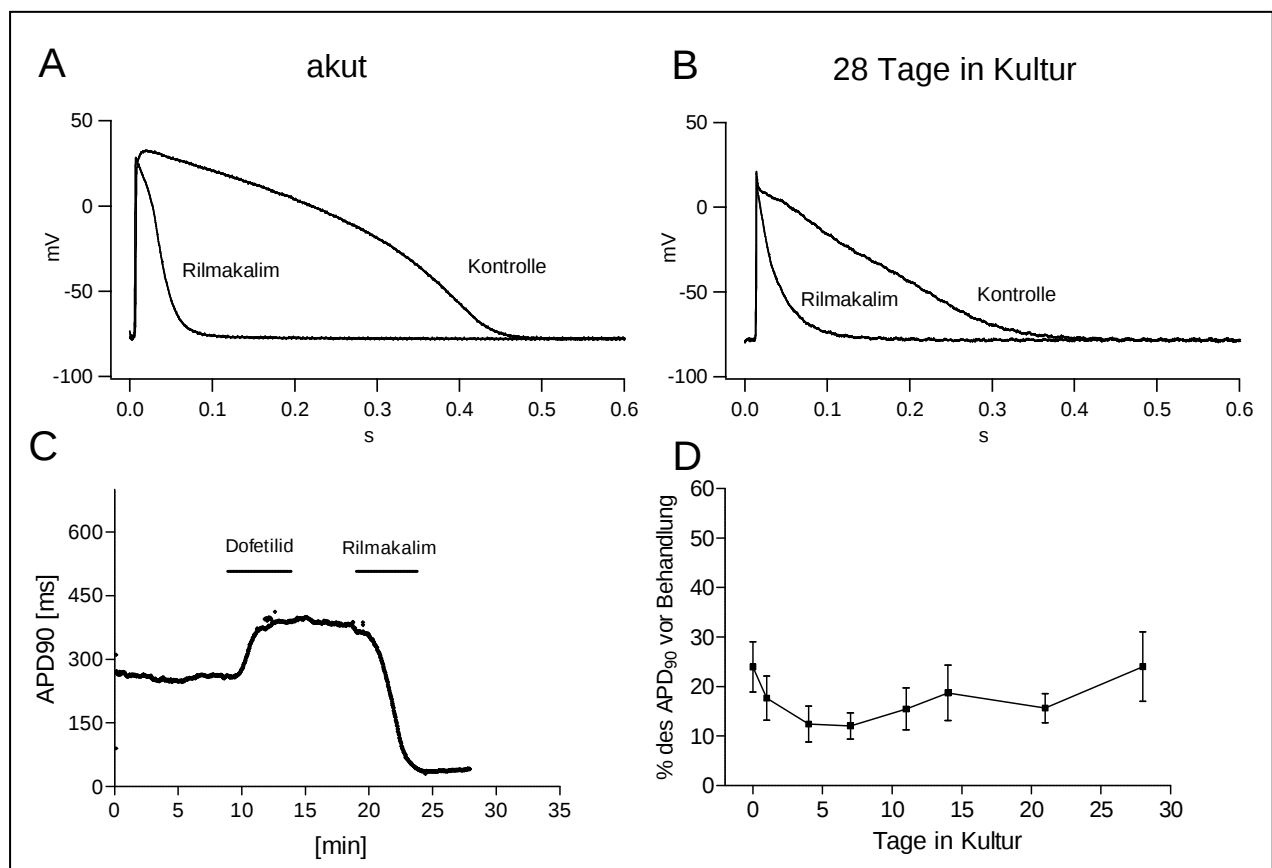


Abbildung 19: Die Wirkung von Rilmakalim im Kulturverlauf. A/B: beispielhafte Aktionspotentiale vor und nach Behandlung mit Rilmakalim. C: Verlauf des APD₉₀ während eines exemplarischen Experimentes. D: Die Rilmakalimwirkung auf das APD₉₀ im Kulturverlauf. Die Behandlung mit 1 μM Rilmakalim verursachte im gesamten Kulturverlauf eine Reduktion des APD₉₀ auf ca. 15-25 % des ursprünglichen Wertes (D). In A und B sind beispielhafte Aktionspotentiale gezeigt. In C sieht man den Verlauf des APD₉₀ eines Experimentes, in dem zunächst mit Dofetilid und danach mit Rilmakalim behandelt wurde. MW $\pm$ SEM, n=4-8 Versuche unabhängiger Präparationen.

Die Reaktion der Kardiomyozyten auf Rilmakalim blieb über den gesamten Kulturverlauf erhalten und die Aktionspotentiallänge wurde stark verkürzt (Abb. 19 A, B und D). Trotz einer leicht veränderten Aktionspotentialform wurde das APD_{90} auch nach 4 Wochen in Kultur noch um ungefähr 75 % kürzer.

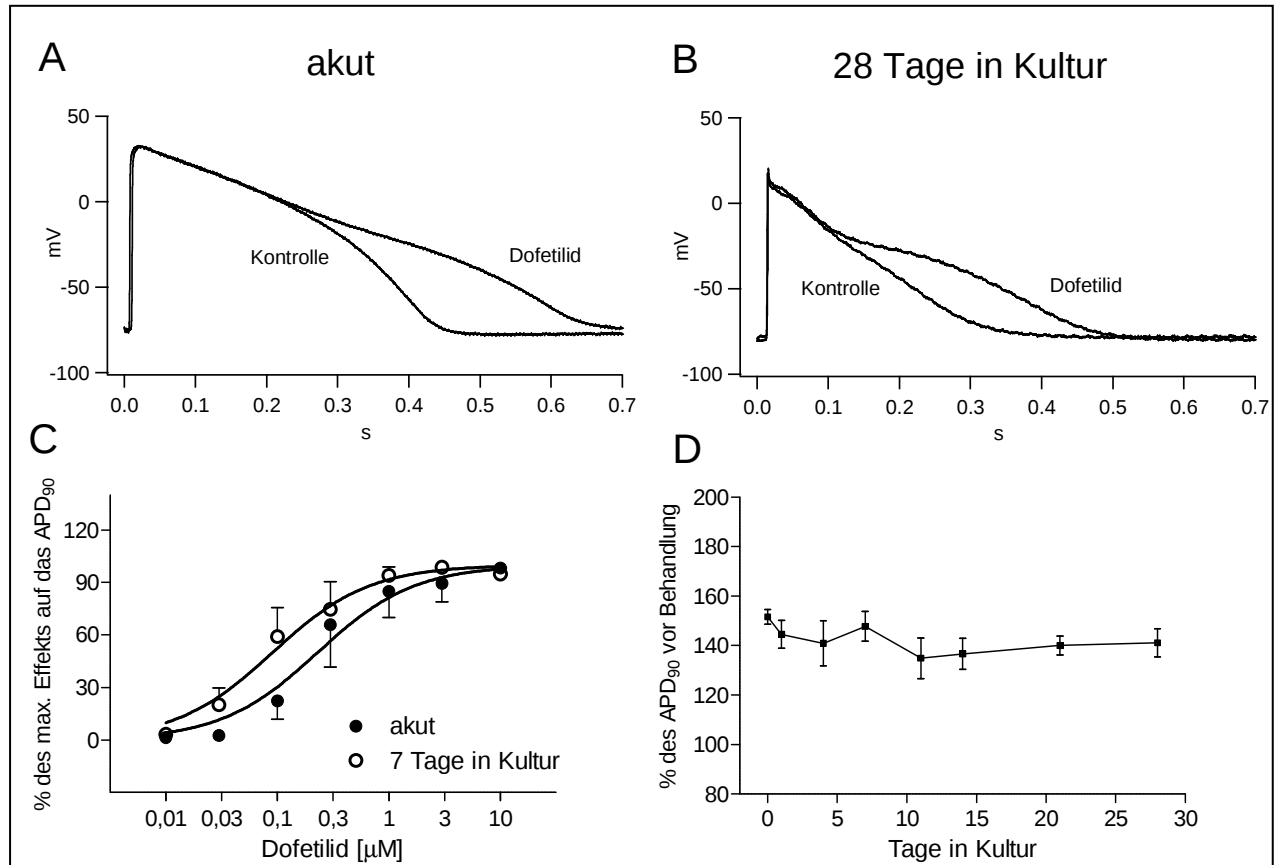


Abbildung 20: HERG-Blockade im Kulturverlauf. A/B: Beispielhafte Aktionspotentiale vor und nach einer Behandlung mit Dofetilid. C: Dosisabhängigkeit des Effektes von Dofetilid auf das APD_{90} akut und nach 7 Tagen in Kultur. D: Dofetilid-Effekt im Kulturverlauf. Der Effekt von 1 μ M Dofetilid auf das Aktionspotential der ventrikulären Herzgewebeschnitte bleibt über den gesamten Kulturverlauf gleich stark (D, $MW \pm SEM$, $n=4-8$ Versuche unabhängiger Präparationen). In A und B sind jeweils Beispiel-Experimente des Anfangs- und Endpunktes der Kultur gezeigt. In C sieht man, dass die Gewebeschnitte nach 7 Tagen in Kultur sensitiver auf eine hERG-Blockade reagieren. $MW \pm SEM$, $n=3-4$ Versuche unabhängiger Präparationen.

Nach einer Blockade des hERG-Kanals durch Dofetilid verlängerte sich das APD_{90} um ungefähr 50 % (Abb. 20 A). Dieser Effekt blieb über den gesamten Kulturverlauf gleich stark erhalten (Abb. 20 D). Die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes allerdings änderte sich nach in Kultur (Abb. 20 C, akut: $EC_{50} = 230$ nM, nach 7 Tagen in Kultur: $EC_{50} = 90$ nM). Die Kardiomyozyten der kultivierten Gewebeschnitte reagierten deutlich sensitiver auf eine hERG-Blockade als die Kardiomyozyten in akut hergestellten Gewebeschnitten.

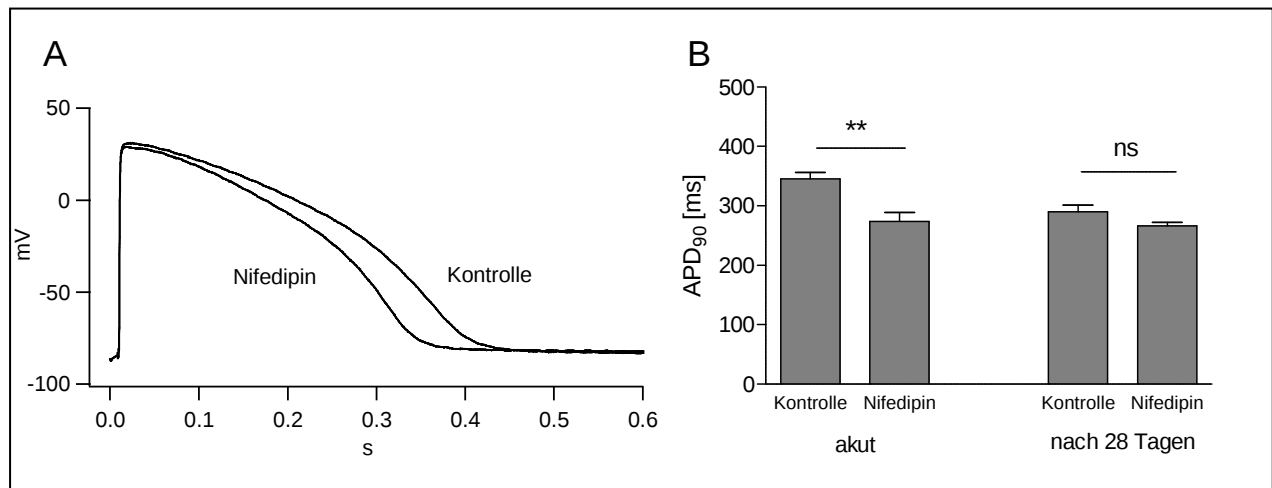


Abbildung 21: Kaliziumkanal-Blockade akut und in Kultur. A: Exemplarische Aktionspotentiale eines akuten Gewebeschnitts vor und nach Behandlung mit Nifedipin. B: Statistische Auswertung der Wirkung von Nifedipin auf das APD₉₀. Die L-Typ-Kaliziumkanäle wurden mit 10 μ M Nifedipin blockiert. In den akuten Gewebeschnitten hatte das eine signifikante Verkürzung des APD₉₀ zur Folge (A, B), in den kultivierten Gewebeschnitten war dieser Effekt nicht mehr vorhanden (B). MW $\pm$ SEM, n=5 Experimente aus unabhängigen Präparationen je Gruppe. ** heißt $p < 0,01$.

Um die Veränderung der Aktionspotentialform in Kultur näher zu charakterisieren wurde der im Ventrikel vor allem für das Plateau verantwortliche Kaliziumstrom $I_{Ca,L}$ durch 10 μ M Nifedipin inhibiert. In den akut hergestellten Gewebeschnitten erzeugte die Blockade eine signifikante Verkürzung des Aktionspotentials (Abb. 21 A und B). Nach 28 Tagen in Kultur hatte dieselbe Behandlung nur noch eine geringfügige nicht signifikante Veränderung in der Aktionspotentiallänge zur Folge (Abb. 21 B).

5.2.8 Vergleich zwischen explantiertem und Morrow-Gewebe

Die bisher gezeigten Ergebnisse wurden mit endokardialen Gewebe erzielt, das während einer Morrow-Myektomie aus dem Patienten entfernt wurde. Allerdings ist die Menge an Gewebe und die Häufigkeit der Operationen zu gering, um die entwickelten Methoden auf aufwendigere Fragestellungen anzuwenden. Um die Ausbeute an Gewebeschnitten und die Verfügbarkeit von humanem Herzgewebe zu erhöhen, wurde in Zusammenarbeit mit der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg linksventrikuläres Myokardium aus explantierten Herzen eingesetzt, um Gewebeschnitte herzustellen und zu kultivieren.

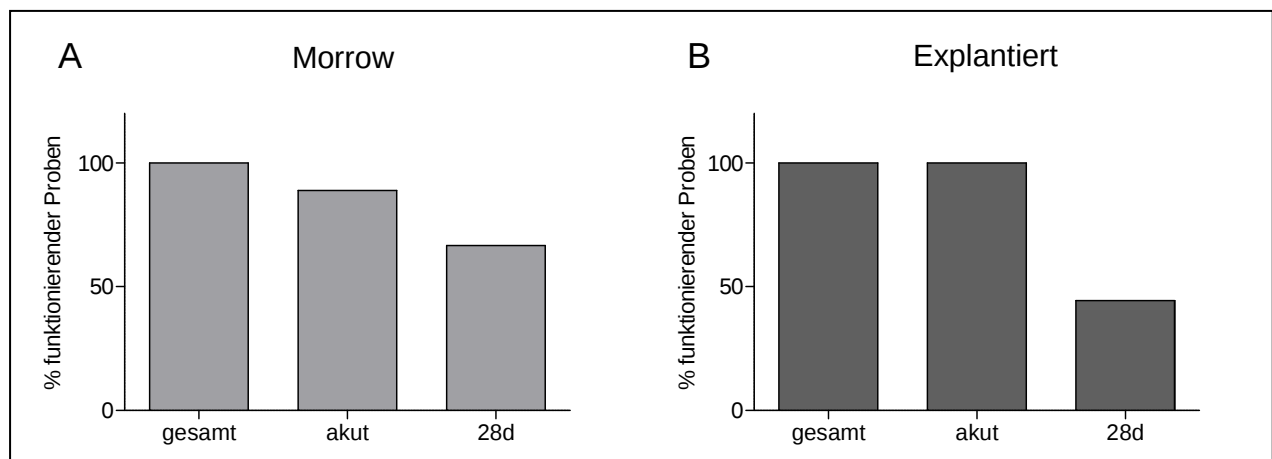


Abbildung 22: Überlebensrate von Gewebeschnitten aus Morrow- und explantiertem Gewebe. Für eine Bestimmung der Funktionalität wurde die Form der Aktionspotentiale ausgewertet. War das Ruhemembranpotential negativer als -60 mV und die maximale Aufstrichgeschwindigkeit größer als 10 V/s, dann galten die Gewebeschnitte als funktional. Sowohl bei explantiertem Gewebe als auch bei Schnitten aus Morrow-Gewebe waren in fast allen Fällen akute Messungen möglich, nach Kultivierung enthielten noch zwei Drittel der Schnitte aus Morrow-Gewebe (n=9) und fast die Hälfte der Schnitte aus explantiertem Gewebe (n=7) funktionale Kardiomyozyten.

Die akuten Gewebeschnitte aus explantiertem Herzgewebe haben in allen Fällen zur Messung von funktionellen Zellen geführt, wenn man bestimmte Qualitätskriterien für die Form der Aktionspotentiale zugrunde legt (Ruhemembranpotential < -60 mV und maximale Aufstrichgeschwindigkeit > 10 V/s, Abb. 22 B). Ungefähr die Hälfte aller kultivierten Präparate haben nach 4 Wochen noch dieselben Qualitätskriterien erfüllt, wie zu Beginn der Kultur. Der Anteil, der 28 Tage überlebt hat war für die Gewebeschnitte aus Morrow-Gewebe etwas höher (Abb. 22).

In Abbildung 23 sind die einzelnen Aktionspotentialparameter im Verlauf der Kultivierung für explantiertes Gewebe im Vergleich zum Morrow-Gewebe gezeigt. Außerdem sieht man zwei Beispiele für Aktionspotentiale nach 28 Tagen in Kultur (Abb. 23 A). Initial, direkt nach der Herstel-

lung der Gewebeschnitte, waren sich die Aktionspotentiale in ihrer Form und den einzelnen Parametern gleich. Im Kulturverlauf gab es leichte Unterschiede.

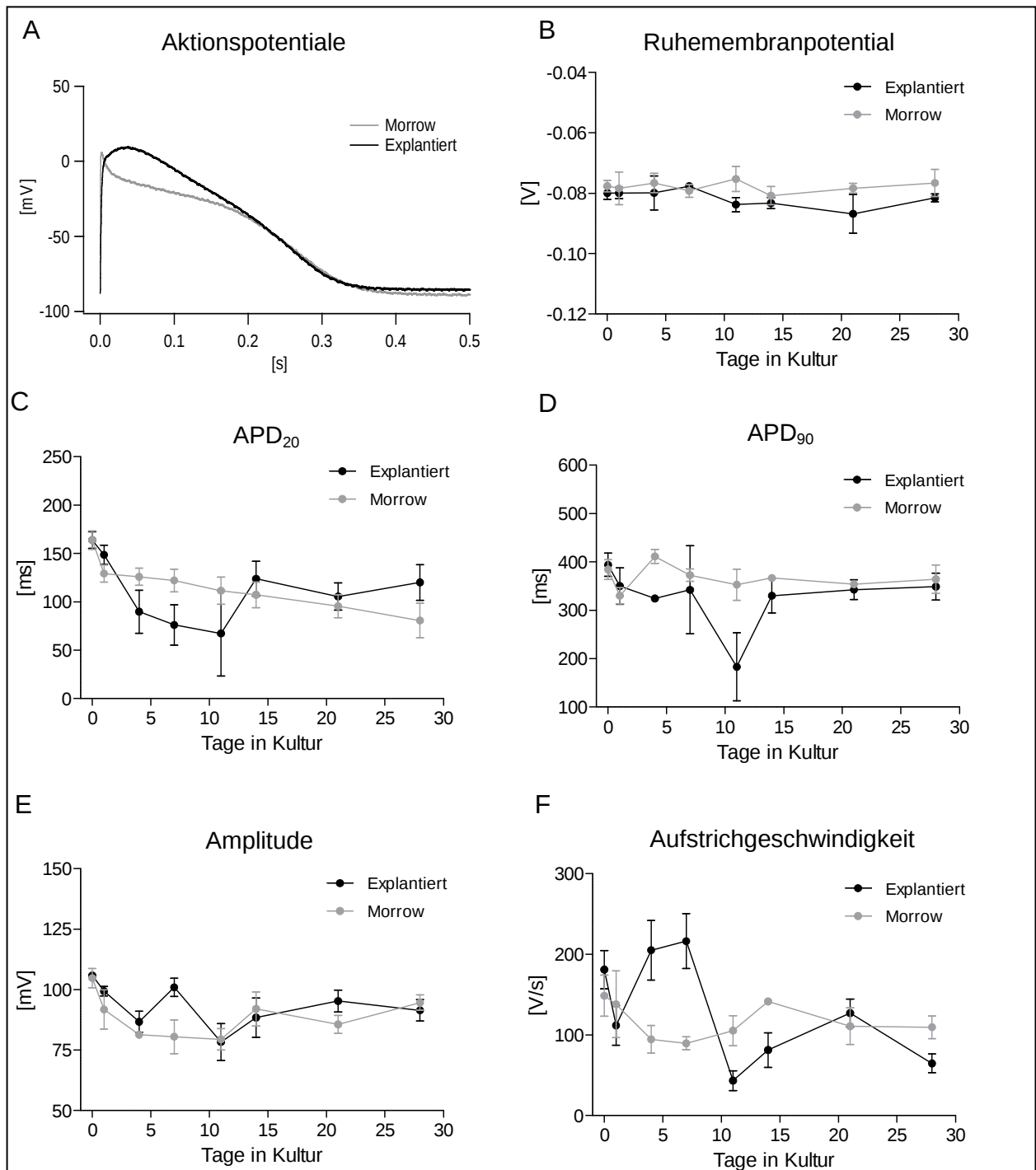


Abbildung 23: Vergleich von Aktionspotentialparametern der kultivierten Gewebeschnitte aus explantiertem Gewebe mit denen aus Morrow-Gewebe. A: Vergleich typischer Aktionspotentialverläufe von kultivierten Herzschnitten aus dem Morrow-Gewebe und von explantierten Herzen. Vergleichende Kulturverläufe von Ruhemembranpotential (B), APD₂₀ (C), APD₉₀ (D), Amplitude (E) und Aufstichgeschwindigkeit (F). Die Aktionspotentialform der kultivierten Kardiomyozyten ist weitgehend gleich, wenn man explantiertes und Morrow-Gewebe vergleicht. Einen Unterschied gibt es nur in der Plateau-Phase der Aktionspotentiale in der zweiten Phase der Kultur. Der Verlust des Plateaus und damit einhergehend die Erniedrigung des APD₂₀ ist bei den Schnitten aus explantiertem Gewebe nicht so stark wie bei den Schnitten aus Morrow-Gewebe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der Zellen aus n=5-9 unabhängigen Gewebeschnitten pro Zeitpunkt für Morrow-Gewebe und n=2-6 für explantiertes Gewebe.

Das Ruhemembranpotential, die Amplitude und das APD_{90} sind für beide Arten von Gewebe ähnlich stabil über den gesamten Kulturzeitraum hinweg (Abb. 23 B, D und E). Die maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials erscheint bei explantiertem Herzgewebe etwas heterogener im Verlauf der Kultur zu sein als bei Herzschnitten aus Morrow-Gewebe (Abb. 23 F). Ein Grund dafür könnte die geringere Anzahl an Präparationen sein, die für das explantierte Gewebe in die Statistik mit eingeflossen sind ($n=5-9$ vs. $n=2-6$). Ein weiterer Unterschied liegt in der Veränderung des APD_{20} in der Kultur (Abb. 23 C). Wie zuvor schon beschrieben, verlieren die Aktionspotentiale der Kardiomyozyten aus Morrow-Gewebe im Verlauf der Kultur kontinuierlich an Plateau, gezeigt am APD_{20} . Bei den Schnitten aus explantiertem Gewebe fiel dieser Parameter ebenfalls innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen ab, nahm allerdings ab der zweiten Woche wieder zu und war nach 4 Wochen in Kultur auf einem deutlich höheren Niveau als bei den Schnitten aus Morrow-Gewebe (Abb. 23 C). Diesen Unterschied in der Plateau-Phase sieht man verdeutlicht an den beiden dargestellten Aktionspotentialen (Abb. 23 A).

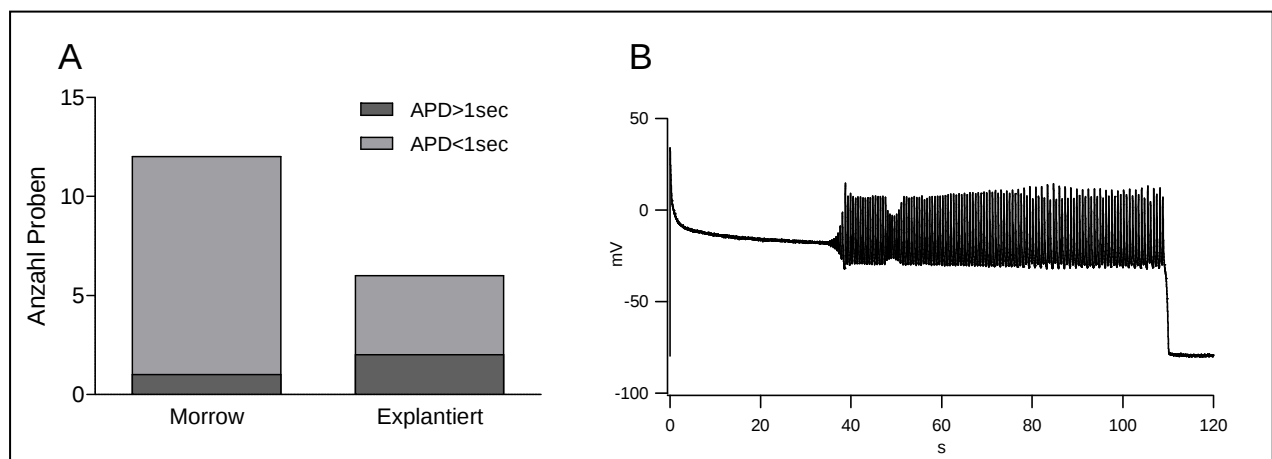


Abbildung 24: Überreaktion der Kardiomyozyten auf eine Behandlung mit Dofetilid. A: Anzahl der Proben, die auf Dofetilid mit einem extrem langen Aktionspotential reagierten. B: Aktionspotential einer Zelle, die mit flimmerhaften Nachdepolarisationen auf Dofetilid reagierte. In 2/6 Fällen kam es bei Gewebeschnitten aus explantiertem Gewebe dazu, dass sich das Aktionspotential enorm verlängerte, während es bei Schnitten aus Morrow-Gewebe nur in einem von 12 Fällen auftrat (A). In B ist ein Beispiel aus explantiertem Gewebe gezeigt. Bei dieser Zelle kam es zusätzlich zu einer Bildung von salvenartigen Nachdepolarisationen, die bis zu einer Minute andauern konnten.

Um die Eigenschaften des explantierten Gewebes mit denen des Morrow-Gewebes weiter zu vergleichen, wurden zunächst die akut hergestellten Gewebeschnitte unter Messung der Aktionspotentiale mit Dofetilid behandelt. Dabei kam es bei einem Drittel der Experimente zu einer Überreaktion der Zellen nach hERG-Blockade bei den Schnitten aus explantierten Herzen, während nur eine von zwölf Zellen aus Morrow-Gewebe diese Reaktion zeigten (Abb. 24 A). Die Aktionspotentiale verlängerten sich enorm und die Zellen waren nicht mehr mit 1 Hz stimulierbar (Abb. 24

B). In einem der Fälle kam es dabei zur Bildung von mehreren Nachdepolarisationen, die über eine Minute andauerten (Abb. 24 B).

Diese Reaktion trat nach einer Kultivierung der Schnitte nicht mehr auf, auch bei Gewebeschnitten derselben Gewebeprobe. Die Reaktion auf 1 μM Dofetilid blieb auch bei den Schnitten aus explantiertem Gewebe während des gesamten Kulturzeitraums stabil (Abb. 25), war allerdings etwas geringer in der Stärke im Vergleich zu Schnitten aus Morrow-Gewebe. Die Reaktion auf die Behandlung mit 1 μM Rilmakalim nach Kultivierung war vergleichbar zwischen Schnitten aus Morrow-Gewebe und explantiertem Gewebe.

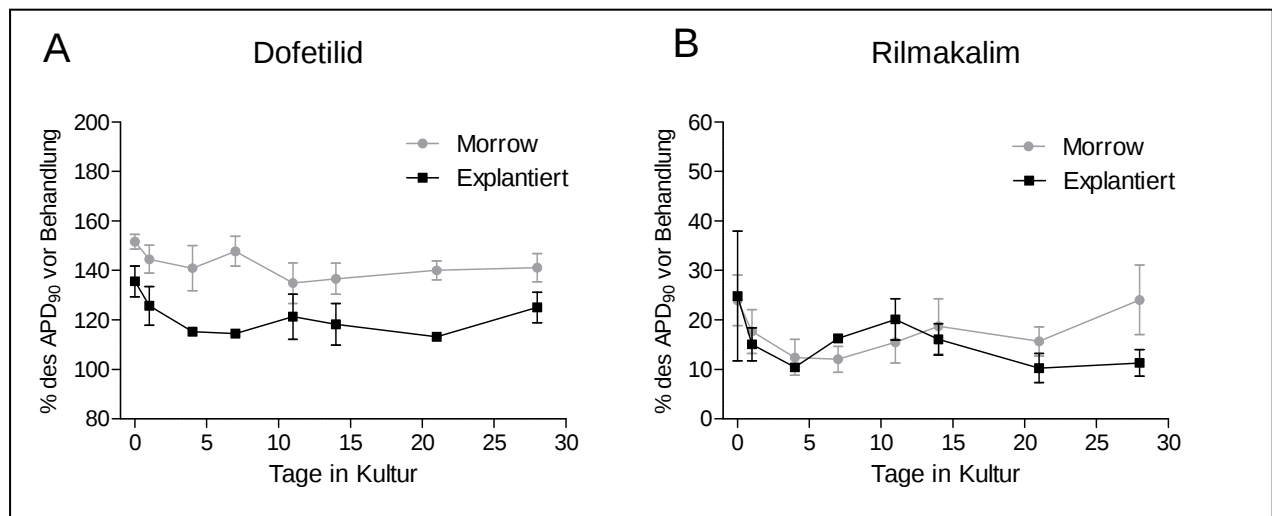


Abbildung 25: Vergleich der Reaktion auf Dofetilid und Rilmakalim im Kulturverlauf der Gewebeschnitte aus explantiertem und aus Morrow-Gewebe. Dargestellt sind die relative Veränderung des APD₉₀ nach Dofetilid-Behandlung (A) und Rilmakalim-Gabe (B) im Kulturverlauf für beide humanen Gewebequellen. Die Reaktion auf 1 μM Dofetilid war etwas schwächer bei Schnitten aus explantiertem Gewebe, blieb aber ebenso stabil in Kultur wie bei Schnitten aus Morrow-Gewebe. Die Reaktion auf 1 μM Rilmakalim verhielt sich ähnlich wie bei den Schnitten aus Morrow-Gewebe. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM der Zellen aus $n=4-8$ unabhängigen Gewebeschnitten pro Zeitpunkt für Morrow-Gewebe und $n=1-4$ für explantiertes Gewebe.

5.3 Beeinflussung des humanen Aktionspotentials durch Pentamidin

Pentamidin ist ein Antiprotozoikum, das in der Klinik bei verschiedenen parasitären Infektionen, die vor allem bei immungeschwächten Patienten auftreten, eingesetzt wird. Es kann schwere kardiale Nebenwirkungen auslösen, beschrieben ist unter anderem das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien (Owens, 2004). Klinisch findet man bei diesen Patienten eine verlängerte QT_c-Zeit und eine Erhöhung der Amplitude der U-Welle im EKG (Mani et al., 1993; Owens, 2004). Als mögliche Ursache für diese Symptome wurde eine chronische Blockade der Proteinreifung des hERG-Kanals beschrieben (Cordes et al., 2005; Kuryshv et al., 2005).

Um die Wirkung von Pentamidin auf humane Kardiomyozyten im Gewebeverband zu untersuchen, wurde die Substanz zunächst kumulativ in drei verschiedenen Konzentrationen auf die Gewebeschnitte gegeben und das Aktionspotential gemessen. In Abbildung 26 kann man erkennen, dass Pentamidin keinen Effekt auf die Form und Länge des Aktionspotentials nach akuter Behandlung hatte. Als Positiv-Kontrolle für eine hERG-Blockade diente dabei Dofetilid, das eine signifikante Verlängerung des APD₉₀ zur Folge hatte (Abb. 26 A und B).

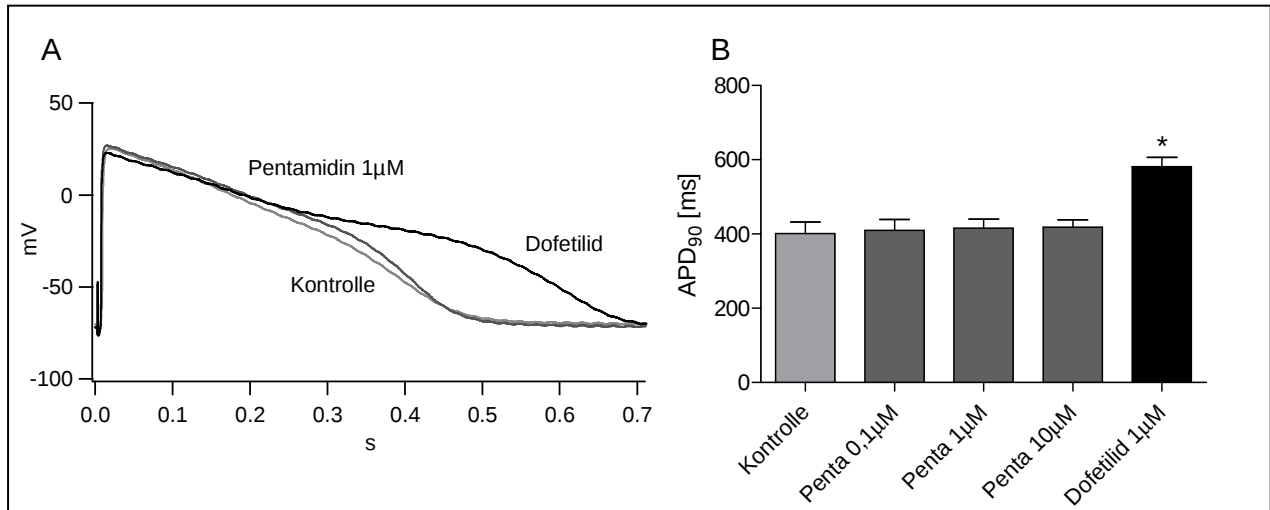


Abbildung 26: Wirkung von Pentamidin auf das humane Aktionspotential. In A sind Aktionspotentiale eines exemplarischen Experimentes mit akuter Pentamidin-Behandlung und nachfolgender Dofetilid-Gabe gezeigt. B: statistische Auswertung des APD₉₀. Die Behandlung mit drei verschiedenen Konzentrationen Pentamidin hatte keinen Effekt auf die Aktionspotentialform (A) und das APD₉₀ blieb unbeeinflusst Reaktion (B). MW±SEM, n=3 Versuche aus unabhängigen Gewebeschnitten

Wenn man die Herzgewebeschnitte über 7 Tage lang mit 1 µM (n=3) oder 10 µM (n=1) Pentamidin behandelte, dann kam es in allen Fällen zu einer deutlichen Verlängerung des Aktionspotentials und in 3 von 4 Fällen zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials in den positiven Bereich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem waren die Zellen anfälliger bei mechanischer

Stimulation, in 3 von 4 Fällen kam es nach dem Eindringen der Messpipette in die Zelle zu Spontanaktivitäten (Abb. 27 A). Die Aktionspotentiale waren in 2 von 4 Fällen so lang, dass man nur mit einer Frequenz von 0,1 Hz stimulieren konnte und dann zusätzlich frühe und späte Nachdepolarisationen auslöste (Abb. 27 B).

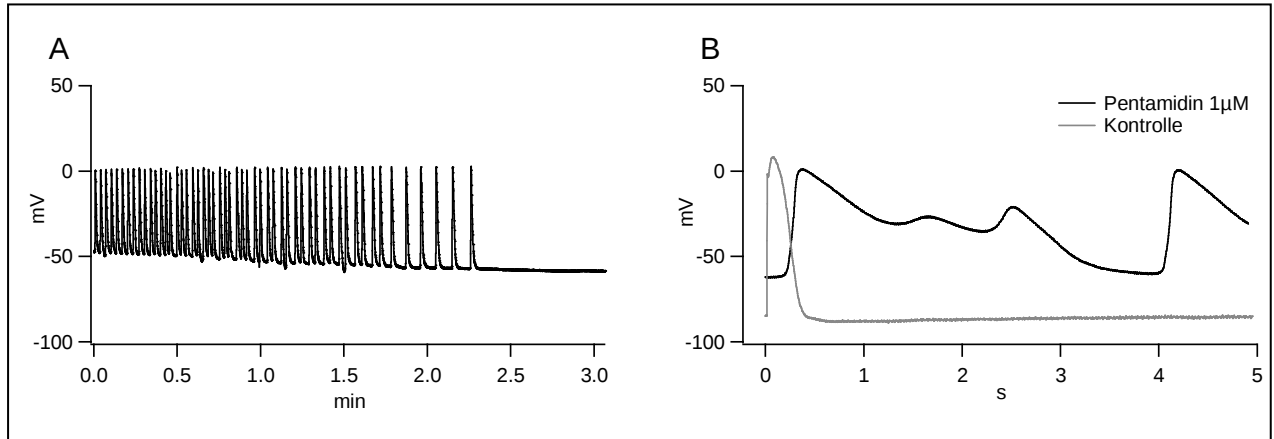


Abbildung 27: Wirkung von Pentamidin auf das humane Aktionspotential nach 7 Tagen in Kultur. A: Aufzeichnung spontan aufgetretener Aktionspotentiale eines mit Pentamidin behandelten Schnittes. B: Exemplarische Aktionspotentiale nach elektrischer Stimulation. Die Behandlung mit 1 µM (n=3), bzw. 10 µM (n=1) Pentamidin hatte eine Verlängerung der Aktionspotentiallänge (B), das Auftreten von Spontanaktivität (A) und einen Anstieg des Ruhemembranpotentials (B) im Vergleich zu 7 Tage kultivierten Kontrollschnitten zur Folge. In 2 von 4 Fällen traten frühe und späte Nachdepolarisationen auf (B).

Um eine Wirkung von Pentamidin auf die Expression relevanter Ionenkanäle zu untersuchen, wurden die mRNA-Mengen von $K_{ir}2.1$ und hERG nach Behandlung mit Pentamidin untersucht. Sowohl 1 µM (n=3) als auch 10 µM (n=2) hatten keine Wirkung auf die Expression von $K_{ir}2.1$ (Abb. 28 A). Die hERG-Expression scheint nach einer Behandlung mit 10 µM etwas zu steigen, allerdings reichen die Versuchszahlen noch nicht aus, um eine statistisch gesicherte Aussage treffen zu können (Abb. 28 B).

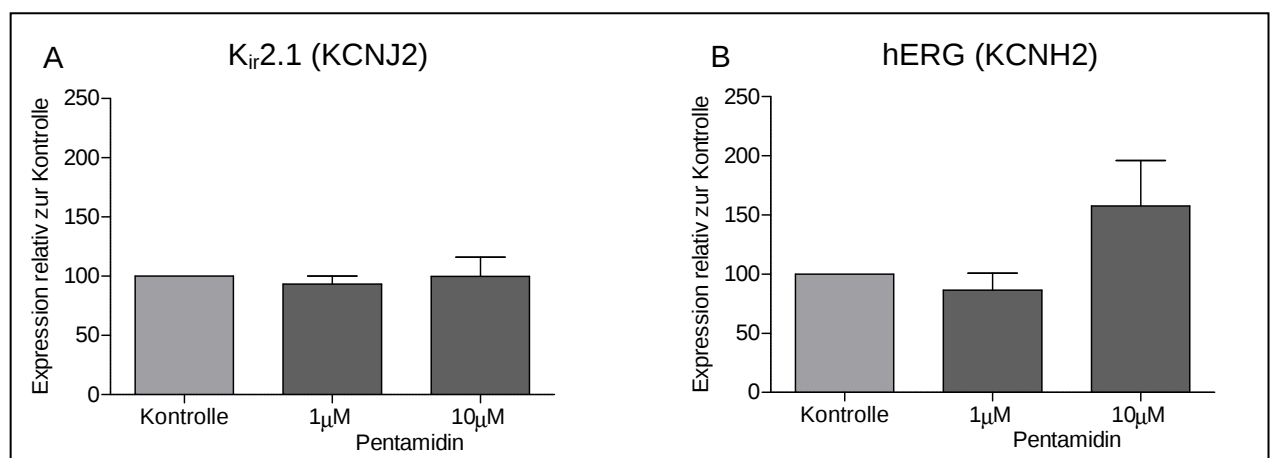


Abbildung 28: Wirkung von Pentamidin auf die Expression von Ionenkanälen nach 7 Tagen in Kultur. Dargestellt sind die relativen Expressionen der KCNJ2-mRNA (A) und der KCNH2-mRNA (B) nach Behandlung mit Pentamidin in Kultur im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit 1 µM (n=3), bzw. 10 µM (n=2) Pentamidin hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von $K_{ir}2.1$ (A). Nach 10 µM Pentamidin scheint es eine Steigerung der hERG-Expression zu geben.

6 Diskussion

Herz-Kreislaufkrankungen sind die weltweit häufigste tödlich verlaufende Erkrankung, der Herzinfarkt aufgrund ischämischer Attacken und Arrhythmien zumeist die letztendliche Todesursache (WHO, 2008). Neue Substanzen werden entwickelt, um diese Erkrankungen zu therapieren, und bevor diese am Menschen erprobt werden können, muss eine möglichst gute Vorhersage über die Effekte auf den menschlichen Organismus gemacht werden können.

Um relevante Aussagen über die Wirkung einer Substanz auf das menschliche Herz zu treffen, werden neue Modelle benötigt, die die Vorteile der bisher vorhandenen Systeme in sich vereinen. Kardiomyozyten exprimieren je nach Differenzierungsgrad und abhängig von der Spezies verschiedene Ionenkanal-Untereinheiten, deshalb spiegeln nur wenige Modelle die Zellaktivität im Menschen wider (Kääh et al., 2003; Barandi et al., 2010; Glukhov et al., 2010). Akut isolierte Herzzellen aus dem Menschen haben zwar die richtige Ionenkanalausstattung, die Interaktion mit benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix geht allerdings verloren (Thum et al., 2000; Kohl et al., 2005). Außerdem werden diese Zellen mit spaltenden Enzymen behandelt, eine Prozedur die auch zur Schädigung der Membraneigenschaften führen kann (Cerbai et al., 2000). Ein dritter Nachteil aktueller Modellsysteme ist die fehlende Möglichkeit, die Wirkung von Medikamenten über einen chronischen Zeitraum zu betrachten. Ein relevantes *in vitro* Modellsystem sollte dementsprechend eine dem adulten humanen Myokard ähnliche Ionenkanalausstattung haben, in einem multizellulären Verband eingebettet sein und zusätzlich Langzeituntersuchungen ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass funktionelle Gewebeschnitte aus dem adulten humanen Endokard hergestellt wurden, deren elektrophysiologische Aktivität über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen weitgehend erhalten werden konnte. Diese organotypischen Herzschnitte stellen ein ideales Modellsystem dar, um chronische Effekte von Medikamenten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des humanen Myokards zu untersuchen.

6.1 Akute Gewebeschnitte

Die Herstellung der Gewebeschnitte

Die Herstellung von dünnen Schnittpräparaten ist für verschiedene Gewebe schon einige Jahrzehnte etabliert und wird hauptsächlich für Toxizitätsstudien an der Leber und pathophysiologischen und pharmakologischen Untersuchungen am zentralen Nervensystem verwendet (Parrish et al., 1995; Gähwiler et al., 2001; Vickers et al., 2004; Hajos et al., 2009). Akute Gewebeschnitte aus dem Herzen wurden für kleine Säuger erst in den letzten Jahren endgültig etabliert, nachdem es bereits Anfang der 90er einen Versuch gab, Ventrikelschnitte aus der Ratte elektrophysiologisch zu beschreiben (Burnashev et al., 1990; Pillekamp et al., 2005; Halbach et al., 2006; Bussek et al., 2009). Humane Gewebeschnitte wurden bisher zwar hergestellt, aber elektrophysiologisch nur partiell beschrieben (Götte et al., 2008; Bussek et al., 2009; Habeler et al., 2009a).

Bei der Präparation von akut isoliertem Herzgewebe muss man spezielle Eigenschaften der Kardiomyozyten berücksichtigen. Durch das Zerstören der Zellen während der mechanischen Isolation kommt es zu einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration und zu einer Kontraktion der angrenzenden Zellen. Ein Großteil der Zellen wird dadurch irreversibel geschädigt, so dass die Aktivität des Gewebes stark eingeschränkt ist. Um diese Nachwirkungen zu vermeiden wurden spezielle Schutzmaßnahmen angewendet. Zunächst wurde die Präparation in kalter Lösung durchgeführt, sodass eventuelle Schädigungsreaktionen verlangsamt wurden. Dann wurde dem Schneidepuffer 2,3-Butandion Monoxim (BDM) zugesetzt, eine Substanz die verhindert, dass sich die Kardiomyozyten zusammenziehen und ihren kontraktilem Apparat irreversibel schädigen, indem unter anderem die ATPase-Aktivität des Myosins inhibiert wird (Mulieri et al., 1989; Sellin et al., 1994; Zhou et al., 2000; Pillekamp et al., 2005). Diese Schutzmaßnahmen wurden bereits erfolgreich für die Herstellung akuter Gewebeschnitte aus dem neonatalen und adultem Mäuseventrikel verwendet (Pillekamp et al., 2005 und 2007; Halbach et al., 2007). Außerdem wird BDM für optische Untersuchungen an elektrophysiologisch aktiven Gewebemodellen benutzt (Caldwell et al., 2005; Kong et al., 2007).

Um das Überladen der Zellen mit Kalzium zu vermeiden, wurde die Kalziumkonzentration auf 0,9 mM reduziert. Für die Isolation von Einzelzellen gibt es Protokolle, in denen das Kalzium komplett entzogen wird, und auch Pillekamp und Kollegen stellten auf diese Weise Herzschnitte her (Piper et al., 1992; Pillekamp et al., 2005). Allerdings hatte eine kalziumfreie Präparation in

unseren Experimenten eine schlechtere Funktionalität der Gewebeschnitte zur Folge (Abb. 5). Letztendlich wurde das Gewebe für das Schneiden in Agarose eingebettet, um ein Zerreißen während des Schneidens zu vermeiden. Zusammen mit den anderen protektiven Maßnahmen führte diese Art der Präparation dazu, dass nur 1-2 Zellschichten im jeweiligen Randbereich geschädigt wurden und das Zentrum des Gewebeschnitts vital blieb.

Speziesunterschiede

Herzzellen unterschiedlicher Herkunft haben unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Angepasst sind sie auf die Größe des Organismus, sein Geschlecht und sein Alter, die Frequenz des Herzschlags und die generelle metabolische Aktivität, sowie die Lokalisation innerhalb des Herzens (Antzelevitch et al., 2001; Lu et al. 2005; Nerbonne et al., 2005; Waldeyer et al., 2009).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass man aus den Herzen verschiedener Spezies funktionell aktive Gewebeschnitte herstellen kann (Abb. 7). Anhand der aufgenommenen Aktionspotentiale kann man die Unterschiede zwischen den Spezies in der ventrikulären Aktivität erkennen. Kleine Nagetiere wie Ratte und Maus haben deutlich kürzere Aktionspotentiale und eine Form, die stark von einer schnellen Repolarisation geprägt ist. Humane und auch Ventrikelzellen großer Säugetiere haben eine ausgeprägte Plateau-Phase, die zu einem langen Aktionspotential und einer zunächst langsamen Repolarisation führt. In Amplitude, Aufstrichgeschwindigkeit und Ruhemembranpotential scheint es keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Spezies zu geben. Der Grund für die verschiedenen Aktionspotentialformen ist in der unterschiedlichen Aktivität und Expression von Ionenkanälen zu finden. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass sowohl Kalziumkanäle als auch Kaliumkanäle speziesabhängig aktiv sind (Varro et al., 1993; Wang et al., 1996; Tanaka et al., 2009). In der Maus und auch in der Ratte ist der I_{to} -Strom stark ausgeprägt, der für die schnelle erste Repolarisationsphase verantwortlich ist, im humanen Endokard scheint dieser Strom nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Rosati et al., 2001; Patel et al., 2005). Die Unterschiede in der Plateau-Phase sind zusätzlich durch die zugrundeliegenden Kalzium-Ströme zu erklären. Sowohl die L-Typ Kalzium-Kanäle als auch der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) scheinen speziesspezifische Unterschiede in der Aktivität zu haben (Tanaka et al., 2009). Der I_{Kr} -Strom scheint in der adulten Maus keine Rolle zu spielen, ist aber im Menschen ein wichtiger Faktor der ventrikulären Repolarisation (Wang et al., 1996; Redfern et al., 2003).

Da die angesprochenen Ionenströme teilweise frequenzabhängig aktiv sind, konnte man auch in diesem Zusammenhang Differenzen in den Gewebeschnitten erkennen (Abb. 8). Das humane Ak-

tionspotential verkürzt sich, wenn man schneller stimuliert, zeigt aber sonst keine Unterschiede in der Aktionspotentialform. Bei der Maus konnte man zusätzlich zu einer Verkürzung bei hohen Frequenzen eine Verlängerung in der ersten Repolarisationsphase erkennen. Dies könnte an einem veränderten I_{to} -Strom bei kürzeren Abständen liegen, wie Patel und Kollegen mutmaßten (Patel et al., 2005).

Ein weiterer Unterschied zwischen den Spezies wurde kürzlich in einer Studie dargestellt, in der der Zeitverlauf eines Myokardinfarkts in verschiedenen Spezies untersucht wurde (Hedström et al., 2009). Darin konnte gezeigt werden, dass der Zeitverlauf einer Infarkt-Progression im Menschen signifikant langsamer ist als im Schwein, in der Ratte und im Hund. Diese Ergebnisse zeigen zusätzlich zu den elektrophysiologischen Unterschieden, dass man bei der Betrachtung von molekularen und zellulären Mechanismen die Ungleichheiten zwischen den Spezies unbedingt berücksichtigen muss.

Diese Unterschiede in den Ionankanalfunktionen zeigen, dass für klinisch relevante pharmakologische Untersuchungen Präparate benötigt werden, die das menschliche Myokard in seinen wesentlichen Eigenschaften widerspiegeln.

Geschlechtsunterschiede

Neben den Speziesunterschieden konnten Geschlechtsunterschiede für die Aktionspotentiale in den Kardiomyozyten des Morrow-Gewebes festgestellt werden (Abb. 13). Die Aktionspotentiale der weiblichen Patienten waren signifikant länger als die der männlichen. Dies könnte durch geschlechtsspezifische Expressionsmuster der Ionenkanäle und –Austauscher erklärt werden, die kürzlich in den Ventrikelwänden von nicht pathologischen Spenderherzen beschrieben wurden (Gaborit et al., 2010). So waren sowohl der hERG-Kanal als auch der für den langsamen Anteil am I_{to} -Strom verantwortliche $K_v1.4$ und der an dem repolarisierenden I_{Ks} -Strom beteiligten minK-Kanal in weiblichem endokardialem linkem Ventrikel weniger stark exprimiert als in männlichem Gewebe. In Kardiomyozyten aus dem Meerschwein und dem Kaninchen konnten sowohl geringere I_{K1} - als auch geringere I_{Kr} -Ströme für weibliche Zellen nachgewiesen werden (Liu et al., 1998; James et al., 2004 und 2007).

Diese Unterschiede kommen möglicherweise durch unterschiedliche Effekte der Geschlechtshormone auf die Kardiomyozyten zustande. Präpubertär findet man keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Kardiomyozyten, nach der Geschlechtsreife kann man eine Verkürzung der QT_c -Zeit in Männern beobachten (Rautaharju et al., 1992). Über die Regulation der Transkription konnten Effekte von Testosteron auf den L-Typ und den T-Typ Kalziumkanal, so-

wie auf die Kaliumkanäle $K_{v4.3}$ und $K_{ir2.1}$ beschrieben werden (Michels et al., 2006; Fülöp et al., 2006; Er et al., 2007). Akute Effekte auf verschiedene Kalzium- und Kaliumkanäle konnten sowohl für Testosteron als auch für Östrogen in Kardiomyozyten der Ratte und des Meerschweinchens gezeigt werden (Tanabe et al., 1999; Nakajima et al., 1999; Bai et al., 2005; Kurokawa et al., 2008). Diese Unterschiede in der Ionenkanal-Aktivität und -Expression zwischen Männern und Frauen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit von Frauen für eine sogenannte *Torsade de Pointes*-Arrhythmie und ein verstärktes Ansprechen auf I_{Kr} -blockierende Substanzen (Makkar et al., 1993; Ebert et al., 1998; Priori et al., 2003). In unserem Modell konnte zwar die Verlängerung der Aktionspotentialdauer, aber keine unterschiedlicher Reaktion auf hERG-Inhibition gezeigt werden. Das liegt möglicherweise an der Lokalisation des untersuchten Gewebes, da Endokard anders auf QT_c -Zeit-verlängernde Substanzen reagiert als die Mittelschicht des linken Ventrikels und das Epikard (Wu et al., 2005; Antzelevitch, 2007), außerdem sind die Geschlechtsunterschiede in der Ionenkanalexpression in humanem Ventrikel auch abhängig davon, welchen Myokard-Bereich man untersucht (Gaborit et al., 2010). Allerdings war die Zahl der Experimente an den Gewebeschnitten zu gering, um eine definitive Aussage zu treffen.

Pharmakologische Untersuchungen

Neben den physiologischen Einflüssen auf das Herzgewebe war es Ziel dieser Arbeit, die Eignung der Gewebeschnitte für potentielle Medikamentenstudien zu untersuchen. Zunächst wurden Antiarrhythmika verschiedener Klassen getestet. Das Klasse-IB-Antiarrhythmikum Lidocain führte zu einer Verlangsamung der Erregungsleitung zwischen Stimulations- und Ableitungs-Elektrode sowie zu einer Erniedrigung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials (Abb. 12). Beide Effekte kann man durch eine Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen erklären, da die Natriumkanäle im Herzen im Wesentlichen für die Reizentstehung und die schnelle Depolarisation in der Anfangsphase des Aktionspotentials zuständig sind (Abriel et al., 2010).

Die antiarrhythmische Wirkung von Klasse-III-Antiarrhythmika beruht darauf, dass Kaliumkanäle inhibiert werden, die in der Repolarisationsphase aktiv sind. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und einer damit verbundenen Erhöhung der Refraktärzeit. In den vorgestellten Experimenten wurde Dofetilid verwendet, das bei Vorhofflimmern in den USA als Medikament zugelassen ist und über eine Blockade des hERG-Kanals wirkt (Burashnikov et al., 2010). Dofetilid führte bei unseren Messungen konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Verlängerung des Aktionspotentials in den Ventrikelschnitten (Abb. 9). Diese Reaktion wurde durch

eine Erniedrigung der Stimulationsfrequenz noch potenziert, ein Effekt der als „reverse use-dependence“ beschrieben wird (Hondeghe et al., 1990; Jurkiewicz et al., 1993; So et al., 2006) und möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass eine langsame Aktivierung und Deaktivierung des I_{Ks} -Stroms die Wirkung einer hERG-Blockade frequenzabhängig beeinflusst (So et al., 2006; Tsujimae et al., 2007). Bei einer Stimulationsfrequenz von 0,1 Hz entstanden in den Gewebeschnitten zum Teil frühe Nachdepolarisationen („early afterdepolarisations“, EADs). Diese können im Herzen zu tödlich verlaufenden ventrikulären Tachykardien führen und sind der Grund für das proarrhythmische Potential der Klasse-III-Arrhythmika. Für Dofetilid wurden in verschiedenen *in vitro*-Modellen das Auftreten von EADs und *Torsade de Pointes*-Arrhythmien beschrieben (Barrett et al., 2001; Farkas et al., 2010; Wu et al., 2005). Eine erhöhte Inzidenz an dem darauf folgenden Kammerflimmern während einer Behandlung mit Dofetilid wurde auch an Patienten festgestellt (Torp-Pedersen et al., 1999; Køber et al., 2000). Aufgrund dieser Nebenwirkungen ist Dofetilid in den meisten Ländern nicht als Antiarrhythmikum zugelassen und darf in den USA nur unter ständiger EKG-Überwachung gegeben werden (Friedman et al., 2006).

Eine weitere Klasse der Antiarrhythmika sind die Kalzium-Antagonisten (Klasse II nach Vaughan-Williams, 1992). In den beschriebenen Versuchen wurde Nifedipin als Blocker der L-Typ-Kalziumkanäle eingesetzt (Triggle, 2006). Nifedipin führt über einen reduzierten Einstrom von Kalziumionen aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol zu einer verkürzten Plateauphase des Aktionspotentials und dadurch einer Verkürzung des Aktionspotentials, was sich auch in unseren Experimenten zeigte (Abb. 21). Nifedipin wird hauptsächlich als Antihypertensivum eingesetzt, da es durch einen verminderten Kalziumspiegel in den Endothelzellen zu einer gefäßerweiternden Wirkung führt (Karow et al., 2007).

Eine Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren in den Ventrikelzellen des Menschen führte zu einer Erhöhung der Plateauphase, aber nicht zu einer Veränderung der Aktionspotentialdauer in akuten Gewebeschnitten (Abb. 11). Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass eine Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren über G-Proteine zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle und über die darauffolgende Aktivierung der Proteinkinase A zu einer Phosphorylierung des L-Typ Kalziumkanals führt, wodurch die Amplitude des Kalzium-Stroms steigt (Redpath et al., 2006; Workman, 2010). Eine Gegenregulation im Hinblick auf die Aktionspotentialdauer entsteht durch eine Erhöhung sowohl des I_{Ks} - als auch des I_{Kr} -Stroms, wodurch sich die Aktionspotentialdauer effektiv nicht ändert (Heath et al., 2000; Volders et al., 2003). Eine α -adrenerge Stimulation dagegen führte in den Gewebeschnitten zu keiner Veränderung in der Form des Aktionspotentials. Burashnikov und Kollegen untersuchten Effekte von Phenylephrin, einem α -adrenergen Agonisten, auf verschiedene Zelltypen des linken Hundeventrikels und stellten fest, dass die Wirkung

stark von der Lokalisation der Zellen abhängig ist und Phenylephrin auf epi- und endokardiale nur kleine Effekte hatte (Burashnikov et al., 1999). Da die Gewebeschnitte aus dem humanen Endokard stammen, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus im Herzen betrifft die Reaktion der Kardiomyozyten auf Energiemangel. Sind nicht genügend Nährstoffe in der Zelle vorhanden, oder liegt zu wenig Sauerstoff vor, dann sinkt der ATP-Spiegel im Zellinneren rapide ab und ATP-abhängige Kaliumkanäle werden geöffnet (Noma, 1983; Gögelein et al. 1999; Flagg et al., 2010). Diese Ionenkanäle sind bei hohen ATP-Konzentrationen geschlossen und bestehen aus 4 porenbildenden und 4 regulatorischen Untereinheiten (Mannhold, 2004). In den ventrikulären Kardiomyozyten sind das hauptsächlich $K_{ir}6.2$ - und SUR2A-Proteine, wobei auch $K_{ir}6.1$ -Ströme und SUR1- sowie SUR2B-mRNA im Ventrikel nachgewiesen wurden (Inagaki et al., 1995 und 1996; Yokoshiki et al., 1999). Die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle hat eine Verkürzung des Aktionspotentials zur Folge, woraufhin die Kontraktilität der Zellen nachlässt, weil verhindert wird, dass sich die Zellen mit Kalzium beladen (Zingman et al., 2007). Auf diese Weise wird einem kompletten Verlust der kardialen Funktionalität auch unter energiearmen Bedingungen vorgebeugt und ein Gleichgewicht zwischen Energie-Angebot und -Bedarf aufrecht erhalten. Außerdem scheinen diese Kanäle entscheidend an dem Phänomen der ischämischen und pharmakologischen Präkonditionierung beteiligt zu sein (Suzuki et al., 2002; Gumina et al., 2003).

Um diese Mechanismen an den humanen Gewebeschnitten zu simulieren, wurden die Zellen mit Rilmakalim behandelt, einer Substanz die zu einer Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in den Kardiomyozyten führt (Linz, 1992; Riccioppo Neto, 1997; Mannhold, 2004). Dadurch wurden, in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen, die Aktionspotentiale deutlich verkürzt (Abb. 10). Eine zusätzliche Gabe von HMR1098 führte zu einer partiellen Umkehrung des Effektes und die Aktionspotentialdauer stieg wieder an. HMR1098 ist ein Sulfonylharnstoff, der spezifisch sarkolemme K_{ATP} -Kanäle inhibiert und deshalb nur auf die kardialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle und weniger potent auf die pankreatischen oder die der glatten Muskelzellen wirkt (Gögelein et al. 1998). Die partielle Aufhebung der Verkürzung des Aktionspotentials ausgelöst durch Rilmakalim passt zu vorangegangenen Studien, die ähnliche Effekte in Papillarmuskeln des Meerschweinchens und in isolierten humanen Kardiomyozyten zeigen konnten (Gögelein et al., 1998; Käab et al., 2003). Die nicht komplette Inhibierung der K_{ATP} -Kanäle durch Sulfonylharnstoffe, bzw. HMR1098 könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Substanzen partiell ihre Potenz gegenüber Kanälen verlieren, die durch metabolische Inhibierung aktiviert wurden (Krause et al., 1995; Findlay, 1993).

Durch unsere Experimente konnte zum ersten Mal eine Wirkung von HMR1098 auf die ATP-abhängigen Kaliumkanäle im multizellulären ventrikulären Präparat des Menschen gezeigt werden. Eine Blockade der kardialen K_{ATP} -Kanäle mit HMR1098 könnte die starke Inhomogenität der Refraktärzeiten zwischen ischämischen und nicht-ischämischen Gewebe herabsetzen, die allgemein als ein Substrat für ventrikuläre Arrhythmien im Falle eines Herzinfarkts angesehen wird (Luqman et al., 2007). Durch die Spezifität von HMR1098 könnte eine Nebenwirkung auf die K_{ATP} -Kanäle anderer Gewebe verhindert werden.

Vergleich mit anderen Modellen

Es gibt bereits multizelluläre Modelle aus humanem Ventrikel, diese sind aber aufwendig in der Präparation (Glukhov et al., 2010) oder man kann nur ein einziges Experiment aus einem Präparat durchführen (Mulieri et al., 1989; Barandi et al., 2010). Aus einem Morrow-Gewebestück kann man bis zu 20 Schnitte anfertigen und dadurch die Ausbeute an potentiell möglichen Experimenten deutlich erhöhen. Außerdem ist die Versorgung des 300 μm dicken Gewebes im Organbad stabiler und einfacher in der Handhabung als bei einer ventrikulären „Wedge“-Präparation, bzw. isoliertem Papillarmuskel (Glukhov et al., 2010; Barandi et al., 2010). Eine Modellierung der Sauerstoffdiffusion für aktive Muskelpräparate zeigte, dass der Radius der Papillarmuskeln der Ratte und der Maus, abhängig von der Kontraktionsfrequenz, in vielen Studien dicker ist, als die Sauerstoffdiffusionsstrecke (Barclay, 2005). Bei einer Frequenz von 4 Hz und 35 °C im Organbad liegt die maximale Diffusionsstrecke für Sauerstoff bei unter 400 μm . Für humane Präparate wurden diese Berechnungen nicht durchgeführt, allerdings kann man von einem ähnlichen Zusammenhang ausgehen. Der Durchmesser der Gewebeschnitte sollte dementsprechend dünn genug sein, um die Kardiomyozyten mit Sauerstoff zu versorgen, bei dickeren Papillarmuskelpräparationen, die diese Grenze deutlich überschreiten können, könnte die Sauerstoffversorgung allerdings problematisch werden (Mulieri et al., 1989; Barclay, 2005).

Zusammenfassend sind die akut hergestellten, ventrikulären humanen Myokardschnitte ein ideales Modell, um die Wirkungen von Antiarrhythmika und die kardialen Nebenwirkungen von neuen Substanzen am relevanten Gewebe zu untersuchen. In der Medikamentenentwicklung würden sie sich für die Sicherheitspharmakologie eignen, die eine Wirkung aller neu eingebrachten Wirkstoffe auf den hERG-Kanal und die Aktionspotentialdauer vorschreibt (ICH S7B, 2005). Als zweites bieten sich die Gewebeschnitte als Alternative zu bisherigen Modellen in der Überprüfung neuer Wirkprinzipien und zur Untersuchung pathophysiologischer Einflüsse am humanen Myokard an.

6.2 Kultivierte Gewebeschnitte

Vorhandene Langzeitmodelle

Um in präklinischen Modellen Langzeiteffekte von pathophysiologischen Einflüssen oder Medikamenten auf die Funktionalität des Herzens zu untersuchen, verwendet man bisher entweder Tiermodelle oder Zellkulturen. Beides sind im Vergleich zum Patienten nur artifizielle Systeme, die für die Übertragbarkeit auf den Menschen diverse Nachteile haben (Horrobin, 2003). In den letzten Jahren gibt es einige Ansätze, pharmakologische Testsysteme zu entwickeln, die über längere Zeit funktionell aktiv sind. Die Kultivierung von isolierten humanen Kardiomyozyten führte trotz optimierter Bedingungen zu einer Dedifferenzierung der Zellen und einem Verlust von herzspezifischen Eigenschaften (Banyasz et al., 2008). Habeler und andere haben gezeigt, dass man fötale humane Ventrikelschnitte und neonatale Herzschnitte aus der Ratte über 60 Tage in Kultur halten kann, wobei diese kontinuierlich spontanaktiv kontrahierten (Habeler et al., 2009a). Neben einer Anwendung in der Untersuchung von Stammzelltransplantationen sehen sie auch einen möglichen Nutzen in der Medikamentenentwicklung und elektrophysiologischen Beschreibung von Substanzwirkungen, haben ihre Präparate elektrophysiologisch bisher jedoch nicht näher charakterisiert (Habeler et al., 2009a und 2009b). Ein weiterer Ansatz stammt von Hansen und Kollegen, die ein Modell einführten, das auf künstlich hergestelltem Herzgewebe aus neonatalen Herzzellen von der Ratte basiert (Hansen et al., 2010). Sie entwickelten eine miniaturisierte Gewebeform, die über mehrere Wochen stabil kontrahierte. Andere Gruppen zeigen, dass man aus embryonalen und induzierten Stammzellen gewebeartige 3D-Gebilde („Embryoid Bodies“) züchten kann, die ein gekoppeltes Herzgewebe-ähnliches Synzytium darstellen und auf pharmakologische Beeinflussung von Ionenströmen reagieren (Zwi-Dantsis et al., 2010; Zhang et al., 2009; Reppel et al., 2007; Liang et al., 2010). Auch wenn diese Gewebe zum Teil aus humanen Stammzellen generiert werden können, haben sie doch deutliche elektrophysiologische Unterschiede im Vergleich zu humanen adulten Kardiomyozyten. Das beruht meist darauf, dass in den gezüchteten Gewebeverbänden Zellen unterschiedlicher Differenzierung und unterschiedlicher Ausrichtung zu finden sind (Ravens, 2006; Asp et al., 2010). Man kann Kardiomyozyten nachweisen, die undifferenziert sind, welche die einer embryonalen Vorhof- oder Ventrikelzelle ähneln und Zellen, die eine Schrittmacherfunktion besitzen (Maltsev et al., 1994; He et al., 2003).

Bisher ist es noch nicht gelungen, adulte Kardiomyozyten im Gewebeverband über längere Zeit in Kultur zu halten, sodass sie elektrophysiologisch aktiv bleiben.

Aktionspotentiale in Kultur

Um mit humanen ausdifferenzierten Kardiomyozyten als Testsystem über einen langfristigen Zeitraum arbeiten zu können, wurden verschiedene Kulturbedingungen für ventrikuläre Gewebeschnitte von Brandenburger getestet und letztendlich auf humanes Gewebe angewendet (Brandenburger, unveröffentlicht). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gewebeschnitte aus dem humanen Herzen über 4 Wochen kultivierbar waren und die Kardiomyozyten in dem Gewebe weiterhin elektrophysiologisch aktiv blieben. Die Form der Aktionspotentiale veränderte sich nur geringfügig im Vergleich zu den akut gemessenen Signalen (Abb. 17). Der einzig signifikant veränderte Parameter war das APD_{20} , ein Zeichen für das Verschwinden der Plateauphase im Lauf des Kulturzeitraums. Für das Plateau im ventrikulären Aktionspotential sind im Wesentlichen repolarisierende Kaliumkanäle und L-Typ Kalziumkanäle verantwortlich (Benitah et al., 2010). In Übereinstimmung mit dem Verschwinden des Plateaus nahm auch die Reaktion auf den Inhibitor der L-Typ Kalziumkanäle, Nifedipin, nach 28 Tagen in Kultur ab (Abb. 21). Allerdings war die veränderte Form nur für die Stimulationsfrequenz von 1 Hz der Fall. Verkürzte man kontinuierlich den Abstand zwischen zwei Aktionspotentialen, dann entstand im zweiten Aktionspotential eine Plateauphase (Abb. 18). Die Form dieses zweiten Aktionspotentials entsprach in allen Eigenschaften der eines akut gemessenen Aktionspotentials. Trägt man die Aktionspotentialdauer, bzw. das APD_{90} , gegen den Abstand zum vorangegangenen Aktionspotential auf und stellt das graphisch dar, dann erhält man eine sogenannte elektrische Restitutionskurve (ERC, „electrical restitution curve“). Die Steilheit in der Anfangsphase dieser Kurve kann einen Hinweis auf die Stabilität und Arrhythmogenität dieses Gewebes geben (Rosenbaum et al., 1991; Taggart et al., 2008). Für die akut gemessenen Herzschnitte war die Form dieser Kurve steil bei geringem Abstand zum vorherigen Aktionspotential und wurde flacher, als die Abstände größer wurden. Insgesamt wurde das Aktionspotential länger, je größer der Abstand zum vorherigen Aktionspotential war. Diese Form der Kurve ist typisch für humanen Ventrikel (Nash et al., 2006), veränderte sich aber in Kultur. Die Länge des Aktionspotentials nahm bei kürzer werdenden Abständen bis ungefähr 500 ms zu und wurde erst dann wieder kürzer und die Kurve verlief im initialen Bereich genauso steil wie bei den akut gemessenen Gewebeschnitten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die frequenzabhängige Aktivität der Ionenkanäle verändert ist. Da angenommen wird, dass diese Abhängigkeit der Aktionspotentialform hauptsächlich auf L-Typ Kalziumströme und den Natrium-Kalzium-Austauscher zurückzuführen ist, kann man davon ausgehen, dass die Aktivität dieser Ionenströme durch die Kulturbedingungen verändert wurde (Carmeliet, 2006; Eisner et al., 2009). Die benutzten intrazellulären Ableitungen lassen jedoch nur eingeschränkte Aussa-

gen über die Eigenschaften einzelner Ionenströme zu. Zusammen mit den Expressionsdaten konnte aber auch durch dieses Ergebnis gezeigt werden, dass die Ionenkanäle auch nach längerer Kultivierung der Zellen vorhanden sind, nur möglicherweise andere Eigenschaften haben.

Im Vergleich mit bisherigen Veröffentlichungen, die Kardiomyozytenkulturen beschrieben haben und diese elektrophysiologisch charakterisierten, ist die elektrische Aktivität der Herzzellen in den Gewebeschnitten unserer Untersuchungen noch außerordentlich gut erhalten. Man hat in isolierten und kultivierten Kardiomyozyten verschiedene Ionenströme untersucht und fand abhängig von den Kulturbedingungen und der verwendeten Spezies weitreichende Regulationen der einzelnen Ionenströme und der Aktionspotentialform (Mitcheson et al., 1998). So konnten Effekte auf den L-Typ Kalziumkanal in Vorhofzellen aus dem Menschen und Ventrikelzellen aus dem Kaninchen nachgewiesen werden (Mitcheson et al., 1996; Benardeau et al., 1997). Auch einige Kaliumkanäle waren in diesen Studien verändert, sobald man die Kardiomyozyten kultiviert hat. Der I_{to} nimmt in allen beschriebenen Versuchen ab (Schackow et al., 1995; Feng et al., 1996; Mitcheson et al., 1996), die Kaliumströme I_{Kur} und I_{K1} waren nur in einigen Studien verändert (Benardeau et al., 1997; Mitcheson et al., 1996 und 1998). Ähnlich wie bei den humanen endokardialen Gewebeschnitten, haben Benardeau und Kollegen nach 7 Tagen in Kultur bei humanen Vorhofzellen auch einen Verlust der Plateauphase feststellen können, allerdings waren diese Zellen schon deutlich dedifferenzierter, da das gemessene Ruhemembranpotential der kultivierten Zellen nur noch bei -30 mV lag und Aktionspotentiale erst ausgelöst werden konnten, nachdem das intrazelluläre Potential auf -80 mV geklemmt wurde (Benardeau et al., 1997).

Schackow und Kollegen stellten deutlich stabilere elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten fest, wenn man diese in 3D-Alginat-Matrizes einwachsen ließ (Schackow et al., 1995). Das spricht, zusammen mit dem Befund, dass eine Kokultur mit Fibroblasten dem strukturellen Erhalt der Kardiomyozyten förderlich ist, dafür, dass die Zellen eine Umgebung benötigen, die dem physiologischen Zustand ähnlich ist (Nichol et al. 2008). Zusätzlich konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass eine elektrische Stimulation während der Kulturdauer („Pacing“), die mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Herzzellen signifikant verbesserten (Radisic et al., 2004; Tandon et al., 2009). Auch die Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten während der Kultivierung scheint durch kontinuierliche elektrische Stimulation veränderbar zu sein (Yang et al., 2005; Sathaye et al., 2006). Möglicherweise würde eine Erweiterung der Kulturbedingungen mittels elektrischer Stimulation auch die elektrophysiologischen Änderungen in den Kardiomyozyten der Gewebeschnitte rückgängig machen.

Expressionen und Struktur

Stabile mRNA-Spiegel in den kultivierten Gewebeschnitten konnten für den L-Typ-Kalziumkanal, den Natrium-Kalzium-Austauscher, den spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$, die Einwärtsgleichrichter $\text{K}_{ir}2.1$ und $\text{K}_{ir}6.2$, die regulatorische Untereinheit des K_{ATP} -Kanals SUR2A und den schnellen verzögerten Gleichrichter hERG gezeigt werden (Abb. 16). Unterschiede in der Kultur gab es für den spannungsabhängigen Kaliumkanal $\text{K}_v4.3$, der in der Kultur erhöhte mRNA-Spiegel aufwies und dessen regulatorische Untereinheit, KChiP geringere mRNA-Spiegel aufwies. Eine erhöhte Expression des $\text{K}_v4.3$ könnte das häufige Auftreten einer ersten schnellen Repolarisationsphase erklären, das nur in kultivierten Gewebeschnitten zu beobachten war, nicht aber bei akuten Messungen. Dieser Kanal ist im humanen Ventrikel hauptsächlich am I_{to} -Strom beteiligt, der eine solche Formänderung zur Folge hat und im Endokard des Menschen nur geringen Anteil an der Gesamt-Repolarisation hat (Rosati et al., 2001; Patel et al., 2005).

Neben diesen Veränderungen wurde eine Abnahme der Reizleitungsgeschwindigkeit festgestellt, die für die akut gemessenen Gewebeschnitte bei ungefähr 0,35 m/s lag (Abb. 15). Das entspricht den Geschwindigkeiten, die in anderen ventrikulären *in vitro*-Präparationen, auch in humanem Ventrikel, gemessen wurden (Bussek et al., 2009; Strom et al., 2010; Glukhov et al., 2010). Nach 28 Tagen in Kultur nahm diese Geschwindigkeit signifikant ab. Da die Expression des wichtigsten Proteins für die ventrikuläre Zellkopplung, Connexin 43, in der mRNA-Expression stabil bleibt (Brandenburger, unveröffentlicht) kann man annehmen, dass es strukturelle Veränderungen sind, die die interzelluläre Kommunikation verlangsamen. Wie Matthias Brandenburger in seiner Dissertation beschreibt, verändert sich die Struktur der Gewebeschnitte in Kultur deutlich und auch die Kontraktilität des Gewebes nimmt stark ab (Brandenburger, unveröffentlicht). Die Integrität des Gewebes verändert sich und die Abstände zwischen den Zellen werden größer, außerdem verliert ein großer Anteil der Schnitte die für Kardiomyozyten spezifische Querstreifung, ein Hinweis auf eine mögliche Umdifferenzierung. Diese Veränderungen in den Eigenschaften des Gewebes könnten die Verlangsamung in der Reizleitung durchaus erklären, wobei hervorzuheben ist, dass die Gewebeschnitte auch nach vier Wochen in Kultur ein funktionell aktives Synzytium darstellen und deshalb für Fragestellungen an multizelluläre Präparate geeignet sind.

Pharmakologische Untersuchungen

Trotz der beschriebenen Veränderungen in den elektrophysiologischen Eigenschaften konnten wir feststellen, dass bei den kultivierten Schnitten die Reaktion auf eine Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle mit Rilmakalim in gleicher Weise über den gesamten Kulturzeitraum erhalten blieb (Abb. 19). Dieses Ergebnis bestätigt die Expressionsdaten, die zeigen dass die mRNA-Spiegel der beiden wichtigsten Untereinheiten des kardialen K_{ATP} -Kanals stabil blieben. Damit ist das Gewebeschnittmodell wahrscheinlich dafür geeignet, lang- und kurzfristige Effekte auf den metabolischen Zustand der Zellen zu untersuchen und auf die elektrophysiologische Funktionalität darzustellen. Man kann beispielsweise die Reaktion auf Nährstoff- und/oder Sauerstoffentzug untersuchen und die Reperfusion in der Kultur simulieren. Eine Narbenbildung und ein kardialer Umbau ließe sich an den Gewebeschnitten in Kultur ideal untersuchen, da wichtige Veränderungen der Kardiomyozyten nach einem Infarkt die elektrophysiologischen Eigenschaften betreffen (Janse, 2004; Aiba et al., 2010).

Auch die Expression der wichtigsten Untereinheit des hERG-Kanals blieb in Kultur konstant und die vorhandene Aktivität dieses Kanals zeigte sich in der Reaktion auf Dofetilid (Abb. 20). Mit einer Konzentration von 1 μ M erreichte man die komplette Wirkung und der Effekt auf das Aktionspotential blieb gleich über den gesamten Kulturverlauf. Allerdings veränderte sich die Sensitivität der Reaktion. Der EC_{50} lag bei akut gemessenen Gewebeschnitten deutlich höher als bei Gewebeschnitten, die in Kultur waren. Der EC_{50} nach 7 Tagen in Kultur lag bei 90 nM, ein Wert der den bisher für Dofetilid beschriebenen Konzentrationen sehr nahe kommt (Jurkiewicz et al., 1993; Kiehn et al., 1996; Redfern et al., 2003; Wu et al., 2005). Dass der EC_{50} für die akuten Gewebeschnitte ungefähr dreimal höher liegt, ist möglicherweise darin begründet, dass in dem Gewebe Substanzen verblieben sind, die als Medikation im Patienten eine hERG-blockierende Wirkung haben. Die Präparation und die initiale Perfusion im Organbad würde nicht zwingend ausreichen, um eine solche Restwirkung auszuwaschen, da die hERG-Blockade der meisten Substanzen nur sehr langsam reversibel ist (Wu et al., 2005; eigene Beobachtungen). In der Kultur allerdings würde sich eine solche Restwirkung durch den täglichen Mediumwechsel und die vergangene Zeitspanne herauswaschen. Um herauszufinden, ob die Sensitivität nach längeren Zeiten in Kultur noch stärker steigt, müsste man weitere Dosis-Wirkungs-Experimente an späteren Zeitpunkten durchführen.

Mit der beschriebenen Kulturmethode ist es zum ersten Mal gelungen, humane adulte Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum funktionell aktiv zu erhalten. Die elektrophysiologischen

Eigenschaften bleiben in den grundlegenden Parametern erhalten und wichtige pharmakologische Reaktionen der Zellen sind stabil über den gesamten Kulturzeitraum.

Explantierte Herzen

Da die Verfügbarkeit von humanem ventrikulärem Gewebe für größere Studien nicht ausreicht, wenn man nur mit Gewebe aus Morrow-Myektomien arbeitet, wurden zusätzlich Gewebeschnitte aus der linken Ventrikelwand explantierter Herzen hergestellt. Trotz der längeren Lagerzeit und der größeren Dimension der Gewebstücke, konnten von jedem Präparat Zellen gemessen werden, die in den elektrophysiologischen Eigenschaften den Kardiomyozyten aus dem Morrow-Gewebe entsprachen. Im Gegensatz zu dem Gewebe aus Morrow-Myektomien, bei denen man maximal 20 Schnitte aus einem Präparat herstellen konnte, war es bei explantiertem Gewebe möglich, 100 und mehr Ventrikelschnitte an einem Tag herzustellen, wobei diese Zahl bei Verwendung mehrerer Vibratome noch zu erhöhen ist.

Der einzige funktionelle Unterschied zwischen den Gewebeschnitten war die Anfälligkeit für extreme Verlängerungen des Aktionspotentials nach hERG-Blockade. Ein Drittel der getesteten Gewebeschnitte aus explantierten Herzen reagierte mit einer Verlängerung über eine Sekunde nach Dofetilid-Gabe, wobei es beim Morrow-Gewebe nur 10 % waren (Abb. 24). Erstaunlicherweise war dieser Effekt in Kultur nicht wiederholbar, die Präparate, die akut auf die beschriebene Weise reagierten, zeigten schon nach einem Tag in Kultur keine abnormen Effekte nach Dofetilid-Gabe mehr. Die Reaktion der Schnitte aus explantiertem Gewebe spiegelt zum einen die umfassendere Prämedikation der Patienten und zum anderen die proarrhythmische pathologische Situation des Gewebes wider (Pak et al., 1997; Janse, 2004; Aiba et al., 2010). Allerdings konnte im Vergleich zum Morrow-Gewebe keine verlängerte Aktionspotentialdauer festgestellt werden, eine Eigenschaft, die typischerweise in geschädigtem Myokard auftritt, wenn man dieses mit Kontrollgewebe vergleicht (Pak et al., 1997; Akar et al., 2003). Diese Verlängerung der Aktionspotentialdauer in humanen Präparationen scheint vor allem das epikardiale Aktionspotential zu betreffen. In ventrikulären „Wedge“-Präparationen konnte gezeigt werden, dass der physiologische Gradient der Aktionspotentialdauer zwischen epikardialen und endokardialen Aktionspotentialen in geschädigtem linken Ventrikel nicht mehr vorhanden ist (Glukhov et al., 2010). Dieser Effekt steht im Gegensatz zu Tiermodellen von geschädigten Herzen (Akar et al., 2003), bestätigt aber die Ergebnisse von Taggart und Kollegen, die einen Verlust der transmuralen Heterogenität der elektrischen Aktivität im Patienten unter ischämischen Bedingungen beschrieben (Taggart et al., 2001). Das heißt, dass sich die Aktionspotentiallänge nur im epikardialen Bereich entscheidend verlängert. Das würde erklären, warum man keine Unterschiede in den elektrophysiologischen

Parametern zwischen den Kardiomyozyten aus dem endokardialen Morrow-Gewebe und explantiertem Gewebe messen konnte.

Die Kultivierung der Gewebeschnitte aus explantierten Herzen war ebenso erfolgreich wie für das Morrow-Gewebe (Abb. 23). Die Parameter der Aktionspotentiale blieben stabil in der Kultur und die explantierten Gewebeschnitte hatten einen etwas geringeren Verlust der Plateauphase. Die Reaktion auf Rilmakalim blieb ebenso konstant über den gesamten Kulturzeitraum, genau wie die Reaktion auf Dofetilid (Abb. 25).

Zusammenfassend bieten die Gewebeschnitte aus dem linken Ventrikel explantierter Herzen eine Erhöhung der Verfügbarkeit humaner Proben, sowie ein elektrophysiologisch funktionierendes Langzeit-Modell. Als akutes Modell bieten diese Schnitte sich an, um die pathophysiologische Situation in den einzelnen Ventrikelschichten zu untersuchen und mögliche arrhythmogene Substrate zu identifizieren.

6.3 Kultivierte Gewebeschnitte als sicherheitspharmakologisches Langzeitmodell

Die häufigste kardiale Nebenwirkung von Medikamenten ist die Verlängerung der QT_c -Zeit im EKG (Redfern et al., 2003). Diese Verlängerung wirkt proarrhythmisch und kann zu tödlich verlaufenden *Torsade de Pointes*-Arrhythmien führen. Dies ist eine Eigenschaft, die viele Antibiotika und Antihistaminika sowie psychiatrischen Medikamente besitzen und das führte in den 90er Jahren zur Entfernung mehrerer Medikamente vom Markt (Woosley, 1996; Rampe et al., 1997; Glassman et al., 2001).

Daraufhin bildete sich ein internationales Komitee, das eine Richtlinie zur Sicherheit von neu entwickelten Substanzen beschloss. Diese ICHS7B-Richtlinie beschreibt die präklinischen Voraussetzungen für die Zulassung von neuen Medikamenten für Patientenstudien. Es werden sicherheitspharmakologische Modelle bewertet, die das Risiko bestimmen sollen, eine Verlängerung der QT_c -Zeit und eine *Torsade de Pointes*-Arrhythmie auszulösen. Da die meisten Medikamente mit diesen Nebenwirkungen eine direkte Blockade des hERG-Kanals auslösen, werden die neu entwickelten Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung dieses Kanals untersucht. Für diese Tests werden mit hERG-RNA injizierte *Xenopus*-Oozyten oder transfizierte HEK-Zellen benutzt, bei denen die entstehenden Ströme in Anwesenheit oder Abwesenheit der zu testenden Substanz gemessen werden (Redfern et al., 2003; Chen et al., 2005; Wible et al., 2005). Eine chronische Wirkung auf das Herzgewebe und die Ionenkanäle wird dabei derzeit jedoch nicht untersucht.

Eine Störung der hERG-Aktivität hängt nicht zwingenderweise von einer direkten Blockade dieses Kanals ab. In den letzten Jahren wurden einige Substanzen beschrieben, die verhindern, dass

der hERG-Kanal aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche gelangt und dadurch nicht aktiv ist, sodass eine Verlängerung der QT_c -Zeit ausgelöst wird (Ficker et al., 2004; Kuryshev et al., 2005; Wible et al., 2005; Rajamani et al., 2006). Die Wirkung dieser Substanzen kann in akuten Testmodellen nicht erfasst werden. Deshalb bieten sich die organotypischen humanen Gewebeschnitte als Modell an, um eine Wirkung von sicherheitspharmakologisch interessanten Substanzen über einen chronischen Zeitraum zu messen. Als Beispiel einer solchen Substanz wurde Pentamidin gewählt. Pentamidin ist ein antimikrobielles Medikament, das beispielsweise bei einer Infektion mit *Pneumocystis carinii* verordnet wird (Schneider et al., 1972; Pearson et al., 1985; Lee et al., 2010). Seit mehr als zwei Jahrzehnten wird immer wieder von Patienten berichtet, die nach Behandlung mit Pentamidin ventrikuläre Arrhythmien erleiden und viele Patienten zeigen eine verlängerte QT_c -Zeit (Owens, 2004). Die molekularen Ursachen für diese klinischen Effekte waren bis vor einigen Jahren unbekannt. Die Arbeitsgruppen von Cordes sowie Kuryshev und Kollegen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass Pentamidin in therapeutischen Konzentrationen den hERG-Kanal nicht inhibiert, aber den Einbau des Proteins in die Zellmembran verhindert und dadurch eine Reduktion des hERG-Stroms verursacht (Cordes et al., 2005; Kuryshev et al., 2005). Dieser Effekt ist möglicherweise mit einer Interaktion des Hitzeschockproteins 70 oder 90 (Hsp 70/90) verbunden, da diese entscheidend an der Faltung des hERG-Kanals beteiligt sind (Ficker et al., 2003).

Um die Wirkung dieser Substanz in humanem Gewebe zu untersuchen wurden in unseren Untersuchungen ventrikuläre Herzschnitte akut und über 7 Tage in Kultur mit Pentamidin behandelt. Es stellte sich heraus, dass Pentamidin in drei verschiedenen Konzentrationen akut keine Wirkung auf die Aktionspotentialform hatte (Abb. 26). Die Kardiomyozyten in den Gewebeschnitten, die mit Pentamidin behandelt wurden, hatten ein positiveres Ruhemembranpotential und ein deutlich verlängertes Aktionspotential (Abb. 27). Außerdem zeigten sie Spontanaktivität nach mechanischer Stimulation und entwickelten Nachdepolarisationen. Diese Eigenschaften sind stark arrhythmogen und bestätigen die klinischen Beobachtungen. Eine Blockade des hERG-Einbaus in die Membran erklärt zwar die verlängerte Aktionspotentialdauer, aber nicht das positivere Ruhemembranpotential. Möglicherweise ist an diesem Effekt noch ein weiterer Ionenkanal beteiligt. De Boer und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass Pentamidin mit intrazellulären Domänen der $K_{ir}2.x$ -Kaliumkanäle interagiert (De Boer et al., 2010). Außerdem konnten sie eine signifikante Abnahme des I_{K1} -Stroms nach Kultivierung mit Pentamidin beobachten. Dieser Mechanismus könnte durchaus für die Zunahme des Ruhemembranpotentials und die damit verbundene proarrhythmische Wirkung verantwortlich sein. Um diese Effekte weiter aufzuklären, müsste man die humanen Kardiomyozyten aus den kultivierten Gewebeschnitten isolieren und dann die entspre-

chenden Ströme messen. Man könnte außerdem verschiedene intrazelluläre Transportwege für Membranproteine inhibieren und die Wirkung auf die betroffenen Kanäle untersuchen.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Etablierung einer Methode zur Herstellung humaner funktioneller Gewebeschnitte ist es gelungen, ein alternatives Modell zu bisherigen multizellulären Präparationen aus dem humanen Ventrikel mit einer höheren Ausbeute zu generieren.

Man kann die Schnitte in akuten Messungen für die Untersuchung verschiedener pharmakologischer und physiologischer Einflüsse einsetzen. Die Geometrie der Gewebeschnitte ist ideal, um als Pseudo-2D-Modell die Einflüsse von inter- und intrazellulären Schnittstellen zu untersuchen und *in silico*-Modellierungen zu überprüfen. Beispielsweise ist die Funktion der Fibroblasten in der Erregungsausbreitung im Myokard noch weitgehend ungeklärt, aber dass sie das Synzytium der Kardiomyozyten beeinflussen können, konnte bereits gezeigt werden (Camelitti et al., 2004; Pedrotty et al., 2009; Yue et al., 2010). Außerdem könnte man mithilfe von funktionellen Farbstoffen wie Fura-2 oder di-4-ANEPPS die Heterogenitäten in der ventrikulären Wand von geschädigten Herzen untersuchen und dafür explantiertes Gewebe unterschiedlicher Pathogenität verwenden. Solche pathogenen Substrate könnte man auch an den relativ unbeschädigten Gewebeschnitten entstehen lassen, indem man ischämische Bedingungen erzeugt oder nur Teile des Gewebes irreversibel schädigt, sodass kreisende Erregungen entstehen können. Außerdem kann man die verschiedenen Einflüsse untersuchen, die im Endeffekt zu einer *Torsade de Pointes*-Arrhythmie führen und dadurch schützende Mechanismen identifizieren. Eine weitere Möglichkeit, die elektrischen Gewebeeigenschaften in den humanen Herzwebeschnitten zu untersuchen bieten die Mikroelektroden-Arrays (MEAs). Mithilfe einer Anordnung von bis zu 256 Elektroden kann man extrazelluläre Feldpotentiale ableiten und dadurch lokale Unterschiede und Reizleitungseigenschaften des ventrikulären Gewebes untersuchen (Meyer et al., 2010). Damit bieten die MEAs eine zusätzliche Methodik, mit der man proarrhythmogene Effekte in Herzschnitten untersuchen könnte.

Die kultivierten Gewebeschnitte kann man, wie ansatzweise schon gezeigt, für sicherheitspharmakologische Fragestellungen verwenden, wenn man chronische Effekte auf die Elektrophysiologie des humanen Ventrikels untersuchen möchte. Auch hierbei ist gerade das Zusammenspiel ver-

schiedener Ionenkanäle von entscheidender Bedeutung, etwas, das man mit den derzeit eingesetzten Methoden wie beispielsweise transfizierten Einzelzellkulturen nicht untersuchen kann.

Eine weitere, bisher nicht vorhandene Möglichkeit ist die Untersuchung bestimmter regulatorischer Proteine und ihren Einfluss auf die Ionenkanalaktivität bei pathologischen Veränderungen des humanen Myokards. Mittels zellbiologischer und molekularbiologischer Techniken wie die Transfektion mit viralen Vektoren oder das Verwenden von siRNA könnte man bestimmte Faktoren hemmen oder aktivieren. Für Gewebeschnitte aus dem Hirn sind solche Methoden bereits erfolgreich etabliert worden (Hsin et al., 2010; Foster et al., 2010). Ein multizelluläres Modell für diese Fragestellungen gab es bisher noch nicht in der kardialen Forschung.

Mit den organotypischen humanen Ventrikelschnitten wurde eine Plattform geschaffen, die man in den verschiedenen Bereichen der kardialen Pharmakologie und Physiologie anwenden kann. Zum ersten Mal sind Langzeitstudien an humanem adultem Herzgewebe möglich, und man ist in der Lage, elektrophysiologische Einflüsse auf die Kardiomyozyten und ihre Kommunikation mit der extrazellulären Umgebung und anderen Zellen zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges N, Philp K, Pollard C, Wakefield I, Hammond TG & Valentin J. Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to torsades de pointes. *Fundam Clin Pharmacol* (2004) **18**: pp. 139-151
- Abriel H. Cardiac sodium channel $Na_v1.5$ and interacting proteins: physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **48**: pp. 2-11.
- Adams CP & Brantner VV. Spending on new drug development1. *Health Econ* (2010) **19**: pp. 130-141.
- Akar FG & Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res* (2003) **93**: pp. 638-645.
- Aiba T & Tomaselli GF. Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* (2010) **25**: pp. 29-36.
- Antzelevitch C & Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol* (2001) **96**: pp. 517-527.
- Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA & Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and m cells. *Circ Res* (1991) **69**: pp. 1427-1449.
- Antzelevitch C. Basic mechanisms of reentrant arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* (2001) **16**: pp. 1-7.
- Antzelevitch C. Drug-induced spatial dispersion of repolarization. *Cardiol J* (2008) **15**: pp. 100-121.
- Antzelevitch C. Ionic, molecular, and cellular bases of qt-interval prolongation and torsade de pointes. *Europace* (2007) **9 Suppl 4**: p. iv4-15.
- Antzelevitch C. Role of transmural dispersion of repolarization in the genesis of drug-induced torsades de pointes. *Heart Rhythm* (2005) **2**: p. S9-15.
- Asp J, Steel D, Jonsson M, Améen C, Dahlenborg K, Jeppsson A, Lindahl A & Sartipy P. Cardiomyocyte clusters derived from human embryonic stem cells share similarities with human heart tissue. *J Mol Cell Biol* (2010) **2**: pp. 276-283.
- Axon CNS Guide: A Guide to Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques. *Molecular Devices* (2006) 2. Auflage
- Bai C, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H & Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation* (2005) **112**: pp. 1701-1710.
- Banyasz T, Lozinskiy I, Payne CE, Edelmann S, Norton B, Chen B, Chen-Izu Y, Izu LT & Balke CW. Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. *Exp Physiol* (2008) **93**: pp. 370-382.

- Bárándi L, Harmati G, Horváth B, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Nánási PP & Bányász T. Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium. *Gen Physiol Biophys* (2010) **29**: pp. 309-313.
- Bárándi L, Virág L, Jost N, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrassy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A & Nánási PP. Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Basic Res Cardiol* (2010) **105**: pp. 315-323.
- Barclay CJ. Modelling diffusive O_2 supply to isolated preparations of mammalian skeletal and cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil* (2005) **26**: pp. 225-235.
- Barrett TD, Hennan JK, Fischbach PS, O'Neill BP, Driscoll Jr EMJ & Lucchesi BR. Tedisamil and dofetilide-induced torsades de pointes, rate and potassium dependence. *Br J Pharmacol* (2001) **132**: pp. 1493-1500.
- Belardinelli L, Shryock JC, Wu L & Song Y. Use of preclinical assays to predict risk of drug-induced torsades de pointes. *Heart Rhythm* (2005) **2**: p. S16-22.
- Bénardeau A, Hatem SN, Rücker-Martin C, Tessier S, Dinanian S, Samuel JL, Coraboeuf E & Mercadier JJ. Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium. *J Mol Cell Cardiol* (1997) **29**: pp. 1307-1320.
- Benitah J, Alvarez JL & Gómez AM. L-type Ca^{2+} current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **48**: pp. 26-36.
- Berridge MV & Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Arch Biochem Biophys* (1993) **303**: pp. 474-482.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* (2002) **415**: pp. 198-205.
- Boyett MR. 'and the beat goes on.' the cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol* (2009) **94**: pp. 1035-1049.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) **72**: pp. 248-254.
- Burashnikov A & Antzelevitch C. Differences in the electrophysiologic response of four canine ventricular cell types to alpha 1-adrenergic agonists. *Cardiovasc Res* (1999) **43**: pp. 901-908.
- Burashnikov A & Antzelevitch C. New developments in atrial antiarrhythmic drug therapy. *Nat Rev Cardiol* (2010) **7**: pp. 139-148.
- Burnashev NA, Edwards FA & Verkhatsky AN. Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices. *Pflügers Arch* (1990) **417**: pp. 123-125.

- Bussek A, Wettwer E, Christ T, Lohmann H, Camelliti P & Ravens U. Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cell Physiol Biochem* (2009) **24**: pp. 527-536.
- Caldwell BJ, Legrice IJ, Hooks DA, Tai DC, Pullan AJ & Smaill BH. Intramural measurement of transmembrane potential in the isolated pig heart: validation of a novel technique. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2005) **16**: pp. 1001-1010.
- Camelliti P, Borg TK & Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* (2005) **65**: pp. 40-51.
- Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, Kohl P & Green CR. Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovasc Res* (2004) **62**: pp. 415-425.
- Carmeliet E. Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2006) **17 Suppl 1**: p. S2-S7.
- Cerbai E, Sartiani L, De Paoli P & Mugelli A. Isolated cardiac cells for electropharmacological studies. *Pharmacol Res* (2000) **42**: pp. 1-8.
- Chen X, Cass JD, Bradley JA, Dahm CM, Sun Z, Kadyszewski E, Engwall MJ & Zhou J. Qt prolongation and proarrhythmia by moxifloxacin: concordance of preclinical models in relation to clinical outcome. *Br J Pharmacol* (2005) **146**: pp. 792-799.
- Claycomb WC, Lanson NAJ, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A & Izzo NJJ. H1-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) **95**: pp. 2979-2984.
- Clement B, Bürenheide A, Rieckert W & Schwarz J. Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, in vitro and in vivo biotransformation. *ChemMedChem* (2006) **1**: pp. 1260-1267.
- Cordes JS, Sun Z, Lloyd DB, Bradley JA, Opsahl AC, Tengowski MW, Chen X & Zhou J. Pentamidine reduces hERG expression to prolong the QT interval. *Br J Pharmacol* (2005) **145**: pp. 15-23.
- Crissman HA, Oka MS & Steinkamp JA. Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* (1976) **24**: pp. 64-71.
- De Boer TP, Camelliti P, Ravens U & Kohl P. Myocardial tissue slices: organotypic pseudo-2D models for cardiac research & development. *Future Cardiol* (2009) **5**: pp. 425-430.
- De Boer TP, Nalos L, Stary A, Kok B, Houtman MJC, Antoons G, van Veen TAB, Beekman JDM, de Groot BL, Ophhof T, Rook MB, Vos MA & van der Heyden MAG. The anti-protozoal drug pentamidine blocks Kir2.x-mediated inward rectifier current by entering the cytoplasmic pore region of the channel. *Br J Pharmacol* (2010) **159**: pp. 1532-1541.

- De Clerck F, Van de Water A, D'Aubioul J, Lu HR, van Rossem K, Hermans A & Van Ammel K. In vivo measurement of qt prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity. *Fundam Clin Pharmacol* (2002) **16**: pp. 125-140.
- Dennis A, Wang L, Wan X & Ficker E. Herg channel trafficking: novel targets in drug-induced long qt syndrome. *Biochem Soc Trans* (2007) **35**: pp. 1060-1063.
- Dick E, Rajamohan D, Ronksley J & Denning C. Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening. *Biochem Soc Trans* (2010) **38**: pp. 1037-1045.
- DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* (2010) **106**: pp. 434-446.
- DiMasi JA, Hansen RW & Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* (2003) **22**: pp. 151-185.
- Drew BJ, Califf RM, Funk M, Kaufman ES, Krucoff MW, Laks MM, Macfarlane PW, Sommargren C, Swiryn S, Van Hare GF. Aha scientific statement: practice standards for electrocardiographic monitoring in hospital settings: an american heart association scientific statement from the councils on cardiovascular nursing, clinical cardiology, and cardiovascular disease in the young: endorsed by the international society of computerized electrocardiology and the american association of critical-care nurses. *J Cardiovasc Nurs* (2005) **20**: pp. 76-106.
- Ebert SN, Liu XK & Woosley RL. Female gender as a risk factor for drug-induced cardiac arrhythmias: evaluation of clinical and experimental evidence. *J Womens Health* (1998) **7**: pp. 547-557.
- Eisner DA, Dibb KM & Trafford AW. The mechanism and significance of the slow changes of ventricular action potential duration following a change of heart rate. *Exp Physiol* (2009) **94**: pp. 520-528.
- Er F, Michels G, Brandt MC, Khan I, Haase H, Eicks M, Lindner M & Hoppe UC. Impact of testosterone on cardiac l-type calcium channels and Ca^{2+} sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* (2007) **41**: pp. 467-477.
- Farkas AS, Rudas L, Makra P, Csík N, Leprán I, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A & Farkas A. Biomarkers and endogenous determinants of dofetilide-induced torsades de pointes in $\alpha(1)$ -adrenoceptor-stimulated, anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol* (2010) **161**: pp. 1477-1495.
- Feng J, Li GR, Fermini B & Nattel S. Properties of sodium and potassium currents of cultured adult human atrial myocytes. *Am J Physiol* (1996) **270**: p. H1676-86.
- Fenichel RR, Malik M, Antzelevitch C, Sanguinetti M, Roden DM, Priori SG, Ruskin JN, Lipicky RJ, Cantilena LR. Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2004) **15**: pp. 475-495.
- Ficker E, Dennis AT, Wang L & Brown AM. Role of the cytosolic chaperones hsp70 and hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel herg. *Circ Res* (2003) **92**: p. e87-100.

- Findlay I. Sulphonylurea drugs no longer inhibit atp-sensitive k⁺ channels during metabolic stress in cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* (1993) **266**: pp. 456-467.
- Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC & Nichols CG. Muscle katp channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* (2010) **90**: pp. 799-829.
- Foster KA, McLaughlin N, Edbauer D, Phillips M, Bolton A, Constantine-Paton M & Sheng M. Distinct roles of nr2a and nr2b cytoplasmic tails in long-term potentiation. *J Neurosci* (2010) **30**: pp. 2676-2685.
- Friedman L & Alexander E. Update of the clinical impact and issues surrounding dofetilide (tikosyn) therapy. *AACN Adv Crit Care* (2006) **17**: p. 102-8; quiz 109-110.
- Fülöp L, Bányász T, Szabó G, Tóth IB, Bíró T, Lôrincz I, Balogh A, Petô K, Mikó I & Nánási PP. Effects of sex hormones on ecg parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Oxf)* (2006) **188**: pp. 163-171.
- Gaborit N, Varro A, Le Bouter S, Szuts V, Escande D, Nattel S & Demolombe S. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **49**: pp. 639-646.
- Gähwiler BH, Thompson SM & Muller D. Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of cns tissue. *Curr Protoc Neurosci* (2001) **Chapter 6**: p. Unit 6.11.
- Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP & Rohr S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* (2003) **93**: pp. 421-428.
- Geiger JRP, Bischofberger J, Vida I, Fröbe U, Pfitzinger S, Weber HJ, Haverkamp K & Jonas P. Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflugers Arch* (2002) **443**: pp. 491-501.
- Gibbons HM & Dragunow M. Adult human brain cell culture for neuroscience research. *Int J Biochem Cell Biol* (2010) **42**: pp. 844-856.
- Gima K & Rudy Y. Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. *Circ Res* (2002) **90**: pp. 889-896.
- Glassman AH & Bigger JTJ. Antipsychotic drugs: prolonged qtc interval, torsade de pointes, and sudden death. *Am J Psychiatry* (2001) **158**: pp. 1774-1782.
- Goette A, Bukowska A, Lendeckel U, Erxleben M, Hammwöhner M, Strugala D, Pfeifferberger J, Röhl F, Huth C, Ebert MPA, Klein HU & Röcken C. Angiotensin ii receptor blockade reduces tachycardia-induced atrial adhesion molecule expression. *Circulation* (2008) **117**: pp. 732-742.
- Gögelein H, Hartung J & Englert HC. Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac k(atp) channels. *Cell Physiol Biochem* (1999) **9**: pp. 227-241.
- Gögelein H, Hartung J, Englert HC & Schölkens BA. Hmr 1883, a novel cardioselective inhibitor of the atp-sensitive potassium channel. part i: effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic beta-cells. *J Pharmacol Exp Ther* (1998) **286**: pp. 1453-1464.

- Gumina RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S & Terzic A. Knockout of kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) **284**: p. H2106-13.
- Habeler W, Peschanski M & Monville C. Organotypic heart slices for cell transplantation and physiological studies. *Organogenesis* (2009) **5**: pp. 62-66.
- Habeler W, Pouillot S, Plancheron A, Puc  at M, Peschanski M & Monville C. An in vitro beating heart model for long-term assessment of experimental therapeutics. *Cardiovasc Res* (2009) **81**: pp. 253-259.
- H  jos N & Mody I. Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying acsf content. *J Neurosci Methods* (2009) **183**: pp. 107-113.
- Halbach M, Pillekamp F, Brockmeier K, Hescheler J, M  ller-Ehmsen J & Reppel M. Ventricular slices of adult mouse hearts--a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies. *Cell Physiol Biochem* (2006) **18**: pp. 1-8.
- Hammer K, Ruppenthal S, Viero C, Scholz A, Edelmann L, Kaestner L & Lipp P. Remodelling of ca²⁺ handling organelles in adult rat ventricular myocytes during long term culture. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **49**: pp. 427-437.
- Hansen A, Eder A, B  nstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schw  rer A, Uebeler J & Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* (2010) **107**: pp. 35-44.
- Hayes E, Pugsley MK, Penz WP, Adaikan G & Walker MJ. Relationship between qat and rr intervals in rats, guinea pigs, rabbits, and primates. *J Pharmacol Toxicol Methods* (1994) **32**: pp. 201-207.
- He J, Ma Y, Lee Y, Thomson JA & Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* (2003) **93**: pp. 32-39.
- Heath BM & Terrar DA. Protein kinase c enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, ikr, through a reduction in c-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* (2000) **522 Pt 3**: pp. 391-402.
- Hedstr  m E, Engblom H, Frogner F, Astr  m-Olsson K, Ohlin H, Jovinge S & Arheden H. Infarct evolution in man studied in patients with first-time coronary occlusion in comparison to different species - implications for assessment of myocardial salvage. *J Cardiovasc Magn Reson* (2009) **11**: p. 38.
- Hilgemann DW, Yaradanakul A, Wang Y & Fuster D. Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2006) **17 Suppl 1**: p. S47-S56.
- Hondeghem LM & Snyders DJ. Class iii antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* (1990) **81**: pp. 686-690.

- Hondeghem LM. Triad: foundation for proarrhythmia (triangulation, reverse use dependence and instability). *Novartis Found Symp* (2005) **266**: p. 235-44; discussion 244-50.
- Horrobin DF. Modern biomedical research: an internally self-consistent universe with little contact with medical reality?. *Nat Rev Drug Discov* (2003) **2**: pp. 151-154.
- Hsin H, Kim MJ, Wang C & Sheng M. Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates hippocampal long-term depression. *J Neurosci* (2010) **30**: pp. 11983-11993.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J & Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of atp-sensitive k⁺ channels. *Neuron* (1996) **16**: pp. 1011-1017.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S & Bryan J. Reconstitution of ikatp: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* (1995) **270**: pp. 1166-1170.
- ICH57B. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarisation (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. (2005) Guideline S7B
- Itzhaki I, Schiller J, Beyar R, Satin J & Gepstein L. Calcium handling in embryonic stem cell-derived cardiac myocytes: of mice and men. *Ann N Y Acad Sci* (2006) **1080**: pp. 207-215.
- James AF, Arberry LA & Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol* (2004) **99**: pp. 183-192.
- James AF, Choisy SCM & Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol* (2007) **94**: pp. 265-319.
- Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* (2004) **61**: pp. 208-217.
- Jie X & Trayanova NA. Mechanisms for initiation of reentry in acute regional ischemia phase 1b. *Heart Rhythm* (2010) **7**: pp. 379-386.
- Jonsson MKB, Vos MA, Duker G, Demolombe S & van Veen TAB. Gender disparity in cardiac electrophysiology: implications for cardiac safety pharmacology. *Pharmacol Ther* (2010) **127**: pp. 9-18.
- Jurkiewicz NK & Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class iii antiarrhythmic agent. specific block of rapidly activating delayed rectifier k⁺ current by dofetilide. *Circ Res* (1993) **72**: pp. 75-83.
- Kääb S, Zwermann L, Barth A, Hinterseer M, Englert HC, Gögelein H & Näbauer M. Selective block of sarcolemmal ikatp in human cardiomyocytes using hmr 1098. *Cardiovasc Drugs Ther* (2003) **17**: pp. 435-441.

- Karow T & Lang-Roth R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. (2007) 15. Auflage Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag (2003) 4. Auflage
- Kassel DB. Applications of high-throughput adme in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* (2004) **8**: pp. 339-345.
- Kiehn J, Lacerda AE, Wible B & Brown AM. Molecular physiology and pharmacology of hERG single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* (1996) **94**: pp. 2572-2579.
- Kimes BW & Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* (1976) **98**: pp. 367-381.
- Køber L, Bloch Thomsen PE, Møller M, Torp-Pedersen C, Carlsen J, Sandøe E, Egstrup K, Agner E, Videbaek J, Marchant B, Camm AJ. Effect of dofetilide in patients with recent myocardial infarction and left-ventricular dysfunction: a randomised trial. *Lancet* (2000) **356**: pp. 2052-2058.
- Kohl P, Camelliti P, Burton FL & Smith GL. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol* (2005) **38**: pp. 45-50.
- Kong W, Fakhari N, Sharifov OF, Ideker RE, Smith WM & Fast VG. Optical measurements of intramural action potentials in isolated porcine hearts using optrodes. *Heart Rhythm* (2007) **4**: pp. 1430-1436.
- Krause E, Englert H & Gögelein H. Adenosine triphosphate-dependent K currents activated by metabolic inhibition in rat ventricular myocytes differ from those elicited by the channel opener rilmakalim. *Pflügers Arch* (1995) **429**: pp. 625-635.
- Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai C, Nakaya H & Furukawa T. Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human IKr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol* (2008) **586**: pp. 2961-2973.
- Kuryshev YA, Ficker E, Wang L, Hawryluk P, Dennis AT, Wible BA, Brown AM, Kang J, Chen X, Sawamura K, Reynolds W & Rampe D. Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) **312**: pp. 316-323.
- Lankipalli RS, Zhu T, Guo D & Yan G. Mechanisms underlying arrhythmogenesis in long QT syndrome. *J Electrocardiol* (2005) **38**: pp. 69-73.
- Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG & Valentin J. In vitro models of proarrhythmia. *Br J Pharmacol* (2008) **154**: pp. 1516-1522.
- Lazzara R. From first class to third class: recent upheaval in antiarrhythmic therapy--lessons from clinical trials. *Am J Cardiol* (1996) **78**: pp. 28-33.
- Le J, Ashley ED, Neuhauser MM, Brown J, Gentry C, Klepser ME, Marr AM, Schiller D, Schwiesow JN, Tice S, VandenBussche HL, Wood GC. Consensus summary of aerosolized antimicrobial agents: application of guideline criteria. insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy* (2010) **30**: pp. 562-584.

- Lee N, Authier S, Pugsley MK & Curtis MJ. The continuing evolution of torsades de pointes liability testing methods: is there an end in sight?. *Toxicol Appl Pharmacol* (2010) **243**: pp. 146-153.
- Liang H, Matzkies M, Schunkert H, Tang M, Bonnemeier H, Hescheler J & Reppel M. Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening. *Cell Physiol Biochem* (2010) **25**: pp. 459-466.
- Linz W, Klaus E, Albus U, Becker R, Mania D, Englert HC & Schölkens BA. Cardiovascular effects of the novel potassium channel opener (3s,4r)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)-6-phenylsulfonylechromane hemihydrate. *Arzneimittelforschung* (1992) **42**: pp. 1180-1185.
- Liu XK, Katchman A, Draci MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M & Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent qt and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* (1998) **285**: pp. 672-679.
- Lu HR, Vlamincx E, Teisman A & Gallacher DJ. Choice of cardiac tissue plays an important role in the evaluation of drug-induced prolongation of the qt interval in vitro in rabbit. *J Pharmacol Toxicol Methods* (2005) **52**: pp. 90-105.
- Luqman N, Sung RJ, Wang C & Kuo C. Myocardial ischemia and ventricular fibrillation: pathophysiology and clinical implications. *Int J Cardiol* (2007) **119**: pp. 283-290.
- Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD & Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* (1993) **270**: pp. 2590-2597.
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M & Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* (1994) **75**: pp. 233-244.
- Mani S, Kocheril AG & Andriole VT. Case report: pentamidine and polymorphic ventricular tachycardia revisited. *Am J Med Sci* (1993) **305**: pp. 236-240.
- Mannhold R. Katp channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev* (2004) **24**: pp. 213-266.
- Martin RL, McDermott JS, Salmen HJ, Palmatier J, Cox BF & Gintant GA. The utility of hERG and repolarization assays in evaluating delayed cardiac repolarization: influence of multi-channel block. *J Cardiovasc Pharmacol* (2004) **43**: pp. 369-379.
- Mejía-Alvarez R, Tomaselli GF & Marban E. Simultaneous expression of cardiac and skeletal muscle isoforms of the l-type Ca^{2+} channel in a rat heart muscle cell line. *J Physiol* (1994) **478** (Pt 2): pp. 315-329.
- Meyer T, Stuerz K, Guenther E, Edamura M & Kraushaar U. Cardiac slices as a predictive tool for arrhythmogenic potential of drugs and chemicals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2010) **6**: pp. 1461-1475.

- Michels G, Er F, Eicks M, Herzig S & Hoppe UC. Long-term and immediate effect of testosterone on single t-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* (2006) **147**: pp. 5160-5169.
- Mitcheson JS, Hancox JC & Levi AJ. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflugers Arch* (1996) **431**: pp. 814-827.
- Mitcheson JS, Hancox JC & Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* (1998) **39**: pp. 280-300.
- Morrison TB, Weis JJ & Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous sybr green i monitoring during amplification. *Biotechniques* (1998) **24**: p. 954-8, 960, 962.
- Morrow AG, Reitz BA, Epstein SE, Henry WL, Conkle DM, Itscoitz SB & Redwood DR. Operative treatment in hypertrophic subaortic stenosis. techniques, and the results of pre and postoperative assessments in 83 patients. *Circulation* (1975) **52**: pp. 88-102.
- MORTON HJ, MORGAN JF & PARKER RC. Nutrition of animal cells in tissue culture; use of tweens in synthetic feeding mixtures. *Proc Soc Exp Biol Med* (1950) **74**: pp. 22-26.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983) **65**: pp. 55-63.
- Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM & Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* (1989) **65**: pp. 1441-1449.
- Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y & Hazama H. Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17beta-estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* (1999) **127**: pp. 429-440.
- Nash MP, Bradley CP, Sutton PM, Clayton RH, Kallis P, Hayward MP, Paterson DJ & Taggart P. Whole heart action potential duration restitution properties in cardiac patients: a combined clinical and modelling study. *Exp Physiol* (2006) **91**: pp. 339-354.
- Nattel S, Duker G & Carlsson L. Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drugs. *Prog Biophys Mol Biol* (2008) **98**: pp. 328-339.
- Nerbonne JM & Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* (2005) **85**: pp. 1205-1253.
- Nerbonne JM. Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms?. *Trends Cardiovasc Med* (2004) **14**: pp. 83-93.
- Nichol JW, Engelmayr GCJ, Cheng M & Freed LE. Co-culture induces alignment in engineered cardiac constructs via mmp-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **373**: pp. 360-365.

- Nichols CG. Katp channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* (2006) **440**: pp. 470-476.
- Niwa N & Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (i(to)) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **48**: pp. 12-25.
- Noma A. Atp-regulated k⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* (1983) **305**: pp. 147-148.
- Owens RCJ. Qt prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance. *Drugs* (2004) **64**: pp. 1091-1124.
- Pabbathi VK, Zhang YH, Mitcheson JS, Hinde AK, Perchenet L, Arberry LA, Levi AJ & Hancox JC. Comparison of na(+)/ca(2+) exchanger current and of its response to isoproterenol between acutely isolated and short-term cultured adult ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) **297**: pp. 302-308.
- Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, Kääb S, Tomaselli GF, Marban E & Kass DA. Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* (1997) **30**: pp. 576-584.
- Parrish AR, Gandolfi AJ & Brendel K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* (1995) **57**: pp. 1887-1901.
- Patel SP & Campbell DL. Transient outward potassium current, 'ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* (2005) **569**: pp. 7-39.
- Pearson RD & Hewlett EL. Pentamidine for the treatment of pneumocystis carinii pneumonia and other protozoal diseases. *Ann Intern Med* (1985) **103**: pp. 782-786.
- Pedrotty DM, Klinger RY, Kirkton RD & Bursac N. Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* (2009) **83**: pp. 688-697.
- Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA & Roederer M. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods* (2006) **313**: pp. 199-208.
- Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JI & Hill AP. Human ether-a-go-go related gene (herg) k⁺ channels: function and dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol* (2008) **98**: pp. 137-148.
- Pillekamp F, Halbach M, Reppel M, Rubenchyk O, Pfannkuche K, Xi J, Bloch W, Sreeram N, Brockmeier K & Hescheler J. Neonatal murine heart slices. a robust model to study ventricular isometric contractions. *Cell Physiol Biochem* (2007) **20**: pp. 837-846.
- Pillekamp F, Reppel M, Dinkelacker V, Duan Y, Jazmati N, Bloch W, Brockmeier K, Hescheler J, Fleischmann BK & Koehling R. Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem* (2005) **16**: pp. 127-132.
- Piper HM, Siegmund B & Schlüter KD. Prevention of the oxygen paradox in the isolated cardiomyocyte and the whole heart. *Am J Cardiovasc Pathol* (1992) **4**: pp. 115-122.

- Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res* (2000) **45**: pp. 123-127.
- Polder HR, Weskamp M, Linz K & Meyer R. Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques aus *Practical Methods in Cardiovascular Research* von Dhein, S, Mohr, FW; Delmar, M; (2005) **3.4**: pp. 272-323
- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R & Cappelletti D. Risk stratification in the long-qt syndrome. *N Engl J Med* (2003) **348**: pp. 1866-1874.
- Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, Freed LE & Vunjak-Novakovic G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**: pp. 18129-18134.
- Rajamani S, Eckhardt LL, Valdivia CR, Klemens CA, Gillman BM, Anderson CL, Holzem KM, Delisle BP, Anson BD, Makielski JC & January CT. Drug-induced long qt syndrome: herg k⁺ channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine. *Br J Pharmacol* (2006) **149**: pp. 481-489.
- Rampe D, Roy ML, Dennis A & Brown AM. A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel herg. *FEBS Lett* (1997) **417**: pp. 28-32.
- Raschi E, Ceccarini L, De Ponti F & Recanatini M. Herg-related drug toxicity and models for predicting herg liability and qt prolongation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2009) **5**: pp. 1005-1021.
- Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R & Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic qt interval with age. *Can J Cardiol* (1992) **8**: pp. 690-695.
- Ravens U. [electrophysiological properties of stem cells]. *Herz* (2006) **31**: pp. 123-126.
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PKS, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ & Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical qt interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* (2003) **58**: pp. 32-45.
- Redpath CJ, Rankin AC, Kane KA & Workman AJ. Anti-adrenergic effects of endothelin on human atrial action potentials are potentially anti-arrhythmic. *J Mol Cell Cardiol* (2006) **40**: pp. 717-724.
- Rehm H. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag* (2002) 4. Auflage
- Reppel M, Igelmund P, Egert U, Juchelka F, Hescheler J & Drobinskaya I. Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* (2007) **19**: pp. 213-224.

- Riccioppo Neto F, Mesquita Júnior O & Olivera GB. Antiarrhythmic and electrophysiological effects of the novel katp channel opener, rilmakalim, in rabbit cardiac cells. *Gen Pharmacol* (1997) **29**: pp. 201-205.
- Rohr S. Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias?. *Heart Rhythm* (2009) **6**: pp. 848-856.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE & McKinnon D. Regulation of kchip2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* (2001) **533**: pp. 119-125.
- Rosenbaum DS, Kaplan DT, Kanai A, Jackson L, Garan H, Cohen RJ & Salama G. Repolarization inhomogeneities in ventricular myocardium change dynamically with abrupt cycle length shortening. *Circulation* (1991) **84**: pp. 1333-1345.
- Schackow TE, Decker RS & Ten Eick RE. Electrophysiology of adult cat cardiac ventricular myocytes: changes during primary culture. *Am J Physiol* (1995) **268**: p. C1002-17.
- Schneider MM, Hoepelman AI, Eeftinck Schattenkerk JK, Nielsen TL, van der Graaf Y, Frissen JP, van der Ende IM, Kolsters AF & Borleffs JC. A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against pneumocystis carinii pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. the dutch aids treatment group. *N Engl J Med* (1992) **327**: pp. 1836-1841.
- Sellin LC & McArdle JJ. Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime. *Pharmacol Toxicol* (1994) **74**: pp. 305-313.
- Sicouri S, Glass A, Ferreira M & Antzelevitch C. Transseptal dispersion of repolarization and its role in the development of torsade de pointes arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2010) **21**: pp. 441-447.
- So PP, Hu X, Backx PH, Puglisi JL & Dorian P. Blockade of iks by hmr 1556 increases the reverse rate-dependence of refractoriness prolongation by dofetilide in isolated rabbit ventricles. *Br J Pharmacol* (2006) **148**: pp. 255-263.
- Soltysinska E, Olesen S, Christ T, Wettwer E, Varró A, Grunnet M & Jespersen T. Transmural expression of ion channels and transporters in human nondiseased and end-stage failing hearts. *Pflugers Arch* (2009) **459**: pp. 11-23.
- Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2009. (2011) Fachserie 12, Reihe 4
- Stoppini L, Buchs PA & Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* (1991) **37**: pp. 173-182.
- Strom M, Wan X, Poelzing S, Ficker E & Rosenbaum DS. Gap junction heterogeneity as mechanism for electrophysiologically distinct properties across the ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2010) **298**: p. H787-94.
- Su X, Young EWK, Underkofler HAS, Kamp TJ, January CT & Beebe DJ. Microfluidic cell culture and its application in high-throughput drug screening: cardiotoxicity assay for hERG channels. *J Biomol Screen* (2011) **16**: pp. 101-111.

- Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marbán E & Nakaya H. Role of sarcolemmal k(atp) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* (2002) **109**: pp. 509-516.
- Suzuki Y, Yeung AC & Ikeno F. The pre-clinical animal model in the translational research of interventional cardiology. *JACC Cardiovasc Interv* (2009) **2**: pp. 373-383.
- Taggart P & Lab M. Cardiac mechano-electric feedback and electrical restitution in humans. *Prog Biophys Mol Biol* (2008) **97**: pp. 452-460.
- Taggart P, Sutton PM, Opthof T, Coronel R, Trimlett R, Pugsley W & Kallis P. Transmural repolarisation in the left ventricle in humans during normoxia and ischaemia. *Cardiovasc Res* (2001) **50**: pp. 454-462.
- Tanabe S, Hata T & Hiraoka M. Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* (1999) **277**: p. H826-33.
- Tanaka H, Komikado C, Namekata I, Nakamura H, Suzuki M, Tsuneoka Y, Shigenobu K & Takahara A. Species difference in the contribution of t-type calcium current to cardiac pacemaking as revealed by r(-)-efonidipine. *J Pharmacol Sci* (2008) **107**: pp. 99-102.
- Tanaka H, Namekata I, Nouchi H, Shigenobu K, Kawanishi T & Takahara A. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: diversity in the excitation-contraction mechanisms of the heart. *J Pharmacol Sci* (2009) **109**: pp. 327-333.
- Tandon N, Cannizzaro C, Chao PG, Maidhof R, Marsano A, Au HTH, Radisic M & Vunjak-Novakovic G. Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nat Protoc* (2009) **4**: pp. 155-173.
- Terlau H & Stühmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* (1998) **85**: pp. 437-444.
- Thomas D, Karle CA & Kiehn J. The cardiac hERG/IKr potassium channel as pharmacological target: structure, function, regulation, and clinical applications. *Curr Pharm Des* (2006) **12**: pp. 2271-2283.
- Thum T & Borlak J. Isolation and cultivation of Ca²⁺ tolerant cardiomyocytes from the adult rat: improvements and applications. *Xenobiotica* (2000) **30**: pp. 1063-1077.
- Torp-Pedersen C, Møller M, Bloch-Thomsen PE, Køber L, Sandøe E, Egstrup K, Agner E, Carlsen J, Videbaek J, Marchant B & Camm AJ. Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. Danish investigations of arrhythmia and mortality on dofetilide study group. *N Engl J Med* (1999) **341**: pp. 857-865.
- Triggle DJ. L-type calcium channels. *Curr Pharm Des* (2006) **12**: pp. 443-457.
- Tsujimae K, Suzuki S, Murakami S & Kurachi Y. Frequency-dependent effects of various IKr blockers on cardiac action potential duration in a human atrial model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2007) **293**: p. H660-9.

- Van Deuren B, Van Ammel K, Somers Y, Cools F, Straetemans R, van der Linde HJ & Gallacher DJ. The fentanyl/etomidate-anaesthetised beagle (feab) dog: a versatile in vivo model in cardiovascular safety research. *J Pharmacol Toxicol Methods* (2009) **60**: pp. 11-23.
- Varró A, Lathrop DA, Hester SB, Nánási PP & Papp JG. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* (1993) **88**: pp. 93-102.
- Vaughan Williams EM. Classifying antiarrhythmic actions: by facts or speculation. *J Clin Pharmacol* (1992) **32**: pp. 964-977.
- Vickers AEM & Fisher RL. Organ slices for the evaluation of human drug toxicity. *Chem Biol Interact* (2004) **150**: pp. 87-96.
- Viero C, Kraushaar U, Ruppenthal S, Kaestner L & Lipp P. A primary culture system for sustained expression of a calcium sensor in preserved adult rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* (2008) **43**: pp. 59-71.
- Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spätjens RLHMG, Beekman JDM, Sipido KR & Vos MA. Probing the contribution of I_{Kr} to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* (2003) **107**: pp. 2753-2760.
- Waldeyer C, Fabritz L, Fortmueller L, Gerss J, Damke D, Blana A, Laakmann S, Kreienkamp N, Volkery D, Breithardt G & Kirchhof P. Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 langendorff-perfused mouse hearts. *Basic Res Cardiol* (2009) **104**: pp. 523-533.
- Wang D, Patel C, Cui C & Yan G. Preclinical assessment of drug-induced proarrhythmias: role of the arterially perfused rabbit left ventricular wedge preparation. *Pharmacol Ther* (2008) **119**: pp. 141-151.
- Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS & Duff HJ. Developmental changes in the delayed rectifier K^+ channels in mouse heart. *Circ Res* (1996) **79**: pp. 79-85.
- Wang W, Watanabe M, Nakamura T, Kudo Y & Ochi R. Properties and expression of Ca^{2+} -activated K^+ channels in h9c2 cells derived from rat ventricle. *Am J Physiol* (1999) **276**: p. H1559-66.
- Wettwer E, Christ T, Dobrev D & Ravens U. Kardiale zelluläre Elektrophysiologie. *Herzschr Elektrophys* (2003) **14**: pp. 50-60
- White SM, Constantin PE & Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured hl-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) **286**: p. H823-9.
- Wible BA, Hawryluk P, Ficker E, Kuryshev YA, Kirsch G & Brown AM. Herg-lite: a novel comprehensive high-throughput screen for drug-induced hERG risk. *J Pharmacol Toxicol Methods* (2005) **52**: pp. 136-145.
- Witchel HJ, Milnes JT, Mitcheson JS & Hancox JC. Troubleshooting problems with in vitro screening of drugs for QT interval prolongation using hERG K^+ channels expressed in mammalian cell lines and xenopus oocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* (2002) **48**: pp. 65-80.

- Wlodkowic D, Skommer J & Darzynkiewicz Z. Syto probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry A* (2008) **73**: pp. 496-507.
- Woosley RL. Cardiac actions of antihistamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1996) **36**: pp. 233-252.
- Workman AJ, Kane KA & Rankin AC. Cellular bases for human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* (2008) **5**: p. S1-6.
- Workman AJ. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2010) **381**: pp. 235-249.
- World Health Organization. The Top Ten Causes of Death 2004. (Nov 2008) Fact Sheet No. 310
- Wu Y, Carlsson L, Liu T, Kowey PR & Yan G. Assessment of the proarrhythmic potential of the novel antiarrhythmic agent azd7009 and dofetilide in experimental models of torsades de pointes. *J Cardiovasc Electrophysiol* (2005) **16**: pp. 898-904.
- Xiao YF & McArdle JJ. Effects of 2,3-butanedione monoxime on blood pressure, myocardial Ca^{2+} currents, and action potentials of rats. *Am J Hypertens* (1995) **8**: pp. 1232-1240.
- Yan GX & Antzelevitch C. Cellular basis for the electrocardiographic j wave. *Circulation* (1996) **93**: pp. 372-379.
- Yan GX, Shimizu W & Antzelevitch C. Characteristics and distribution of m cells in arterially perfused canine left ventricular wedge preparations. *Circulation* (1998) **98**: pp. 1921-1927.
- Yang Z, Shen W, Rottman JN, Wikswo JP & Murray KT. Rapid stimulation causes electrical remodeling in cultured atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2005) **38**: pp. 299-308.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T & Sperelakis N. Antisense oligodeoxynucleotides of sulfonylurea receptors inhibit atp-sensitive K^{+} channels in cultured neonatal rat ventricular cells. *Pflügers Arch* (1999) **437**: pp. 400-408.
- Zhang H, Flagg TP & Nichols CG. Cardiac sarcolemmal $K(AtP)$ channels: latest twists in a questing tale!. *J Mol Cell Cardiol* (2010) **48**: pp. 71-75.
- Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA & Kamp TJ. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* (2009) **104**: p. e30-41.
- Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H & Xiao RP. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2000) **279**: p. H429-36.
- Zicha S, Moss I, Allen B, Varro A, Papp J, Dumaine R, Antzelevich C & Nattel S. Molecular basis of species-specific expression of repolarizing K^{+} currents in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) **285**: p. H1641-9.

Zimmermann M, Lampe J, Lange S, Smirnow I, Königsrainer A, Hann-von-Weyhern C, Fend F, Gregor M, Bitzer M & Lauer UM. Improved reproducibility in preparing precision-cut liver tissue slices. *Cytotechnology* (2009) **61**: pp. 145-152.

Zingman LV, Alekseev AE, Hodgson-Zingman DM & Terzic A. Atp-sensitive potassium channels: metabolic sensing and cardioprotection. *J Appl Physiol* (2007) **103**: pp. 1888-1893.

Zwi-Dantsis L, Mizrahi I, Arbel G, Gepstein A & Gepstein L. Scalable production of cardiomyocytes derived from c-myc free induced pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part A* (2011)

Abkürzungsverzeichnis

ABCC9	ATP-bindende Kasette, Sub-Familie C Typ 9
AD/DA-Wandler	Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler
ANOVA	Analyse der Varianz
AP	Aktionspotential
APA	Aktionspotentialamplitude
APD ₂₀	Zeitpunkt der 20%igen Repolarisation des Aktionspotentials
APD ₉₀	Zeitpunkt der 90%igen Repolarisation des Aktionspotentials
AV-Knoten	atrioventrikulärer Knoten
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
Ca _v	spannungsabhängiger Kalziumkanal
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxy-Adenosin-Tri-Phosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Tri-Phosphat
dGTP	Desoxy-Guanin-Tri-Phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymidin-Tri-Phosphat
EAD	frühe Nachdepolarisation („early afterdepolarisation“)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EKG	Elektrokardiogramm
ERC	elektrische Restitutionskurve
HE	Hämatoxylin & Eosin
HEK-Zelllinie	humane embryonale Nieren-(„kidney“)-Zelllinie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
hERG	humanes “ether-a-go-go”-verwandtes (“related”) Genprodukt
I _{Ca,L}	Kalziumstrom des L-Typs
I _{Ca,T}	Kalziumstrom des T-Typs
ICH S7B	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Richtlinie S7B

I_K	repolarisierender Kaliumstrom
I_{KATP}	ATP-abhängiger Kaliumstrom
I_{Kr}	schnell („rapid“) aktivierende Komponente des I_K
I_{Ks}	langsam („slow“) aktivierende Komponente des I_K
I_{Kur}	sehr schnell („ultra-rapid“) aktivierende Komponente des I_K
I_{Na}	Natriumstrom
I_{to}	transienter Auswärts-(„outward“)-Kaliumstrom
ITS	Insulin/Transferrin/Selen
KChIP	K_v -Kanal („Channel“) interagierendes Protein
K_{ir}	einwärtsgleichgerichteter („inward rectifier“) Kaliumkanal
K_v	spannungsabhängiger Kaliumkanal
M199	Medium 199
max. dV/dt	maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials
MEA	Mikroelektroden-Array
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotids
Na_v	spannungsabhängiger Natriumkanal
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
pH	potentium hydrogenii
PI	Propidiumiodid
qPCR	quantitative PCR
QT _c -Zeit	auf die Schlagfrequenz korrigierte Zeit zwischen Q-Zacke und T-Welle im EKG
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion
SERCA	sarko-/endoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
siRNA	kleine eingreifende („small interfering“) RNA
SUR2A	Sulfonylharnstoffrezeptor Typ 2A
TdP	Torsade des Pointes
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Terlau und Prof. Dendorfer für die Vergabe dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihren Laboren durchführen zu können. Ich möchte mich für die anregenden Diskussionen, die Hilfe beim Planen der Versuche und speziell bei Prof. Terlau für die Hinweise beim Erstellen dieser Dissertationsschrift bedanken.

Herrn Prof. Dominiak danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Gudrun Vierke bedanke ich mich für die Durchführung der PCRs und bei Beate Lembrich für das sorgfältige und immer verlässliche Vorbereiten der Versuche. Ines Stölting und Klaus Tempel danke ich für die Unterstützung im Umgang mit den Versuchstieren.

Allen Mitarbeitern der Pharmakologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die bereitwillige Hilfe bei theoretischen und technischen Problemen danken.

Ferner danke ich den beteiligten Mitarbeitern der Herzchirurgie in Lübeck und in Hamburg für die entstandenen Kooperationen, die die Durchführung der Experimente erst ermöglichten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Matthias Brandenburger. Die vielen gemeinsamen Gespräche, Ideen und Versuchsplanungen waren mir eine Freude.

Meiner Frau Liv Wenzel danke ich innig für ihre Liebe, fortwährende Unterstützung und unermüdliche Motivation. Meinen Töchtern Amélie und Lilith danke ich für ihre bezaubernde Fröhlichkeit und den immer wieder überraschenden Blick auf die Welt, der meinen grundlegend verändert hat. Ich liebe Euch!

Veröffentlichungen

Veröffentlichte Kurzfassungen:

Wenzel J, Jöhren O, Blischke A, Dendorfer A, Dominiak P (2006) Orexin stimulates the expression of 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human adrenocortical cells. *N-S Arch Pharmacol* 372, p70

Jöhren O, Wenzel J, Blischke A, Dendorfer A, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P (2006) Orexins Selectively Increase the Expression of 21-Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Human Adrenocortical Cells. *ENDO2006*, P1-59, p175

Jöhren O, Wenzel J, Blischke A, Dendorfer A, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P (2006) Orexin A stimulates cortisol secretion through increased expression of 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human adrenocortical cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114, S4

Knopp CA, Dendorfer A, Wenzel J, Terlau H, Dominiak P, Jöhren O (2008) Isolation and characterization of a novel dominant-negative splice variant of the human orexin type-2 receptor. *N-S Arch Pharmacol* 377, p17

Wenzel J, Brandenburger M, Richardt D, Bogdan R, Reppel M, Hescheler J, Dendorfer A, Terlau H (2009) Funktionelle humane adulte ventrikuläre Herzschnitte - Entwicklung eines neuen Modellsystems. *Clin Res Cardiol* 98, Suppl 2, P87

Wenzel J, Brandenburger M, Richardt D, Bogdan R, Reppel M, Hescheler J, Dendorfer A, Terlau H (2010) Physiological and pharmacological studies on adult human ventricular slices: Electrophysiology. *N-S Arch Pharmacol* 381, p53

Wenzel J, Brandenburger M, Richardt D, Bogdan R, Reppel M, Hescheler J, Dendorfer A, Terlau H (2010) An electrophysiological long-term model of human adult myocardium. *Cardiovasc Res* 87, p106

Brandenburger M, Wenzel J, Richardt D, Bogdan R, Reppel M, Hescheler J, Terlau H, Dendorfer A (2010) Establishment of organotypic slice cultures from human myocardium. *Cardiovasc Res* 87, p46

Grunow B, Wenzel J, Gebert M, Kruse C (2010) *In vitro* generated autonomously contracting cardiomyocytes from rainbow trout as a model system for human heart research. *Journal of Biotechnology*, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Pages 6-7

Veröffentlichte Originalarbeiten:

Wenzel J, Grabinski N, Knopp CA, Dendorfer A, Ramanjaneya M, Randeva HS, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P, Jöhren O (2009) Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *AJP – Reg Integr Comp Physiol* 297, R1601-R1609

Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H, Klein J (2010) Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab.* 12(2):158-66

Grunow B, Wenzel J, Terlau H, Langner S, Gebert M, Kruse C (2011) *In vitro* Developed Spontaneously Contracting Cardiomyocytes from Rainbow Trout as a Model System for Human Heart Research. *Cell Physiol Biochem.* 27:01-12