

**Rolle des CYP-Epoxygenase Pathways bei der Vermittlung der kardioprotektiven
und antiarrhythmischen Wirkung von Omega-3 Fettsäuren**

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

M.Ed., Tim Wesser geb. Hoppenheit

2022

Die Dissertation wurde bei der OMEICOS Therapeutics GmbH in Kooperation und unter der Leitung von Herrn Dr. Wolf-Hagen Schunck am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in der Zeit von März 2019 bis Oktober 2022 erstellt.

Gutachter/innen

1. Gutachter*in: Prof. Dr. Oliver Daumke
2. Gutachter*in: Prof. Dr. Dominik Müller,

Disputation am: 03.03.2023

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation erstmalig einreiche, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tim Wesser

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dominik Müller und Herrn Prof. Dr. Oliver Daumke für die Annahme meiner Promotion und bei der OMEICOS Therapeutics GmbH für die Möglichkeit, meine Promotion im Rahmen meiner Anstellung zu erstellen, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolf-Hagen Schunck und den MitarbeiterInnen seiner Arbeitsgruppe – *Cytochrom P450 Eicosanoide* – für die ausdauernde Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit. Der Umfang des methodischen Wissens von Herrn Dr. Schunck war ebenso beeindruckend wie sein globaler Einblick in die wissenschaftliche Literatur.

Herrn Dr. Gerd Wallukat als auch Frau Dr. Sabine Bartel gilt mein Dank für die Einführung in die Präparation und Verwendung des Schlagfrequenz-Assays, auf deren Grundlage die Validierung des Assays beruhte und diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Dem gesamten Team von OMEICOS Therapeutics möchte ich für die großartige Zeit danken, in der ich viel Neues lernen durfte und die Zeit und den Raum erhalten habe, um über mich hinauszuwachsen. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle Herr Dr. Robert Fischer, dessen Vertrauen diese Arbeit erst möglich gemacht hat und Frau Dr. Karen Uhlmann, die es geschafft hat, die diplomatische Seite in mir zu fördern. Frau Dr. Anne Konkel und Frau Dr. Janine Lossie möchte ich für die großartige gemeinsame Gestaltung innerhalb von OMEICOS danken. Wir konnten zusammen viele Ideen mit Leben füllen. Den WissenschaftlerInnen Dr. Saskia Scholz, Dr. Kathrin Göldner und Dr. Ulf Harnack möchte ich für den spannenden Einblick in die Immunologie danken. Den technischen Assistentinnen Anja Conrad, Jacqueline Klewer, Hanna Bockmeyer, Ulrike Borgmeier, Ramona Zummach und Christel Andree möchte ich für die stetige technische Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten danken. Die methodischen Erfahrungen waren immer unschätzbar wertvoll.

Inhaltsverzeichnis

Eigenständigkeitserklärung	III
Danksagung	IV
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Evidenz für die Wirksamkeit von Omega-3-Fettsäuren.....	2
1.2 Kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von Omega-3-Fettsäuren.....	5
1.3 Zellulärer Wirkmechanismus der Omega-3-Epoxyeicosanoide 17,18-EEQ und 19,20-EDP	9
1.4 Bedeutung eines stabilen 17,18-EEQ Analogons.....	10
1.5 Das kardiale Aktionspotenzial.....	12
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Isolation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	17
2.1.1 Isolation von NRKM.....	17
2.1.2 Kultivierung von NRKM	19
2.2 Genexpressionsanalyse.....	20
2.2.1 RNA Isolation	20
2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA	21
2.2.3 cDNA Synthese.....	21
2.2.4 RT-PCR.....	21
2.3 Proteinanalytik.....	23
2.3.1 Western Blot	23
2.3.2 Cisbio Assay	27
2.3.3 PI3K Aktivitäts-Assay	27
2.4 Lentivirale Transduktion	28
2.4.1 Amplifikation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	29
2.4.2 Amplifikation von Lentiviren	31
2.4.3 Bestimmung des viralen Titers	31

2.5	Schlagfrequenz-Assay	32
2.6	Nachweis der Bildung von Epoxyeicosanoiden in NRKM.....	34
2.7	Elektrophysiologische Untersuchung in NRKM.....	35
2.8	Ca ²⁺ -Transient- und Kontraktilitäts-Messungen in NRKM	37
2.9	Statistik.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Validierung des Schlagfrequenz-Assay.....	42
3.1.1	Basale Schlagfrequenz	43
3.1.2	Zeitabhängige Wirkung von Ethanol, 17,18-EEQ und C4	43
3.1.3	Validierung des Effekts von Ethanol, 17,18-EEQ und C4	46
	Validierung des Effekts von Ethanol.....	46
	Validierung des Effekts von 17,18-EEQ	47
	Validierung des Effekts von C4	48
3.1.4	Zusammenfassende Darstellung und Anwendung der Validitätskriterien des Schlagfrequenz-Assays	50
3.2	Ist für die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren deren Umwandlung in CYP-Epoxyeicosanoide notwendig?.....	51
3.2.1	Nachweis der Bildung von Epoxyeicosanoiden in NRKM	51
3.2.2	Nachweis der CYP-Epoxygenasen	52
3.2.3	Untersuchung des Effekts von EPA, 17,18-EEQ und C4	53
3.2.4	Untersuchung des Effekts von DHA und 19,20-EDP.....	55
3.3	Über welche molekularen Eigenschaften muss ein wirksames 17,18-EEQ Analog verfügen?	58
3.4	Welcher intrazelluläre Signalweg wird von 17,18-EEQ und C4 aktiviert?	60
3.4.1	Identifizierung von Rezeptorkomponenten.....	60
3.4.2	Bedeutung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K).....	64
3.4.3	Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT).....	66
3.4.4	Aktivierung der NO-Synthase.....	68
3.4.5	Einfluss der Proteinkinasen A (PKA), C (PKC) und G (PKG)	69

3.5	Wie kann die antiarrhythmische und kardioprotektive Wirkung von C4 erklärt werden?	72
3.5.1	Bedeutung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle	72
3.5.2	Untersuchung der elektrischen Erregbarkeit und der Refraktärzeit	73
3.5.3	Untersuchung der Kontraktilität und des Ca ²⁺ -Transienten.....	74
3.5.4	Phosphorylierung von Phospholamban und des Ryanodin-Rezeptors	77
4	Diskussion.....	81
4.1	Das Schlagfrequenz-Assays kann für die Untersuchung von Epoxyeicosanoiden und stabilen Analoga verwendet werden	81
4.2	Die Umwandlung von Omega-3-Fettsäuren in deren CYP-Epoxyeicosanoide ist notwendig	84
4.3	C4 verfügt über die optimalen Eigenschaften eines wirksamen 17,18-EEQ Analogs.....	86
4.4	17,18-EEQ und C4 aktivieren einen zellprotektiven Signalweg.....	88
4.4.1	Die zelluläre Zielstruktur von 17,18-EEQ und C4 bleibt unbekannt....	88
4.4.2	Der kardioprotektive Effekt von 17,18-EEQ und C4 wird über den PI3K/AKT/eNOS/PKG-Signalweg vermittelt	89
4.5	Der kardioprotektive und antiarrhythmische Effekt von C4 resultiert aus der Modulation der intrazellulären Ionenhomöostase	92
4.5.1	C4 aktiviert die sarcK _{ATP} - und mitoK _{ATP} -Kanäle	92
4.5.2	C4 führt vermutlich zu einer Hyperpolarisation	93
4.5.3	C4 führt zu einer Modulation des Ca ²⁺ -Handlings	94
4.5.4	C4 führt zu einer erhöhten SERCA- aber nicht zu einer veränderten RyR2-Aktivität.....	96
4.6	17,18-EEQ und C4 wirken über einen komplexen intrazellulären Regulationsmechanismus	97

Ausblick	99
Literaturverzeichnis	101
Abbildungsverzeichnis	112
Tabellenverzeichnis	114
Formelverzeichnis	114
Publikationen	115
Posterbeiträge	115
Abkürzungsverzeichnis	116

Zusammenfassung

Hintergrund:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bildung und Wirkungsweise von Omega-3 Epoxyeicosanoiden, einer neuen Klasse bioaktiver Lipidmediatoren, die durch Cytochrom P450 Enzyme (CYP) aus langkettigen Omega-3 Fettsäuren gebildet werden.

Hypothesen und Zielstellung:

Es wird vermutet, dass die Omega-3 Epoxyeicosanoide die kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekte der im Fischöl enthaltenen Omega-3 Fettsäuren, insbesondere der Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), vermitteln. Bei den infrage kommenden Metaboliten handelt es sich um 17,18-Epoxyeicosatetraensäure (17,18-EEQ) und 19,20-Epoxydocosapentaensäure (19,20-EDP). Dementsprechend sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob 17,18-EEQ selbst über die gewünschten kardioprotektiven und antiarrhythmischen Eigenschaften verfügt, die sonst EPA zugeschrieben wird. Darüber hinaus sollten erste Untersuchungen zum Verständnis der beteiligten Signalwege durchgeführt werden. Ein weiteres wesentliches Ziel war die Identifizierung von metabolisch stabilen, synthetischen 17,18-EEQ Analoga für eine zukünftige klinische Anwendung.

Methoden:

Zur Erreichung dieser Ziele wurde ein in der Literatur bereits beschriebenes Zellmodell zur Analyse der kardioprotektiven und antiarrhythmischen Eigenschaften von Omega-3 Fettsäuren aufgebaut und nach detaillierter Validierung angewendet. Es handelt sich um ein Schlagfrequenz-Assay, der mit isolierten, spontan schlagenden neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM) durchgeführt wird. Der Hauptweg zur Identifizierung der Signaltransduktionskomponenten waren pharmakologische Interventionsstudien.

Ergebnisse:

Die Schlagfrequenz der NRKMs wurde durch 17,18-EEQ und deren getesteten synthetischen Analoga innerhalb weniger Minuten reduziert. Dieser negativ chronotrope Effekt stellte einen Surrogatmarker für die kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekte der Epoxyeicosanoide dar. Unter den validierten Bedingungen wurde für 17,18-EEQ eine halbmaximale Wirkungskonzentration (EC_{50}) von 11,96 nM und ein

maximaler negativ chronotroper Effekt von -28,93 Schlägen pro Minute (bpm) ermittelt. Im Gegensatz dazu trat der negativ chronotrope Effekt von EPA erst nach einer Inkubation von über 30 min auf und erreichte bei einem EC₅₀ von 2342 nM in etwa die gleiche Schlagfrequenzreduktion. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition von CYP-Epoxygenasen durch den Wirkstoff MS-PPOH zum Verlust der Wirkung von EPA, aber nicht von 17,18-EEQ führte.

Im Ergebnis der Struktur-Funktions-Analyse von 17,18-EEQ wurde die Compound 4 (C4) identifiziert, die sich gegenüber 17,18-EEQ durch einen verbesserten EC₅₀ (1,41 nM) und einem erhöhten negativ chronotropen Effekt (-36,70 bpm) auszeichnete. Gegenüber 17,18-EEQ enthält C4 nur eine Doppelbindung (11,12-Position), die Epoxygruppe ist durch ein Bioisostere (Oxamid-Gruppe) ersetzt und eine weitere Modifikation (3-Oxa-Gruppe) dient zur Verhinderung der β -Oxidation und des Membraneinbaus.

Die Beteiligung des PI3K/AKT/eNOS/PKG Signalwegs sowie ATP-abhängiger Kalium-Kanäle (K_{ATP}) konnte am Effekt von 17,18-EEQ und C4 mittels pharmakologischer Inhibitionen identifiziert werden. Primäre Zielstruktur ist möglicherweise ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), da die Behandlung der NRKMs mit Pertussis Toxin sowie der lentivirale Knockdown von Filamin A zum Verlust der Wirksamkeit von 17,18-EEQ und C4 führten. C4 reduzierte im NRKM-Assay zudem signifikant die elektrische Erregbarkeit, sowie die Ca²⁺-Transientenamplitude im Vergleich zum Vehikel.

Schlussfolgerungen:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Hypothese, dass Omega-3 Epoxyeicosanoide die eigentlichen Vermittler der kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekte von Omega-3 Fettsäuren sind. Die Wirkung umfasst Veränderungen im Ca²⁺-Stoffwechsel und der elektrischen Erregbarkeit von Kardiomyozyten. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer GPCR vermittelten Aktivierung des PI3K/AKT/eNOS/PKG Signalweges sowie von K_{ATP}-Kanälen. Mit C4 konnte ein biologisch hochaktives und metabolisch stabiles 17,18-EEQ Analog identifiziert werden. Tatsächlich erwies sich C4 in weiterführenden Untersuchungen der OMEICOS Therapeutics GmbH auch in anderen präklinischen Modellen als therapeutisch wirksam und steht jetzt für erste klinische Anwendungen zur Verfügung.

Summary

Background:

The present work focuses on the formation and mode of action of omega-3 epoxyeicosanoids, a new class of bioactive lipid mediators formed by cytochrome P450 enzymes (CYP) from long-chain omega-3 fatty acids.

Hypotheses and Objectives:

Omega-3 epoxyeicosanoids are thought to mediate the cardioprotective and antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids present in fish oil, particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The metabolites in question are 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid (17,18-EEQ) and 19,20-epoxydocosapentaenoic acid (19,20-EDP). Accordingly, the present work aimed to test the hypothesis that 17,18-EEQ itself possesses the desired cardioprotective and antiarrhythmic properties otherwise attributed to EPA. In addition, initial studies were to be performed to understand the signaling pathways involved. Another major goal was to identify metabolically stable, synthetic 17,18-EEQ analogues for future clinical applications.

Methods:

To achieve these goals, a cell model already described in the literature for the analysis of the antiarrhythmic properties of omega-3 fatty acids was constructed and used after detailed validation. This beating frequency assay is performed with spontaneously beating isolated neonatal rat cardiomyocytes (NRCM). Pharmacological intervention studies was the main route for identification of signal transduction components.

Results:

The beating frequency of NRCMs was reduced within minutes by 17,18-EEQ as well as by the synthetic analogues tested. This negative chronotropic effect provided a surrogate marker for the cardioprotective and antiarrhythmic effects of epoxyeicosanoids. Under the validated conditions, a half-maximal effect concentration (EC_{50}) of 11.96 nM and a maximal negative chronotropic effect of -28.93 beats per minute (bpm) were determined for 17,18-EEQ. In contrast, the negative chronotropic effect of EPA occurred only after

incubation for more than 30 min and reached approximately the same beat rate reduction at an EC₅₀ of 2342 nM. Moreover, it was shown that pharmacological inhibition of CYP epoxygenases by the drug MS-PPOH resulted in the loss of effect of EPA but not of 17,18-EEQ.

As a result of structure-function analysis of 17,18-EEQ, compound 4 (C4) was identified, which was characterized by an improved EC₅₀ (1.41 nM) and an increased negative chronotropic effect (-36.70 bpm) compared with 17,18-EEQ. Compared with 17,18-EEQ, C4 contains only one double bond (11,12-position), the epoxy group is replaced by a bioisosteric (oxamide group), and another modification (3-oxa group) serves to prevent β -oxidation and membrane incorporation.

Pharmacological inhibition has identified the involvement of the PI3K/AKT/eNOS/PKG pathway and ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) for the effect of 17,18-EEQ and C4. Primary target is possibly a G protein-coupled receptor (GPCR), as treatment of NRCMs with pertussis toxin as well as lentiviral knockdown of filamin A resulted in loss of efficacy of 17,18-EEQ and C4. C4 also significantly reduced electrical excitability and Ca²⁺ transient amplitude in the NRCM model compared to vehicle.

Conclusions:

The results of the present work confirm the hypothesis that omega-3 epoxyeicosanoids are the actual mediators of the cardioprotective and antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. The effect involves changes in Ca²⁺ metabolism and electrical excitability of cardiomyocytes. The mechanism is likely based on GPCR-mediated activation of the PI3K/AKT/eNOS/PKG signaling pathway and K_{ATP} channels. C4 was identified as a biologically highly active and metabolically stable 17,18-EEQ analog. Indeed, in further studies conducted by OMEICOS Therapeutics GmbH, C4 also proved to be therapeutically effective in other preclinical models and is now available for first clinical applications.

1 Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist laut WHO die häufigste Todesursache weltweit [1]. Lokale entzündliche Veränderungen der Blutgefäße mit Einlagerung von Lipiden, sogenannte Plaques, sorgen für eine pathologische Veränderung der Gefäßwand, die dadurch enger und steifer wird, was wiederum den Blutfluss im betroffenen Bereich beeinflusst – die Gefahr eines Gefäßverschlusses, eines sogenannten Thrombus, steigt. Dieses als Arteriosklerose bekannte Krankheitsbild gilt als Hauptursache für die KHK. Zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose zählen unter anderem eine hohe Konzentration von Triglyceriden und LDL-Cholesterin im Blut, oft als Folge einer fettreichen Ernährung [2]. Im Gegensatz zu diesen in einer Vielzahl von Publikationen veröffentlichten Erkenntnissen zeigte sich in einer epidemiologischen Studie mit kanadischen Inuit jedoch, dass Studienteilnehmer trotz ihrer fettreichen Ernährung über eine reduzierte kardiovaskuläre Mortalität verfügen [3]. Dieses Phänomen wird als „Eskimoparadox“ bezeichnet und auf die Qualität der aufgenommenen Fettsäuren zurückgeführt [4-7]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe enthielt das Serum der Inuit wesentlich höhere Spiegel an Omega-3-Fettsäuren.

Omega-3-Fettsäuren müssen über die Nahrung aufgenommen werden

Wie Omega-6-Fettsäuren gehören Omega-3-Fettsäuren zur Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*Polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Die Bezeichnung leitet sich von der Position der ersten C-C Doppelbindung ab, wobei vom Methylende der Fettsäure her gezählt wird. Die PUFAs die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, sind die Omega-6 Fettsäure Linolsäure (C18:2, n-6) und die Omega-3 Fettsäure α -Linolensäure (C18:3, n-3). Mit Hilfe eines Systems aus körpereigenen Elongasen und Desaturasen können aus diesen Vorläufer-Fettsäuren langkettige Omega-6 Fettsäuren wie Arachidonsäure (AA; C20:4, n-6) und langkettige Omega-3 Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA; C20:5, n-3) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6, n-3) aufgebaut werden (Abbildung 1). Dieses Enzymsystem arbeitet beim jedoch Menschen ineffizient [8, 9], was eine Supplementation vor allem der gesundheitlich vorteilhaft wirkenden langkettigen Omega-3-Fettsäuren wie EPA und DHA sinnvoll macht.

Omega-3-Fettsäuren sorgen global für hohe Umsätze

Global wurden im Jahr 2020 schätzungsweise 5,58 Milliarden USD für Omega-3-Fettsäure Nahrungsergänzungsmittel ausgegeben [10]. Sie werden vor allem damit beworben, einen Beitrag zur normalen Herzfunktion zu leisten. Die Wirksamkeit von Omega-3-Fettsäuren wurde in einer Vielzahl von klinischen Studien untersucht und führte zu einer Empfehlung der *American Heart Association* (AHA, Aktuelle Empfehlung aus dem Jahr 2017), welche die EPA/DHA-Supplementation als Sekundärprävention bei der KHK, zur Vermeidung des plötzlichen Herztods bei Patienten mit prävalenter KHK sowie zur Sekundärprävention bei Patienten mit Herzinsuffizienz empfiehlt [11].

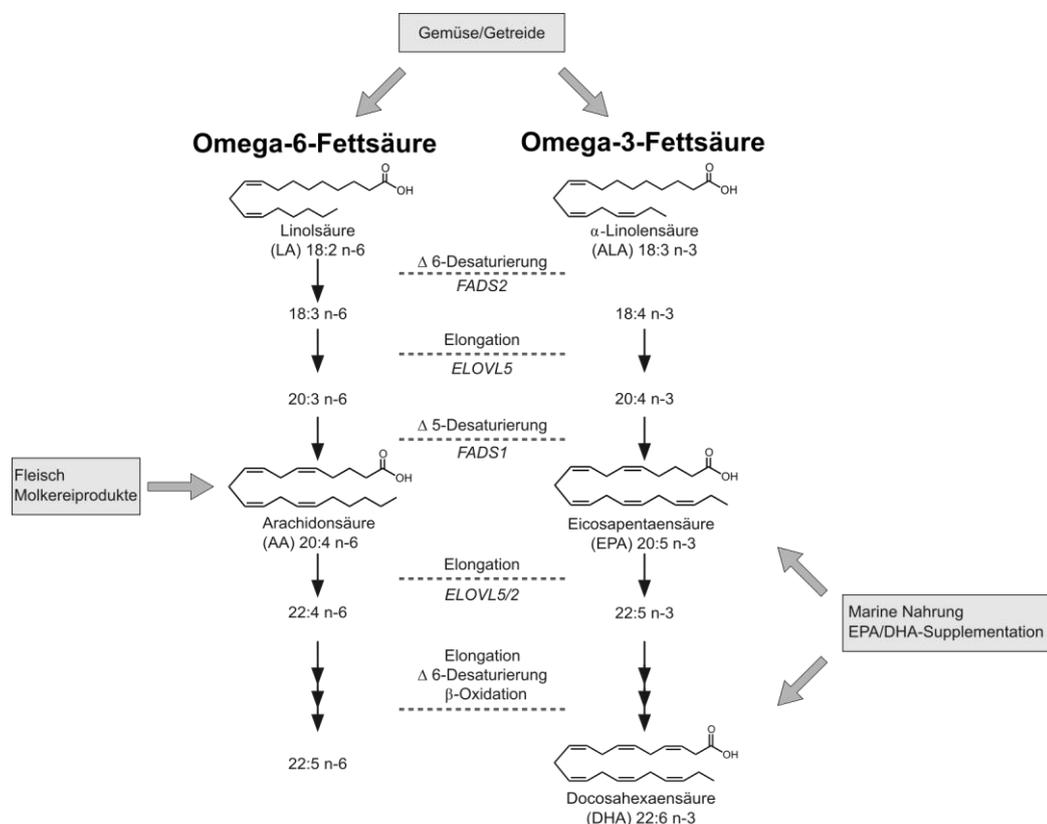


Abbildung 1: Biosynthese von langkettigen Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren.

Übersetzt und übernommen nach [12].

1.1 Evidenz für die Wirksamkeit von Omega-3-Fettsäuren

Das Eingangs dargestellte „Eskimoparadox“ wurde in weiteren epidemiologischen Studien untersucht und es zeigte sich, dass die kardiovaskuläre Mortalität durch eine Omega-3-Fettsäure-reiche Diät reduziert werden kann [13, 14].

Patienten, die einen Myokardinfarkt überleben, haben durch die Einnahme von 1 g Omega-3-Fettsäuren pro Tag ein reduziertes Risiko, an einem weiteren kardiovaskulären

Ereignis (z.B. Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Schlaganfall) zu versterben [15]. Diese Reduktion der Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulären Ereignisses und der kardiovaskulären Mortalität wurde in der jüngst veröffentlichten klinischen Studie REDUCE-IT bestätigt. In der Studie wurde das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie dem kardiovaskulären Tod, dem nicht-tödlichen Myokardinfarkt oder Schlaganfall, der koronaren Revaskularisierung (u.a. Koronararterien-Bypass, Angioplastie) oder der Hospitalisierung wegen instabiler Angina pectoris untersucht. Die Behandlung der Studienteilnehmer mit 4 g Icosapent-Ethyl pro Tag, dem Ethylester von EPA, führte zu einer signifikanten Reduktion des Auftretens eines kardiovaskulären Ereignisses gegenüber der Placebogruppe [16]. In Bezug auf Vorhofflimmern (*atrial fibrillation*, AF) konnte die Gabe von Omega-3-Fettsäuren das Auftreten von AF nach Koronararterien-Bypass reduzieren [17] und das Wiederauftreten von AF nach erfolgreicher Kardioversion, d.h. die Wiederherstellung des Sinusrhythmus, verzögern [18].

Die Studienlage zur Wirksamkeit von Omega-3-Fettsäuren ist nicht einheitlich

Neben diesen positiven Studien existieren ebenfalls eine Vielzahl von klinischen Studien, die keinen Vorteil in der Omega-3-Supplementation feststellen konnten [19-22]. Die Metaanalyse von 10 randomisierten Studien mit insgesamt 78.000 Patienten [23] sowie die kürzlich abgeschlossene VITAL Studie zur Primärprävention mit 25.000 Teilnehmern [24] konnten insgesamt keine signifikante Reduktion des atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungsrisikos durch Gabe von Omega-3 Fettsäuren feststellen. Diese Ergebnisse fallen mit veränderten Anforderungen an klinische Studien zusammen, nach denen der Effekt eines Wirkstoffs in bereits medikamentierten Patienten gezeigt werden muss. Die Patienten in den Omega-3-Supplementationsstudien nehmen meistens Blutdrucksenker, Gerinnungshemmer oder Statine. Dies führt vermutlich zu Wechselwirkungen der Behandlungen, wodurch die protektiven Eigenschaften der Omega-3-Fettsäuren verändert oder zumindest maskiert werden könnten.

Veränderungen am Studiendesign könnten verlässlichere Ergebnisse liefern

Eine Möglichkeit, dennoch erfolgreiche klinische Studien mit Omega-3-Fettsäuren durchführen zu können, wäre, wie bei REDUCE-IT, die Erweiterung der Stichprobenzahl sowie des Beobachtungszeitraums [12]. Des Weiteren wäre die Messung des Effekts der Omega-3-Supplementation auf das endogene Fettsäureprofil sinnvoll. In den meisten Studien wurde dieser Effekt nicht erfasst [12]. Zu diesem Zweck wäre die

Berücksichtigung eines Biomarkers wie zum Beispiel des Omega-3-Index‘, welcher den prozentualen Anteil von EPA und DHA in Bezug zur Gesamt-Fettsäuremenge in Erythrozyten darstellt, sinnvoll, um so vergleichbarere Daten aus den verschiedenen klinischen Studien zu erhalten [14, 25].

Omega-3-Fettsäuren haben keine bedeutenden Nebenwirkungen

Die Behandlung der Studienteilnehmer mit Omega-3-Fettsäuren führte zu keinen wesentlichen Nebenwirkungen. Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen waren Übelkeit, gastrointestinale Verstimmungen, "fischiges" Aufstoßen und eine verlängerte Blutungszeit [26, 27]. Die Aufnahme von bis zu 7 g EPA und DHA pro Tag führte zu keinem erhöhten Risiko für hämorrhagische Komplikationen, auch nicht in Kombination mit dem Antikoagulans Warfarin [28]. Trotz der nicht eindeutigen Studienlage und der beschriebenen Nebenwirkungen wird die Empfehlung der Einnahme von Omega-3 Fettsäuren durch die AHA weiterhin aufrecht erhalten.

Die klinischen Effekte der Omega-3-Fettsäuren wurden in einer Vielzahl von Tierstudien und zellulären Experimenten verifiziert und mechanistisch untersetzt. Ein Ausschnitt über die Evidenz der Wirksamkeit von Omega-3-Fettsäuren kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Evidenz zur kardiovaskulären Wirkung von Omega-3-Fettsäuren
 Übernommen und ergänzt nach [12]

Evidenz	Referenz
<u>Klinische Indikation</u>	
Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod	[15, 16, 29, 30]
Herzinsuffizienz	[31, 32]
Koronare Herzkrankheit	[33, 34]
Vorhofflimmern	[17-19, 35, 36]
Bluthochdruck	[37, 38]
<u>Physiologische Wirkungen</u>	
Antiarrhythmisch	[26, 30, 39, 40]
Myokardial Effizienz	[30, 40]
Antiinflammatorisch	[30, 41]
Antiatherogen (Plaque-Stabilisierung)	[42-45]
Antithrombotisch	[40, 45]
Senkung der Triglyceride	[26, 30, 46, 47]
Verbesserung der Endothelfunktion	[30, 40, 48]
<u>Molekulare Effekte</u>	
Ionenkanäle	[49, 50]
Signalkomplexe (<i>lipid raft</i>)	[51-54]
Nukleare Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren	[54]
Fettsäure-bindende Rezeptoren	[55, 56]
Bildung von bioaktiven Lipidmediatoren	[57-63]

1.2 Kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von Omega-3-Fettsäuren

Die bedeutendste Wirkung der Omega-3-Fettsäuren ist die durch ihren Einbau in die Zellmembran verursachte Erhöhung der Membranfluidität [64]. Der Einbau der Fettsäuren erfolgt bevorzugt an sn2-Position von Phospholipiden und hat einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion und Aktivität von membranständigen Proteinen wie Rezeptoren, Ionenkanälen und Enzymen [65-68]. Die beobachteten Effekte der Omega-3-Fettsäuren können jedoch nicht ausschließlich durch die erhöhte

Membranfluidität erklärt werden. In Abhängigkeit von extrazellulären Stressstimuli wie Ischämie, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen kommt es zur Freisetzung der Omega-3-Fettsäuren durch die zytosolische, Calcium-abhängige Phospholipase A2 (cPLA2) [69]. Die freigesetzten Omega-3-Fettsäuren können über die Aktivierung der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) und anderen Transkriptionsfaktoren die Genexpression verändern [70].

CYPs setzen Omega-3-Fettsäuren um

Neben dieser direkten Wirkung können Omega-3-Fettsäuren auch durch Cytochrom P450 Enzyme (CYP) zu Eicosanoiden metabolisiert werden [71, 72]. Der Begriff Eicosanoide wurde ursprünglich für die, aus der AA von Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) gebildeten Prostaglandine und Leukotriene verwendet, welche eine wesentliche Bedeutung bei Entzündungen, Asthma, Fieber, Schmerz und kardiovaskulären Erkrankungen haben [73] (Abbildung 2).

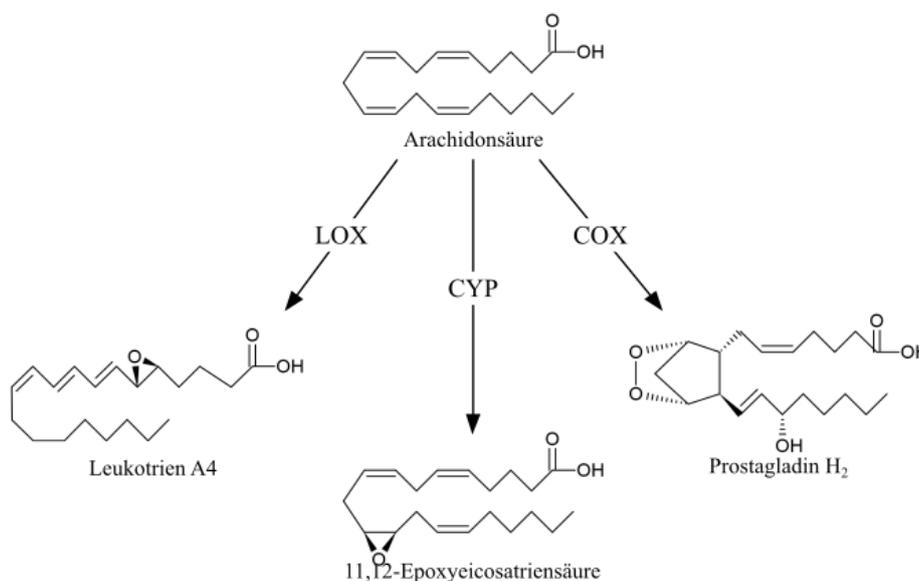


Abbildung 2: Eicosanoide können durch LOX-, COX- und CYP-Enzyme gebildet werden

Dargestellt sind die drei Wege des Arachidonsäure-Metabolismus'. LOX führt zur Bildung von Leukotrienen, CYP zu Hydroxyeicosanoiden oder Epoxyeicosanoiden und COX zu Prostaglandinen. In der Abbildung ist jeweils ein Beispiel dargestellt. Modifiziert nach [74]

COX und LOX sind Dioxygenasen die AA und EPA metabolisieren können, wobei die gebildeten Eicosanoide größtenteils gegenteilige Effekte haben [75-77]. CYPs stellen die dritte Kaskade für die Bildung von Eicosanoiden dar, wobei es sich um Monooxygenasen handelt. Die Omega-3- als auch Omega-6- Fettsäuren werden dabei terminal oder

subterminal hydroxyliert oder an einer der Doppelbindungen epoxidiert. Einen Überblick über die CYP-abhängig gebildeten Eicosanoide gibt Abbildung 3.

Hydroxy-Eicosanoide von AA werden Hydroxyeicosatetraensäure (HETE), von EPA Hydroxyeicosapentaensäure (HEPE) und von DHA Hydroxydocosahexaensäure (HDHA) genannt. Für die Benennung wird die Nummer des modifizierten C-Atoms vorangestellt, z.B. 20-Hydroxyeicosatriensäure (20-HETE).

Die Epoxyeicosanoide von AA werden Epoxyeicosatriensäure (EET), von EPA Epoxyeicosatetraensäure (EEQ) und von DHA Epoxydocosapentaensäure (EDP) genannt. Die Benennung erfolgt durch Angabe der modifizierten Doppelbindung, z.B. 17,18-EEQ [78-80].

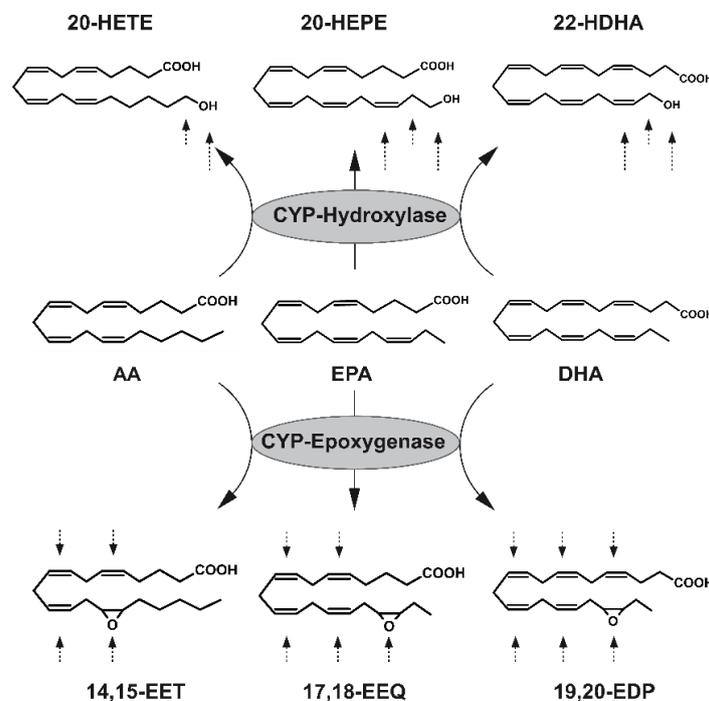


Abbildung 3: Bildung von CYP-Eicosanoiden aus AA, EPA und DHA im Herzen

Die Hauptmetaboliten sind dargestellt und benannt. Mögliche weitere Metaboliten werden durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet. Übersetzt, übernommen und modifiziert nach [12].

17,18-EEQ und 19,20-EDP sind die beiden Epoxyeicosanoide, die bei Omega-3 Fettsäure Supplementation kardial durch das Enzym CYP2J2 am häufigsten gebildet werden [81]. Wu et al. gelang der Nachweis, dass es sich bei den gebildeten CYP-Epoxyeicosanoiden um aktive Lipidmediatoren handelt. Die von der AA abgeleitete 11,12-EET verbesserte signifikant die post-ischämische Funktion von isolierten, perfundierten Rattenherzen [82].

Der protektive Effekt von 11,12-EET wurde im Herzinfarktmodel mit temporärem Verschluss einer Koronararterie an Ratten und Hunden bestätigt. Identische Wirkungen wurden für das Regioisomer 14,15-EET beobachtet [83, 84]. Im Gegensatz zu den AA-abgeleiteten Epoxyeicosanoiden fehlen weitgehend vergleichbare Studien mit EPA- und DHA-abgeleiteten CYP-Epoxyeicosanoiden [12]. Erste Evidenz für die korrespondierende Wirkung von DHA und 19,20-EDP gelang Seubert et. al. Durch DHA und 19,20-EDP konnte sowohl die post-ischämische Funktionsverringering isolierter, perfundierter Mausherzen als auch die mit der Ischämie assoziierte Aktivierung des Inflammasoms reduziert werden [85].

Eicosanoide verfügen über eine Vielzahl von protektiven Eigenschaften

Unabhängig von dem direkten Wirkungsnachweis konnte in einer Vielzahl von Tierstudien gezeigt werden, dass die verstärkte Bildung oder der gehemmte Abbau der Eicosanoide die post-ischämische Funktion des Herzens erhöhen, die Drucklast-induzierte Herzhypertrophie verringern und die Anfälligkeit für ventrikuläre Tachyarrhythmien und Vorhofflimmern bei maladaptiver Herzhypertrophie oder chronischer β -adrenerger Stimulation reduzieren kann. Während die verstärkte Bildung der Eicosanoide durch die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression der humanen CYP-Epoxygenase CYP2J2 erreicht wird, ist der gehemmte Abbau eine Reaktion auf die pharmakologische Inhibition oder die genetische Deletion der löslichen Epoxidhydrolase (*soluble epoxide hydrolase*, sEH) [86-90].

Es ist davon auszugehen, dass die kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von CYP-Eicosanoiden durch die gleichzeitige Wirkung auf Kardiomyozyten, Myofibroblasten und Immunzellen erreicht wird [91]. Limitiert werden die positiven Effekte der CYP-Epoxyeicosanoide vor allem durch den schnellen Abbau durch die sEH. Die gebildeten Diolen sind weitgehend biologisch inaktiv (Abbildung 4).

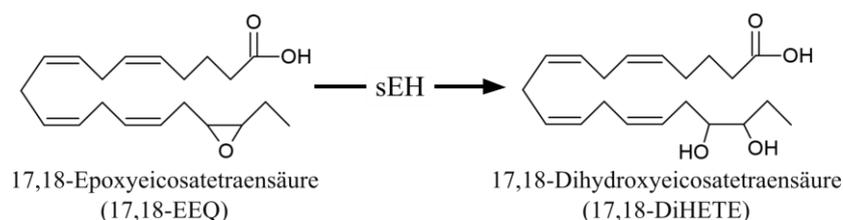


Abbildung 4: sEH hydroxyliert CYP-Epoxyeicosanoide zu inaktiven Diolen

Dargestellt ist die Aktivität der sEH am Beispiel der Hydroxylierung von 17,18-EEQ zu 17,18-DiHETE. Modifiziert nach [12].

1.3 Zellulärer Wirkmechanismus der Omega-3-Epoxyeicosanoide 17,18-EEQ und 19,20-EDP

Eine Vielzahl von Erkenntnissen über den kardialen Wirkmechanismus von Omega-3-Fettsäuren wurde durch Studien an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM) erzeugt, welche über die besondere Eigenschaft verfügen, in Kultur spontan zu schlagen. Kern des Testsystems ist die Modulation der spontanen Schlagfrequenz nach Zugabe von Testsubstanzen. So konnte gezeigt werden, dass die Schlagfrequenz der NRKM in Abhängigkeit vom Prostaglandin-Rezeptor gesteigert oder gesenkt wird [92]. Die Anwendbarkeit dieses Schlagfrequenz-Assays zur Untersuchung der intrazellulären Signalwege von CYP-Epoxyeicosanoiden wurde durch Studien mit EPA und DHA gezeigt [39, 50, 93].

Dabei lösen 17,18-EEQ und 19,20-EDP den gleichen negativ chronotropen Effekt aus wie die korrespondierenden Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA. Die notwendige Konzentration der CYP-Epoxyeicosanoide liegt dabei allerdings im nanomolaren Bereich und damit deutlich unter dem der beiden Fettsäuren, die im mikromolaren Bereich wirksam sind [81]. Der negativ chronotrope Effekt ist assoziiert mit der Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Transientenamplitude und der Modulation der Ionenkanalaktivität und stellt somit einen Surrogatmarker für das antiarrhythmische Potenzial der Epoxyeicosanoide dar [94, 95]. Darüber hinaus schützen DHA und 19,20-EDP die Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 vor dem LPS- (Lipopolysaccharid) und Hypoxie/Reoxygenierungs-induziertem Verlust der Zellviabilität. Dieser kardioprotektive Effekt war mit der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Aktivität verbunden [91, 96, 97].

CYP-Epoxyeicosanoide aktivieren einen protektiven Signalweg

Die antiarrhythmische und kardioprotektive Wirkung der CYP-Epoxyeicosanoide wird vermutlich über einen Signalweg vermittelt, welcher das Überleben der Zellen sichert und in der Aktivierung des sarkolemmalen ($\text{sarcK}_{\text{ATP}}$) und des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) sowie des mitochondrialen Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanal (BK_{Ca}) mündet [98, 99]. Die Erkenntnisse zur kardioprotektiven und antiarrhythmischen Wirkung von CYP-Epoxyeicosanoiden sind eng mit dem Phänomen der ischämischen Präkonditionierung verbunden. Diese beschreibt die erhöhte Widerstandsfähigkeit des Herzens gegenüber eines Myokardinfarkts, wenn es vor dieser intensiven Ischämie-Episode zu mehreren kurzen, nicht schädlichen Ischämie/Reperfusionen-Zyklen (I/R) gekommen ist [100].

Dieses Phänomen konnte nicht nur in Tierstudien, sondern auch beim Menschen gezeigt werden [101].

Limitiert werden die positiven Effekte der CYP-Epoxyeicosanoide vor allem durch ihren schnellen Abbau durch die sEH. Die gebildeten Diole sind weitgehend inaktiv (Abbildung 4). Des Weiteren können die CYP-Epoxyeicosanoide durch die β -Oxidation abgebaut und autooxidiert werden.

1.4 Bedeutung eines stabilen 17,18-EEQ Analogons

Es gibt drei mögliche Ansätze, die kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von CYP-Epoxyeicosanoiden therapeutisch zu nutzen.

Der *erste Ansatz* ist die eingangs beschriebene Ernährungssupplementation mit EPA/DHA-Präparaten, um die endogene Bildung der Metabolite zu forcieren. Dieser Ansatz führt, wie zuvor beschrieben, zu uneinheitlichen Ergebnissen (Abschnitt 1.1).

Der *zweite Ansatz* zielt auf die sEH-Inhibition und somit auf die Hemmung des Abbaus der gebildeten CYP-Epoxyeicosanoide. Aktuell werden sEH-Inhibitoren für die klinische Anwendung entwickelt [102].

Der *dritte Ansatz* umfasst die Entwicklung stabiler synthetischer CYP-Epoxyeicosanoid-Analoga, welche zur klinischen Behandlung eingesetzt werden können. Nach der Auswahl eines spezifischen CYP-Epoxyeicosanoids muss dieses so modifiziert werden, dass es zwar die biologische Funktion beibehält aber gleichzeitig die beschriebenen Limitationen überwindet. Es wurden bereits EET-Analoga entwickelt, welche erfolgreich in kardiovaskulären Krankheitsmodellen von Nagern eingesetzt wurden [103, 104]. Es gibt jedoch weder auf Basis von AA noch von EPA oder DHA ein zugelassenes Medikament, welches sich von CYP-Epoxyeicosanoiden ableitet. Bereits weit fortgeschritten ist die Entwicklung eines stabilen 17,18-EEQ Analogons durch die Firma OMEICOS Therapeutics, welches bereits erfolgreich in einer klinischen Phase 1 erprobt wurde (EudraCT No.: 2016-003445-28). Dieses Analogon stammt aus einer langjährigen Entwicklungsphase, bei der zunächst die chemische Struktur von 17,18-EEQ analysiert, optimiert und anschließend in unterschiedlichen Tiermodellen getestet wurde [12].

Schunck et al. konnte die Schwachstellen der chemischen Struktur von 17,18-EEQ durch eine ausführliche Struktur-Funktions-Analyse identifizieren (Abbildung 5).

Diese sind wie folgt:

- (I) Die vorhandenen Doppelbindungen sind anfällig für Autoxidation oder unterliegen Sekundärmetabolismus durch COX- oder LOX-Enzyme.
- (II) Die Epoxidgruppe kann durch die sEH zum Diol hydrolysiert werden.
- (III) Über die freie Carboxylgruppe kann 17,18-EEQ in Phospholipide verestert werden oder mittels β -Oxidation abgebaut werden.

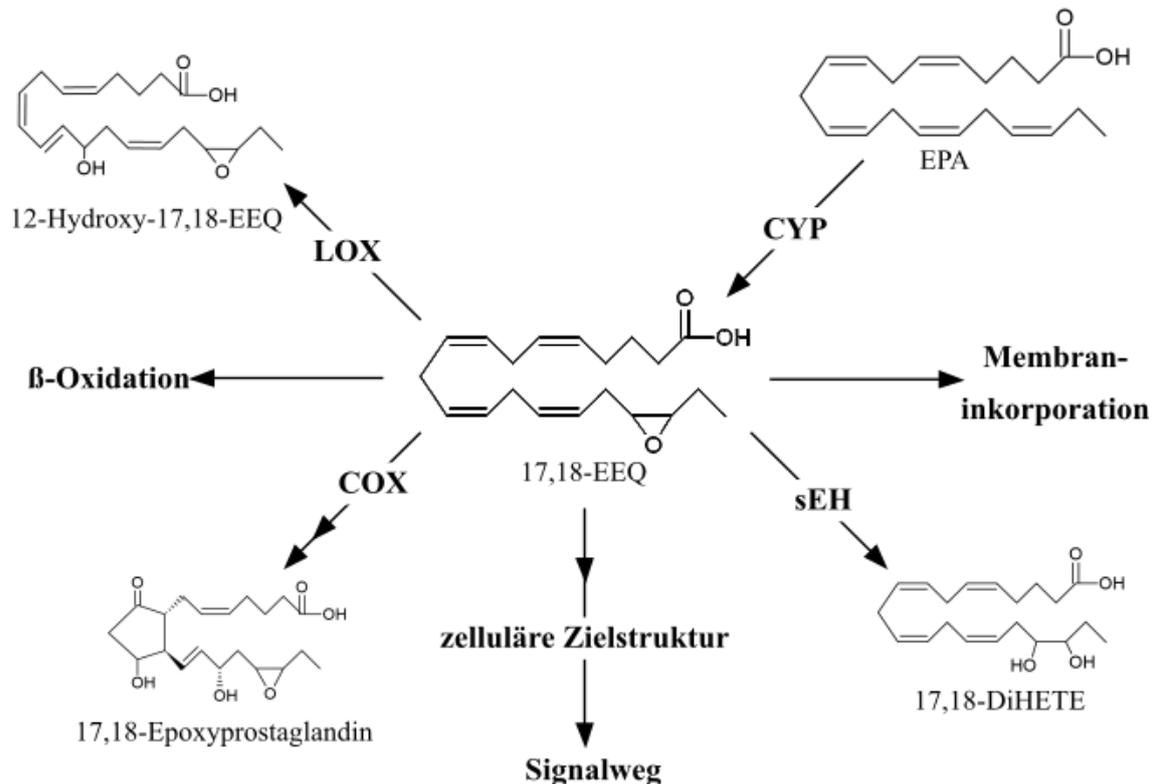


Abbildung 5: 17,18-EEQ wird von einer Vielzahl von zellulären Mechanismen genutzt.

CYP-Enzyme bilden 17,18-EEQ aus EPA. Das gebildete 17,18-EEQ kann anschließend an die zelluläre Zielstruktur binden und einen Signalweg auslösen, in die Membran eingebaut werden oder durch die β -Oxidation abgebaut werden oder durch die Enzyme sEH, LOX und COX metabolisiert werden. Abbildung übernommen und verändert nach [74].

All diese Mechanismen führen zur biologischen Inaktivierung von 17,18-EEQ (Abbildung 6) [105, 106]. Auf dieser Grundlage wurde eine Reihe von stabilen Analoga entwickelt, die diese strukturellen Schwachstellen überwinden. Bei dem Analog *Compound 21* (C21) wurde die Carboxylgruppe und die 11,12-Doppelbindung als essenziell identifiziert. Alle weiteren Doppelbindungen wurden entfernt. Des Weiteren wurde die Epoxidgruppe in R,S-Konfiguration durch eine sEH unempfindliche Oxamidgruppe ersetzt (Abbildung 6) [107]. Die Limitationen, die durch die β -Oxidation und die Membraninkorporation bestehen, wurden mit der Entwicklung von C21 noch nicht gelöst. Das Ergebnis der Arbeiten war die Entwicklung der Verbindung 4

(Compound 4, C4), deren detaillierte, biologische Charakterisierung in der hier vorgelegten Arbeit erarbeitet wurde.

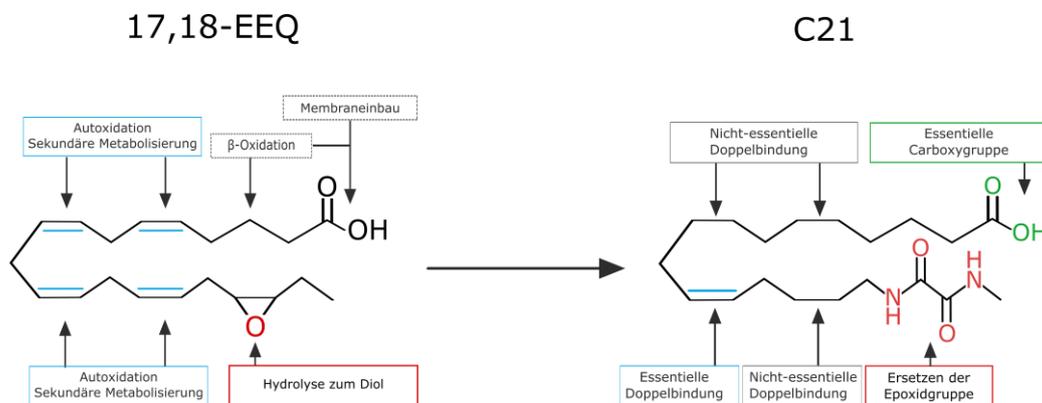


Abbildung 6: Strukturelle Schwachstellen von 17,18-EEQ und Modifikation an C21

Dargestellt sind die strukturellen Schwachstellen von 17,18-EEQ sowie die strukturellen Modifikationen von C21, mit denen die Limitationen von 17,18-EEQ überwunden wurden. Übernommen und modifiziert nach [107].

1.5 Das kardiale Aktionspotenzial

Für das Verständnis des im Abschnitt 1.3 beschriebenen antiarrhythmischen und kardioprotektiven Effekts der CYP-Epoxyeicosanoide sind Kenntnisse der Abläufe eines kardialen Aktionspotenzials notwendig.

Das kardiale Aktionspotenzial und die daraus folgende Kontraktion des Kardiomyozyten resultiert aus dem Zusammenspiel eines Na^+ -Ioneneinstroms, dem transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Ionenkonzentration und eines K^+ -Ionenausstroms. Der Verlauf des Membranpotenzials und der Aktivität der beteiligten Ionenkanäle während eines Aktionspotenzials können der Abbildung 7 entnommen werden. An diesem Prozess sind eine Vielzahl von Ionenkanälen beteiligt, die zeitlich sequenziell öffnen und schließen.

Die Kontraktion eines Kardiomyozyten ist an sein Membranpotenzial gekoppelt

Das Ruhepotenzial eines Kardiomyozyten wird maßgeblich durch die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe hergestellt und durch die hohe Permeabilität für K^+ -Ionen aufrechterhalten [108]. Die Depolarisation beginnt mit der schnellen Öffnung von Na^+ -Ionenkanälen gefolgt vom Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC). Dieser initiale Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Öffnung der kardialen Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) und zu einem Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dies wiederum führt zu einem starken Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet. Die hohe Ca^{2+} -Konzentration ist die

Voraussetzung für die Kontraktion des Kardiomyozyten. Während der Repolarisation werden die Ca^{2+} -Ionen durch die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) zurück ins SR gepumpt und durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) aus dem Zytosol entfernt. Dies führt zur Relaxation des Kardiomyozyten. Dieser Ablauf wird Erregungs-Kontraktions-Kopplung genannt. Der Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration stellt den Ca^{2+} -Transienten dar [109-111]. Das Ruhepotenzial wird abschließend vor allem durch die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe wiederhergestellt.

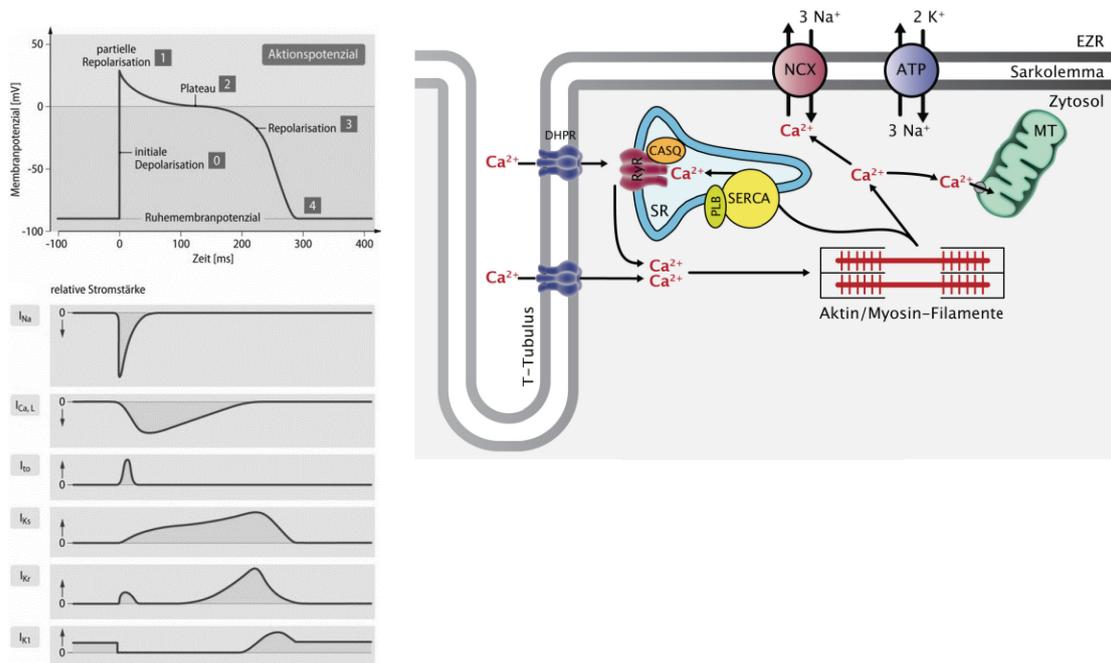


Abbildung 7: Die komplexen Abläufe beim kardialen Aktionspotenzial

Dargestellt sind der Verlauf des Membranpotenzials (links) und des Ca^{2+} -Handlings (rechts) während eines kardialen Aktionspotenzials sowie die beteiligten Ionenströme. Bei Überschreitung des Schwellenwertes kommt es durch Öffnung der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle zu einer schnellen Depolarisation. Durch Schließung der Na^+ -Kanäle und Öffnung von K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle kommt es zu einer partiellen Repolarisation (1). Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal (DHPR) führt zur Aktivierung RyR und somit zur Freisetzung großer Mengen Ca^{2+} -Ionen aus dem SR. Der depolarisierende Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und der repolarisierende K^+ -Ionen Ausstrom halten sich für ca. 200-400 ms die Waage, wodurch es zu einer Plateauphase kommt und zur Kontraktion der Kardiomyozyte (2). Die Ca^{2+} -Ionen werden durch SERCA, NCX und den mito Ca^{2+} -Uniporter wieder aus dem Zytosol entfernt und es kommt zur Öffnung weiterer K^+ -Kanäle mit anschließender Repolarisation (3). Durch die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wird das Ruhepotenzial wiederhergestellt (4). Übernommen von [112] [113].

Arrhythmie werden unter anderem durch eine gestörte Ca^{2+} - Homöostase verursacht

Während der Ischämie-Phase eines Myokardinfarktes kommt es zu einer Akkumulation von Laktat, Protonen und NAD^+ und damit zu einer Senkung des intrazellulären pH-Wertes. Zum Ausgleich des pH-Wertes werden Protonen über den Na^+/H^+ -Austauscher aus der Zelle geschleust, was über den NCX zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt, man spricht von einem Ca^{2+} -Overload. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird noch durch die eingeschränkte SERCA-Aktivität und die spontane Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR2 verstärkt [114].

Störungen im Gleichgewicht des Ca^{2+} -Transienten sind eine Ursache für das Auftreten von Arrhythmien. Gründe sind zum einen die frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarizations*, EADs), die der vollständigen Repolarisation vorausgehen (in Phase 2 und Phase 3 der Repolarisation), und zum anderen die verzögerten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarizations*, DADs), die nach der vollständigen Repolarisation auftreten. EADs entstehen häufig durch eine Verlängerung des kardialen Aktionspotenzials, wodurch der LTCC bereits vor der vollständigen Repolarisierung wieder aktiviert wird und ein erneutes Aktionspotenzial auslöst. DADs treten vor allem bei Ca^{2+} -Overload oder durch erhöhte Ca^{2+} -Beladung des SRs auf, bei der es zur spontanen Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen über den RyR2 kommt. Die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt zur inversen Aktivität des NCX, was zu einer Depolarisation und so zu einem Aktionspotenzial führt. Die Normalisierung eines gestörten Ca^{2+} -Transienten stellt einen möglichen Ansatzpunkt für eine antiarrhythmische Therapie dar [109, 115].

1.6 Zielsetzung

Die von den Omega-3 Fettsäuren EPA und DHA abgeleiteten Epoxyeicosanoide verfügen über eine kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung (vgl. Abschnitt 1), welche bisher therapeutisch nicht genutzt wird. Die Struktur-Funktions-Analyse von 17,18-EEQ offenbarte einige Limitation des natürlichen Fettsäuremetaboliten, welche die direkte medikamentöse Verwendung ausschließt und die Entwicklung stabiler synthetischer Analoga nahelegt (vgl. Abschnitt 1.4). Für die vergleichende Bewertung unterschiedlicher stabiler Analoga ist ein validiertes Testsystem notwendig. Für die Struktur-Funktions-Analyse wurde ein zelluläres Testsystem mit neonatalen Rattenkardiomyozyten verwendet, welches auf der Messung der Modulation der Schlagfrequenz der Zellen durch eine hinzugegebene Substanz beruht. Daraus leitet sich das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ab:

1. Validierung des Schlagfrequenz-Assays.

Die Verwendung von primären Zellen für ein Testsystem führt zu einer hohen Variabilität der Ergebnisse, allerdings wurde angenommen, dass es Kriterien und Maßnahmen gibt, der hohen Variabilität zu begegnen und die Messergebnisse auch über einen langen Zeitraum vergleichbar zu machen. Die Ergebnisse aus mehr als 30 Zellpräparationen sollten die Grundlage für die Validierung des Assays sowie aller weiteren Ziele der vorliegenden Arbeit bilden.

2. Nachweis der Epoxyeicosanoide als Mediatoren des negativ chronotropen Effekts.

EPA und DHA führen ebenso wie die korrespondierenden Epoxyeicosanoide zu einer Reduktion der Schlagfrequenz der NRKM. Es wurde davon ausgegangen, dass nicht direkt die Omega-3 Fettsäuren sondern die daraus gebildeten Epoxyeicosanoide zum negativ chronotropen Effekt im Assay führen.

In einem ersten Schritt sollte die endogene Bildung als auch die Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition der Bildung von Epoxyeicosanoiden aus korrespondierenden Omega-3-Fettsäuren in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden. In einem zweiten Schritt sollte der negativ chronotrope Effekt der EPA, DHA, von 17,18-EEQ, 19,20-EDP sowie dem synthetischen Analog C4 vergleichend analysiert werden.

3. Identifizierung eines wirksamen Analogs der dritten Generation

Eine vorausgegangene Struktur-Funktions-Analyse von 17,18-EEQ führte zum stabilen Analog C21. C21 gehört zur ‚zweiten Generation‘ von stabilen Analoga, die weiter

modifiziert werden sollten, sodass der Abbau über β -Oxidation sowie die Membraninkorporation verhindert werden, ohne die biologische Aktivität zu verlieren. Diese Modifikationen sollten zur ‚dritten Generation‘ von stabilen Analoga führen, möglicherweise geeignet für den klinischen Einsatz. Zur Erreichung des Ziels sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. Falck und weiteren externen Dienstleistern eine Vielzahl von Analoga getestet werden. Im Fokus dieser Arbeit steht die Testung der synthetischen Analoga auf ihre biologische Aktivität mit Hilfe des Schlagfrequenz-Assays. Ziel ist es, ein biologisch aktives Analoga zu identifizieren, welches anschließend für die weitere Charakterisierung zur Verfügung steht.

4. Vergleichende Analyse des intrazellulären Signalwegs von 17,18-EEQ und dem stabilen Analog C4.

Von den Epoxyeicosanoiden der AA ist die Aktivierung eines intrazellulären Signalweges bekannt. Es wird vermutet, dass es auch durch die Epoxyeicosanoide von EPA und DHA zu einer Aktivierung eines Signalweges kommt.

Die Beteiligung unterschiedlicher Signalkomponenten konnte durch den Ausfall des negativ chronotropen Effekts von 17,18-EEQ und C4 (synthetisches 17,18-EEQ Analog ‚dritter Generation‘) nach pharmakologischer Inhibition der Komponenten untersucht werden. Der intrazelluläre Signalweg sollte so schrittweise aufgeklärt werden.

5. Identifizierung möglicher zellulärer Endeffektoren

Der von den Epoxyeicosanoiden aktivierte intrazelluläre Signalweg mündet vermutlich in der Modulation des kardialen Aktionspotenzials, welches ein Zusammenspiel einer Vielzahl von Ionenkanälen ist (vgl. Abschnitt 1.5). Klassische Antiarrhythmika modulieren spezifisch den Ionenstrom einer Ionensorte über die Zellmembran. Die beschriebenen Modulationen von Epoxyeicosanoiden lassen einen komplexeren Wirkungsmechanismus vermuten.

Es wurde davon ausgegangen, dass C4 über einen kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekt verfügt, welcher durch die Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase, einer Veränderung des Membranpotenzials sowie der Aktivierung von ATP-abhängigen K^+ -Kanälen verursacht wird. Die Hypothesen sollten mit unterschiedlichen Techniken im Schlagfrequenz-Assay untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Für die Isolation der NRKM wurden Ratten des Stammes Wistar (Charles River) im Alter von 0 bis 4 Tagen nach der Geburt (P0 bis P4) verwendet. Die Jungtiere wurden von der Versuchstiereinrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft (MDC) bereitgestellt. Die Zuchtpärchen wurden verpaart (2♀ auf 1♂) und hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (SNIFF Spezialdiäten). Die Verwendung von neonatalen Ratten war durch die Tötungsanzeige Y9018/15 amtlich genehmigt. Die geschlechtliche Zusammensetzung der verwendeten Tiere wurde nicht festgestellt.

2.1.1 Isolation von NRKM

Die Jungtiere wurden dekapitiert und der Thorax proximal entlang des Sternums geöffnet. Auf leichten Druck auf die Vorderläufe hin, öffnet sich der Schnitt und das Herz ragt heraus. Das mit Hilfe einer Pinzette entnommene Herz wurde in eine Petrischale mit phosphatgepufferter Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PBS, Biochrom, #L1820) überführt. Im Anschluss wurden die Herzen mit PBS gewaschen und die Atrien abgetrennt. Die verbleibenden Ventrikel wurden nochmals mit PBS gewaschen und in der vorbereiteten Enzymlösung in ca. 1 mm² große Stücke zerschnitten. Die Enzymlösung wurde entsprechend den Herstellerangaben für das Produkt *Neonatal Cardiomyocyte Isolation Kit, rat* (Miltenyi Biotec, #130-105-420) hergestellt. Das vorgeschlagene Isolationsprozedere und die verwendeten Volumina wurden wie folgt modifiziert: Für je 20 Herzen wurde ein Volumen von 5 ml Enzymlösung vorbereitet. Die Gewebestücke wurden in ein gentleMACS C Tube (Miltenyi Biotec, #130-093-237) überführt. Zusammen mit den gentleMACS C Tubes wurde der gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, #130-093-235) und das Programm *Neo Heart Diss* verwendet. Die Gewebestücke wurden in zwei Schritten dissoziiert. Im ersten Dissoziationsschritt wurden 3/5 und in einem zweiten Dissoziationsschritt 2/5 der vorbereiteten Enzymlösung verwendet und das folgende Prozedere durchgeführt:

1. Schüttelwasserbad, 37 °C, 150 rpm, 15 min
2. Zweimaliges Durchlaufen des Dissoziationsprogramms (3/5 der Enzymlösung)
3. CO₂-Inkubator, 37 °C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeitsgesättigt, 15 min
4. Einmaliges Durchlaufen des Dissoziationsprogramms (2/5 der Enzymlösung)

Nach Schritt 3 wurden die verbleibenden Gewebestücke durch eine kurze Zentrifugation abgetrennt. Die Zellsuspension wurde abgenommen und in 10 ml SM20-I Complete (Tabelle 3) überführt und bis zum Abschluss des zweiten Dissoziationsschrittes auf Eis gelagert. Zu den verbliebenden Gewebestücken wurde die übrigen 2/5 Enzymlösungen gegeben und das Prozedere wiederholt durchlaufen.

Mit Abschluss des zweiten Verdauschrittes wurden die verbliebenen Gewebestücke nochmals pelletiert und mit Hilfe einer 10 ml serologischen Pipette mechanisch aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde in weitere 10 ml SM20-I Complete überführt. Beide Fraktionen wurden durch ein 100 µm Zellsieb (EASYstraine Cell Sieves, Greiner Bio-One, #542000) gegeben und das Zellsieb mit 20 ml Medium nachgespült. Die Zellen wurden bei $500 \times g$, 20 min, 4 °C zentrifugiert, das Pellet in frischen SM-20-I Complete resuspendiert und die Zellzahl unter Verwendung des automatischen Zellzählgeräts Luna-FL (Logos Biosystems, #L20001) im Fluoreszenzmodus bestimmt. Je $10\text{-}15 \times 10^6$ Zellen wurden mit 10 ml Medium auf eine 10 cm Petrischale (Sarstedt, #83.3902) für 30 min im CO₂-Inkubator inkubiert, um so den Anteil der Fibroblasten in der Kultur zu verringern [116]. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl der nicht-adhärenten Zellen, hauptsächlich Kardiomyozyten, erneut bestimmt und die Zellen für unterschiedliche Fragestellungen auf die in Tabelle 2 angegebenen Zellkulturgefäße verteilt.

Tabelle 2: Übersicht zu verwendeten Zellkulturgefäße.

Zellkulturgefäß	Fragestellung	Hersteller	Zellzahl	Medium
Kleine Flasche 12,5 cm ²	Schlagfrequenz- messungen	Corning Life Sciences, USA, #353018	$1,1 \times 10^6$	2,5 ml
Große Flasche 25 cm ²	Proteinanalysen Epoxyeicosanoide	Corning Life Sciences, USA, # 353014	$2,2 \times 10^6$	5 ml
6-Well Platten 9,6 cm ² /Well	Rezeptor- Identifizierung	Sarstedt, Deutschland, # 83.3920	$0,9 \times 10^6$	2 ml
Chamber Slide (Kammerobjekträger) 4,4 cm ² /Well	Ca ²⁺ -Transient- messungen & elektrophysiologische Untersuchungen	Sarstedt, Deutschland, # 94.6190.202	$0,4 \times 10^6$	1 ml

Dem Medium wurde zum aussäen 10 µM des Cytochrom P450 Epoxygenase-Inhibitors N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide (MS-PPOH, Cayman Chemical, #206052-02-0) zugesetzt, um die Bildung von Epoxyeicosanoiden zu unterdrücken. Die verwendeten Zellkulturflaschen verfügten über einen geschlossenen Deckel und alle anderen Zellkulturgefäße wurden für die Kulturdauer mit Hilfe einer

selbstklebenden Aluminiumfolie (Sarstedt, # 95.1995) verschlossen, um so einen Gasaustausch zu verhindern und den pH-Wert stabil zu halten.

2.1.2 Kultivierung von NRKM

Die Zellen wurden am Tag nach der Präparation 2x mit PBS gewaschen und unter Verwendung von Antibiotika-haltigem Medium (Penicillin/Streptomycin, Tabelle 3) sowie 10 µM MS-PPOH kultiviert. Für die weitere Kultivierung wurde Antibiotika-freies Medium mit 5 µM MS-PPOH verwendet. Vor der ersten Verwendung, erfolgte eine 4-tägige Periode ohne Mediumwechsel. Vor der Verwendung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anwendungsspezifisch mit Medium oder Puffer versetzt. Detaillierte Angaben sind im jeweiligen Abschnitt vermerkt.

Zellen, die für die Messung der Schlagfrequenz verwendet wurden, konnten nach einer 2-tägigen Pause, Kultivierung mit Antibiotika-freiem Medium mit 5 µM MS-PPOH, nochmals vorbereitet und verwendet werden. Die Zellen einer einzelnen Präparation wurden maximal 9 Tage verwendet.

Die Zellen wurden außerdem in synthetischem Serum-freien, phosphatgepufferten Medium (SPSM) inkubiert. Die Zusammensetzung des Mediums wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Auf eine detaillierte Beschreibung der Entwicklung wird jedoch verzichtet. Stattdessen ist die Zusammensetzung des finalen Mediums Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: Zusammensetzung des NRKM Zellkulturmediums (SM20-I komplett)

Ingredienz	Konzentration	Hersteller
SM20-I	88 %	Biochrom, #F9005
NCS, Hitze inaktiviert ¹	10 %	Thermo Fisher Scientific, #16010159
L-Alanin-L-Glutamin	2 mM	Biochrom, #K 0302
FUDR ²	20 nM	Sigma Aldrich, # F0503
Hydrocortison	500 nM	Sigma Aldrich, # H0888
Nur für die ersten zwei Tage der Kultivierung		
Pen/Strep ³	1 %	Biochrom, # A 2212

¹ NCS – Newborn calf serum

² FUDR - 5-Fluoro-2'-deoxyuridine

³ Pen/Strep – Penicillin/Streptomycin

Tabelle 4: Zusammensetzung des SPSM

Ingredienz	Konzentration	Hersteller	Formulation of SPSM basis	Formulation of SPSM Komplett
NaCl	136.89 mM	Carl Roth, #926.5	X	X
KCl	5.37 mM	Carl Roth, #6781.1	X	X
KH ₂ PO ₄	0.441 mM	Carl Roth, #P018.1	X	X
Na ₂ HPO ₄	0.419 mM	Merck Millipore, #1065801000	X	X
CaCl ₂	1.263 mM	Merck Millipore, #1023821000	X	X
MgCl ₂	0.985 mM	Merck Millipore, #58330250	X	X
NaHCO ₃	3.928 mM	Carl Roth, #8551.1	X	X
Glukose	11.1 mM	Carl Roth, #6887.1	X	X
Arginin	0.123 mM	Sigma Aldrich, #A5131	X	X
L-Ala-L-Glu	200 µM	Biochrom, #K0302	X	X
Insulin	5 mg/ml	Sigma Aldrich, #I9278	-	X
Hydrocortison	5 µg/ml	Sigma Aldrich, #1001340943	-	X
MEM Vitamine	1 µl/ml	Bioconcept, #5-21KOO-H	-	X
Transferrin	7.5 µg/ml	Sigma Aldrich, #T8158	-	X

2.2 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der Genexpression wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) verwendet. Diese Methode kombiniert die klassische Amplifikation eines DNA-Templates mit einer Fluoreszenzmessung nach jedem Amplifikationszyklus. Es entsteht eine typische sigmoidale Kurve, deren Verlauf proportional zur Template-Menge ist und so einen Rückschluss auf das Expressionslevel des Gens zulässt.

2.2.1 RNA Isolation

Die Isolation erfolgt mit Hilfe einer kombinierten Methode aus einer Einphasen-Separation und einer Säulen-Aufreinigung.

Die Zellen oder Gewebeprobe wurden in NucleoZol (Macherey-Nagel, #740404.200) lysiert und wenn nötig bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß den Herstellerangaben und soll hier nur in Kürze dargestellt werden. Die lysierten Proben wurden mit Wasser gemischt und das dabei ausfallende Protein wurde mittels Zentrifugation abgetrennt. 80 % des Überstandes wurden mit dem gleichen Teil *Binding Buffer MX* (Macherey-Nagel, #740405.60) gemischt und die RNA mit Hilfe des Kits *NucleoSpin 8 RNA* (Macherey-Nagel, #740698.2) aufgereinigt. Die

genomische DNA wurde während dieser Aufreinigung mit rekombinanter DNase entfernt.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der gewonnen RNA wurde unter Verwendung einer NanoQuant Platte und dem Infinite M200 PRO Plattenreader (Tecan) durch eine Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.2.3 cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA, reverse Transkription genannt, erfolgte mit den Kits High Capacity cDNA RT (Thermo Fisher, # 4368813) oder PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, # RR037B). Der erste Kit arbeitet mit Oligo dT Primern und der zweite mit Oligo dT Primern und Random 6mer Primern. Der Vorteil des zweiten Kits ist die Geschwindigkeit der cDNA Synthese (15 min vs. 2 ½ h). Allerdings ist hier das Reaktionsvolumen stark eingeschränkt. Mit beiden Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben maximal 400 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Die umgeschriebene cDNA wurde auf eine Konzentration von 4 ng/µl verdünnt und in zwei Aliquote aufgeteilt. Aus der Mischung aller Proben wurde eine Verdünnungsreihe über 5 Schritte mit jeweils einem Verdünnungsfaktor von 1:2 erzeugt. Eine cDNA-freie Kontrolle wurde der cDNA Platte für die qRT-PCR hinzugefügt. Diese Platte mit den enthaltenen cDNA-Templates diente als Grundlage für die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.

2.2.4 RT-PCR

Es wurden zwei Arten von RT-PCRs durchgeführt, welche sich in der Detektion des Amplifikats unterschieden. Zum einen erfolgte die Detektion mit Hilfe von SyberGreen, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, und zum anderen mit Hilfe von FAM- (6-Carboxyfluorescein) und TAMRA-markierten (Tetramethylrhodamine) Sonden. FAM ist bei einer solchen Sonde am 3'-Ende und TAMRA am 5'-Ende eines Oligonukleotids gebunden. Die beiden Fluorophore sind mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) gekoppelt und bei einer Anregung wird die Lichtenergie in Wärme umgewandelt. Während einer Amplifikation bindet die Sonde hinter dem Vorwärtsprimer (in 5'-Richtung) und wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut, was zu einer Freisetzung der Fluorophore führt und damit zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Für eine Genexpressionsanalyse mit SyberGreen wird eine Mischung aus 6 µM Vorwärtsprimer und 6 µM Rückwärtsprimer hergestellt. Für die Analyse unter

Verwendung einer Sonde wurden der Mischung zusätzlich 3 μM Fluoreszenzsonde hinzugefügt. Jeder Primer wurde in einer finalen Konzentration von 300 nM und die Sonde in einer Konzentration von 150 nM eingesetzt. Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Beacon Designer (PREMIER Biosoft, Version 8.21) auf der Grundlage von Referenzsequenzen der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Die Sequenzen der Primer und Sonden können Tabelle 5 entnommen werden.

Für die RT-PCR wurde entweder der innuMIX qPCR MasterMix SyGreen (Analytik Jena, #845-AS-1300200) oder der innuMIX qPCR MasterMix Probe (Analytik Jena, #845-AS-1201000) verwendet. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes enthielt:

1 μl (4 ng) cDNA
0,5 μl Primer Mischung
2,5 μl Mastermix
1 μl Nukleotid-freies Wasser
 Σ 5 μl finales Volumen

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem qTower 2.2 (Analytik Jena) unter Anwendung des folgenden Temperaturprogramms:

95 °C, 120 s
95 °C, 3 s
60 °C, 10 s } 40x

Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software qPCRsoft 3.2 in Kombination mit einer Kalkulation in MS Excel, in der die Amplifikationszyklen unter Verwendung der Standardkurve in einem ersten Schritt in eine cDNA Konzentration umgerechnet und anschließend auf ein unreguliertes Gen wie z.B. 18S, GAPDH oder HPRT normalisiert wurden.

Tabelle 5: Sequenzen der Primer und Sonden für die Genexpressionsanalyse.

Gen	Spezies	Primer	Sequenz (5'-3')
FlnA	Ratte	Sonde	AGAAGACATGCTCTGCCACCA
		Vorwärts	GGTTGTACATAGGACTTC
		Rückwärts	CACTCTAGCCACTATTCA
CYP2J3	Ratte	Vorwärts	GAGGTTCCATTCCAAGGT
		Rückwärts	TGACACATACAGAGACACAT
CYP2C11	Ratte	Vorwärts	GCTTTAACTCACATATCC
		Rückwärts	GGAACAGGAATAGAATA
18S	Alle	Sonde	ACCTCTATGCCAACACAGTGCT
		Vorwärts	GACGTTGACATCCGTAAA
		Rückwärts	GAGCAATGATCTTGATCTTC

2.3 Proteinanalytik

Für die Analyse der Proteinmenge, des Phosphorylierungsstatus und der Aktivität eines Proteins wurden unterschiedliche Antikörper-basierte Methoden angewendet. Die Analyse erfolgte entweder klassisch mittels Western Blot, ELISA, oder unter Verwendung der Kits von Cisbio (PerkinElmer).

2.3.1 Western Blot

Der immunologische Nachweis von Proteinen mittels Western Blot erfolgte durch folgende Schritte:

1. Herstellung und Quantifizierung von Proteinproben
2. Auftrennung des Proteingemischs mittels SDS-Gelelektrophorese
3. Übertragung und Immobilisierung der Proteine auf eine Membran
4. Nachweis des Proteins mittels Antikörper-Reaktion und Lumineszenz-Detektion

Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgendem im Detail beschrieben:

Die Herstellung von Proteinproben für die immunologische Untersuchung erfolgte aus kultivierten Zellen durch eine Kombination von chemischer und physikalischer Lyse. Die Zellen wurden einmal in kalter phosphatgepufferter Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PBS, Biochrom, #L1820) gewaschen, anschließend in PBS geschabt und bei $500 \times g$, 10 min, 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend in einem Lysepuffer resuspendiert. Die Zusammensetzung des Lysepuffers richtete sich dabei nach dem zu analysierenden Protein und kann der Tabelle 7 entnommen werden. Der Lysepuffer wurde frisch mit Protease-Inhibitoren (Thermo Fisher, #A32953) und, wenn der Phosphorylierungsstatus eines Proteins analysiert werden sollte, zusätzlich mit Phosphatase-Inhibitor (Thermo Fisher, #A32957) versetzt. Die Proben wurden

anschließend bei RT für 30 min geschüttelt. Wenn sich in der Probe noch erkennbare Zellbruchstücke befanden, wurde die Probe zusätzlich mit Ultraschall, einem Ultra-Turrax® oder mit Homogenisator (Analytik Jena, SpeedMill Plus) aufgeschlossen. Abschließend wurden die Proben 10 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt.

Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte im Mikrotitermaßstab mit dem Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay Kit (Thermo Fisher, #23246). 10 µl der Probe wurden hierzu mit 300 µl des Reagenzes versetzt und die Absorption nach 10 min bei 595 nm im Plattenreader (Tecan Infinite M200 PRO) gemessen. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine BSA-Standardreihe und eine Lysepuffer-Kontrolle (Leerwert) mitgeführt. Die Kalkulation erfolgte über eine Standardkurve mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde eine Proteinmenge zwischen 1 bis 50 µg mit einem Ladepuffer versetzt. Als Ladepuffer wurde entweder 4-fach RotiLoad (Carl Roth, #K929.3) oder 6-fach Lämmli-Puffer (0,06 M Tris pH 6,8, 12 % SDS, 0.6 M DTT, 60 % Glycerol, 0,06 % Bromphenolblau) verwendet (Tabelle 7). Die Proben wurden 10 min bei 95 °C erhitzt und 5 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Gradientengel (4-20 % Mini Protean TGX Gel, BioRad, #456-1096) aufgetragen. Es wurde der Lämmli-Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) verwendet. Die Proben sind bei 80 V in das Gel eingelaufen und anschließend bei 150 V aufgetrennt worden. Auf jedes Gel wurde entweder der Proteingrößenstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, #26620) oder der Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Fisher, #26625) geladen. Mit Abschluss der Elektrophorese wurde der relevante Größenbereich aus dem Gel ausgeschnitten.

Im nächsten Schritt wurden die Proteine auf eine Membran übertragen und immobilisiert. Der Transfer erfolgte auf eine PVDF Membran (BioRad, #1704273) mit Hilfe des Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, #1704150). Die Membran wurde vor dem Transfer mit Ethanol (Carl Roth, #T171.6) aktiviert. Der Transfer erfolgte innerhalb von 5 bis 10 min.

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Inkubation der Membran mit peptidspezifischen Antikörpern (Tabelle 7). Alle Inkubationsschritte der Membran erfolgten unter ständigem Schütteln mit einem Kippschüttler. Um die unspezifische

Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst für 1 h mit 5 % Magermilch (Carl Roth, # T145.2) oder 1-5 % Rinderserum Albumin (*bovine serum albumin*, BSA) gelöst in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit dem Primärantikörper über Nacht in 5 % Magermilch oder 1-5 % BSA in PBS versetzt mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Aldrich, #P7949) bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dann 3x für 10 min mit PBST (PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten (*horseradish peroxidase*, HRP), sekundären Antikörper in 5 % Magermilch oder 1-5 % BSA in PBS versetzt mit 0,1 % Tween 20 inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran nochmals 3x für 10 min mit PBST gewaschen. Die Detektion erfolgte am ChemStudio (Analytik Jena) mit dem Western Blot Ultra Sensitive Luminol Reagenz (Takara, # T7104Q). Die densitometrische Analyse erfolgte mit der Software VisionWorks (Analytik Jena).

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lysepuffer.

Lysepuffer	Zusammensetzung	Hersteller
RIPA-Puffer	20 mM Tris (pH 7,5)	Sigma Aldrich, #T1503
	150 mM NaCl	Carl Roth, #9265.2
	1 % NP-40	Sigma Aldrich, #I3021
	1 % Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich, #D6750
	1 mM EDTA	Carl Roth, #11280
	1 mM EGTA	Sigma Aldrich, #03777
Urea-Puffer	20 mM Tris (pH 6,8)	Sigma Aldrich, #T1503
	20 % Glycerol	Carl Roth, #6962.1
	2 % SDS	Carl Roth, #CN30.2
	6 M Urea	Sigma Aldrich, #33247
	2 mM EDTA	Carl Roth, #11280
	150 nM Bromphenolblau	Merck, #11746.0005
Kranias-Puffer	30 mM Tris (pH 8,8)	Sigma Aldrich, #T1503
	10 % Glycerol	Carl Roth, #6962.1
	3 % SDS	Carl Roth, #CN30.2
	5 mM NaF	Sigma Aldrich, #S7920
	5 mM EDTA	Carl Roth, #11280
Tris-Puffer	10 mM Tris (pH 8,8)	Sigma Aldrich, #T1503
1 % OGP	10 mM Tris (pH 7,4)	Sigma Aldrich, #T1503
	1 % Octyl beta-D glycopyranoside (OGP)	Sigma Aldrich, #O8001
1 % SDS	10 mM Tris (pH 7,4)	Sigma Aldrich, #T1503
	1 % SDS	Carl Roth, #CN30.2

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper, Lyse- und Ladepuffer.

Protein	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Lysepuffer	Ladepuffer
FlnA	Rabbit polyclonal Filamin A antibody	1:1.000	Origene, #TA325464	RIPA-Puffer	RotiLoad
pAKT T308	Rabbit monoclonal Phospho-AKT (Thr308) (C31E5E)	1:1.000	Cell Signaling #2965	10 mM Tris (pH 7,4)	RotiLoad
pAKT S473	Rabbit monoclonal Phospho-AKT (Ser473) (D9E)	1:2.000	Cell Signaling #4060	10 mM Tris (pH 7,4)	RotiLoad
AKT pan	Rabbit polyclonal AKT antibody	1:1.000	Cell Signaling #9272	10 mM Tris (pH 7,4)	RotiLoad
eNOS S1177	Anti p-eNOS (Ser1177) pAB rabbit	1:1.000	Cell Signaling #9571	Urea-Puffer	-
eNOS pan	Anti eNOS pAb rabbit	1:1.000	Cell Signaling #32027	Urea-Puffer	-
PLN	Mouse monoclonal anti-PLN	1:5.000	Badrilla #A010-014	1 % OGP	RotiLoad
pPLN S16	Rabbit polyclonal anti-pPLN S16	1:2.000	Badrilla #A010-012	1 % OGP	RotiLoad
pPLN T17	Rabbit polyclonal anti-pPLN T17	1:2.000	Badrilla #A010-013	1 % OGP	RotiLoad
RyR	Mouse monoclonal anti-RyR2	1:1.000	Thermo Fischer #MA3-916	Kranias-Puffer	Lammlipuffer
pRyR S2808	Rabbit polyclonal anti-pRyR2 S2808	1:1.000	Badrilla #A010-030	Kranias-Puffer	Lammlipuffer
pRyR S2814	Rabbit polyclonal anti-pRyR2 S2814	1:1.000	Badrilla #A010-031	Kranias-Puffer	Lammlipuffer
Cyp2J3	Rabbit polyclonal anti-Cyp2J3	1:3.000	Biorbyt #orb100613	1 % SDS	RotiLoad
Cyp2c11	Rabbit polyclonal anti-Cyp2C11	1:2.000	Thermo Fisher #PA3034	1 % SDS	RotiLoad
Referenzproteine					
β -Actin	Mouse monoclonal anti- β -Actin	1:400	Thermo Fisher #MA511869	-	-
β -Actin	Rabbit polyclonal anti- β -Actin	1:5.000	Thermo Fisher #PA116889	-	-
Vinculin	Mouse monoclonal anti-Vinculin	1:2.000	Thermo Fisher #14-9777-82	-	-
Vinculin	Rabbit polyclonal anti-Vinculin	1:3.000	Thermo Fisher #PA5-85279	-	-
Sekundäre Antikörper					
Anti-Kaninchen	Goat anti-rabbit IgG-Peroxidase	1:10.000	Thermo Fischer # G21234	-	-
Anti-Maus	Horse anti-mouse IgG-Peroxidase	1:10.000	Thermo Fischer #G21040	-	-
Anti-Kaninchen	Donkey anti-rabbit IgG DyLight 488	1:5.000	Thermo Fischer # SA5-10038	-	-
Anti-Maus	Donkey anti-mouse IgG Alexa 488	1:5.000	Thermo Fischer # A32766	-	-

2.3.2 Cisbio Assay

Cisbio Bioassay, mittlerweile von PerkinElmer übernommen, ist ein Hersteller von Hochdurchsatz-Immunoassays. Der Cisbio Assay basiert auf einem zeitaufgelöstem FRET (*homogeneous time-resolved fluorescence*, HTRF) und basiert auf der Bindung von zwei unterschiedlich konjugierten Antikörpern in einer mobilen Phase an den Analyten. Nach der Übertragung der Energie vom Donor auf den Akzeptor erfolgt eine verzögerte Emission der Fluoreszenz. Dies führt zu einem deutlich verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis. Die Analysen wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und eine Übersicht über die Analyten findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Cisbio Assays.

Analyt	Cisbio Bestellnummer
Phospho-AKT1/2/3 (Ser473) cellular kit	#64AKSPET
Phospho-AKT1/2/3 (THR308) cellular kit	# 64AKTPEG
Total AKT cellular kit	# 64NKTPET

2.3.3 PI3K Aktivitäts-Assay

Die Untersuchung der Phosphoinositid-3-Kinasen-Aktivität (PI3K) erfolgte in stimulierten NRKM Lysaten, aus denen die Proteine mittels Immunpräzipitation aufgereinigt und die Aktivität der Kinasen in einem kompetitiven Assay bestimmt wurden. Die Stimulation der NRKMs erfolgte in SPSM Complete (Tabelle 4). Die Zellen wurden 4 h vor der Stimulation 2x mit PBS gewaschen und in SPSM Complete inkubiert. Die Stimulation mit Vehikel (Ethanol), 17,18-EEQ und C4 erfolgte für 10 min bei 31 °C. Anschließend wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und in kaltem PBS mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Thermo Fisher, #A32961) geschabt und bei 400 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in PI3K Lysepuffer (Tabelle 9) resuspendiert und mechanisch mittels Ultra-Turrax[®] homogenisiert. Die Lysate wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Immunpräzipitation erfolgte unter Verwendung von 120 µg Lysat und 5 µl des p85-PI3K Antikörpers (Merck Millipore, #ABS234). Während der Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C, wurden die Dynabeads Protein G (Thermo Fisher, #10004D) durch dreimaliges Waschen mit PI3K Lysepuffer vorbereitet. Für die Isolation der Dynabeads wurde der DynaMag-2 Magnet (Thermo Fisher, #12321D) verwendet. 100 µl (3 mg) Dynabeads wurden jeder Probe hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C über Kopf schwenkend inkubiert. Die gebundene PI3K wurden

2x mit PI3K Lysepuffer, 3x mit PI3K Waschpuffer I, 2x mit PI3K Waschpuffer II und abschließend 2x mit Kinase-Reaktionspuffer gewaschen (Tabelle 9). Der Kinase-Reaktionspuffer ist Bestandteil des verwendeten PI3K Aktivitäts-Assays (Echelon Bioscience, #K-1000s). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Puffer im PI3K Aktivitäts-Assay.

Ingredienz	Konzentration	Hersteller
PI3K Lysepuffer		
Tris pH 7,4	20 mM	Sigma Aldrich, #154563
NaCl	137 mM	Carl Roth, #9265.2
MgCl ₂	1 mM	Merck, #5833.0250
CaCl ₂	1 mM	Merck, #1023821000
Na ₃ VO ₄	1 mM	Sigma Aldrich, #450243
IGEPAL	1 %	Sigma Aldrich, #I3021
PMSF	1 M	Sigma Aldrich, #78830
PI3K Waschpuffer I		
Tris pH 7,4	100 mM	Sigma Aldrich, #154563
LiCl	5 mM	Sigma Aldrich, #62476
Na ₃ VO ₄	1 mM	Sigma Aldrich, #450243
PI3K Waschpuffer II		
Tris pH 7,4	10 mM	Sigma Aldrich, #154563
NaCl	150 mM	Carl Roth, #9265.2
EDTA	5 mM	Sigma Aldrich, #EDS
Na ₃ VO ₄	1 mM	Sigma Aldrich, #450243

2.4 Lentivirale Transduktion

Die genetische Manipulation von primären Kardiomyozyten erfolgte mittels lentiviralem Gentransfer. Die verwendeten Lentiviren wurden durch ein Verpackungsplasmidsystem der 4. Generation unter Freigabe des Landesamts für Gesundheit und Soziales (gentechnische Anlage 523193-12) in einem Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 erzeugt.

Das Verpackungsplasmidsystem zeichnet sich durch sehr hohe Sicherheit aus, da die lentiviralen Gene auf fünf Plasmide verteilt werden und die Verpackungssequenz, welche dazu führt, dass das virale RNA-Genom in die viralen Partikeln gelangt, sich nur auf einem der Plasmide befindet. So entstehen in diesem System replikationsdefiziente, pseudovirale Partikel. Für die Amplifikation der pseudoviralen Partikel wurde das Lenti-X System (Takara, #631276) in Kombination mit Plasmiden der Firma GeneCopoeia verwendet. Die pseudoviralen Lentiviren verfügen über das VSV-G

Oberflächenprotein, welches die Transduktion vermittelt und so das virale Genom in das Genom der Zielzelle integriert. Die Sequenzen der Verpackungsplasmide werden vom Hersteller nicht angegeben und sind daher nicht bekannt.

Für die Reduktion der Expression eines Gens wurde ein auf shRNA (*small hairpin RNA*) basierender Ansatz gewählt, welcher über RNA-Interferenz zur Reduktion der Expression des Zielgens führt. Die Vektorkarte des Plasmids kann Tabelle 10 entnommen werden. Zur Überexpression eines Gens in der Zielzelle wurde die Sequenz des Gens unter Kontrolle des murinen CMV-Promotors in das Genom der Zielzelle integriert.

Alle Teilschritte der lentiviralen Transduktion werden im Folgenden im Detail beschrieben. Die Effizienz der genetischen Manipulation wurde nach jedem Experiment auf mRNA- und Proteinebene (Abschnitt 2.1 und 2.3) überprüft.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten lentiviralen Plasmide.

Plasmid	Vektorkarte
Lentivirales shRNA-Plasmid	
Lentivirales Überexpressions-Plasmid	

2.4.1 Amplifikation von Plasmiden in *E.coli*

Die Amplifikation des shRNA- oder Überexpressions-Plasmids erfolgte durch Übertragung des Plasmids in *E.coli* (DH5 α , Thermo Fisher, #18265017). Es wurde die Methode des Hitzeschocks angewendet.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-10 ng Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 30 sek Hitzeschock

bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation von 2 min auf Eis. Anschließend wurden 250 µl S.O.C-Medium (Thermo Fisher, #15544034) zugesetzt und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Erzeugung von Einzelklonen wurden die Zellen auf LB-Agar (Lennox, Carl Roth, # X965.2) ausplattiert, welcher 0,1 mg/ml Ampicillin (Sigma Aldrich, # A0166) als Selektionsmarker enthielt, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mindestens zwei Einzelkolonien je Plasmid wurden gepickt und in 3 ml LB-Medium (Lennox, Carl Roth, # X964.2) mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C schüttelnd vermehrt. Ein Aliquot von 2 ml der Bakteriensuspension wurde entnommen und die Plasmid DNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin Plasmid Easy Pure (Macherey-Nagel, #740727) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau charakterisiert. NruI-HF (New England Biolabs, # R3192S) und ScaI-HF (New England Biolabs, #R3122S) wurden für den Restriktionsverdau entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Plasmid wurde durch den Verdau in zwei Fragmente der Größe 1330 bp und 7041 bp (Angabe beziehen sich auf die shRNA-Plasmide) gespalten. Das restriktierte als auch das Original-Plasmid wurden in einem 0,8 % Agarose-Gel analysiert. Die Agarose (Carl Roth, # R3122S) wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris, Sigma Aldrich, #T1503, 20 mM Essigsäure, Carl Roth, # 6755.1, 1 mM EDTA Carl Roth, #11280, pH 8,0) durch Aufkochen gelöst, wobei ein Volumenausgleich nach dem Kochen erfolgte. Zur Detektion der DNA, wurde der Agaroselösung SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher, #S33102) zugesetzt. Die Proben wurden unter Verwendung des 6-fach DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher, #R0611) in das Gel geladen. Zur Überprüfung der Größe wurde zusätzlich der Supercoiled DNA Ladder (New England Biolabs, # N0472S) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 1,5 h. Die abschließende Detektion erfolgte am ChemStudio (Analytik Jena). Der Klon wurde als valide betrachtet, wenn das Plasmid die erwartete Größe hatte und es durch Restriktionsverdau zur Bildung der erwarteten Fragmente gekommen ist.

300 µl der Bakteriensuspension dieses Klons wurde für das sogenannte Animpfen von 300 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis sie bei 600 nm eine optische Dichte von 3 erreicht hat. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit Nucleo Bond Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel, #740424) entsprechend den Herstellerangaben. Die Konzentration des gewonnenen Plasmids wurde unter Verwendung der NanoQuant Platte und dem Infinite M200 PRO Plattenreader (Tecan) durch die Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.4.2 Amplifikation von Lentiviren

Die Amplifikation der Lentiviren erfolgte in HEK293ta (*human embryonic kidney*) Zellen (GeneCopoeia, #LT008), welche in DMEM (Corning, #10-101-CV) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (Biochrom, #S0615) und 1 % Pen/Strep (Corning, #30-002-CI) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Für jeden zu amplifizierenden Virus wurden zwei Tage vor der Transfektion $1,3 \times 10^6$ Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml Medium ausgesät. Für die Transfektion der Zellen wurde Lenti X Packaging Single Shots (Takara, #631275) verwendet, welches die Verpackungsplasmide und das Transfektionsmittel enthält. Dieser Mischung wurden 7 µg eines Plasmids aus Abschnitt 2.3.3 zugesetzt und das Produkt wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Zellen erhielten 14 h nach der Transfektion frisches Medium und gaben ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich Lentiviren in den Überstand ab. Der Überstand wurde ein erstes Mal nach 72 h und ein weiteres Mal nach 48 h gewonnen. Die Überstände wurden jeweils 10 min bei $400 \times g$ zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Membranfilter gesaugt um die Viren von Zellbruchstücken zu befreien. Die Überstände wurden mit 8,5 % PEG 6000 (Carl Roth, #0158) und 0,4 M NaCl (Carl Roth, #9265) versetzt, auf 4 °C abgekühlt und 30 min bei $7000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die präzipitierten Lentiviren in PBS resuspendiert.

2.4.3 Bestimmung des viralen Titers

Für die routinemäßige Bestimmung des viralen Titers wurden die Lenti-X GoStix (Takara, #631244) in Kombination mit der Mobiltelefon App von Takara gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Stix basieren auf einem p24 Schnelltest und benötigen zur Bestimmung der infektiösen Partikel einen Virus-Referenz-Titer, welcher einmalig durch die Infektion von HEK293 Zellen mit Scramble Virus bestimmt wurde. Das angewandte Protokoll ist eine adaptierte Version eines Protokolls der Universität von Texas, MD Anderson Cancer Center [117].

Bestimmung des Virus-Referenz-Titer

24 h vor der Transduktion wurden 5×10^5 HEK293 Zellen in 1 ml DMEM (Abschnitt 2.4.2) auf 6-Well Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zellen einer 6-Well Platte wurden mit Trypsin (Corning, #25-051-CI) abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe des automatischen Zellzählgeräts Luna-FL (Logos Biosystems, #L20001) im Durchlichtmodus bestimmt. Der Virus wurde 5-fach seriell 1:10 in PBS verdünnt und 10 µg/ml Polybren (Sigma Aldrich, #H9268) hinzugefügt. Jede Verdünnung wurde in

6-fach Bestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt, mit der Virusverdünnung versetzt und für 9 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und die Zellen wurden für weitere 72 h inkubiert, anschließend abgelöst und die Anzahl der GFP-positiven Zellen mittels FACS bestimmt. Für eine genaue Berechnung des Virus-Referenz-Titer muss die Transduktionsrate im Bereich von 10-20 % liegen. Die Kalkulation des Virus-Referenz-Titers pro Milliliter Virusstocklösung erfolgte nach der folgenden Formel.

Formel 1: Bestimmung des Virus-Referenz-Titers

$$\text{Virus Titer} = (N \times P) / (V \times D)$$

N steht für die Anzahl der für die Transduktion eingesetzten HEK293 Zellen, P für den Anteil der GFP-positiven Zellen, V für das eingesetzte Volumen der Virusverdünnung in Millilitern und D für den Verdünnungsfaktor. Der bestimmte Virus-Titer lag bei $1,17 \times 10^6$ TU/ml (transduction unit – transduzierende Partikel) Die Voraussetzung für die Verwendung des Virus-Referenz-Titer war die genaue Einhaltung des Virenamplifikationsprotokolls (Abschnitt 2.4.2). Virus-Referenz-Titer Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die NRKM wurden gemäß den Abschnitten 0 und 2.1.2 isoliert und kultiviert. Für die lentivirale Transduktion wurden Zellen zwei Tage nach der Präparation verwendet. Die Zellen wurden mit einem Virus-Zellen-Verhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) von 20 in drei aufeinanderfolgenden Runden im Abstand von 3 h infiziert. Zur ersten Infektionsrunde erhielten die Zellen Virus in frischem SM20-I Medium (Tabelle 3) mit 10 µg/ml Polybren. In den beiden folgenden Infektionsrunden wurde jeweils nur frischer Virus zum Medium hinzugefügt. Mit diesem Protokoll wurde eine Transduktionsrate von 86,8 % erreicht.

2.5 Schlagfrequenz-Assay

Die Besonderheit der NRKM, spontan und rhythmisch in Kultur zu kontrahieren, wurde in diesem Assay genutzt, um den Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Schlagfrequenz zu messen. Die Zellen organisieren sich nach dem Aussäen in sogenannten Clustern. Ein Cluster besteht aus einer Vielzahl von Kardiomyozyten, welche alle gleichzeitig kontrahieren. Die einzelnen Cluster sind durch Zellausläufer miteinander verbunden. Über diese Zellausläufer kommt es zu einer Weiterleitung des Aktionspotenzials.

Die Zellen wurden 4 h vor Beginn der Messung 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit Messmedium (SM20-I Complete ohne Pen/Strep und mit 20 mM HEPES) versetzt und bis zur Messung bei 37 °C inkubiert (vgl. 2.1.2). Der pH-Wert der 1 M HEPES-Lösung (Thermo Fisher, #15630049) wurde auf 6,8 eingestellt. Die so entstehende 800 mM Lösung wurde zum Abpuffern des Messmediums verwendet, womit sich ein pH-Wert von 7,0 im Messmedium ergab.

Für die Messung wurden die Zellen 15 min bei 31 °C inkubiert, vier bis sechs Bereiche auf dem Flaschenboden markiert. Jeder markierte Bereich umfasste mehrere Cluster, welche synchron schlugen. Die basale Schlagfrequenz der Cluster innerhalb des markierten Bereichs wurde für 15 sek ermittelt. Für die Messung wurde ein Leica Inversmikroskop (Leica DM IRB), gekoppelt mit einem IonOptix Myocyte Contractility System und einer CCD Kamera, verwendet. Die Detektion der Schlagfrequenz erfolgte mit Hilfe eines Edge-Detektors (IonOptix, IonWizard Version 6), welcher die Kontraktionen der Cluster in einen Graphen umwandelte. Die Anzahl der Peaks pro 15 Sekunden wurde ermittelt und in eine Excel-Tabelle überführt.

Im Anschluss an eine Behandlung der Zellen mit einer Testsubstanz, wurde die Schlagfrequenz eines Clusters in den markierten Bereichen wiederholt bestimmt. Der Einfluss der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz wurde dann als Differenz zur basalen Schlagfrequenz kalkuliert. Eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren kann der Tabelle 11 entnommen werden.

Die Anzahl der gemessenen Cluster stellt in den weiteren Analysen die n-Zahl dar. Jede Messung wurde mit mindestens zwei unabhängigen Zellpräparationen durchgeführt.

Tabelle 11: Übersicht zu verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Zielprotein	Konzentration	Hersteller	Inkubationszeit
5-HD	mitoK _{ATP} -Kanal	100 μ M	Sigma Aldrich #H135	7 min
Calphostin C	PKC	100 nM	Sigma Aldrich #C6303	7 min
Cholera Toxin	G α s	200 ng/ml	Sigma Aldrich #C8052	4 Std
HMR 1098	sarcK _{ATP} -Kanal	10 μ M	Axon Medchem #1757	7 min
L-NAME	NO-Synthase	100 μ M	Sigma Aldrich #N5751	30 min
MS-PPOH	CYP-Epoxygenasen	100 nM/3 μ M	Cayman Chemicals #75770	4 Std
Naloxon	Filamin A	50 pM	Sigma Aldrich #N7758	7 min
Pertussis Toxin	G α i	200 ng/ml	Thermo Fisher #PHZ1174	4 Std
Rp-cAMPS	PKA	1 μ M	Sigma Aldrich #B2432	7 min
Rp-cGMPS	PKG	1 μ M	Sigma Aldrich #SML1614	7 min
Wortmannin	PI3K	100 nM	Sigma Aldrich #N7758	30 min

2.6 Nachweis der Bildung von Epoxyeicosanoiden in NRKM

Die NRKM wurden bis zum Versuch ohne MS-PPOH kultiviert, am Versuchstag, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, vorbereitet, wobei die Hälfte der Flaschen mit 3 μ M MS-PPOH versetzt wurde. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37 °C und vor Versuchsbeginn 15 min bei 31 °C inkubiert. Jeweils 8 Flaschen mit und ohne MS-PPOH wurde 4 μ M EPA-d₅ (Cayman, #10005056) oder DHA-d₅ (Cayman, #10005057) zugesetzt und 1 Stunde bei 31 °C leicht schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, geschabt, pelletiert, in 200 μ l H₂O resuspendiert und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Die Aufarbeitung und Messung der Proben erfolgte durch Dr. Maximilian Blum (OMEICOS Therapeutics GmbH). Die Proben wurden mit internem Standard (Tabelle 12), 5 μ l Butylhydroxytoluol (10 mg/ml, Carl Roth, #3559.2), 1 ml Acetonitril (Carl Roth, #8825.1) und 100 μ l NaOH (10 M, Carl Roth, #6771.1) bei 60 °C für 30 min alkalisch hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend mit 100 μ l Essigsäure (Carl Roth, #6755.1) und 3,5 ml Phosphat-Puffer (PP, pH 6,0, 58,6 mM KH₂PO₄ [Carl Roth, #6878.1], 10 mM Na₂HPO₄ [Carl Roth, # P030.3], 5 % Methanol [Carl Roth, #KK39.2]) neutralisiert. Der pH-Wert wurde auf 6,0 eingestellt. Die Eicosanoide wurden mittels

Festphasenextraktion aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden Blond Elut Certify II Säulen (Agilent, #14102088) verwendet, welche zunächst mit 3 ml Methanol und anschließend mit 3 ml KKP äquilibriert wurden. Das Volumen der Lösungen wurde mit Unterdruck durch die Säulen gesaugt. Nach dem Durchlauf der Probe, wurde die Säule mit Methanol/Wasser (50 %, v/v) gewaschen, 2 min trocken gesaugt und anschließend die Probe mit 24,5 % n-Hexan (Carl Roth, #T861.1), 74,5 % Essigsäureethylester (Carl Roth, #7336.1) und 1 % Essigsäure eluiert. Die Bestimmung erfolgte bei der Firma Lipidomix mittels des HPLC-Tandem-Massenspektrometers LC-MS/MS Agilent 6470.

Tabelle 12: Zusammensetzung des internen Standards.

Ingredienz	Menge in der Probe [ng]	Hersteller
PGF _{2α} -d ₄	0,50	Cayman Chemical, #10007275
LTB ₄ -d ₄	0,50	Cayman Chemical, #29629
15-HETE-d ₈	0,50	Cayman Chemical, #334720
13-HODE-d ₄	0,50	Cayman Chemical, #338610
20-HETE-d ₆	0,50	Cayman Chemical, #390030
14,15-DHET-d ₁₁	0,50	Cayman Chemical, #10008040
8,9-EET-d ₁₁	0,50	Cayman Chemical, #10009532
9,10-DiHOME-d ₄	0,50	Cayman Chemical, #10009993
12,13-EpOME-d ₄	0,50	Cayman Chemical, #10009996
13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin E ₂ -d ₄	0,50	Cayman Chemical, #10010606
PGB ₂ -d ₄	1,00	Cayman Chemical, #311210
PGE ₂ -d ₄	1,00	Cayman Chemical, #10007273

2.7 Elektrophysiologische Untersuchung in NRKM

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der NRKM umfassten die Bestimmung der Refraktärzeit und elektrischen Erregbarkeit. Die elektrische Erregbarkeit wurde als die Mindestspannung der elektrischen Stimulation definiert, die erforderlich ist, um synchrone Kontraktionen der NRKM (Spannungsschwelle) mit der gegebenen Stimulationsfrequenz hervorzurufen. Die Refraktärzeit wurde definiert als die maximale Stimulationsfrequenz, der die Zellen folgen konnten. Die Zellen mussten der elektrischen Stimulation mindestens 5 Sekunden folgen, um als zuverlässig angesehen zu werden.

Die Messung wurde in Kammerobjektträgern (Sarstedt, #94.6140.202) durchgeführt. Am Tag des Experiments wurde das Kulturmedium durch 2 ml Kang & Leaf Puffer (Tabelle 13) ersetzt. Die Zusammensetzung des Puffers ist der Publikation von J.X. Kang und A. Leaf entnommen [39] entnommen. Die Messung wurde nach einer Äquilibrierungszeit von 4 h gestartet. Die Zellen wurden für 10 min bei 31 °C auf dem Mikroskop-Heiztisch inkubiert, bevor das Perfusionssystem eingeschaltet wurde. Das Perfusionssystem

bestand aus einer Rollenpumpe und einem Wasserbad. Im Wasserbad wurde der mit den Testsubstanzen versetzte Kang & Leaf Puffer erwärmt und mit Hilfe der Rollenpumpe in die Kammer des Objektträgers transportiert.

Die basale Schlagrate der Zellen lag in diesem Puffer unter 25 Schlägen pro Minute ($\leq 0,4$ Hz), was eine Voraussetzung für die zuverlässige Bestimmung der elektrischen Erregbarkeit und der Refraktärzeit durch elektrische Stimulation war. Die Zellen wurden mit einer konstanten Flussrate von 1,5 ml pro Minute und einer Temperatur von 31 °C über den gesamten Beobachtungszeitraum perfundiert. Die Behandlung der Zellen mit C4 oder Ethanol erfolgte durch Umstellung auf den dafür vorbereiteten Kang & Leaf Puffer.

Die elektrische Stimulation der NRKM erfolgte mit einem Elektrodenpaar, das aus zwei Edelstahldrähten mit einem Durchmesser von 0,3 mm, einer Länge von 17 mm und einem Abstand zwischen den Drähten von 5 mm bestand. Ein positiver Rechteckimpuls mit einer Impulslänge von 1,5 ms wurde mit dem MyoPacer-Zellstimulator (IonOptix) erzeugt.

Die Spannungsschwelle wurde für die Frequenzen von 1-4 Hz in 0,5-Hz-Schritten bestimmt. Die Spannungsschwelle für jede Stimulationsfrequenz wurde dokumentiert.

Die Refraktärzeit wurde nach der Bestimmung der Spannungsschwelle mit einer konstanten Spannung gemessen, die auf das 1,5-fache der für eine zuverlässige Stimulation der Zellen erforderlichen Spannung bei 4 Hz festgelegt wurde. Um die Refraktärzeit zu ermitteln, wurde die Stimulationsfrequenz schrittweise um 0,1 Hz erhöht, bis die Zellen der vorgegebenen Frequenz nicht mehr folgen konnten. Die höchste Frequenz, der die Zellen zuverlässig folgen konnten, wurde dokumentiert. Die Spannungsschwelle und Refraktärzeit wurden vor und nach der Behandlung der Zellen bestimmt. Die Spannungsschwelle (ΔmV) und die Refraktärzeit (Δms) wurden als Differenz zwischen dem basalen und dem von der Behandlung beeinflussten Wert berechnet.

Tabelle 13: Formulierung des Kang & Leaf Puffers

Ingredienz	Konzentration	Hersteller
NaCl	140 mM	Carl Roth, #9265.2
KCl	5 mM	Carl Roth, #6781.1
MgCl ₂	1 mM	Merck Millipore, #58330250
CaCl ₂	1,2 mM	Merck Millipore, #1023821000
Na ₂ HPO ₄	1 mM	Merck Millipore, #1065801000
HEPES	5 mM	Sigma Aldrich, #H3375
Glucose	10 mM	Carl Roth, #6887.1

2.8 Ca²⁺-Transient- und Kontraktilitäts-Messungen in NRKM

Die Messung des zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationsverlaufs (Ca²⁺-Transient) wurde mit der Messung der Kontraktionslängenveränderung (Kontraktilität) während der Kontraktion der NRKM kombiniert. Aus dem Verlauf und der Amplitude der Kurven können Aussagen über die beteiligten Ca²⁺-Ionenkanäle sowie den Einfluss auf den kontraktilen Apparat der Kardiomyozyten abgeleitet werden.

Die Messung wurde in Kammerobjektträgern am Ca²⁺-Mikroskop-System der Firma IonOptix durchgeführt. Das System verfügt über einen sogenannten *Hyper Switch* der es ermöglicht die Anregungswellenlänge mit einer Frequenz von 200 Hz zu ändern. Der verwendete fluorogene Ca²⁺-Indikator, FURA-2, verfügt über zwei Anregungswellenlängen, welche von dem Ca²⁺-Bindungszustand des Indikators abhängig sind. Im Ca²⁺-freien Zustand absorbiert FURA-2 Licht mit einer Wellenlänge von 380 nm und im Ca²⁺-gebundenen Zustand Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm. Emittiert wird in beiden Fällen Licht der Wellenlänge 510 nm. Die Fluoreszenzintensität ergibt sich aus dem Verhältnis des emittierten Lichts beider Anregungswellenlängen. Zusätzlich zur Messung des Ca²⁺-Transienten ist das System mit Hilfe eines Edge-Detektors in der Lage die Kontraktilität zu messen (Abschnitt 2.5).

Am Tag des Experiments wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für 45 min bei 37 °C mit 1 µM FURA-2 AM (Sigma Aldrich, #47989) in HBSS (Biochrom, #L2035) beladen. Um den Transport des hydrolysierten FURA-2 aus dem Zytosol zu verhindern, wurde allen verwendeten Lösungen 1 µM Probenecid, ein Inhibitor des organischen Anionen-Transportes, zugesetzt [118]. Mit Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit HBSS gewaschen und mit 2 ml SM20-I Complete, ohne Pen/Strep aber mit 20 mM HEPES (Abschnitt 2.5), versetzt. Dem Medium wurde zusätzlich 1 mM CaCl₂ hinzugefügt, wodurch sich eine Gesamtkonzentration an Ca²⁺ von 2,3 mM ergab. Die Messung wurde dann nach einer Äquilibrationszeit von 4 h gestartet. Die Zellen wurden

für 10 min bei 31 °C auf dem Mikroskop-Heiztisch inkubiert und mit einer Frequenz von 3 Hz elektrisch stimuliert (vgl. Abschnitt 2.7). Die Stimulation erfolgte über den gesamten Messzeitraum.

Für die Messung wurde ein Cluster von Zellen ausgewählt, welches der Stimulation zuverlässig folgen konnte und ein starke Längenveränderung bei Kontraktion aufwies. Die Intensität des FURA-2 Signals wurde überprüft. Voraussetzung einer erfolgreichen Messung war, dass sie erschütterungsfrei erfolgte. Um dies gewährleisten zu können, erfolgte die basale Messung des Ca^{2+} -Transienten und der Kontraktilität direkt im Anschluss an die Behandlung. Die Messung wurde 10 min nach der Behandlung ein zweites Mal wiederholt. Die Messung des Ca^{2+} -Transienten und der Kontraktilität erfolgte simultan unter Verwendung eines Rotlichtfilters, um die Ca^{2+} -Transient-Messung nicht zu beeinträchtigen.

Die Messung der Kontraktilität erfolgte mit Hilfe des Edge-Detektors und der Software IonWizard 6, welcher in der Lage ist, der räumlichen und zeitlichen Veränderung eines Kontrastpunktes im mikroskopischen Bild zu folgen und diese Veränderung in einer Kurve darzustellen. Das verwendete Mikroskop-System der Firma IonOptix wurde zum Zweck der Messung der Längenveränderung in Verbindung mit dem verwendeten 40-fach Objektiv (Leica) kalibriert.

Für die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals wurde die elektrische Stimulation der Zellen beendet, ein zellfreier Bereich im Kammerobjekträger ausgewählt und dem Medium 1 μM des FURA-2 Kaliumsalzes (Sigma Aldrich, #171959) hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität wurde aufgezeichnet und entspricht der maximalen Intensität. Es wurde der Mittelwert des Verhältnisses der beiden Anregungswellenlängen (R_{max}) und die Intensität der Wellenlänge 340 nm (S_{b2}) dokumentiert. Dem Medium wurden dann 100 mM EGTA (Sigma Aldrich, # 03777) hinzugefügt. Die resultierende Fluoreszenzintensität wurde gemessen und entspricht der minimalen Intensität. Es wurde ebenfalls das Verhältnis der beiden Anregungswellenlängen (R_{min}) und die Intensität der Wellenlänge 340 nm (S_{f2}) dokumentiert.

Die Umrechnung des Fluoreszenzsignals in die Ca^{2+} -Konzentration erfolgte nach der folgenden Formel [119]:

Formel 2: Kalibrierung des FURA-2 Fluoreszenzsignals

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

R entspricht dem Verhältnis des Fluoreszenzsignals der beiden Anregungswellenlängen zum Messzeitpunkt und K_d ist die substanzspezifische Dissoziationskonstante. Die K_d von FURA-2 ist 145 nM. Die Kalibrierung wurde genutzt um die systolische und diastolische Ca^{2+} -Konzentration zu berechnen. Final wurde für beide Konzentrationen die prozentuale Veränderung zur basalen Konzentration berechnet.

Die Messung wurde abgeschlossen, indem ein Zellcluster der nicht elektrisch stimulierten Zellen ausgewählt wurde, für das die Ca^{2+} -Transient Messung für ein Intervall von 5 min unter Zugabe von 100 μ M Koffein (Sigma Aldrich, #C0750) durchgeführt wurde. Das Koffein bewirkt dabei die spontane Entleerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers der Kardiomyozyten, was zu einem temporären, starken Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Das Koffein wurde als 1 mM Lösung in Medium verwendet.

Zusätzlich wurde für die Auswertung der Kontraktilität und des Ca^{2+} -Transienten das Analyse-Werkzeug in der IonWizard Software (Version 6.6.10.125, IonOptix) genutzt, welches auf dem Fitting des Kurvenverlaufs mit der folgenden Exponentialfunktion beruht (Formel 3):

Formel 3: Exponentialfunktion für Analyse der Kontraktilität und Ca^{2+} Transienten

$$f(x) = A \cdot (e^{-k_{fall} \cdot x} - e^{-k_{rise} \cdot x}) + B$$

A entspricht der Amplitude des Signals, k_{rise} ist die Exponentialkonstante des Aufstrichs und k_{fall} die Exponentialkonstante des Abfalls der Kurve und B entspricht der Grundlinie. Aus dem Verlauf der Kurve wurden die in Abbildung 8 dargestellten Parameter ausgewertet.

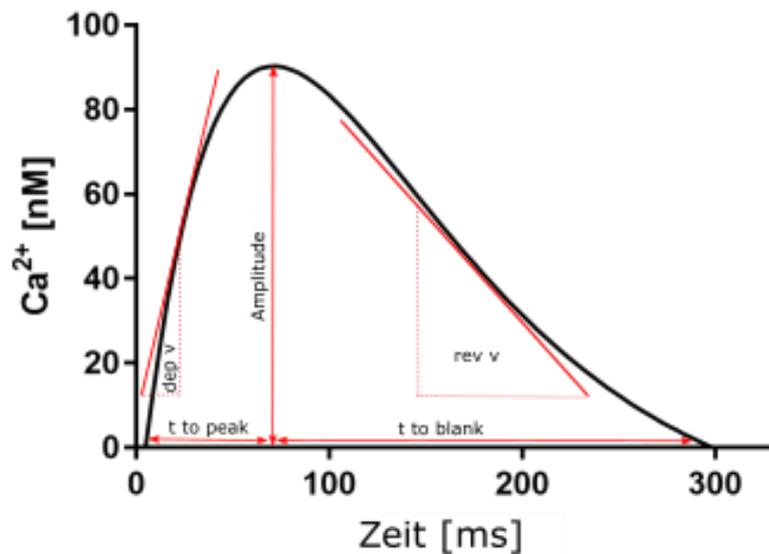


Abbildung 8: Graphische Erläuterung der analysierten Parameter

Der dargestellte gefittete Kurvenverlauf ist exemplarisch für einen Ca²⁺-Transienten. Die analysierten Parameter sind in Rot in den Kurvenverlauf eingezeichnet.

Zu den analysierten Parametern zählen unter anderem:

- **Amplitude** ist der maximale Unterschied zwischen der Grundlinie und dem maximalen Messsignal und entspricht der freigesetzten Ca²⁺-Menge oder der Kontraktionslänge.
- **T to 50 % peak** ist die Zeit bis 50 % des Messsignals der Amplitude erreicht wird und entspricht der Zeit bis 50 % der maximalen Ca²⁺-Menge freigesetzt oder 50 % der maximalen Kontraktionslänge erreicht wird.
- **T to 50 % blank** ist die Zeit von der Amplitude bis 50 % der Grundlinie wieder erreicht wird und entspricht der Zeit bis 50 % der freigesetzten Ca²⁺-Menge wieder aus dem Zytosol entfernt wird oder die Zelle wieder zu 50 % relaxiert.
- **dep v** ist die maximale Steigung des Aufstrichs und entspricht der Geschwindigkeit mit der die Ca²⁺-Ionen ins Zytosol freigesetzt werden oder der Geschwindigkeit der Kontraktion.
- **rev v** ist die minimale Steigung des Abfalls und entspricht der Geschwindigkeit mit der die Ca²⁺-Ionen aus dem Zytosol entfernt werden oder der Geschwindigkeit der Relaxation.

Es wurde stets die prozentuale Veränderung der Parameter in Bezug auf den basalen Messwert berechnet.

2.9 Statistik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 8.4.3. Bei den dargestellten Daten handelt es sich meist um Mittelwerte mit Standardfehler. Die mit dem Schlagfrequenz-Assay erhobenen Daten erfolgten immer mit mehreren Präparationen. Daten aus der gleichen Präparation stellten technische Replikate und Daten aus unterschiedlichen Präparationen biologische Replikate dar.

In Abhängigkeit zur Anzahl der verglichenen Daten, wurde ein *t*-Test oder eine einfaktorische oder mehrfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Posthoc Test durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Die jeweiligen durchgeführten Signifikanztests sind unter der entsprechenden Abbildung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des Schlagfrequenz-Assay

Zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Omega-3-Fettsäuren, ihren korrespondierenden Metaboliten (CYP-Epoxyeicosanoide) sowie eines synthetischen CYP-Epoxyeicosanoid-Analogons (C4) wurde ein bereits beschriebenes NRKM-Zellassay verwendet. Das Assay basiert auf der Eigenschaft der Zellen, auch in Kultur spontan und rhythmisch zu schlagen. Diese Schlagfrequenz wird nachweislich durch die Omega-3-Fettsäuren, die CYP-Epoxyeicosanoide und C4 beeinflusst und stellt somit einen Surrogatmarker für den kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekt der Substanzen dar. Der negativ chronotrope Effekt von C4 ist in einem repräsentativen Beispiel in Abbildung 9 dargestellt.

Da dieser Schlagfrequenz-Assay auf primären Zellen basiert, deren Qualität von einer Vielzahl von Faktoren, wie z.B. dem Alter der präparierten Tiere, der Anzahl der vitalen Zellen nach der Präparation oder der Dauer der Kultivierung der Zellen abhängt, mussten in einem ersten Schritt Validitätskriterien identifiziert werden, um präparationsunbeeinflusste Ergebnisse erzeugen zu können.

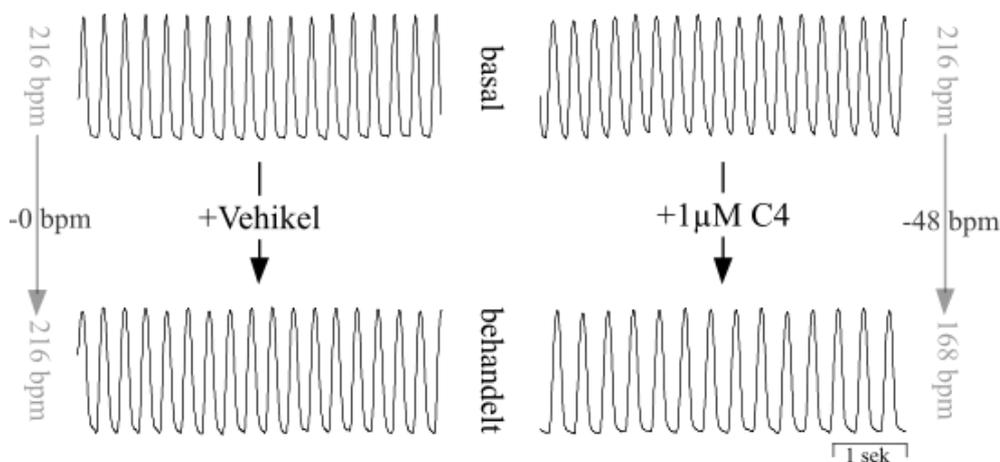


Abbildung 9: Analog C4 reduziert die basale Schlagfrequenz der NRKM

Die Abbildung zeigt beispielhaft den Effekt von 0,025 % Ethanol (links) und 1 µM C4 (rechts) auf die basale Schlagfrequenz der NRKM. Modifiziert nach [120].

Die basale Schlagfrequenz der Kardiomyozyten sowie die Veränderung der Schlagfrequenz durch die Behandlung der Zellen mit Ethanol, 17,18-EEQ oder C4 wurde über eine Vielzahl von Präparationen erfasst und ausgewertet. Im Folgenden sind die drei Validitätskriterien dargestellt, die vor Beginn jeder Messung überprüft wurden. Die Zellpräparation wurde nur verwendet, wenn diese Validitätskriterien erfüllt waren.

3.1.1 Basale Schlagfrequenz

Die basale Schlagfrequenz der Zellen lag zwischen 52 und 288 Schlägen pro Minute (bpm), mit einem Mittelwert von 156 bpm und einer Standardabweichung von 46 bpm und war in 746 Messungen aus 32 unabhängigen Präparationen normalverteilt (ϕ 0,063, Abbildung 10). Als erstes Validitätskriterium wurde die Schlagfrequenz definiert, die im Bereich von zwei Standardabweichungen um den Mittelwert liegen sollte. Damit ergibt sich eine valide Schlagfrequenz in den Grenzen von 56 bis 248 bpm.

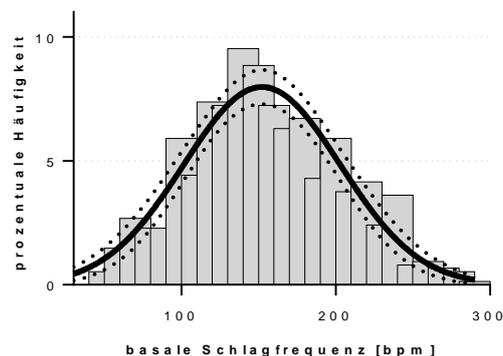


Abbildung 10: Die basale Schlagfrequenz ist normalverteilt

Dargestellt ist die Verteilung der basalen Schlagfrequenz der NRKM in einer Vielzahl von Messungen. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus K2 getestet. Die basale Schlagfrequenz der Zellen ist normalverteilt (ϕ 0,063). $n=746$.

3.1.2 Zeitabhängige Wirkung von Ethanol, 17,18-EEQ und C4

Für die Ableitung von Validitätskriterien für den Effekt von Ethanol, 17,18-EEQ und C4 wurde zunächst die Kinetik jedes Effekts bestimmt, um anschließend die Effektstärken jeder Verbindung über eine Vielzahl von Zellpräparationen und Messungen erfassen zu können.

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe einer normierten Bateman-Funktion gefittet (Formel 4) [121]. Die Bateman-Funktion findet Anwendung in der Pharmakokinetik und beschreibt die zeitabhängige Aufnahme und Ausscheidung einer Substanz. Die Funktion wurde um das Element ax ergänzt, wodurch eine Normierung der Funktion auf die Effektstärke erreicht wurde.

Formel 4: Normierte Bateman Funktion

$$f(x) = c \cdot ax \cdot (e^{-bx} - e^{-dx})$$

Im Gegensatz zu Ethanol reduzieren 17,18-EEQ und C4 die Schlagfrequenz der NRKM zeitabhängig (Abbildung 11 & Abbildung 12). Der Zeitpunkt und die maximale Effektstärke von 17,18-EEQ und C4 unterscheiden sich dabei geringfügig (5,6 min vs. 8,8 min). Der negativ chronotrope Effekt von 20 nM 17,18-EEQ und 30 nM C4 war zeitlich stark begrenzt. Die Dauer des Effekts konnte durch die Steigerung der eingesetzten Konzentration auf 1 μM erheblich verlängert werden, ohne dabei die maximale Effektstärke zu erhöhen.

Der optimale Zeitpunkt für eine Einzelmessung wurde für 17,18-EEQ auf 6 min und für C4 auf 8 min festgelegt.

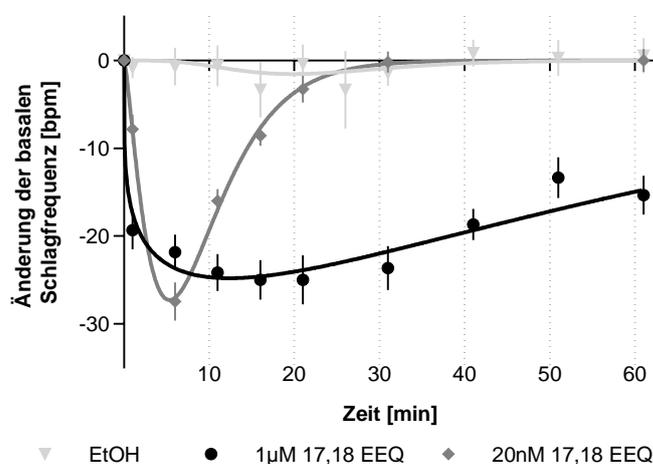


Abbildung 11: 17,18-EEQ senkt die Schlagfrequenz zeit- und konzentrationsabhängig

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Wirkung von 1 μM und 20 nM 17,18-EEQ sowie 0,025 % Ethanol im Schlagfrequenz-Assay. Ethanol zeigt keine zeitabhängige Wirkung. Der Effekt von 20 nM 17,18-EEQ ist nach 5,6 min maximal (-24,9 bpm) und verliert im Verlauf seine Wirkung. Die Wirkung von 1 μM 17,18-EEQ ist vergleichbar, bleibt aber im Vergleich zu 20 nM deutlich länger erhalten. Ethanol $n \geq 12$, 17,18-EEQ $n = 22$. Mittelwert \pm Standardfehler.

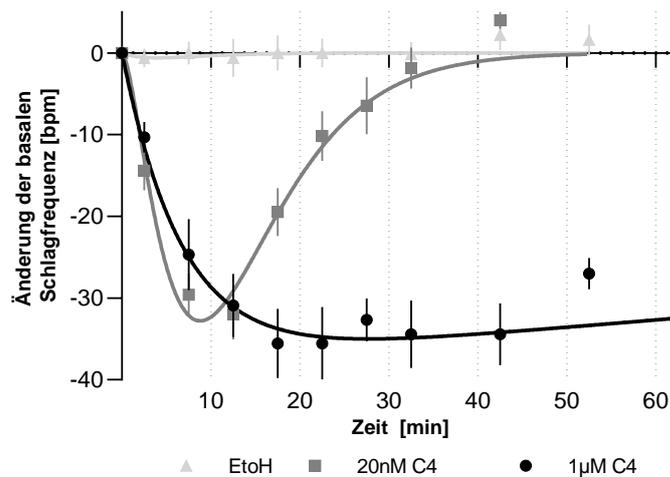


Abbildung 12: C4 senkt die Schlagfrequenz zeit- und konzentrationsabhängig

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Wirkung von 30 nM und 1 µM C4 sowie 0,025 % Ethanol im Schlagfrequenz-Assay. Ethanol zeigt keine zeitabhängige Wirkung. Der Effekt von 20 nM C4 ist nach 8,8 min maximal (-32,7 bpm) und verliert im Verlauf seine Wirkung. 1 µM C4 senkt die Schlagfrequenz nahezu konstant über den gesamt Beobachtungszeitraum auf ein vergleichbares Niveau. Ethanol n=26, C4 n=30. Mittelwert ± Standardfehler.

Der zeitliche Verlauf des negativ chronotropen Effekts der niedrigen Konzentration von 17,18-EEQ und C4 ist im Vergleich zur hohen Konzentration durch die zeitliche Begrenzung sehr ungewöhnlich und sollte im weiteren Verlauf näher untersucht werden. Aus der präklinischen Charakterisierung von C4 war bekannt, dass C4 im Blut bevorzugt an Albumin gebunden vorliegt. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die zeitlich eingeschränkte Wirksamkeit der niedrigen Konzentrationen von 17,18-EEQ und C4 im Zusammenhang mit ihrer Bindungskinetik zu Albumin stehen könnte. Die NRKM wurden zur Überprüfung in SPSM Komplett ohne Insulin und Transferrin (tierischen Ursprungs inkl. Albumin Verunreinigungen) für das Schlagfrequenz-Assay vorbereitet und der negativ chronotrope Effekt von Ethanol und 30 nM C4 zeitabhängig gemessen. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von Albumin auch 30 nM C4 zu einem langanhaltenden negativ chronotropen Effekt führten. Durch Zugabe von 1 mg/ml Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin, BSA) wurde der negativ chronotrope Effekt wiederum auf den zeitlich begrenzten Verlauf verändert (Abbildung 13).

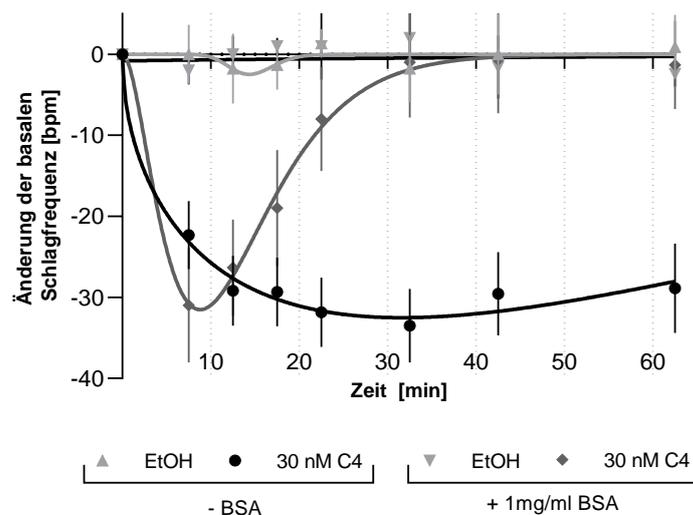


Abbildung 13: BSA beeinflusst den zeitlichen Verlauf des Effekts von C4

Im Schlagfrequenz-Assay wurde der Einfluss von BSA auf den zeitlichen Verlauf des negativ chronotropen Effekts von C4 untersucht. Die Messung wurde in BSA-freiem SPSM komplett ohne Insulin und Transferrin durchgeführt. 30 nM C4 hat in Abwesenheit von BSA einen langanhaltenden Effekt und der Zusatz von 1 mg/ml BSA führt zur charakteristischen Kinetik des negativ chronotropen Effekts. $n \geq 12$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.1.3 Validierung des Effekts von Ethanol, 17,18-EEQ und C4

Die Effektstärke von Ethanol, 20 nM 17,18-EEQ und 30 nM C4 wurde in einer Vielzahl von Präparationen gemessen. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet und die Abhängigkeit zur basalen Schlagfrequenz untersucht. Aus dieser Analyse wurde für jede Substanz ein Validitätskriterium abgeleitet.

Validierung des Effekts von Ethanol

Ethanol wurde als Lösungsmittel für 17,18-EEQ und C4 genutzt. Die Stammlösungen von 17,18-EEQ und C4 wurden 1:4000 im Assay-Medium verdünnt, sodass die finale Ethanol-Konzentration 0,025 % betrug. Der Effekt von Ethanol wurde in 32 unabhängigen Präparationen gemessen. Für die Auswertung wurden nur Daten verwendet, für die das erste Validitätskriterium der basalen Schlagfrequenz eingehalten wurde.

Ethanol reduziert die basale Schlagfrequenz im Mittel um -0,59 bpm mit einer Standardabweichung von 9,7 bpm und einem Konfidenzintervall (95 %) von $\pm 1,6$ bpm. Die Daten sind um diesen Mittelwert normalverteilt (ϕ 2,06).

Je höher die basale Schlagfrequenz der Zellen ist, desto stärker senkt Ethanol die Schlagfrequenz der Zellen (Abbildung 14). Die Korrelation kann mit den folgenden linearen Gleichungen wiedergegeben werden (Formel 5). Die Varianz ist homoskedastisch, womit sich die obere und untere Grenze durch Parallelverschiebung der Regressionsgeraden um 2 Standardabweichung ergibt. Die Nachweisgrenze des Assays liegt bei -6,3 bpm und die Bestimmtheitsgrenze bei -16,3 bpm (die Berechnung erfolgte adaptiert nach [122]). Die Präparation der Zellen wurde als valide betrachtet, wenn sich der Ethanol-Effekt innerhalb der Grenzen der linearen Gleichungen befand.

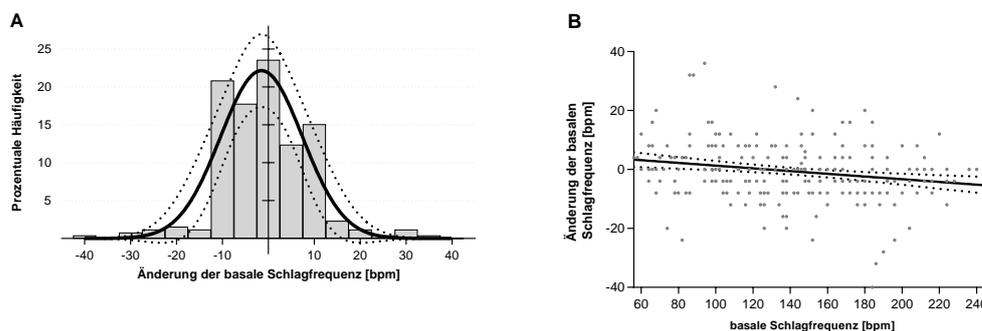


Abbildung 14: Ethanol verändert die Schlagfrequenz kaum

Dargestellt ist die Normalverteilung (A) und der lineare Zusammenhang des Effekts von Ethanol mit der basalen Schlagfrequenz (B). Die Daten wurden mit dem Schlagfrequenz-Assay erhoben. Der Ethanol-Effekt ist normalverteilt (ϕ 2,06, $p=0,357$) und es besteht ein negativer Zusammenhang ($p=0,0004$) mit der basalen Schlagfrequenz. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino & Pearson Omnibus K2 Test geprüft und als Gauß-Kurve dargestellt. Die Korrelation wurde mit dem Spearman R Test überprüft. Es wurde außerdem auf Homoskedastizität getestet. $n=257$.

Formel 5: Validitätskriterium für den Effekt von Ethanol

Bei $f(x)$ handelt sich dabei um den Ethanol Effekt und bei x um die basale Schlagfrequenz.

$$\text{Regressionsgerade:} \quad f(x) = -0,047x + 5,92$$

$$\text{Obere Grenze:} \quad f(x) = -0,047x + 2,05$$

$$\text{Untere Grenze:} \quad f(x) = -0,047x + 9,79$$

Validierung des Effekts von 17,18-EEQ

Der Effekt von 20 nM 17,18-EEQ wurde in sieben unabhängigen Präparationen untersucht und auf Normalverteilung, Korrelation und Homoskedastizität zur basalen Schlagfrequenz getestet.

20 nM 17,18-EEQ reduzierten im Mittel die basale Schlagfrequenz um 28,4 bpm bei einer Standardabweichung von 13,7 bpm und einem Konfidenzintervall (95 %) von $\pm 2,0$ bpm. Die Daten sind normalverteilt (ϕ 4,14, $p=0,126$). Mit zunehmender Schlagfrequenz wird der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ größer ($p<0,0001$). Die negative

Korrelation kann mit den folgenden linearen Gleichungen ausgedrückt werden (Formel 6), wobei die obere und untere Grenze die um zwei Standardabweichungen parallel verschobene lineare Gleichung der Korrelation ist. Es handelt sich um eine homoskedastische Varianz (Abbildung 15). Der Vergleich der gemessenen und kalkulierten Werte ergibt eine mittlere Abweichung von 0,0 bpm bei einem Konfidenzintervall (95 %) von $\pm 1,85$ bpm. Das Schlagfrequenz-Assay hat für 20 nM 17,18-EEQ eine Intra-Assay-Variabilität von 48,2 % und eine Inter-Assay-Variabilität von 39,9 %. Die relative erweiterte Messunsicherheit für den negativ chronotropen Effekt von 20 nM 17,18-EEQ beträgt 0,6 % bei einem Vertrauensniveau von 95 % (die Berechnungen erfolgten adaptiert nach [122]). Die Präparation der Zellen wurde als valide betrachtet, wenn sich der 17,18-EEQ Effekt innerhalb der Grenzen der linearen Gleichungen befand.

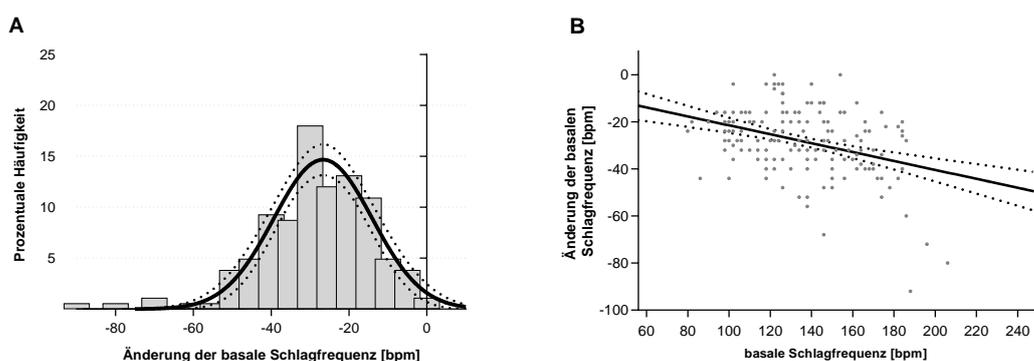


Abbildung 15: 17,18-EEQ reduziert die Schlagfrequenz stark

Die Normalverteilung (A) und die Korrelation (B) des Effekts von 20 nM 17,18-EEQ mit der basalen Schlagfrequenz ist dargestellt und die Daten wurden mit dem Schlagfrequenz-Assay erhoben. Der Effekt ist normalverteilt (ϕ 4,14, $p=0,126$), zeigt eine starke negative Korrelation ($p<0,0001$) mit der basalen Schlagfrequenz und verfügt über eine homoskedastische Varianz. D’Agostino & Pearson Omnibus K2 Test zur Prüfung auf Normalverteilung. Korrelation wurde mit dem Spearman R Test überprüft und auf Homoskedastizität getestet. $n=183$.

Formel 6: Validitätskriterium für den Effekt von 17,18-EEQ

Regressionsgerade: $f(x) = -0,189x - 2,57$

Obere Grenze: $f(x) = -0,189x + 7,54$

Untere Grenze: $f(x) = -0,189x - 12,69$

Validierung des Effekts von C4

Der Effekt von 30 nM C4 wurde in 25 unabhängigen Zellpräparationen untersucht. Die Normalverteilung der Daten wurde getestet, die Korrelation des Effekts von C4 mit der basalen Schlagfrequenz untersucht und auf Homoskedastizität getestet.

Die Behandlung der NRKM mit 30 nM C4 führte im Schnitt zu einer Reduktion der basalen Schlagfrequenz von 23,62 bpm bei einer Standardabweichung von 13,03 bpm und einem Konfidenzintervall (95 %) von $\pm 1,9$ bpm. Die Daten stellten sich als normalverteilt dar (ϕ 1,80, $p=0,407$) und korrelierten negativ mit der basalen Schlagfrequenz ($p=0,0002$) (Abbildung 16). Die Korrelation lässt sich mit den folgenden linearen Gleichungen (Formel 7) darstellen, wobei sich die obere und untere Grenze durch die Parallelverschiebung der linearen Gleichung um zwei Standardabweichungen ergibt, da eine homoskedastische Varianz vorliegt. Der Vergleich der gemessenen und kalkulierten Werte ergibt eine mittlere Abweichung von 0,5 bpm bei einem Konfidenzintervall (95 %) von $\pm 1,85$ bpm. Die Intra-Assay-Variabilität beträgt 57,4 % und eine Inter-Assay-Variabilität von 47,1 %. Die relative erweiterte Messunsicherheit für den negativ chronotropen Effekt von 30 nM C4 beträgt 5,6 % bei einem Vertrauensniveau von 95 % (die Berechnungen erfolgten adaptiert nach [122]). Die Präparation der Zellen wurde als valide betrachtet, wenn sich der C4-Effekt innerhalb der Grenzen der linearen Gleichungen befand.

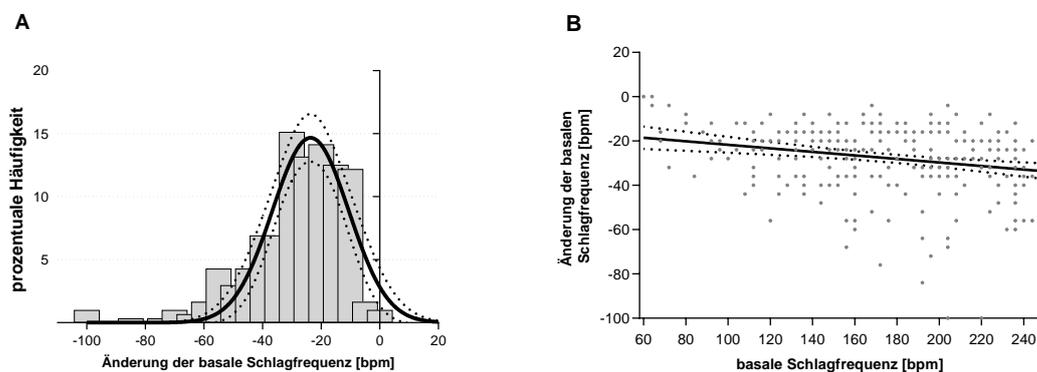


Abbildung 16: Die Schlagfrequenz wird durch C4 stark reduziert

Der Effekt von 30 nM C4 wurden auf Normalverteilung (A), auf die Korrelation zur basalen Schlagfrequenz (B) und auf homoskedastische Varianz getestet. Die Daten aus dem Schlagfrequenz-Assay sind normalverteilt (ϕ 1,80, $p=0,407$), sind negative von der basalen Schlagfrequenz ($p=0,0002$) abhängig und verfügen über eine Homoskedastizität. Normalverteilung: D'Agostino & Pearson Omnibus K2 Test, Korrelation: Spearman R Test und Test auf Homoskedastizität. $n=284$.

Formel 7: Validitätskriterium für den Effekt von C4

Regressionsgerade: $f(x) = -0,080x - 13,75$

Obere Grenze: $f(x) = -0,080x - 6,24$

Untere Grenze: $f(x) = -0,080x - 21,26$

3.1.4 Zusammenfassende Darstellung und Anwendung der Validitätskriterien des Schlagfrequenz-Assays

Zur Überprüfung der festgelegten Validitätskriterien und zur Darstellung der biologischen Bedeutung der Kriterien wurden die linearen Gleichungen inklusive ihrer Konfidenzintervalle dargestellt (Abbildung 17). Die Konfidenzintervalle von Ethanol und 17,18-EEQ beziehungsweise C4 überschneiden sich in keinem Bereich der festgelegten basalen Schlagfrequenz.

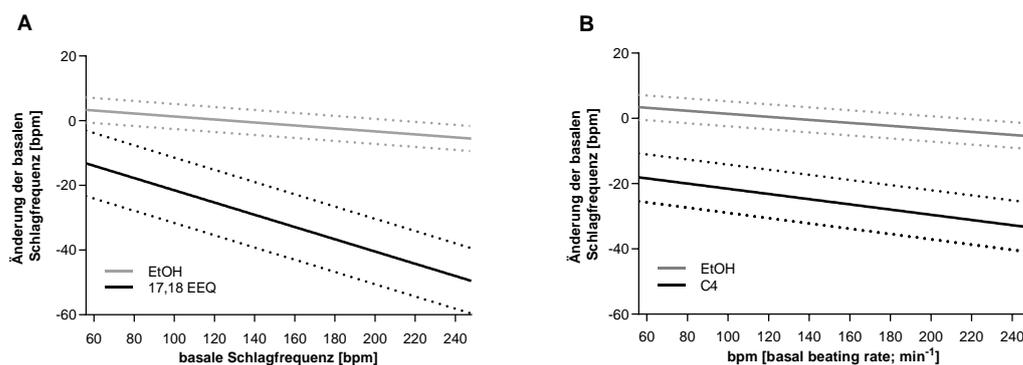


Abbildung 17: 17,18-EEQ und C4 können im Schlagfrequenz-Assay zuverlässig untersucht werden

Dargestellt ist der Vergleich der abgeleiteten Validitätskriterien von Ethanol und 17,18-EEQ (A) bzw. C4 (B). Die gestrichelten Linien stellen die Konfidenzintervalle (95 %) dar. Alle in den Validitätskriterien eingeschlossenen Effekte von Ethanol von 17,18-EEQ bzw. C4 unterscheiden sich über den gesamten validen Bereich der basalen Schlagfrequenz.

Die Überprüfung der Validitätskriterien erfolgte zu Beginn jeder Messung durch die Implementierung der linearen Gleichungen in das Microsoft Excel basierte Messprotokoll. Die basale Schlagfrequenz der Zellen, die Effektstärke von 0,025 % Ethanol sowie 20 nM 17,18-EEQ oder 30 nM C4 wurde bestimmt und protokolliert. Die hinterlegten Gleichungen analysierten die erhobenen Daten und gaben die Validität oder Invalidität der Zellen wieder. Nur bei einem validen Messergebnis wurden die Zellen im geplanten Experiment verwendet.

3.2 Ist für die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren deren Umwandlung in CYP-Epoxyeicosanoide notwendig?

Die Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA und die jeweiligen Epoxide 17,18-EEQ und 19,20-EDP wurden im Schlagfrequenz-Assay auf ihre antiarrhythmischen Effekte untersucht. Es soll gezeigt werden, dass nicht die Fettsäuren selbst, sondern die durch die CYP-Epoxygenase gebildeten Metabolite den Effekt vermitteln. Außerdem sollte überprüft werden, ob diese Metabolite sowie C4 über eine höhere biologische Aktivität verfügen als die korrespondierenden Fettsäuren.

3.2.1 Nachweis der Bildung von Epoxyeicosanoiden in NRKM

Die Fähigkeit der NRKM, EPA und DHA in die korrespondierenden Epoxide umzusetzen, wurde mittels Lipidanalytik nachgewiesen. Der Nachweis der CYP-Epoxygenasen erfolgte mittels mRNA- und Protein-Expressionsmessung.

Die Bildung der Epoxyeicosanoide wurde durch die Inkubation der NRKM mit fünffach deuterierter (d_5) EPA bzw. DHA und anschließender Analyse mittels HPLC-Tandem-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Analyse der Proben erfolgte durch Dr. Maximilian Blum und der Firma Lipidomix GmbH. Es wurden die gebildeten d_5 regioisomeren Epoxide sowie die korrespondierenden endogenen Epoxide bestimmt. Das jeweilige d_5 Epoxid wurde auf die Summe der endogenen Epoxide normalisiert. Alle detektierten regioisomeren Epoxide wurden von den NRKM aus EPA- d_5 und DHA- d_5 gebildet. In Gegenwart von MS-PPOH (CYP-Epoxygenase-Hemmer) wurde die Bildung der Epoxide signifikant inhibiert. Die Hauptmetabolite von EPA und DHA waren 17,18-EEQ und 19,20-EDP (Abbildung 18).

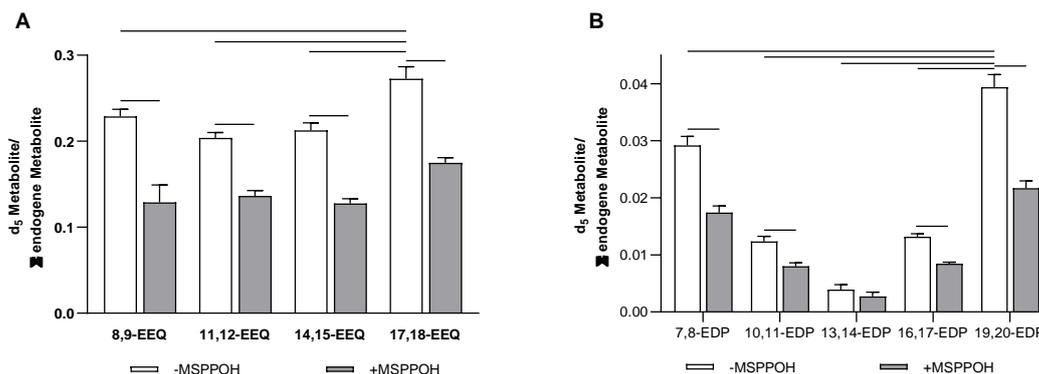


Abbildung 18: Nachweis von endogen gebildeten Epoxyeicosanoiden in NRKM

Dargestellt sind die in den NRKM aus EPA-d₅ oder DHA-d₅ gebildeten CYP-Epoxyeicosanoide. Das jeweilige d₅-Epoxid wurde auf die Summe der endogenen Epoxide normalisiert. Die gebildeten Hauptmetabolite von EPA-d₅ und DHA-d₅ sind 17,18-EEQ und 19,20-EDP. Die Bildung der Metabolite konnte signifikant durch MS-PPOH inhibiert werden. Two-way ANOVA mit Tukey oder Sidak Posthoc Test. n=8. Mittelwert ± Standardfehler.

3.2.2 Nachweis der CYP-Epoxygenasen

Die Expression der kardialen CYP-Epoxygenasen der Ratte, CYP2J3 und CYP2C11, wurde auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Die mRNA-Expression von CYP2J3 und CYP2C11 stiegen über die Kulturdauer der NRKM auf das 12- bzw. 56-fache der ursprünglichen Expression, gemessen zum Zeitpunkt der Zellpräparation, an. Die Protein-Expression von CYP2J3 und CYP2C11 stieg ebenfalls für beide Enzyme über die Kulturdauer auf das 1,2-fache der ursprünglichen Expression an (Abbildung 19).

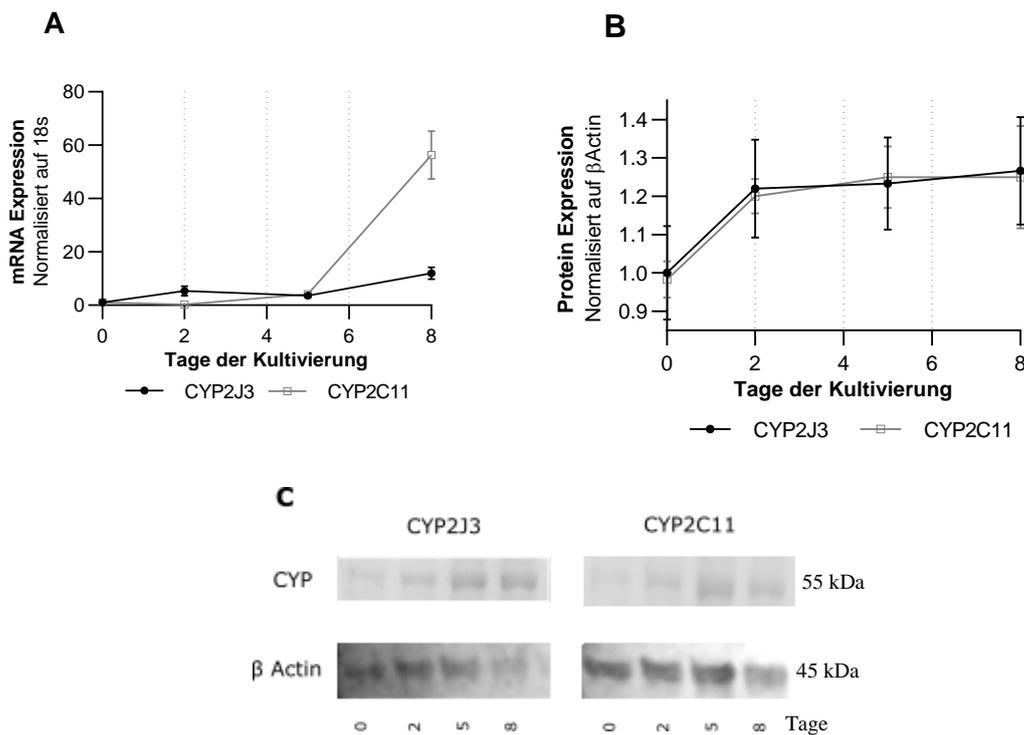


Abbildung 19: Die CYP-Epoxygenasen CYP2J3 und CYP2C11 werden exprimiert

Die Expression von CYP2J3 und CYP2C11 wurde in NRKM auf mRNA- (A) und Protein-Ebene (B) in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung nachgewiesen. Die mRNA- und Protein-Expression wurde auf die Expression von 18s beziehungsweise β -Actin normalisiert. Ein repräsentatives Ergebnis der Protein-Expression ist in Abbildung C dargestellt.

3.2.3 Untersuchung des Effekts von EPA, 17,18-EEQ und C4

4 μ M EPA, 20 nM 17,18-EEQ sowie 30 nM C4 zeigten einen negativ chronotropen Effekt auf die Schlagfrequenz der NRKM, wobei sich der Zeitpunkt ihres maximalen Effekts (41,3 min vs. 5,6 min vs. 8,8 min) als auch ihre jeweilige Effektstärke (-11,3 bpm vs. -24,9 bpm vs. -32,7 bpm) maßgeblich unterscheiden (Abbildung 20).

EPA, 17,18-EEQ und C4 zeigten eine typische, sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abbildung 20), wobei der EC_{50} von EPA über 17,18-EEQ zu C4 abnimmt (2342 vs. 11,96 vs. 1,41 nM). Die maximale Effektstärke von EPA und 17,18-EEQ unterscheidet sich nicht ($-28,92 \pm 3,54$ bpm vs. $28,93 \pm 4,44$ bpm), nur C4 zeigt einen deutlich stärkeren negativ chronotropen Effekt ($-36,70 \pm 3,59$ bpm). Die Steilheit der Kurve, was den Konzentrationsbereich zwischen minimaler, messbarer und maximaler Wirksamkeit beschreibt, war bei 17,18-EEQ und C4 näherungsweise gleich (Steigung -0,61 vs. -0,69). EPA verfügte über eine deutliche größere Steigung und damit einen kleinen Wirkungsbereich (Steigung -1,18) (Abbildung 21). Die Daten für die

Abbildungen 20 & 21 wurden mit Zellen unterschiedlicher Präparationen erhoben, wodurch sich die Unterschiede in den Effektstärken von EPA und 17,18-EEQ ergeben. In Gegenwart des CYP-Epoxygenase-Inhibitors MS-PPOH (100 nM) führte die Zugabe von EPA (4 μ M) nicht mehr zu einem negativ chronotropen Effekt. Die Zellen reagierten allerdings weiterhin mit einer Verringerung der Schlagfrequenz, wenn sie anschließend direkt mit 17,18-EEQ (100 nM) oder C4 (100 nM) behandelt wurden (Abbildung 22).

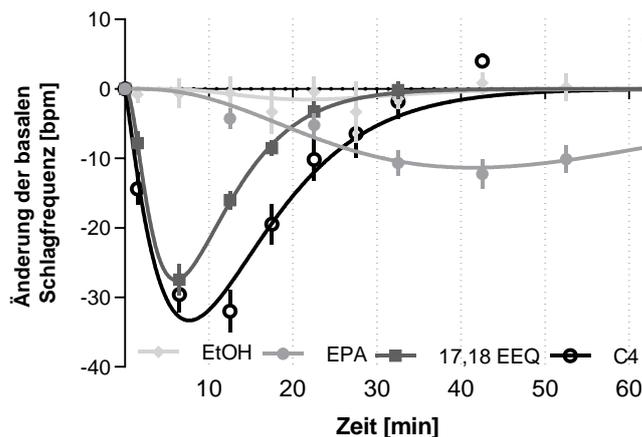


Abbildung 20: Der negativ chronotrope Effekt von EPA, 17,18-EEQ und C4 ist zeitabhängig

Dargestellt ist der zeitabhängige Effekt von Ethanol (EtOH), 4 μ M EPA, 20 nM 17,18-EEQ und 30 nM C4 auf die Schlagfrequenz der NRKM. Die Daten wurden im Schlagfrequenz-Assay erhoben. Dargestellt mit der normierten Bateman Funktion (Formel 4). n=30. Mittelwert \pm Standardfehler.

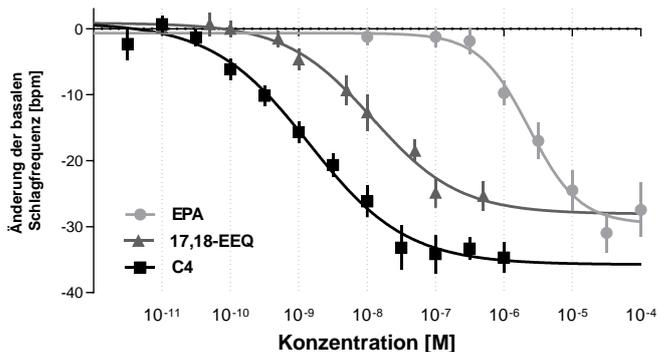


Abbildung 21: Der Effekt von EPA, 17,18-EEQ und C4 ist konzentrationsabhängig

Die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von EPA, 17,18-EEQ und C4 wurden jeweils im Bereich zwischen maximaler und minimaler Wirkung untersucht. Die halbmaximale Konzentration (EC_{50}) von EPA (2342 nM) war größer als die von 17,18-EEQ (11,96 nM) und von C4 (1,41 nM). Der maximale Effekt von EPA ($-28,92 \pm 3,54$ bpm) und 17,18-EEQ ($-28,93 \pm 4,44$ bpm) war kleiner als der von C4 ($-36,70 \pm 3,59$ bpm). Das Wirkungsspektrum von EPA (Steigung -1,18) war kleiner als das von C4 und 17,18-EEQ, deren Wirkungsspektrum annähernd gleich (Steigung -0,61 vs. -0,69) war. Die Daten wurden mit einer vierparametrischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung gefittet. n \geq 16. Mittelwert \pm Standardfehler.

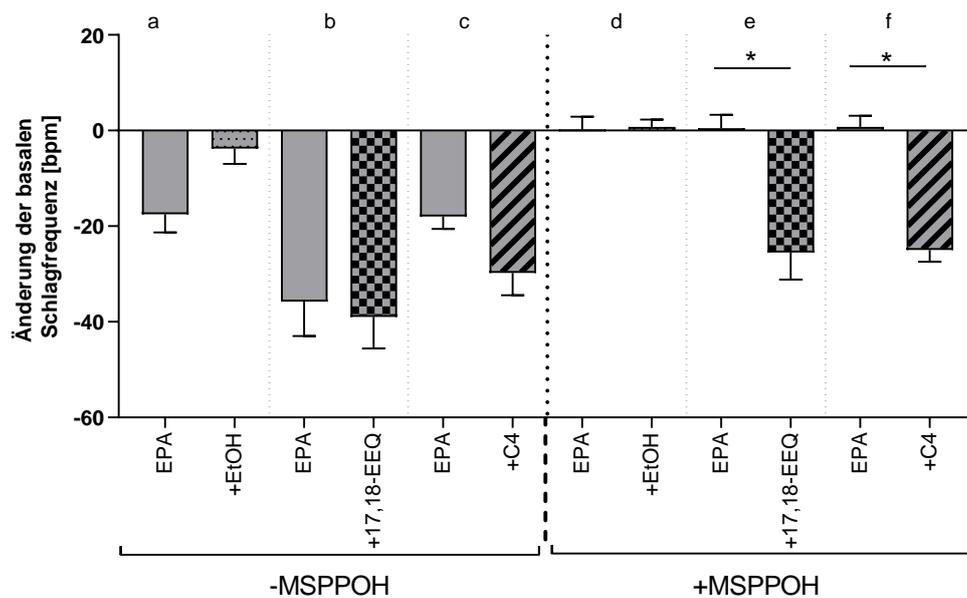


Abbildung 22: Der Effekt von EPA aber nicht von 17,18-EEQ und C4 kann durch MS-PPOH gehemmt werden

Die NRKM wurden ~4 h vor der Messung zunächst mit Ethanol oder 100 nM MS-PPOH behandelt. Die Schlagfrequenz wurde dann basal sowie nach jeder Behandlung gemessen (insgesamt 3 Messungen: basal, nach Behandlung 1 und nach Behandlung 2). Alle Zellen wurden somit 2x behandelt. Die Effektstärke der ersten Behandlung (EtOH oder 4 μ M EPA) wurde nach 30 min und die der zweiten Behandlung (EtOH, 100 nM 17,18-EEQ oder 100 nM C4) nach 7 min gemessen. Zellen, die nicht mit MS-PPOH behandelt wurden, reagierten negativ chronotrop auf EPA (a, b & c), 17,18-EEQ (b) und C4 (c). In Gegenwart von MS-PPOH reagierten die Zellen entsprechend auf 17,18-EEQ (e) und auf C4 (f) mit einer Reduktion der Schlagfrequenz. EPA (Gruppe d, e & f) zeigte allerdings in Gegenwart von MS-PPOH keinen Effekt mehr auf die Schlagfrequenz der NRKM. EtOH als Vehikel zur EPA Behandlung hatte keinen Effekt. Die Daten sind nicht dargestellt. Signifikanzen sind im Diagramm mit Sternen. One-way ANOVA mit Tukey oder Sidak Posthoc Test. n=16. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.2.4 Untersuchung des Effekts von DHA und 19,20-EDP

Die Behandlung der NRKM mit 4 μ M DHA und 20 nM 19,20-EDP führt ebenso wie die Behandlung mit EPA und 17,18-EEQ zu einem zeitabhängigen, negativ chronotropen Effekt. In der Effektstärke unterscheiden sich 19,20-EDP (-36,2 bpm) und DHA (-38,0 bpm) kaum voneinander, allerdings war der Zeitpunkt der maximalen Wirkung sowie der Kurvenverlauf unterschiedlich. Der maximale Effekt von 20 nM 19,20-EDP trat nach 7,3 min auf und verschwand über den Messzeitraum von 60 min vollständig. Der maximale Effekt von 4 μ M DHA trat nach 20 min auf und blieb über den Messzeitraum konstant. Die Lösungsmittelkontrolle Ethanol (0,025 %) führte zu keiner Modulation der basalen Schlagfrequenz (Abbildung 23).

Die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Wirkung von DHA und 19,20-EDP ergaben einen EC_{50} für DHA von 190 nM und für 19,20-EDP von 10,3 pM. Die Wirkungsstärke als auch das Wirkungsspektrum von DHA und 19,20-EDP unterschieden sich deutlich. DHA hatte eine maximale Effektstärke von -37,5 bpm und ein Wirkungsspektrum von -1,8. Die Effektstärke von 19,20-EDP war mit -47,9 bpm größer und das Wirkungsspektrum mit -0,4 breiter im Vergleich zu DHA (Abbildung 24).

Der negativ chronotrope Effekt von DHA konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem CYP-Epoxygenase-Inhibitor MS-PPOH aufgehoben werden. Eine anschließende Behandlung der gleichen Zellen mit 19,20-EDP führte wiederum zu einer entsprechenden Reduktion der Schlagfrequenz (Abbildung 25).

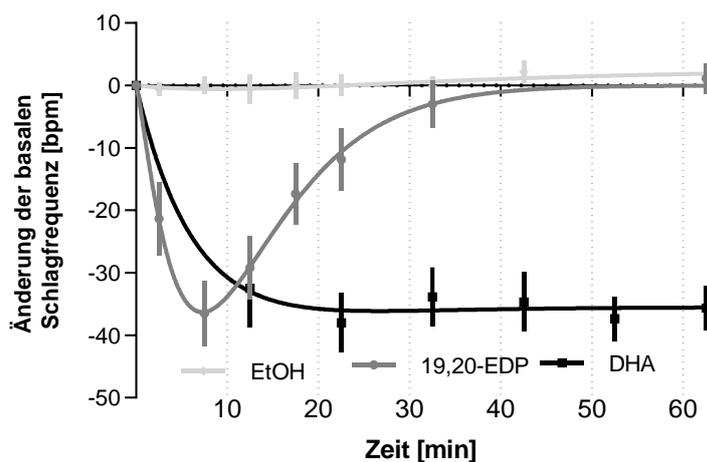


Abbildung 23: Der Effekt von DHA und 19,20-EDP ist zeitabhängig

Die zeitabhängige Wirkung von Ethanol (EtOH), 20 nM 19,20-EDP und 4 μ M DHA wurde im Schlagfrequenz-Assay untersucht und die Ergebnisse mit Hilfe der normierten Bateman Funktion (Formel 4) dargestellt. EtOH führte zu keiner Veränderung der Schlagfrequenz. Der maximale Effekt von 19,20-EDP (-36,2 bpm) und DHA (-38 bpm) unterscheidet sich kaum. Im Gegensatz dazu ist die Zeit zum Erreichen des maximalen Effekts deutlich geringer für 19,20-EDP (7,3 min vs. 20 min). Zusätzlich zeigt sich ein Unterschied im Kurvenverlauf. Die Wirkung von 19,20-EDP verschwindet über den Messzeitraum, wohingegen die Wirkung von DHA konstant bleibt. $n \geq 12$, Mittelwert \pm Standardfehler.

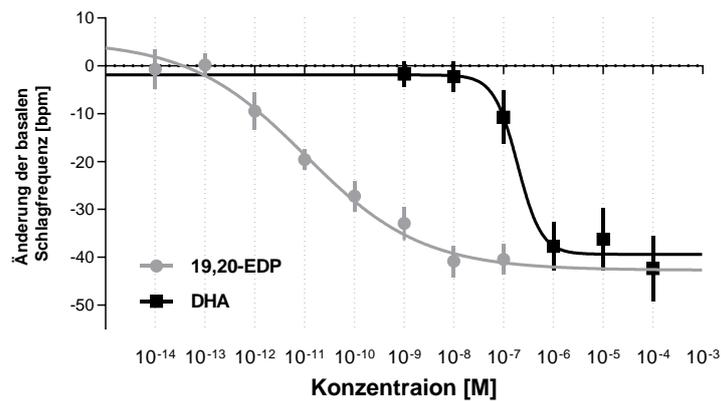


Abbildung 24: Der Effekt von DHA und 19,20-EDP ist konzentrationsabhängig

Die konzentrationsabhängige Wirkung von 19,20-EDP (1 pM bis 1 μ M) und DHA (1 nM bis 100 μ M) auf die Schlagfrequenz der NRKM wurde untersucht. Es zeigt sich eine typische sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die EC_{50} von DHA lag dabei bei 190 nM und die von 19,20-EDP bei 10,3 pM. Der maximale Effekt von DHA und 19,20-EDP war -37,5 bpm beziehungsweise -47,9 bpm. Das Wirkungsspektrum von DHA lag bei -1,8 und das für 19,20-EDP bei -0,4. Die Daten wurden mit einer vierparametrischen Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung gefittet. $n \geq 16$. Mittelwert \pm Standardfehler.

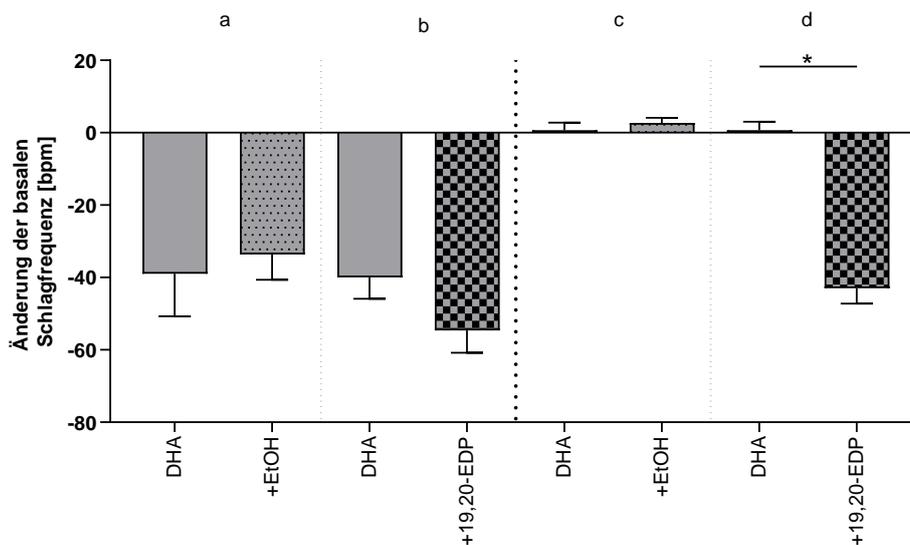


Abbildung 25: Der Effekt von DHA aber nicht von 19,20-EDP kann durch MS-PPOH gehemmt werden

Der Einfluss von MS-PPOH auf den negativ chronotropen Effekt von DHA und 19,20-EDP wurde im Schlagfrequenz-Assay untersucht. Alle Zellen wurden 2x behandelt. Die Effektstärke der ersten Behandlung (EtOH oder 4 μ M DHA) wurde nach 20 min und die der zweiten Behandlung (EtOH oder 100 nM 19,20-EDP) nach 7 min gemessen. Zellen die nicht mit MS-PPOH behandelt wurden, reagierten negativ chronotrop auf DHA (a & b) und 19,20-EDP (b). In Gegenwart von MS-PPOH reagierten die Zellen mit einer Reduktion der Schlagfrequenz nach Zugabe von 19,20-EDP (d) aber nicht mehr auf DHA (c & d). Ethanol als Vehikel zu DHA hatte keinen Effekt. Daten nicht dargestellt. Intergruppen-Signifikanzen sind im Diagramm mit Sternen gekennzeichnet. One-way ANOVA mit Tukey oder Sidak Posthoc Test. $n=16$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.3 Über welche molekularen Eigenschaften muss ein wirksames 17,18-EEQ Analog verfügen?

Auf der Grundlage des validierten Schlagfrequenz-Assays war es möglich, eine Vielzahl von neuen Verbindungen zu testen und vergleichend zu analysieren. Die Struktur-Funktions-Analyse von 17,18-EEQ führte zur Entwicklung von C21 ([107], vgl. Abbildung 6), welches die wesentlichen strukturellen Schwächen von 17,18-EEQ ausgleichen konnte (vgl. Abschnitt 1.4). C21 verfügte bereits über eine hohe Plasmastabilität und Plasmaproteinbindung und zeigte keine CYP-Inhibition. Die orale Bioverfügbarkeit und die metabolische Stabilität von C21 waren dagegen begrenzt. Des Weiteren verfügte C21 über eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu sich in Entwicklung befindlichen sEH Inhibitoren. Die Entwicklung neuer stabiler Analoga war somit in einem ersten Schritt an eine hohe Aktivität im Schlagfrequenz-Assay und eine geringe sEH Inhibition gekoppelt (Tabelle 14).

Alle getesteten Analoga verfügten über die 11,12-Doppelbindung und die Oxamid- oder Harnstoff-Gruppe als Epoxid-Bioisostere. Die durchgeführten Modifikationen konzentrierten sich auf die Carboxylgruppe von C21, um einerseits die Wasserlöslichkeit zu verbessern und andererseits den Membraneinbau und den Abbau über die β -Oxidation zu verhindern. Getestet wurden Triethylenglykol-Ester (5,6) - in Bezug auf die Tabelle 14 werden im weiteren Verlauf die Nummern der Verbindungen in Klammern angegeben- Aminosäureamid (7 - 9), Sulfonat- (10, 11) oder Phosphonat- Derivate (12 - 15) sowie die klassischen Carboxy-Bioisostere Tetrazol (16) und Oxathiadiazol (17) sowie Modifikationen davon (18 - 20). Des Weiteren wurde überprüft, ob die 11,12-Doppelbindung durch ein Benzylring ersetzt werden kann (21 - 22) und welchen Einfluss die 3-oxa Modifikation hat (3 - 5). Alle getesteten Analoga führten zu einer Veränderung in der Wasserlöslichkeit, der sEH-Inhibition und/oder der biologischen Aktivität im Schlagfrequenz-Assay. Die Oxamid-Verbindungen 4 und 16 (C4 und C16) mit 3-oxa- und Tetrazol-Modifikation erwiesen sich als besonders geeignet und wurden weiteren Testungen im Vergleich zu C21 unterzogen [120]. Die maximale Effektstärke (C21 - $38,2 \pm 7,4$, C16 - $37,1 \pm 6,0$, C4 - $36,7 \pm 3,6$ bpm) und die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) der drei Verbindungen waren vergleichbar (C21: 5,69 nM, C16: 1,15 nM, C4: 1,41 nM). Im Ergebnis gelang es mit C4 eine im niedrigen nanomolaren Bereich wirksame Substanz zu identifizieren, die wie in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, über eine hohe orale Bioverfügbarkeit und metabolische Stabilität verfügt [120].

Tabelle 14: Übersicht über getestete 17,18-EEQ Analoga

Nr. ¹	Verbindung	Δbpm^2	sEHi ³ [%]	Nr. ¹	Verbindung	Δbpm^2	sEHi ³ [%]
1		Verbindung der ersten Generation		12		-18,0±1,0	6,4±2,7
2		Verbindung der zweiten Generation (C21)		13		-21,3±1,0	37,7±2,9
3		-38,0±3,3	10,4±4,1	14		-16,2±0,9	18,6±3,6
4		-33,6±1,1	0,8±2,5	15		-23,5±1,0	38,4±6,7
5		-25,2±2,3	1,9±0,9	16		-30,9±5,5	1,9±4,6
6		-19,8±1,0	76,6±3,0	17		-24,3±1,3	10,0±3,1
7		-21,1±1,4	19,2±5,0	18		-11,0±1,2	-9,2±4,1
8		-15,6±4,3	17,8±4,0	19		-21,1±1,1	61,8±2,8
9		-1,1±1,5	18,7±3,4	20		-7,5±4,5	1,5±3,8
10		-23,1±1,2	1,1±2,7	21		-24,5±0,8	-2,2±2,2
11		-20,7±0,9	0,0±3,8	22		21,8±1,0	1,8±2,6

¹Zählweise übernommen aus [120]. ² Δbpm – Veränderung der basalen Schlagfrequenz nach 7 min Inkubation von 30 nM der Verbindung im Schlagfrequenz-Assay. $n \geq 18$. Mittelwert \pm Standardfehler. ³sEHi – sEH Inhibition. Rekombinante humane sEH wurde mit 14,15-EET als Substrat inkubiert und der prozentuale Einfluss von 10 μM der Verbindung auf den Abbau von 14,15-EET ermittelt. $n = 4$. Mittelwerte \pm Standardabweichung. AUDA, ein potenter sEH-Inhibitor, bewirkte bei 1 μM eine Hemmung von $98,4 \pm 0,1$ %. Übernommen und modifiziert nach [120].

Alle weiteren Analysen wurden vom präklinischen Dienstleister Pharmacelsus GmbH durchgeführt. Die Wasserlöslichkeit von C4 war wesentlich höher als die von C21 und C16 ($1,96 \pm 0,04$, $0,08 \pm 0,01$, $0,04 \pm 0,01$ mg/ml). Die metabolische Stabilität wurde durch die Inkubation der Verbindungen mit primären, menschlichen Hepatozyten bestimmt. Die hepatische Abbaurate (*intrinsic clearance*) von C4 war kleiner als von C21 und C16 ($2,48$, $16,53$, $4,77$ $\mu\text{l}/\text{min}/10^6$ Zellen) und die Halbwertszeit von C4 größer als von C21 und C16 ($349,72$, $52,43$, $181,50$ min). Die orale Bioverfügbarkeit wurde zunächst in einem zellulären Assay zur intestinalen epithelialen Barriere bestimmt. Eine einfache Zellschicht der Zelllinie Caco-2 wurde dazu auf einer semipermeablen Membran eines Zellkultureinsatzes kultiviert. Es entsteht so ein apikales und basolaterales Volumen. Eine apikal zugegebene Substanz kann nur durch die Caco-2 Zellen auf die basolaterale Seite des Einsatzes gelangen. Auf diese Art wird die intestinale Aufnahme simuliert. Aus der Analyse der apikalen und basolateralen Konzentration der Substanz kann der Permeationskoeffizient (P_{app} - *apparent permeation coefficient*) kalkuliert werden. Es zeigte sich, dass der P_{app} -Wert von C4 größer als von C21 und C16 war ($28,2/15,8$, $5,3/2,3$, $10,0/8,0$ – apikal zu basolaterale / basolaterale zu apikal).

Die Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit in der Ratte ergab eine Verfügbarkeit von 100 % für C4 und eine Verfügbarkeit von 35 % für C16. Die Verfügbarkeit von C21 konnte nicht berechnet werden. Der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration von C4 und C16 wurde nach 1,6 Stunden und für C21 nach 2 Stunden gemessen. Die maximale Plasmakonzentration von C4 und C16 war rund zweimal so hoch wie die von C21.

3.4 Welcher intrazelluläre Signalweg wird von 17,18-EEQ und C4 aktiviert?

Die Identifikation der Rezeptorkomponenten und des intrazellulären Signalwegs für die antiarrhythmische und kardioprotektive Wirkung der im Abschnitt 3.2 untersuchten Eicosanoide und dem synthetischen Analogon ist ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Aufklärung erfolgte unter anderem mittels pharmakologischer Intervention, Knockdown von Zielproteinen sowie Proteinanalytik.

3.4.1 Identifizierung von Rezeptorkomponenten

Zur Überprüfung der G-Proteinkopplung des Rezeptors wurden die NRKM mit Pertussis-Toxin und Cholera-Toxin behandelt. Pertussis-Toxin (200 ng/ml) führt zu einer Entkopplung der inhibitorischen G α -Proteine und Cholera-Toxin (200 ng/ml) der

stimulierenden G α s-Proteine. Die Zellen wurden 4 Std. vor der Messung mit dem jeweiligen Toxin behandelt und anschließend ein Schlagfrequenz-Assay durchgeführt.

Beide Toxine führten zu einem Anstieg der basalen Schlagfrequenz der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 26A & C). Im Gegensatz zu Cholera-Toxin konnte Pertussis-Toxin den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 inhibieren (Abbildung 26B & D).

In der Literatur ist ein positiv chronotroper Effekt des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 beschrieben, welcher durch die typische G $_{q/11}$ oder G $_{12/13}$ Kopplung des Thromboxan-Rezeptors erklärt werden kann [123-125]. Im verwendeten Schlagfrequenz-Assay zeigte U46619 überraschender Weise einen starken negativ chronotropen Effekt, der auf eine Änderung der G-Proteinkopplung zurückgeführt werden könnte. Zur näheren Untersuchung wurde U46619 ebenfalls in Gegenwart des Pertussis-Toxins verwendet und der Effekt änderte sich von stark negativ auf stark positiv chronotrope. Durch diesen überraschenden Befund kann U46619 als Kontrolle für die Effektivität der Pertussis-Toxin-Behandlung genutzt werden (Abbildung 26B).

Isoprenalin führt über die Aktivierung des G-gekoppelten β adrenergen Rezeptors zu einem Anstieg der Schlagfrequenz von Kardiomyozyten [126] und konnte so als Kontrolle für die Wirksamkeit der Cholera-Toxin-Behandlung verwendet werden. Der positiv chronotrope Effekt von Isoprenalin konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit Cholera-Toxin vollständig geblockt werden (Abbildung 26D).

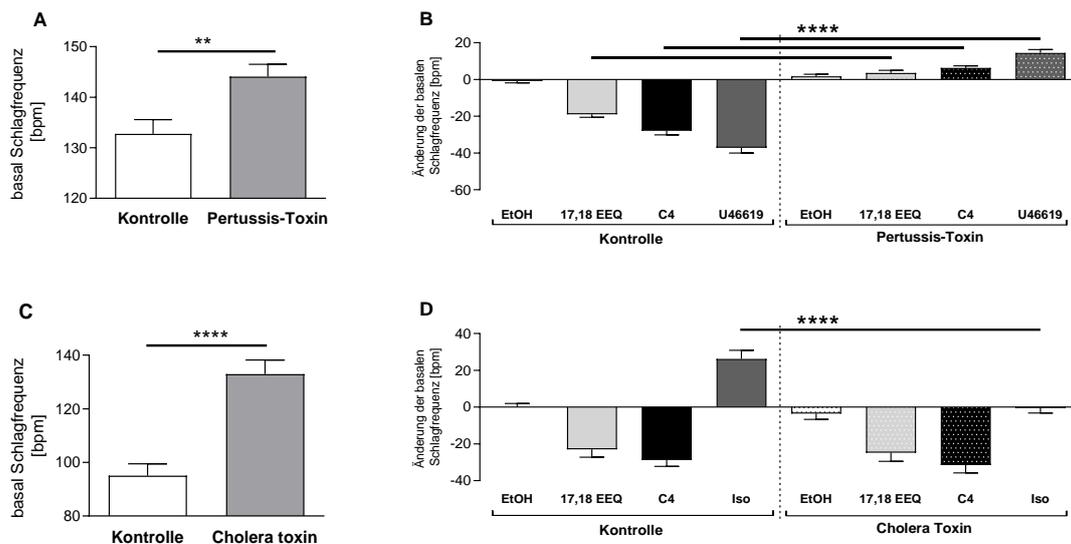


Abbildung 26: Pertussis-Toxin aber nicht Cholera-Toxin kann den Effekt von 17,18-EEQ und C4 hemmen

Der Einfluss von Pertussis-Toxin und Cholera-Toxin auf den Effekt von 17,18-EEQ und C4 wurden im Schlagfrequenz-Assay an NRKM untersucht. Die Zellen wurden 4 h vor dem Schlagfrequenz-Assay mit den Toxinen (200 ng/ml) behandelt. Beide Toxine erhöhten die basale Schlagfrequenz signifikant gegenüber der Kontrolle (A & C). Pertussis-Toxin inhibierte den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ, C4 sowie der Kontrollsubstanz U46619, einem Thromboxan-Rezeptor-Agonist (B). Cholera-Toxin hatte keinen Einfluss auf den Effekt von 17,18-EEQ und C4, blockierte aber den positiv chronotropen Effekt der Kontrollsubstanz Isoprenalin. Signifikanzen sind in den Diagrammen mit Sternen gekennzeichnet. T-Test (A & C) oder One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test (B & D). (A) n=120, (B) n≥18, (C) n=82, (D) n=16. Mittelwert ± Standardfehler.

Der Opioid-Rezeptor-Antagonist Naloxon verfügt über zwei Wirkungsmechanismen:

- I) direkter Antagonismus der Opioid-Rezeptoren [127] und
- II) Blockade der Bindungsstelle von Filamin A [128].

Der EC₅₀ von Naloxon für die Opioid-Rezeptoren liegt im nanomolaren Bereich, wohingegen die Blockade der Filamin A-Bindungsstelle im picomolaren Bereich liegt. Bei sehr niedrigen Konzentrationen kann somit ausschließlich die Blockade der Filamin A-Bindungsstelle untersucht werden.

Filamin A ist ein intrazelluläres Strukturprotein, welches die Aktinfilamente mit Membranproteinen wie Rezeptoren verbindet. Auf diese Weise stabilisiert Filamin A zum Beispiel die G-Proteinkopplung eines Rezeptors [128].

Die 7-minütige Vorbehandlung der Zellen mit 50 pM Naloxon hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Schlagfrequenz der NRKM, blockierte aber den negativ chronotropen Effekt von 100 nM 17,18-EEQ und 100 nM C4 (Abbildung 27).

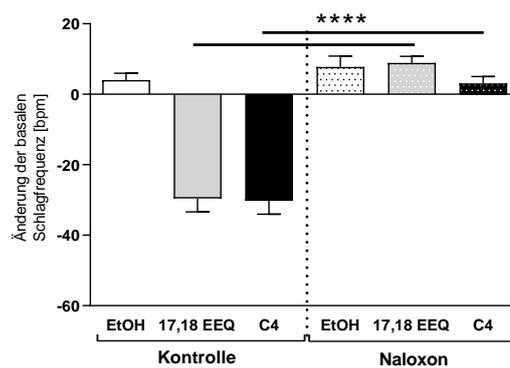


Abbildung 27: Naloxon blockiert den Effekt von 17,18-EEQ und C4 bereits im pikomolaren Bereich

Die Behandlung der NRKM mit 50 pM Naloxon für 7 min inhibiert den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ (100 nM) und C4 (100 nM) im Schlagfrequenz-Assay. Naloxon selbst hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Schlagfrequenz der Zellen. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. n=16. Mittelwert \pm Standardfehler.

Die Beteiligung von Filamin A am Rezeptorkomplex von 17,18-EEQ und C4 wurde zusätzlich zur pharmakologischen Intervention auch durch einen lentiviralen Knockdown in NRKM untersucht.

Die Infektion der NRKM mit Lentiviren, welche shRNA gegen Filamin A übertragen, führt auf mRNA- und Protein-Ebene zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Filamin A. Diese Reduktion geht mit dem Verlust der spontanen Kontraktilität der Zellen einher, sodass kein Schlagfrequenz-Assay mehr durchgeführt werden kann. Zur Überprüfung des Einflusses des Filamin A-Knockdowns auf den Effekt von 17,18-EEQ (1 μ M) und C4 (1 μ M) wurde aus diesem Grund die Phosphorylierung von AKT untersucht. Beide Testsubstanzen, 17,18-EEQ und C4, steigerten die AKT-Phosphorylierung am Serin 473 (S473) und am Threonin 308 (T308) gegenüber der Kontrolle (Ethanol) und den Scramble-transduzierten Zellen. Der Knockdown von Filamin A blockt diesen Anstieg der AKT-Phosphorylierung.

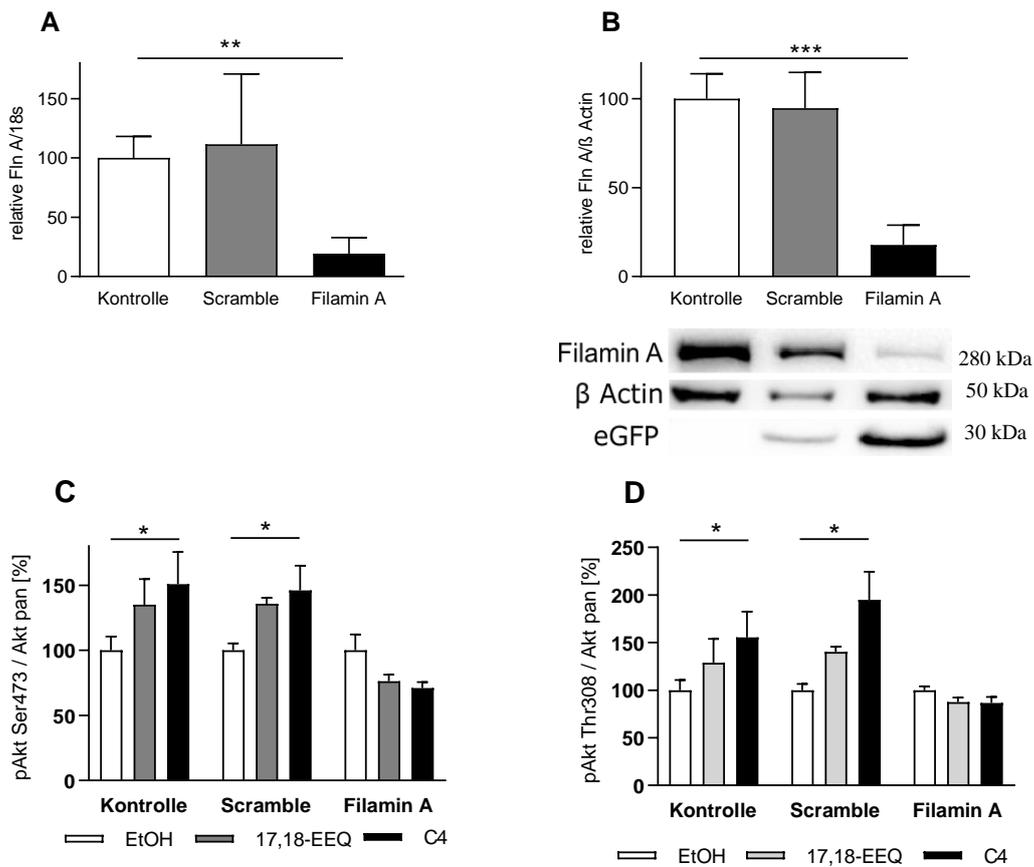


Abbildung 28: Filamin A ist für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 essentiell

Die lentiviral übertragene shRNA führt auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) zu einem Knockdown von Filamin A im Vergleich zu den nicht-infizierten und Scramble-transduzierten Zellen. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qPCR und die des Proteins mittels Western Blot. In Abbildung B ist zusätzlich zur quantitativen Darstellung ein repräsentativer Western Blot von Filamin A, β -Actin und eGFP gezeigt. β -Actin dient als Kontrollprotein und eGFP als Transduktionskontrolle. Der Knockdown von Filamin A führte, im Vergleich zu den nicht-infizierten und den Scramble-transduzierten Zellen, zu einem Ausfall der 17,18-EEQ- (1 μ M) und C4- (1 μ M) abhängigen AKT Phosphorylierung (C pAKT S473, D pAKT T308). One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test (A & B), Two-way ANOVA mit Dunnett Posthoc Test (C & D). A & B n=6, C & D n=12. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.4.2 Bedeutung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)

Es gibt vier Klassen von PI3K, welche durch die katalytische Untereinheit des Heterodimers klassifiziert werden [129]. Das Heterodimer ist aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Die PI3K wurde in den NRKM im Schlagfrequenz-Assay und im Aktivitäts-Assay untersucht.

Im Schlagfrequenz-Assay wurde die Bedeutung der PI3K unter Verwendung des Inhibitors Wortmannin (100 nM) für den Effekt von 17,18-EEQ (100 nM) und C4 (100 nM) untersucht.

Die Kontrollzellen reagierten mit einem negativ chronotropen Effekt auf die Behandlung mit 17,18-EEQ und C4, nicht aber auf die Behandlung mit Ethanol. Nach der Vorinkubation der Zellen mit Wortmannin für 30 min reagierten die Zellen auf die Zugabe von Ethanol, 17,18-EEQ als auch C4 mit einem positiv chronotropen Effekt (Abbildung 29).

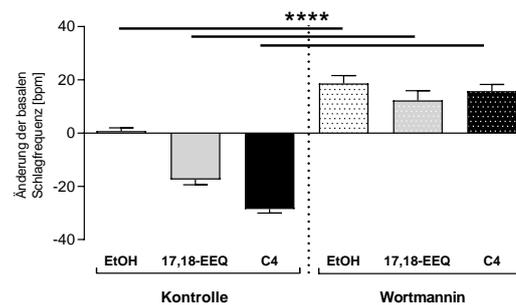


Abbildung 29: 17,18-EEQ und C4 aktivieren die PI3K

Im Schlagfrequenz-Assay wurde der Einfluss von Wortmannin (100 nM, 30 min) auf den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ (100 nM) und C4 (100 nM) untersucht. Im Gegensatz zu Ethanol führt die Behandlung mit 17,18-EEQ und C4 zu einer Reduktion der Schlagfrequenz. Durch die Vorinkubation der Zellen mit Wortmannin für 30 min, kommt es durch die Zugabe von Ethanol, 17,18-EEQ und C4 zu einem Anstieg der Schlagfrequenz. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. n=16. Mittelwert \pm Standardfehler.

Der PI3K-Aktivitäts-Assay wurde an Immunopräzipitaten von, mit 17,18-EEQ (1 μ M) oder C4 (1 μ M) stimulierten NRKM-Lysaten durchgeführt. Für die Immunopräzipitation wurde ein Antikörper gegen die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K verwendet. Die Aktivität der PI3K wurde auf die Vehikelgruppe (EtOH) normalisiert. Die Behandlung der NRKM mit C4 führt zu einem signifikanten Anstieg und mit 17,18-EEQ zu einem tendenziellen Anstieg der PI3K-Aktivität (Abbildung 30).

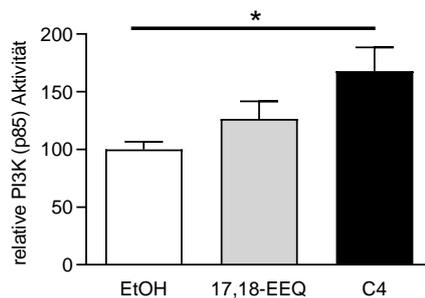


Abbildung 30: Die PI3K-Aktivität wird durch 17,18-EEQ und C4 gesteigert

Die NRKM wurden mit Ethanol (EtOH), 17,18-EEQ (1 μ M) oder C4 (1 μ M) für 10 min bei 31°C behandelt, lysiert und die Aktivität der PI3K an Immunopräzipitaten (p85) bestimmt. Die Aktivität wurde auf die Vehikel (EtOH) behandelten Zellen normalisiert. Die Behandlung mit C4, aber nicht mit 17,18-EEQ, führt zu einem signifikanten Anstieg der PI3K Aktivität. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. $n \geq 9$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.4.3 Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT)

Die Aktivität von AKT wird über das Ausmaß ihrer Phosphorylierung gesteuert, wobei sie am Serin 473 (S473) und Threonin 308 (T308) phosphoryliert werden kann und somit ihre Aktivität steigert. Das Ausmaß der Phosphorylierung von AKT wurde mittels Western Blot in Lysaten von NRKM analysiert und auf die Proteinmenge von AKT normiert. Dieses Verhältnis wurde für die Kontrollgruppe, mit Ethanol (0,025 %) behandelte Zellen, auf 100 % gesetzt. Ein repräsentatives Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 31C dargestellt.

Die Behandlung der Zellen mit 1 μ M 17,18-EEQ führte an S473 und T308 zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von AKT. 1 μ M C4 führte zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von AKT an S473 und zu einem tendenziellen Anstieg an T308 (Abbildung 31A & B).

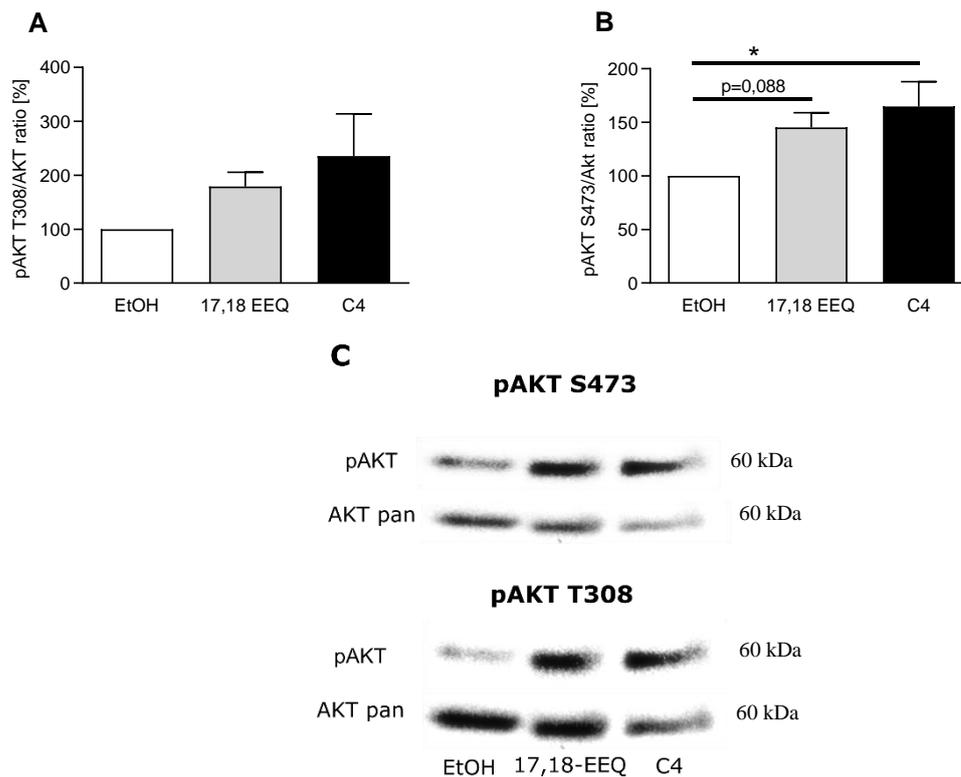


Abbildung 31: Phosphorylierung von AKT wird durch 17,18-EEQ und C4 erhöht

Mittels Western Blot wurde in Lysaten von NRKM die Phosphorylierung von AKT am Serin 473 (S473) und am Threonin 308 (T308) untersucht. Repräsentative Banden der Analyse sind in Abbildung C dargestellt. Die Intensität der Banden von mindestens sechs unabhängigen Versuchen wurde analysiert, das Ausmaß der Phosphorylierung wurde auf die Intensität des AKT (pan) bezogen und auf die Vehikelkontrolle (EtOH) normiert. 1 μ M C4 konnte die Phosphorylierung von AKT an S473 (B) signifikant und an T308 (A) tendenziell im Vergleich zur EtOH (0,025 %) Kontrolle erhöhen. 1 μ M 17,18-EEQ erhöhte die Phosphorylierung von AKT an S473 und T308 tendenziell im Vergleich zur Kontrolle. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. $n \geq 6$. Mittelwert \pm Standardfehler.

Zusätzlich zur Western Blot Analyse wurde in den Lysaten der NRKM der zeitabhängige Effekt von 1 μ M C4 auf die Phosphorylierung von AKT an Position S473 untersucht. Die Bestimmung der Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe eines CisBio-Assays und wurde auf die totale Menge an AKT in der Probe normiert. Die Veränderung der Phosphorylierung wurde durch die Normierung auf die basale Phosphorylierung errechnet.

Die Behandlung der Zellen mit C4 führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abbildung 32). Dieser Anstieg war temporär mit einem Maximum nach 3 min.

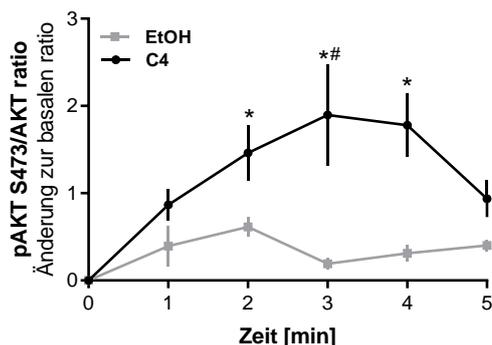


Abbildung 32: Die Phosphorylierung von AKT an Position S473 durch C4 ist zeitabhängig

Die zeitabhängige Phosphorylierung von AKT an Position S473 wurde in Lysaten von NRKM mit Hilfe des CisBio-Assays analysiert. Die Daten wurden auf die basale Phosphorylierung der Zellen normiert. 1 μ M C4 führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung über die Zeit (Signifikanz gekennzeichnet mit *) als auch gegenüber der Vehikelkontrolle (Signifikanz gekennzeichnet mit #). Two-way ANOVA mit Sidak Posthoc Test. $n \geq 6$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.4.4 Aktivierung der NO-Synthase

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Signalmolekül mit vielfältigen biologischen Effekten. Die Bildung von NO erfolgt durch die NADPH-abhängige Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin durch die NO-Synthase, von der es drei Isoformen gibt: die neuronale NO-Synthase (nNOS), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Alle drei Isoformen werden im Herzen exprimiert, wobei die eNOS die dominante Isoform in Kardiomyozyten darstellt [130]. Zur Untersuchung der Beteiligung der NO-Synthase am intrazellulären Signalweg von 17,18-EEQ und C4 wurde das L-Arginin-Analog L-NAME als Inhibitor im Schlagfrequenz-Assay verwendet und die Phosphorylierung von eNOS an Serin 1177 (S1177) analysiert. Ein Anstieg der Aktivität von AKT führt dabei zu einem phosphorylierungsbedingten Anstieg der eNOS Aktivität [131].

Im Schlagfrequenz-Assay wurden die Zellen 30 min vor der Messung mit L-NAME (100 μ M) behandelt und anschließend der Effekt von Ethanol (0,025 %), 17,18-EEQ (60 nM) und C4 (60 nM) auf die basale Schlagfrequenz getestet. Der Effekt von Ethanol wurde durch L-NAME im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht verändert (Abbildung 33). Der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ und C4 wurde in Gegenwart von L-NAME vollständig geblockt.

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von eNOS an S1177 wurden die NRKM 5 min mit 1 μ M 17,18-EEQ oder 1 μ M C4 stimuliert, lysiert und im Western Blot analysiert. Die Signalintensität wurde zunächst auf β -Actin und anschließend auf die

Vehikelkontrolle normiert. 17,18-EEQ konnte die Phosphorylierung von eNOS tendenziell und C4 signifikant steigern (Abbildung 34).

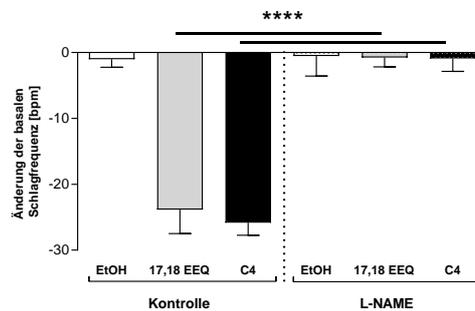


Abbildung 33: Die Inhibition der NO-Synthase führt zum Ausfall des Effekts von 17,18-EEQ und C4

Die Beteiligung der NO-Synthase am Signalweg von 17,18-EEQ (60 nM) und C4 (60 nM) wurde durch die Verwendung von L-NAME (100 μ M) im Schlagfrequenz-Assay untersucht. L-NAME beeinflusst die Wirkung von Ethanol (0,025%) auf die Zellen nicht, konnte aber den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 signifikant hemmen. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. $n \geq 20$. Mittelwert \pm Standardfehler.

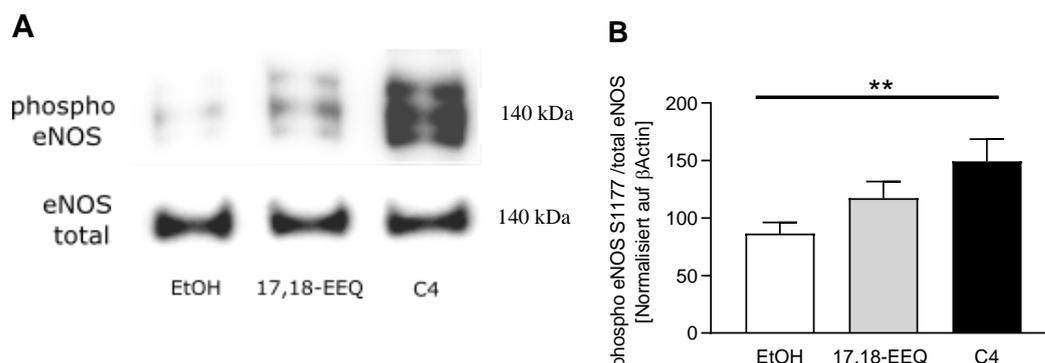


Abbildung 34: 17,18-EEQ und C4 erhöhen die eNOS- Phosphorylierung

Das Ausmaß der Phosphorylierung von eNOS an Serin 1177 (S1177) wurde in stimulierten NRKM Lysaten untersucht. Die Zellen wurden 5 min mit EtOH, 1 μ M 17,18-EEQ oder 1 μ M C4 stimuliert, lysiert und im Western Blot analysiert. Die Behandlung der Zellen mit 17,18-EEQ führte zu einem tendenziellen und mit C4 zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von eNOS an S1177. Ein repräsentatives Ergebnis ist in (A) dargestellt. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. $n \geq 19$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.4.5 Einfluss der Proteinkinasen A (PKA), C (PKC) und G (PKG)

Proteinkinasen spielen eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Regulation der Signaltransduktion. Sie phosphorylieren Enzyme und Transkriptionsfaktoren und beeinflussen so deren Aktivität. Die Bedeutung der PKA, PKC und PKG für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 wurde im Schlagfrequenz-Assay durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren untersucht.

Die PKA wird durch cAMP und die PKG durch cGMP aktiviert. cAMP als auch cGMP sind wichtige Signalmoleküle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Inhibition von PKA erfolgte mit dem cAMP-Analogon Rp-cAMPS triethylammonium Salz (Rp-cAMPS) und von PKG durch das cGMP-Analogon Rp-8-[(4-Chlorophenyl)thio]-cGMPS triethylammonium Salz (Rp-cGMPS). Der Einfluss der Inhibitoren (1 μ M) auf den Effekt von 100 nM 17,18-EEQ, 100 nM C4 und den als Positivkontrolle fungierenden β -adrenergen Rezeptor-Agonisten Isoprenalin (Iso, 100 nM) wurde im Schlagfrequenz-Assay untersucht. Die Zellen wurden 7 min vor der Messung mit 1 μ M des entsprechenden Inhibitors oder Vehikel inkubiert.

Die Inhibition der PKA mittels Rp-cAMPS führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des negativ chronotropen Effekts von 17,18-EEQ und C4. Der positiv chronotrope Effekt von Iso wurde allerdings deutlich reduziert (Abbildung 35A).

Die Inhibition der PKG mittels Rp-cGMPS hatte keinen Einfluss auf die Effekte von Ethanol und Iso, blockte allerdings den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 vollständig (Abbildung 35B)

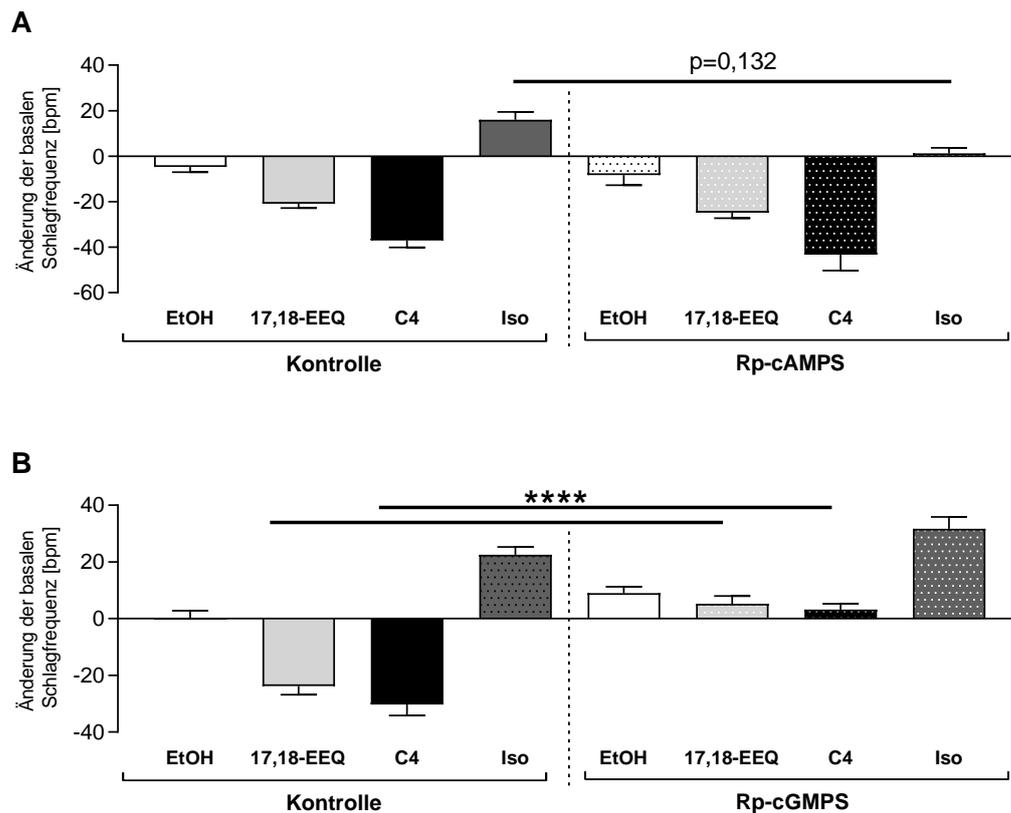


Abbildung 35: Die Inhibition der PKG aber nicht der PKA blockiert den Effekt von 17,18-EEQ und C4

Der Einfluss der Inhibition von PKA und PKG mittels Rp-cAMPS (1 μ M) und Rp-cGMPS (1 μ M) auf den Effekt von Ethanol (EtOH), 17,18-EEQ (100 nM), C4 (100 nM) und Isoprenalin (Iso, 100 nM) wurde im Schlagfrequenz-Assay untersucht. Die Inhibitoren Rp-cAMPS (1 μ M, PKA Inhibitor, A) und Rp-cGMPS (1 μ M, PKG Inhibitor, B) wurden 7 min vor der Schlagfrequenzmessung hinzugefügt. Der Effekt von EtOH, 100 nM 17,18-EEQ und 100 nM C4 wurde durch Rp-cAMPS nicht beeinflusst, aber der positiv chronotrope Effekt von 100 nM Iso deutlich reduziert, wenn auch nicht signifikant. Die Inhibition der PKG mittels Rp-cGMPS hatte keinen Einfluss auf den Effekt von Iso aber blockte den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 signifikant. Beide Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf den Effekt des Vehikels EtOH. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. n=16. Mittelwert \pm Standardfehler.

Die Aktivierung der PKC erfolgt durch den IP₃-abhängigen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in IP₃ und Diacylglycerine (DAG), welches ebenfalls für die Aktivierung der PKC notwendig ist. Die Untersuchung der Bedeutung der PKC für die Wirkung von 17,18-EEQ und C4 im Schlagfrequenz-Assay erfolgte durch die Hemmung der PKC mittels Calphostin C, welches die Bindung von DAG an die PKC inhibiert.

Die Zellen wurden, 7 min vor der Behandlung mit Ethanol, 17,18-EEQ (100 nM) oder C4 (100 nM), mit Calphostin C (100 nM) behandelt. Die Inhibition der PKC blockierte

den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 signifikant, wobei der Effekt des Vehikels EtOH statistisch unverändert blieb (Abbildung 36).

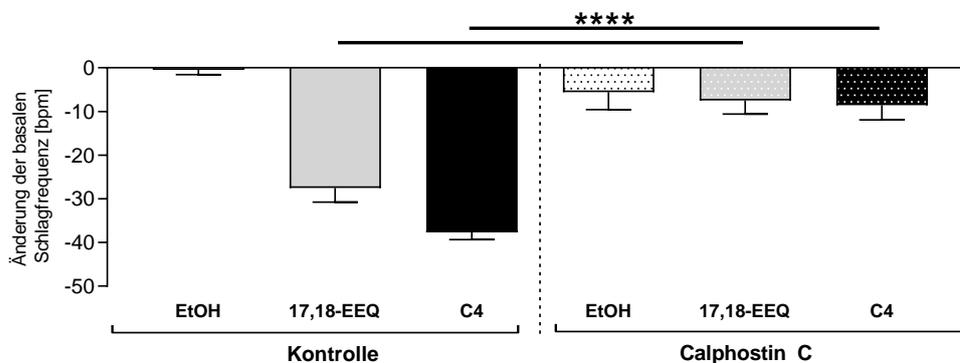


Abbildung 36: Für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 ist die Aktivierung der PKC notwendig

Der Einfluss der Inhibition von PKC mittels Calphostin C (100 nM) auf den Effekt von Ethanol (EtOH), 17,18-EEQ (100 nM) und C4 (100 nM) wurde im Schlagfrequenz-Assay untersucht. Die Zellen wurden 7 min vor der Behandlung mit 100 nM 17,18-EEQ oder 100 nM C4 mit 100 nM Calphostin C behandelt. Der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ und C4 wurde durch Calphostin C vollständig gehemmt. Die Wirkung von EtOH wurde nicht signifikant beeinflusst. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. $n \geq 13$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.5 Wie kann die antiarrhythmische und kardioprotektive Wirkung von C4 erklärt werden?

Die vom Rezeptor vermittelten und vom intrazellulären Signalweg übertragenen kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekte der CYP-Epoxyeicosanoide und dem synthetischen Analogon führen zu einer Veränderung in den elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten (vgl. Abschnitt 1.3). Diese Veränderungen wurden in Bezug auf die pharmakologische Inhibition von Ionenkanälen, elektrische Erregbarkeit, Refraktärzeit, Kontraktilität und den Ca^{2+} -Transienten untersucht. Des Weiteren wurde die Phosphorylierung der Schlüsselproteine des SR untersucht.

3.5.1 Bedeutung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle

Im Herz wurden zwei ATP-abhängige K^+ -Kanäle identifiziert; der sarkolemmale ATP-abhängige Kaliumkanal ($\text{sarcK}_{\text{ATP}}$) und der mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanal ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) [132]. Der $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ kann spezifisch durch HMR 1098 und der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ durch 5-Hydroxydecanoat (5-HD) blockiert werden. Unter Verwendung der beiden Inhibitoren konnte die Bedeutung der beiden Kanäle für die Wirkung von C4 im

Schlagfrequenz-Assay untersucht werden. Die Zellen wurden dafür 7 min vor Beginn der Messung der Schlagfrequenz mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt.

Die Inhibition des sarcK_{ATP} Kanals durch HMR 1098 (10 µM) führt zu einer signifikanten Hemmung des negativ chronotropen Effekts von C4 (100 nM) sowie zu einem signifikanten negativ chronotropen Effekt der Vehikelkontrolle Ethanol (Abbildung 37A).

Der Effekt von C4 (1 µM) wurde signifikant durch den Einsatz des mitoK_{ATP} Kanal-Hemmers 5-HD (100 µM) blockiert. Der Effekt von Ethanol auf die Schlagfrequenz der Zellen wurde durch 5-HD nicht moduliert (Abbildung 37B).

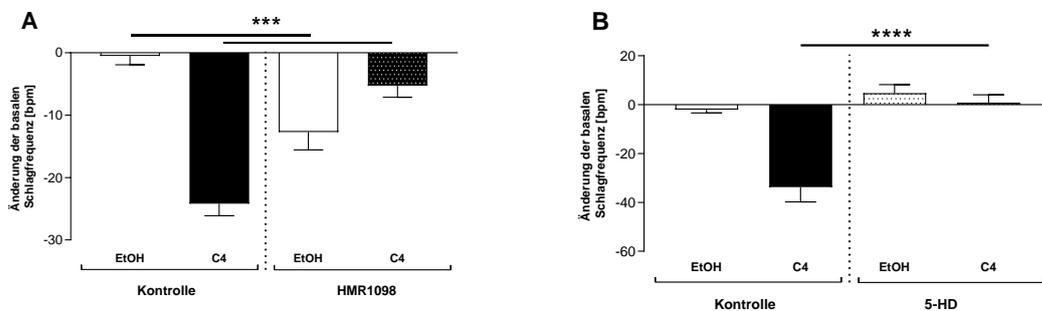


Abbildung 37: Die Inhibition des sarcK_{ATP} und mitoK_{ATP} Kanals führt zum Verlust des Effekts von C4

Um die Bedeutung der sarcK_{ATP} und mitoK_{ATP} Kanäle für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 untersuchen zu können, wurden die Inhibitoren HMR 1098 (10 µM) und 5-HD (100 µM) im Schlagfrequenz-Assay eingesetzt. Die Zellen wurden 7 min vor Beginn der Messung mit den Inhibitoren behandelt. In Gegenwart von HMR1098 wurde der negativ chronotrope Effekt von 100 nM C4 signifikant gehemmt. Zusätzlich verstärkte sich der Effekt der Vehikelkontrolle Ethanol ebenfalls signifikant (vgl. A). 5-HD blockierte den Effekt von 1 µM 17,18-EEQ als auch 1 µM C4 signifikant ohne einen Einfluss auf den Effekt von Ethanol zu haben. One-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test. n≥20. Mittelwert ± Standardfehler.

3.5.2 Untersuchung der elektrischen Erregbarkeit und der Refraktärzeit

Zur Bestimmung der elektrischen Erregbarkeit und der Refraktärzeit wurden die NRKM in Kammerobjektträgern kultiviert und für die Messung in einen Messpuffer ("Kang & Leaf" Puffer) überführt, in dem das spontane Schlagen der Zellen weitgehend unterdrückt wird. Die Behandlung mit der Vehikelkontrolle EtOH oder C4 (60 nM) erfolgte mittels eines Überströmungssystems und die Stimulation der Kontraktion mit Hilfe einer Pacing-Elektrode.

Die maximale Stimulationsfrequenz, der die Zellen folgen konnten, lag unter basalen Bedingungen zwischen 4,4 bis 4,8 Hz und somit bei einer durchschnittlichen basalen

Refraktärzeit von 234 ms. Die Behandlung der Zellen mit EtOH erhöhte die Refraktärzeit durchschnittlich um 6,1 ms, und um 9,5 ms im Falle von C4. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 38A).

Die Spannungsschwelle der Zellen ist stimulationsfrequenzabhängig und lag unter basalen Bedingungen durchschnittlich bei 3,9 mV bei 1 Hz und stieg auf 5,4 mV bei 4 Hz. Die Behandlung der Zellen mit EtOH führte zu keiner bedeutenden Veränderung der elektrischen Erregbarkeit der Zellen. C4 erhöht im Vergleich zu EtOH die Spannungsschwelle der Zellen signifikant über die gesamte Stimulationsfrequenz (Abbildung 38B).

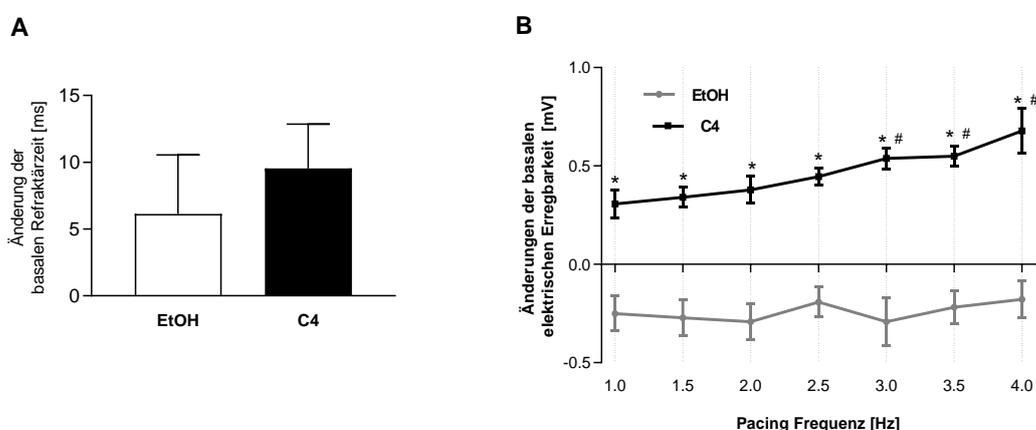


Abbildung 38: C4 reduziert die elektrische Erregbarkeit, aber nicht die Refraktärzeit

Die Refraktärzeit und die elektrische Erregbarkeit wurde durch elektrische Stimulation der NRKM bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit der Vehikelkontrolle Ethanol (EtOH) und C4 (60 nM) erfolgte mit Hilfe eines Überströmungssystems. Die Refraktärzeit der Zellen wurde durch die Behandlung mit EtOH oder C4 nicht signifikant verändert (A). Die Behandlung der Zellen mit C4 führte zu einem signifikanten Anstieg der Schwellenspannung (B) gegenüber der Vehikelkontrolle (*) EtOH als auch über die Frequenz (#). Ungepaarter t-Test (A), Two-way ANOVA mit Tukey Posthoc Test (B). A n \geq 11, B n \geq 9. Mittelwert \pm Standardfehler.

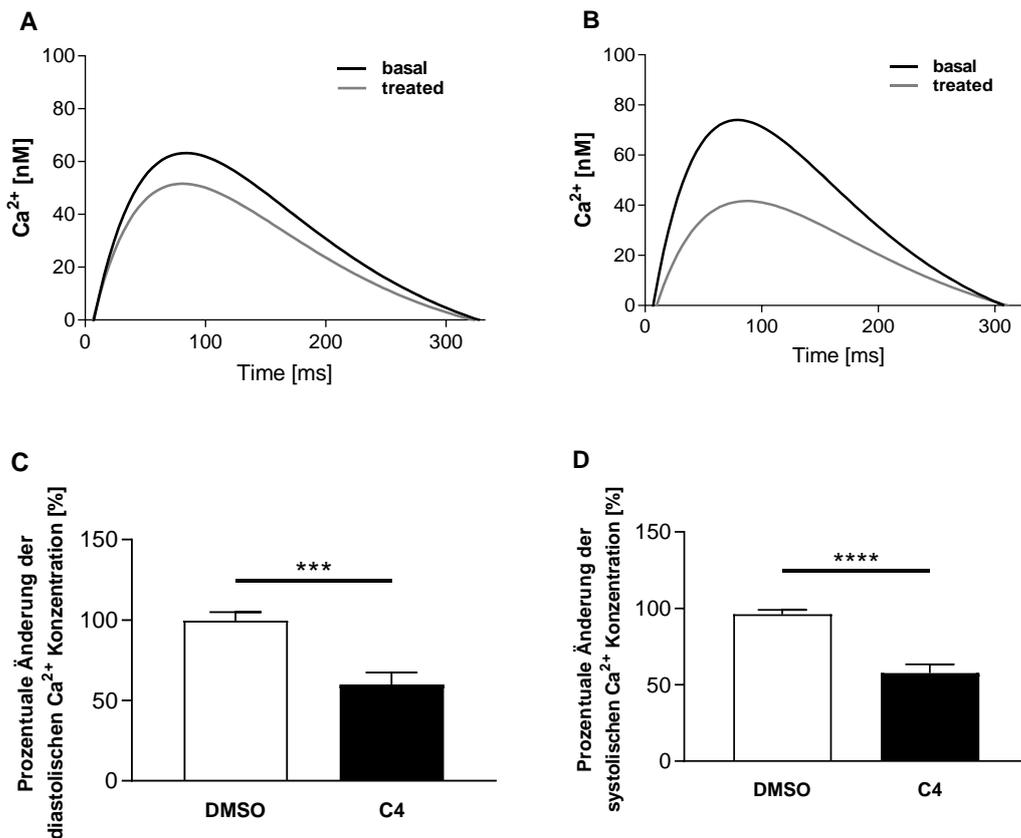
3.5.3 Untersuchung der Kontraktilität und des Ca²⁺-Transienten

Zur Messung der Kontraktilität und des Ca²⁺-Transienten wurden die NRKM in Kammerobjekträgern kultiviert, mit dem Ca²⁺-Indikator FURA-2 beladen und elektrisch bei 3 Hz stimuliert. Die Messung der Kontraktilität und des Ca²⁺-Transienten erfolgte simultan unter basalen Bedingungen und 10 min nach der Behandlung der Zellen mit DMSO (0,1 %) oder C4 (1 μ M). DMSO diente in dieser Versuchsreihe als Vehikel. Die Parameter des Ca²⁺-Transienten und der Kontraktilität wurden auf den Basiswert normiert und als prozentuale Veränderung dargestellt.

Die Zellen hatten durchschnittlich eine diastolische Ca²⁺-Konzentration von 38,0 \pm 7,6 nM und eine systolische Ca²⁺-Konzentration 101,2 \pm 25,5 nM. Der Verlauf der

Ca²⁺-Transienten ist repräsentativ in Abbildung 39 A & B dargestellt. Im Fall von C4 wurde die diastolische und systolische Ca²⁺-Konzentration, die Amplitude sowie die Aufstrich- und Abfallgeschwindigkeit des Ca²⁺-Transienten signifikant reduziert (Abbildung 39 C, D, E, F & G). Unbeeinflusst blieb dagegen die Zeit bis zum 50 % Peak als auch vom Peak zum 50 % Basiswert durch die Behandlung mit C4 (Abbildung 39 H & I). Die im SR gespeicherte Ca²⁺-Konzentration wurde durch die Zugabe von 100 µM Koffein spontan freigesetzt. Diese Ca²⁺-Konzentration wurde durch die Behandlung mit C4 im Vergleich zu DMSO signifikant reduziert.

Die Zellen verkürzten sich durchschnittlich um 2,2±0,2 µm. Verglichen mit DMSO hatte C4 keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktionslänge (Abbildung 40 A), die Aufstrichgeschwindigkeit (Abbildung 40 B) oder auf die Zeit bis 50 % der maximalen Kontraktionslängenveränderung bzw. 50 % der vollständigen Relaxation erreicht sind (Abbildung 40 D). Im Gegensatz dazu beeinflusste C4 im Vergleich zu DMSO die Relaxationsgeschwindigkeit der Zellen signifikant (Abbildung 40 C).



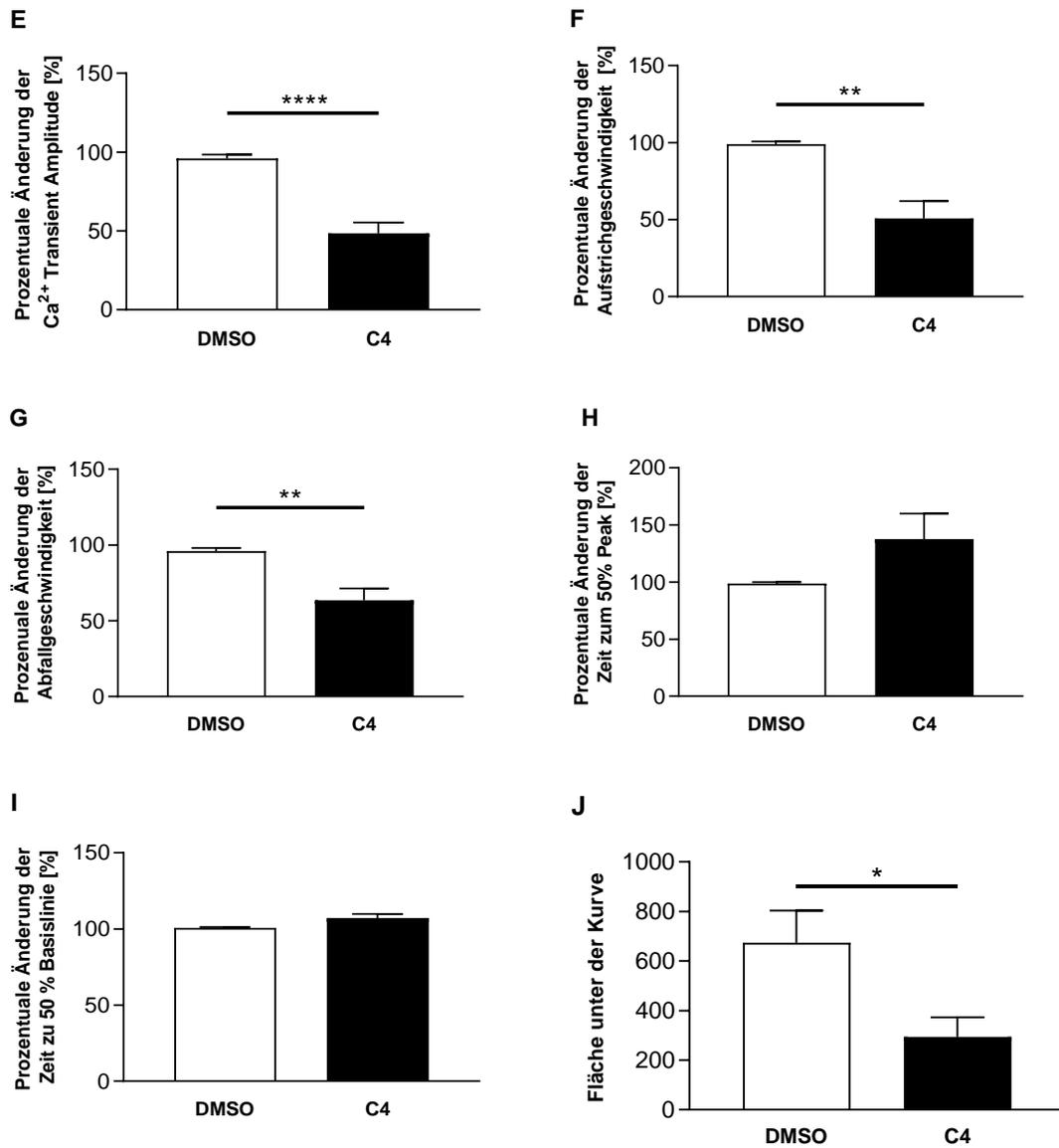


Abbildung 39: C4 hat einen bedeutenden Einfluss auf den Ca²⁺-Transienten

Die NRKM wurden mit dem Ca²⁺-Indikator FURA-2 beladen und der Ca²⁺-Transient und die Kontraktilität eines Clusters simultan bestimmt. Die Zellen wurden mit 3 Hz elektrisch stimuliert und mit DMSO (1 %) oder C4 (1 μM) behandelt. Die Manipulation und Behandlung führte zu einer Reduktion des Ca²⁺-Transients, wie in den repräsentativen Kurven dargestellt (A - DMSO, B - C4). Die Normierung der Daten auf den basalen Wert zeigt einen signifikanten Einfluss von C4 im Vergleich mit DMSO auf eine Vielzahl der Parameter des Ca²⁺-Transientes. C4 reduzierte die prozentuale diastolische als auch systolische Ca²⁺-Konzentration (C & D) und verringert die Amplitude sowie die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeit (E, F & G). Die Behandlung der Zellen mit C4 veränderte die Zeit bis zum Peak und vom Peak zum Basiswert nicht (H & I). Die im sarkoplasmatischen Retikulum gespeicherte Ca²⁺-Konzentration, welche durch die Zugabe von 100 μM Koffein freigesetzt wurde, wurde durch die Behandlung mit C4 im Vergleich mit DMSO signifikant reduziert (J). Kurvenfit mit normierter Bateman Funktion (A & B), Ungepaarter t-Test (C - J), n ≥ 8. Mittelwert ± Standardfehler.

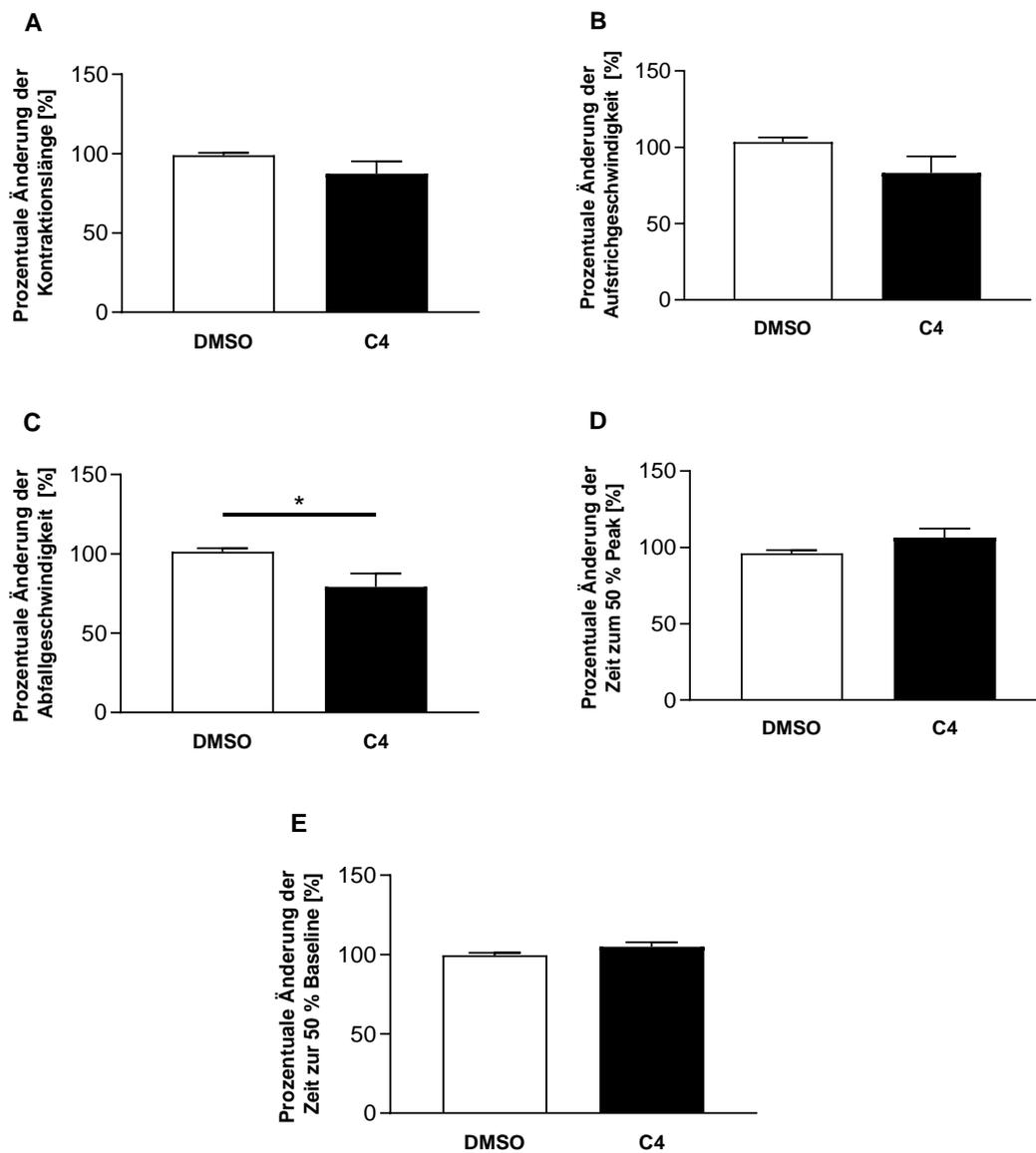


Abbildung 40: C4 hat keinen Einfluss auf die Kontraktilität

Die Kontraktilität wurde simultan mit dem Ca^{2+} -Transienten an mit 3 Hz elektrisch stimulierten NRKM bestimmt. Die Kontraktilität wurde basal und 10 min nach der Behandlung mit DMSO (1 %) oder C4 (1 μM) bestimmt. Die Daten wurden auf die basalen Messwerte normiert. Der statistische Vergleich von DMSO und C4 führte zu keiner signifikanten Veränderung in Bezug auf die Kontraktionslänge (A), die Anstiegsgeschwindigkeit (B), die Zeit bis zum Erreichen von 50 % der Amplitude (D) und die Zeit bis zum Erreichen von 50 % des Ausgangswertes (E). Es zeigte sich jedoch ein Einfluss der Behandlung mit C4 bei der Geschwindigkeit der Relaxation (C). Ungepaarter t-Test (A - E), $n \geq 8$. Mittelwert \pm Standardfehler.

3.5.4 Phosphorylierung von Phospholamban und des Ryanodin-Rezeptors

Die zytosolische Konzentration von Ca^{2+} -Ionen während einer Kontraktion eines Kardiomyozyten wird maßgeblich vom Ryanodin-Rezeptor (RyR2) und von der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA)

bestimmt [110]. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 wird durch den Anstieg der Phosphorylierung des Serins an Position 2808 (S2808) und 2814 (S2814) erhöht. Die Aktivität von SERCA wird durch Phospholamban (PLN) reguliert. PLN kann an Serin 16 (S16) und an Threonin 17 (T17) phosphoryliert werden. Phosphoryliertes PLN führt zu einem Anstieg der SERCA-Aktivität. Die Phosphorylierung von RyR2 und PLN erfolgt unter anderem PKA- und PKG-abhängig. Um den Einfluss der Proteinkinasen zu untersuchen, wurde die C4- und Iso-abhängige Phosphorylierung von RyR2 und PLN in Abwesenheit und Gegenwart eines PKA- und eines PKG-Inhibitors (Rp-cAMPS bzw. Rp-cGMPS) durchgeführt. Die Zellen wurden 7 min vor der Stimulation mit 100 nM C4 mit 1 μ M des Inhibitors behandelt. Die Analyse der Phosphorylierung von PLN und RyR2 erfolgte mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern im Western Blot. Das Ausmaß der Phosphorylierung wurde durch Normierung auf das Gesamtprotein berechnet. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe eines Normierungsproteins berücksichtigt. Das Normierungsprotein für PLN war β -Aktin und für RyR2 Vinculin. Der Einfluss der Behandlung von C4 wird als Veränderung zur Kontrolle dargestellt.

Die Inkubation der NRKM mit C4 in Abwesenheit eines Inhibitors führte zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von PLN an Serin 16 (pPLN S16). Dieser Anstieg konnte durch die Behandlung der Zellen mit Rp-cAMPS und Rp-cGMPS blockiert werden (Abbildung 41 A). Die Phosphorylierung von PLN an Threonin 17 (pPLN T17) wurde weder in Ab- noch Anwesenheit eines Inhibitors durch C4 verändert (Abbildung 41 B). Der Einfluss der Behandlung der Zellen mit C4 sowie der Effekt der Inhibitoren auf die Phosphorylierung von PLN wird in den repräsentativen Banden der Abbildung 41 C dargestellt.

Die Phosphorylierung von RyR2 an Serin 2808 (pRyR2 S2808) und Serin 2814 (pRyR2 S2814) wurde von C4 weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit der Inhibitoren Rp-cAMPS und Rp-cGMPS verändert (Abbildung 42 A & B). Der Einfluss auf die Phosphorylierung von RyR2 wird in den repräsentativen Western Blot Ergebnissen in Abbildung 42 C dargestellt.

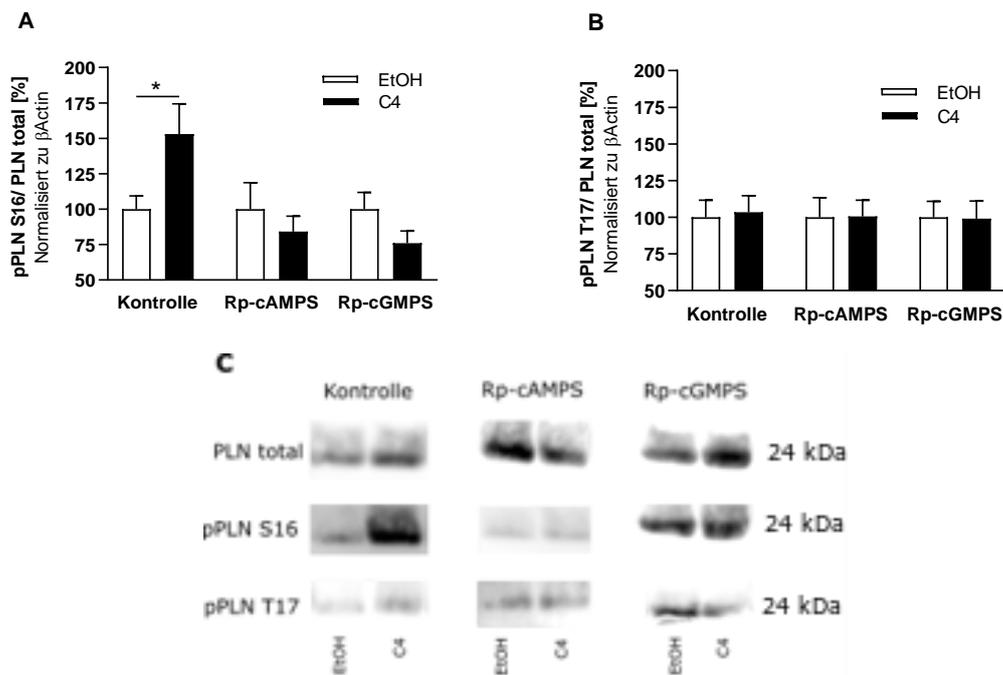


Abbildung 41: C4 steigert die Phosphorylierung von PLN

Die Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) an Serin 16 (pPLN S16, A) und Threonin 17 (pPLN T17, B) wurde in Lysaten von mit C4 (100 nM) stimulierten NRKM analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt eines PKA- (Rp-cAMPS) bzw. PKG-Inhibitors (Rp-cGMPS) untersucht. Die Zellen wurden 7 min mit EtOH (0,025%) oder 1 μ M Inhibitor inkubiert, bevor sie für 5 min mit EtOH oder C4 behandelt wurden. Die Analyse erfolgte in 15 Lysaten je Gruppe aus 5 unabhängigen Präparationen. Die Proteinmenge der Phosphorylierung und des Gesamtproteins wurde auf β -Aktin normiert. Das Ausmaß der Phosphorylierung wurde durch den Bezug zum Gesamtprotein kalkuliert und als Veränderung zur Kontrolle dargestellt. Two-way ANOVA mit Dunnett Posthoc Test. n=15. Mittelwert \pm Standardfehler.

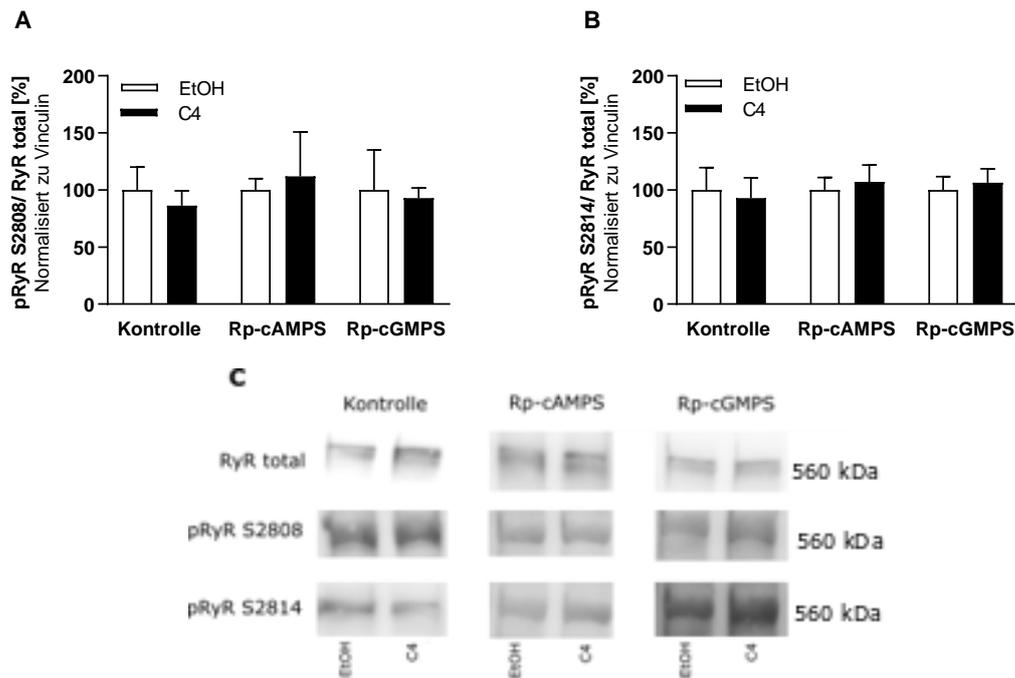


Abbildung 42: C4 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des RyR2

Die Phosphorylierung des RyR2 an Serin 2808 (pRyR2 S2808) und Serin 2814 (pRyR2 S2814) wurde in Lysaten von mit C4 (100 nM) stimulierten NRKM untersucht. Des Weiteren sollte der Einfluss der PKA und PKG auf den von C4 vermittelten Effekt geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde der PKA- (Rp-cAMPS) und PKG-Inhibitor (Rp-cGMPS) verwendet. Die Zellen wurden 7 min mit EtOH (0,025%) oder 1 µM Inhibitor inkubiert, bevor sie für 5 min mit EtOH oder C4 behandelt wurden. Die Analyse erfolgte in 15 Lysaten je Gruppe aus 5 unabhängigen Präparationen. Die Proteinmenge der Phosphorylierung und des Gesamtproteins wurde auf Vinculin normiert. Das Ausmaß der Phosphorylierung wurde durch den Bezug zum Gesamtprotein kalkuliert und als Veränderung zur Kontrolle dargestellt. Two-way ANOVA mit Dunnett Posthoc Test. n=15. Mittelwert ± Standardfehler.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkmechanismus der Omega-3 Fettsäuren EPA und DHA, zwei von ihnen abgeleiteten Epoxyeicosanoiden 17,18-EEQ und 19,20-EDP sowie einem synthetischen Analogon von 17,18-EEQ, namentlich C4 untersucht. Zur Sicherung der Datenqualität und Verlässlichkeit der erzeugten Daten wurde in einem ersten Schritt der sogenannte Schlagfrequenz-Assay erfolgreich validiert, mit dessen Hilfe im Verlauf der Wirkmechanismus erfolgreich aufgeklärt werden konnte.

4.1 Das Schlagfrequenz-Assays kann für die Untersuchung von Epoxyeicosanoiden und stabilen Analoga verwendet werden

Neonatale Kardiomyozyten wurden bereits in einer Vielzahl von kardiovaskulären Studien als standardisiertes *in vitro* Modell genutzt. Verwendet werden in der Regel neonatale Ratten oder Mäuse im Alter von 0 bis 3 Tagen. Mit den Zellen können eine Vielzahl von Fragestellungen zur Elektrophysiologie, dem Ca^{2+} -Handling, der Kardiotoxikologie, der Zellphysiologie oder der Proteinbiochemie untersucht werden [133, 134]. Die Schlagfrequenz der Zellen stellt einen bedeutenden Parameter dar [135-137] und wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung der Wirkung von Omega-3-Fettsäuren verwendet [39, 50, 81, 93, 107]. Allerdings handelt es sich um primäre Zellen, wodurch eine Vielzahl von Variablen die Qualität der Zellen der jeweiligen Präparation beeinflusst. Um über einen langen Zeitraum vergleichbare Ergebnisse mit primären Zellen erzeugen zu können ist eine Validierung des Assays unverzichtbar.

Der global bedeutendste Leitfaden für die Validierung von Analyseverfahren ist die ICH Q2 (R1). Dieser Leitfaden wird vom Internationalen Rat für die Harmonisierung der technischen Anforderungen an Humanarzneimittel (aus dem Englischen; *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) herausgegeben. Der Rat hat die Aufgabe, die Beurteilungskriterien der Zulassungsbehörden der USA, Europa und Japan zu vereinheitlichen. Der Leitfaden wurde 1995 ursprünglich für die Validierung von chromatographischen Verfahren veröffentlicht und befindet sich gegenwärtig in der Überarbeitung, um zukünftig besser auf weitere Methoden angewendet werden zu können. Zum jetzigen Zeitpunkt bedarf es einer individuellen Anpassung der definierten Anforderungen auf die angewendete Methode. Im Leitfaden wird zwischen analytischen Methoden zur Identifizierung, zur

Reinheitsbestimmung und zur Wirksamkeitsprüfung von Arzneimittel unterschieden [138, 139].

Gemäß diesem Leitfaden ist der verwendete Schlagfrequenz-Assay der Kategorie „Wirksamkeitsprüfung“ zuzuordnen. Bei dieser Kategorie muss die Richtigkeit, Spezifität, Präzision und Linearität des Arbeitsbereichs im Rahmen der Methodvalidierung untersucht und bewertet werden.

Betrachtung der Validierungsparameter

Unter der Richtigkeit wird die Abweichung eines gemessenen Wertes vom wahren Wert verstanden [122]. Als wahrer Wert wurde der durch die linearen Gleichungen berechnete Wert bei gegebener, basaler Schlagfrequenz angenommen. Es wurde der berechnete und gemessene Wert verglichen und die Richtigkeit berechnet. Der Schlagfrequenz-Assay verfügt für 17,18-EEQ als auch für C4 über eine sehr hohe Richtigkeit. Da die Spezifität eine Voraussetzung für Richtigkeit ist, kann der Schlagfrequenz-Assay als spezifisch angesehen werden [140].

Die Präzision gibt die Streuung zwischen einer Reihe von Messungen an. Es wird die Intra-Assay-Präzision, also die Streuung der Messwerte innerhalb einer Zellpräparation unter Verwendung der gleichen Prüflösung und die Inter-Assay-Präzision, also die Streuung der Messwerte zwischen mehreren Zellpräparationen unter Verwendung der gleichen Prüflösung, unterschieden [138]. Die Messwerte streuen innerhalb als auch zwischen den Präparationen stark und verfügen somit über eine sehr geringe Intra- und Inter-Assay-Präzision. Der hohen Streuung der Messwerte kann nur durch einen hohen Stichprobenumfang jeder Messung begegnet werden.

Die Linearität des Arbeitsbereichs ist der Konzentrationsbereich bei dem der negativ chronotrope Effekt direkt proportional zur Konzentration von 17,18-EEQ oder C4 ist [138]. Der lineare Arbeitsbereich kann nur indirekt aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 17,18-EEQ und C4 abgeleitet werden (Abbildung 21), und liegt für 17,18-EEQ zwischen 1-100 nM und für C4 zwischen 0,1-10 nM.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die betrachtete Strichprobe repräsentativ für die Messwerte des Schlagfrequenz-Assays ist und somit die abgeleiteten Validitätskriterien angewendet werden können.

Bedeutung der Kinetik des negativ chronotropen Effekts

Neben diesen Kriterien der Methodvalidierung muss in diesem speziellen Fall die Kinetik des negativ chronotropen Effekts berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt von niedrigen Konzentrationen von 17,18-EEQ und C4 (20 oder 30 nM) zu einer zeitlich begrenzten und hohe Konzentrationen (1 μ M) zu einer deutlichen Verlängerung der Effektdauer führten (Abbildung 11 & Abbildung 12). Die genauere Untersuchung zeigte, dass dieser Zeitverlauf des Effekts durch die Überlagerung mit der Bindung von 17,18-EEQ und C4 an Albumin erklärt werden kann (Abbildung 13). Die Aktivierung der zellulären Zielstruktur von 17,18-EEQ und C4 ist im Verlauf zur Bindung an Albumin der schnellere Prozess, wodurch es zu einer vollen Ausprägung des negativ chronotropen Effekts kommt. Nach ~6 min wird dies jedoch von der Albumin-Bindungskinetik überlagert. Die Bindung von 17,18-EEQ oder C4 an Albumin entzieht der zellulären Zielstruktur den Liganden, wodurch die Effektstärke sinkt, bis die minimale Konzentration für einen Effekt unterschritten wird und die Zellen zu den basalen Schlagfrequenzen zurückkehrt. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass der optimale Zeitpunkt für eine Einpunktmessung für jedes Eicosanoid/Analog bestimmt werden muss, und die Messungen mit 17,18-EEQ und C4 nach 6 bzw. 8 min erfolgen müssen.

Abschließende Betrachtung der Assay-Validierung

In der Gesamtbetrachtung der erhobenen Daten zur Validierung des Schlagfrequenz-Assays zeigt sich, dass der Assay trotz der Abhängigkeit des negativ chronotropen Effekts von drei Variablen - der basalen Schlagfrequenz, dem Zeitpunkt der Messung sowie der Compound-Konzentration - über eine hohe Genauigkeit verfügt und somit zur Untersuchung des kardioprotektiven und antiarrhythmischen Wirkmechanismus der Omega-3-Fettsäuren eingesetzt werden kann. Die Festlegung des Messzeitpunktes und die Überprüfung der festgelegten Validitätskriterien vor jeder Messung kann die Qualität, unter Berücksichtigung der notwendigen, hohen Sichtprobenzahl, sicherstellen.

Neben dieser formalen Betrachtung der Daten zeigt sich die biologische Bedeutung des Surrogatmarkers ‚negativ chronotroper Effekt‘, betrachtet man die Wirkung von 17,18-EEQ oder C4 in diesem Assay im Vergleich zu Ethanol. Dieses bedeutsamste Kriterium wird durch die linearen Gleichungen, die den Validitätskriterien zugrunde liegen,

abgebildet (Abbildung 17). Die Grenzen von Ethanol und 17,18-EEQ oder C4 überschneiden sich in keinem Bereich der festgelegten basalen Schlagfrequenz. Somit ist der negativ chronotrope Effekt spezifisch für die Wirkung von 17,18-EEQ und C4 und erlaubt die Verwendung des Schlagfrequenz-Assays für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus von 17,18-EEQ und C4.

4.2 Die Umwandlung von Omega-3-Fettsäuren in deren CYP-Epoxyeicosanoide ist notwendig

In der Literatur über Omega-3-Fettsäuren und deren korrespondierende CYP-Epoxyeicosanoide wird häufig ausschließlich die Wirkung der Fettsäuren oder deren Metabolite nachgewiesen (Abschnitt 1). Es ist außerdem belegt, dass die gezielte Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren zu einem Anstieg der CYP-Epoxyeicosanoide im Blut [141] und Geweben [81] führt. Die Frage, ob die Omega-3-Fettsäuren selbst oder die gebildeten CYP-Epoxyeicosanoide für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, bleibt jedoch unbeantwortet. Dieser Frage widmet sich diese Arbeit in diesem Abschnitt mit der Hypothese, dass nicht die Omega-3-Fettsäuren selbst, sondern die korrespondierenden CYP-Epoxyeicosanoide für den kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekt verantwortlich sind.

Für die Hydroxylierung und Epoxygenierung von PUFAs sind unterschiedliche CYP-Isoformen verantwortlich, welche gewebespezifisch exprimiert werden. Die CYP-Epoxygenase des menschlichen Herzens ist CYP2J2 und die des Rattenherzens CYP2J3 und CYP2C11. PUFAs können theoretisch an jeder Doppelbindung epoxygeniert werden. Die CYP-Epoxygenasen setzen jedoch die verschiedenen PUFAs unterschiedlich um und verfügen dabei über eine Regiospezifität, wodurch bevorzugt 17,18-EEQ aus EPA und 19,20-EDP aus DHA gebildet wird [142-144].

17,18-EEQ und 19,20-EDP verursachen den negativ chronotropen Effekt

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, werden CYP2J3 und CYP2C11 in den NRKM in Abhängigkeit von der Kulturdauer exprimiert (Abbildung 19). Die Inkubation der NRKM mit einer deuterierten Form von EPA und DHA führte zur Bildung aller Epoxy-Regioisomere, wobei 17,18-EEQ und 19,20-EDP die Hauptmetaboliten darstellen. Die Bildung der CYP-Epoxyeicosanoide konnte, wenn auch nicht vollständig, aber dennoch signifikant durch MS-PPOH inhibiert werden (Abbildung 18). Diese

Ergebnisse beweisen, dass die NRKM durch ihr endogenes CYP-Epoxygenase-System in der Lage sind, aus EPA und DHA 17,18-EEQ und 19,20-EDP zu bilden. Die Behandlung der NRKM mit EPA und DHA sowie der gebildeten Hauptmetaboliten 17,18-EEQ und 19,20-EDP haben nachweislich einen negativ chronotropen Effekt auf die Zellen. Die Reduktion der Schlagfrequenz durch EPA und DHA setzt allerdings deutlich verzögert ein und es wurden im Vergleich zu 17,18-EEQ und 19,20-EDP deutlich höhere Konzentrationen benötigt (Abbildung 20 & Abbildung 23). Die Bestimmung der EC₅₀-Werte bestätigt die Notwendigkeit höherer Konzentrationen von EPA und DHA. Der EC₅₀-Wert von 17,18-EEQ ist 196-fach kleiner als der von EPA und der von 19,20-EDP sogar 18446-fach kleiner als der von DHA (Abbildung 20 & Abbildung 23). Der höhere EC₅₀-Wert und der verzögerte Effekt von EPA und DHA im Vergleich zu 17,18-EEQ und 19,20-EDP deuten darauf hin, dass EPA und DHA zunächst metabolisiert werden müssen, bevor sie negativ chronotrop wirken können. Diese Vermutung wird gestützt von den Ergebnissen, dass der negativ chronotrope Effekt von EPA und DHA in Gegenwart von MS-PPOH verhindert werden kann, wohingegen der Effekt von 17,18-EEQ und 19,20-EDP durch MS-PPOH nicht beeinflusst wird (Abbildung 22, Abbildung 25 & Abbildung 43).

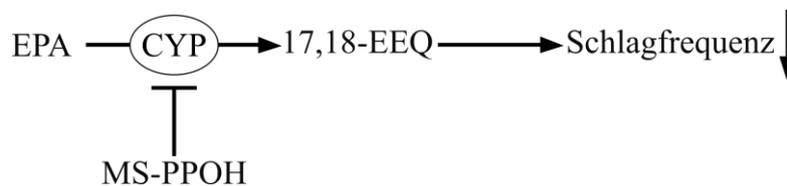


Abbildung 43: MS-PPOH inhibiert die CYP-Epoxygenasen

Dargestellt ist die CYP-abhängige Epoxygenierung von EPA zu 17,18-EEQ, welches anschließend in der Lage ist, die Schlagfrequenz der NRKMs zu senken. Der Zusammenhang von DHA und 19,20-EDP ist adäquat. Übernommen und modifiziert nach [74].

Des Weiteren verfügt das stabile Analogon C4 in Bezug auf den Zeitpunkt, das Ausmaß des negativ chronotropen Effekts und den EC₅₀-Wert über vergleichbare oder sogar bessere Ergebnisse als 17,18-EEQ. Die chemischen Modifikationen die zur metabolischen Stabilisierung von 17,18-EEQ notwendig waren, führten mit C4 zu einem mindestens gleichwertigen, wenn nicht sogar potenteren Analogon.

19,20-EDP ist ein hoch potentes Epoxyeicosanoid

Als bemerkenswert muss die Wirksamkeit von 19,20-EDP angesehen werden. Nicht nur der EC₅₀-Wert ist um den Faktor 1161 kleiner als der von 17,18-EEQ, sondern auch der maximal negativ chronotrope Effekt ist bedeutend größer (Abbildung 24).

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, ist die Stärke des Effekts im Schlagfrequenz-Assay sehr variabel, sodass trotz hoher n-Zahl bei den Messungen (≥ 16) der beobachtete, stärkere negativ chronotrope Effekt von 19,20-EDP auch auf die Variabilität zurückgeführt werden kann. Der deutlich niedrigere EC₅₀-Wert könnte auch Folge einer falschen Konzentration der Lösung (Cayman Chemicals, #10175) sein. Allerdings ist auch der EC₅₀-Wert von DHA niedriger als der von EPA, was darauf hindeutet, dass 19,20-EDP im Vergleich zu 17,18-EEQ tatsächlich das bioaktivere CYP-Epoxyeicosanoid ist.

Zusammenfassende Betrachtung

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die endogene Bildung der CYP-Epoxyeicosanoide 17,18-EEQ und 19,20-EDP im verwendeten Modell die Voraussetzung für den beobachteten negativ chronotropen Effekt war. Es ist zu vermuten, dass die Metabolite für die kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung der Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA verantwortlich sind. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, dass die Zugabe von DHA zu HL-1 Zellen in Gegenwart von MS-PPOH nicht vor dem LPS- oder Hypoxie/Reoxygenierungs-induziertem Verlust der Mitochondrien-Funktion und Vitalität schützen konnte [96, 97].

Das stabile Analogon C4 zeigt identische oder sogar bessere Effekte als 17,18-EEQ. Diese vielversprechenden Ergebnisse sind das erste Indiz, dass das Konzept der therapeutischen Nutzung von CYP-Epoxyeicosanoid-abgeleiteten Analoga mit kardioprotektiven und antiarrhythmischen Eigenschaften tatsächlich funktioniert.

4.3 C4 verfügt über die optimalen Eigenschaften eines wirksamen 17,18-EEQ Analogs

Die klinische Nutzung des kardioprotektive und antiarrhythmische Potenzial von Omega-3-Fettsäure abgeleiteten CYP-Epoxyeicosanoiden stellt ein vielversprechendes neues Behandlungskonzept dar [12]. Voraussetzung der Nutzung ist die Überwindung der strukturellen Schwachstellen von CYP-Epoxyeicosanoiden. Die Struktur-Funktions-Analyse von 17,18-EEQ führte zur Entwicklung einer ersten

Generation von stabilen Analoga, welche vor allem durch die Eliminierung der nicht essenziellen Doppelbindungen und die Fixierung der Epoxid-Gruppe in R,S-Konformation gekennzeichnet ist. Die zweite Generation der Analoga waren Epoxid-Mimetika, die neben vielen Vorteilen vor allem gegen den Abbau durch die sEH geschützt sind. Das potenteste Analog dieser Generation war C21 (vgl. Abschnitt 1.4). Die Herausforderung an die dritte Generation an stabilen Analoga war die strukturelle Ähnlichkeit zu in Entwicklung befindlichen sEH Inhibitoren zu vermeiden, als auch die orale Bioverfügbarkeit und metabolischen Stabilität zu verbessern. Des Weiteren musste der Möglichkeit der Membraninkorporation und des Abbaus über die β -Oxidation begegnet werden [120].

Die Entwicklung der dritten Generation an stabilen 17,18-EEQ Analoga führte zu C4

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. Falck (UT Southwestern, Dallas, Texas, USA) konnte eine Vielzahl von Analoga entwickelt werden, die dann bei OMEICOS getestet wurden. Die β -Oxidation von Linolensäure und Lipoxin A₄ sowie die Membraninkorporation von EPA und DHA kann durch die Substitution des β -Kohlenstoffatoms durch ein Sauerstoff-Atom verhindert werden [145-147]. Dieses Konzept der 3-oxa-Verbindung wurde auf C21 übertragen. Die entstandene C4 verfügte über eine verbesserte Wasserlöslichkeit bei gleichbleibendem negativ chronotropen Effekt. Alle weiteren getesteten Analoga scheiterten durch eine verminderte biologische Aktivität, geringere metabolische Stabilität, höheren sEH Inhibition oder geringerer Wasserlöslichkeit (im Detail nachzulesen in [120]).

Die nähere Untersuchung von C4 zeigte eine biologische Aktivität im nanomolaren Bereich, eine hohe metabolische Stabilität und eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit, womit C4 alle Voraussetzungen eines klinischen Entwicklungskandidaten erfüllt. C4 ist ein Analog aus der Substanzbibliothek der Firma OMEICOS Therapeutics. Ein Analog hat bereits erfolgreich die klinische Phase I absolviert (EudraCT No.: 2016-003445-28). Der Beweis der biologischen Aktivität von C4 stand zu Beginn der Tätigkeiten für diese Arbeit noch aus.

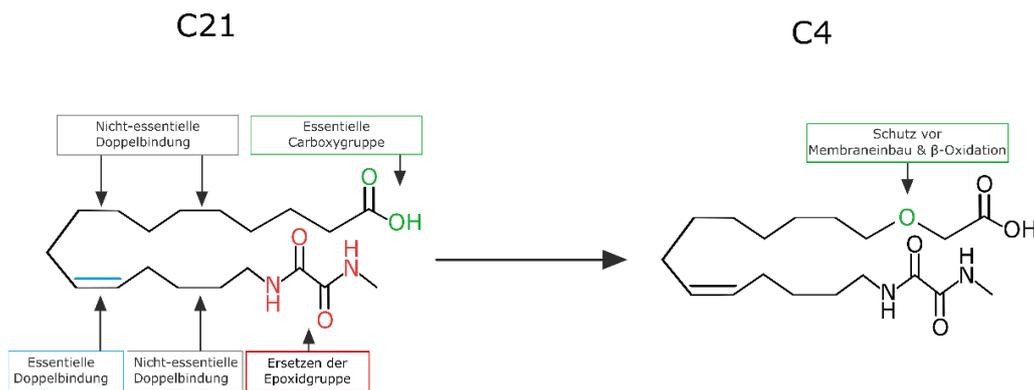


Abbildung 44: C4 ist eine Weiterentwicklung von C21

Dargestellt sind die strukturellen Modifikationen von C21 und C4. Übernommen und modifiziert nach [107].

4.4 17,18-EEQ und C4 aktivieren einen zellprotektiven Signalweg

Die kardioprotektive und antiarrhythmische Wirkung von EETs konnte in einer Vielzahl von *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Modellen nachgewiesen werden. Es wird mehrheitlich davon ausgegangen, dass es für die CYP-Epoxyeicosanoide eine noch unbekannte zelluläre Zielstruktur gibt, von der aus ein intrazellulärer Signalweg aktiviert wird. Es wird die Beteiligung des PI3K/AKT- und ERK1/2-Signalwegs diskutiert. [82-84, 86-90, 98, 99, 132, 148]. Es ist allerdings unklar, ob dieser von den EETs ausgelöste Signalweg, auch durch das CYP-Epoxyeicosanoid 17,18-EEQ ausgelöst werden kann [77]. In diesem Abschnitt der Arbeit soll die Hypothese diskutiert werden, ob 17,18-EEQ sowie das stabile Analog C4 tatsächlich einen kardioprotektiven und antiarrhythmischen Signalweg aktivieren. Des Weiteren sollen weitere mögliche Komponenten des Signalwegs und die zelluläre Zielstruktur diskutiert werden.

4.4.1 Die zelluläre Zielstruktur von 17,18-EEQ und C4 bleibt unbekannt

Die Identifizierung der zellulären Zielstrukturen der CYP-Epoxyeicosanoide ist eine langjährige Aufgabe auf dem Gebiet der Eicosanoidforschung. Für das AA abgeleitete CYP-Hydroxid 20-HETE konnte der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 75 (*G-protein coupled receptor*, GPCR) identifiziert werden [149]. GPR40 und GPR132 werden im Zusammenhang mit den AA-abgeleiteten CYP-Epoxyeicosanoiden 11,12-EET und 14,15-EET diskutiert [150, 151]. Als möglicher Rezeptor von 14,15-EET konnte ein 47 kDa großes Protein identifiziert werden, dessen Identität nicht abschließend aufgeklärt werden konnte [152]. Es ist strittig, ob der Effekt von EETs durch Beteiligung eines

Gas-gekoppelten oder Gai-gekoppelten Rezeptors vermittelt wird [153, 154]. Auch ein Screening-Ansatz mit 105 überexprimierten GPCRs führte nicht zur Identifizierung des zellulären Zielmoleküls [155]. Für EPA- oder DHA-abgeleitete CYP-Epoxyeicosanoide fehlt die Evidenz eines Rezeptors noch gänzlich.

Der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ und C4 konnte nur durch die Inhibition des Gai-Proteins, nicht aber des Gas-Proteins blockiert werden (Abbildung 26). Die Beteiligung eines GPCRs wird durch die Notwendigkeit der Filamin A-Kopplung unterstützt (Abbildung 27 & Abbildung 28). Filamin A ist ein Aktin-vernetzendes und biochemisches Signalübertragungsmolekül, welches mit einer Vielzahl von GPCRs interagiert und für deren Funktion obligatorisch ist [128]. Ebenfalls für ein GPCR-Abhängigkeit spricht der EC_{50} von 17,18-EEQ in nanomolaren Bereich (Abbildung 21) als auch die strikten Anforderungen an die Struktur der Analoga [107, 120].

Trotz dieser Ergebnisse und einer Vielzahl in dieser Arbeit nicht dargestellter Experimente zur Identifizierung eines GPCRs konnte kein Rezeptor für 17,18-EEQ oder C4 identifiziert werden. Neben der direkten Aktivierung eines GPCRs durch 17,18-EEQ oder C4 ist auch die intrazelluläre Beeinflussung eines GPCR-abhängigen Signalwegs eine mögliche Erklärung für die dargestellten Ergebnisse zur Wirkung dieser Substanzen.

4.4.2 Der kardioprotektive Effekt von 17,18-EEQ und C4 wird über den PI3K/AKT/eNOS/PKG-Signalweg vermittelt

Der Effekt der ischämischen Präkonditionierung wird von Signalwegen vermittelt, welche das Überleben der Zellen sichern, wobei die Beteiligung einer Vielzahl von Proteinkinasen, wie der PKC, PKG und PKA, Mitgliedern der MAPK-Familie (ERK1/2, p38, JNK und BMK1), der PI3K/AKT-Kaskade und der JAK-STAT-Weg diskutiert wird [100]. Im Zusammenhang mit EETs wurde in einem transgenen CYP2J2 Mausmodell gezeigt, dass es postischämisch zu einem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung kommt, allerdings ist die Aktivierung des Signalwegs nicht einheitlich bewiesen [86, 100]. Im Hypoxie/Reoxygenierungs-Modell (H/R) mit HL-1 Zellen und NRKM konnte der EET-abhängige Anstieg der AKT-Phosphorylierung gezeigt werden [148].

17,18-EEQ und C4 aktivieren den PI3K/AKT-Signalweg

In einem initialen Schritt wurde der Einfluss von 17,18-EEQ und C4 auf die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 untersucht. Eine Veränderung der

Phosphorylierung von ERK1/2 durch 17,18-EEQ oder C4 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), wohingegen die Phosphorylierung von AKT tendenziell oder, im Fall von C4, sogar signifikant erhöht wurde (Abbildung 31). Für C4 konnte sogar eine zeitabhängige Phosphorylierung am Serin 473 gezeigt werden (Abbildung 32). Die Aktivierung der PI3K durch 17,18-EEQ und C4 konnte sowohl durch die Inhibition mit Wortmannin im Schlagfrequenz-Assay als auch durch die Bestimmung der PI3K-Aktivität in Lysaten bestätigt werden (Abbildung 29 & Abbildung 30). Diese Ergebnisse belegen erstmalig die 17,18-EEQ- und C4-abhängige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs.

eNOS und PKG wird durch 17,18-EEQ und C4 aktiviert

Im Signalweg der ischämischen Präkonditionierung folgt auf die Aktivierung von PI3K/AKT die Aktivierung von eNOS unter Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), was über die Aktivierung der Guanylatcyclasen (GC) unter Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zur Aktivierung der PKG führt [100]. Aus diesem Grund wurden systematisch die jeweiligen Enzyme im beschriebenen Signalweg genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ und C4 durch Inhibition der NO-Synthase blockiert werden konnte. Darüber hinaus wurde die Phosphorylierung der eNOS durch C4 signifikant und durch 17,18-EEQ tendenziell erhöht (Abbildung 33 & Abbildung 34). Unter Verwendung des cGMP-Analogons Rp-cGMP, welches hoch spezifisch die Aktivierung von PKG inhibiert, wurde der negativ chronotrope Effekt von 17,18-EEQ und C4 ebenfalls blockiert (Abbildung 35). Der aus der Literatur zur ischämischen Präkonditionierung bekannte PI3K/AKT/eNOS/PKG-Signalweg konnte somit für 17,18-EEQ und C4 bestätigt werden.

PKA ist nicht am Effekt von 17,18-EEQ und C4 beteiligt

Neben der Beteiligung von PKG wird in der Literatur ebenfalls die Aktivierung von PKA im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung diskutiert [100]. PKA ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Kontraktilität und des Ca²⁺-Handlings in den Kardiomyozyten spielt [156]. Zur Überprüfung der Beteiligung der PKA am Effekt von 17,18-EEQ und C4 wurde im Schlagfrequenz-Assay das spezifische cAMP-Analogon Rp-cAMPS verwendet, welches den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 jedoch nicht messbar

beeinflusste (Abbildung 35). Dies deckt sich mit dem Ergebnis, dass die Inhibition des $G_{\alpha s}$ -Proteins, und damit die Inhibition des Adenylylcyclasen-abhängigen cAMP-Anstiegs, keinen Einfluss auf den negativ chronotropen Effekt von 17,18-EEQ und C4 hatte. Aus der Literatur ist bekannt, dass EETs in Endothelzellen zu einem cAMP Anstieg und somit zur Aktivierung der PKA führen [157]. Der Schutz von EETs gegenüber eines I/R-Schadens des Herzens ist ein Zusammenspiel aus der Verringerung der Apoptose von Kardiomyozyten, einer antiinflammatorischen Wirkung und einer Vasodilatation der Koronargefäße [132]. Diese Betrachtung lässt die Vermutung zu, dass der EET-Effekt zelltypspezifisch und PKA- oder PKG-abhängig verlaufen könnte. In Patch-Clamp Studien an Kaninchen-Kardiomyozyten konnte die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle in Abhängigkeit von PKG, aber nicht von PKA, nachgewiesen werden [158]. An isolierten Mitochondrien des Herzens, der Leber und des Gehirns von Ratten wurde außerdem die PKG-abhängige Öffnung des $mitoK_{ATP}$ -Kanals gezeigt. [159]. Der Effekt der ischämischen Präkonditionierung kann durch Bradykinin oder Acetylcholin nachgeahmt werden und wurde für den Nachweis der PKG-Aktivierung in Kaninchen-Kardiomyozyten verwendet [160, 161].

Auch PKC wird durch 17,18-EEQ und C4 aktiviert

Des Weiteren kann die Aktivierung der PKG zur Aktivierung der PKC führen, welche im Kontext der ischämischen Präkonditionierung ebenfalls häufig beschrieben wird [100]. In Patch-Clamp Studien mit humanen und Kaninchen-Kardiomyozyten konnte die PKC-abhängige Aktivierung des $sarcK_{ATP}$ -Kanals nachgewiesen werden [162]. Zudem wurde gezeigt, dass embryonale Hühner-Kardiomyozyten in Hypoxie/Reoxygenierungs-Experimenten durch die PKC-abhängige $mitoK_{ATP}$ -Kanal Öffnung besser vor dem Zelltod geschützt waren. Dieser Effekt wird in Zusammenhang mit der reduzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) während der Reoxygenierung gebracht [163]. An isolierten Rattenherzen konnte außerdem eine PKC-abhängige Reduktion der Ischämie-bedingten, intrazellulären pH-Wert Senkung beobachtet werden. Dieser Prozess soll über die Aktivierung des Natrium/Protonen-Austauschers vermittelt werden [164]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Schlagfrequenz-Assay, durch die Verwendung des Inhibitors Calphostin C, die Beteiligung der PKC am Effekt von 17,18-EEQ und C4 nachwiesen werden (Abbildung 36).

Zusammenfassende Betrachtung

Folglich lässt sich festhalten, dass der kardioprotektive Effekt von 17,18-EEQ sowie des stabilen Analogons C4 sehr wahrscheinlich über den PI3K/AKT/eNOS-Signalweg der ischämischen Präkonditionierung vermittelt wird und dabei von der Aktivierung eines bisher unbekanntes G α i- und Filamin A-gekoppelten Rezeptors abhängig ist.

4.5 Der kardioprotektive und antiarrhythmische Effekt von C4 resultiert aus der Modulation der intrazellulären Ionenhomöostase

Vermutlich ist die Aktivierung der PKG und PKC entscheidend für die Vermittlung des kardioprotektiven und antiarrhythmischen Effekts der CYP-Epoxyeicosanoide [100]. In diesem Abschnitt sollen die PKG- und PKC-vermittelten Effekte auf die intrazelluläre Ionenhomöostase diskutiert werden.

4.5.1 C4 aktiviert die sarcK_{ATP}- und mitoK_{ATP}-Kanäle

Der kardioprotektive Effekt der CYP-Epoxyeicosanoide bei der ischämischen Präkonditionierung wird vermutlich final durch die Aktivierung der sarcK_{ATP}- und mitoK_{ATP}-Kanäle hervorgerufen [12].

Die Wirkung von C4 ist vom sarcK_{ATP}-Kanal abhängig

Der sarcK_{ATP}-Kanal ist aus zwei verschiedenen Proteinen aufgebaut, der Porenuntereinheit des einwärts gerichteten Kaliumkanals (Kir) und des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR). Während der Ischämie wird der Kanal auf Grund der Abnahme der zytosolischen ATP-Konzentration aktiviert, was zu einem Ausstrom von K⁺-Ionen führt. Dies hat zur Folge, dass das kardiale Aktionspotenzial verkürzt und die intrazelluläre Ca²⁺-Akkumulation (Ca²⁺-Overload) reduziert wird [165, 166]. Neben einer Vielzahl von pharmakologischen Studien ist das Ausbleiben des protektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung in einem Kir6.2 defizienten Mausmodell der wichtigste Beleg für die Bedeutung des sarcK_{ATP}-Kanals [167]. In Patch-Clamp Studien an Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass EETs potente Aktivatoren für den sarcK_{ATP}-Kanal sind, indem sie die Empfindlichkeit des Kanals gegenüber ATP senken [162, 168, 169]. Zur Überprüfung der Beteiligung des sarcK_{ATP}-Kanals am kardioprotektiven Effekt von C4 wurde der spezifische Inhibitor HMR 1098 im Schlagfrequenz-Assay eingesetzt. Es zeigte sich, dass der negativ chronotrope Effekt von

C4 in Gegenwart von HMR 1098 blockiert wurde (Abbildung 37). Der Wirkmechanismus von C4 deckt sich daher mit dem beschriebenen Wirkmechanismus der EETs.

Der mitoK_{ATP}-Kanal ist vermutlich am Wirkungsmechanismus von C4 beteiligt

Im Vergleich zum sarcK_{ATP}-Kanal ist der genaue Aufbau des mitoK_{ATP}-Kanal nicht bekannt. Es wird von einem Multiproteinkomplex ausgegangen, zu dem auch der Adenin-Nukleotid-Transporter und die Succinat-Dehydrogenase gehören [170]. Die Öffnung des Kanals erfolgt vermutlich erst während der Reperfusion und führt zur teilweisen Depolarisation der intramitochondrialen Membran, zu einer vorübergehenden Schwellung des intramitochondrialen Raums, zur Verbesserung der mitochondrialen Elektronentransportkette, zur Reduktion des mitochondrialen Ca²⁺-Overloads und zu einer Reduktion der ROS-Bildung [165, 166, 171]. Die vermehrte Bildung von EETs, im Falle der Überexpression von CYP2J2 im Mausherzen, sowie die direkte Gabe von 11,12-EET führen zu einer Reduktion des I/R-Schadens des Herzens. Dieser Effekt kann durch die Verwendung des mitoK_{ATP}-Kanal Inhibitors 5-HD aufgehoben werden. Zusätzlich erhöhte die CYP2J2 Überexpression als auch die Gabe von 11,12-EET die Flavoprotein-Fluoreszenz in den Kardiomyozyten, ein bekannter Marker für den mitochondrialen Redox-Status [86]. Die Verwendung des spezifischen mitoK_{ATP}-Kanal Inhibitors 5-HD führte auch zum Verlust des negativ chronotropen Effekts von C4 im Schlagfrequenz-Assay, wodurch die Beteiligung des mitoK_{ATP}-Kanals am Wirkmechanismus von C4 zu vermuten ist.

4.5.2 C4 führt vermutlich zu einer Hyperpolarisation

Von EETs, aber auch von 17,18-EEQ und 19,20-EEQ, ist bekannt, dass sie über die Aktivierung des BK_{Ca} zu einer Hyperpolarisation und somit zur Vasodilatation von Arterien führen [78, 172-177]. Eine EET-abhängige Hyperpolarisation konnte auch an Kardiomyozyten nachgewiesen werden [168, 169]. Zur Überprüfung des Einflusses von C4 auf das Membranpotenzial wurden die NRKM elektrisch stimuliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die mit C4 behandelten Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten Kontrollzellen eine signifikant höhere Spannung benötigten, um einer vorgegeben Stimulationsfrequenz folgen zu können, ohne dass es dabei zu einem signifikanten Anstieg der Refraktärzeit gekommen ist (Abbildung 38). Die Erhöhung der notwendigen Spannung, um ein Aktionspotenzial und damit eine Kontraktion auszulösen, hängt direkt mit dem Ruhemembranpotenzial der Zelle zusammen [178]. Auch wenn die

direkte Messung des Einflusses von C4 auf das Membranpotenzial fehlt, liegt auf Grundlage der generierten Daten die Vermutung nahe, dass die Behandlung mit C4 zu einer Hyperpolarisation der NRKM führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der nachgewiesenen, hyperpolarisierenden Wirkung von EPA und DHA an Kardiomyozyten [49, 179]. Diese Hyperpolarisation ist vermutlich die entscheidende Veränderung, durch die der negativ chronotrope Effekt der Epoxyeicosanoide sowie von C4 im Schlagfrequenz-Assay erklärt werden kann. Um ein niedrigeres Ruhemembranpotenzial bis zum Schwellenwert für das Aktionspotenzial zu depolarisieren, ist bei gleicher Anzahl an verfügbaren Na^+ -Kanälen ein länger andauernder Na^+ -Ionenstrom notwendig. Diese verlängerte Depolarisationsphase mündet anschließend in einer Reduktion der Schlagfrequenz des Kardiomyozyten, ohne dabei Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit der Zelle selbst zu nehmen. Studien mit EPA und DHA an Kardiomyozyten konnten die partielle Inhibition des einwärts gerichteten spannungsabhängigen Ca^{2+} - (I_{CaL}) und Na^+ -Stroms (I_{Na}) sowie einen Effekt auf die auswärts gerichteten K^+ -Ströme (I_{to} und I_{Kur}) nachweisen, was in der Summe die Ursache für die Hyperpolarisation sein kann [50, 180-184]. Die Hyperpolarisation durch C4 scheint somit ähnlich wie bei EPA und DHA auf einer vielfältigen Modulation der Ionenströme zu basieren, wobei für alle Moleküle die ursächliche Modulation offenbleibt.

Während der Ischämie kommt es zu einer Anhebung des Ruhemembranpotenzials in Richtung des Schwellenwerts, wodurch bereits ein geringer Depolarisationsstimulus außerhalb der autogenen Erregung des Herzens ausreicht, um ein Aktionspotenzial und somit eine Arrhythmie auszulösen. Es wird daher vermutet, dass die antiarrhythmische Wirkung von EPA und DHA auf die Hyperpolarisation zurückzuführen ist, wobei in diesem Zusammenhang eher von einer Verschiebung in Richtung des physiologischen Ruhepotenzial gesprochen werden muss [50]. Da C4 ebenfalls zu einer Hyperpolarisation der Kardiomyozyten führt, ist eine antiarrhythmische Wirkung zu erwarten.

4.5.3 C4 führt zu einer Modulation des Ca^{2+} -Handlings

Nicht nur die Depolarisation des Ruhemembranpotenzials, sondern auch das Auftreten eines intrazellulären Ca^{2+} -Overload ist maßgeblich an der Entstehung von Arrhythmien, wie dem Vorhofflimmern oder ventrikulären Tachyarrhythmien, wie sie bei Patienten mit Herzinsuffizienz auftreten, beteiligt [50, 109, 185, 186]. Herzinsuffizienz wird als pathologische Veränderung der Herzstruktur- oder -funktion definiert, die dazu führt, dass das Herz den Stoffwechselbedarf des Körpers nicht mehr decken kann [109]. Im

Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es zu irreversiblen strukturellen und elektrophysiologischen Veränderungen des Herzmuskels. In einem Mausmodell zur maladaptiven Herzhypertrophie durch chronische Drucküberlastung oder β -adrenerge Stimulation konnte gezeigt werden, dass transgene CYP2J2 Mäusen signifikant weniger anfällig für ventrikuläre Tachyarrhythmien und Vorhofflimmern waren [89]. Auch bei der pharmakologischen und genetischen Unterdrückung des sEH-vermittelten, endogenen CYP-Epoxyeicosanoid-Abbaus konnte eine geringere Anfälligkeit für Arrhythmien bei maladaptiver Herzhypertrophie gezeigt werden [88, 90]. In Fütterungsstudien mit Omega-3-Fettsäuren an Ratten und Affen konnte zudem ein antiarrhythmischer Effekt nachgewiesen werden [179, 187].

C4 reduziert die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude

Studien an NRKM haben zeigen können, dass EPA und DHA nicht nur die Schlagfrequenz der Zellen reduzieren, sondern die Zellen auch vor Ca^{2+} -Overload schützen [39, 50, 93]. Die Verringerung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude in NRKM durch die Behandlung mit 17,18-EEQ wurde in der Literatur bereits beschrieben [95]. Die Behandlung der NRKM mit C4 führt nicht nur zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude, sondern auch zu einer Reduktion der diastolischen und systolischen Ca^{2+} -Konzentration bei gleichbleibender Dauer des Ca^{2+} -Transienten und bei unveränderter Kontraktionslänge der Kardiomyozyten. Des Weiteren wurde der Ca^{2+} -Gehalt im SR reduziert (Abbildung 39 & Abbildung 40). Diese Daten belegen einen vielschichtigen Einfluss von C4 auf das Ca^{2+} -Handling und stehen im Einklang mit den publizierten Ergebnissen zu EPA, DHA und 17,18-EEQ [50, 95]. Die bei EETs beobachtete Verkürzung des kardialen Aktionspotenzials müsste sich in einem verkürzten Ca^{2+} -Transienten widerspiegeln. Da dieser in den eigenen Messungen zeitlich unverändert verläuft, konnte in diesem Modell die Verkürzung des kardialen Aktionspotenzials nicht nachgewiesen werden. Eine reduzierte Ca^{2+} -Transienten-Amplitude kann durch einen reduzierten Ca^{2+} -Strom vom LTCC oder durch eine reduzierte Ca^{2+} -Beladung des SR verursacht werden [188, 189]. EPA und DHA reduzierten die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude über die Hemmung des LTCC-abhängigen Ca^{2+} -Stroms [190, 191]. Die Reduktion der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude durch C4 wird vermutlich ebenfalls durch die Hemmung der LTCC-Aktivität verursacht. Die Reduktion der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie die Reduktion der Ca^{2+} -Beladung des SRs durch C4 würden direkt gegen pathologische Ca^{2+} -Overload

Situationen wirken und somit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Arrhythmien verringern. [109, 110].

4.5.4 C4 führt zu einer erhöhten SERCA- aber nicht zu einer veränderten RyR2-Aktivität

Der größte Anteil der Ca^{2+} -Freisetzung während eines kardialen Aktionspotenzials erfolgt durch RyR2 aus dem SR. Die spontane RyR2-abhängige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR ist mit dem Auftreten von Arrhythmien eng verknüpft [109]. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Phosphorylierung von RyR2 an Serin 2808 (S2808), vermittelt durch PKA, und an Serin 2814 (S2814), vermittelt durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), mit einer Erhöhung des Auftretens von Arrhythmien verbunden ist [109]. Im Versuch modulierte C4 die Phosphorylierung von RyR2 an S2808 oder S2814 im Vergleich zu DMSO jedoch nicht. Auch die Inhibition von PKA und PKG führte zu keiner Veränderung der Phosphorylierung (Abbildung 42). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Versuch zur Inhibition von PKA und PKG im Schlagfrequenz-Assay, bei dem die Inhibition von PKG aber nicht von PKA zu einer Blockierung des negativ chronotropen Effekts von C4 führte (Abbildung 35). Der Einfluss von C4 auf CaMKII wurde in einer akademischen Kooperation mit Prof. Dr. El-Armouche der TU Dresden überprüft. In den noch unveröffentlichten Daten konnte kein Einfluss von C4 auf die CaMKII nachgewiesen werden. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit der unveränderten Phosphorylierung von RyR2 an S2814. Diese Ergebnisse machen eine proarrhythmische Wirkung von C4 über die RyR2 Phosphorylierung unwahrscheinlich. Ob C4 gegen den pathologischen Anstieg der Phosphorylierung von RyR2 wirken würde, müsste in einem geeigneten Modell untersucht werden.

C4 erhöht über die Phosphorylierung von PLN die SERCA Aktivität

In Studien mit Kardiomyozyten der Ratte konnte die erhöhte Phosphorylierung von PLN am Serin 16 durch EPA nachgewiesen werden [190]. Die Phosphorylierung von PLN verringert die Interaktion mit SERCA, was zu einem Anstieg der SERCA-Aktivität führt und so zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Beladung des SRs [110]. PLN kann an drei Stellen phosphoryliert werden: Serin 10 (S10) durch PKC, Serin 16 (S16) durch PKA oder PKG und Threonin 17 (T17) durch die CaMKII. [109].

Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von PLN erfolgte an den Positionen Serin 16 (S16) und Threonin 17 (T17). Zum Zeitpunkt der Untersuchung war kommerziell kein phosphorylierungsspezifischer Antikörper für Serin 10 (S10) verfügbar und somit konnte die PKC-abhängige PLN Phosphorylierung nicht untersucht werden. Die Behandlung der NRKM mit C4 führte im Vergleich zu DMSO nur für S16 zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von PLN. Die Steigerung der Phosphorylierung von PLN an S16 konnte durch Inhibition der PKA als auch der PKG inhibiert werden (Abbildung 41). Der fehlende, C4-abhängige Anstieg der T17 Phosphorylierung von PLN steht im Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen von Prof. Dr. El-Armouche der TU Dresden, nach der C4 keinen Effekt auf die CaMKII-Aktivität hat. Der PKG-abhängige Anstieg der S16 Phosphorylierung steht im Einklang mit der Blockierung des negativ chronotropen Effekts von C4 durch PKG-Inhibitoren (Abbildung 35). Dass die Inhibition der PKA ebenfalls die S16 Phosphorylierung inhibieren konnte, steht im Widerspruch zur Wirkungslosigkeit der Inhibition im Schlagfrequenz-Assay (Abbildung 35). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die Phosphorylierung von PLN an S16 nicht ausschlaggebend für den negativ chronotropen Effekt von C4 ist und die nachgewiesenen Veränderungen des Ca^{2+} -Transienten nicht maßgeblich auf eine erhöhte SERCA-Aktivität zurückzuführen sind. Diese Vermutung steht im Einklang mit der Reduktion der Ca^{2+} -Beladung des SRs, da aus einem Anstieg der SERCA-Aktivität eine erhöhte Ca^{2+} -Ionenbeladung des SRs resultieren müsste [189]. Dieser Zusammenhang macht eine antiarrhythmische Wirkung von C4 wahrscheinlich, da eine erhöhte SERCA-Aktivität in einer Überlastung der Ca^{2+} -Beladung des SRs führen kann, was eine Grundlage für Arrhythmie ist [109].

4.6 17,18-EEQ und C4 wirken über einen komplexen intrazellulären Regulationsmechanismus

Wie die vorangegangenen Abschnitte zeigen konnten, aktivieren 17,18-EEQ und C4 den schützenden PI3K/AKT/eNOS/PKG-Signalweg und entfalten ihre kardioprotektive Wirkung vermutlich über die Aktivierung der $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ - und $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle und ihre antiarrhythmische Wirkung vermutlich über die Hyperpolarisation der Kardiomyozyten sowie über die Modulation des Ca^{2+} -Handlings. Diese Zusammenhänge sind im Hypothesen-Schema der Abbildung 45 dargestellt. Alle Ergebnisse dieser Arbeit basieren ausschließlich auf einem zellulären Modell unter Verwendung eines Surrogatmarkers, dem negativ chronotropen Effekt. In noch unveröffentlichten Daten von Herrn Philipp

Westphal, welche er im Rahmen seiner Anstellung bei OMEICOS erzeugt hat, konnte die kardioprotektive Wirkung von C4 durch eine Verbesserung der postischämischen Funktion an isoliert, perfundierten Mausherzen gezeigt werden. Die antiarrhythmische Wirkung von C4 konnte von Frau Dr. Janine Lossie im Rahmen ihrer Anstellung bei OMEICOS durch eine verringerte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern bei Mäusen nach chronischer β -adrenerger Stimulation nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Diese *ex vivo* und *in vivo* Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit abgeleitete kardioprotektive und antiarrhythmischen Wirkung von C4 und verdeutlichen gleichzeitig das große klinische Potenzial, welches in der Entwicklung von stabilen CYP-Epoxyeicosanoide steckt. Wenn es zu einer erfolgreichen Übertragung dieser bedeutenden präklinischen Daten in die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen bei Menschen kommt, steht zukünftig ein völlig neuartiger Therapieansatz zur Verfügung, welcher auf der Aktivierung eines natürlichen Schutzmechanismus der kardialen Zellen beruht.

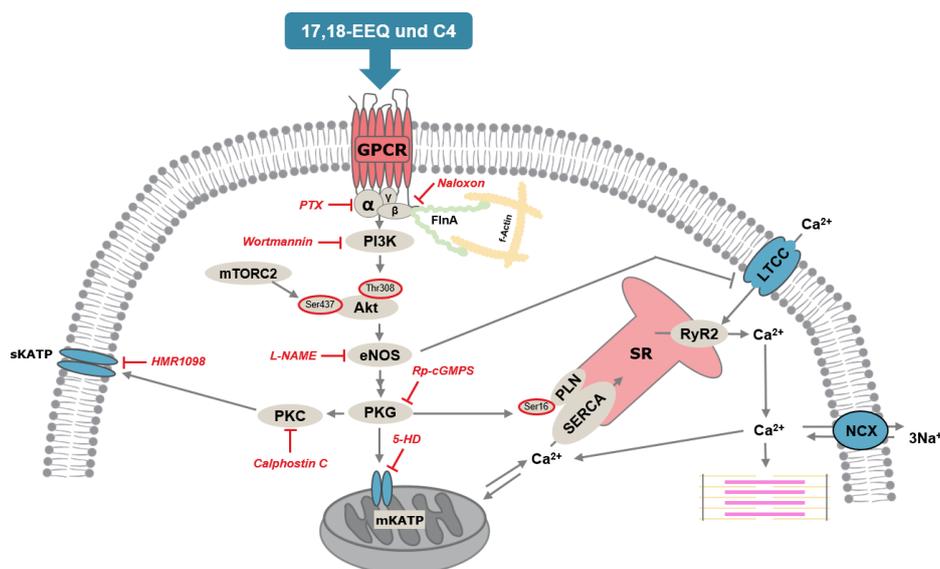


Abbildung 45: Der Wirkmechanismus von 17,18-EEQ und C4

In diesem Hypothesen-Schema sind die nachgewiesenen Elemente des Wirkmechanismus von 17,18-EEQ und C4 dargestellt. Der kardioprotektive Effekt von C4 wird vermutlich durch die Aktivierung der mitoKATP- und sarcKATP-Kanäle vermittelt. Die antiarrhythmische Wirkung von C4 resultiert vermutlich aus der Kombination der Hyperpolarisation der Kardiomyozyten und der Modulation des Ca^{2+} -Handlings. Das modifizierte Hypothesen-Schema wurde ursprünglich durch Herrn Dr. Wolf-Hagen Schunck und Frau Dr. Anne Konkel erstellt.

Ausblick

Das Potenzial der stabilen CYP-Epoxyeicosanoide Analoga als Therapeutika ist wohl vor allem bei der Behandlung von Erkrankungen zu heben, die sich durch eine reduzierte endogene Bildung von CYP-Epoxyeicosanoiden auszeichnen, wie zum Beispiel kardiovaskuläre und inflammatorische Erkrankungen (übernommen nach [12]):

- Koronare Herzerkrankungen [192-194]
- Akutes Nierenversagen [195]
- Endotheliale Dysfunktion [102, 196]
- Chronische Lungenerkrankungen [197, 198]

Es wird eine Vielzahl klinischer Studien benötigen, um das volle Potenzial dieses neuen Therapieansatzes - den endogenen Schutzmechanismus des menschlichen Körpers zu nutzen – in die medikamentöse Anwendung zu bringen. Mit der Substanzbibliothek von OMEICOS stehen erstmalig Moleküle zur Verfügung, mit denen es möglich ist, diese Studien durchzuführen. Bei der Entwicklung weiterer stabiler CYP-Epoxyeicosanoid-Analoga bietet 19,20-EDP, mit seinem überraschend niedrigen EC_{50} , einen weiteren möglichen und vielversprechenden Ansatz.

Für ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus wäre die Identifizierung der primären Zielstruktur der Epoxyeicosanoide ein Meilenstein, der zudem die Akzeptanz und Weiterentwicklung dieser Wirkstoffe vorbringen könnte. Die publizierten Ergebnisse deuten auf die Beteiligung eines GPCRs hin, auch wenn die bereits Jahrzehnte andauernden Bemühungen, diesen zu identifizieren, bisher noch nicht zum Erfolg geführt haben. Es ist denkbar, dass die CYP-Epoxyeicosanoide nicht direkt einen GPCR aktivieren, sondern einen GPCR-abhängigen Signalweg modulieren. Vor diesem Hintergrund wäre eine Fokussierung auf intrazelluläre Zielstrukturen sinnvoll.

Ein weiterer Baustein für den erfolgreichen Nachweis der kardioprotektiven Wirkung von C4 auf zellulärer Ebene wäre der Beleg der Aktivierung der sarcK_{ATP}- und mitoK_{ATP}-Kanäle, sowie die Verwendung der spezifischen Inhibitoren in *ex vivo* und *in vivo* Modellen. In Bezug auf den antiarrhythmischen Effekt von C4 wäre der Nachweis der Hyperpolarisation, die Messung der modulierten Ionenströme und abschließend die Identifizierung der beeinflussten Ionenkanäle ein entscheidender Schritt, um das Verständnis des Wirkmechanismus zu verbessern.

Im Bereich der inflammatorischen und metabolischen Erkrankungen konnte für 19,20-EDP die Inhibition des Inflammasoms und eine Verbesserung der mitochondrialen

Funktion gezeigt werden, welche vermutlich durch Sirtuin-abhängige Deacetylierung vermittelt wird [85, 86, 97]. Die Überprüfung, ob 17,18-EEQ und C4 ebenfalls in der Lage sind, diese Effekte hervorzurufen, könnte weitere aussichtsreiche Anwendungsgebiete im Bereich der chronischen, mitochondrialen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen eröffnen.

Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva, World Health Organization; 2018. 2017 10.02.2021]; Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GHE2016_Deaths_Global_2000_2016.xls?ua=1.
2. MD, P.D.L., MD, Prof. Ramachandran S. Vasan, MD, Prof. Thomas J. Wang, MD, *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. The Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999-1008.
3. Sinclair, H.M., *Prevention of coronary heart disease: the role of essential fatty acids*. Postgrad Med J, 1980. **56**(658): p. 579-84.
4. Bang, H.O., J. Dyerberg, and N. Hjoorne, *The composition of food consumed by Greenland Eskimos*. Acta Med Scand, 1976. **200**(1-2): p. 69-73.
5. Dyerberg, J., *Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns*. Arctic Med Res, 1989. **48**(2): p. 47-54.
6. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair, *The composition of the Eskimo food in north western Greenland*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(12): p. 2657-61.
7. Bang, H.O., J. Dyerberg, and A.B. Nielsen, *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos*. Lancet, 1971. **1**(7710): p. 1143-5.
8. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1467S-1476S.
9. Russo, G.L., *Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(6): p. 937-46.
10. Research, G.V., 2020.
11. Siscovick, D.S., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(15): p. e867-e884.
12. Schunck, W.H., et al., *Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases*. Pharmacol Ther, 2018. **183**: p. 177-204.
13. Lands, W.E., *Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1055**: p. 179-92.
14. von Schacky, C. and W.S. Harris, *Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 310-5.
15. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
16. Bhatt, D.L., et al., *REDUCE-IT USA: Results From the 3146 Patients Randomized in the United States*. Circulation, 2020. **141**(5): p. 367-375.
17. Calo, L., et al., *N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(10): p. 1723-8.

18. Nodari, S., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of atrial fibrillation recurrences after electrical cardioversion: a prospective, randomized study*. *Circulation*, 2011. **124**(10): p. 1100-6.
19. Virtanen, J.K., et al., *Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men*. *Circulation*, 2009. **120**(23): p. 2315-21.
20. Benedetto, U., et al., *n-3 Polyunsaturated fatty acids for the prevention of postoperative atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2013. **14**(2): p. 104-9.
21. Kwak, S.M., et al., *Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials*. *Arch Intern Med*, 2012. **172**(9): p. 686-94.
22. Rizos, E.C., et al., *Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis*. *JAMA*, 2012. **308**(10): p. 1024-33.
23. Aung, T., et al., *Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals*. *JAMA Cardiol*, 2018. **3**(3): p. 225-234.
24. Manson, J.E., et al., *Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer*. *N Engl J Med*, 2019. **380**(1): p. 23-32.
25. Harris, W.S., *The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1997S-2002S.
26. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(7): p. 585-94.
27. Kris-Etherton, P.M., et al., *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. *Circulation*, 2002. **106**(21): p. 2747-57.
28. Harris, W.S., *Expert opinion: omega-3 fatty acids and bleeding-cause for concern?* *Am J Cardiol*, 2007. **99**(6A): p. 44C-46C.
29. Rauch, B., et al., *OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction*. *Circulation*, 2010. **122**(21): p. 2152-9.
30. Mozaffarian, D., *Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1991S-6S.
31. Marchioli, R., et al., *Omega-3 fatty acids and heart failure*. *Current Atherosclerosis Reports*, 2009. **11**(6): p. 440.
32. Heydari, B., et al., *Effect of Omega-3 Acid Ethyl Esters on Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction: The OMEGA-REMODEL Randomized Clinical Trial*. *Circulation*, 2016. **134**(5): p. 378-91.
33. Calder, P.C. and P. Yaqoob, *Marine omega-3 fatty acids and coronary heart disease*. *Curr Opin Cardiol*, 2012. **27**(4): p. 412-9.
34. Harris, W.S., L. Del Gobbo, and N.L. Tintle, *The Omega-3 Index and relative risk for coronary heart disease mortality: Estimation from 10 cohort studies*. *Atherosclerosis*, 2017. **262**: p. 51-54.
35. Kumar, S., et al., *Long-term omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reduces the recurrence of persistent atrial fibrillation after electrical cardioversion*. *Heart Rhythm*, 2012. **9**(4): p. 483-91.
36. Martino, A., et al., *Omega 3 and atrial fibrillation: Where are we?* *World J Cardiol*, 2016. **8**(2): p. 114-9.

37. Cicero, A.F., S. Ertek, and C. Borghi, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: their potential role in blood pressure prevention and management*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009. **7**(3): p. 330-7.
38. Minihane, A.M., et al., *Consumption of Fish Oil Providing Amounts of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid That Can Be Obtained from the Diet Reduces Blood Pressure in Adults with Systolic Hypertension: A Retrospective Analysis*. *The Journal of Nutrition*, 2016. **146**(3): p. 516-523.
39. Kang, J.X. and A. Leaf, *Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(21): p. 9886-90.
40. Mozaffarian, D. and J.H. Wu, *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(20): p. 2047-67.
41. Mori, T.A. and L.J. Beilin, *Omega-3 fatty acids and inflammation*. *Curr Atheroscler Rep*, 2004. **6**(6): p. 461-7.
42. Thies, F., et al., *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2003. **361**(9356): p. 477-85.
43. DiNicolantonio, J.J. and J.H. O'Keefe, *The Benefits of Omega-3 Fats for Stabilizing and Remodeling Atherosclerosis*. *Mo Med*, 2020. **117**(1): p. 65-69.
44. Calder, P.C., *The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(7): p. 1073-80.
45. Robinson, J.G. and N.J. Stone, *Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(4A): p. 39i-49i.
46. Backes, J., et al., *The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia*. *Lipids Health Dis*, 2016. **15**(1): p. 118.
47. Karalis, D.G., *A Review of Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertriglyceridemia: A Focus on High Dose Omega-3 Fatty Acids*. *Adv Ther*, 2017. **34**(2): p. 300-323.
48. Colussi, G., et al., *Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017. **27**(3): p. 191-200.
49. Xiao, Y.F., D.C. Sigg, and A. Leaf, *The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism*. *J Membr Biol*, 2005. **206**(2): p. 141-54.
50. Leaf, A., et al., *Experimental studies on antiarrhythmic and antiseizure effects of polyunsaturated fatty acids in excitable tissues*. *J Nutr Biochem*, 1999. **10**(8): p. 440-8.
51. Turk, H.F. and R.S. Chapkin, *Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2013. **88**(1): p. 43-7.
52. Shaikh, S.R., *Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(2): p. 101-5.
53. Shaikh, S.R., et al., *N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Lipid Microclusters, and Vitamin E*. *Curr Top Membr*, 2015. **75**: p. 209-31.
54. Jump, D.B., *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 8755-8.

55. Milligan, G., et al., *Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors*. Chem Rev, 2017. **117**(1): p. 67-110.
56. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acid receptors and drug discovery*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(10): p. 1847-51.
57. Gabbs, M., et al., *Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs*. Adv Nutr, 2015. **6**(5): p. 513-40.
58. Wada, M., et al., *Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22254-66.
59. Weylandt, K.H., et al., *Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2012. **97**(3-4): p. 73-82.
60. Konkol, A. and W.H. Schunck, *Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(1): p. 210-22.
61. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 92-101.
62. Weylandt, K.H., et al., *omega -3 PUFAs in the Prevention and Cure of Inflammatory, Degenerative, and Neoplastic Diseases 2014*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 695875.
63. Roy, J., et al., *Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acid: Bioactive drugs?* Biochimie, 2016. **120**: p. 56-61.
64. Leifert, W.R., A. Jahangiri, and E.J. McMurchie, *Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes*. J Nutr Biochem, 2000. **11**(1): p. 38-44.
65. Connor, W.E., *Importance of n-3 fatty acids in health and disease*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 171S-5S.
66. McLennan, P.L., et al., *Myocardial function, ischaemia and n-3 polyunsaturated fatty acids: a membrane basis*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2007. **8 Suppl 1**: p. S15-8.
67. McLennan, P.L., *Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models*. Lipids, 2001. **36 Suppl**: p. S111-4.
68. Schmitz, G. and J. Ecker, *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(2): p. 147-55.
69. Leslie, C.C., *Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease*. J Lipid Res, 2015. **56**(8): p. 1386-402.
70. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
71. Capdevila, J.H. and J.R. Falck, *Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 325-44.
72. McGiff, J.C. and J. Quilley, *20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings*. Am J Physiol, 1999. **277**(3): p. R607-23.
73. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
74. Hrycay, E.G. and S.M. Bandiera, *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*. Springer International Publishing AG, 2015. **851**: p. 151 - 187.
75. Terano, T., J.A. Salmon, and S. Moncada, *Biosynthesis and biological activity of leukotriene B5*. Prostaglandins, 1984. **27**(2): p. 217-32.

76. Dyerberg, J., et al., *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* Lancet, 1978. **2**(8081): p. 117-9.
77. Westphal, C., A. Konkel, and W.H. Schunck, *CYP-eicosanoids--a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. **96**(1-4): p. 99-108.
78. Lauterbach, B., et al., *Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators.* Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 609-13.
79. Barbosa-Sicard, E., et al., *Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(4): p. 1275-81.
80. Fer, M., et al., *Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450.* Arch Biochem Biophys, 2008. **471**(2): p. 116-25.
81. Arnold, C., et al., *Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of {omega}-3 fatty acids.* J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32720-32733.
82. Wu, S., et al., *Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes.* J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12551-9.
83. Gross, G.J., et al., *Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2838-44.
84. Gross, G.J., et al., *Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts.* J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(3): p. 687-91.
85. Darwesh, A.M., et al., *Cardioprotective effects of CYP-derived epoxy metabolites of docosahexaenoic acid involve limiting NLRP3 inflammasome activation (1).* Can J Physiol Pharmacol, 2019. **97**(6): p. 544-556.
86. Seubert, J., et al., *Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway.* Circ Res, 2004. **95**(5): p. 506-14.
87. Ai, D., et al., *Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 564-9.
88. Xu, D., et al., *Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18733-8.
89. Westphal, C., et al., *CYP2J2 overexpression protects against arrhythmia susceptibility in cardiac hypertrophy.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73490.
90. Monti, J., et al., *Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease.* Nature Genetics, 2008. **40**(5): p. 529-537.
91. Jamieson, K.L., et al., *Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function.* Pharmacol Ther, 2017. **179**: p. 47-83.
92. Mechiche, H., et al., *Prostanoid receptors involved in regulation of the beating rate of neonatal rat cardiomyocytes.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45273.
93. Leaf, A., et al., *Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils.* Circulation, 2003. **107**(21): p. 2646-52.
94. Zhang, X.H., et al., *Regionally diverse mitochondrial calcium signaling regulates spontaneous pacing in developing cardiomyocytes.* Cell Calcium, 2015. **57**(5-6): p. 321-36.

95. Schmelzle, M., et al., *Cardioprotection of 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in ischemia/reperfusion is mediated by cyclooxygenase-2: a study in a rat model*. *Transplant Proc*, 2011. **43**(5): p. 1515-9.
96. Samokhvalov, V., et al., *CYP epoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid protect HL-1 cardiac cells against LPS-induced cytotoxicity through SIRT1*. *Cell Death Discovery*, 2015. **1**(1): p. 15054.
97. Samokhvalov, V., et al., *SIRT Is Required for EDP-Mediated Protective Responses toward Hypoxia–Reoxygenation Injury in Cardiac Cells*. *Frontiers in Pharmacology*, 2016. **7**(124).
98. Bodiga, S., et al., *Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid: dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(6): p. 978-88.
99. Katragadda, D., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids limit damage to mitochondrial function following stress in cardiac cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(6): p. 867-75.
100. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 240-53.
101. Rezkalla, S.H. and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2004. **1**(2): p. 96-102.
102. Yang, L., et al., *Mechanisms of Vascular Dysfunction in COPD and Effects of a Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor in Smokers*. *Chest*, 2017. **151**(3): p. 555-563.
103. Sodhi, K., et al., *EET agonist prevents adiposity and vascular dysfunction in rats fed a high fat diet via a decrease in Bach 1 and an increase in HO-1 levels*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2012. **98**(3-4): p. 133-42.
104. Cao, J., et al., *EET intervention on Wnt1, NOV, and HO-1 signaling prevents obesity-induced cardiomyopathy in obese mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. **313**(2): p. H368-H380.
105. Schunck, W.-h., et al., *Novel cyp-eicosanoid derivatives*. 2017, Google Patents.
106. Schunck, W.-h., et al., *Novel eicosanoid derivatives*. 2019, Google Patents.
107. Falck, J.R., et al., *17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid, a potent eicosapentaenoic acid (EPA) derived regulator of cardiomyocyte contraction: structure-activity relationships and stable analogues*. *J Med Chem*, 2011. **54**(12): p. 4109-18.
108. Snyders, D.J., *Structure and function of cardiac potassium channels*. *Cardiovascular Research*, 1999. **42**(2): p. 377-390.
109. Landstrom, A.P., D. Dobrev, and X.H.T. Wehrens, *Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias*. *Circ Res*, 2017. **120**(12): p. 1969-1993.
110. Fearnley, C.J., H.L. Roderick, and M.D. Bootman, *Calcium signaling in cardiac myocytes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(11): p. a004242.
111. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
112. Brandes, R., Lang, F. and Schmidt, R., *Physiologie des Menschen*. Springer, 2020: p. 187-198.
113. Wernhart, M., *Zellkernmorphologie und Lokalisation intrazellulärer Ca²⁺-Regulationsproteine in Kardiomyozyten mit RyanodinRezeptor-Mutation* 2015.
114. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012. **298**: p. 229-317.

115. Sankaranarayanan, R. and L. Venetucci, *Are the anti-arrhythmic effects of omega-3 fatty acids due to modulation of myocardial calcium handling?* Front Physiol, 2012. **3**: p. 373.
116. Simpson, P. and S. Savion, *Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol.* Circ Res, 1982. **50**(1): p. 101-16.
117. Texas, M.A.C.C.-U.o.
118. Persoon-Rotherth, M., et al., *Cumene hydroperoxide induced changes in calcium homeostasis in cultured neonatal rat heart cells.* Cardiovasc Res, 1992. **26**(7): p. 706-12.
119. Gryniewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.* J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
120. Adebesein, A.M., et al., *Development of Robust 17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic Acid (17,18-EEQ) Analogues as Potential Clinical Antiarrhythmic Agents.* J Med Chem, 2019. **62**(22): p. 10124-10143.
121. Sernetz, M., *Vorlesung am Fachbereich Biomedizintechnik der FH Gießen und am Fachbereich Veterinärmedizin der JFU Gießen.* 2000.
122. Wellnitz, J. and D.M. Gluschke, *Leitlinie zur Methodenvalidierung.* 2005.
123. Li, Y., J.X. Kang, and A. Leaf, *Differential effects of various eicosanoids on the production or prevention of arrhythmias in cultured neonatal rat cardiac myocytes.* Prostaglandins, 1997. **54**(2): p. 511-30.
124. Kinsella, B.T., D.J. O'Mahony, and G.A. Fitzgerald, *The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha.* J Pharmacol Exp Ther, 1997. **281**(2): p. 957-64.
125. Offermanns, S., et al., *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 504-8.
126. Hazeltine, L.B., et al., *Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells.* Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 508294.
127. Malenka RC, N.E., Hyman SE, *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience.* McGraw-Hill Medical., 2009. (2nd ed.).
128. Tirupula, K.C., et al., *G protein-coupled receptors directly bind filamin A with high affinity and promote filamin phosphorylation.* Biochemistry, 2015. **54**(44): p. 6673-83.
129. Leever, S.J., B. Vanhaesebroeck, and M.D. Waterfield, *Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 219-25.
130. Balligand, J.L. and P.J. Cannon, *Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(10): p. 1846-58.
131. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
132. Seubert, J.M., et al., *Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **82**(1-4): p. 50-9.

133. Chlopcikova, S., J. Psotova, and P. Miketova, *Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2001. **145**(2): p. 49-55.
134. Louch, W.E., K.A. Sheehan, and B.M. Wolska, *Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(3): p. 288-98.
135. Webster, D.R. and D.L. Patrick, *Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1653-61.
136. Curtis, M.W., et al., *Hypertrophy, gene expression, and beating of neonatal cardiac myocytes are affected by microdomain heterogeneity in 3D*. Biomed Microdevices, 2010. **12**(6): p. 1073-85.
137. Boudreau-Béland, J., et al., *Spatiotemporal Stability of Neonatal Rat Cardiomyocyte Monolayers Spontaneous Activity Is Dependent on the Culture Substrate*. PLOS ONE, 2015. **10**(6): p. e0127977.
138. Agency, E.M., *ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology*. 01.06.1995.
139. Borman, P. and D. Elder, *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures*, in *ICH Quality Guidelines*. 2017. p. 127-166.
140. Kromidas, S., R. Klinkner, and R. Mertens, *Methodenvalidierung im analytischen Labor*. Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium, 1995. **43**: p. 669-676.
141. Fischer, R., et al., *Dietary omega-3 fatty acids modulate the eicosanoid profile in man primarily via the CYP-epoxygenase pathway*. J Lipid Res, 2014. **55**(6): p. 1150-64.
142. Preissner, S., et al., *Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy*. PloS one, 2013. **8**: p. e82562.
143. Imaoka, S., T. Hashizume, and Y. Funae, *Localization of rat cytochrome P450 in various tissues and comparison of arachidonic acid metabolism by rat P450 with that by human P450 orthologs*. Drug Metab Pharmacokinet, 2005. **20**(6): p. 478-84.
144. El-Sherbeni, A.A., et al., *Determination of the dominant arachidonic acid cytochrome p450 monooxygenases in rat heart, lung, kidney, and liver: protein expression and metabolite kinetics*. AAPS J, 2013. **15**(1): p. 112-22.
145. Hamberg, M., et al., *Synthesis of 3-oxalolenic acid and beta-oxidation-resistant 3-oxa-oxylipins*. Lipids, 2006. **41**(5): p. 499-506.
146. Guilford, W.J., et al., *Novel 3-oxa lipoxin A4 analogues with enhanced chemical and metabolic stability have anti-inflammatory activity in vivo*. J Med Chem, 2004. **47**(8): p. 2157-65.
147. Larsen, L.N., et al., *Polyunsaturated thia- and oxa-fatty acids: incorporation into cell-lipids and their effects on arachidonic acid- and eicosanoid synthesis*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1348**(3): p. 346-54.
148. Dhanasekaran, A., et al., *Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H724-35.
149. Garcia, V., et al., *20-HETE Signals Through G-Protein-Coupled Receptor GPR75 (Gq) to Affect Vascular Function and Trigger Hypertension*. Circ Res, 2017. **120**(11): p. 1776-1788.

150. Park, S.K., et al., *GPR40 is a low-affinity epoxyeicosatrienoic acid receptor in vascular cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(27): p. 10675-10691.
151. Lahvic, J.L., et al., *Specific oxylipins enhance vertebrate hematopoiesis via the receptor GPR132*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(37): p. 9252-9257.
152. Chen, Y., et al., *20-Iodo-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoyle-3-azidophenylsulfonamide: photoaffinity labeling of a 14,15-epoxyeicosatrienoic acid receptor*. Biochemistry, 2011. **50**(18): p. 3840-8.
153. Gross, G.J., et al., *Evidence for a role of opioids in epoxyeicosatrienoic acid-induced cardioprotection in rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(6): p. H2201-7.
154. Xiao, Y.F., *Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ channel activities by epoxyeicosatrienoic acids*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **82**(1-4): p. 11-8.
155. Liu, X., et al., *Functional screening for G protein-coupled receptor targets of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. **132**: p. 31-40.
156. Dhalla, N.S. and A.L. Muller, *Protein Kinases as Drug Development Targets for Heart Disease Therapy*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(7): p. 2111-2145.
157. Node, K., et al., *Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15983-9.
158. Han, J., et al., *Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22140-7.
159. Costa, A.D., et al., *Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria*. Circ Res, 2005. **97**(4): p. 329-36.
160. Oldenburg, O., et al., *Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H468-76.
161. Krieg, T., et al., *Peptide blockers of PKG inhibit ROS generation by acetylcholine and bradykinin in cardiomyocytes but fail to block protection in the whole heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1976-81.
162. Hu, K., et al., *Protein kinase C activates ATP-sensitive K⁺ current in human and rabbit ventricular myocytes*. Circ Res, 1996. **78**(3): p. 492-8.
163. Vanden Hoek, T., et al., *Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 541-8.
164. Rehring, T.F., et al., *Mechanisms of pH preservation during global ischemia in preconditioned rat heart: roles for PKC and NHE*. Am J Physiol, 1998. **275**(3): p. H805-13.
165. Gross, G.J. and J.N. Peart, *KATP channels and myocardial preconditioning: an update*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H921-30.
166. Gross, G.J. and R.M. Fryer, *Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning*. Circ Res, 1999. **84**(9): p. 973-9.
167. Suzuki, M., et al., *Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice*. J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 509-16.
168. Lu, T., M. VanRollins, and H.C. Lee, *Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 1076-83.

169. Lu, T., et al., *Activation of ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 3): p. 811-27.
170. Ardehali, H., et al., *Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11880-5.
171. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 420-32.
172. Campbell, W.B., et al., *Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors*. Circ Res, 1996. **78**(3): p. 415-23.
173. Fisslthaler, B., et al., *Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 493-7.
174. Fleming, I., *Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s)*. Pharmacol Res, 2004. **49**(6): p. 525-33.
175. Ye, D., et al., *Cytochrome p-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 768-76.
176. Hercule, H.C., et al., *The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents*. Exp Physiol, 2007. **92**(6): p. 1067-76.
177. Agbor, L.N., et al., *Elevated blood pressure in cytochrome P4501A1 knockout mice is associated with reduced vasodilation to omega-3 polyunsaturated fatty acids*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **264**(3): p. 351-60.
178. Sayegh, M.N., N. Fernandez, and H.C. Cho, *Strength-duration relationship as a tool to prioritize cardiac tissue properties that govern electrical excitability*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019. **317**(7): p. H13-H25.
179. McLennan, P.L., et al., *Dietary lipid modulation of ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey*. Am Heart J, 1992. **123**(6): p. 1555-61.
180. Li, G.R., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit transient outward and ultra-rapid delayed rectifier K⁺ currents and Na⁺ current in human atrial myocytes*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(2): p. 286-93.
181. Xiao, Y.F., et al., *Fatty acids suppress voltage-gated Na⁺ currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na⁺ channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2680-5.
182. Xiao, Y.F., et al., *Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11000-4.
183. Xiao, Y.F., et al., *Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4182-7.
184. Honore, E., et al., *External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1937-41.
185. Dobrev, D. and X.H. Wehrens, *Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease*. Circ Res, 2014. **114**(8): p. 1311-9; discussion 1319.
186. Dobrev, D. and X.H.T. Wehrens, *Calcium-mediated cellular triggered activity in atrial fibrillation*. J Physiol, 2017. **595**(12): p. 4001-4008.
187. McLennan, P.L., M.Y. Abeywardena, and J.S. Charnock, *Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 1985. **63**(11): p. 1411-7.

188. Trafford, A.W., M.E. Diaz, and D.A. Eisner, *Coordinated control of cell Ca(2+) loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-type Ca(2+) current*. *Circ Res*, 2001. **88**(2): p. 195-201.
189. Shannon, T.R., K.S. Ginsburg, and D.M. Bers, *Potential of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration*. *Biophys J*, 2000. **78**(1): p. 334-43.
190. Szentandrassy, N., et al., *Protein kinase A is activated by the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid in rat ventricular muscle*. *J Physiol*, 2007. **582**(Pt 1): p. 349-58.
191. Rodrigo, G.C., S. Dhanapala, and A.D. Macknight, *Effects of eicosapentaenoic acid on the contraction of intact, and spontaneous contraction of chemically permeabilized mammalian ventricular myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(4): p. 733-43.
192. Oni-Orisan, A., et al., *Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and coronary artery disease in humans: a targeted metabolomics study*. *J Lipid Res*, 2016. **57**(1): p. 109-19.
193. Spiecker, M., et al., *Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2*. *Circulation*, 2004. **110**(15): p. 2132-6.
194. Lee, C.R., et al., *Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(10): p. 1640-9.
195. Shuey, M.M., et al., *Association of gain-of-function EPHX2 polymorphism Lys55Arg with acute kidney injury following cardiac surgery*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0175292.
196. Bellien, J., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered nitric oxide and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension*. *Circulation*, 2012. **125**(10): p. 1266-75.
197. Ono, E., et al., *Lipoxin generation is related to soluble epoxide hydrolase activity in severe asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(8): p. 886-97.
198. Balgoma, D., et al., *Linoleic acid-derived lipid mediators increase in a female-dominated subphenotype of COPD*. *Eur Respir J*, 2016. **47**(6): p. 1645-56.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biosynthese von langkettigen Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren.	2
Abbildung 2: Eicosanoide können durch LOX-, COX- und CYP-Enzyme gebildet werden.....	6
Abbildung 3: Bildung von CYP-Eicosanoiden aus AA, EPA und DHA im Herzen	7
Abbildung 4: sEH hydroxyliert CYP-Epoxyeicosanoide zu inaktiven Diolen	8
Abbildung 5: 17,18-EEQ wird von einer Vielzahl von zellulären Mechanismen genutzt.	11
Abbildung 6: Strukturelle Schwachstellen von 17,18-EEQ und Modifikation an C21 12	
Abbildung 7: Die komplexen Abläufe beim kardialen Aktionspotenzial	13
Abbildung 8: Graphische Erläuterung der analysierten Parameter	40
Abbildung 9: Analog C4 reduziert die basale Schlagfrequenz der NRKM	42
Abbildung 10: Die basale Schlagfrequenz ist normalverteilt	43
Abbildung 11: 17,18-EEQ senkt die Schlagfrequenz zeit- und konzentrationsabhängig	44
Abbildung 12: C4 senkt die Schlagfrequenz zeit- und konzentrationsabhängig	45
Abbildung 13: BSA beeinflusst den zeitlichen Verlauf des Effekts von C4.....	46
Abbildung 14: Ethanol verändert die Schlagfrequenz kaum	47
Abbildung 15: 17,18-EEQ reduziert die Schlagfrequenz stark	48
Abbildung 16: Die Schlagfrequenz wird durch C4 stark reduziert	49
Abbildung 17: 17,18-EEQ und C4 können im Schlagfrequenz-Assay zuverlässig untersucht werden.....	50
Abbildung 18: Nachweis von endogen gebildeten Epoxyeicosanoiden in NRKM	52
Abbildung 19: Die CYP-Epoxygenasen CYP2J3 und CYP2C11 werden exprimiert	53
Abbildung 20: Der negativ chronotrope Effekt von EPA, 17,18-EEQ und C4 ist zeitabhängig.....	54
Abbildung 21: Der Effekt von EPA, 17,18-EEQ und C4 ist konzentrationsabhängig 54	
Abbildung 22: Der Effekt von EPA aber nicht von 17,18-EEQ und C4 kann durch MS-PPOH gehemmt werden	55
Abbildung 23: Der Effekt von DHA und 19,20-EDP ist zeitabhängig	56
Abbildung 24: Der Effekt von DHA und 19,20-EDP ist konzentrationsabhängig	57
Abbildung 25: Der Effekt von DHA aber nicht von 19,20-EDP kann durch MS-PPOH gehemmt werden.....	57
Abbildung 26: Pertussis-Toxin aber nicht Cholera-Toxin kann den Effekt von 17,18- EEQ und C4 hemmen	62

Abbildung 27: Naloxon blockiert den Effekt von 17,18-EEQ und C4 bereits im pikomolaren Bereich.....	63
Abbildung 28: Filamin A ist für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 essentiell.....	64
Abbildung 29: 17,18-EEQ und C4 aktivieren die PI3K.....	65
Abbildung 30: Die PI3K-Aktivität wird durch 17,18-EEQ und C4 gesteigert	66
Abbildung 31: Phosphorylierung von AKT wird durch 17,18-EEQ und C4 erhöht.....	67
Abbildung 32: Die Phosphorylierung von AKT an Position S473 durch C4 ist zeitabhängig.....	68
Abbildung 33: Die Inhibition der NO-Synthase führt zum Ausfall des Effekts von 17,18-EEQ und C4.....	69
Abbildung 34: 17,18-EEQ und C4 erhöhen die eNOS- Phosphorylierung	69
Abbildung 35: Die Inhibition der PKG aber nicht der PKA blockiert den Effekt von 17,18-EEQ und C4.....	71
Abbildung 36: Für den Effekt von 17,18-EEQ und C4 ist die Aktivierung der PKC notwendig	72
Abbildung 37: Die Inhibition des sarcK _{ATP} und mitoK _{ATP} Kanals führt zum Verlust des Effekts von C4.....	73
Abbildung 38: C4 reduziert die elektrische Erregbarkeit, aber nicht die Refraktärzeit	74
Abbildung 39: C4 hat einen bedeutenden Einfluss auf den Ca ²⁺ -Transienten	76
Abbildung 40: C4 hat keinen Einfluss auf die Kontraktilität	77
Abbildung 41: C4 steigert die Phosphorylierung von PLN.....	79
Abbildung 42: C4 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des RyR2.....	80
Abbildung 43: MS-PPOH inhibiert die CYP-Epoxygenasen.....	85
Abbildung 44: C4 ist eine Weiterentwicklung von C21	88
Abbildung 45: Der Wirkmechanismus von 17,18-EEQ und C4	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Evidenz zur kardiovaskulären Wirkung von Omega-3-Fettsäuren Übernommen und ergänzt nach [12]	5
Tabelle 2: Übersicht zu verwendeten Zellkulturgefäße	18
Tabelle 3: Zusammensetzung des NRKM Zellkulturmediums (SM20-I komplett)	19
Tabelle 4: Zusammensetzung des SPSM.....	20
Tabelle 5: Sequenzen der Primer und Sonden für die Genexpressionsanalyse.	23
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lysepuffer.	25
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper, Lyse- und Ladepuffer.....	26
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Cisbio Assays.....	27
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Puffer im PI3K Aktivitäts-Assay.....	28
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten lentiviralen Plasmide.	29
Tabelle 11: Übersicht zu verwendeten Inhibitoren.....	34
Tabelle 12: Zusammensetzung des internen Standards.	35
Tabelle 13: Formulierung des Kang & Leaf Puffers	37
Tabelle 14: Übersicht über getestete 17,18-EEQ Analoga.....	59

Formelverzeichnis

Formel 1: Bestimmung des Virus-Referenz-Titers	32
Formel 2: Kalibrierung des FURA-2 Fluoreszenzsignals	39
Formel 3: Exponentialfunktion für Analyse der Kontraktilität und Ca^{2+} Transienten	39
Formel 4: Normierte Bateman Funktion	43
Formel 5: Validitätskriterium für den Effekt von Ethanol	47
Formel 6: Validitätskriterium für den Effekt von 17,18-EEQ	48
Formel 7: Validitätskriterium für den Effekt von C4.....	49

Publikationen

Zhu Y, Blum M, Hoff U, **Wesser T**, Fechner M, et al. (2016) Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Soluble Epoxide Hydrolase-Deficient Mice. PLOS ONE 11(1): e0145645. DOI: 10.1371/journal.pone.0145645

Adebesin, A., **Wesser, T.**, Vijaykumar, J., Konkell, A., Paudyal, M., Lossie, J., Zhu, C., Westphal, C., Puli, N., Fischer, R., Schunck, W-H., and Falck, J., (2019) Development of Robust 17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic Acid (17,18-EEQ) Analogues as Potential Clinical Antiarrhythmic Agents. Journal of Medicinal Chemistry 62 (22): 10124-10143 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00952

Posterbeiträge

Winter Eicosanoids 2016, Baltimore, USA (03/2016): Blum, M., Rothe, M., **Wesser, T.**, Schunck, W-H. DEVELOPMENT OF A REVERSED PHASE CHIRAL LC/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF EPOXYEICOSANOID ENANTIOMERS. DOI: 10.13140/RG.2.1.2377.8965

6th European Workshop on Lipid Mediators, Frankfurt am Main, Deutschland (09/2016): **Wesser, T.**, Lossie, J., Konkell, A., Falck, J., Fischer, R., Schunck, W-H. Anti-arrhythmic and cardioprotective properties of a synthetic 17,18-EEQ analog. DOI:

American Heart Association Scientific Sessions, Anaheim, USA (11/2017): **Wesser, T.**, Fischer, R., Samokhvalov, V., Konkell, A., Lossie, J., Falck, J., Seubert, J., Schunck, W-H. A novel synthetic omega-3 epoxyeicosanoid analogue mediates cardioprotection via modulation of mitochondrial function.

International Society for the study fatty acids and lipids, Las Vegas, USA (05/2018): **Wesser, T.**, Samokhvalov, V., Lossie, J., Konkell, A., Westphal, P., Falck, J., Seubert, J., Westphal, C., Fischer, R., Schunck, W-H. Cardioprotective properties of omega-3 epoxyeicosanoids.

6th Meeting of European Section and 7th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS), Vrnjacka Banja, Serbia (09/2019): **Wesser, T.**, Konkell, A., Lossie, J., Dobrev, D., Seubert, J., Fischer, R., Schunck, W-H. Cardioprotective mechanisms of a synthetic epoxyeicosanoid mimetic developed for the treatment of atrial fibrillation.

Abkürzungsverzeichnis

5-HD	5-Hydroxydecanoat
17,18-EEQ	17,18-Epoxyeicosateraensäure
AA	Arachidonsäure
AF	Vorhofflimmern (atrial fibrillation)
AKT	Proteinkinase B
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute)
C4	Compound 4
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulinabhängige Proteinkinase II (CaMKII)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenasen
cPLA ₂	Calcium-abhängige Phospholipase A ₂
CYP	Cytochrom P450 Enzyme
DHA	Docosahexaensäure
DHA	Docosahexaensäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure
EPA	Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
FRED	Förster-Resonanzenergietransfer
FUDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine (Mitose-Inhibitor)
GC	Guanylatcyclasen
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor)
H/R	Hypoxie/Reoxygenierung
HTRF	Zeitaufgelöster FRED
I/R	Ischämie/Reperfusion
Iso	Isoprenalin
LOX	Lipoxygenasen
LPS	Lipopolysaccharide
LTCC	L-Typ Ca ²⁺ Channel (L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle)
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft

MS-PPOH	N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide (Cytochrom P450 Epoxygenase Inhibitor)
NCS	Newborn calf serum (Neugeborenen Kälberserum)
NO	Stickstoffmonooxid
NRKM	Neonatale Rattenkardiomyozyten
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure (polyunsaturated fatty acids)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
Rp-cAMPS	cAMP Analog (Rp-cAMPS triethylammonium Salz)
Rp-cGMPS	cGMP Analog (Rp-8-[(4-Chlorophenyl)thio]-cGMPS triethylammonium Salz)
S10	Serin 10
S16	Serin 16
sEH	lösliche Epoxidhydrolase (soluble epoxide hydrolase)
shRNA	Small Hairpin RNA
T17	Threonin 17