

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität Heidelberg
Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)

Transkriptionelle Regulation und Pharmakologische Modulation des Zwei-Porendomänen Kaliumkanals TASK-1

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
der
Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von
Manuel Kraft

aus
Heidelberg

2022

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich
Doktormutter: Frau Prof. Dr. med. Constanze Schmidt

FÜR MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xxv
Tabellenverzeichnis	xxix
1. Einleitung	1
1.1. Vorhofflimmern	1
1.1.1. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	2
1.1.2. Vorhofflimmertherapie gemäß Leitlinien	6
1.1.3. Neue Therapieansätze gegen Vorhofflimmern	13
1.2. Der Zwei-Porendomänen Kaliumkanal TASK-1	15
1.2.1. Kardiale Bedeutung	15
1.2.2. Rolle bei anderen Erkrankungen	16
1.2.3. Modulation und Regulation	18
1.3. miRNA	22
1.3.1. Biogenese und Regulation	22
1.3.2. Funktionsweise	24
1.3.3. Rolle bei Vorhofflimmern	25
1.4. Doxapram und Ketodoxapram	26
1.4.1. Anwendung	27
1.4.2. Pharmakologie	27
1.4.3. Stereochemie	31
1.5. Zielsetzung der Arbeit	35
2. Material und Methoden	37
2.1. Material	37
2.2. Molekularbiologie	37
2.2.1. Isolation von Ribonukleinsäure	37
2.2.2. Reverse Transkription	39
2.2.3. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	40
2.2.4. Transformation	43
2.2.5. Gewinnung von Plasmid Desoxyribonukleinsäure	44
2.2.6. Linearisierung von Plasmiden	44
2.2.7. <i>In vitro</i> Transkription	44
2.3. Proteinbiochemie	45
2.3.1. Isolation von Proteinen	46

2.3.2.	Quantifizierung von Proteinen	46
2.3.3.	Western Blot Analyse	47
2.4.	Zellkultur	49
2.4.1.	Induzierte pluripotente Stammzellen	50
2.4.2.	Kardiomyozyten	51
2.4.3.	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	52
2.5.	Elektrophysiologie	57
2.5.1.	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	58
2.5.2.	Patch-Clamp-Technik	59
2.6.	Quantitative Analytik	60
2.6.1.	Validierung von bioanalytischen Messmethoden	60
2.6.2.	Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram	62
2.6.3.	Quantifizierung von A293	65
2.7.	Großtiermodelle	67
2.7.1.	Versuchstierhaltung	68
2.7.2.	Anästhesie	68
2.7.3.	Untersuchungen zu Beginn der Operation	68
2.7.4.	Induktion von paroxysmale Vorhofflimmern	69
2.7.5.	Medikamentengabe und Blutentnahme	69
2.7.6.	Messung hämodynamischer Parameter	70
2.7.7.	Terminale Operation	70
2.8.	DOCTOS-Studie — First-in-human	70
2.8.1.	Ablauf der Studie	71
2.8.2.	Exposition und erster Studientag	73
2.8.3.	Nachfolgeuntersuchungen und Beendigung der Studie	75
2.9.	Datenauswertung	76
3.	Ergebnisse	77
3.1.	Transkriptionelle Regulation des TASK-1-Kanals	77
3.1.1.	Unterschiedliche Expression von miRNAs unter Vorhofflimmern	77
3.1.2.	Korrelation zwischen der Expression von miRNAs und TASK-1 mRNA	79
3.1.3.	miRNA vermittelte Regulation der TASK-1-Expression	81
3.1.4.	Funktionelle Untersuchung der miRNA-Regulation	85
3.1.5.	miRNAs als Biomarker für Vorhofflimmern	86
3.1.6.	Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und klinischen Parametern	89
3.2.	Pharmakologische Modulation des TASK-1-Kanals	92
3.2.1.	Inhibition von TASK-1 und TASK-3 durch Doxapram und Ketodoxapram	92
3.2.2.	Inhibitorischer Effekt auf atriale Kaliumkanäle und die Kanalfamilie der Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle	94
3.2.3.	Inhibitorischer Effekt in humanen Kardiomyozyten	96

3.2.4.	Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram in Plasma und Gehirngewebe	96
3.2.5.	Quantifizierung von A293 im Plasma von Schweinen	102
3.2.6.	Bestimmung pharmakokinetischer Parameter im Schwein	103
3.2.7.	Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis und Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram	106
3.2.8.	Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck	108
3.2.9.	Verlängerung der arteriellen effektiven Refraktärzeit und Terminierung von Vorhofflimmern durch Ketodoxapram	111
3.2.10.	Pharmakokinetik von Doxapram in humanen Probanden	114
3.2.11.	Unterschiedliche Effekte der beiden Enantiomere von Ketodoxapram	119
4.	Diskussion	121
4.1.	Regulation der Expression des TASK-1-Kanals	121
4.1.1.	TASK-1-Regulation durch miRNA-34a	121
4.1.2.	miRNA-34a als Biomarker für Vorhofflimmern	125
4.1.3.	miRNAs sind assoziiert mit Myokarddilatation	125
4.1.4.	Limitationen der Studie	126
4.2.	Modulation des TASK-1-Kanals durch pharmazeutische Wirkstoffe	127
4.2.1.	Doxapram und Ketodoxapram inhibieren selektiv TASK-1 und TASK-3	127
4.2.2.	Zuverlässige Konzentrationsbestimmung in Plasma und Gewebe	129
4.2.3.	Pharmakokinetik von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein	133
4.2.4.	Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks durch Doxapram und Ketodoxapram	138
4.2.5.	Ketodoxapram führt zur Verlängerung der arteriellen effektiven Refraktärzeit und Kardioversion von Vorhofflimmern	140
4.2.6.	Pharmakokinetik und Proteinbindung von Doxapram in humanen Probanden mit Vorhofflimmern	141
4.2.7.	R-Ketodoxapram konnte als Eutomer identifiziert werden	143
4.3.	Schlussfolgerung	143
5.	Zusammenfassung	145
6.	Literaturverzeichnis	147
7.	Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung und eigene Veröffentlichungen	189
7.1.	Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung	189
7.2.	Eigene Veröffentlichungen	190
A.	Anhang	197

Danksagung	239
Eidesstattliche Versicherung	243

Abkürzungsverzeichnis

AAV

Adeno-assoziierte Viren

ACC

Amerikanisches Kollegium für Kardiologie (engl. American College of Cardiology)

ACE

Angiotensin-konvertierendes Enzym (engl. Angiotensin Converting Enzym)

ACN

Acetonitril

ACTB

Beta-Aktin

AERP

atriale effektive Refraktärzeit (engl. atrial effective refractory period)

AGO

Argonautenprotein

AHA

Amerikanische Herzvereinigung (engl. American Heart Association)

ALT

Alanin-Aminotransferase

ANS

autonomes Nervensystem

AP

Aktionspotential

APD

Aktionspotentialdauer (engl. action potential duration)

APS

Ammoniumperoxidsulfat

ARB

Angiotensin-II-Rezeptorblocker

AST

Aspartat-Aminotransferase

ATP

Adenosintriphosphat

AUC

Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve)

AV

atrioventrikular

AVD

Aortenklappenerkrankung (engl. aortic valve disease)

AVR

Aortenklappenersatz (engl. aortic valve replacement)

BCA

Bicinchoninsäure

BfArM

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

BHPT

β -Hydroxyphenyltheophyllin

BMI

Body-Mass-Index

BSA

Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)

C_{max}

maximale Plasmakonzentration (engl. maximum plasma concentration)

CABANA

Catheter Ablation vs. Anti-arrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation

CABG

Koronararterien-Bypass (engl. coronary artery bypass graft)

CAD

koronare Herzkrankheiten (engl. coronary artery disease)

CaMKII

Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

CAST

Cardiac Arrhythmia Suppression Trail

CASTLE-AF

Catheter Ablation vs. Standard Conventional Treatment in Patients with Left Ventricular Dysfunction and Atrial Fibrillation

cDNA

komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. copy deoxyribonucleic acid)

CL

Clearance

COL1A2

Kollagen Typ 1 Alpha 2 (engl. collagen type 1 alpha 2)

COPD

chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease)

CRL4

Cullin-4-containing E3 ubiquitin ligase complex CUL4-RBX1-DDB1

cRNA

komplementäre Ribonukleinsäure (engl. copy ribonucleic acid)

CRP

C-reaktives Protein

CSA

zentrale Schlafapnoe (engl. central sleep apnea)

CT

Schwellenwert-Zyklus (engl. cycle threshold)

DAD

späte Nachdepolarisationen (engl. delayed afterdepolarizations)

DAG

Diacylglycerol

DDR2

Discoidin-Domänen-haltiger Rezeptor 2

DGCR8

DiGeorge Syndrom kritische Region 8 (engl. DiGeorge syndrome critical region 8)

DLT

dosislimitierende Toxizität

DMSO

Dimethylsulfoxid

DNA

Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)

dNTP

Desoxynukleosidtriphosphat

DOAK

direkte orale Antikoagulanzen

DOCTOS

Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie (engl. doxapram conversion to sinus rhythm study)

DPBS

Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Dulbecco's phosphate buffered saline)

dTTP

Desoxythymidintriphosphat

EAD

frühe Nachdepolarisationen (engl. early afterdepolarizations)

EAST-AFNET 4

Early Treatment of Atrial Fibrillation for Stroke Prevention Trial

ECL

verbesserte Chemilumineszenz (engl. enhanced chemiluminescent)

eCV

elektrische Kardioversion (engl. electrical cardioversion)

EDD

enddiastolischer Durchmesser

EDTA

Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA

Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure

EKG

Elektrokardiogramm

EMA

Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. European Medicines Agency)

EPU

elektrophysiologische Untersuchung

ERP

effektive Refraktärzeit (engl. effective refractory period)

ESC

Europäische Gesellschaft für Kardiologie (engl. European Society of Cardiology)

ESD

endsystolischer Durchmesser

ESI

Elektrosprayionisation

FA

Ameisensäure (engl. formic acid)

FAM

6-Carboxyfluorescein

FDA

US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. U.S. Food and Drug Administration)

FID

Flammenionisationsdetektor

FRET

Förster-Resonanzenergietransfer

GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GC

Gaschromatographie

GFR (CKD-E)

glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach der Formel der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

GGT

γ -Glutamyltransferase

GOT

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT

Glutamat-Pyruvat-Transaminase

GTP

Guanosintriphosphat

HCM

humane Kardiomyozyten (engl. human cardiomyocytes)

HCT

Hydrochlorothiazid

HEPES

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HI

Herzinsuffizienz

HIV-1

Humanes Immundefizienz-Virus 1

HPASMC

menschliche pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. human pulmonary artery smooth muscle cells)

HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)

HRP

Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)

HRS

Gesellschaft für Herzrhythmusstörungen (engl. Heart Rhythm Society)

HSC70

Hitzeschockkognat 70 (engl. heat shock cognate 70)

HSP90

Hitzeschockprotein 90 (engl. heat shock protein 90)

IBF

Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung

IC₅₀

halbmaximale inhibitorische Konzentration (engl. half maximal inhibitory concentration)

i.m.

intramuskulär

IP₃

Inositoltrisphosphat

IPO8

Importin 8

IPS

induzierte pluripotente Stammzellen

IS

interner Standard

i.v.

intravenös

K_{2P}

Kalium-Zwei-Porendomänen

K_{ir}3.1

einwärtsgerichteter Kaliumkanal, Unterfamilie J, Mitglied 3 (engl. potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3)

K_{ir}3.4

einwärtsgerichteter Kaliumkanal, Unterfamilie J, Mitglied 5 (engl. potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5)

K_v1.5

spannungsgesteuerter Kaliumkanal, *shaker*-verwandte Unterfamilie, Mitglied 5 (engl. potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5)

KHK

koronare Herzkrankheit

LA

linkes Atrium

LB

Lysogenese Brühe (engl. lysogeny broth)

LC

Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography)

LDH

Lactatdehydrogenase

LLE

Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. liquid-liquid-extraction)

LLOQ

untere Quantifizierungsgrenze (engl. lower limit of quantification)

LV

linker Ventrikel

LVEF

linksventrikuläre Ejektionsfraktion

M-MuLV

Moloney Murines Leukämievirus

MCH

mittleres korpuskulares Hämoglobin (engl. mean corpuscular haemoglobin)

MCHC

mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (engl. mean corpuscular haemoglobin concentration)

MCV

mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (engl. mean corpuscular volume)

MDRD

Änderung der Ernährung bei Nierenerkrankungen (engl. Modification of Diet in Renal Disease); Formel zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

miRNA

micro Ribonukleinsäure

MOPS

3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure

MRE

miRNA-Reaktionselement (engl. miRNA response element)

MRM

Mehrfachreaktionsüberwachung (engl. multiple reaction monitoring)

mRNA

Boten Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)

MS

Massenspektrometer

MS/MS

Tandem-Massenspektrometer

N-D

Stickstoffdetektor (engl. nitrogen detector)

N/P-D

Stickstoff-Phosphor-Detektor (engl. nitrogen-phosphorus detector)

NCX1

Natrium-Calcium-Austauscher Isoform 1 (engl. sodium-calcium exchanger isoform 1)

NFATc3

Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen zytoplasmatisch 3 (engl. nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 3)

NFQ

nicht fluoreszierender Quencher

NFW

nukleasefreies Wasser

NTP

Nukleosidtriphosphat

NYHA

New Yorker Herzvereinigung (engl. New York Heart Association)

OR2

Oozyten Ringerlösung 2

OSA

obstruktive Schlafapnoe

PA

Pulmonalarterien

PASMC

pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. pulmonary artery smooth muscle cells)

PBS-T

Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (engl. phosphate buffered saline with Tween)

PCI

perkutane Koronarintervention (engl. percutaneous coronary intervention)

pCV

pharmakologische Kardioversion (engl. pharmacological cardioversion)

PCWP

Lungenkapillarenverschlussdruck (engl. pulmonary capillary wedge pressure)

PH

pulmonale Hypertonie

PIP₂

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKA

Proteinkinase A

PKB

Proteinkinase B

PKC ϵ

Proteinkinase C ϵ

PLC β

Phospholipase C β

PP

Proteinfällung (engl. protein precipitation)

pre-miRNA

vorläufer miRNA (engl. precursor miRNA)

pri-miRNA

primäre microRNA

PVI

Pulmonalvenenisolation (engl. pulmonary vein isolation)

PVRI

Index des pulmonalen Gefäßwiderstands (engl. pulmonary vascular resistance index)

QC

Qualitätskontrolle (engl. quality control)

qPCR

quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. quantitative real-time polymerase chain reaction)

RACE 7 ACWAS

Rate Control vs. Electrical Cardioversion Trial 7 - Acute Cardioversion vs. Wait and See

RACE II

Race Control Efficacy in Permanent Atrial Fibrillation II

Ran

Ras-verwandtes nukleäres Protein (engl. ras-related nuclear protein)

RBC

Erythrozytenanzahl (engl. red blood cell count)

RDW-CV

Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (engl. red cell distribution width coefficient of Variation)

RED

schnelle Gleichgewichtsdialyse (engl. rapid equilibrium dialysis)

RIPA

Radioimmunpräzipitationsassay

RISC

RNA-induzierter Stilllegungs-Komplex (engl. RNA-induced silencing complex)

RMP

Ruhemembranpotential

RNA

Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)

RR

systemischer Blutdruck

RYR2

Ryanodin-Rezeptor 2

S100A4

S100 Calcium-bindendes Protein A4

SA

Sinuatricial

SDS

Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulphate)

SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis)

SERCA2a

Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums Isoform 2a (engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase isoform 2a)

SGK

Serum- und Glucocorticoide-induzierbare Kinase (engl. serum- and glucocorticoid-inducible kinases)

siRNA

kleine eingreifende RNA (engl. small interfering RNA)

SK

Calcium-aktivierte Kaliumkanäle kleiner Leitfähigkeit (engl. small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel)

SNP

Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)

SOS

Standard Oozyten Lösung (engl. standard oocyte solution)

SR

Sinusrhythmus

SVRI

Index des systemischen Gefäßwiderstands (engl. systemic vascular resistance index)

$t_{1/2}$

Halbwertszeit

t_{max}

Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration

TAH

Thrombozytenaggregationshemmer

TASK-1

Tandem von P-Domänen in einem schwach einwärts gleichgerichteten K^{+} Kanal (TWIK)-verwandter säureempfindlicher Kaliumkanal 1 (engl. tandem of P domains in a weak inward rectifying K^{+} channel related acid sensitive K^{+} channel 1)

TASK-3

Tandem von P-Domänen in einem schwach einwärts gleichgerichteten K^+ Kanal (TWIK)-verwandter säureempfindlicher Kaliumkanal 3 (engl. tandem of P domains in a weak inward rectifying K^+ channel related acid sensitive K^+ channel 3)

TBME

Tert-Butylmethylether

TEMED

Tetraethylmethyldiamin

TEVC

Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl. two electrode voltage clamp)

TIA

transitorische ischämische Attacke

TRBP

TAR RNA-bindendes Protein

Tris

Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UPLC

Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. ultra high performance liquid chromatography)

UTR

untranslatierte Region

UV

Ultraviolett Detektor

UV/VIS

Ultraviolett/Sichtbares Licht Detektor (engl. ultraviolet/visible spectrum detector)

V_{ss}

Verteilungsvolumen

VHF

Vorhofflimmern

VIC

2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein

VKA

Vitamin-K-Antagonisten

WB

Western Blot

WT

Wildtyp

ZNS

zentrales Nervensystem

ZVK

zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Metabolismus von Doxapram	32
1.2.	Enantiomere der Weinsäure	33
1.3.	Enantiomere von Thalidomid	34
1.4.	Strukturformeln von Doxapram und Ketodoxapram	35
2.1.	Geplante Eskalierungsstufen zur Dosisfindung der DOCTOS-Studie .	73
3.1.	Unterschiedliche Expression der untersuchten miRNAs	78
3.2.	Unterschiedliche Expression der miRNAs stratifiziert nach Rhythmus- status	80
3.3.	Signifikanz gegen die Expression der miRNAs stratifiziert nach Rhyth- musstatus	81
3.4.	Ratio gegen relative Expression der miRNAs	82
3.5.	Einfluss des Herzrhythmus auf die Expression von TASK-1 und ausge- wählten miRNAs	83
3.6.	Regulation von TASK-1 auf mRNA- und Proteinebene	84
3.7.	Einfluss von miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren auf RMP und Strom- stärke von Oozyten	85
3.8.	Zeitverlauf des Einflusses von miRNA-34a-Imitatoren und -Inhibitoren auf Stromstärke und RMP in Oozyten	87
3.9.	Analyse der zirkulierende miRNA-34a als Biomarker für Vorhofflimmern	88
3.10.	Assoziationen zwischen miRNA-Expression und klinischen numerischen Parametern	90
3.11.	Assoziation zwischen miRNA-Expression und klinischen binären Para- metern	91
3.12.	Inhibition von hTASK-1, hTASK-3 und pTASK-1 durch Doxapram und Ketodoxapram	93
3.13.	Vergleich des inhibitorischen Effekts von Doxapram und Ketodoxapram auf hTASK-1 und hTASK-3	94
3.14.	Selektivität von Doxapram und Ketodoxapram	95
3.15.	Whole-Cell Patch-Clamp-Messungen an humanen Kardiomyozyten .	97
3.16.	Massenspektrum und Fragmentierung von Doxapram und Ketodoxapram	99
3.17.	Massenspektrum und Struktur von A293	103
3.18.	Konzentrations-Zeit-Kurve von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein	104
3.19.	Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein	107

3.20.	Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis von Doxapram und Ketodoxapram nach 14-tägiger Applikation im Schwein	108
3.21.	Veränderung des Pulmonalarteriendrucks nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron	110
3.22.	Veränderung des systemischen Blutdrucks nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron	111
3.23.	Veränderungen der hämodynamischen Parametern nach chronischer Applikation	112
3.24.	Veränderung der atrialen effektiven Refraktärzeit nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron . . .	113
3.25.	Veränderungen der atrialen effektiven Refraktärzeit und im Oberflächen-EKG nach chronischer Verabreichung von Doxapram und Ketodoxapram	115
3.26.	Kardioversion durch Ketodoxapram im Vorhofflimmer-Schweinemodell	116
3.27.	Konzentrations-Zeit-Kurven nach Verabreichung von Doxapram in den DOCTOS-Probanden	116
3.28.	Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram in den DOCTOS-Probanden	118
3.29.	Inhibitorischer Effekt der Ketodoxapram Enantiomere auf hTASK-1	119
A.1.	Cluster-Analyse der Veränderungen der miRNA-Expression	224
A.2.	Assoziation von miRNA- und mRNA-Expression mit Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz	225
A.3.	Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der hohen Doxapram- und Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen	226
A.4.	Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der niedrigen Doxapram- und Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen	227
A.5.	Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der Doxapram- und Ketodoxapram-Konzentrationen in Gehirngewebe	228
A.6.	Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung von A293 in Schweineplasma	229
A.7.	Detailabbildungen der Konzentrations-Zeit-Kurven nach Applikation von Doxapram im Schwein stratifiziert nach Schwein und Tag	230
A.8.	Detailabbildungen der Konzentrations-Zeit-Kurven nach Ketodoxapram Applikation im Schwein stratifiziert nach Schwein und Tag	231
A.9.	Zeitverlauf pharmakokinetischer Parameter der Doxapram Schweine	232
A.10.	Zeitverlauf pharmakokinetischer Parameter der Ketodoxapram Schweine	233
A.11.	Veränderung des Lungenkapillarenverschlussdrucks nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron . . .	234
A.12.	Veränderung der Herzfrequenz nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron	235
A.13.	Veränderung des Index des systemischen Gefäßwiderstands nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron	236

A.14.	Veränderung des Index des pulmonalen Gefäßwiderstands nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren im Vergleich mit Amiodaron	237
A.15.	Übersicht der Plasmakonzentrationen von A293, Doxapram, Ketodoxapram und Amiodaron im Vergleich zur verabreichten Dosis	238

Tabellenverzeichnis

1.1.	Übersicht der zur pharmakologischen Kardioversion empfohlenen Antiarrhythmika	7
1.2.	Liste der TASK-1-Inhibitoren	20
1.3.	Übersicht der Pharmakokinetik von Doxapram	31
2.1.	Reverse Transkription von RNA und miRNA	40
2.2.	TaqMan Genexpressionsassays	41
2.3.	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	42
2.4.	Verwendete Plasmide	43
2.5.	<i>In Vitro</i> Transkription	45
2.6.	Ansatz des Radioimmunpräzipitationsassay Lysepuffers	46
2.7.	Zusammensetzung der Lösungen und Gele für den Western Blot . . .	48
2.8.	Transfektion von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen .	51
2.9.	Grundlegende Merkmale der Studienpopulation zur Untersuchung der miRNAs	53
2.10.	Grundlegende Merkmale der Patienten, deren Proben für die Patch-Clamp-Messungen verwendet wurden	54
2.11.	Lösungen zur Isolierung humaner Kardiomyozyten aus frischem Gewebe	55
2.12.	Zusammensetzung der Oozyten-Lösungen	57
2.13.	Zusammensetzung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Lösungen	58
2.14.	Zusammensetzung der Patch-Clamp-Lösungen	60
2.15.	Lösungen zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram . .	63
2.16.	Instrumentelle Parameter des Massenspektrometers zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram	65
2.17.	Lösungen zur Quantifizierung von A293 im Blutplasma von Schweinen	66
2.18.	Instrumentelle Parameter des Massenspektrometers zur Quantifizierung von A293	67
2.19.	Einschlusskriterien der DOCTOS-Studie	71
2.20.	Ausschlusskriterien der DOCTOS-Studie	71
3.1.	Pharmakokinetische Parameter von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein	105
3.2.	Pharmakokinetische Parameter von Doxapram und Ketodoxapram in den Probanden der DOCTOS-Studie	117
4.1.	Literaturdaten der miRNA-Kandidaten	123

4.2.	Überblick über die bereits publizierten Methoden zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram	131
A.1.	Übersicht der empfohlenen Antiarrhythmika	197
A.2.	Matrixeffekt und Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	201
A.3.	Matrixeffekt und Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	202
A.4.	Matrixeffekt und Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung im Gehirngewebe von Schweinen	203
A.5.	Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	204
A.6.	Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	205
A.7.	Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung im Gehirngewebe von Schweinen	206
A.8.	Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	207
A.9.	Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen im Schweineplasma	208
A.10.	Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung im Gehirngewebe von Schweinen	209
A.11.	Erneute Vermessung eines Teils der Schweineplasma-Proben mit hohen Konzentration	210
A.12.	Erneute Vermessung eines Teils der Schweineplasma-Proben mit niedrigen Konzentration	211
A.13.	Erneute Vermessung eines Teils der Gehirnproben der Schweine . . .	211
A.14.	Matrixeffekt und Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung von Humanplasma	212
A.15.	Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung von Humanplasma	213
A.16.	Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung von Humanplasma	214
A.17.	Erneute Vermessung humaner Plasma-Proben zum Vergleich von Citrat- und Lithium-Heparin-Plasma	214
A.18.	Kreuzvalidierung von QCs in humanem Citrat-Plasma	216
A.19.	Kreuzvalidierung von QCs in humanem Lithium-Heparin-Plasma . .	217
A.20.	Kreuzvalidierung von QCs in humanem EDTA-Plasma	218
A.21.	Kreuzvalidierung von QCs in humanem Vollblut	219
A.22.	Kreuzvalidierung von QCs in Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen	220
A.23.	Erneute Vermessung eines Teils der DOCTOS-Proben	220
A.24.	Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung von A293 im Schweineplasma	223

1. Einleitung

1.1. Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung in der westlichen Population mit einer Prävalenz von bis zu 4 % (Zulkifly et al. 2018), wobei besonders ältere Menschen davon betroffen sind. Dies zeigt sich in der stark altersabhängigen Prävalenz, die von unter 0,1 % für Personen bis 49 Jahren auf bis zu 17 % für über 80-Jährige steigt (Zoni-Berisso et al. 2014). Durch den demografischen Wandel und die damit einhergehend immer älter werdende Bevölkerung ist mit einem stetigen Anstieg der Patientenzahlen zu rechnen (Colilla et al. 2013).

VHF ist assoziiert mit einem Anstieg der Mortalität um das 1,5–3,5-fache (Hindricks et al. 2021) und einer fünffach höheren Inzidenz für Schlaganfälle (Wolf et al. 1991). Darüber hinaus wird bei 30 % aller Schlaganfallpatienten zusätzlich VHF diagnostiziert (Henriksson et al. 2012). Zur Reduzierung des Schlaganfallrisikos ist die Behandlung mit gerinnungshemmenden Mitteln ein essentieller Bestandteil jeder VHF-Therapie (Hindricks et al. 2021). Obwohl das Risiko unter dieser Behandlung deutlich reduziert werden kann, besteht weiterhin ein Restrisiko einen Schlaganfall zu erleiden von jährlich 1,5 % (Kirchhof et al. 2013).

In der Behandlung von VHF gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Behandlungsstrategien: die Rhythmuskontrolle mit der Wiederherstellung und Erhaltung des Sinusrhythmus (SR) als Ziel und die Frequenzkontrolle mit dem Ziel die ventrikuläre Herzfrequenz zu modulieren und eine Tachymyopathie zu verhindern (Hindricks et al. 2021). In der bisher publizierten Literatur herrschte jedoch kein Konsens dazu, welche der beiden Strategien zu bevorzugen ist. Die kürzlich von Kirchhof et al. (2020) publizierte Studie Early Treatment of Atrial Fibrillation for Stroke Prevention Trial (EAST-AFNET 4) gibt nun erste Hinweise, dass eine frühe Rhythmuskontrolle einer Frequenzkontrolle überlegen ist. Ob eine Rhythmustherapie jedoch überhaupt benötigt wird, stellen Pluymaekers et al. (2019) in der Studie Rate Control vs. Electrical Cardioversion Trial 7 - Acute Cardioversion vs. Wait and See (RACE 7 ACWAS) für Patienten mit neu aufgetretenem VHF in Frage. Sie beobachteten bei 69 % der Probanden, die in den ersten 48 Stunden ausschließlich eine Frequenzkontrolltherapie erhalten haben, eine spontane Wiederherstellung des SR. Darüber hinaus zeigte sich die Behandlungsstrategie des Abwartens und Beobachtens einer Strategie der sofortigen Kardioversion nicht unterlegen im Bezug auf den Endpunkt der Anwesenheit von SR nach 4 Wochen. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu genießen, da sie auf einem sehr eng gefassten Patientenkollektiv beruhen sowie einen einfachen und schnellen Zugang zu medizinischer Versorgung voraussetzten (Capucci und Compagnucci 2020; Botto und Tortora 2020).

Obwohl für die Behandlung von VHF viele verschiedene Therapieansätze zur Verfügung stehen (siehe Abschnitt 1.1.2), gibt es aufgrund unzureichender Wirksamkeit mit gleichzeitig vorhandener kardialer sowie extrakardialer Nebenwirkungen der momentan verfügbaren therapeutischen Optionen immer noch einen ungedeckten Bedarf in der VHF-Therapie (Ravens 2017). Aus diesem Grund sind die dem VHF zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen Gegenstand intensiver Forschung (siehe Abschnitt 1.1.1).

1.1.1. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Bereits um 1550 v. Chr. beschrieben die Ägypter im Papyrus Ebers den Zusammenhang zwischen Puls und Herzschlag, womit sie erste Beiträge zur bis heute andauernden Erforschung des Herz-Kreislauf-Systems leisteten (Koehler et al. 2021). Im 2. Jahrhundert beobachtete der griechische Universalgelehrte und Arzt Claudius Galen, dass ein denerviertes Herz außerhalb des Körpers für kurze Zeit weiter schlug und postulierte, dass keine Nervenleitungen für den Herzschlag erforderlich sind (Silverman et al. 2006). Daraufhin entbrannte eine Diskussion darüber, ob der Herzschlag myogenen oder neurogenen Ursprungs ist, die erst Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Entdeckung der Purkinje-Fasern (1839), des His-Bündels (1893), der Tawara-Schenkel (1904), des atrioventrikular (AV)-Knotens und des Sinuatrial (SA)-Knotens endgültig beigelegt werden konnte (James 1982; Fye 1987; Silverman et al. 2006).

Im gesunden Herzen hat der Herzschlag seinen Ursprung im SA-Knoten. Er besteht aus speziellen Herzmuskelzellen, die in der Lage sind, spontan selbständig zu depolarisieren und den Grundrhythmus des Herzens von 60–100 bpm vorgeben (James 1977). Vom SA-Knoten werden die entstandenen Reize über beide Vorhöfe weitergeleitet, die von den Hauptkammern elektrisch isoliert sind und nur über den AV-Knoten mit diesen verbunden sind (Mantri et al. 2021). Der AV-Knoten hat eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit als das restliche Myokard. Dies führt dazu, dass zum einen die Hauptkammern ausreichend Zeit haben sich zu füllen und zum anderen werden zu schnelle atriale Impulse gefiltert, die sonst zu lebensgefährlichen ventrikulären Arrhythmien führen könnten (Billette und Tadros 2019). Über den AV-Knoten wird die Erregung entlang des His-Bündels und der Tawara-Schenkel zu den Purkinje-Fasern geleitet, wo sie zu einer synchronisierten Kontraktion der Herzkammern und somit einer maximalen Auswurfleistung des Herzens führt (Mantri et al. 2021).

Im Gegensatz zum SR erfolgt die Erregungsweiterleitung beim VHF nicht geordnet über die Vorhöfe sondern unkoordiniert. Dies führt zu einer asynchronen, schnellen Kontraktion der Vorhofwände mit 300–600 bpm und damit zu einer Verminderung des Schlagvolumens um 20–30 %, die nur teilweise durch erhöhte ventrikuläre Frequenzen kompensiert werden kann (Rawles 1990). Durch die Filterfunktion des AV-Knotens wird die Kammer zwar vor den sehr hohen atrialen Frequenzen (über 200 bpm) geschützt, auf Dauer sind jedoch selbst Frequenzen im Bereich von 100–160 bpm schädlich und führen unbehandelt zu Tachymyopathien (Umana et al. 2003).

Die genauen Auslöser und die zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgänge, die zur Entstehung von VHF beitragen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt

und daher noch Gegenstand intensiver Forschung (Staerk et al. 2017). Bluthochdruck, Diabetes, Herzinsuffizienz, Herzklappenerkrankungen, Alter, Übergewicht, obstruktive Schlafapnoe (OSA), Alkohol, Tabak sowie sehr wenig und extrem viel physische Aktivität konnten als Risikofaktoren für die Entstehung von VHF identifiziert werden (Cintra und Figueriredo 2021). Ebenso wurden pathophysiologische Mechanismen entdeckt, die in der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF involviert sind. Hier seien vor allem fokale Erregungszentren und kreisende Erregungen genannt (Nattel 2002).

Bei den fokalen Erregungszentren kommt es durch Veränderungen in einzelnen Zellen außerhalb des SA-Knoten zu einer schnelleren Depolarisation oder zu Nachdepolarisation, die zu einem raschen Erreichen des Schwellenpotentials und einer schnelleren Erregungsentstehung als durch den SA-Knoten vorgegeben führen (Nattel 2002). Da diese Erregungen nicht in Frequenz und Ursprung mit den sonstigen Erregungswellen im Vorhof übereinstimmen, können diese nur irregulär weitergeleitet werden und führen zu sogenannten Triggerarrhythmien. Trifft eine solche Welle auf Zellen des Vorhofmyokards, deren Leitungseigenschaften bereits durch pathophysiologische Veränderungen auf mikro- und markoskopischer Ebene empfänglich gemacht wurden (sogenanntes vulnerables Substrat), kommt es zur Entstehung von kreisenden Erregungen, die ebenfalls zum Auftreten und zur Aufrechterhaltung von VHF beitragen. Im Folgenden werden mögliche Veränderungen näher beschrieben.

1.1.1.1. Elektrische Umbauprozesse

Elektrische Umbauprozesse sind ein Teil der Antwort des Herzens auf funktionelle und strukturelle Stressfaktoren mit dem Ziel, die kardiale Leistung zu erhalten und Beeinträchtigungen zu kompensieren. Nach einiger Zeit jedoch führen diese Mechanismen zu Fehlanpassungen, die Arrhythmien auslösen und zu Herzinsuffizienz führen können (Cutler et al. 2011). In Vorhöfen von Ziegen wurde beobachtet, dass künstlich ausgelöstes VHF zu einer Verkürzung der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP), einer Umkehr der physiologischen Frequenzanpassung und einer Zunahme der Frequenz, Induzierbarkeit und Stabilität von VHF führte (Wijffels et al. 1995). Es konnte somit gezeigt werden, dass durch VHF ausgelöste Umbauprozesse zu einem Fortschreiten von VHF führen. Wijffels et al. (1995) prägten hierfür den Ausspruch "*Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation*" (deutsch: Vorhofflimmern fördert Vorhofflimmern).

Im Rahmen der Umbauprozesse finden eine Reihe von Veränderungen in der elektrischen Funktion des Herzens statt, die bisher noch nicht vollständig verstanden sind (Nattel et al. 2020). Im Verlauf eines normalen kardialen Aktionspotentials (AP) kommt es durch spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle zu einem Calciumeinstrom, der zu einer deutlich größeren Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2)-vermittelten Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führt. Das freigesetzte Calcium bindet an Myofilamente und führt somit zur Kontraktion der Muskelzellen. Anschließend wird das Calcium durch Calcium-ATPasen des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums Isoform 2a (SERCA2a) wieder ins sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen oder durch Natrium-Calcium-Austauscher Isoform 1 (NCX1) aus der Zelle ausgeschieden, wodurch es zur Relaxation des Muskels kommt (Dobrev und Nattel 2008; Heijman et al. 2012). Bei

Patienten mit VHF wurden eine Reihe von Veränderungen festgestellt, die zu Störungen der Calcium-Homöostase führen. Es wurde unter anderem eine Reduktion des L-Typ Calciumkanalstroms, eine erhöhte Expression von NCX1, vermehrte Aktivität von SERCA2a und eine Sensibilisierung von RYR2 gegenüber Calciumionen, die zu einem vermehrten Calciumausstrom führt, beobachtet (Christ et al. 2004; Dobrev und Nattel 2008; Heijman et al. 2012; Voigt et al. 2012; Voigt et al. 2014). All diese Modifikationen können entweder zu späten Nachdepolarisationen (DAD) oder zu frühen Nachdepolarisationen (EAD) führen und somit zur Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF beitragen.

Auch wurden Veränderungen der Kaliumkanalströme, wie eine Hochregulation des einwärtsgerichteten Kaliumkanals $K_{ir2.1}$, die zu einem Anstieg von I_{K1} führt (Gaborit et al. 2005), eine Abnahme des transienten auswärtsgerichteten Kaliumstroms I_{to} (Nattel et al. 2007), eine Reduktion des ultraschnellen verzögerten gleichgerichteten Kaliumstroms I_{Kur} (Nattel et al. 2008), ein Anstieg des langsamen verzögerten gleichgerichteten Kaliumstroms I_{Ks} (Caballero et al. 2010) und eine reduzierte Expression von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen kleiner Leitfähigkeit (SK) beobachtet (Yu et al. 2012). Darüber hinaus wurde eine Hochregulation des Tandem von P-Domänen in einem schwach einwärts gleichgerichteten K^+ Kanal (TWIK)-verwandten säureempfindlichen Kaliumkanals 1 (TASK-1) bei Patienten mit VHF beobachtet (Schmidt et al. 2015; Schmidt et al. 2017), die im Abschnitt 1.2.1 näher beschrieben wird. Je nach Regulationsmechanismus führen diese Veränderungen der verschiedenen Kaliumströme zu einer Verlängerung oder Verkürzung der Aktionspotentialdauer (APD) und fördern damit VHF in diesen Patienten.

Die Umbauprozesse betreffen jedoch nicht nur Ionenkanäle sondern auch andere Strukturen, die an den elektrischen Prozessen im Herzen beteiligt sind. Beispielsweise ist auch die Expression von Connexin43 unter VHF reduziert (Bikou et al. 2011).

1.1.1.2. Strukturelle Umbauprozesse

Neben den elektrischen Umbauprozessen finden auch strukturelle Veränderungen der Zellen statt, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF beitragen. Ein bedeutender Prozess hierbei ist die Fibrose, ein Vorgang, bei dem entweder Fibroblasten tote Kardiomyozyten in Folge von Apoptose oder Nekrose ersetzen oder bei dem es zu einer vermehrten Proliferation von Fibroblasten im perivaskulären Raum und im Perimysium kommt, mit anschließender Umwandlung zu Myofibroblasten und Ansammlung von extrazellulärer Matrix (Weber et al. 2013; Travers et al. 2016; Nattel 2017). Durch diese Umwandlung wird die Verbindung zwischen den Muskelzellen gestört und es kommt zur Ausbildung von Barrieren, die die Reizweiterleitung stören und somit VHF begünstigen (Burstein et al. 2009; Nattel 2017). Auslöser der Fibrose können unter anderem Seneszenz, Herzdysfunktion, Mitralklappenerkrankungen und Myokardischämie sein (Burstein und Nattel 2008).

Weiter makroskopische Veränderungen, die zur Pathologie von VHF beitragen können, sind Amyloidose, Fetteinlagerungen und Hämochromatose (Leone et al. 2004; Röcken et al. 2002; Saito et al. 2007; Griffin et al. 1950). Bereits 1955 wurde ein Zusammenhang zwischen der Größe der Atrien und dem Auftreten von VHF beschrieben (Fraser und Turner 1955). Später konnte in einer großen Studie mit über 5000 Probanden ein ausgeprägter

Zusammenhang zwischen der Größe des linken Vorhofs und dem Auftreten von VHF gezeigt werden (Psaty et al. 1997). Ob jedoch atriale Dilatation die Ursache für VHF oder eine Folge davon ist, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, da viele der Risikofaktoren für VHF auch unabhängig davon zur Dilatation des linken Vorhofs führen (Schotten et al. 2003; Wijesurendra et al. 2016; Delgado et al. 2017). Fest steht auf jeden Fall, dass ein *circulus vitiosus* aus VHF und Dilatation entsteht, da es durch VHF zu atrialen Umbauprozessen kommt, die wiederum zur atrialen Dilatation führen, welche wiederum als Substrat für VHF dienen (Corradi 2014).

1.1.1.3. Veränderungen des autonomen Nervensystems

Nicht nur elektrische und strukturelle Umbauprozesse sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF beteiligt, sondern auch Veränderungen des autonomen Nervensystems (ANS) (Nattel und Harada 2014). Eine Aktivierung des ANS kann die atriale Elektrophysiologie bedeutend verändern und somit zur Auslösung von VHF führen (Chen et al. 2014). Weiterhin zeigt sich die Bedeutung des ANS auch darin, dass das Auftreten von VHF einem circadianem Rhythmus unterliegt (Viskins et al. 1999). In tierexperimentellen Versuchen konnten gezeigt werden, dass durch Manipulation des ANS das Auftreten von VHF beeinflusst werden konnte (Richer et al. 2008; Tan et al. 2008; Shen et al. 2011). Des Weiteren wurde unter VHF eine abnormale autonome Innervation festgestellt, sowohl im Tiermodell als auch in histologischen Schnitten von Patienten mit chronischem VHF (Change et al. 2001; Nguyen et al. 2009).

Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht abschließend geklärt, jedoch führt eine Aktivierung des ANS zu einem erhöhten Strom der L-Typ Calciumkanäle, einer höheren Öffnungswahrscheinlichkeit von RYR2 und zu einer Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und Proteinkinase A (PKA) vermittelten erhöhten Calciumkonzentration im sarkoplasmatischen Retikulum (Nattel und Harada 2014). Hierdurch wird das Auftreten von DAD gefördert, wodurch ANS Aktivität zur Entstehung von fokalen Erregungszentren und somit VHF beiträgt (Nishida et al. 2011b; Choi et al. 2010). Wobei auch an dieser Stelle wieder von einem *circulus vitiosus* gesprochen werden kann, da VHF zu einer gesteigerten autonomen Innervation führt, die wiederum zum Auftreten und Erhalt vom VHF beiträgt (Nattel und Harada 2014; Nishida et al. 2011a; Chen et al. 2014; Linz et al. 2019).

1.1.1.4. Genetische Disposition

In einer Subanalyse der Framingham Heart Study konnte gezeigt werden, dass Kinder von Eltern mit VHF ein erhöhtes Risiko haben, selbst zu erkranken (Fox et al. 2004; Lubitz et al. 2010). Auch in anderen Kollektiven konnte eine familiäre Häufung gezeigt werden, die auf eine genetische Disposition hindeutet (Arnar et al. 2006; Ellinor et al. 2005). Durch die Identifizierung von genetischen Mutationen, die mit einer gesteigerten Rate an VHF zu erkranken assoziiert sind, konnte dies bestätigt werden. Als eine der Ersten wurde eine autosomal dominant vererbte Mutation im *KCNQ1* Gen entdeckt, die zu einem erhöhten Kaliumstrom führt und somit zu einer hereditären Häufung von

VHF (Chen et al. 2003). Im Laufe der Jahre wurden viele weitere Mutationen in Genen, die Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren, myokardiale Strukturelemente, Signalproteine und verschiedene andere Proteine codieren, identifiziert (Fatkin et al. 2017). Hierbei sind Gene wie *ZFHX3*, *PITX2* und *KCNN3* zu nennen, die zum gesteigerten Auftreten von familiären VHF führen (Gudbjartsson et al. 2007; Gudbjartsson et al. 2009; Benjamin et al. 2009; Ellinor et al. 2010).

Der große Einfluss, den die Genetik auf die Entstehung von VHF hat, konnte auch in einer Studie mit dänischen Zwillingen eindrucksvoll belegt werden. Hierbei zeigte sich in Zwillingspaaren, bei denen einer bereits an VHF erkrankt ist, dass die Wahrscheinlichkeit des anderen, selbst zu erkranken, bei eineiigen Zwillingen gegenüber zweieiigen verdoppelt ist. In diesem speziellen Kollektiv wurde die Vererbbarkeit von VHF mit 62 % angegeben (Christophersen et al. 2009). Dies bestätigt einmal mehr, dass genetische Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von VHF spielen (Weng et al. 2017; Roselli et al. 2020).

1.1.2. Vorhofflimmertherapie gemäß Leitlinien

Es existieren zwei Therapieansätze mit grundsätzlich unterschiedlicher Herangehensweise zur Behandlung des VHF. Zum einen die Rhythmuskontrolle (Abschnitt 1.1.2.1) und zum anderen die Frequenzkontrolle (Abschnitt 1.1.2.2). In den folgenden Absätzen wird auf die beiden Strategien näher eingegangen und auch die begleitende gerinnungshemmende Therapie wird betrachtet, wobei für konkrete Behandlungsanweisungen auf einschlägige Leitlinien der entsprechenden Fachgesellschaften verwiesen wird.

1.1.2.1. Rhythmuskontrolltherapie

Um das Ziel der Rhythmuskontrolle zu erreichen, die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des SR, stehen drei unterschiedliche Ansätze zur Verfügung. Die ersten beiden sind die Kardioversion durch Medikamente (pharmakologische Kardioversion (pCV)) und durch elektrischen Strom (elektrische Kardioversion (eCV)), der dritte Ansatz ist die Ablation von Gewebe durch Radiofrequenz- oder Kryoverfahren (Hindricks et al. 2021).

Die eCV beruht auf der Wiederherstellung des normalen Herzrhythmus durch gezielte Applikation eines Stromstoßes. Dieser Stromstoß wird Elektrokardiogramm (EKG)-geleitet verabreicht, um das Risiko des Auftretens von Kammerflimmern zu reduzieren. Die erste erfolgreiche eCV von vier Probanden mit Kammerflimmern wurde 1955 von Zoll et al. (1956) durchgeführt. Bereits wenige Jahre später beschrieb Lown et al. (1963) die erfolgreiche eCV von VHF in 50 Patienten. Die Methode ist sehr effektiv, setzt jedoch die Sedierung der Patienten voraus und erfordert eine engmaschige Kontrolle während der Prozedur und in der Aufwachphase (Morani et al. 2019). Aus diesen Gründen ist für die eCV ein Krankenhaus oder eine vergleichbare Einrichtung mit medizinischem Fachpersonal erforderlich (Furniss und Sneyd 2015).

Obwohl die Prozedur sehr erfolgreich ist, werden je nach Studie hohe Rezidivraten angegeben, die zwischen 30 % in den ersten drei Monaten und bis zu 43 % bereits nach 30 Tagen liegen (De Simone et al. 2003; Zarauza et al. 2006). Nebenwirkungen, die während

bzw. in Folge der Behandlung auftreten können, sind neben den Anästhesie assoziierten Risiken, Verbrennungen der Haut, Entstehung eines AV-Blocks, Sinusknotenarrest und ventrikuläre Arrhythmien (Kowey et al. 1998). Die bei der invasiven eCV durch implantierte Defibrillatoren beobachteten Schädigungen am Myokard sind bei der externen Variante jedoch nicht zu beobachten (Stieger et al. 2018).

Im Gegensatz zur eCV basiert die pCV nicht auf der Verabreichung gezielter Stromstöße, sondern auf der Applikation von pharmazeutischen Wirkstoffen. Bereits 1918 berichtete Frey (1918) über die pharmakologisch aktive Substanz Chinidin und ihren Einsatz in der Terminierung von VHF. Seit dieser Pionierarbeit wurden viele weitere Arzneistoffe erforscht, so dass heutzutage eine Vielzahl verschiedener Antiarrhythmika auf dem Markt verfügbar sind (Hindricks et al. 2021). Eine Übersicht der durch die europäischen und amerikanischen kardiologischen Fachgesellschaften empfohlenen Wirkstoffe zur Behandlung von VHF kann Tabelle A.1 entnommen werden.

Obwohl bei reiner Betrachtung der Kardioversionsrate die pCV der eCV unterlegen ist (Chen et al. 2013; Dankner et al. 2009), eröffnen sich unter Einbeziehung der Tatsache, dass die Patienten nicht sediert werden müssen, mögliche Vorteile gegenüber der eCV (Hindricks et al. 2021). Insgesamt ist die Studienlage auf diesem Gebiet jedoch noch unzureichend und die Wahl der Methode hängt stark vom individuellen Krankheitsverlauf des Patienten ab. Tabelle 1.1 führt die von der Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) empfohlenen Antiarrhythmika zur akuten Kardioversion auf.

Tabelle 1.1.: Übersicht der Antiarrhythmika, die von der ESC für die akute pCV von VHF empfohlen werden (Hindricks et al. 2021). Angegeben ist die Kardioversionsrate und -zeit, die Zielstrukturen sowie die Vaughan Williams Klasse.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2021).

Substanz	Kardioversion		Kanäle	Klasse
	Rate	Zeit		
Amiodaron	5–85 %	6–18 h	I_{Na} , I_{Ca} , I_K , I_{KNa} , I_{KACH} , I_{TASK-1}	III
Flecainid	52–92 %	25–52 min	I_{Na}	Ic
Ibutilid	43–77 %	26–54 min	I_{Na} , I_{Kr}	III
Propafenon	49–85 %	29–287 min	I_{Na}	Ic
Vernakalant	47–93 %	8–16 min	I_{Na} , I_{Kur} , I_{KACH} , I_{Kr} , I_{to}	III

Zur besseren Charakterisierung und Gruppierung der Substanzen nach ihrem Wirkmechanismus wurde 1970 von Vaughan Williams (1984) ein System mit vier Substanzklassen eingeführt. Substanzen der ersten Klasse sind Natriumkanal-Blocker, die entsprechend ihres Einflusses auf die APD und der Stärke des Kanalblocks in drei Subgruppen unterteilt werden (Campbell und Vaughan Williams 1983). Wirkstoffe der Klasse Ia verursachen eine moderate Blockierung der Natriumkanäle und führen zu einer Verlängerung der APD, Klasse Ib eine schwache Blockierung und eine Verkürzung der APD und Klasse Ic eine ausgeprägte Blockierung und keine Veränderung der APD (Lei et al. 2018). Die Arzneistoffgruppe der β -Blocker bilden die Klasse II, sie redu-

zieren die Taktfrequenz des SA-Knotens und verlangsamen die AP-Weiterleitung im AV-Knoten (Dukes und Vaughan Williams 1984). Die Substanzen der Klasse III wirken über eine Blockade von Kalium-Kanälen und führen so zu einer verlangsamen AP-Repolarisation und einer verlängerten effektiven Refraktärzeit (ERP) (Lei et al. 2018). Die Wirkstoffe der Klasse IV sind Calciumkanal-Blocker und reduzieren die Herzfrequenz und AP-Weiterleitung, insbesondere im AV- und SA-Knoten (Lei et al. 2018).

Zur akuten Kardioversion stehen mit Flecainid und Propafenon zwei Vertreter der Klasse Ic Antiarrhythmika zur Verfügung (siehe Tabelle 1.1), deren Wirkmechanismus auf einer Blockade der schnellen Natriumströme (I_{Na}) beruht (Roden und Woosley 1986; Funck-Brentano et al. 1990). Vorsicht ist geboten bei Patienten mit strukturellen Herzerkrankungen, da die Cardiac Arrhythmia Suppression Trail (CAST)-Studie für dieses Kollektiv ein hohes pro-arrhythmisches Risiko und eine erhöhte Sterblichkeit unter der Einnahme von Flecainid zeigen konnte (Echt et al. 1991; Hindricks et al. 2021). Des Weiteren wurden Patienten mit strukturellen Herzerkrankungen von den meisten Studien ausgeschlossen (Khan 2003). Bekannte Nebenwirkungen beider Substanzen sind vor allem pro-arrhythmischer Natur sowie allgemeines Unwohlsein, Kopfschmerzen und Übelkeit (Holmes und Heel 1985; Capucci und Boriani 1995).

Mit Amiodaron, Ibutilid und Vernakalant werden drei Klasse III Antiarrhythmika zur akuten Kardioversion empfohlen, deren Wirkung unter anderem auf einer Blockade von Kaliumkanälen beruht und so zu einer Verlängerung der APD führt. Die älteste dieser Substanzen ist Amiodaron, das eine Vielzahl verschiedene Kanäle inhibiert (siehe Tabelle 1.1) und somit auch als Multi-Kanal Blocker bezeichnet wird (Kodama et al. 1999). Heutzutage ist die Anwendung von Amiodaron auf wenige Indikationen begrenzt, da während der Therapie eine Vielzahl von Nebenwirkungen beobachtet wurden. Die häufigste Nebenwirkung ist Hypothyreose mit einer Rate von bis zu 22 %. Weitere Nebenwirkungen sind unter anderem Pneumotoxizität, Blaufärbung und Photosensitivität der Haut sowie Bradykardie, AV-Block und pro-arrhythmische Effekte, die vor allem unter Dauertherapie auftreten (Goldschlager et al. 2007). Trotz all dieser Nebenwirkungen bleibt Amiodaron immer noch Mittel der Wahl zur Therapie von VHF bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder strukturellen Herzerkrankungen mit einer Klasse I Empfehlung der ESC (Hindricks et al. 2021).

Die Substanz Ibutilid ist ein weiterer Vertreter der Klasse III Antiarrhythmika, deren Wirkung auf einer Blockierung von Kalium- und Natriumströmen (vgl. Tabelle 1.1) beruht und somit zur typischen Verlängerung der APD führt. Als Nebenwirkungen wurden hauptsächlich Torsade-de-pointes-Tachykardien beschrieben, extrakardiale Nebenwirkungen wurden sehr selten beobachtet (Murray 1998).

Vernakalant blockiert Natriumkanäle in einer frequenz- und spannungsabhängigen Weise. Dies führt dazu, dass die Inhibition im Ventrikel mit seiner niedrigen Frequenz geringer ist, während sie im Vorhofgewebe unter VHF mit seiner hohen Frequenz deutlich ausgeprägter ist und zu einer fast ausschließlich vorhofspezifischen Wirkungsweise führt. Neben den Natriumkanälen werden auch verschiedene Kaliumkanäle blockiert (siehe Tabelle 1.1), die ebenfalls selektiv im Vorhof exprimiert werden und daher keine pro-

arrhythmischen Nebenwirkungen im Ventrikel erzeugen (Fedida et al. 2005; Fedida 2007). Es wurde hauptsächlich Hypotension als unerwünschte Wirkung beobachtet, während sich das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien in Studien nicht von der Placebogruppe unterschied (Savelieva et al. 2013).

Neben den fünf beschriebenen Substanzen zur akuten pCV stehen zur rhythmuserhaltenden Therapie nach ESC Leitlinie noch zwei weitere Wirkstoffe zur Verfügung. Zum einen das Amiodaron-Derivat Dronedaron und zum anderen Sotalol (Hindricks et al. 2021). Dronedaron entstand durch Abspaltung der Iod-Atome von der Amiodaron-Struktur und Hinzufügen einer Methansulfonyl-Gruppe, wodurch eine Reduktion der Nebenwirkungen erreicht werden sollte (Nattel und Singh 1999). Während die extrakardialen Nebenwirkungen reduziert werden konnten, muss bei der Anwendung von Dronedaron sehr genau auf Kontraindikationen geachtet werden. Im Besonderen zeigen sich häufig Transaminasenerhöhungen unter Dronedaron Therapie sowie Leberfunktionseinschränkungen (Grimaldi-Bensouda et al. 2018). In verschiedenen Patientengruppen hat sich eine Erhöhung der Mortalität unter Therapie gezeigt und nur in Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem VHF konnte eine Reduktion der Mortalität beobachtet werden (Hohnloser et al. 2009; Connolly et al. 2011; Køber et al. 2008), so dass die Anwendung von Dronedaron auf diese Patientengruppe beschränkt bleiben sollte (Hindricks et al. 2021).

Das Klasse II Antiarrhythmikum Sotalol gehört zur Wirkstoffgruppe der β -Blocker und zeigt in hohen Dosierungen zusätzlich Klasse III Effekte (Hindricks et al. 2021; Edvardsson et al. 1980). Die duale Wirkung beruht auf den unterschiedlichen Eigenschaften der Enantiomeren, wobei beide als Klasse III Antiarrhythmikum wirken und das *R*-Sotalol zusätzlich als β -Blocker (Funck-Brentano 1993). Die Anwendung von Sotalol sollte jedoch sehr sorgfältig überlegt werden, da in einer Metaanalyse eine erhöhte Sterblichkeit festgestellt wurde (Valembois et al. 2019). Unter der Anwendung treten Torsade-de-pointes-Tachykardien in über 2 % der Patienten auf sowie andere pro-arrhythmische Effekte, die vor allem bei höheren Dosierungen vermehrt zu beobachten sind (MacNeil et al. 1993). Insgesamt sollte die Therapie somit nur in Ausnahmefällen in Betracht gezogen und unter sorgfältiger Überwachung durchgeführt werden (Hindricks et al. 2021).

Neben der eCV und pCV existiert die kathetergestützte Ablation als dritte Behandlungsstrategie (Hindricks et al. 2021). Diese Methode basiert auf Beobachtungen von Haissaguerre et al. (1998), dass Auslöseimpulse für VHF von den Pulmonalvenen ausgehen und dass durch deren Ablation eine Terminierung des VHF erreicht werden kann. Bei der Ablation wird mit Hilfe eines Katheters durch Anwendung von Hitze oder Kälte eine gezielte zirkuläre Nekrose von Herzgewebe um die Pulmonalvenen herbeigeführt, das anschließend nicht mehr elektrisch leitfähig ist. Hierdurch soll das impulsauslösende Areal elektrische vom restlichen Herzen isoliert werden, um ein Auslösen von VHF zu verhindern (Haegeli und Calkins 2014). Für die klassische Pulmonalvenenisolation (PVI) konnte gezeigt werden, dass sie der medikamentösen Therapie im Bezug auf den Endpunkt Patienten im SR nach 12 Monaten überlegen ist und eine vergleichbare Komplikationsrate aufweist (Mont et al.

2014). Jedoch sind auch bei der PVI nach 6 Jahren nur noch 40 % der Patienten im SR, so dass die restlichen 60 % eine erneute Prozedur benötigen (Sorgente et al. 2012).

Es gibt drei große Studien zur Katheterablation, die hier kurz angesprochen werden sollen. Zum einen nahmen sich Kuck et al. (2016) in der FIRE AND ICE-Studie der Frage an, ob Kälte in Form der Kryoablation oder Hitze in Form der Radiofrequenzablation überlegen ist im Bezug auf den primären Sicherheitsendpunkt von Tod, Schlaganfälle, transitorischen ischämischen Attacken (TIA), im Zusammenhang mit den Prozeduren stehende kardiale Arrhythmien außer Wiederauftreten von VHF und behandlungsbezogene schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen. Des Weiteren wurde der primäre Endpunkt des Wiederauftretens von VHF, des Auftretens von Vorhofflattern oder Vorhoftachykardien, die Notwendigkeit der Verschreibung von Klasse I oder III Antiarrhythmika und eine benötigte erneute Ablation untersucht (Förnkrantz et al. 2014). Es zeigte sich in der Studie, dass die Kryoablation der Radiofrequenzablation nicht unterlegen ist in Bezug auf den primären Endpunkt, der primäre Sicherheitsendpunkt jedoch in über 10 % der Probanden in beiden Studienarmen erreicht wurde (Kuck et al. 2016).

Die anderen beiden Studien verglichen die Katheterablation mit einer medikamentösen Therapie. In der Catheter Ablation vs. Anti-arrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation (CABANA)-Studie wurde untersucht, ob Katheterablation einer medikamentösen Therapie nach aktuellen Leitlinien überlegen ist. Als primärer Endpunkt wurde die Gesamtmortalität sowie das Auftreten von Schlaganfällen, schwerwiegenden Blutungen und Herzstillstand gewählt (Packer et al. 2018). Es konnte in der Studie jedoch kein signifikanter Unterschied im Bezug auf den Endpunkt gezeigt werden, wobei die niedriger als erwartete Ereignisrate und Wechsel zwischen den Studienarmen bei der Interpretation der Studienergebnisse berücksichtigt werden müssen (Packer et al. 2019).

Die Catheter Ablation vs. Standard Conventional Treatment in Patients with Left Ventricular Dysfunction and Atrial Fibrillation (CASTLE-AF)-Studie hatte ebenfalls den Vergleich von Katheterablation mit medikamentöser Standardtherapie zum Ziel, jedoch in einem eingeschränkten Patientenkollektiv mit linksventrikulärer Dysfunktion. Der primäre Endpunkt war die Gesamtmortalität und eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz, die eine ungeplante Hospitalisierung erforderlich machte (Marrouche und Brachmann 2009). Es zeigt sich, dass zumindest in dem gewählten Patientenkollektiv die Katheterablation überlegen war und zu einer Reduktion der Gesamtmortalität und von ungeplanten Hospitalisierungen führte (Marrouche et al. 2018). Jedoch sind auch die Ergebnisse dieser Studie mit Vorsicht zu interpretieren, da beispielsweise über die Qualität der medikamentösen Behandlung keine Angaben gemacht wurden, sich die Patientengruppen in ihren Charakteristiken signifikant unterschieden und alle eingeschlossenen Probanden in ihrer Vorgeschichte bereits eine fehlgeschlagene antiarrhythmische Therapie hatten oder diese wegen inakzeptabler Nebenwirkungen oder aus sonstigen Gründen nicht durchführen wollten (Bono und Kirchhof 2018).

1.1.2.2. Frequenzkontrolltherapie

Neben der Rhythmuskontrolle steht mit der Frequenzkontrolle eine weitere Behandlungsstrategie zur Verfügung. Oftmals reicht die Regulierung der ventrikulären Herzfrequenz bereits aus, um die Entstehung einer Tachymyopathie zu verhindern und die VHF-Symptomatik zu verbessern. Hierbei sind β -Blocker die Therapie der ersten Wahl in der akuten sowie der andauernden Frequenzkontrolle (Hindricks et al. 2021). Sie sind gut verträglich in allen Altersgruppen, führen zur symptomatischen und funktionellen Verbesserung und erreichen eine Reduktion der Gesamtmortalität in SR-Patienten mit Herzinsuffizienz, die jedoch bei Patienten mit VHF in Frage gestellt wird (Kotecha et al. 2014; Kotecha et al. 2016).

Weitere Substanzen, die für die Frequenzkontrolle in Frage kommen, sind Calciumkanalblocker vom Nicht-Dihydropyridin-Typ als Monotherapie oder in Kombination mit β -Blockern, wobei hier die Herzfrequenz aufmerksam überwacht und auf Anzeichen einer Bradykardie geachtet werden muss (Hindricks et al. 2021). Diese Substanzgruppe, vertreten durch Verapamil und Diltiazem, verlangsamt die Herzfrequenz und ist in der Lage, die typische VHF-Symptomatik zu verringern (Ulimoen et al. 2013).

Eine weitere Option ist die Wirkstoffgruppe der herzwirksame Glykoside, die über eine Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ wirken (Schatzmann 1953). Obwohl die Substanzen seit über 200 Jahren angewendet werden, werden sie immer noch kontrovers diskutiert (Hindricks et al. 2021; Goldberger und Alexander 2014). Dies liegt unter anderem an der schwierigen Datenlage, da Ziff et al. (2015) in ihrer Metaanalyse zeigen konnten, dass Patienten in der Glykosid-Gruppe oftmals mehr Begleiterkrankungen hatten und es somit einen gewissen Auswahlfehler gab, der die höhere Sterblichkeit der Glykosid-Gruppe erklären könnte. Zum heutigen Zeitpunkt werden die herzwirksamen Glykoside noch immer von der aktuellen ESC-Leitlinie empfohlen, wobei eine aufmerksame Überwachung der Plasmaspiegel erfolgen sollte, um eine Intoxikation zu vermeiden (Hindricks et al. 2021).

Falls die bereits genannten Wirkstoffe nicht ausreichend sind, um eine zufriedenstellende Frequenzkontrolle zu erreichen, kann ein Einsatz von Amiodaron in Erwägung gezogen werden. Auf Grund der Vielzahl an extrakardialen Nebenwirkungen sollte für die Frequenzkontrolle jedoch auf diese Substanz verzichtet werden (Hindricks et al. 2021).

Sollte es nicht möglich sein, mit einer medikamentösen Therapie einen zufriedenstellenden Therapieerfolg zu erreichen, kann als Ultima Ratio eine Ablation des AV-Knoten oder His-Bündel durchgeführt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Patienten danach für den Rest ihres Lebens einen Herzschrittmacher benötigen. Aus diesem Grund empfiehlt sich diese Option nur für Patienten, die bereits einen Herzschrittmacher implantiert bekommen haben oder bei denen keine medikamentöse Therapie anschlägt (Hindricks et al. 2021).

Die mit der Frequenzkontrolle zu erreichende, ideale Herzfrequenz ist nicht eindeutig definiert. In der Race Control Efficacy in Permanent Atrial Fibrillation II (RACE II)-Studie wurde ein Schema mit einer milden Kontrolle der Herzfrequenz von 110/min in Ruhe mit einer stringenten Reduktion auf 80/min in Ruhe und auf 110/min nach moderater Anstrengung verglichen. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den

beiden Gruppen im Bezug auf Mortalität und andere kardiovaskulären Ereignisse, wobei die milde Frequenzkontrolle einfacher zu erreichen und im Endpunkt der Lebensqualität nicht unterlegen war (Van Gelder et al. 2010; Groenveld et al. 2011).

1.1.2.3. Antikoagulationstherapie

Wie bereits eingangs beschrieben, leiden VHF-Patienten unter einem 5-fach erhöhtem Schlaganfallrisiko. Aus diesem Grund ist die Therapie mit Antikoagulantien zur Schlaganfallprophylaxe essentieller Bestandteil der Behandlung von Patienten mit VHF. Hierfür stehen zum einen die Vitamin-K-Antagonisten (VKA) mit den Vertretern Phenprocoumon und Warfarin zu Verfügung, zum anderen gibt es die direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) mit den Wirkstoffen Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban (Hindricks et al. 2021).

Die VKA wirken über eine kompetitive Hemmung der Vitamin-K₁-Epoxid-Reduktase, wodurch es zu einer Ansammlung von Vitamin-K₁-Epoxid kommt, da dieses nicht mehr zu Vitamin-K₁ reduziert wird und somit nicht als Co-Faktor für die γ -Glutamylcarboxylase zur Verfügung steht (Park 1988). Dieses Enzym ist für die Carboxylierung und damit verbundene Aktivierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X sowie der Proteine C, S und Z zuständig. Bleibt diese Aktivierung aus, kommt es zu Störungen in der Blutgerinnung (Suttie und Nelsestuen 1980; De Caterina et al. 2013). Auf Grund des Wirkmechanismus kommt es zu einem verzögerten Wirkungseintritt, da die vorhandenen Gerinnungsfaktoren erst abgebaut werden müssen. Die Substanzen haben eine sehr lange Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von über 100 h, daher hält die Wirkung nach Absetzen der Therapie noch einige Zeit an. Mit der Gabe von größeren Mengen Vitamin-K₁ steht für den Notfall jedoch ein Antidot bereit (De Caterina et al. 2013).

Die Anwendung von VKA reduziert das Schlaganfallrisiko um 64 % und die Sterblichkeit um 26 % (Hart et al. 2007). Sie werden daher weltweit noch in der Therapie von vielen Patienten mit VHF eingesetzt, auch weil sie die einzigen Substanzen mit bestätigter Sicherheit in Patienten mit rheumatischen Mitralklappenerkrankungen und künstlichen Herzklappen sind (Hindricks et al. 2021). VKA haben eine geringe therapeutische Breite, wodurch eine Überwachung mit häufiger Korrektur der Dosis erforderlich ist (De Caterina et al. 2013). In vielen Fällen ist daher eine Umstellung auf DOAKs in Betracht zu ziehen (Hindricks et al. 2021).

In verschiedenen Studien hat sich gezeigt, dass Apixaban (Granger et al. 2011), Dabigatran (Connolly et al. 2009), Edoxaban (Giugliano et al. 2013) und Rivaroxaban (Patel et al. 2011) den VKA (gezeigt im Vergleich mit Warfarin) nicht unterlegen sind im Bezug auf die Prophylaxe von Schlaganfällen. Es wurde sogar eine Reduktion der Sterberate um 10 % im Vergleich zu VKA gezeigt (Ruff et al. 2014). Darüber hinaus besitzen die DOAKs eine besser Pharmakokinetik, Wirksamkeit und Sicherheit, besonders im Bezug auf sehr anfällige Patientengruppen, so dass sie von der ESC-Leitlinie als Mittel der ersten Wahl aufgeführt werden (Hindricks et al. 2021).

Die Wirkungsweise von Apixaban, Edoxaban und Rivaroxaban beruht auf einer direkten Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa (Stuart-Prower-Faktor), wodurch eine Umwandlung und damit einhergehende Aktivierung von Faktor II (Prothrombin) in Faktor IIa

(Thrombin) verhindert wird. Dabigatran hingegen wirkt über eine direkte Hemmung des Gerinnungsfaktors IIa (Garcia et al. 2010). Durch die Hemmung bzw. fehlende Aktivierung von Thrombin wird Fibrinogen nicht zu Fibrin umgewandelt und es kommt letztlich nicht zur Bildung von Thromben (Eikelboom und Weitz 2010).

Die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern (TAHs) ist zur Schlaganfallprophylaxe nicht empfohlen (Hindricks et al. 2021). Die Monotherapie mit Aspirin hat sich als ineffizient erwiesen und führte bei VHF-Patienten sogar zu einem erhöhten Auftreten von ischämischen Schlaganfällen (Mant et al. 2007; Själander et al. 2014) und auch die duale Therapie mit Aspirin und Clopidogrel erwies sich als weniger effizient gegenüber der Therapie mit Warfarin bei einem ähnlichen Blutungsrisiko (Connolly et al. 2006).

Neben der medikamentösen Therapie, vor allem bei Patienten mit einer Kontraindikation gegenüber oralen Antikoagulantien oder einem hohen Blutungsrisiko, können invasive Behandlungsmethoden in Betracht gezogen werden. Hierbei wird entweder das linke Herzkatheter interventionell mittels Okkluder Katheter basiert verschlossen oder chirurgisch im Rahmen einer Operation resektiert (Hindricks et al. 2021).

1.1.3. Neue Therapieansätze gegen Vorhofflimmern

Neben den bereits etablierten Therapieansätzen zur Behandlung von VHF gibt es eine Reihe weitere Konzepte, die sich in verschiedenen Stadien der Erforschung befinden (Ravens 2017). Ein Hauptaugenmerk wurde dabei auf Zielstrukturen gelegt, die im Herzen ausschließlich oder zumindest überwiegend in den Atrien exprimiert sind und idealerweise unter VHF eine erhöhte Expression aufweisen (Ehrlich et al. 2007). Eine Reihe von Kaliumkanälen erfüllen diese Anforderungen, so dass auf folgende Kanäle kurz eingegangen wird: spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, *shaker*-verwandte Unterfamilie, Mitglied 5 ($K_v1.5$), einwärtsgerichtete Kaliumkanal, Unterfamilie J, Mitglied 3 ($K_{ir3.1}$)/ einwärtsgerichtete Kaliumkanal, Unterfamilie J, Mitglied 5 ($K_{ir3.4}$) und SK. Der TASK-1-Kanal, der ebenfalls die genannten Anforderungen erfüllt, wird intensiv im Abschnitt 1.2 behandelt.

Neben den in diesem Abschnitt beschriebenen Kaliumkanälen gibt es noch eine Reihe weiterer potentieller Zielstrukturen, die für eine Behandlung von VHF in Betracht kommen. An dieser Stelle seien nur exemplarisch Connexine, Proteine des Calciumhaushalts und Natriumkanäle erwähnt (Antzelevitch und Burashnikov 2009; Dobrev et al. 2012), die jedoch auf Grund des Fokus dieser Arbeit auf Kaliumkanäle nicht näher beschrieben werden.

1.1.3.1. $K_v1.5$ -Kanal-Inhibitoren

Eine vielversprechende Zielstruktur, die lange Zeit erforscht wurde, ist der atrial selektive, spannungsgesteuerte, nach außen gerichtete Kaliumkanal $K_v1.5$ (Fedida et al. 1993). In einem mathematischem VHF-Modell wurde für eine Inhibition des $K_v1.5$ eine Verlängerung der APD vorhergesagt (Courtemanche et al. 1999), jedoch konnten die experimentellen Ergebnisse dies nur teilweise bestätigen (Wettwer et al. 2004; Ravens 2017; Schmidt und Peyronnet 2018). In VHF-Proben konnte die prädiktive Verlängerung der APD

bestätigt werden, jedoch zeigte sich in SR-Proben der gegenteilige Effekt und es kam zu einer Verkürzung der APD verbunden mit dem Auftreten und der Aufrechterhaltung von kreisenden Erregungen, die Arrhythmien auslösen können (Loose et al. 2014). Darüber hinaus ist $K_v1.5$ in Patienten mit chronischem VHF herunterreguliert, wodurch der Erfolg einer Inhibitor-Therapie in Frage gestellt werden kann (Schmidt und Peyronnet 2018; Van Wagoner et al. 1997). Im Einklang mit den bereits erwähnten Daten gibt es bisher keine klinische Studie, die eine Reduktion der Vorhofflimmerlast unter Anwendung von $K_v1.5$ -Inhibitoren zeigen konnte (Ravens 2017; Schmidt und Peyronnet 2018).

1.1.3.2. SK-Kanal-Inhibitoren

Eine weitere potentielle Zielstruktur ist die Gruppe der ebenfalls atrial selektiven SK-Kanäle, die aus den drei Unterformen SK 1, SK 2 und SK 3 besteht (Ravens 2017). Ob die Kanäle jedoch wirklich selektiv in den Atrien exprimiert werden, ist in Frage zu stellen, da SK 1 und SK 2 zwar vermehrt im Atrium exprimiert werden, SK 3 jedoch zu gleichen Teilen in den Ventrikel und im Atrium vorhanden ist (Tuteja et al. 2005). Weiterhin ist unklar, welche Rolle genau die SK-Kanäle in der VHF-induzierten Veränderung der AP-Form spielen. Es wurde sowohl eine Herunter- als auch eine Hochregulation in VHF-Patienten beschrieben (Skibsbjerg et al. 2014; Schmidt und Peyronnet 2018). Folglich wurde unter der Anwendung von SK Inhibitoren sowohl eine Verlängerung der APD mit einhergehendem Schutz gegen kreisende Erregungen als auch proarrhythmische Ereignisse beobachtet (Diness et al. 2010; Hsueh et al. 2013). Somit stellen auch die Daten über die SK-Kanäle deren Eignung als Zielstruktur für eine VHF-Therapie in Frage (Ravens 2017; Schmidt und Peyronnet 2018). Eventuell ändert sich diese Einschätzung jedoch nach Beendigung der momentan noch laufenden Studie NCT04571385, in der AP30663, ein Inhibitor der SK-Kanäle, bei Patienten mit VHF eingesetzt wird (Heijman et al. 2021).

1.1.3.3. $K_{ir}3.1/K_{ir}3.4$ -Inhibitoren

Obwohl der heteromere $K_{ir}3.1/K_{ir}3.4$ nicht ausschließlich in den Atrien exprimiert ist, erfüllt er doch die oben beschriebenen Voraussetzungen. Er trägt zu einem erheblich größeren Teil zum nach innen gerichteten Kaliumstrom in den Atrien als in den Ventrikeln bei. Der Kanal ist unter physiologischen Bedingungen für die vagal gesteuerte und Acetylcholin-vermittelte Verkürzung der atrialen APD verantwortlich (Koumi und Wasserstorm 1994; Machida et al. 2011). Bei VHF-Patienten konnte ebenfalls eine Verkürzung der APD beobachtet werden, ausgelöst durch eine erhöhte Aktivierungswahrscheinlichkeit des Kanals unabhängig von Acetylcholin. Diese konstitutive Aktivität wird durch VHF-bedingte Umbauprozesse im Herzen verursacht (Dobrev et al. 2005). Im VHF-Hundemodell war es möglich, mit $K_{ir}3.1/K_{ir}3.4$ -Inhibitoren einen antiarrhythmischen Effekt zu erzielen, der jedoch in humanen Gewebe nicht reproduziert werden konnte (Cha et al. 2006; Machida et al. 2011; Walfridsson et al. 2015). Eine erste klinische Studie im Menschen zeigte keine Verminderung der VHF-Last, wobei die Dosierung sehr restriktiv gehandhabt werden musste, um zentralnervöse Nebenwirkungen zu vermeiden (Podd et al. 2016). Zusammengefasst lässt sich auch zur VHF-Therapie mit $K_{ir}3.1/K_{ir}3.4$ Inhibitoren

sagen, dass deren mögliche Rolle in Frage gestellt werden kann (Walfridsson et al. 2015; Ravens 2017).

1.2. Der Zwei-Porendomänen Kaliumkanal TASK-1

Bereits im Jahre 1952 wurde durch Hodgkin und Huxley das Vorhandensein von Leckströmen postuliert (Hodgkin und Huxley 1952). Es sollte noch über 40 Jahre dauern, bis die Kalium-Zwei-Porendomänen (K_{2P})-Kanäle als neuste Gruppe der Kaliumkanäle identifiziert und für den Leckstrom verantwortlich gemacht wurden (Goldstein et al. 2001). Die 15 unterschiedlichen Familienmitglieder lassen sich an der gemeinsamen Morphologie erkennen, die pro Untereinheit aus zwei Poren-formenden (P) Schleifen und aus vier transmembranen Domänen (M) bestehen (Goldstein et al. 2005). An der Zellmembran bilden sie funktionelle Hetero- und Homodimere, die durch eine Vielzahl von Faktoren (u.a. Temperatur, Druck, pH-Wert) beeinflusst werden, wobei sie gegenüber bekannten Kaliumkanal-Blockern (u.a. Tetraethylammonium, 4-Aminopyridin, Caesium- und Barium-Ionen) relativ unempfindlich sind (Lesage und Lazdunski 2000; Lesage 2003; Feliciangeli et al. 2015). Die K_{2P} -Kanäle sind beteiligt an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen wie beispielsweise vaskuläre und pulmonale Hypertonie, kardiale Arrhythmien, Nozizeption, Geschmacks- und Temperaturwahrnehmung, Anästhesie, Apoptose, Krebs und Depressionen (Feliciangeli et al. 2015).

In den letzten Jahren hat jedoch besonders ein Mitglied der K_{2P} -Kanalfamilie vermehrt Aufmerksamkeit genossen — der TASK-1-Kanal.

1.2.1. Kardiale Bedeutung

Der TASK-1-Kanal ist von besonderer kardialer Bedeutung, da in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, dass er zu einem großen Teil in die Pathophysiologie von VHF involviert ist (siehe auch Abschnitt 1.1.1). Im Rahmen elektrischer Umbauprozesse, die während der Entstehung und unter dem Einfluss von VHF stattfinden, kommt es zu einer deutlich vermehrten Expression von TASK-1 im Herzen (Barth et al. 2005; Schotten et al. 2011; Schmidt et al. 2015). Dies führt dazu, dass der TASK-1-Strom in Kardiomyozyten von Patienten mit VHF ungefähr 3-fach höher ist als in einer SR-Kontrollgruppe (Schmidt et al. 2015). Der erhöhte Strom wiederum führt zu einer Verkürzung der APD in Patienten mit VHF, wodurch die Entstehung von VHF gefördert wird (Schmidt et al. 2015; Schmidt et al. 2017).

Inhibiert man nun den TASK-1-Strom in isolierten humanen Kardiomyozyten von VHF-Patienten, führt dies zu einer Verlängerung der APD um bis zu 30 % (Schmidt et al. 2015). Dies konnte durch gezielte Applikation von A293, einem spezifischen TASK-1-Inhibitor, gezeigt werden. Während in isolierten Kardiomyozyten der SR-Kontrollgruppe keine Effekte zu beobachten waren, zeigte sich in Zellen von VHF-Patienten eine Verlängerung der APD auf Werte ähnlich der Kontrollgruppe (Schmidt et al. 2015).

Diese Beobachtungen konnten auch in einem Computermodell einer humanen atrialen Kardiomyozyte bestätigt werden. Hierfür wurde das bereits etablierte Modell von Grandi

et al. (2011) um den TASK-1-Strom erweitert, woraufhin die APD-Verkürzung durch TASK-1 Hochregulierung und die daraus resultierenden pro-arrhythmogenen Effekte gezeigt werden konnten (Schmidt et al. 2015; Schmidt et al. 2017).

Weiterhin ist der Kanal im humanen Herzen fast ausschließlich in den Atrien exprimiert (Limberg et al. 2011; Schmidt et al. 2015; Schmidt et al. 2017). Auf Boten Ribonukleinsäure (mRNA)-Ebene zeigte sich eine deutlich stärkere Expression im Vergleich zu den Ventrikeln (Schmidt et al. 2015). Zusammen mit der auf VHF beschränkten Wirkungsweise der TASK-1-Inhibitoren, führt die spezifische Expression in den Atrien dazu, dass der TASK-1-Kanal eine vielversprechende, neue Therapieoption für die VHF-Therapie ist, da unter anderem keine ventrikulären Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Zur Bestätigung der Wirkung und Effizienz einer TASK-1 basierenden VHF-Therapie, wurden in einem etablierten Schweinemodell (vgl. Abschnitt 2.7) verschiedene Ansätze getestet (Schmidt et al. 2019; Wiedmann et al. 2020; Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2022a). Durch Implantation eines Zweikammer-Herzschrittmachers und anschließender Stimulation der Vorhöfe wurde VHF ausgelöst und es kommt zu dem bereits im Menschen beobachteten Phänomen der APD-Verkürzung. Eine Inhibition des TASK-1-Stroms durch pharmakologische Substanzen (Wiedmann et al. 2020; Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2022a) sowie eine Herunterregulation des TASK-1-Kanals durch eine spezifische kleine eingreifende RNA (siRNA) (Schmidt et al. 2019) führte zu einer Verlängerung der APD, vergleichbar der Kontrollgruppe ohne VHF. Ebenfalls wurde eine signifikante Reduktion der Vorhofflimmerlast beobachtet.

1.2.2. Rolle bei anderen Erkrankungen

Neben der Expression im Herzen wird der TASK-1-Kanal auch noch in verschiedenen anderen Organen exprimiert, wie zum Beispiel Lunge, Niere, Prostata, Pankreas und Gehirn (Lesage und Lazdunski 2000; Williams et al. 2013). In der Lunge wird TASK-1 mit der Pathophysiologie von pulmonaler Hypertonie (PH) in Verbindung gebracht und in den Chemorezeptoren im Gehirn mit Schlafapnoe.

1.2.2.1. Pulmonale Hypertonie

PH ist definiert als ein Anstieg des durchschnittlichen pulmonal arteriellen Drucks auf mehr als 20 mmHg und ein pulmonaler Gefäßwiderstand von größer gleich 3 Wood-Einheiten (Simonneau et al. 2019). Die Ursache von PH liegt in einem Umbauprozess der Pulmonalarterien, wodurch es zu einer Vasokonstriktion in Verbindung mit einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes und einer Zerstörung von Pulmonalarterien und -arteriolen mit geringem Widerstand kommt (Crosswhite und Sun 2014; Thompson und Lawrie 2017). Letztendlich führt das Fortschreiten der Erkrankung zu Rechtsherzinsuffizienz und schließlich zum Tod mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 68 % (Humbert et al. 2004; Gaine und McLaughlin 2017; Hurdman et al. 2012).

Während des Umbauprozesses kommt es vor allem zu einer überschießenden Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC), möglicherweise ausgelöst durch verminderte Aktivität von Kalium-Kanälen. Diese reduzierte Kanalaktivität wird

mit erhöhter Apoptoseresistenz, Zellproliferation und Vasokonstriktion in Verbindung gebracht, die letztlich zu anfangs erwähnten Umbauprozessen führt (Boucherat et al. 2015; Olschewski et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von TASK-1 in isolierten, primären PASMC zu einer Depolarisation der Zellen und somit einem höheren pulmonalen Muskeltonus führt (Olschewski et al. 2006). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Mutationen, die zu einem verringerten TASK-1-Strom führen oder zu einem vollständigen Funktionsverlust, in Patienten PH auslösen (Ma et al. 2013; Navas Tejedor et al. 2017; Cunningham et al. 2019).

Weiterhin ungeklärt ist jedoch die Frage, ob eine pharmakologische Inhibition von TASK-1 auch zu PH führen kann (Olschewski et al. 2016; Schmidt et al. 2016; Wiedmann et al. 2021). Der endogene TASK-1-Inhibitor Endothelin-1 kann PH induzieren, sowie Dasatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der zur Inaktivierung von TASK-1 führt (Olschewski et al. 2016; Tang et al. 2009; Montani et al. 2012; Seyler et al. 2012; Nagaraj et al. 2013). Diese Daten sind jedoch nicht in *in vivo* Tiermodellen oder Humanstudien bestätigt worden, so dass der letztendliche Effekt einer TASK-1-Inhibition auf den Muskeltonus der Pulmonalmuskulatur noch nicht geklärt ist (Schmidt et al. 2016). Dennoch zeigen diese Entdeckungen, dass der TASK-1-Kanal eine Rolle in der Pathophysiologie von PH spielt und PH als mögliche Nebenwirkung in der VHF-Therapie mit TASK-1-Inhibitoren bedacht werden sollte.

1.2.2.2. Schlafapnoe

Neben seiner Rolle in der Pathophysiologie von PH ist der TASK-1-Kanal auch in der Entstehung von Schlafapnoe involviert, einer Krankheit, die definiert ist als Atempausen während des Schlafens, die länger als 10s sind, öfters als 5-mal pro Stunde auftreten und mit einem partiellen neurologischen Erwachen verbunden sind (Guilleminault et al. 1976). Es gibt drei verschiedene Arten der Schlafapnoe: (I) die OSA, ausgelöst durch eine Verengung bis hin zur vollständigen Blockierung der Atemwege, (II) die zentrale Schlafapnoe (CSA), bei der das Atemzentrum im Hirnstamm unzureichende Atemreize an die Atemmuskulatur sendet, und (III) eine Mischform aus beidem (Laratta et al. 2017; Costanzo et al. 2015; Gastaut et al. 1966). Typische Symptome der Schlafapnoe sind Tagesmüdigkeit, Schlaflosigkeit und Müdigkeit (Laratta et al. 2017; Costanzo et al. 2015). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es unter anderem zu einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen bis hin zum Tod kommen (Hla et al. 2015).

Die spontane Atmung wird über einen Regelkreis gesteuert, der auf Messungen von pH-Wert, Sauerstoffgehalt und CO₂ Partialdruck im Blut beruht. Die Hauptkomponente dabei ist der Anstieg des CO₂ Partialdruckes, da eine Erhöhung um 1 mmHg die Atmung bereits um 20–30 % vermehrt (Feldman et al. 2003). Der Partialdruck wird dabei hauptsächlich von zentralen Chemorezeptoren im Hirnstamm gemessen, wobei diese auf eine Änderung des pH-Wertes reagieren, die durch den Anstieg an gelöstem CO₂ im Blut ausgelöst wird, und nicht direkt den Partialdruck messen (Feldman et al. 2003; Jiang et al. 2005).

Eine Möglichkeit ist, dass die Messung des pH-Wertes über den TASK-1-Kanal erfolgt (Bayliss et al. 2001; Washburn et al. 2002). Der Kanal reagiert empfindlich auf Änderungen

im pH-Wert, ein erhöhter pH-Wert (pH 8.4) führt zu einem signifikanten Anstieg und ein erniedrigter Wert (pH 6.5) zu einer Abnahme des TASK-1-Stromes im Vergleich zum physiologischen pH-Wert (pH 7.4) (Kang et al. 2004; Schmidt et al. 2014). Somit führt eine extrazelluläre Azidose über eine Abnahme des TASK-1-Stromes zu einer Depolarisation der Zellmembran und dadurch zu einer erhöhten Erregbarkeit der Zelle (Wang et al. 2008a). Durch die Depolarisation der Zelle kommt es ebenfalls zu einem Calciumeinstrom über spannungsgesteuerte Calciumkanäle und einer verstärkten neuronalen Aktivität der Chemorezeptoren. Der entstehende Impuls wird anschließend über afferente Neuronen zu den Regulationszentren weitergeleitet.

Bei der Schlafapnoe liegt nun ein Fehler in dem Regelkreis der Atmung vor, der zu einer instabilen Atemkontrolle führt (Hudgel et al. 1998; Younes et al. 2001; Wang et al. 2008a). Eine mögliche Ursache ist eine gesteigerte Expression von TASK-1, wodurch es zu einer erhöhten Sensitivität der zentralen Chemorezeptoren kommt. Dies führt zu einer überschießenden Wahrnehmung von Unterschieden im CO₂ Partialdruck, die letztendlich zu einer Überkorrektur des Regelkreises führt und somit zur Schlafapnoe (Khoo et al. 1982; Khoo 2000; Wang et al. 2008a).

Die Verwicklung von TASK-1 in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen führt dazu, dass eine TASK-1 basierte Therapie bei vielen Krankheiten helfen kann, dabei aber auch mit besonderer Vorsicht vorgegangen werden muss, um die physiologischen Prozesse nicht zu stören.

1.2.3. Modulation und Regulation

In den vorhergehenden Abschnitten wurde bereits die Rolle von TASK-1 in der Pathophysiologie von VHF (siehe Abschnitt 1.2.1) sowie in der Pathophysiologie von PH und Schlafapnoe (vgl. Abschnitt 1.2.2) beschrieben. Zur Behandlung dieser Krankheiten hat sich eine Modulation von TASK-1 als mögliche Therapieoption gezeigt, so dass im Folgenden näher auf bereits bekannte pharmakologische und genetische Beeinflussungsmöglichkeiten sowie die endogene Kontrolle der Expression eingegangen werden soll.

1.2.3.1. Pharmakologische Modulation

Viele der verfügbaren Substanzen wurden ursprünglich als Inhibitoren für den spannungsgesteuerten Kaliumkanal K_v1.5 entwickelt (Kiper et al. 2015). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die K_v1.5-Inhibitoren A1899 (auch bekannt als S20951), A293 (auch bekannt als A1231) und S9947 deutlich potentere Inhibitoren von TASK-1 sind (Knobloch et al. 2002; Knobloch et al. 2004; Putzke et al. 2007b; Streit et al. 2011).

Die Bindung der Inhibitoren an TASK-1 erfolgt sehr selektiv und mit einer hohen Affinität. Darüber hinaus werden sie sehr langsam ausgewaschen und verbleiben über eine lange Zeit an TASK-1 gebunden. Dieser Sachverhalt konnte vor kurzem durch die Veröffentlichung der TASK-1-Kristallstruktur aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die hochaffinen Inhibitoren in einer Art Vorraum unterhalb des Selektivitätsfilters durch ein sogenanntes X-Gate gefangen sind, wodurch sich die niedrigen Auswaschraten erklären las-

sen. (Rödström et al. 2020). Bei der Bewertung von Pharmakokinetik-Pharmakodynamik Studien darf der Einschluss der Inhibitoren nicht außer Acht gelassen werden, da die Substanzen länger an den Kanal gebunden und damit aktiv bleiben als von den Studien vorhergesagt.

In Abschnitt 1.2.2 wurde bereits die kardiale Bedeutung des TASK-1-Kanals beschrieben, daher wundert es nicht, dass eine Reihe von TASK-1-Inhibitoren bereits auf ihre potentielle Verwendung in der VHF-Therapie in verschiedenen Tiermodellen und Humanstudien getestet wurden oder sich in laufenden Studien befinden (siehe Tabelle 1.2). Besonders Tierstudien in Schweinen versprechen eine gute Translation zum Menschen, da das kardiovaskuläre System sehr ähnlich ist und auch der humane TASK-1-Kanal zu 97 % mit dem des Schweines übereinstimmt (Schmidt et al. 2014; Wiedmann et al. 2020). Zusammengefasst zeigen die verschiedenen Studien vielversprechende Ergebnisse für einen Einsatz von pharmakologischen TASK-1-Inhibitoren in der Therapie von VHF, da die Substanzen zum einen in der Langzeitanwendung zur Senkung der Vorhofflimmerlast führten und zum anderen aber auch durch akute Anwendung eine erfolgreiche und schnelle pCV herbeiführen konnten (Wiedmann et al. 2020; Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2022a).

Pharmakologische Substanzen führen jedoch nicht nur zu einer Inhibition des TASK-1-Kanals, sondern können diesen auch aktivieren. Es ist bekannt, dass die Inhalationsanästhetika Halothan, Isofluran und Sevofluran diesen Effekt haben und dass dieser zur lähmenden Wirkung beiträgt (Patel et al. 1999; Putzke et al. 2007a; Lazarenko et al. 2010). Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass Injektionsanästhetika entweder keinen oder nur bei sehr hohen Konzentrationen, die in der normalen Behandlung nicht erreicht werden, inhibitorischen Effekt auf TASK-1 haben (Kindler et al. 1999; Putzke et al. 2007a). Weitere Substanzen, die TASK-1 aktivieren, sind der Phospholipase A2 Inhibitor ONO-RS-082 und der Guanylatzyklase-Aktivator Riociguat, der bereits zur Behandlung der PH eingesetzt wird (Cunningham et al. 2019).

1.2.3.2. Genetische Beeinflussung

Neben der Modulation von TASK-1 durch pharmakologisch aktive Substanzen ist es auch möglich, den Kanal in seiner Expression zu modulieren. Durch den Transfer von einer anti-TASK-1 siRNA mittels Adeno-assoziierte Viren (AAV) konnte die VHF-vermittelte Hochregulation von TASK-1 verhindert werden. Hierfür wurde bei Schweinen, wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben, VHF ausgelöst. Während der Operation wurde der Behandlungsgruppe die AAV mit mehreren Injektionen direkt in beide Atrien injiziert, während die Kontrollgruppe keine Behandlung bekam. Nach der 14-tägiger Beobachtungsdauer zeigte sich, dass die Behandlungsgruppe TASK-1-Level vergleichbar zur Kontrollgruppe hatte und dass die Vorhofflimmerlast signifikant reduziert war (Schmidt et al. 2019). Es konnte somit gezeigt werden, dass mittels siRNA eine Herunterregulation von TASK-1 *in vivo* erfolgen kann.

Tabelle 1.2.: Liste der TASK-1-Inhibitoren, die in Tiermodellen oder Humanstudien auf eine mögliche Nutzung in der Therapie von Vorhofflimmern hin getestet wurden. Die IC_{50} -Werte für den humanen TASK-1-Kanal sind in den heterologen Expressionsmodellen der *Xenopus laevis* Oozyten (XO), chinesischen Hamster Ovarzellen (CHO) oder humanen embryonalen Nierenzellen (tsA201) bestimmt worden. Für die IC_{50} -Messungen von Doxapram in *X. laevis* Oozyten wurde TASK-1 von Ratten verwendet, zum Zeitpunkt als das Promotionsvorhaben gestartet wurde, waren noch keine Messungen des humanen TASK-1 in Oozyten veröffentlicht. Mittlerweile wurden Messungen des humanen TASK-1 basierend auf Daten, die im Rahmen des Dissertationsvorhabens entstanden sind, veröffentlicht (Wiedmann et al. 2022a). Die Daten sind bereits hier aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt (kursiv), werden jedoch in Abschnitt 3.2.1 ausführlich dargestellt.

AERP: atriale effektive Refraktärzeit; DOCTOS: Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie; IC_{50} : halbmaximale inhibitorische Konzentration; pCV: pharmakologische Kardioversion; VHF: Vorhofflimmern.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2021).

Substanz	Zelluläre Studien	Tiermodelle	Klinische Studien
A1899 (S20951)	IC_{50} 0.04 μM (XO) ¹ IC_{50} 0.01 μM (CHO) ¹	Verlängerte AERP ^{2,3} Reduzierte Vulnerabilität ^{2,3}	
A293 (AVE1231)	IC_{50} 0.22 μM (XO) ⁴ IC_{50} 0.25 μM (XO) ⁵	Reduzierte VHF-Last ^{6,7} Akute pCV ^{6,7} Rhythmuskontrolle ^{6,7} Verlängerte AERP ⁶⁻⁸	Phase I - unpubliziert ⁹
AVE0118	IC_{50} 0.603 μM (XO) ⁹	Verlängerte AERP ³ Reduzierte Vulnerabilität ³	Phase IIa - unpubliziert ¹⁰
Doxapram	IC_{50} 0.41 μM (XO) ¹¹ IC_{50} 4.0 μM (tsA201) ¹² <i>IC_{50} 0.98 μM (XO)¹³</i>	Reduzierte VHF-Last ¹³ Akute pCV ¹³ Rhythmuskontrolle ¹³ Verlängerte AERP ¹³	Phase Ib/IIa - fortlaufend ¹⁴ (DOCTOS)
S9947	IC_{50} 0.2 μM (XO) ⁹	Verlängerte AERP ^{2,3} Reduzierte Vulnerabilität ^{2,3}	

¹ Streit et al. (2011)

² Knobloch et al. (2002)

³ Knobloch et al. (2004)

⁴ Putzke et al. (2007b)

⁵ Schmidt et al. (2015)

⁶ Wiedmann et al. (2020)

⁷ Wiedmann et al. (2021)

⁸ Wirth et al. (2007)

⁹ Kiper et al. (2015)

¹⁰ Kambayashi et al. (2020)

¹¹ Cotten et al. (2006) (Ratte)

¹² Cunningham et al. (2020)

¹³ Wiedmann et al. (2022a) (Human)

¹⁴ Peyronnet und Ravens (2019)

1.2.3.3. Endogene Regulation

Abgesehen von der Regulierung durch extern zugeführte Substanzen, wird der TASK-1-Kanal auch endogen reguliert. Im Abschnitt 1.2.1 wurde bereits beschrieben, dass der Kanal bei Patienten mit VHF hochreguliert ist. In Expressionsdaten aber auch bei funktionellen Messungen konnte gezeigt werden, dass die TASK-1-Level bei SR-Patienten am niedrigsten sind und über paroxysmales hin zum chronischem VHF stetig ansteigen (Schmidt et al. 2015). Es wurde allerdings auch beobachtet, dass mit abneh-

mender linksventrikulärer Pumpfunktion die Expression von TASK-1 ebenfalls sinkt, so dass Patienten mit chronischem VHF und hochgradig reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion ähnliche TASK-1-Level haben wie Patienten mit SR und normaler Pumpfunktion (Schmidt et al. 2017). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung der Expression von TASK-1 auf Ebene der mRNA durch micro Ribonukleinsäure (miRNA). Dieser Mechanismus ist jedoch ein elementarer Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wird daher im nachfolgenden Abschnitt (Abschnitt 1.3) detailliert beschrieben.

Neben der unterschiedlich ausgeprägten Expression, unter anderem abhängig von VHF-Status und linksventrikulärer Pumpfunktion, kommt es auch zu einer Regulation auf funktioneller Ebene durch den pH-Wert (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2). Beim physiologischen pH-Wert von 7.4 zeigt der TASK-1-Kanal nur die Hälfte seiner maximalen Aktivität und kann durch Azidose inhibiert und durch Alkalose aktiviert werden (Olschewski et al. 2017). Dieser Effekt beruht vor allem auf der Protonierung eines einzelnen Histidins in Position H98 der ersten extrazellulären Schleife (Morton et al. 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit saurerem pH-Wert die Selektivität gegenüber K^+ -Ionen verloren geht und auch Na^+ -Ionen durch den Kanal transportiert werden (Ma et al. 2012).

Der TASK-1-Kanal wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert (Olschewski et al. 2017). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Inhibition des TASK-1-Stromes und somit zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Zelle (Talley et al. 2000). Der genaue Signalweg, über den diese Inhibition erfolgt, ist noch nicht abschließend geklärt. Sehr wahrscheinlich ist eine Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) durch die α -Untereinheit des aktivierten G_q -Rezeptors mit anschließender Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) erforderlich (Czirják et al. 2001; Lindner et al. 2011; Schiek et al. 2013). Während ursprünglich vermutet wurde, dass die Modulation des TASK-1-Kanals von den PIP_2 -Spiegel an der Zellmembran abhängt (Czirják et al. 2001), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Regulation davon unabhängig ist (Lindner et al. 2011). Stattdessen konnte DAG als verantwortlicher Botenstoff ausgemacht werden, dessen Herunterregulation durch Enzyme zu einer verminderten Inhibition von TASK-1 führt (Wilke et al. 2014).

Neben der beschriebenen Regulation von TASK-1 über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gibt es noch eine Reihe weiterer Mechanismen. Es wurden eine Rho-Kinase vermittelte Inhibition, die über Phosphorylierung einer Serien-Seitenkette abläuft und durch Endothelin-1 ausgelöst wird, und eine Src-Tyrosinkinase vermittelte Aktivierung beobachtet (Seyler et al. 2012; Nagaraj et al. 2013). Im Mausmodell inhibiert DAG TASK-1 nicht nur direkt, sondern auch über eine Aktivierung der Proteinkinase $C\epsilon$ ($PKC\epsilon$) und nachfolgender Phosphorylierung einer Threonin-Seitenkette (Besana et al. 2004). Weiterhin konnte eine Serum- und Glucocorticoide-induzierbare Kinase (SGK) und Proteinkinase B (PKB) abhängige Regulation gefunden werden, die über einen verringerten Zellmembrantransport von TASK-1 zu einem reduzierten Kaliumstrom führt (Rinné et al. 2017).

1.3. miRNA

Bereits im Jahre 1869 gelang es dem Schweizer Arzt Friedrich Miescher aus Eiter Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu isolieren (Miescher 1871). Dieser Entdeckung folgten noch viele weitere bedeutenden Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Molekularbiologie, von denen eine Vielzahl mit einem Nobelpreis gewürdigt wurden. Dennoch sollte es noch bis ins Jahr 1993 dauern, bevor mit *lin-4* die erste miRNA entdeckt wurde (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Seitdem hat sich viel getan auf diesem Gebiet, so dass die miRBase-Datenbank in ihrem aktuellen Stand 2654 reife miRNAs aufführt, wobei bei den meisten die genaue Funktion noch nicht bekannt ist (Ha und Kim 2014; Kozomara et al. 2019). Zusammen mit anderen kleinen Ribonukleinsäuren (RNAs) bilden die miRNAs eine Untergruppe der RNAs und bestehen in der Regel aus 22 Nukleotiden. Sie sind hoch konserviert, nicht-codierend und spielen eine wichtige Rolle in Entwicklungsvorgängen und pathologischen Prozessen in Lebewesen (Bartel 2004; Ha und Kim 2014). In den folgenden Abschnitten wird näher auf Funktion, Regulation und im Besonderen die Rolle der miRNAs bei Vorhofflimmern eingegangen.

1.3.1. Biogenese und Regulation

Die Biogenese der miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess, der einer engen zeitlichen und räumlichen Kontrolle unterliegt, da eine fehlerhafte Regulation mit diversen Krankheitsbildern assoziiert ist (Ha und Kim 2014). Die Transkription der miRNA erfolgt im Nukleus durch die RNA Polymerase II und liefert eine primäre microRNA (*pri-miRNA*) mit einem typischen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und einer 7-Methylguanosin-Cap Struktur am 5'-Ende (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004). Dieser Prozess wird, ähnlich der Transkription von Protein-codierenden Genen, durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise p53, MYC, ZEB1 und ZEB2, positiv sowie negativ reguliert (Kim et al. 2009; Wellner et al. 2009; Krol et al. 2010). Des Weiteren erfolgt eine Kontrolle durch epigenetische Regulatoren wie Methylierung und Histone Modifikationen (Chang et al. 2011; Davis-Dusenbery und Hata 2010).

Die *pri-miRNA* unterläuft mehrere Schritte bis sie schließlich zur reifen miRNA wird (Lee et al. 2002). Direkt nach der Transkription ist sie noch über 1 kb lang und liegt in Form einer Schleife vor, in der die spätere reife miRNA enthalten ist (Ha und Kim 2014). Der Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNase III (*Drosha*) und dem Doppelstrang-RNA-bindenden Protein DiGeorge Syndrom kritische Region 8 (*DGCR8*), maturiert die *pri-miRNA* durch Entfernen eines großen Anteil der vorhandenen Basen, so dass am Ende eine ungefähr 65 Nukleotide lange haarnadelförmige Vorläufer miRNA (*pre-miRNA*) erhalten bleibt (Lee et al. 2003; Gregory et al. 2004). Auch bei diesem Prozess gibt es eine Reihe von Regulationsmöglichkeiten. Zum einen regulieren sich *Drosha* und *DGCR8* gegenseitig, *DGCR8* führt über eine Protein-Protein-Interaktion zu einer Stabilisation von *Drosha*, wohingegen *Drosha* zum Abbau der *DGCR8* mRNA beiträgt (Han et al. 2009; Kadener et al. 2009). Zum anderen kommt es zur externen Regulation durch Phosphorylierung und (De-)Acetylierung von *Drosha* und *DGCR8*, wodurch deren Stabilität (Herbert et al. 2013; Tang et al. 2013), Aktivität (Wada et

al. 2012; Cheng et al. 2014) und die Lokalisierung im Zellkern beeinflusst wird (Tang et al. 2010; Tang et al. 2011). Des Weiteren gibt es noch Faktoren, die mit spezifischen pri-miRNA interagieren und deren Prozessierung durch den Mikroprozessor-Komplex beeinflussen bzw. dafür notwendig sind (Davis et al. 2008; Davis et al. 2010).

Nachdem die pri-miRNA durch Drosha und DGCR8 zur pre-miRNA prozessiert wurde, wird diese zur weiteren Maturation mit Hilfe eines Transportkomplexes über eine Kernpore aus dem Nukleus ins Zytoplasma exportiert (Ha und Kim 2014). Der Komplex besteht aus Exportin-5, das die korrekt verarbeitete pre-miRNA erkennt und bindet, sowie dem Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Kernprotein Ras-verwandtes nukleäres Protein (Ran). Der Transport verläuft unter Verbrauch von GTP, das im Zytoplasma hydrolysiert wird und zur Abspaltung der pre-miRNA vom Transportkomplex führt (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004; Yi et al. 2003; Okada et al. 2009). Bisher ist kaum etwas bekannt über Regulationsmechanismen des Transports, jedoch wurden im Zusammenhang mit Krebserkrankungen verschiedene Kinasen identifiziert, die in der Lage sind, diesen Transportmechanismus zu beeinflussen (Ha und Kim 2014; Sun et al. 2016; Wu et al. 2018).

Im Zytoplasma wird die freie pre-miRNA zur fertigen miRNA weiter gereift. Hierbei entfernt eine weitere RNase III (Dicer) die Schleifenstruktur der pre-miRNA, wodurch eine doppelsträngige miRNA entsteht (Ha und Kim 2014). Hierfür interagiert Dicer mit dem Doppelstrang-RNA-bindenden Protein TAR RNA-bindendes Protein (TRBP) und dem Kofaktor PACT (Chendrimada et al. 2005; Haase et al. 2005; Lee et al. 2006; Lee et al. 2013). Wie bereits für die anderen Teilprozesse beschrieben, lässt sich auch dieser Prozess unter anderem durch Phosphorylierung von TRBP regulieren (Paroo et al. 2009). Auch auf mRNA-Ebene findet eine Regulation statt, so hat die mRNA des Dicer Proteins eine Bindestelle für die miRNA let-7, wodurch diese einen negativen Regelkreis bilden (Tokumaru et al. 2008; Forman et al. 2008).

In einem nächsten Schritt wird ein prä-RISC-induzierter Stilllegungs-Komplex (RISC) aus der doppelsträngigen miRNA zusammen mit einem Argonautenprotein (AGO) gebildet (Hammond et al. 2001; Kawamata und Tomari 2010; Kobayashi und Tomari 2016), wobei im menschlichen Körper bisher keine Präferenz bestimmter miRNAs hin zu einem der vier AGOs, bezeichnet als AGO 1–4, gefunden werden konnte (Su et al. 2009; Dueck et al. 2012). Es hat jedoch nur AGO 2 Endoribonuklease-Aktivität und kann die Ziel mRNA direkt abbauen, wohingegen die anderen AGOs für den Abbau der mRNA weitere Faktoren rekrutieren müssen (Liu et al. 2004; Kobayashi und Tomari 2016).

Die Bildung des prä-RISC ist ein Adenosintriphosphat (ATP)-abhängiger Prozess, bei dem eine Konformationsänderung von AGO durch einen Chaperon-Komplex, bestehend aus Hitzeschockkognat 70 (HSC70) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90), herbeigeführt wird, wodurch AGO die doppelsträngige miRNA binden kann (Iwasaki et al. 2010). Um aus dem prä-RISC einen reifen Komplex zu erzeugen, der in der Lage ist, mit mRNA zu interagieren, wird der Begleitstrang der noch doppelsträngigen miRNA entfernt, so dass nur der Leitstrang im fertigen Komplex verbleibt (Diederichs und Haber 2007; Kobayashi und Tomari 2016). In Komplexen, an denen AGO 2 beteiligt ist, kann es zum direkten Abbau des Begleitstrangs kommen, während bei den restlichen AGOs der Doppelstrang

nur getrennt und der Begleitstrang aus dem Komplex entfernt wird (Rand et al. 2005; Ha und Kim 2014). Die Auswahl, welcher Strang Leit- und welcher Begleitstrang ist, erfolgt anhand der thermodynamischen Stabilität, kann sich jedoch auch innerhalb der verschiedenen Gewebe im Körper unterscheiden (Chiang et al. 2010; Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). Die Regulation von AGO erfolgt über eine Vielzahl verschiedener Wege, beispielsweise führt die Phosphorylierung an verschiedenen Serin und Tyrosin Seitenketten je nach Position zu einer verstärkten oder verminderten Aktivität (Zeng et al. 2008; Horman et al. 2013; Ha und Kim 2014) und eine Prolyl-4-Hydroxylierung von AGO2 soll dessen Stabilität erhöhen (Qi et al. 2008).

Neben dem hier beschriebenen Weg der Biogenese, über den der überwiegende Großteil reifer miRNAs erzeugt wird, gibt es noch eine Zahl weiterer Wege, die teilweise allerdings nur miRNA-ähnliche Strukturen erzeugen, weswegen diese hier nicht beschrieben werden und lediglich auf einschlägige Literatur verwiesen wird (Miyoshi et al. 2010; Ha und Kim 2014; Stavast und Erkeland 2019). Ebenfalls nicht unerwähnt bleiben sollen die weiteren Regulationsmechanismen, deren Ziel nicht die Enzyme und Kofaktoren der Biogenese sind, sondern die miRNA selbst. Durch Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP), dem Austausch einzelner Basen im miRNA-codierenden Gen, kann es zu Änderungen in der Biogenese und Zielspezifität der miRNA kommen (Ryan et al. 2010). Durch Uridylierung kann die Prozessierung durch Dicer blockiert und der Abbau der miRNA eingeleitet werden (Heo et al. 2008) und Adenylierung kann sowohl zur Stabilisierung also auch zum Abbau der miRNA führen (Katoh et al. 2009; Backes et al. 2012). Neben dem Anhängen von Uridin- oder Adeninschwänzen an die miRNA, kann es zu Desaminierung eines Adenins kommen, wodurch die Affinität zu Drosha bzw. Dicer reduziert wird (Yang et al. 2006; Kawahara et al. 2007). Auch eine Methylierung von miRNAs, die die Interaktion mit Dicer negativ beeinflusst (Xhemalce et al. 2012), und Nukleasen, die bestimmte pre-miRNAs gezielt abbauen, wurde beschrieben (Suzuki et al. 2011; Upton et al. 2012).

1.3.2. Funktionsweise

Der im vorhergehenden Abschnitt 1.3.1 gebildete reife RISC versetzt die miRNA in die Lage, ihre eigentliche Funktion, die posttranskriptionelle Genregulation, auszuüben. In den meisten Fällen ist entweder der Abbau oder die Unterdrückung der Translation von mRNA das Ziel der Regulation (Bartel 2004). Der zu Grunde liegende Mechanismus basiert auf einer Interaktion der miRNA mit der 3' untranslatierten Region (UTR) der Ziel-mRNA, wobei in selteneren Fällen auch die 5' UTR, die kodierende Sequenz oder die Promotorregionen involviert sein können (O'Brien et al. 2018). Es wurde aber auch beobachtet, dass miRNAs die Genexpression aktivieren bzw. verstärken können (Vasudevan 2012).

Die im RISC gebundene miRNA interagiert mit dem miRNA-Reaktionselement (MRE) der mRNA, wobei je nachdem, wie komplementär die Sequenzen der beiden Strukturen sind, unterschiedliche Prozesse ausgelöst werden (O'Brien et al. 2018). Ist die Basenabfolge der mRNA über die gesamte Länge der miRNA komplementär, dann erfolgt ein Abbau der mRNA durch die Endnukleaseaktivität von AGO 2, wobei dies die Bindung zwischen AGO 2 und miRNA schwächt und den Abbau der miRNA fördert (Ameres et al. 2010; Jo

et al. 2015). In den meisten Fällen ist die Bindung jedoch nicht vollständig komplementär, wodurch die Endnukleaseaktivität von AGO 2 nicht aktiviert wird (Jonas und Izaurralde 2015).

In diesen Fällen wird zuerst das Adapterproteine GW182 in den RISC rekrutiert, wodurch die Ansammlung weiterer Proteine in den Komplex ermöglicht wird (Behm-Ansmant et al. 2006). Als nächstes werden die Poly(A)-Deadenylase Komplexe PAN2-PAN3 und CCR4-NOT akquiriert, die den Poly-A-Schwanz der miRNA entfernen (Christie et al. 2013; Jonas und Izaurralde 2015), gefolgt von DCP2 und assoziierten Proteinen, die die Cap-Struktur abspalten (Behm-Ansmant et al. 2006). Die so bearbeitete mRNA wird anschließend von der Exoribonuklease XRN1 von 5' in 3' Richtung abgebaut (Braun et al. 2012; O'Brien et al. 2018).

1.3.3. Rolle bei Vorhofflimmern

Seit ihrer Entdeckung vor annähernd 30 Jahren, wurde bereits eine Vielzahl an Prozessen identifiziert, die durch miRNAs reguliert werden. Hierzu zählen unter anderem Entwicklungsvorgänge und zelluläre Prozesse, wie Gewebeentwicklung, Zellproliferation, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Metabolismus, Apoptose, Proteinsekretion und virale Infektionen (Orang et al. 2014). Bisher geht man davon aus, dass über 60 % der Gene durch miRNAs reguliert werden (Friedman et al. 2009; Shu et al. 2017). Dabei können an einzelne Gene mehrere verschiedenen miRNAs binden und jede miRNA hat eine Vielzahl an Genen als Zielstruktur (Shu et al. 2017). In Anbetracht der vielen verschiedenen Prozessen an denen miRNAs beteiligt sind, ist es nicht überraschend, dass diese auch an der Pathologie vieler Krankheiten beteiligt sind. Im Folgenden soll die Rolle der miRNA bei VHF näher beschrieben werden, wobei auf Grund der Vielzahl an involvierten Elementen und miRNAs, sowie der ständig neuen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet, nachfolgend nur eine repräsentative Auswahl ohne Anspruch auf Vollständigkeit behandelt werden kann. Für eine vollständige Übersicht alle möglichen Interaktionspartner sei auf einschlägige Literatur verwiesen (Shi et al. 2013; Luo et al. 2015; Komal et al. 2019).

Es gibt mehrere Studien, die zeigen, dass miRNAs eine Rolle in den elektrischen Umbauprozessen unter VHF spielen (Xu et al. 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die miRNA-1 arrhythmogenes Potential hat. Sie wird bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten vermehrt exprimiert und unterdrückt die Translation der Gene *KCNJ2* (kodiert $K_{ir}2.1$) und *GJA1* (kodiert Connexin-43), was zu einer verlangsamten Leitungsgeschwindigkeit und einer Depolarisation der Zellmembran führt (Yang et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde für miRNA-26 eine Herunterregulation in VHF-Patienten entdeckt, die zu einer *KCNJ2* vermittelten Hochregulation von $K_{ir}2.1$ führt, die ebenfalls zu VHF führen kann (Luo et al. 2013). Nicht nur Kaliumkanäle und Zell-Zell-Verbindungen werden durch miRNAs beeinflusst, sondern auch Proteine der Calcium-Homöostase. In Patienten mit VHF wurde eine Hochregulation von miRNA-328 beobachtet, die zu einer reduzierten Expression von spannungsgesteuerten Calciumkanälen führt, über eine Interaktionen mit den Genen *CACNA1C* und *CACNB1*. Somit kommt es zu einer Verkürzung der APD und einer erhöhten Vulnerabilität gegen-

über VHF (Lu et al. 2010). Auch einer Reihe weiterer miRNAs, wie beispielsweise miRNA-208a und miRNA-499, konnte ein Einfluss auf elektrische Umbauprozesse zugeordnet werden (Callis et al. 2009; Ling et al. 2013; Komal et al. 2019; Xu et al. 2020).

Nicht nur bei elektrischen Umbauprozessen spielen miRNAs eine Rolle sondern auch bei strukturellen Umbauprozessen. In Patienten mit VHF ist miRNA-21 vermehrt exprimiert. Dies führt zu einer reduzierten Translation von SPRY1 und dadurch Fibrose der Atrien, die die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF fördert (Adam et al. 2012). Für miRNA-26 wurde ebenfalls ein positiver Zusammenhang mit Fibrose entdeckt, der über eine Regulation von TRCP3 vermittelt ist (Luo et al. 2013). Viele extrazellulären Matrixproteine, wie Kollagen, Fibrillin und Elastin, sind Zielstrukturen von miRNA-29, daher wird auch sie mit Fibrose in Verbindung gebracht (Kriegel et al. 2012; Pandit und Workman 2016; Xu et al. 2020). Darüber hinaus konnten unter anderem auch miRNA-30, miRNA-133 und miRNA-590 als Regulatoren der Fibrose und andere struktureller Umbauprozesse identifiziert werden (Komal et al. 2019; Xu et al. 2020).

Neben ihrer Rolle bei der Regulation von Umbauprozessen und damit als mögliche Zielstrukturen von Therapien, können miRNAs auch als Biomarker dienen (Clauss et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit VHF niedrigere miRNA-21 und miRNA-150 Plasmakonzentrationen haben als eine SR-Kontrollgruppe und dass die Spiegel nach Kardioversion wieder ansteigen (McManus et al. 2015). In einem anderen Studienkollektiv konnten für miRNA-328 niedrigere Konzentrationen im Blut von Patienten mit VHF im Vergleich zur SR-Kontrollgruppe gemessen werden (McManus et al. 2014). In einer weiteren Studie wurde eine Kombination aus vier miRNAs (miRNA-99a-5p, miRNA-192-5p, miRNA-214-3p und miRNA-342-5p), die alle im Blut von VHF-Patienten signifikant hochreguliert sind, als Marker ausgewählt, wobei lediglich eine Sensitivität von 76 % und eine Spezifität von 80 % erreicht wurde (Natsume et al. 2018). Daher bleibt die Frage, ob und welche miRNAs wirklich als Biomarker für VHF geeignet sind, weiterhin offen und bedarf weiterer Forschungsarbeit (Chaulin und Duplyakov 2020).

1.4. Doxapram und Ketodoxapram

In der im Jahre 1878 von Claiborne Robins gegründeten Firma A. H. Robins wurde 1962 die Substanz 1-ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3,3-diphenyl-2-pyrrolidinone erstmals synthetisiert und beschrieben (Ward und Franko 1961; Lunsford et al. 1964). Sie wurden auf der Suche nach Stimulanzen des zentralen Nervensystemes (ZNS) entdeckt und zeigten einen ausgeprägten stimulierenden Einfluss auf den Atemantrieb in Katzen, Hunden und Menschen (Ward und Franko 1961; Canter 1963; Lunsford et al. 1964). Der intern auch als AHR-619 bezeichneten Substanz wurde der bis heute gültige Trivialnamen Doxapram gegeben (Canter 1963; Bruce et al. 1965). Aus dieser Substanz entsteht nach Verabreichung durch metabolische Prozesse der aktive Metabolit Ketodoxapram (Robson und Prescott 1979). Auf beide Wirkstoffe soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.4.1. Anwendung

Doxapram ist in Deutschland nur als Injektionslösung unter der Bezeichnung Dopram® (Carinopharm, Elze, Deutschland) erhältlich. Die Lösung hat eine Konzentration von 20 mg/mL und wird in Ampullen zu 5 mL abgefüllt. Andere Darreichungsformen oder Konzentrationen werden nicht vertrieben (Carinopharm 2021). Dopram® ist zugelassen für die Behandlung von milden Atemdepressionen, die durch Medikamente ausgelöst wurden, zur Behandlung von chronischen Lungenerkrankungen mit akuter Hyperkapnie, zur Anregung der Atmung bei Apnoe oder Atemdepression nach Narkose und bei zentraler Apnoe von Neu- und Frühgeborenen bei unreifen Atemzentren (Carinopharm 2021). Die Anwendung erfolgt stets als intravenöse (*i.v.*) Injektion oder (intermittierende) Infusion, wobei die in der Fachinformation angegebenen Dosierschemata und (Tages-)Höchstmengen beachtet werden müssen.

Durch die Einführung von Narkotika mit verbesserten Wirkungsprofil wurde die Anwendung von Doxapram in vielen Fällen obsolet, so dass es heute nur noch vereinzelt angewendet wird (Yost 2006). Durch die Entdeckung von Cotten et al. (2006), das Doxapram die Ionenkanäle TASK-1 und Tandem von P-Domänen in einem schwach einwärts gleichgerichteten K⁺ Kanal (TWIK)-verwandter säureempfindlicher Kaliumkanal 3 (TASK-3) inhibiert, erlebt die Substanz jedoch eine Renaissance und wurde wieder Mittelpunkt intensiver Forschungsbemühungen, da eine Blockade von TASK-1 mit einer möglichen Anwendung bei Schlafapnoe und VHF (siehe Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2.2) in Verbindung gebracht wird (Yost 2006). Für Ketodoxapram gibt es bisher noch kein Anwendungsgebiet und daher auch kein zugelassenes Arzneimittel.

Unter der Anwendung von Doxapram wurde eine Reihe von Nebenwirkungen beobachtet, wobei diese überwiegend leicht ausfielen. Häufig wurden Kopfschmerzen, Schwindel, Beklemmungen, Husten, Dys- sowie Tachypnoe, Bluthochdruck, Erröten, Schwitzen, Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, Muskelspastik und Harnverhalt beobachtet (Stephen und Talton 1964; Yost 2006). Der beschriebene Anstieg des systemischen sowie des pulmonalen Blutdrucks fiel mild aus, wobei er bei hypovolämischen Zuständen ausgeprägter war als bei normovolämischen (Kim et al. 1971). Die Beeinflussung des Blutdrucks lässt sich über den im Abschnitt 1.2.2.1 beschriebenen Mechanismus erklären. Im Abschnitt 1.2.1 wurde bereits über die kardiale Bedeutung von TASK-1 berichtet, daher ist es nicht verwunderlich, dass auch pro- und antiarrhythmische Effekte unter der Anwendung von Doxapram festgestellt wurden (Huffington und Craythorne 1966; De Villiers et al. 1998; Maillard et al. 2001; Wiedmann et al. 2022a). Zum Nebenwirkungsprofil von Ketodoxapram sind sehr wenig Daten vorhanden, in einer Studie in Lämmern wurde jedoch unter der Gabe keine Nebenwirkungen beobachtet (Bairam et al. 1990).

1.4.2. Pharmakologie

Die Pharmakologie ist untergliedert in zwei Teilbereiche, die Pharmakodynamik und die Pharmakokinetik. Während sich die Pharmakodynamik damit beschäftigt, was ein (Wirk-)Stoff im Körper macht, beschäftigt sich die Pharmakokinetik damit, was der Körper mit diesem macht. In vorherigen Abschnitt 1.2 wurde bereits ausführlich über

den TASK-1-Kanal, seine Regulation durch pharmazeutische Substanzen und deren Rolle bei verschiedenen Krankheiten eingegangen. An dieser Stelle soll nun vor allem auf die Pharmakokinetik und Details zur Pharmakodynamik des TASK-1-Blockers Doxapram und seines Metaboliten Ketodoxapram eingegangen werden.

1.4.2.1. Pharmakodynamik

Erste Studien zum Einsatz von Doxapram in Menschen zeigten geringe Effekte auf die Atmung von Patienten mit Spinalanästhesie, jedoch eine ausgeprägte Erhöhung der Atemfrequenz und des Atemzugvolumens bei Personen, die mit inhalativen Anästhetika behandelt wurden (Stephen und Talton 1964). In atrialen Blutgasanalysen zeigte sich ein erhöhter pH-Wert und verringerter CO₂ Partialdruck, wobei sich die Sauerstoffsättigung ohne externe Sauerstoffgabe nicht veränderte. Darüber hinaus wurde unter Gabe von Doxapram ein Anstieg des Blutdrucks um 10–20 mmHg gemessen sowie eine gesteigerte zerebrale Erregung und ein schnelleres Aufwachen in Patienten beobachtet, die zuvor mit inhalativen Anästhetika oder Barbituraten narkotisiert worden waren (Stephen und Talton 1964; Winnie und Collins 1966; Yost 2006). In einer Studie, die verschiedene Analeptika miteinander verglichen hat, zeigte Doxapram den größten Effekt und führte zu einer starken Erhöhung des Atemzugvolumens und einer leichten Steigerung der Atemfrequenz (Winnie und Collins 1966).

Die genaue Wirkungsweise von Doxapram ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Es gibt sowohl Hinweise auf eine Wirkung an peripheren Chemorezeptoren als auch am Atemzentrum im Hirnstamm (Calverley et al. 1983; Yost 2006). Hinzu kommt, dass sich die Daten von Tier- und Humanstudien teilweise widersprechen. Allgemein erfolgt die Steuerung der Atmung über die Aktivierung von peripheren Chemorezeptoren im Nacken und am Aortenbogen durch Hypoxämie und Azidose, sowie von zentralen Atemzentren im Hirnstamm, durch pH-Wert Änderungen im Liquor als Folge einer Hyperkapnie. Nachfolgend wird der Prä-Bötzinger-Komplex als Teil der ventralen respiratorischen Gruppe stimuliert, der über abwechselnde Aktivierung bzw. Deaktivierung von inspiratorischen und expiratorischen Motoneuronen die Atemmuskulatur und damit die Atmung steuert (Smith et al. 1991; Feldman et al. 2003; Yost 2006).

Für eine Wirkung von Doxapram auf das zentrale Atemzentrum spricht, dass ein Durchtrennen des *Ramus sinus carotici*, dem Nerv, der den Sinus caroticus innerviert, und des Nervus Vagus in Hunden keinen Einfluss auf den Effekt hatte, wohingegen eine Kappung des Rückenmarks auf Höhe von C2 den Effekt blockierte (Ward und Franko 1961). Es konnte auch eine erhöhte Aktivität der inspiratorischen und expiratorischen Neuronen im Hirnstamm von Katzen nach Gabe von Doxapram festgestellt werden (Polak und Plum 1964; Funderburk et al. 1966).

Es konnte jedoch in Experimenten mit Hunden gezeigt werden, dass Doxapram neben einem ausgeprägten Effekt auf zentrale Atemzentren auch periphere Chemorezeptoren stimuliert (Kato und Buckley 1964). In weiteren Studien in Katzen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, wobei hier eine Dosisabhängigkeit beobachtet wurde. Während es bei niedrigen Dosen (0,05–0,25 mg/kg) vor allem zu einer Aktivierung der peripheren Chemorezeptoren der Carotis kommt, die wiederum zentrale Atemzentren

aktivieren, kommt es bei höheren Dosen auch zur direkten Aktivierung der Zentren (Hirsh und Wang 1974). Eine weitere Studie in Katzen zeigte, dass bereits 1 mg/kg Doxapram einen ähnlich stimulierenden Effekt auf die Chemorezeptoren der Carotis hat wie eine ausgeprägte Hypoxämie (Sauerstoffpartialdruck von unter 38 mmHg). Nach Denervation der peripheren Chemorezeptoren konnte dieser Einfluss für Dosen bis zu 6 mg/kg blockiert werden (Mitchell und Herbert 1975). Die beschriebenen unterschiedlichen Effekte bzw. Wirkungsorte könnten folglich zum einen an der verwendeten Dosis liegen, aber auch an den untersuchten Spezies und den genauen Versuchsbedingungen.

Als molekulare Grundlage für den Einfluss von Doxapram auf periphere Chemorezeptoren und zentrale Atemzentren wird unter anderem eine Inhibition von TASK-1 und dem nahen Verwandten TASK-3 vermutet (Yost 2006). In isolierten Hauptzellen (Typ I) des Glomus caroticum von Ratten, den Zellen, die Änderungen im Sauerstoffgehalt, Kohlendioxidgehalt und pH-Wert des Blutes registrieren, wurde ein Kalium-Strom gemessen, der durch Doxapram inhibiert werden konnte (Peers 1991). Wenig später wurde dieser Strom als TASK-1-Strom identifiziert, da seine pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften identisch sind, wobei noch kein Zusammenhang zur Inhibition durch Doxapram hergestellt wurde (Buckler et al. 2000). Des Weiteren konnte die Expression von TASK-1 und TASK-3 in peripheren Chemorezeptoren und in zentralen Atemzentren nachgewiesen werden (Buckler et al. 2000; Yamamoto et al. 2002; Washburn et al. 2003; Wang et al. 2008a).

In diesen Zellen sind TASK-1 und TASK-3 für den Kalium-Hintergrundstrom und somit das Ruhemembranpotential verantwortlich, das die Erregbarkeit der Zellen maßgeblich bestimmt (Olschewski et al. 2017). Die Kanäle werden durch einen sauren pH-Wert und Hypoxie inhibiert, während volatile Narkosemittel und ein basischer pH-Wert zu einer Aktivierung führen (Patel et al. 1999; Kim et al. 2014; Olschewski et al. 2017). Eine Inhibition führt zu einer Depolarisation der Zellen, gefolgt von der Auslösung von APs, die zu einer Stimulation des Prä-Bötzinger-Komplexes führen und schließlich zu einer verstärkten Atmung. Eine Aktivierung der Kanäle führt folglich zu einer Hyperpolarisation von Zellen und einer verminderten Auslösung von APs und somit einer ausbleibenden Stimulation des Prä-Bötzinger-Komplexes und einer verminderten Atmung (Buckler 2015).

Ob nun jedoch TASK-1 und TASK-3 nur essentiell für periphere Chemorezeptoren sind oder auch für zentrale Atemzentren, in denen sie ubiquitär exprimiert werden, ist noch nicht abschließend geklärt. In einem Experiment mit humanen Probanden, die Halothan, ein volatiles Narkosemittel, bekommen haben, konnte gezeigt werden, dass die Reaktion auf Doxapram-Gabe und Hypoxie stark vermindert ist wohingegen die Reaktion auf Hyperkapnie unverändert blieb (Knill und Gelb 1978). Nach heutigem Stand des Wissens stimmt das Experiment mit den Beobachtungen überein, dass TASK-1 und TASK-3 eine große Bedeutung in peripheren Chemorezeptoren und die darüber gesteuerte Reaktion auf Hypoxie haben, für die zentralen Atemzentren und die davon ausgehende Anpassung an Hyperkapnie wahrscheinlich jedoch nur von untergeordneter Rolle sind (Yost 2006; Buckler 2015; Bayliss et al. 2015).

Während bisher nur gezeigt worden war, dass Doxapram einen Einfluss auf die Atmung hat und TASK-1 und TASK-3 eine bedeutende Rolle in der Regulation spielen, konnte durch Cotten et al. (2006) ein direkter inhibitorischer Effekt von Doxapram auf die beiden Kanäle festgestellt werden. Doxapram entpuppte sich als effizienter TASK-1-Inhibitor mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 410 nM und einer IC_{50} von 37 μ M für TASK-3, wobei beide Werte an heterolog exprimiertem Rattenkanälen in *X. laevis* Oozyten gemessen wurden. Diese Werte befinden sich innerhalb der üblichen therapeutischen Plasmalevel und bestätigen somit noch einmal den beschriebenen Mechanismus. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die humanen TASK-1- und TASK-3-Kanäle in etwa gleichstark inhibiert werden. Es wurde für den TASK-1 eine IC_{50} von 4,0 μ M und für TASK-3 von 2,5 μ M gemessen (Cunningham et al. 2020). In der unterschiedlich ausgeprägten Inhibition zwischen Nagetieren und Menschen könnten auch die abweichenden Beobachtungen in der Wirkungsweise von Doxapram begründet liegen.

Doxaprams Metabolit Ketodoxapram ist weitaus weniger charakterisiert als seine Muttersubstanz, bisher wurden noch keine IC_{50} -Werte bestimmt. In einer vergleichenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass Ketodoxapram auch einen Effekt auf die Atmung hat, allerdings ist dieser etwas schwächer ausgeprägt (Bairam et al. 1990). Ebenfalls konnte in Lämmern, nach Denervation der peripheren Chemorezeptoren, gezeigt werden, dass auch der Effekt von Ketodoxapram zum größten Teil auf einer Wirkung an diesen Rezeptoren beruht (Bairam et al. 1991).

1.4.2.2. Pharmakokinetik

Zur Pharmakokinetik von Doxapram gibt es in der Literatur bereits einige Daten, während die Datenlage zu Ketodoxapram — vor allem nach direkter Gabe und nicht als Metabolit — unzureichend ist. Nach intravenöser Gabe wird Doxapram schnell verstoffwechselt, es ist initial ein steiler Abfall der Plasmakonzentration über die Zeit zu beobachten. Nach kurzer Zeit flacht der Verlauf der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve jedoch ab und die Abnahme der Konzentration wird langsamer. Man spricht von einer biphasischen Pharmakokinetik mit einer kurzen initialen (wenige Minuten) und einer längeren terminalen (mehrere Stunden) $t_{1/2}$ (Robson und Prescott 1979; Clements et al. 1979). Bei einer Beobachtungsdauer von über 12 Stunden lässt sich eine dritte, noch flachere Phase erkennen, so dass man auch von einer triphasischen Pharmakokinetik sprechen kann (Clements et al. 1979). Der Metabolit Ketodoxapram ist bereits fünf Minuten nach Beginn der Doxapram Infusion im Blut nachweisbar (Robson und Prescott 1979). Einen Überblick über die bereits publizierten Pharmakokinetikdaten in verschiedenen Spezies gibt Tabelle 1.3. Nach oraler Einnahme von Doxapram beträgt die Bioverfügbarkeit in gesunden Probanden ungefähr 60 % (Robson und Prescott 1979) und in Frühgeborenen geringfügig mehr mit 72–74 % (de Wildt et al. 2005; Flint et al. 2021).

Doxapram wird nur zu einem sehr geringen Anteil unverändert ausgeschieden, lediglich maximal 4 % einer verabreichten Dosis wurden im Urin nachgewiesen. Somit hat die renale Elimination nur einen geringen Anteil an der direkten Ausscheidung von Doxapram (Pitts et al. 1973; Robson und Prescott 1979). Weitaus bedeutender ist die Oxidation

Tabelle 1.3.: Übersicht über die bereits in der Literatur publizierten Daten zur Pharmakokinetik von Doxapram in verschiedenen Spezies nach intravenöser Applikation als Bolusinjektion. $C_{\max}$: maximale Plasmakonzentration; AUC: Fläche unter der Kurve; CL: Clearance; $t_{1/2}$: Halbwertszeit

Spezies	Dosis [mg/kg]	$C_{\max}$ [ng/mL]	AUC [ng/mL*h]	CL [mL/min/kg]	$t_{1/2}$ [h]	
Mensch ¹	1,5	2 600	-	5,2	1,0	intermediär
					5,9	terminal
Mensch ²	1,5	3 000	4 533	5,9	3,4	
Pferd ³	1,1	1 341	1 728	11,1	3,2	
Lamm ⁴	2,5	3 100	5 100	9,0	5,2	
Hase ⁵	5,0	1 515	2 094	18,1	0,5	

¹ Clements et al. (1979)

³ Sams et al. (1992)

⁵ Lin et al. (2011)

² Robson und Prescott (1979)

⁴ Bairam et al. (1990)

zu Ketodoxapram und andere metabolische Prozesse (siehe Abbildung 1.1) (Bruce et al. 1965; Robson und Prescott 1979). In Tieren konnte nachgewiesen werden, dass die Metabolite etwa zu gleichen Teilen über Galle und Fäzes sowie über den Urin ausgeschieden werden (Bruce et al. 1965). Weiterhin liegen Anzeichen dafür vor, dass Doxapram einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen könnte (Robson und Prescott 1979).

Wie anfangs erwähnt, gibt es zur Pharmakokinetik von Ketodoxapram nur sehr wenige Daten in der Literatur. Bairam et al. (1990) verabreichten neugeborenen Lämmern eine *i.v.* Bolusinfusion von 2,5 mg/kg Ketodoxapram und beobachteten eine biphasische Pharmakokinetik. Sie kalkulierten eine terminale $t_{1/2}$ von 2,26 h, eine Clearance (CL) von 14,8 mL/(min kg), eine maximale Plasmakonzentration ($C_{\max}$) von 5 260 ng/mL und eine Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 400 ng/(mL h). Zu anderen Spezies sind keine Daten veröffentlicht. Darüber hinaus sind auch keine Pharmakokinetikdaten zu Doxapram oder Ketodoxapram im Hausschwein publiziert, die für das bereits beschriebene VHF-Modell von großem Interesse wären.

1.4.3. Stereochemie

Die Stereochemie ist ein Teilgebiet der Chemie, das sich mit der dreidimensionalen Struktur von Molekülen und den räumlichen Abläufen von chemischen Reaktionen beschäftigt. Das Gebiet wurde vor über 200 Jahren durch Forschungen von Wollaston (1808) zur tetraedrischen Anordnung von Substituenten um ein Zentralatom begründet. Auf dem weiteren Weg zum heutigen Verständnis bilden die Arbeiten von Louis Pasteur zu Kristallen der Weinsäuren, mit denen er den Begriff der optischen Isomerie und die Verbindung zwischen Chiralität und optischer Aktivität postulierte, einen wichtigen Meilenstein (Flack 2009). Ihm gelang die erste manuelle Racematspaltung, indem er Kristalle der Weinsäure, die nach Auskristallisierung einer racemischen Lösung

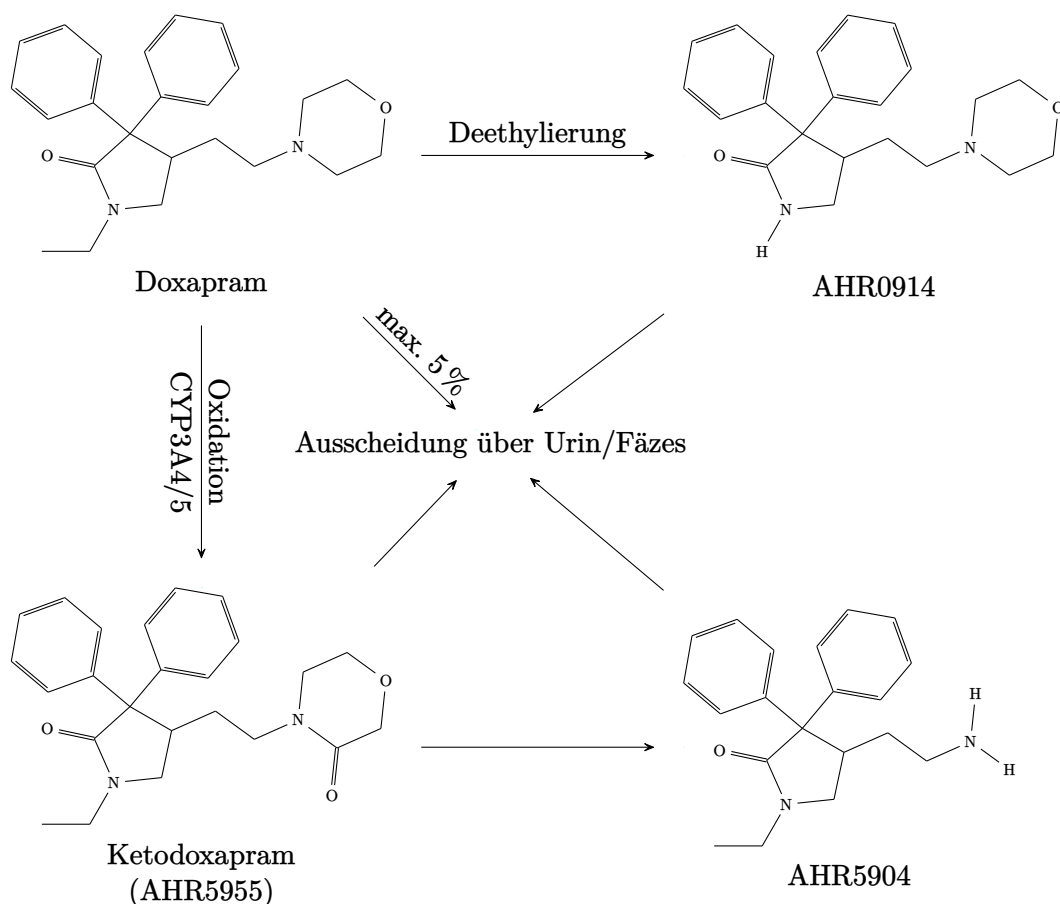


Abbildung 1.1.: Übersicht über den Metabolismus von Doxapram im menschlichen Körper. Der Hauptabbauweg ist die Oxidation zum aktiven Metaboliten Ketodoxapram durch CYP3A4/5 Enzyme, der entweder direkt ausgeschieden wird oder weiter metabolisiert wird zu AHR 5904. Ein weiterer Weg ist die Deethylierung von Doxapram zu AHR 0914. Weniger als 5 % einer verabreichten Doxapram Dosis werden unverändert ausgeschieden.

von Weinsäure entstehen, per Hand trennte. Diese Kristalle verhielten sich unter dem Mikroskop wie Bild und Spiegelbild und drehten in Lösung die Ebene von polarisierten Licht in gegensätzlicher Richtung. Er konnte somit zeigen, dass das chirale Verhalten der beiden enantiomeren Kristalle für die unterschiedliche optische Aktivität verantwortlich ist. Das Aussehen der Kristalle liegt in der unterschiedlichen Konfiguration der Stereozentren begründet, so besteht der eine Kristalltyp nur aus *R,R*-Weinsäure und der andere aus *S,S*-Weinsäure, den beiden Enantiomeren der Weinsäure (vgl. Abbildung 1.2).

Dass die zwei Enantiomere einer Substanz nicht nur unterschiedliche Kristalle bilden und polarisiertes Licht entgegengesetzt drehen, konnte bereits Cushny (1903) an den beiden Enantiomere von Hyoscyamin beobachten, die unterschiedlich stark auf das ZNS von Fröschen wirkten. Er konnte somit die unterschiedliche Bioaktivität der



Abbildung 1.2.: Struktur der zwei Enantiomere der Weinsäure.

beiden Enantiomere aufzeigen. Dass die unterschiedliche Bioaktivität jedoch nicht auf das Ausbleiben von gewünschten positiven Effekten beschränkt ist, sondern auch zu unerwünschten negativen Effekten führen kann, zeigte sich im Zusammenhang mit der Einnahme von Contergan®. Das Medikament Contergan® enthielt den Wirkstoff Thalidomid und war von der Firma Grünenthal (Stolberg im Rheinland, Deutschland) entwickelt worden. Thalidomid bewies sich als sehr effizient in der Behandlung von Morgenübelkeit und als Schlafmittel, weshalb es intensiv zur Anwendung bei Schwangeren beworben wurde. Da die Einnahme nach dem damaligen Stand der Wissenschaft als unbedenklich galt, wurde das Medikament im großen Stil angewendet (Vargesson 2015). Bereits wenige Jahre nach Markteinführung berichtete jedoch Florence (1960) über nervenschädigende Nebenwirkungen und kurz danach zeigten McBride (1961) und Lenz und Knapp (1962) unabhängig voneinander auf, dass Thalidomid zu schweren Missbildungen bei Neugeborenen führt. Insgesamt kam es so weltweit zur Geburt von über 10 000 betroffenen Kindern und zu einer erhöhten Rate an Fehlgeburten (Vargesson 2015).

Die teratogene Wirkung beruht auf der Bindung von Thalidomid an Cereblon und der damit einhergehenden Beeinflussung des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes CRL4 (Ito et al. 2010). Durch die Bindung von Thalidomid kommt es zu einer Änderung der Substratspezifität der Ligase und neben anderen Substraten zu einem Abbau von p63, einem Transkriptionsfaktor, der notwendig ist für die Ausbildung und Entwicklung von Extremitäten (Asatsuma-Okumura et al. 2019; Ito und Handa 2020). Hierdurch kommt es zu den von Mellin und Katzenstein (1962) beschriebenen Fehlbildungen der Arme, Beine und Hände.

Die ursprüngliche Synthese von Keller et al. (1956) und Keller und Kunz (DE Patent 1074584) lieferte Thalidomid als Racemat, somit beinhaltet das Medikament Contergan® sowohl *R*- als auch *S*-Thalidomid (vgl. Abbildung 1.3). Spätere Forschungen zeigten, dass die gewünschte sedierende und antiemetische Wirkung vor allem durch das *R*-Thalidomid (Höglund et al. 1998) und die unerwünschten teratogenen Effekte durch das *S*-Thalidomid ausgelöst werden (Jacques et al. 2015). Dies konnte durch Kristallstrukturanalysen erklärt werden, die zeigten, dass *S*-Thalidomid eine höhere Bindungsaffinität zu Cereblon aufweist als *R*-Thalidomid (Fischer et al. 2014). Aus diesem Grund wurde lange Zeit behauptet, dass die Gabe von reinem *R*-Thalidomid die Missbildungen hätte verhindern können. Da es jedoch im menschlichen Körper zu einer Racemisierung, der Umwandlung des einen Enantiomers in das jeweils andere, kommt, hätte auch diese Strategie nichts verbessert (Eriksson et al. 1995). Somit zeigt der Fall von Thalidomid deutlich die

unterschiedlichen Effekte der Enantiomere auf und weshalb deren intensive Erforschung von großem Interesse für die Arzneimittelforschung ist.

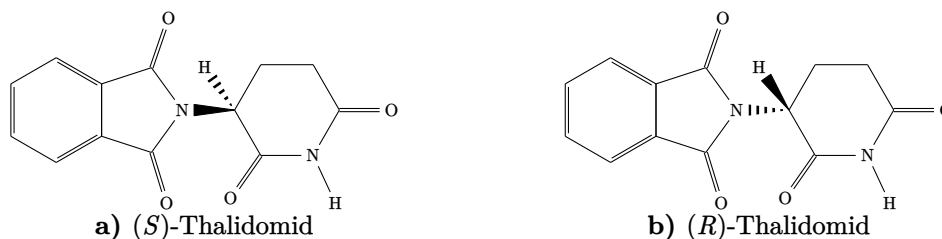


Abbildung 1.3.: Struktur der zwei Enantiomere von Thalidomid.

Analog zu Thalidomid liefert auch die ursprüngliche, von Lunsford et al. (1964) beschriebene Synthese von Doxapram als Produkt ein Racemat. Auf Grund des Stereozentrums am Kohlenstoffatom Nummer Vier im γ -Lactamring existieren zwei Enantiomere des Doxaprams (vgl. Abbildung 1.4a und 1.4b). In Versuchen mit Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass *R*-Doxapram einen deutlich ausgeprägteren Effekt auf das Atemzentrum hat und dort zur Atemantriebssteigerung und zur Reduktion der durch Opioide ausgelösten Atemdepression führt, wohingegen *S*-Doxapram keinen Effekt auf das Atemzentrum zeigte (Golder et al. 2012a; Golder et al. 2012b). Die in Ratten unter Gabe von Doxapram beobachteten Nebenwirkungen (Rhythmusstörungen, Krämpfe, Tod), waren ebenfalls nach Verabreichung von *S*-Doxapram zu sehen (Golder et al. 2012a). Cunningham et al. (2020) zeigte für *R*-Doxapram eine deutlich stärkere Inhibition von TASK-1 als für *S*-Doxapram. Dies erklärt die Unterschiede im TASK-1 vermittelten Effekt am Atemzentrum. Es lässt sich also sagen, dass das *R*-Doxapram das Eutomer, das Enantiomer mit der pharmakologisch gewünschten Wirkung, und das *S*-Doxapram das Distomer, das Enantiomer ohne die pharmakologisch gewünschte Wirkung, ist. In späteren Versuchen mit Ratten zeigte sich jedoch, dass *R*-Doxapram zu einem Blutdruckanstieg von 15–20 % im Vergleich zum Ausgangswert führt und somit auch zu Nebenwirkungen (Golder et al. 2013).

Während über die unterschiedliche Wirkung der Enantiomere von Doxapram bereits einige Forschungsarbeit geleistet wurde, sind zur Stereochemie von Ketodoxapram bisher nur sehr wenige Informationen publiziert worden. Die Metabolisierung von Doxapram zu Ketodoxapram (vgl. Abbildung 1.1) erfolgt durch Oxidation des Morpholinrings und somit zur Entstehung der namensgebenden Ketogruppe (Robson und Prescott 1979). Da bei dieser Reaktion das Stereozentrum im γ -Lactamring nicht beteiligt ist, existieren prinzipiell auch von Ketodoxapram zwei Enantiomere (vgl. Abbildung 1.4c und 1.4d). Ob und in welchem Verhältnis die beiden Enantiomere im menschlichen Körper vorkommen, ist jedoch bisher noch nicht untersucht worden. Darüber hinaus muss noch erforscht werden, ob es auch von Ketodoxapram ein Eutomer gibt oder ob beide Enantiomere in etwa die gleichen Effekte zeigen. Bisher ist lediglich bekannt, dass *R*-Ketodoxapram den Atemantrieb steigert, ohne jedoch einen Vergleich zu *S*-Ketodoxapram zu ziehen (US Patent PCT/US2012/040195).

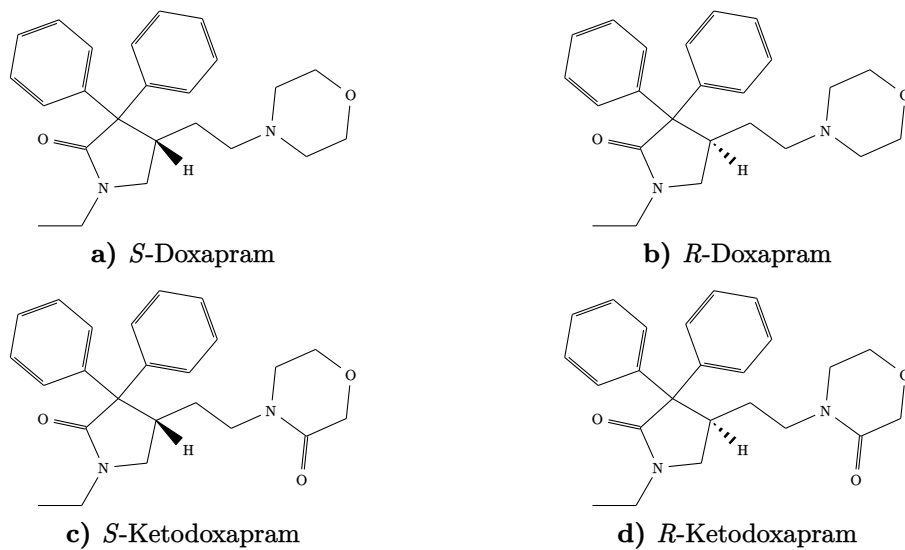


Abbildung 1.4.: Strukturformel von Doxapram (a und b) und seinem aktivem Metaboliten Ketodoxapram (c und d).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

In der heutigen immer älter werdenden Bevölkerung entwickelt sich VHF zu einer großen Belastung für das Gesundheitswesen und für jeden einzelnen Patienten, der dadurch in seiner Leistungsfähigkeit eingeschränkt wird und unter einem erhöhten Risiko von Schlafanfällen leidet. Trotz dieser gesellschaftlichen und individuellen Beeinträchtigung ist die momentan verfügbar Therapie von unzureichender Wirkung und teilweise starken Nebenwirkungen und hohen Risiken geprägt. Eine Ursache hierfür ist das noch ungenügende Verständnis der zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen und die fehlende Identifizierung idealer Zielstrukturen für eine spezifische Therapie. In den letzten Jahren jedoch konnte mit der Entdeckung des TASK-1-Ionenkanals und dessen Inhibition durch die Substanz Doxapram eine vielversprechende Therapieoption entwickelt werden, die sich zum jetzigen Zeitpunkt in der klinischen Testung befindet.

Anknüpfend daran und um ein tieferes Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen und Abläufe zu erhalten, bilden zwei zentrale Themen die Zielsetzung dieser Arbeit:

1. Regulation der TASK-1-Expression durch miRNAs
2. Charakterisierung und Vergleich von Doxapram und Ketodoxapram auf einer elektrophysiologischen und pharmakologischen Ebene

Der erste Projektteil beruht auf der unterschiedlichen Expression von TASK-1 in Patienten mit SR und VHF. Um diesen Sachverhalt näher zu verstehen, werden Herzohrproben von Patienten, die einer Operation am offenen Herzen unterzogen werden, gesammelt.

Aus diesen Proben werden miRNAs isoliert und Unterschiede in der Expression zwischen Patienten im SR und VHF untersucht, wobei eine Substratifizierung nach paroxysmalen und chronischem VHF erfolgen wird. Hierbei identifizierte Kandidaten-miRNAs werden in folgenden Experimenten weiter untersucht. Durch Transfektion humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (IPS) mit miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren wird deren Einfluss auf die TASK-1-Expression sowohl auf mRNA-Ebene durch quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) als auch auf Proteinebene durch Western Blot (WB) näher betrachtet. In einem weiteren Schritt werden funktionelle Messungen in *Xenopus laevis* Oozyten mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) durchgeführt, um den Einfluss der miRNAs auf den TASK-1-Strom zu quantifizieren und die bis dahin gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen. Die Identifizierung von miRNAs, die an der Regulation der TASK-1-Expression beteiligt sind, soll einerseits zum Verständnis dieser Pathologie beitragen und andererseits Eingriffspunkte aufzeigen, um die Hochregulation von TASK-1 zu modulieren und das damit verbundene Auftreten von VHF zu verhindern.

Der zweite Projektstrang behandelt die Charakterisierung von Doxapram und seinem Metaboliten Ketodoxapram. Nachdem die Wirkung von Doxapram im Schweinmodell bereits gezeigt werden konnte, soll nun zum besseren Verständnis der Wirkungsweise dessen Pharmakokinetik untersucht werden. Darüber hinaus ist in der Literatur der Metabolit von Doxapram als aktiv beschrieben worden, daher soll auch dieser näher betrachtet werden, um zu klären, ob Ketodoxapram eine weitere mögliche Therapieoption in einer TASK-1 basierten VHF-Behandlung sein könnte. Hierfür werden die IC₅₀-Werte von Doxapram und Ketodoxapram für den TASK-1-Kanal in Mensch und Schwein bestimmt, um die beiden Substanzen miteinander zu vergleichen, aber auch um mögliche Unterschiede in Dosierung, Wirkung usw. zwischen Mensch und Schwein abschätzen zu können. Zur Überprüfung der Selektivität soll im Anschluss deren Effekte auf weitere Ionenkanäle untersucht werden. Auch ein Vergleich der Wirkung auf humane Kardiomyozyten (HCM) soll mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt werden. Ebenfalls wird der Einfluss von Doxapram und Ketodoxapram auf den pulmonal arteriellen Druck im Schwein untersucht, um der Fragestellung nachzugehen, ob die Anwendung zu PH führt.

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik wird Schweinen Doxapram und Ketodoxapram verabreicht und die Konzentrationen der beiden Substanzen in Blutproben mit einer zu entwickelnden Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)-Methode bestimmt. Aus diesen Daten wird eine Konzentrations-Zeit-Kurve erstellt und pharmakokinetische Parameter berechnet. Darüber hinaus wird die Proteinbindung und die Gehirn-Plasma-Verteilung untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen Doxapram und seinem Metaboliten feststellen zu können. Im Anschluss wird Ketodoxapram in ersten Pilotexperimenten im VHF-Schweinmodell getestet. Hierbei wird untersucht, ob eine Kardioversion durchgeführt werden kann und Ketodoxapram eine mögliche Alternative zu Doxapram sein könnte. Abschließend sollen ersten pharmakokinetische Daten von Probanden der Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie (DOCTOS) gezeigt werden (EudraCT Nr. 2018-002979-17).

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle verwendeten Laborchemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Herstellern Sigma-Aldrich (St. Louis, IL, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) in Analysequalität erworben. Bezugsquellen spezieller Substanzen und Geräte sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.2. Molekularbiologie

Die strukturelle und funktionelle Untersuchung von biologischen Makromolekülen ist das Kerngebiet der Molekularbiologie. Somit befasst sie sich mit der Synthese, Funktion und Struktur von RNA sowie DNA, deren Interaktion miteinander und mit Proteinen. Einige bedeutende Meilensteine auf diesem Gebiet waren die Entdeckung der Nukleinsäurebasen durch den Heidelberger Albrecht Kossel (Kossel 1911), der Nachweis, dass Erbinformation durch DNA übertragen wird (Avery et al. 1944) und die Aufklärung der DNA-Struktur (Watson und Crick 1953). Im Folgenden wird die Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen beschrieben sowie die Umwandlung in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) und anschließender Quantifizierung mit Hilfe der qPCR. Außerdem ist die Klonierung von Ionenkanälen, die anschließende Subklonierung in Expressionsvektoren, deren Amplifikation sowie *in vitro* Transkription in komplementäre Ribonukleinsäure (cRNA) Inhalt dieses Abschnitts. Die Untersuchung von Proteinen wird im Abschnitt 2.3, die Injektion von cRNA in Oozyten im Abschnitt 2.4.3.3 und die elektrophysiologische Untersuchung dieser im Abschnitt 2.5 behandelt.

2.2.1. Isolation von Ribonukleinsäure

Zur Isolation von RNA aus Zellen und Gewebe mit anschließender Untersuchung mittels qPCR wurde TRIzol Reagenz (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Für die Isolation aus Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, 960 μ L TRIzol in jedes Well gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) abgelöst. Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurden 40–50 mg schwere Gewebestücke in 300 μ L TRIzol Reagenz gegeben und mit einem TissueRuptor (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert und weitere 700 μ L TRIzol Reagenz hinzugegeben. Zu den Zell- und Gewebeproben wurde 200 μ L Chloroform hinzu pipettiert, 15 s kräftig geschüttelt und für 2–3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (Centrifuge 5424R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 15 min

bei $12\,000 \times g$ und 4°C bildeten sich drei getrennte Phasen aus. Eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, eine mittlere Interphase und eine obere wässrige Phase, die zur weiteren Fällung und Aufreinigung in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt wurde.

Danach wurde $500\,\mu\text{L}$ Isopropanol zur wässrigen Phase hinzugegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls bei 4°C für 10 min bei $12\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die ausgefallene RNA war als weißes Pellet am Boden des Gefäßes sichtbar. Zur Aufreinigung wurde $1\,000\,\mu\text{L}$ 75 % Ethanol hinzugegeben, das Pellet resuspendiert und anschließend bei 4°C und $7\,500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Vorgang zuerst mit $1\,000\,\mu\text{L}$ 75 % Ethanol und anschließend mit $1\,000\,\mu\text{L}$ 100 % Ethanol wiederholt. Das Pellet wurde für 5–10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in $20\,\mu\text{L}$ nukleasefreies Wasser (NFW) (Ambion, Thermo Fisher Scientific) resuspendiert. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels Photometer durchgeführt (ND-2000, PegaLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und die RNA zur Langzeitlagerung bei -80°C in ein Ultratiefkühlgerät (HeraFreez HFU 400 TV, Thermo Fisher Scientific) überführt.

Die Gewinnung von miRNA aus Gewebe erfolgte mittels mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurde von den tiefgefrorenen Gewebestücken ein 40–50 mg schweres Stück abgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß mit $500\,\mu\text{L}$ Lyse-Puffer gegeben und mit einem Homogenisator homogenisiert. Zur Extraktion der miRNA wurde $50\,\mu\text{L}$ des Homogenisat Additives hinzugegeben, die Flüssigkeit durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden $500\,\mu\text{L}$ einer sauren Phenol-Chloroform-Mischung hinzugefügt und für 30–60 s kräftig durchmischt. Durch einen Zentrifugationsschritt bei $10\,000 \times g$ für 5 min wurde die wässrige von der organischen Phase durch eine sich ausbildende kompakte Interphase getrennt. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 1,25-fachen Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die Lösung wurde anschließend durch Zentrifugation bei $10\,000 \times g$ für 15 s in $700\,\mu\text{L}$ Schritten auf eine Filtersäule geladen und der Durchfluss jeweils verworfen. Danach wurden $700\,\mu\text{L}$ Wasch-Lösung 1 auf die Filtersäule gegeben und durch 5–10 s Zentrifugation bei $10\,000 \times g$ entfernt. Mit $500\,\mu\text{L}$ Wasch-Lösung 2/3 wurde anschließend auf gleiche Weise zweimal gewaschen. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt von 1 min bei $10\,000 \times g$ wurde die verbleibende Flüssigkeit aus der Säule entfernt. Die Filtersäule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die miRNA mit $100\,\mu\text{L}$ 95°C warmen NFW (Thermomixer 5436, Eppendorf) durch Zentrifugation für 20–30 s bei $10\,000 \times g$ von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Konzentration mit einem Photometer bestimmt und die miRNA in ein Ultratiefkühlgerät zur Langzeitlagerung bei -80°C überführt.

Die Isolation von miRNA aus Patientenblut erfolgte mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurde Patientenblut in EDTA-Gel S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen, für 10 min bei $2\,500 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific). Das flüssige Plasma wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei $16\,000 \times g$ und 4°C

zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in einem Ultratiefkühlgerät zur Langzeitlagerung bei -80°C tiefgefroren.

Vor dem Einfrieren wurde ein 200 μL Aliquot für die miRNA-Isolation entnommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 1 000 μL QIAzol Lyse Reagenz hinzugefügt, gut durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μL Chloroform hinzugegeben, für 15 s kräftig durchmischt und anschließend für 2–3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation mit $12\,000 \times g$ bei 4°C für 15 min trennte sich die Probe in eine obere wässrige Phase, eine weiße Interphase und eine untere organische Phase. Die 600 μL der wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 μL 100 % Ethanol gemischt. Anschließend wurde die Lösung in 700 μL Schritten durch Zentrifugation für 15 s bei $8\,000 \times g$ und Raumtemperatur auf eine RNeasy MinElute Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Danach wurde die Säule erst mit 700 μL RWT Puffer und anschließend mit 500 μL RPE Puffer gewaschen, wobei nach dem Auftragen des jeweiligen Puffers für 15 s bei $8\,000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Für einen letzten Waschschrift wurden 500 μL 80 % Ethanol auf die Säule gegeben und für 2 min bei $8\,000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und zum Trocknen bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min zentrifugiert. Die Säule wurde abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die miRNA durch Hinzugabe von 14 μL NFW und Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min eluiert. Nach der Isolation wurde die miRNA bis zur weiteren Verwendung in einem Ultratiefkühlgerät bei -80°C gelagert.

2.2.2. Reverse Transkription

Um RNA und miRNA der Quantifizierung durch eine qPCR zugänglich zu machen, müssen diese in cDNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang der reversen Transkription wurde mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific) für RNA und dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) für miRNA durchgeführt. Die isolierte RNA wurde durch die gentechnisch verbesserte reverse Transkriptase vom Moloney Murines Leukämievirus (M-MuLV) und einer Mischung aus zufälligen Primer-Hexameren und Oligo(dT)₁₈ Primern sowie Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) umgewandelt. Um die eingesetzte RNA vor Zersetzung durch RNasen bei den höheren Reaktionstemperaturen zu beschützen, ist im Reaktionsansatz der RiboLock RNase-Inhibitor enthalten.

Für einen Reaktionsansatz von 20 μL wurden 3 000 ng RNA eingesetzt. Der komplette Ansatz kann Tabelle 2.1a entnommen werden. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde dieser anschließend in einen Thermozykler (Mastercycler ep gradient, Eppendorf) nach einem zuvor festgelegten Temperaturprotokoll (siehe Tabelle 2.1b) inkubiert. Nach Abschluss der Transkription wurde die cDNA mit NFW 1:4 verdünnt und bei -20°C in einem Tiefkühlgerät (LGex 3410 MediLine, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland) gelagert.

Die miRNA wurde analog zur RNA mit einer reversen Transkriptase, der MultiScribe Reverse Transcriptase, in cDNA umgeschrieben. Anstelle der zufälligen Primer-Hexameren

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1.: Reaktionsansatz und Temperaturschritte im Thermozykler für die reverse Transkription von RNA (a und b) mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR sowie dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit für miRNA (c und d).

cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure; dNTP: Desoxynukleosidtriphosphat; dTTP: Desoxythymidintriphosphat; miRNA: micro Ribonukleinsäure; NFW: nukleasefreies Wasser; RNA: Ribonukleinsäure; RT: reverse Transkription

a) RT RNA Reaktionsansatz

Substanz	Menge
Reaktionsmix 5x	4,0 µL
Maxima Enzymmix	2,0 µL
RNA	3,0 µg
NFW	ad 20,0 µL

b) RNA Temperaturprotokoll

Substanz	Dauer	Temperatur
Primeranlagerung	10 min	25 °C
cDNA-Synthese	30 min	56 °C
Hitzeinaktivierung	5 min	85 °C

c) RT miRNA Master Mix

Substanz	Menge
dNTPs (mit dTTP)	0,075 µL
MultiScribe Enzym	0,50 µL
10-fach RT Puffer	0,75 µL
RNase Inhibitor	0,095 µL
NFW	ad 3,5 µL

d) miRNA Temperaturprotokoll

Substanz	Dauer	Temperatur
RT Schritt 1	30 min	16 °C
RT Schritt 2	30 min	42 °C
Hitzeinaktivierung	5 min	85 °C

wurden jedoch für jede zu untersuchende miRNA spezifische Primer verwendet (siehe Tabelle 2.2). Für einen Reaktionsansatz von 7,5 µL wurden 3,5 µL des Master Mixes (siehe Tabelle 2.1c) zusammen mit 2,5 µL der jeweiligen miRNA (Konzentration: 10 ng/µL) und 1,5 µL des spezifischen Primers in ein Reaktionsgefäß gegeben und nach dem Temperaturprotokoll aus Tabelle 2.1d in einem Thermozykler inkubiert. Die fertig transkribierte cDNA wurde anschließend mit NFW 1:4 verdünnt und bei –20 °C gelagert.

2.2.3. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

An die reverse Transkription von RNA und miRNA zu cDNA schließt sich zur Quantifizierung die qPCR mit Hilfe des TaqMan-Systems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), genauer TaqMan Fast Advanced Master Mix zusammen mit spezifischen TaqMan Genexpressionsassays, an. Hierfür wurden die Substanzen anhand der Zusammensetzung in Tabelle 2.3a in einer 96-Well-Platte (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL), Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) auf Eis zusammen gegeben, mit einer Folie (Ampliseal, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) verschlossen, die Flüssigkeit bei 4 700 × g und 4 °C für 30 s herunterzentrifugiert und mit dem in Tabelle 2.3b angegebenen Temperaturzyklen in einem StepOnePlus Real-Time-qPCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) gefahren. Die Quantifizierung erfolgte anhand technischer Tripletten wobei für die Auswertung lediglich der Mittelwert aus

Tabelle 2.2.: Auflistungen der verwendeten TaqMan Genexpressionsassays für die reverse Transkription und Quantifizierung von miRNA (a) sowie die Quantifizierung von RNA (b) mittels qPCR.

hsa: homo sapiens; miR: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; qPCR: quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; RNA: Ribonukleinsäure

a) Verwendete miRNA TaqMan Genexpressionsassays

Ziel-miRNA	TaqMan Assay	Ziel-miRNA	TaqMan Assay
hsa-miR-1	002222	hsa-miR-125b	000449
hsa-miR-9	000583	hsa-miR-132	000457
hsa-miR-16	000391	hsa-miR-133a	002246
hsa-miR-21	000397	hsa-miR-193a	002250
hsa-miR-23a	000399	hsa-miR-202	002363
hsa-miR-23b	002126	hsa-miR-215	000518
hsa-miR-25	000403	hsa-miR-338	002252
hsa-miR-26a	000405	hsa-miR-449a	001030
hsa-miR-26b	000407	hsa-miR-485	001277
hsa-miR-28	000411	hsa-miR-708	002341
hsa-miR-29b	000413	hsa-miR-874	002268
hsa-miR-30a	000417	RNU6B	001093
hsa-miR-31	002279	U6 snRNA	001973
hsa-miR-34a	000426	U47	001223
hsa-miR-124a	001182		

b) Verwendete RNA TaqMan Genexpressionsassays

Ziel-RNA	TaqMan Assay
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1
<i>IPO8</i>	Hs00183533_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>KCNK3</i>	Hs00605529_m1

den drei Einzelwerte verwendet wurde. Zusätzlich zu den gewünschten Proben wurden negativ Kontrollen, in denen die cDNA durch Wasser ersetzt wurde, vermessen, um mögliche Kontaminationen aufzuzeigen. Zur Normierung der RNA-Expressionsdaten wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Importin 8 (IPO8) und Beta-Aktin (ACTB) verwendet, für die Normierung von miRNA-Expressionsdaten wurden das geometrische Mittel aus hsa-miR-16, U6 snRNA und RNU6B verwendet. Die verwendeten TaqMan Genexpressionsassays sind in Tabelle 2.2a und 2.2b aufgeführt.

Das Prinzip der TaqMan Genexpressionsassays beruht auf spezifischen TaqMan Sonden, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein (FAM) oder 2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (VIC)) und am 3'-Ende mit einem

2. Material und Methoden

Tabelle 2.3.: Reaktionsansatz (a) und Temperaturzyklen (b) für die qPCR unter Verwendung des TaqMan-Systems zur Quantifizierung von RNA und miRNA. Die Aktivierung der Polymerase erfolgte einmal zu Beginn der Quantifizierung und die Schritte der Denaturierung und Anlagerung/Elongation bilden einen Zyklus, der zur Quantifizierung 40-mal wiederholt wurde.

cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure; miRNA: micro Ribonukleinsäure; NFW: nukleasefreies Wasser; qPCR: quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; RNA: Ribonukleinsäure

a) Reaktionsansatz qPCR

Substanz	Menge
Master Mix	5,0 µL
Gen Assay	0,5 µL
cDNA	2,0 µL
NFW	2,5 µL

b) Temperaturzyklen qPCR

Substanz	Dauer	Temperatur
Polymeraseaktivierung	20 s	95 °C
Denaturierung	1 s	95 °C
Anlagerung/Elongation	20 s	60 °C

nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) markiert sind. Durch die räumliche Nähe des NFQ zum Farbstoff wird dessen Fluoreszenzsignal durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) unterdrückt. Die qPCR beginnt mit einer Temperaturerhöhung um die doppelsträngige DNA zu denaturieren und somit Einzelstränge zu erzeugen. Anschließend wird die Temperatur gesenkt und die TaqMan Sonde sowie die ebenfalls vorhandenen spezifischen unmarkierten Primer binden an die DNA Einzelstränge. Nun synthetisiert die Taq-DNA-Polymerase ausgehend von den Primern einen komplementären Tochterstrang bis sie auf die TaqMan Sonde trifft. Durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase kommt es nun zur Hydrolyse der Sonde und somit der Trennung von Farbstoff und NFQ. Durch diesen räumlichen Abstand wird das Fluoreszenzsignal nicht weiter unterdrückt. Auf diese Weise wird nach jedem Zyklus mehr Fluoreszenzsignal freigesetzt, wobei das Signal proportional zur Ausgangsmenge an Genprodukt ist.

Um nun verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wird die ΔCT -Methode angewendet. Der Schwellenwert-Zyklus (CT)-Wert drückt aus, wie viele Zyklen benötigt werden bevor das entstehende Fluoreszenzsignal einen zuvor festgelegten Schwellenwert übersteigt. Da eine absolute Quantifizierung nicht möglich ist, wird relativ quantifiziert, indem Bezug genommen wird auf ein anderes, nicht reguliertes Gen, das in allen Proben in etwa gleicher Menge vorhanden sein sollte. Dieser Bezug lässt sich durch die Differenz der CT-Werte ausdrücken:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}} \quad (2.1)$$

Nimmt man darüber hinaus an, dass die TaqMan Genexpressionassays auf eine Effizienz von 100 % hin optimiert wurden und es daher bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-Kopienanzahl kommt, lässt sich der ΔCT -Wert in ein tatsächliches Verhältnis umrechnen:

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta CT} \quad (2.2)$$

2.2.4. Transformation

Zur Amplifikation von Plasmid DNA wurde diese in DH5 α *Escherichia coli* (Thermo Fisher Scientific) transformiert. Dieser *E. coli* Stamm wurde durch drei gezielte Mutationen genetisch verändert um die Transformationseffizienz zu maximieren. Die verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von den in Tabelle 2.4 genannten Personen zur Verfügung gestellt. Zur Transformation wurden 1 μ L Plasmid DNA und 30 μ L der DH5 α Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock von genau 45 s bei 42 °C ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde mit 200 μ L Lysogenese Brühe (LB)-Medium (5 g/L Hefeextrakt (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10 g/L Trypton (Gibco, Thermo Fisher Scientific) und 10 g/L NaCl; pH 7 (NaOH)) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einer LB-Agar-Platte (LB-Medium ergänzt mit 15 g/L Agar und 100 μ g/mL Ampicillin (Labochem international, Heidelberg, Deutschland)) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht in einem Heizschrank (HeraTherm ICM 18, Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

Tabelle 2.4.: Auflistung aller verwendeten Plasmide mit deren jeweiliger Herkunft, verwendetem Vektor und vorhandenen Promotor.

Kanal	Herkunft	Vektor	Promotor
hK _{2P} 1.1 K274Q	Goldstein (Chicago, IL, USA)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 2.1 IF2 WT	Thomas (Heidelberg, Deutschland)	pMax ⁺	T7/CMV
hK _{2P} 3.1 WT	Goldstein (Chicago, IL, USA)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 4.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 5.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 6.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 9.1 WT	Goldstein (Chicago, IL, USA)	pMax ⁺	T7/CMV
hK _{2P} 10.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 13.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 16.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 17.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
hK _{2P} 18.1 WT	Thomas, Gierten (Heidelberg, Deutschland)	pRAT	T7/CMV
pK _{2P} 3.1 WT	Wiedmann (Heidelberg, Deutschland)	pMax ⁺	T7/CMV
hK _v 1.4	Decher (Marburg, Deutschland)	pXOOM	T7
hK _v 1.5	Wible (Cleveland, OH, USA)	pcDNA3	T7
hK _v 2.1	Decher (Marburg, Deutschland)	pSGEM	T7
hK _v 4.3	Goldstein (Chicago, IL, USA)	pMax ⁺	T7/CMV
hK _{ir} 3.1	Decher (Marburg, Deutschland)	pSGEM	T7
hK _{ir} 3.4	Decher (Marburg, Deutschland)	pSGEM	T7

2.2.5. Gewinnung von Plasmid Desoxyribonukleinsäure

Am nächsten Tag wurde von der LB-Agar-Platte eine gewachsene Bakterienkultur gepickt, in 5 mL vorgewärmtes LB-Medium gegeben und bis zum nächsten Tag bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert (Certomat[®] H; B Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland und Innova 2000 Platform Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Konnte nach der Inkubation eine Trübung des Mediums durch Bakterienwachstum festgestellt werden, wurde für 15 min bei $4\,000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur anschließenden Plasmidpräparation wurde das MiniPrep Kit verwendet (Qiagen). Hierfür wurde das Pellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert, 250 µL P2-Puffer hinzugefügt und durch 4–6 maliges Invertieren gemischt. Durch Zugabe von 350 µL N3-Puffer wurde die Lyse der Zelle gestoppt und anschließend für 10 min bei $17\,900 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Filtersäule gegeben und für 60 s bei $17\,900 \times g$ zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, 500 µL PB-Puffer auf die Säule gegeben und wieder für 60 s bei $17\,900 \times g$ zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit 750 µL PE-Puffer wiederholt, gefolgt von einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Säule. Zur Elution der Plasmid DNA wurde die Filtersäule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 20 µL NFW auf die Säule gegeben. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 1 min bei $17\,900 \times g$ zentrifugiert. Die gewonnene Plasmid DNA wurde im Tiefkühlgerät bei –20 °C gelagert.

2.2.6. Linearisierung von Plasmiden

Zur Weiterverarbeitung der Plasmide zu cRNA wurden diese zunächst mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) linearisiert. Die Plasmid DNA wurde hierfür zusammen mit Cut Smart Puffer (New England BioLabs), NFW und der entsprechenden Endonuklease bei 37 °C für 2 h inkubiert. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 2.5a und die verwendeten Enzyme können Tabelle 2.5c entnommen werden.

Nach Ende der Inkubation wurde die linearisierte DNA mit Hilfe eines abgewandelten MiniPrep Kits (Qiagen) aufgereinigt. Zu den 20 µL Probe wurden 100 µL PB-Puffer hinzugegeben und das gesamte Volumen auf eine Filtersäule aufgetragen und anschließend für 1 min bei $13\,000 \times g$ zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 750 µL PE-Puffer wurde für 1 min bei $13\,000 \times g$ zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und erneut zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Zur Eluierung der DNA wurden 20 µL NFW auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei $13\,000 \times g$ zentrifugiert. Die aufgereinigte, linearisierte DNA wurde im Tiefkühlgerät bei –20 °C gelagert.

2.2.7. *In vitro* Transkription mittels mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit

Die linearisierte DNA wurde anschließend *in vitro* transkribiert, um sie für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten (siehe Abschnitt 2.4.3.3) zugänglich zu machen. Hierfür wurde das

Tabelle 2.5.: Reaktionsansatz zur Linearisierung von Plasmiden und verwendete Restriktionsendonukleasen sowie der Reaktionsansatz zur anschließenden *in vitro* Transkription.

DNA: Desoxyribonukleinsäure; NTP: Nukleosidtriphosphat; NFW: nukleasefreies Wasser; WT: Wildtyp

a) Reaktionsansatz Linearisierung

Substanz	Volumen
Plasmid DNA	8 μ L
NFW	8 μ L
Cut Smart Puffer	2 μ L
Endonuklease	2 μ L

b) Reaktionsansatz *in vitro* Transkription

Substanz	Volumen
Linearisierte DNA	8 μ L
Nukleotide (NTP)	8 μ L
Reaktionspuffer 10 x	2 μ L
Polymerase T7	2 μ L

c) Verwendete Restriktionsendonukleasen

NotI-HF	PacI	PmeI	NheI	XhoI
hK _{2P} 1.1 K274Q	hK _{2P} 2.1 IF2 WT	hK _{2P} 18.1 WT	hK _v 2.1 WT	hK _v 1.5 WT
hK _{2P} 4.1 WT	pK _{2P} 3.1 WT	hK _v 1.4 WT	hK _{ir} 3.1 WT	
hK _{2P} 5.1 WT	hK _{2P} 9.1 WT	hK _v 4.3 WT	hK _{ir} 3.4 WT	
hK _{2P} 6.1 WT				
hK _{2P} 10.1 WT				
hK _{2P} 13.1 WT				
hK _{2P} 16.1 WT				
hK _{2P} 18.1 WT				

mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Reaktionsansatz aus linearisierter DNA, Nukleotiden, 10-fach Reaktionspuffer und Polymerase T7 wurde anhand Tabelle 2.5b zusammengefügt und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die transkribierte cRNA durch Hinzugabe von 30 μ L NFW und 25 μ L Lithiumchlorid über Nacht bei –80 °C ausgefällt. Nach dem Ausfällen wurde die cRNA aufgereinigt, indem der aufgetaute Reaktionsansatz bei 4 °C und 13 000 $\times g$ für 15 min zentrifugiert wurde und der Überstand abgenommen wurde. Auf das Pellet wurde 1 000 μ L 70 % Ethanol gegeben und nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C und 13 000 $\times g$ für 15 min wieder abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 20 μ L NFW gelöst und nach einer 30 min Inkubation auf Eis wurde die Konzentration mit einem Photometer bestimmt. Die aufgereinigte cRNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.3. Proteinbiochemie

In der Proteinbiochemie sind die experimentellen Methoden zur Untersuchung von Proteinen zusammengefasst. Je nach Fragestellung gibt es eine Vielzahl von Methoden, die angewandt werden können. In dieser Arbeit wird hauptsächlich die im Folgenden näher beschriebene, semiquantitative Proteinbestimmung mittels Western Blot mit im-

munbiochemischen Proteinnachweis verwendet. Des Weiteren wird in Abschnitt 2.5 die funktionelle Untersuchung von Proteinen mittels elektrophysiologischer Experimente näher behandelt.

2.3.1. Isolation von Proteinen

Der erste Schritt zu Untersuchung von Proteinen ist deren Isolierung aus Zellen und Gewebeproben mittels Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.6). Für die Isolierung aus Zellen wurde zuerst das Zellkulturmedium abgenommen und 300 μ L gekühlter RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden diese anschließend abgelöst und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach bei $14\,000 \times g$ und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 2.6.: Ansatz von 100 mL RIPA-Lysepuffer. Unmittelbar vor Verwendung werden in 10 mL des Puffers eine Tablette cOmplete mini Proteasehemmer-Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gelöst und der fertig angesetzte Puffer auf Eis gelagert.

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; SDS: Natriumdodecylsulfat; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Substanz	Menge
EDTA	1,0 mM
Natriumchlorid	150 mM
Natriumdeoxycholat	0,25 %
Natriumfluorid	1,0 mM
Natriumorthovanadat	1,0 mM
NP-40	0,5 %
Tris-HCl	50,0 mM
SDS	0,1 %
Demineralisiertes Wasser	100 mL

2.3.2. Quantifizierung von Proteinen mittels Pierce BCA Protein Assay Kit

Zur Durchführung von Western Blot Analysen ist es erforderlich, die Gesamtkonzentration der zuvor isolierten Proteinproben zu bestimmen und diese aneinander anzugleichen. Hierfür wurde die von Smith et al. (1985) entwickelte Messmethode verwendet, die auf der farbigen Komplexbindung von Bicinchoninsäure (BCA) mit Cu^+ -Ionen basiert und besonders unempfindlich gegenüber den Einflüssen von nicht-ionischen Detergenzien und häufigen Puffersalzen ist. Bei dieser Methode werden Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu durch Reaktion mit Peptidbindungen zu Cu^+ reduziert, die anschließend mit BCA einen

blau-violetten Farbkomplex bilden. Dieser Komplex kann durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden.

Die praktische Durchführung erfolgte unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurde eine Standardreihe von 25–2 000 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA) und die Arbeitslösung, bestehend aus 50 Teilen BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B, hergestellt. Von der Arbeitslösung wurden 200 µL pro Well in einer 96-Well Platte (Nunc, Thermo Fisher Scientific) vorgelegt und 25 µL der zuvor 1:5 verdünnten Proteinproben hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 min und Abkühlung auf Raumtemperatur, erfolgte im Photometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm und anschließende Quantifizierung der Proben anhand der Standardreihe. Anschließend wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben durch Verdünnung mit Wasser an die niedrigste Konzentration angeglichen.

2.3.3. Western Blot Analyse

Um die Anwesenheit eines bestimmten Proteins nachzuweisen oder dessen Konzentration semiquantitativ zu bestimmen, hat sich der 1979 zeitgleich von mehreren Laboren entwickelte Western Blot als Methode der Wahl herausgestellt. Besonders die Variante von Towbin et al. (1979), bei der die Proteine mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper detektiert werden, ist auch heute noch die am meisten verwendete Methode.

2.3.3.1. Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese

Vor dem spezifischen Nachweis von Proteinen müssen diese durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Hierbei wird die native Ladung der Proteine durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) abgeschirmt und eine Auftrennung im elektrischen Feld nach Molekulargewicht ermöglicht. Die Trennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammelgel (siehe Tabelle 2.7a), zur Bündelung der Probe um einen gleichmäßigeren Lauf zu gewährleisten, und einem Trenngel (siehe Tabelle 2.7b), dem eigentlichen Ort der Auftrennung.

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Auftrennung wurden zwei Teile Probe mit einem Teil Laemmli-Probenpuffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), der zuvor mit 5 % β -Mercaptoethanol versetzt wurde, gemischt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Dabei dient das β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel zum Abbau der Disulfidbrücken und somit der Auflösung von Tertiär- sowie Quartärstruktur, das SDS zur Maskierung der native Ladung und Glycerin und Bromphenolblau erleichtern das Beladen der Gele. Anschließend wurden die entsprechend vorbereiteten Proteinproben zusammen mit einem farbigen (PageRuler, Thermo Fisher Scientific) und einem biotinylierten (Biotinylated Protein Ladder, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) Proteingrößenmarker aufgetragen. Mit dem farbigen Marker kann der Fortschritt des Gellaufes überwacht

2. Material und Methoden

werden, während der biotinylierte Marker zur späteren Ermittlung der Proteingrößen nach Entwicklung des Gels dient.

Zum Auftragen der Proben und dem anschließenden Lauf des Gels wurde dieses zuvor in eine Gelelektrophoresekammer (Mini-PROTEAN, Bio-Rad Laboratories) gefüllt mit Laufpuffer (siehe Tabelle 2.7c) gestellt. Zum Starten der Elektrophorese wurde die Kammer mit einer Spannungsquelle (Power Pac Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories) verbunden. Der Lauf wurde mit 80 V für 20–30 min gestartet und, nachdem das Sammelgel durchgelaufen war, für 120 min auf 120 V erhöht, bis die Proteinbanden die gewünschte Strecke zurück gelegt hatten.

Tabelle 2.7.: Zusammensetzung der Lösungen und Gele, die für den Western Blot verwendet werden. Die Substanzen Acrylamid (Ratiophorese® 30 (37,5:1)) und TEMED sind von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), APS von Sigma-Aldrich (St. Louis, IL, USA) und 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (Stacking Gel Buffer) und 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) (Resolving Gel Buffer) sind von Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) bezogen worden. Als Wasser wurde *Aqua ad iniectabilia* (B Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) für die Western Blot Gele verwendet und demineralisiertes Wasser (hausinterne Produktion) für die Western Blot Lösungen. APS: Ammoniumperoxidsulfat; TEMED: Tetraethylmethyldiamin; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; SDS: Natriumdodecylsulfat

a) Sammelgel (6 %)

Substanz	Volumen
Acrylamid	400 µL
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	500 µL
H ₂ O	1,1 mL
APS 10 %	20 µL
TEMED	4 µL

b) Trenngel (10 %)

Substanz	Volumen
Acrylamid	1,65 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,25 mL
H ₂ O	2,05 mL
APS 10 %	50 µL
TEMED	5 µL

c) Laufpuffer

Substanz	Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
Wasser	ad 1 000 mL

d) Wet-Blot-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
Wasser	ad 1 000 mL

2.3.3.2. Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran

Nachdem die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt und der Lauf gestoppt worden war, wurde das Gel in Wet-Blot-Puffer (siehe Tabelle 2.7d) gewaschen und zusammen mit einer Nitrocellulosemembran (Protran BA85 Nitrocellulosemembrane, Whatman Biosystems, Maidstones, England) in ein Sandwich aus Filterpapier (Whatman Biosystems) und Schwämmen gepackt. Das Sandwich wurde zum Übertragen der Proteine aus dem

Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran in eine mit Wet-Blot-Puffer gefüllte Blotkammer (Mini-PROTEAN Tetra Mini Trans-Blot Module, Bio-Rad Laboratories) gestellt. Anschließend wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 200 mA innerhalb von 2 h auf die Membran übertragen.

2.3.3.3. Immunbiochemischer Nachweis der Proteine

Zum Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran müssen diese durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde, nachdem die Proteine auf die Membran übertragen worden waren, diese für 5 min in phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (PBS-T) (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 7,81 mM Na_2HPO_4 und 1,47 mM KH_2PO_4 ergänzt mit 1 mL Tween 20) gewaschen und anschließend in Blockpuffer, PBS-T mit 3 % BSA und 5 % Milchpulver, für 2 h inkubiert. Die Inkubation mit Blockpuffer diente zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurde noch einmal für 5 min mit PBS-T gewaschen, bevor über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper gegen TASK-1 (APC-024, 1:200 in Blockpuffer; Alamone Labs, Jerusalem, Isreal) inkubiert wurde. Am nächsten Morgen folgte, nach dreimaligem Waschen von 5 min in PBS-T, für 1,5–2 h die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (ab6721, 1:3 000 in Blockpuffer; Abcam, Cambridge, UK). Der Antikörper war mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert und gegen das Fc-Fragmentes des Primärantikörpers gerichtet. Nach erneutem Waschen in PBS-T von dreimal 10 min wurde die Membran belichtet. Zum sichtbar machen der Proteinbanden wurde ein verbesserter Chemilumineszenz (ECL)-Assay (WesternBright ECL HRP substrate; Advanta, San Jose, CA, USA) verwendet. Das zugrundeliegende Prinzip ist die Katalyse der Luminol-Reaktion durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP und der damit einhergehenden Chemolumineszenz. Hierfür wird die Membran mit WesternBright ECL HRP substrate für 2 min inkubiert und danach in einem digitalen Western-Blot-Entwickler (Azure 400; Azure Biosystems, Dublin, CA, USA) belichtet und fotografiert.

Der gesamte Vorgang wurde nach erneutem Waschen für 5 min in PBS-T mit einem Primärantikörper gegen GAPDH (G8140-01, 1:10 000 in Blockpuffer; US Biological, Swampscott, MA, USA) als Ladekontrolle wiederholt. Als Sekundärantikörper wurde sc-2005 in Blockpuffer (1:3 000; Santa Cruz Botechnology, Dallas, TX, USA) verwendet. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde ImageJ 1.5f (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) verwendet.

2.4. Zellkultur

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelte Ross Granville Harrison die ersten Zellkulturtechniken indem er embryonales Froschgewebe isolierte und außerhalb des Körpers in Lymphe wachsen ließ (Harrison 1910). Seitdem wurden diese Techniken stetig weiterentwickelt, so dass heute eine Vielzahl von Zellen in Kultur gehalten werden können und für *in vitro* Experimente zur Verfügung stehen. In den nachfolgenden Ab-

schnitten werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie die dazugehörigen Zellkulturtechniken näher beschrieben.

Alle durchgeführten Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Safe 2020, Thermo Fisher Scientific) mit laminaren Luftstrom durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem HeraCell 150i CO₂ Inkubator (Thermo Fisher Scientific) mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 %, 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C. Soweit nichts anderes vermerkt, wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet, die vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt worden waren.

2.4.1. Induzierte pluripotente Stammzellen

Im Jahr 2006 gelang es Shinya Yamanaka erstmals, aus murinen Fibroblasten IPS-Zellen zu erzeugen (Takahashi und Yamanaka 2006). Nur ein Jahr später wurden unabhängig voneinander durch mehrere Arbeitsgruppen humane somatische Zellen zu IPS-Zellen reprogrammiert. Hierbei führen durch Retroviren eingebrachte Pluripotenzgene dazu, dass die Zellen spezifische Transkriptionsfaktoren exprimieren und somit in einen pluripotenten Zustand übergehen. Anschließend lassen sich die IPS-Zellen in andere Zelltypen differenzieren und für die Forschung verwenden.

2.4.1.1. Kultivierung der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten IPS-Zellen wurden über eine zentrale Einrichtung des Universitätsklinikums Heidelberg von Dr. Timon Seeger bezogen. Ursprünglich wurden die Zellen aus Material von gesunden Spendern der Biobank des kardiovaskulären Instituts in Stanford durch episodale Reprogrammierung unter Verwendung von Sendaiviren gewonnen. Anschließend wurden die Zellen anhand etablierter Protokolle (Lian et al. 2013; Burridge et al. 2014) zu einem Kardiomyozyten-ähnlichen Phänotyp differenziert. Die ausdifferenzierten Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) mit zugesetztem B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die Zellen wurden an Tag 25 bis 35 für Experimente verwendet.

2.4.1.2. Transfektion von IPS-Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 250 000 Zellen pro Well für die 24-Well Platten und 125 000 Zellen pro Well für die 48-Well Platten ausgesät und mit den verschiedenen miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren durch Zugabe von Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) in Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) ohne Zusatz von P3000 transfiziert. Der genaue Ansatz zur Transfektion kann Tabelle 2.8a entnommen werden und die verwendenden Imitatoren, Inhibitoren und Kontrollen (Qiagen) sind in Tabelle 2.8b aufgelistet. Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, um anschließend Proteine und RNA zu isolieren.

Tabelle 2.8.: Ansatz zur Transfektion der humanen IPS-Zellen mit den entsprechenden miRNA-Inhibitoren und -Imitator und Lipofectamine 3000 als Transfektionsreagenz (a). Auflistung der verwendeten Imitatoren, Inhibitoren und entsprechenden Kontrollen zur Untersuchung des Einflusses bestimmter miRNAs auf die Expression von TASK-1 in humanen IPS-Zellen (b). IPS: induzierte pluripotente Stammzellen; miRNA: micro Ribonukleinsäure

a) Transfektionsansatz

Substanz	Inhibitor		Imitator		
	24-Well	48-Well	24-Well	48-Well	
Opti-MEM	50,0	20,0	50,0	20,0	µL
Lipofectamine 3000	2,5	1,0	0,25	0,10	µL
miRNA Inhibitor	25,0	10,0	–	–	pmol
miRNA Imitator	–	–	2,5	1,0	pmol

b) Verwendete Imitatoren und Inhibitoren

Zielstruktur	Inhibitor			Imitator		
	miRCURY	LNA	miRNA Inhibitor	miRCURY	LNA	miRNA Mimic
miRNA-9			Hsa-miR-9-5p			Hsa-miR-9-5p
miRNA-23a			Hsa-miR-23a-3p			Hsa-miR-23a-3p
miRNA-28			Hsa-miR-28-5p			Hsa-miR-28-5p
miRNA-34a			Hsa-miR-34a-5p			Hsa-miR-34a-5p
miRNA-124			Hsa-miR-124-3p			Hsa-miR-124-3p
Kontrolle			Negative Control A			Negative Control 4

2.4.2. Kardiomyozyten

Mit den zu Kardiomyozyten differenzierten IPS-Zellen stehen bereits gute experimentelle Modelle für die kardiale Forschung zur Verfügung. Jedoch werden die IPS-Zellen bisher nur zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenziert, die einen Mischphänotyp aus atrialen und ventrikulären Zellen besitzen. Um ein Zellmodell zu generieren, das die *in vivo* Verhältnisse besser darstellen kann, wurden für diese Arbeit HCM aus *auriculae aurii* (deutsch: Herzohren) von freiwilligen Spendern isoliert.

2.4.2.1. Patientenkollektiv

Für die Untersuchung der Regulation von TASK-1 durch miRNAs wurden rechte Herzohrproben von 61 Patienten, die sich wegen einer aortokoronaren Bypass-Operation oder eines benötigten Aortenklappenersatzes einer Operation am offenen Herzen in der Abteilung für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg unterzogen, gesammelt. Die Patienten wurden anhand ihres Rhythmusstatus in eine SR (n = 23), paroxysmale VHF (n = 21) und chronische VHF (n = 17) Gruppe stratifiziert. Die TASK-1-Expression wird durch die linksventrikuläre Pumpfunktion beeinflusst, daher wurde das Patienten-

kollektiv im Bezug auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) balanciert. Des Weiteren wurden grundlegende Merkmale der Studienpopulation, deren Medikation sowie Labordiagnostik am Tag der Aufnahme erfasst (siehe Tabelle 2.9). Für die Analyse der zirkulierenden miRNA-34a wurden zwei weitere SR-Patienten in die Studie aufgenommen. Das Studienprotokoll für die Gewinnung und Verarbeitung der Herzohrproben wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Antragsnummer: S-017/2013) genehmigt. Von allen eingeschlossenen Probanden wurde eine schriftliche Zustimmung eingeholt, nachdem diese spätestens am Tag vor der Operation durch medizinisches Fachpersonal über die Studie aufgeklärt worden waren.

Um den Einfluss von Doxapram und Ketodoxapram auf den Kaliumstrom in atrialen HCMs und die unterschiedliche Expression von TASK-1 in Zellen von Patienten im SR verglichen mit VHF zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten frisch aus Herzohrproben isoliert. Hierfür wurden für die Untersuchung von Doxapram $n = 5$ SR- und $n = 4$ VHF-Patienten und für Ketodoxapram von $n = 3$ SR- und $n = 2$ VHF-Patienten Herzohrproben verwendet. Die Charakteristika dieser Patienten sind in Tabelle 2.10 zusammengefasst.

2.4.2.2. Isolierung von Kardiomyozyten

Zur Isolation von HCM wurden die *auriculae aurii* Proben direkt nach Entnahme im Operationssaal in gekühlte Transportlösung (Tabelle 2.11a) überführt und ins Labor gebracht. Die Proben wurden anschließen in kardioplegischer Lösung (Tabelle 2.11c), die frisch mit 31,29 mg Taurin ergänzt wurde, von Fettgewebe befreit und alle 2–3 mm eingeschnitten. Danach wurde das Gewebestück in einer Waschlösung (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA)-Lösung (Tabelle 2.11d) frisch ergänzt mit 31,29 mg Taurin) für 5 min bei 37 °C unter konstanter O₂-Zufuhr gewaschen. Anschließend wurde die Probe in der Verdau-Lösung (Tabelle 2.11e) mit 5,4 U/mL Proteinase des *Bacillus licheniformis* (Biosynth, Staad, Schweiz), 200 U/mL Kollagenase von *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), 20 mg BSA und 31,29 mg Taurin für 30 min bei 37 °C und stetiger Zufuhr von O₂ verdaut. Nachdem die Lösung abgenommen worden war, wurde die Isolation ohne Proteinase weitergeführt. In regelmäßigen Abständen von ungefähr 5 min wurde die Lösung auf Anwesenheit von isolierten Kardiomyozyten hin überprüft. Sobald Zellen vorhanden waren, wurde die Zellsuspension für 3 min bei 400 × *g* zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500 mL Kraftbrühe (Tabelle 2.11b) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal mit neuer Lösung wiederholt. Anschließend wurden die isolierten Kardiomyozyten bis zur Verwendung in Experimenten bei 4 °C im Kühlschrank (LKexV 2600 MediLine, Liebherr) für maximal 10–12 h aufbewahrt.

2.4.3. *Xenopus laevis* Oozyten

Im Jahr 1971 wurden von Gurdon et al. (1971) erste funktionelle Untersuchungen von mRNA in Oozyten des *Xenopus laevis* (deutsch: Afrikanischer Krallenfrosch) durchgeführt. Durch die Injektion von mRNA in Oozyten erfolgte eine heterologen Expression der darauf codierten Proteine, die auf diese Weise weiteren Experimenten zugänglich gemacht

Tabelle 2.9.: Grundlegende Merkmale der Studienpopulation, die zur Untersuchung des Einflusses der miRNAs auf die Regulation von TASK-1 verwendet worden waren. Statistische Signifikanz wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur für mehrfache Testung für kontinuierliche Variablen und dem exakter Fisher-Test für kategorische Variablen berechnet, wobei $p < 0,05$ im Vergleich mit pVHF durch * und $p < 0,05$ im Vergleich mit SR durch † gekennzeichnet ist.

ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; AVD: Aortenklappenerkrankung; BMI: Body-Mass-Index; CAD: koronare Herzkrankheiten; COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung; cVHF: chronisches Vorhofflimmern; LV: linksventrikulär; Ø: Durchmesser; pVHF: paroxysmales Vorhofflimmern; SR: Sinusrhythmus.

Tabelle modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

	SR (n= 23)	pVHF (n = 21)	cVHF (n = 17)
Demografische Daten			
Frauen, Anzahl ([%])	5 (21,7)	9 (42,9)	4 (23,5)
Alter, [Jahre]	67,5 ± 11,5	70,7 ± 8,7	70,0 ± 9,4
Größe, [cm]	173,9 ± 7,5	170,8 ± 8,5	178,4 ± 9,9*
Gewicht, [kg]	86,3 ± 13,6	82,5 ± 24,1	96,2 ± 13,3
BMI, [kg/m ²]	28,6 ± 4,4	28,3 ± 8,8	30,4 ± 4,8
Raucher, Anzahl [%]	10 (43,5)	9 (42,9)	8 (47,1)
Echokardiographie			
LV Ejektionsfraktion, [%]	36,9 ± 11,9	41,1 ± 8,8	36,6 ± 15,9
LV End-Systolischer Ø, [mm]	37,6 ± 13,7	36,9 ± 9,3	47,6 ± 7,2
LV End-Diastolischer Ø, [mm]	51,8 ± 16,3	50,2 ± 8,6	57,2 ± 7,0
Septumwand, [mm]	13,2 ± 2,3	14,7 ± 2,4	10,6 ± 5,1
Linksatrialer Ø, [mm]	43,1 ± 4,6	45,4 ± 4,2	50,0 ± 6,3
Medizinische Vorgeschichte, Anzahl ([%])			
CAD	11 (47,8)	11 (52,4)	7 (41,2)
Myokardinfarkt	6 (26,1)	9 (42,9)	2 (11,8)
AVD	4 (17,4)	9 (42,9)	6 (35,3)
Mitralklappenerkrankung	0 (0)	0 (0)	1 (5,9)
CAD+AVD	7 (30,4)	1 (4,8)*	3 (17,6)
LV-Unterstützungsgerät	1 (4,3)	0 (0)	0 (0)
Hypertension	23 (100)	21 (100)	16 (94,1)
Diabetes	6 (26,1)	9 (42,9)	7 (41,2)
COPD	0 (0)	2 (9,5)	4 (23,5)†
Begleitmedikation, Anzahl ([%])			
ACE-Hemmer	9 (39,1)	10 (47,6)	9 (52,9)
ARB	4 (17,4)	5 (23,8)	3 (17,6)
Diuretika	12 (52,2)	13 (61,9)	13 (76,5)
Statine	17 (73,9)	16 (76,2)	12 (70,6)
Digitalis	1 (4,3)	1 (4,8)	2 (11,8)
Amiodaron	0 (0)	1 (4,8)	3 (17,6)

2. Material und Methoden

Tabelle 2.10.: Grundlegende Merkmale der Patienten, deren Proben für die Patch-Clamp-Messungen verwendet wurden, um den Einfluss von 100 μ M Doxapram und Ketodoxapram auf den Kaliumstrom von HCM zu testen. Statistische Signifikanz wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur für mehrfache Testung für kontinuierliche Variablen und dem exakter Fisher-Test für kategoriale Variablen berechnet, wobei $p < 0,05$ im Vergleich mit den jeweiligen VHF-Proben mit * gekennzeichnet ist.

ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; AVD: Aortenklappenerkrankung; BMI: Body-Mass-Index; CAD: koronare Herzkrankheiten; DOAK: direkte orale Antikoagulanzen; LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LV: linker Ventrikel; SR: Sinusrhythmus; VHF: Vorhofflimmern

	Doxapram		Ketodoxapram	
	SR (n = 5)	VHF (n = 4)	SR (n = 3)	VHF (n = 2)
Demografische Daten				
Frauen, Anzahl ([%])	1 (20)	1 (25)	1 (33)	2 (100)
Alter, [Jahre]	71,0 $\pm$ 4,9	80,3 $\pm$ 2,7	54,0 $\pm$ 6,2	74,5 $\pm$ 1,5*
Größe, [cm]	173,2 $\pm$ 9,8	168,8 $\pm$ 3,3	168,7 $\pm$ 2,1	172,0 $\pm$ 2,0
Gewicht, [kg]	85,1 $\pm$ 14,5	78,5 $\pm$ 9,1	81,3 $\pm$ 22,9	92,0 $\pm$ 18,0
BMI, [kg/m ²]	28,5 $\pm$ 5,1	27,5 $\pm$ 2,2	28,4 $\pm$ 7,4	31,3 $\pm$ 6,8
Raucher, Anzahl [%]	3 (60)	2 (50)	1 (33)	1 (50)
LVEF				
Normal, n [%]	3 (60)	2 (50)	3 (100)	1 (50)
Mild einge. n, [%]	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)
Moderat einge. n, [%]	2 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (50)
Stark einge. n, [%]	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)
Medizinische Vorgeschichte, Anzahl ([%])				
CAD	4 (80)	4 (100)	2 (67)	2 (100)
Myokardinfarkt	3 (60)	1 (25)	1 (33)	1 (50)
AVD	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mitralklappenerkrankung	2 (40)	2 (50)	1 (33)	1 (50)
CAD+AVD	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hypertension	4 (100)	4 (80)	3 (100)	2 (100)
Diabetes	0 (0)	1 (25)	1 (33)	1 (50)
Hyperlipidemie	5 (100)	4 (100)	2 (67)	2 (100)
Begleitmedikation, Anzahl ([%])				
ACE-Hemmer	5 (100)	2 (50)	2 (67)	2 (100)
ARB	0 (0)	1 (25)	1 (33)	0 (0)
Diuretika	1 (20)	3 (75)	0 (0)	2 (100)
Statine	5 (100)	3 (75)	1 (33)	2 (100)
Amiodaron	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
β -Blocker	3 (60)	4 (100)	3 (100)	1 (50)
DOAC	0 (0)	4 (100)*	0 (0)	1 (50)

Tabelle 2.11.: Zusammensetzung der Lösungen, die verwendet wurden zur Isolierung von HCM aus frischem Herzmuskelgewebe. Die Lösungen wurden aus *Aqua ad iniectabilia* hergestellt, mit einem 0,22 µm Filter (Stericup® Quick Release Millipore Express® PLUS 0,22 µm PES, Merck, Darmstadt, Deutschland) steril filtriert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Transportlösung (a) und Kraftbrühe (b) wurden ohne weitere Zusätze verwendet. Der Kardioplegischen- (c), EGTA- (d) und Verdau-Lösung (e) wurden unmittelbar vor Verwendung 31,29 mg Taurin hinzugefügt. Die Verdau-Lösung wurde zusätzlich noch mit 20 mg BSA, 5,4 U/mL Proteinase und 200 U/mL Kollagenase ergänzt.

BSA: Rinderserumalbumin; EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure; HCM: humane Kardiomyozyten; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; MOPS: 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure

a) Transportlösung

Substanz	Menge
KCl	50 mM
NaCl	50 mM
KH ₂ PO ₄	6 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	25 mM
Taurin	250 mM
Diacetylmonoxim	30 mM
MOPS	25 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	500 mL
pH 7,0 mit NaOH	

b) Kraftbrühe

Substanz	Menge
KCl	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
Glucose	25 mM
Mannitol	40 mM
BSA	0,1 % (<i>w/v</i>)
Monokaliumglutamat	70 mM
β-Hydroxybutyrat	10 mM
Taurin	20 mM
EGTA	10 mM
H ₂ O	500 mL
pH 7,4 mit KOH	

c) Kardioplegische-Lösung

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	50 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	8 mM
HEPES	10 mM
Adenosin	5 mM
Glucose	140 mM
Mannitol	100 mM
H ₂ O	500 mL
pH 7,4 mit KOH	

d) EGTA-Lösung

Substanz	Menge
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
EGTA	0,2 mM
H ₂ O	500 mL
pH 7,4 mit KOH	

e) Verdau-Lösung

Substanz	Menge
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
H ₂ O	500 mL
pH 7,4 mit KOH	

wurden (Sumikawa et al. 1981; Barnard et al. 1982). Besonders für die Untersuchung von Ionenkanälen konnten Oozyten von *X. laevis* als Modellsystem etabliert werden (Wagner et al. 2000).

2.4.3.1. Tierhaltung und Operation von *Xenopus laevis*

Zur Gewinnung von Oozyten wurden weibliche *X. laevis* Frösche (Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) im Einklang mit der Richtlinie 2010/63/EU und dem deutschen Tierschutzgesetz nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Karlsruhe (Antragsnummern: G-221/12, G-296/14, G-217/18, G-165/19) gehalten. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in einer Anlage der Firma Aqua Schwarz (Göttingen, Deutschland) in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg mit PCV Tunnel und Hütten zur Anreicherung der Haltung. Die Raumtemperatur betrug $20 \pm 2^\circ\text{C}$, die Wassertemperatur 20°C und der Hell-Dunkel-Zyklus war auf 12 h hell und 12 h dunkel festgesetzt. Die Tiere wurden restriktiv mit dem Extrudat 3590.ES.F10 der Firma Kliba Nafag (Kaiseraugst, Schweiz) gefüttert.

Während in der freien Natur das Ablachen durch die längere Tagesdauer im Frühling ausgelöst wird, muss bei der Haltung mit gleichbleibendem Hell-Dunkel-Zyklus ein Teil der Ovarien exziiert werden, um an die Oozyten zu gelangen. Für den operativen Eingriff wurden die Tiere in einem Narkosebad mit 0,3 % Tricain-Lösung (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonat; PharmaQ, Fordingbridge, England) anästhesiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Testung des Zwischenzehenreflexes wurde eine ventrolaterale Inzision durchgeführt, gefolgt von einer Resektion eines Teils des Ovariums. Die Bauchdecke wurde anschließend mit einer chirurgischen Naht wieder verschlossen. Die gesamte Operation erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Zum Beenden der Narkose wurden die Frösche in frisches Leitungswasser gesetzt und bis zum Erwachen beobachtet.

Es wurden maximal vier Operationen pro Frosch durchgeführt mit einer dazwischenliegenden Erholungsphase von mindestens 30 Wochen. Die Entnahme erfolgte alternierend am linken oder rechten Ovarium. Während des letzten Eingriffes wurden die Frösche durch Dezerebration getötet.

2.4.3.2. Enzymatische Aufreinigung der Oozyten

Der entnommene Teil des Ovariums wurde in Oozyten Ringerlösung 2 (OR2) (siehe Tabelle 2.12a) gegeben und mit Hilfe von Pinzetten in Gruppen von 10–15 Oozyten zerkleinert. Anschließend wurde mit OR2 gewaschen bis unter leichtem Schwenken kein Eintrüben erfolgte. Zur Entfernung der kollagenhaltigen Bindegewebsstruktur wurden die Oozyten in einer Lösung aus 25 mL OR2, 125 mg BSA, 32 mg Na_2HPO_4 und 8–10 mg Kollagenase D (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 12–14 h bei 18°C (AL 185, Aqualytic, Dortmund, Deutschland) unter ständiger Agitation (VXR basic Vibrax, IKA, Staufen, Deutschland) inkubiert. Der Fortschritt des enzymatischen Abbaus der Bindegewebsstruktur wurde unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) überwacht und durch mehrmaliges Waschen in OR2 und anschließend in Standard Oozyten Lösung (SOS) (siehe Tabelle 2.12b) beendet.

Die fertigen Oozyten wurden bei 18 °C in SOS gelagert, wobei alle 48 h das Medium gewechselt wurde.

Tabelle 2.12.: Zusammensetzung der Oozyten-Lösungen. Die Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Vor dem Autoklavieren wurde der pH Wert mit NaOH eingestellt. Anschließend wurden Pyruvat und Gentamicinsulfat hinzugefügt.
HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; OR2: Oozyten Ringerlösung 2; SOS: Standard Oozyten Lösung

a) OR2-Lösung (pH 7,6)

Substanz	Konzentration
NaCl	96,0 mM
KCl	2,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	10,0 mM
Pyruvat	2,5 mM
H ₂ O	ad 1 000 mL

b) SOS-Lösung (pH 7,7)

Substanz	Konzentration
NaCl	100,0 mM
KCl	2,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	10,0 mM
Pyruvat	2,5 mM
Gentamicinsulfat	50,0 mg/L
H ₂ O	ad 1 000 mL

2.4.3.3. Injektion der Oozyten mit cRNA

Zur Vorbereitung der anschließenden Experimente wurden unter dem Stereomikroskop Oozyten der Reifegrade V und VI selektiert, bei denen die kollagenhaltige Bindegewebsstruktur komplett entfernt worden war. Anschließend wurde mit einem Mikroinjektor (Nanoject II, Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) 1,5–50 ng cRNA in einem Volumen von 46 nL pro Oozyte injiziert. Hierfür wurden Glaskapillaren (Drummond #3-0000203-G, Helmut Saur, Reutlingen, Deutschland) mit einem Mikropipetten-Zuggerät (Flaming/Brown Micropipettepuller P-87, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) zu Mikropipetten verarbeitet. Diese Pipetten wurden zur Finalisierung unter einem Inversmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf einen Durchmesser von 27–36 µm aufgebrochen. Die injizierten Oozyten wurden für 1–7 d in SOS-Lösung bei 18 °C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte ein täglicher Wechsel des Mediums und ein Aussortieren der toten und beschädigten Oozyten.

2.5. Elektrophysiologie

Die Untersuchung von elektrochemischen Vorgängen in Zellen und Geweben ist in der Elektrophysiologie gebündelt. Es wird unterschieden zwischen der klinischen und experimentellen Elektrophysiologie. Im klinischen-kardiologischen Bereich ist vor allem das EKG und die elektrophysiologische Untersuchung (EPU) von großer Bedeutung, bei denen die Ströme des gesamten Herzens gemessen werden. Im Gegensatz dazu werden im

experimentellen Bereich die Ströme von einzelnen Zellen und Zellverbänden bis hinunter zu einzelnen Ionenkanälen untersucht. Hierfür stehen unter anderem die Methode der TEVC (Abschnitt 2.5.1) und die Patch-Clamp-Technik (Abschnitt 2.5.2) zur Verfügung, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.5.1. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur funktionellen Untersuchung von heterolog exprimierten Ionenkanälen in *X. laevis* Oozyten wurde die TEVC verwendet. Hierfür wurden, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, die Oozyten vorbereitet und mit cRNA injiziert. Anschließend wurde, abhängig von der Expression des injizierten Ionenkanals, nach 1–7 d gemessen.

Die TEVC beruht auf der Technik der Spannungsklemme, die ursprünglich zur Messung von Strömen an Riesenaxonen entwickelt wurde. Hierbei wird die Zellmembran mit zwei Mikroelektroden aus Glas, die mit einer leitfähigen Flüssigkeit gefüllt sind (Tabelle 2.13a), durchstoßen. Die eine Mikroelektrode dient hierbei dazu, eine festgelegte Haltespannung vorzugeben, die andere Mikroelektrode zeichnet die dabei auftretenden Ströme auf. Die verwendeten Mikroelektroden wurden aus Glaskapillaren (GB 100F-10, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit einem Mikropipetten-Zuggerät hergestellt und auf eine Öffnung von 9–15 µm aufgebrochen, um einen Widerstand von 1–3 MΩ zu erhalten.

Für die Messung einer Oozyte wurde diese in eine mit Badlösung (Tabelle 2.13b) gefüllte Messkammer gegeben. Diese Lösung wurde durch ein kontinuierlich laufendes Perfusionssystem ständig ausgetauscht. Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die zu untersuchenden Ionenkanäle zu testen, wurden die Substanzen in Badlösung gelöst und über das Perfusionssystem in die Messkammer perfundiert. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur mit einem OC-735C Oocyte Clamp Verstärker (Warner Instruments, Hamden, CT, USA), einem Digidata 1332A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) und pClamp 10 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Die verwendeten Messprotokolle werden bei den jeweiligen Messergebnissen angegeben.

Tabelle 2.13.: Zusammensetzung der Lösungen zur Verwendung bei der TEVC. Die Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und der pH-Wert mit NaOH eingestellt.
HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

a) 3K⁺-Lösung (pH 7,4)

Substanz	Konzentration
NaCl	102,0 mM
KCl	3,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM
CaCl ₂	1,5 mM
HEPES	10,0 mM

b) 4K⁺-Lösung (pH 7,4)

Substanz	Konzentration
NaCl	101,0 mM
KCl	4,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM
CaCl ₂	1,5 mM
HEPES	10,0 mM

2.5.2. Patch-Clamp-Technik

Während die TEVC gut geeignet ist zur Messung von großen Zellen mit hohen Strömen im μA -Bereich, ist die Umsetzung mit kleinen Zellen und niedrigen Strömen nur begrenzt möglich. Um kleine Zellen und sogar einzelne Ionenkanälen der elektrophysiologischen Messung zugänglich zu machen, wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann die Patch-Clamp-Technik entwickelt (Neher und Sakmann 1976). Sie stellt eine Weiterentwicklung der TEVC dar, die es ermöglicht, selbst kleinste Ströme im pA-Bereich zu messen.

Dies gelingt unter anderem dadurch, dass im Gegensatz zur TEVC bei der Patch-Clamp-Technik die Zellmembran nicht mit zwei Mikroelektroden durchstoßen wird, sondern eine einzelne Mikroelektrode auf die Membran aufgesetzt wird. Diese Elektrode ist durch den Einsatz einer spezieller Messapparatur in der Lage, sowohl die Haltespannung vorzugeben also auch die hierbei auftretenden Ströme zu messen. Eine zweite Elektrode, die bei der TEVC noch benötigt wird, kann bei der Patch-Clamp-Technik somit entfallen.

Nach Aufsetzen der Patchpipette wird, durch Anwendung eines leichten negativen Druckstoßes, eine elektrisch dichte Verbindung zwischen Pipettenrand und Zellmembran erreicht. Diese Abdichtung hat einen Widerstand im $\text{G}\Omega$ -Bereich (sogenanntes Giga-Seal), wodurch auftretende Leckströme vernachlässigt werden können. Durch einen weiteren negativen Druckimpuls wird die Membran innerhalb der Pipette aufgebrochen und eine Verbindung zwischen Pipettenlösung und Cytosol erzeugt. In dieser nun erreichten Whole-Cell (engl. für ganze Zelle) Konfiguration wird ein Strom, bestehend aus der Summe aller einzelnen Ionenkanal-Ströme der gesamten Zelle, gemessen. Entfällt der zweite Druckimpuls, ist es möglich nur die Ströme der Ionenkanäle zu messen, die sich auf dem Membranabschnitt (engl. patch) innerhalb der Pipette befinden. Durch die Verwendung von Mikropipetten mit sehr kleinen Öffnungen von ungefähr $1\text{ }\mu\text{m}$ ist es möglich, die Anzahl der Ionenkanäle innerhalb der Pipette auf einige wenige bis einen einzigen Kanal zu begrenzen und somit die Ströme einzelner Ionenkanäle zu messen.

Technisch basiert die Messung, wie bereits bei der TEVC (Abschnitt 2.5.1) beschrieben, auf der Spannungsklemme. Diese Messtechnik wurde für die Patch-Clamp-Technik verfeinert, um die Messung kleinster Ströme zu ermöglichen. Es wurden ein Axopatch 200B Verstärker (Axon Instruments), ein Axon Digidata 1550B (Axon Instruments) und pClamp 10 (Molecular Devices) zur Aufzeichnung der Ströme verwendet. Zum Herstellen der Messpipetten wurden Glaskapillaren (1B120F-4, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit einem Mikropipetten-Zuggerät zu Messspitzen mit einer Öffnung von $1\text{ }\mu\text{m}$ und einem Widerstand von $3\text{--}7\text{ M}\Omega$ verarbeitet. Zur Messung wurden die Pipetten mit intrazellulärer Lösung gefüllt (Tabellen 2.14a) und die Zellen in ein Bad aus extrazellulärer Lösung gegeben (Tabellen 2.14b). Um den Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die zu untersuchenden Ionenkanäle zu messen, wurden diese in die mit extrazellulärer Lösung gefüllte Messkammer pipettiert. Die verwendeten Messprotokolle und der genaue Messablauf werden bei den entsprechenden Ergebnissen angegeben. Der Widerstand des Giga-Seals lag in der Regel bei $2\text{--}10\text{ G}\Omega$ und nach Erreichen der Whole-Cell Konfiguration wurden Zellkapazität und Serienwiderstand bestimmt und kompensiert. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 2.14.: Zusammensetzung der Patch-Clamp-Lösungen zur Verwendung bei der Messung von HCM in der Whole-Cell Konfiguration. Zur Ansetzung der Lösungen wurde *Aqua ad iniectabilia* (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) verwendet und der pH-Wert mit KOH bei der intrazellulären und NaOH bei der extrazellulären Lösungen eingestellt.

EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure; HCM: humane Kardiomyozyten; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

a) HCM intrazelluläre Lösung (pH 7,2)

Substanz	Konzentration
KCl	60,0 mM
K-glutamat	65,0 mM
EGTA	5,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM
K ₂ ATP	3,0 mM
NaGTP	0,2 mM
HEPES	5,0 mM

b) HCM extrazelluläre Lösung (pH 7,4)

Substanz	Konzentration
NaCl	140,0 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1,0 mM
CaCl ₂	1,0 mM
NaH ₂ PO ₄	0,3 mM
HEPES	5,0 mM
Glucose	10,0 mM

2.6. Quantitative Analytik

Die quantitative Analytik hat als Ziel die Bestimmung von Mengen bzw. Konzentrationen einer oder mehrerer Substanzen in unterschiedlichsten Probenmaterialien. Hierbei können verschiedene chemische, biologische und physikalische Verfahren zum Einsatz kommen, wobei die Abgrenzung fließend ist und häufig verschiedene Verfahren kombiniert werden. Die Methode der Photometrie, bei der die Absorption von Licht durch die zu untersuchende Substanz verwendet wird, um deren Konzentration zu bestimmen, wurde bereits bei der Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA erwähnt (für den theoretischen Hintergrund sei auf gängige Lehrbücher verwiesen). An dieser Stelle soll nun die UPLC zur hocheffizienten Auftrennung von Substanzgemischen mit anschließender Detektion sowie Quantifizierung von spezifischen Substanzen mittels Massenspektrometrie beschrieben werden. Diese Methode wurde verwendet, um die Konzentration von A293 und Doxapram sowie dessen Metabolit Ketodoxapram in verschiedenen Probenmatrices von unterschiedlichen Spezies zu bestimmen.

2.6.1. Validierung von bioanalytischen Messmethoden

Die Validierung der bioanalytischen Messmethoden erfolgte anhand der Leitlinien von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) und der Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) (FDA 2018; EMA 2011). Zur Bestimmung der Richtigkeit — Maß der Abweichung von tatsächlicher zur theoretischen Konzentration — und Präzision — relative Standardabweichung der einzelnen Messwerte vom Mittelwert — sowohl innerhalb jeder einzelnen (engl. Within-Batch) als auch im Vergleich mehrere Messreihen zueinander (engl. Batch-to-Batch), wurden an verschiedenen Tagen insgesamt drei getrennte Messreihen vermessen. Eine Messreihe bestand jeweils aus den acht verschiedenen Kalibratoren, die

doppelt vermessen wurden, sowie den vier Proben der Qualitätskontrolle (QC) und einer unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ)-Probe, die sechsfach vermessen wurden. Nach den Vorgaben der Leitlinie dürfen die beiden Parameter Präzision und Richtigkeit nicht mehr als $\pm 15\%$ bei den QCs und $\pm 20\%$ am LLOQ betragen. Für die Vermessung von Proben, die oberhalb des Kalibrierbereiches liegen, wurde in einer der Messreihen eine fünfte QC-Probe, die oberhalb des Kalibrierbereiches lag und vor der Messung mit Leermatrix verdünnt wurde, sechsfach vermessen und sowohl Präzision als auch Richtigkeit bestimmt. Hierbei galten die bereits beschriebenen Grenzwerte von $\pm 15\%$.

Als weitere Parameter wurden die Wiederfindungsrate (engl. Recovery) und der Matrixeffekt untersucht. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde Leermatrix (hier: Blutplasma bzw. Gehirngewebe in Wasser) anhand der üblichen Aufbereitungsmethode verarbeitet, wobei die QC- und internal Standard (IS)-Lösung durch reines Lösungsmittel ersetzt worden waren. Anstelle der Resuspension im Laufmittel wurde mit einer Mischung aus QC-, IS-Lösung und Laufmittel resuspendiert und anschließend vermessen. Das dabei gemessene Verhältnis der Flächen von Analyt und IS wurde mit dem nach normaler Probenaufbereitung verglichen. Ein Vergleich der Verhältnisse nach Extraktion mit denen von IS- und QC-Lösungen in reinem Laufmittel ohne vorherige Hinzugabe von Probenmatrix und anschließender Probenaufbereitung ermöglichte die Bestimmung des Matrixeffekts (Matuszewski et al. 2003).

Weiterhin wurde die Spezifität und Selektivität bestimmt, indem sechs verschiedene Proben von Leermatrix vermessen wurden, wobei die Signalintensität bei der Retentionszeit des Analyten nicht mehr als 20 % der Intensität des Analyten in der Messung der LLOQ-Proben betragen durfte. Auch wurde untersucht, wie sich die Messmethode im Fall von hämolytischem oder lipämischen Plasma verhält. Hierfür wurden der Matrixeffekt, die Wiederfindungsrate, die Spezifität und Selektivität in hämolytischem sowie lipämischen Plasma bestimmt. Zur Identifizierung und Quantifizierung von möglichen Verschleppungen (engl. Carryover) wurden nach der Kalibrierprobe höchster Konzentration mehrere Proben mit reinem Laufmittel analysiert. Hierbei durfte die Verschleppung nicht mehr als 20 % der Flächen des LLOQ betragen.

Zur Untersuchung der Probenstabilität während der Lagerung im Tiefkühlgerät sowie der Probenaufarbeitung bei Raumtemperatur wurden QC-Proben aller drei Konzentrationen ohne IS in Leermatrix hergestellt und bei Raumtemperatur und -20°C für unterschiedliche Zeiträume gelagert. Ebenso wurden auf gleiche Art und Weise vorbereitete Proben mehrfach für mindestens 12 h bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Proben unter Hinzugabe von IS-Lösung aufgearbeitet und vermessen. In allen Fällen wurden die gemessenen Konzentrationen mit denen von frisch aus der Einwaage hergestellten QC-Proben verglichen. Abschließend wurde die Stabilität der aufgearbeiteten Proben bei 15°C im automatischen Probenzufuhrsystem überprüft. Hierfür wurden bereits vermessene QC-Proben, nach eintägiger Lagerung im Probenzufuhrsystem, zusammen mit einer neuen Messreihe ein zweites Mal injiziert und vermessen. Die Ergebnisse der beiden Messungen wurden miteinander verglichen, um die Stabilität zu bestimmen.

Zur kontinuierlichen Überwachung der Qualität einer jeden Messreihe musste neben den zur Quantifizierung von Probanden- und Versuchstierproben notwendigen Kalibrier-

proben in zweifacher Ausführung auch die vier QC-Proben jeweils doppelt mit aufbereitet und vermessen werden. Die Anzahl an QC-Proben musste in der Art gewählt werden, dass die Anzahl mindestens 5 % der Probenanzahl betrug, jedoch nicht weniger als sechs QC-Proben pro Messreihe. An diesen Stellen galten ebenfalls die bereits bekannten Akzeptanzkriterien von maximal $\pm 15\%$ Abweichung vom nominellen Gehalt. Dieses Kriterium musste von 75 % der Kalibrierproben — mindestens jedoch von sechs verschiedenen Kalibrierpunkten — und von 67 % der QC-Proben — jedoch mindestens eine Probe je Konzentration — eingehalten werden.

Zur abschließenden Beurteilung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen wurden, nachdem alle Probanden- bzw. Versuchstierproben einer Versuchsreihe vermessen worden waren, 10 % der gesamten Proben erneut für die Messung aufbereitet und vermessen. Hierbei durfte bei 67 % der Proben die Abweichung der zwei Messwerte voneinander nicht größer als 20 % des Mittelwerts der beiden Werte sein.

2.6.2. Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram

Zur simultanen Quantifizierung von Doxapram und seinem aktiven Metaboliten Ketodoxapram im Blutplasma von Menschen und Schweinen wurde eine UPLC-MS/MS-Methode entwickelt und nach den Vorgaben der Leitlinien von FDA und EMA validiert (siehe Abschnitt 2.6.1). Im Rahmen der Vermessung der Tierversuchproben zeigte sich, dass der gewählte Kalibrierbereich eine zu kleine Konzentrationsspanne abdeckte und die Methode daher in einen niedrigen (10–10 000 pg/mL) und einen hohen Kalibrierbereich (1–2 500 ng/mL) aufgeteilt werden musste. Dies war nötig, da der Messbereich durch die Sensitivität nach unten und die Sättigung des Detektors nach oben begrenzt ist.

In einem weiteren Schritt wurde die Methode für die Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Gehirngewebe von Schweinen abgewandelt und ebenfalls validiert.

2.6.2.1. Herstellung der Stammlösungen

Zur Quantifizierung der Analyten wurden Stammlösungen benötigt, aus denen die weiteren Arbeitslösungen angesetzt werden konnten. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte durch Einwaage von Doxapram ($C_{24}H_{30}N_2O_2$, 97,7 %, 378,2 g/mol, Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) und Ketodoxapram ($C_{24}H_{28}N_2O_3$, 98,8 %, 392,2 g/mol, TLC Pharmaceutical Standards, Newmarket, ON, Canada) mit anschließender Lösung in einem Flüssigkeitsgemisch aus Acetonitril (ACN) (Biosolve, Valkenswaard, Niederlande) und Wasser (1:1, v/v). Von beiden Substanzen wurden zwei getrennte Einwaagen hergestellt, um voneinander unabhängig Stammlösungen zu erhalten. Aus diesen wurde durch Verdünnung mit einer Lösung aus ACN/Wasser (1:1, v/v) die verwendeten Kalibrations- und QC-Lösungen hergestellt, wobei jeweils ein Satz der Stammlösungen für die Kalibrationslösungen und einer für die QC-Lösungen verwendet wurde. In Tabelle 2.15 sind die Konzentrationen der Lösungen zur Quantifizierung im Blutplasma und Gehirngewebe angegeben, wobei Doxapram und Ketodoxapram jeweils in identischer Konzentration vorliegen.

Ebenfalls wurden durch Einwaage von Doxapram-d5 (99,6 %, 383,2 g/mol, TLC Pharmaceutical Standards) und Ketodoxapram-d5 (99,6 %, 397,2 g/mol, TLC Pharmaceutical Standards) weitere Stammlösungen hergestellt. Aus diesen beiden Lösungen wurde, durch Verdünnung mit einer ACN/Wasser-Mischung (1:1, *v/v*), die zur Messung verwendete IS-Lösung angesetzt, wobei die beiden Substanzen in identischer Konzentration vorlagen. Die Stammlösungen wurden bei -20°C und die angesetzten Kalibrier-, QC- und IS-Lösungen bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

Tabelle 2.15.: Konzentrationen der Kalibrations- und QC-Lösungen, die zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Blutplasma von Menschen und Schweinen sowie im Gehirngewebe von Schweinen verwendet wurden. a: Konzentrationen der Lösungen für den hohen Kalibrierbereich für Plasmaproben; b: Konzentrationen der Lösungen für den niedrigen Kalibrierbereich für Plasmaproben; c: Konzentrationen der Lösungen für die Quantifizierung von Gehirngewebeproben. Die Kalibrations- und QC-Lösungen wurden aus unterschiedlichen Stammlösungen angesetzt, die aus getrennten Einwaagen hergestellt worden waren. Die angesetzten Lösungen wurden bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Kal: Kalibrator; QC: Qualitätskontrolle

a) Hoher Bereich		b) Niedriger Bereich		c) Gehirngewebeproben	
Lösung	Konzentration	Lösung	Konzentration	Lösung	Konzentration
Kal A	1 ng/mL	Kal A	10 pg/mL	Kal A	10 pg/Probe
Kal B	5 ng/mL	Kal B	25 pg/mL	Kal B	25 pg/Probe
Kal C	10 ng/mL	Kal C	50 pg/mL	Kal C	50 pg/Probe
Kal D	25 ng/mL	Kal D	100 pg/mL	Kal D	100 pg/Probe
Kal E	100 ng/mL	Kal E	500 pg/mL	Kal E	500 pg/Probe
Kal F	500 ng/mL	Kal F	1 000 pg/mL	Kal F	1 000 pg/Probe
Kal G	1 000 ng/mL	Kal G	5 000 pg/mL	Kal G	5 000 pg/Probe
Kal H	2 500 ng/mL	Kal H	10 000 pg/mL	Kal H	10 000 pg/Probe
QC A	3 ng/mL	QC A	30 pg/mL	QC A	30 pg/Probe
QC B	15 ng/mL	QC B	150 pg/mL	QC B	150 pg/Probe
QC C	150 ng/mL	QC C	1 500 pg/mL	QC C	1 500 pg/Probe
QC D	1 500 ng/mL	QC D	7 500 pg/mL	QC D	7 500 pg/Probe

2.6.2.2. Probenaufbereitung

Ein direktes Auftragen von Proben auf eine UPLC-Trennsäule würde durch die vielen verschiedenen Bestandteile der Matrix zur Verstopfung dieser führen. Um die Lebensdauer der Trennsäulen zu verlängern und Quantifizierung von Gewebeproben zu ermöglichen, wurden vor der Vermessung die zu untersuchenden Substanzen aus der Probenmatrix mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Tert-Butylmethylether (TBME) im basischen Milieu extrahiert.

Für die LLE von Plasmaproben wurden 100 μL Plasma und für die Extraktion aus Gehirngewebe 100 μL eine Gehirngewebesuspension (40 mg/mL Gehirngewebe in Wasser)

zusammen mit 25 μL IS-Lösung, 100 μL 0,2 M Boratpuffer (pH 9) und 2 mL TBME in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und für 10 min durch ständiges Invertieren durchmischt. Anschließend wurde für 10 min bei 15 °C und 3 000 $\times g$ zentrifugiert und 25 μL (hoher Kalibrierbereich) oder 1 500 μL (niedriger Kalibrierbereich; Gehirngewebeproben) der organischen Phase in ein Reagenzglas überführt. Die organische Phase wurde für 10 min unter 40 °C warmer Stickstoffbegasung zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden auf den Rückstand 500 μL (hoher Kalibrierbereich, Gehirngewebeproben) oder 100 μL (niedriger Kalibrierbereich) Laufmittel (Wasser mit 9,75 % ACN und 0,1 % Ameisensäure (FA)) gegeben und für 1 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 1028 CH, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) eluiert. Für die anschließende Messung wurde die Lösung in eine 96-Well Platte (Waters Corporation, Milford, MA, USA) überführt.

Die Aufarbeitung der QC- und Kalibrierproben erfolgte analog, jedoch wurden anstelle der 100 μL Probe, 100 μL Leermatrix (Blutplasma oder 40 mg/mL Gehirngewebe in Wasser) zusammen mit 25 μL der entsprechenden QC- bzw. Kalibrierlösungen verwendet. Für die Vermessungen von Plasmaproben wurde reines Plasma verwendet, für die Gehirnproben wurden 40–50 mg Gehirngewebe in 1 mL Wasser gegeben und für 5 min in einem Ultraschallbad homogenisiert. Von dieser Suspension wurden 100 μL für die Messung verwendet, wobei die Gehirnproben immer doppelt bestimmt wurden.

2.6.2.3. Chromatographie und Massenspektrometrie

Für die Chromatographie und anschließende Massenspektrometrie wurde ein Acquity UPLC® I-class System in Verbindung mit einem Xevo TQ-S Tandem-Massenspektrometer (Waters Corporation) verwendet. Die chromatografische Trennung erfolgte im Gradienten-Modus mit einer Flussrate von 0,5 mL/min und einem Injektionsvolumen von 10 μL mit Hilfe einer Acquity UPLC® BEH C18 Trennsäule (1,7 μm , 2,1 $\times$ 50 mm; Waters), die in einem Säulenofen auf 40 °C erwärmt wurde. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Lösung A (Wasser mit 5 % ACN und 0,1 % FA) und Lösung B (ACN mit 0,1 % FA) verwendet. Die Messung startete mit einem Verhältnis von 95 % A / 5 % B für 0,5 min, drehte sich linear bis 3,5 min um auf 5 % A / 95 % B und erreichte bis 4 min wieder das ursprüngliche Verhältnis von 95 % A / 5 % B. Anschließend folgte, zur Entfernung von Substanzrückständen auf der Säule, eine zweite Umkehr des Verhältnisses hin zu 5 % A / 95 % B bis 5 min und eine Rückkehr zum Ausgangswert 95 % A / 5 % B bis 5,5 min, der bis zum Ende der Messung nach 6 min gehalten wurde.

Nach Ionisation der Moleküle mit Hilfe der Elektrosprayionisation (ESI) (Z-spray) im positiv Modus, wurden Übergänge in den Masse-zu-Ladungsverhältnissen von m/z 379,5 > 292,3 für Doxapram und m/z 384,5 > 297,3 für Doxapram-d5 (IS) gemessen und für die Quantifizierung von Doxapram mittels Mehrfachreaktionsüberwachung (MRM) verwendet. Für den Metaboliten Ketodoxapram wurden Übergänge von m/z 393,4 > 214,3 für Ketodoxapram und m/z 398,4 > 219,3 für Ketodoxapram-d5 (IS) registriert. In Tabelle 2.16 sind die instrumentellen Parameter angegeben.

Tabelle 2.16.: Instrumentelle Parameter, die verwendet wurden zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram an einem Xevo TQ-S Tandem-Massenspektrometer.

Parameter	Wert
Kapillarspannung (engl. capillary voltage)	2 kV
Kegelspannung (engl. cone voltage)	44 V
Quellentemperatur (engl. source temperature)	150 °C
Kegelgasfluss (engl. cone gas flow) N ₂	150 L/h
Desolvatisierungsgasstrom (engl. desolvation gas flow) N ₂	1 000 L/h
Desolvatisierungstemperatur (engl. desolvation temperature)	600 °C
Stoßgasstrom (engl. collision gas flow) Ar	0,15 mL/min
Stoßenergie (engl. collision energy)	
Doxapram / Doxapram-d5	18 V
Ketodoxapram / Ketodoxapram-d5	23 V

2.6.2.4. Bestimmung der Proteinbindung

Zur Bestimmung der Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram wurde eine Gleichgewichtsdialyse mit dem schnelle Gleichgewichtsdialyse (RED)-System (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 300 µL einer Plasmaprobe in die rot umringte Kammer gegeben und 550 µL Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) in die weiß umringte Kammer. Anschließend wurde für 4 h bei 37 °C unter leichtem schütteln inkubiert. Für die Messung wurde aus jeder der Kammern 100 µL Flüssigkeit entnommen und wie im Abschnitt 2.6.2.2 beschrieben, aufbereitet und anschließend vermessen.

2.6.3. Quantifizierung von A293

Analog zur Bestimmung der Konzentration von Doxapram und Ketodoxapram (siehe Abschnitt 2.6.2) wurde eine UPLC-MS/MS-Methode entwickelt, um A293 in Schweineplasma zu quantifizieren. Die Methode wurde nur für Tierproben angewendet und daher nicht vollständig nach den Vorgaben von FDA und EMA validiert.

2.6.3.1. Herstellung der Stammlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von A293 in Blutplasma benötigte Kalibrier- und QC-Lösungen. Diese wurden aus zwei Stammlösungen angesetzt, die aus unabhängigen Einwaagen hergestellt worden waren. Für jede Stammlösung wurden 5–10 mg A293 (ChiroBlock, Wolfen, Deutschland) eingewogen, in 5 mL einer Mischung aus ACN und Wasser (1:1, v/v) eluiert und anschließend mit dieser verdünnt, um Kalibrier- und QC-Lösungen der gewünschten Konzentrationen (siehe Tabelle 2.17) zu erhalten. Des Weiteren wurde eine Stammlösung des mehrfach deuterierten A293-d8 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) angesetzt, aus der durch

Verdünnung die verwendete IS-Lösung hergestellt wurde. Die angesetzten Stammlösungen wurden bei -20°C und die gebrauchsfertigen Kalibrier-, QC- und IS-Lösungen bei 4°C gelagert und vor der Verwendung wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Tabelle 2.17.: Konzentrationen der verwendeten Kalibrations- und QC-Lösungen zur Quantifizierung von A293 im Blutplasma von Schweinen. Die Kalibrations- und QC-Lösungen wurden aus unterschiedlichen Stammlösungen angesetzt, die aus getrennten Einwaagen hergestellt worden waren. QC D wurde zur Überprüfung der Verdünnung angesetzt und ist daher oberhalb des kalibrierten Bereichs. Die angesetzten Lösungen wurden bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

Lösung	Konzentration	Lösung	Konzentration
Kal A	5 ng/mL	QC A	15 ng/mL
Kal B	10 ng/mL	QC B	150 ng/mL
Kal C	25 ng/mL	QC C	1 500 ng/mL
Kal D	100 ng/mL	QC D	3 000 ng/mL
Kal E	500 ng/mL		
Kal F	1 000 ng/mL		
Kal G	2 500 ng/mL		

2.6.3.2. Probenaufbereitung

Die Extraktion von A293 aus Schweineplasma erfolgte durch LLE. Hierfür wurden 100 μL Blutplasma mit 25 μL IS-Lösung versetzt, um Verluste während der Probenaufbereitung auszugleichen. Außerdem wurden 100 μL 0,2 M Boratpuffer (pH 9) und 2 mL TBME hinzu gegeben. Anschließend wurden die Proben für 10 min durch intensives invertieren durchmischt, für 10 min bei 15°C und $3\,000 \times g$ zentrifugiert und 25 μL der organischen Phase in ein Reagenzglas überführt und für 10 min unter 40°C Stickstoffbegasung zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 250 μL der mobilen Phase gelöst und zur Messung in eine 96-Well Platte überführt.

Für die Kalibrier- und QC-Proben wurden 100 μL Nullplasma von Schweinen und 25 μL der zuvor angesetzten Kalibrier- und QC-Lösungen anstelle der 100 μL Blutplasma mit 25 μL IS-Lösung versetzt und anschließend wie beschrieben weiterverarbeitet. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des kalibrierten Bereiches lagen, wurden mit Nullplasma 1:10 oder 1:100 verdünnt. Zur Überprüfung der Verdünnung wurde bei der Vermessung dieser Proben zusätzlich QC D in einer entsprechenden Verdünnung aufgearbeitet und ebenfalls bestimmt.

2.6.3.3. Chromatographie und Massenspektrometrie

Auf die Probenaufbereitung folgt die chromatographische Auftrennung und anschließende Detektion durch Massenspektrometrie. Die Chromatographie erfolgte mit einer Aquity UPLC[®] zusammen mit einem Xevo TQ-S Tandem-Massenspektrometer (Waters).

Die chromatografische Auftrennung erfolgte im Gradienten-Modus mit einer Flussrate von 0,5 mL/min auf einer Acquity UPLC® BEH C18 Trennsäule (1,7 µm, 2,1 × 50 mm; Waters), die auf 40 °C erwärmt wurde. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL und als Laufmittel wurde eine Mischung aus Lösung A (Wasser mit 5 % ACN und 0,01 % FA) und Lösung B (ACN mit 0,01 % FA) verwendet.

Die Messung startete mit einem Verhältnis von 90 % A / 10 % B für 0,5 min, drehte sich bis 3,0 min um auf 5 % A / 95 % B und hielt dieses Verhältnis bei bis 3,5 min. Danach wurde bis 4,0 min wieder das ursprüngliche Verhältnis von 90 % A / 10 % B hergestellt und bis zum Endes des Messlaufes nach 4,5 min gehalten. Nach Ionisation der Moleküle mit ESI (Z-spray) im positiv Modus wurden zur Quantifizierung von A293 Übergänge in den Masse-zu-Ladungsverhältnissen von m/z 406,3 > 122,1 für A293 und m/z 414,3 > 122,1 für A293-d8 überwacht. Die verwendeten instrumentellen Parameter sind in Tabelle 2.18 zusammengefasst.

Tabelle 2.18.: Instrumentelle Parameter, die verwendetet wurden zur massenspektrometrischen Quantifizierung von A293 in Schweineplasma.

Parameter	Wert
Kapillarspannung (engl. capillary voltage)	2,5 kV
Kegelspannung (engl. cone voltage)	30 V
Quellentemperatur (engl. source temperature)	150 °C
Kegelgasfluss (engl. cone gas flow) N ₂	150 L/h
Desolvatisierungsgasstrom (engl. desolvation gas flow) N ₂	1 000 L/h
Desolvatisierungstemperatur (engl. desolvation temperature)	600 °C
Stoßgasstrom (engl. collision gas flow) Ar	0,15 mL/min
Stoßenergie (engl. collision energy)	34 V

2.7. Großtiermodelle

Die Verhältnisse in komplexen Organismen werden durch *in vitro* Modelle nur unzureichend dargestellt, daher ist es notwendig, neben den zuvor beschriebenen zellulären Modellen auch Tiermodelle anzuwenden. Auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung, insbesondere dem Teilgebiet der Erforschung von VHF, sind Kleintiere mit ihrem schnellen Puls, kleinem Gefäßsystem und unterschiedlicher Ausstattung an Ionenkanälen nur begrenzt als Modell geeignet, so dass bestimmte Fragestellungen nur in Großtieren erforscht werden können. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente, wurde auf ein bereits zuvor etablierte Modell von VHF im Hausschwein (lat. *Sus scrofa domesticus*) zurück gegriffen (Wiedmann et al. 2022a; Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2020; Schmidt et al. 2019).

2.7.1. Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere der Rasse Deutsche Landrasse mit einem Gewicht von 30–40 kg wurden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU bei einer Raumtemperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 50–60 % und einem 12 h Wechsel von Hell zu Dunkel gehalten. Die Fütterung erfolgt restriktiv zweimal täglich mit SAF 130M Alleinfuttermittel für Mastschweine ab 35 kg (Raiffeisen Kraftfutterwerk Kehl, Kehl am Rhein, Deutschland), wobei Wasser *ad libitum* zur Verfügung stand. Zur Haltunganreicherung befanden sich Beißhölzer, Ketten und Futterbälle in den mit Stroh gefüllten Käfigbuchten.

Die Tierversuchsvorhaben mit den Referenznummern G29-12, G217-18 und G198-20 wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt. Die Durchführung erfolgte anhand des deutschen Tierschutzgesetzes und der Richtlinie 2010/63/EU in den Räumlichkeiten der IBF der Universität Heidelberg.

2.7.2. Anästhesie

Vor Durchführung der operativen Eingriffe wurden die Versuchstiere anästhesiert. Hierfür wurden diese am Tag der geplanten Operation nüchtern gehalten, um ein mögliches Aspirieren während der Narkose zu verhindern. Die Anästhesie wurde durch eine intramuskuläre (*i.m.*) Applikation von 5 mg/kg Azaperon (Stresnil®; Elanco, Cuxhaven, Deutschland) in den Nacken der Tiere eingeleitet. Nach einer Einwirkzeit von 15–30 min wurden die Tiere mit einer Kombination aus 10 mg/kg Ketamin (Ketamin 10 %; Bremer Pharma, Warburg, Deutschland) und 0,5 mg/kg Midazolam (Midazolam 5 mg/mL, Hameln Pharma, Hameln, Deutschland), die ebenfalls *i.m.* appliziert wurde, vollständig narkotisiert. Anschließend wurde ein venöser Zugang über die Ohrvene der Tiere eröffnet (Vasofix® Braunüle® 1,30 x 45 mm G 18 grün; B Braun Melsungen) und die Narkose durch einen *i.v.* Bolus von 2 mg/kg Propofol (Propofol 2 %, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) vertieft. Zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung wurden die Tiere intubiert (Endotrachealtubus; Smith Medical, Minneapolis, MN, USA) und künstlich beatmet (Primus, Dräger, Lübeck, Deutschland). Die Narkose wurde durch Propofol Dauerinfusion (10 mg/(kg h)) aufrechterhalten. Zur zusätzlichen Analgesie erhielten die Tiere 0,01 mg/kg Buprenorphin *i.v.* (Buprenorvet sine 0,3 mg/mL; Elanco, Bad Homburg, Deutschland). Des Weiteren erhielten die Tiere zur Infektionsprophylaxe 1 500 mg Cefuroxim *i.v.* (Cefuroxim-saar 1 500 mg; Chephasaar, St. Ingbert, Deutschland).

2.7.3. Untersuchungen zu Beginn der Operation

Nachdem die Versuchstiere narkotisiert und intubiert worden waren, wurde je nach Experiment bei einem Teil der Tiere eine EPU zur Erfassung der Ausgangswerte durchgeführt. Für die Untersuchung mussten sich die Tieren im SR befinden, weshalb bei akuten Episoden von VHF erst eine eCV erfolgte, bevor nach einer Wartezeit von 30 min die Untersuchung fortgesetzt werden konnte.

Bei den Tieren, die eine EPU zu Erfassung der Ausgangswerte erhalten hatten, wurde diese bei der finalen Operation wiederholt, um mögliche Unterschiede, die durch Appli-

kation der zu untersuchenden Substanzen entstanden sind, zu erfassen. Befanden sich die Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt im VHF, musste dieses zuerst durch eine eCV terminiert werden, bevor die Untersuchung nach einer Wartezeit durchgeführt werden konnte.

2.7.4. Induktion von paroxysmalem Vorhofflimmern

Um den Effekt pharmakologisch aktiver Substanzen auf Schweine im VHF zu testen, wurde ein bereits etabliertes Tiermodell verwendet (Wiedmann et al. 2022a; Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2020; Schmidt et al. 2019). Hierbei wurde durch Implantation eines Zweikammer-Herzschrittmachers (St. Jude Medical, St. Paul, MN, USA) und anschließender schneller, atrialer Stimulation mit 40 Hz, VHF in Schweinen ausgelöst. Die Stimulation wurde gemäß eines integrierten Biofeedback-Stimulationsalgorithmus nach 20 s pausiert und der Herzrhythmus überprüft. Wurde detektiert, dass die Tiere sich im VHF befanden, wurde die Stimulation ausgesetzt bis eine SR-Episode mit einer Dauer von mindestens 15 s registriert wurde, wonach weiter stimuliert wurde bis die Tiere intrinsisches VHF entwickelten. Zur Vermeidung der Tachykardiomyopathie als Folge des ausgelösten VHF wurde bei den Tieren der AV-Knoten mit Radiofrequenz abladiert und die Ventrikel durch den Zweikammer-Herzschrittmacher stimuliert.

2.7.5. Medikamentengabe und Blutentnahme

Zur Applikation von Medikamenten und zur Entnahme von Blutproben wurde im Rahmen der initialen Operation ein zentraler Venenkatheter (ZVK) implantiert. Dieser wurde unterhalb der Haut entlang des Halses geführt und trat im Nacken der Tiere aus. Dies ermöglichte eine einfachere Manipulation des ZVK mit einem verminderten Infektionsrisiko. Die Medikamentengabe erfolgte ein- bis zweimal täglich, wobei vor jeder Applikation eine Blutentnahme zur Bestimmung der Talspiegel erfolgte. Die Blutproben wurden in Lithium-Heparin-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und bei Raumtemperatur für 10 min mit $2\,500 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden aus dem Blutplasma zwei Aliquote von je $750\,\mu\text{L}$ entnommen und bei $-20\,^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse (siehe Abschnitt 2.6) gelagert.

Zur Medikamentengabe über den ZVK wurde Doxapram in Form einer wässrigen Injektionslösung (Dopram[®]; Carinopharm, Elze, Deutschland) verwendet. Der Metabolit Ketodoxapram (Enamine, Riga, Lettland) ist nicht wasserlöslich, so dass eine Stammlösung in Ethanol zu $30\,\text{mg/mL}$ angesetzt werden musste, die kurz vor Applikation mit 0,9 % Kochsalzlösung 1:10 verdünnt worden war. Für die Substanzen A293 und Z3217409047 (Enamine) wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von $10\,\text{mM}$ in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und vor der Verabreichung mit 0,9 % Kochsalzlösung entsprechend verdünnt. Amiodaron wurde ebenfalls als wässrige Injektionslösung (Codarex[®]; Sanofi-Aventis Deutschland, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

2.7.6. Messung hämodynamischer Parameter

Um den akuten Einfluss verschiedener Substanzen auf den Pulmonalarterien (PA)-Druck zu überprüfen, wurde bei einigen Schweinen die Oberschenkelarterie und Jugularvene kanüliert, um eine invasive Blutdruckmessung (Dräger infinity system, Dräger) zu ermöglichen. Zur Bestimmung des PA-Drucks wurde ein Swan-Ganz Katheter (Biosensors International, Morges, Schweiz) verwendet. Die Messungen erfolgten zu Beginn des jeweiligen Experimentes, um die Ausgangswerte zu erfassen, und nach jedem Applikationsschritt der verschiedenen Substanzen und der Kontrolle. Untersucht wurde Amiodaron als klassischer Vertreter der etablierten Antiarrhythmika sowie Doxapram, Ketodoxapram und die experimentellen TASK-1-Inhibitoren Z3217409047 und A293. Für jede Substanz gab es fünf Applikationsschritte im Abstand von jeweils 10 min, wobei sich die insgesamt verabreichte Menge an Substanz jeweils verdoppelte. Die genauen verabreichten Dosierungen sind bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben. Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurde ebenfalls nach jeder Verabreichung eine EPU durchgeführt.

Zusätzlich zur Messung der akuten Effekte wurde für Doxapram und Ketodoxapram der Einfluss einer zweiwöchigen Dauertherapie auf den PA-Druck untersucht. Hierfür wurde bei den Tieren, die für Untersuchungen der Pharmakokinetik einmal täglich für 14 d mit entweder 1 mg/kg Doxapram oder Ketodoxapram behandelt wurden, während der initialen und im Rahmen der terminalen Operation jeweils die hämodynamischen Parameter gemessen.

2.7.7. Terminale Operation

Nach Ende des Versuchsvorhabens mussten die Tiere terminal operiert werden. Hierfür wurden die Tiere, wie bereits in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, anästhesiert und einer Untersuchung (Abschnitt 2.7.3) unterzogen. Nachdem alle Untersuchungen abgeschlossen worden waren, bekamen die Tiere einen zusätzlichen Propofol-Bolus (*i.v.*) und weitere Schmerzmedikation (0,02 mg/kg Buprenorphin *i.v.*) verabreicht. Anschließend wurden die Tiere durch eine intrakardiale Applikation von 40 mmol KCl (Kaliumchlorid 7,5 % gefärbt, B Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) euthanasiert. Direkt im Anschluss wurde eine finale Blutprobe entnommen, und wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben, behandelt und gelagert. Möglichst zeitgleich wurde der Schädel eröffnet und Proben von beiden Gehirnhemisphären entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse (Abschnitt 2.6) gelagert.

2.8. DOCTOS-Studie — First-in-human

Im Anschluss an die präklinischen Studien erfolgte eine Analyse im Rahmen einer First-in-human Studie, der DOCTOS-Studie (EudraCT Nr. 2018-002979-17). Hierbei wird Doxapram im Rahmen der klinischen Studie der Phase Ib/IIa für die Indikation der akuten Kardioversion von VHF eingesetzt. Die DOCTOS-Studie wurde nach einem positiven Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Nr. AFmu-736/2018) durch die zuständige Bundesoberbehörde (Bundesinstitut für

Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), Bonn, Deutschland) genehmigt (Eudra-CT Nr. 2018-002979-17; aktuelle Version des Studienprotokolls: 6.0 vom 15.05.2022). Die Studie ist momentan in der Rekrutierungsphase und noch nicht final abgeschlossen, daher werden in dieser Arbeit nur vorläufige, exemplarische Zwischenanalysen gezeigt, die sich im Vergleich zur finalen Analyse unterscheiden können.

2.8.1. Ablauf der Studie

Im Rahmen der Studie werden Patienten rekrutiert, die sich in der kardiologischen Notaufnahme des Universitätsklinikums Heidelberg mit Symptomen von VHF vorstellen. Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien (vgl. Tabelle 2.19 und 2.20) im Rahmen einer körperlichen Untersuchung (sogenanntes Screening), sowie Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten werden diese als Probanden in die Studie aufgenommen. Jeder Proband durchläuft drei Studienteile: einen ersten Studientag mit Doxapram Exposition (siehe Abschnitt 2.8.2), eine bzw. mehrere Nachfolgeuntersuchungen 24–48 h nach Exposition mit optionaler eCV und eine Abschlussuntersuchung an Tag sieben nach Studieneinschluss (siehe Abschnitt 2.8.3). Die Studie befindet sich momentan noch in der Rekrutierungsphase.

Tabelle 2.19.: Einschlusskriterien der DOCTOS-Studie.

- 1 Patient ist zwischen 18 und 80 Jahren alt
- 2 Patient erfüllt die Kriterien für eine nicht notfallmäßige elektrische oder pharmakologische Kardioversion
- 3 Patient verfügt über ein SR-EKG, in dem die QT-Zeit ermittelt werden kann
- 4 Patient versteht die Studienintervention und ist Willens sie zu befolgen
- 5 Patient wurde die Studie vollständig erklärt und er unterschreibt freiwillig die Einverständniserklärung

Tabelle 2.20.: Ausschlusskriterien der DOCTOS-Studie.

- 1 Jede Teilnahme an einer früheren klinischen Studie innerhalb von fünf Halbwertszeiten der getesteten Substanz oder, falls diese unbekannt ist, innerhalb von vier Wochen vor Einschluss
- 2 Jede körperliche Beeinträchtigung, die nach Meinung der Prüfer die Sicherheit der Patienten und das Erreichen der Studienziele negativ beeinflusst
- 3 Unfähigkeit, auf Grund von Sprachbarrieren oder mentaler Beeinträchtigung mit den Prüfern ausreichend zu kommunizieren
- 4 Schwangerschaft oder Stillzeit

- 5 Einnahme von jedweder antiarrhythmischen Begleitmedikation (nach Vaughan Williams Klassifikation), außer Beta-Blocker der Klasse II, innerhalb von fünf Halbwertszeiten der entsprechenden Substanz:
 - class Ia: z.B. Quinidin, Ajmalin, Procainamid oder Disopyramide
 - class Ib: z.B. Lidocain, Phenytoin, Mexiletin oder Tocainid
 - class Ic: z.B. Encainid, Flecainid, Propafenon oder Moricizin
 - class III: z.B. Amiodaron, Sotalol, Ibutilid, Dofetilid, Dronedarone oder Vernakalant
 - class IV: z.B. Verapamil oder Diltiazem
 - class V: z.B. Adenosin, Digoxin oder Digitoxin
 - unklassifiziert: Ranolazin
- 6 Jede Adenosin ähnliche Substanz (z.B. Ticagrelor) innerhalb von fünf Halbwertszeiten der entsprechenden Substanz
- 7 Jede Einnahme von Magnesium (über 500 mg) innerhalb von 4 h vor geplanter Exposition. Wurde Magnesium bis zu 24 h vor der geplanten Exposition verabreicht, dürfen die Magnesiumblutspiegel nicht um mehr als 10 % über dem oberem Normalwert liegen
- 8 Jede Einnahme von Theophyllin bis zu 3 d vor geplanter Exposition
- 9 Jede Kontraindikation für die Anwendung von Doxapram
 - a) bekannte Intoleranz für Doxapram
 - b) systolischer Blutdruck unter 100 mmHg oder über 170 mmHg
 - c) diastolischer Blutdruck unter 60 mmHg oder über 100 mmHg
 - d) Herzfrequenz unter 50/min
 - e) akutes Koronarsyndrom
 - f) dekompensierte Herzinsuffizienz oder chronischer Herzinsuffizienz der New Yorker Herzvereinigung (NYHA) Klassen III oder IV
 - g) Hyperthyreose
 - h) Phäochromozytom in der Vorgeschichte
 - i) Beeinträchtigte Atemfunktion
 - j) Epilepsie oder andere konvulsive Störungen in der Vorgeschichte
 - k) Zerebrale Verletzungen, zerebrale Ödeme, zerebrale Ischämie oder zerebrale Blutungen in der Vorgeschichte
- 10 Jede Notfallsituation, die eine sofortige Behandlung erfordert
- 11 Jede sofortige Notwendigkeit einer Sympathomimetika, Monoaminoxidase-Hemmer, Halothan, Isofluran, Enfluran oder Theophyllin Gabe
- 12 Hämoglobin unter 10 g/dL
- 13 Bekannte Kanalopathie
- 14 Anzeichen eines langes QT-Syndrom (männliche Patienten mit QTc über 430 ms, weibliche Patienten mit QTc über 450 ms) oder verkürztes QT-Syndrom in einem SR-EKG der letzten zwei Jahre
- 15 Körpergewicht über 140 kg

Bei DOCTOS handelt es sich um eine Dosisfindungsstudie, daher werden die Probanden konsekutiv in Kohorten mit steigender Dosierung eingeteilt um eine effektive Dosis zu ermitteln (Abbildung 2.1). Aus Sicherheitsgründen wird mit zwei Dosierungen im subtherapeutischen Bereich (0,5 mg/kg und 1,0 mg/kg) begonnen und erst nach Abschluss dieser beiden Kohorten wird die Dosis (2,0 mg/kg) getestet, die im Schweinemodell zur erfolgreichen Kardioversion führte (Wiedmann et al. 2022a). Eine weitere Erhöhung der Dosierung mit 8 mg/kg als Dauerinfusion kann im Anschluss ebenfalls getestet werden. Eine Kohorte zählt als abgeschlossen, sobald entweder zehn Probanden eingeschlossen wurden oder von sechs eingeschlossenen Probanden weniger als zwei den primären Endpunkt erreichen.

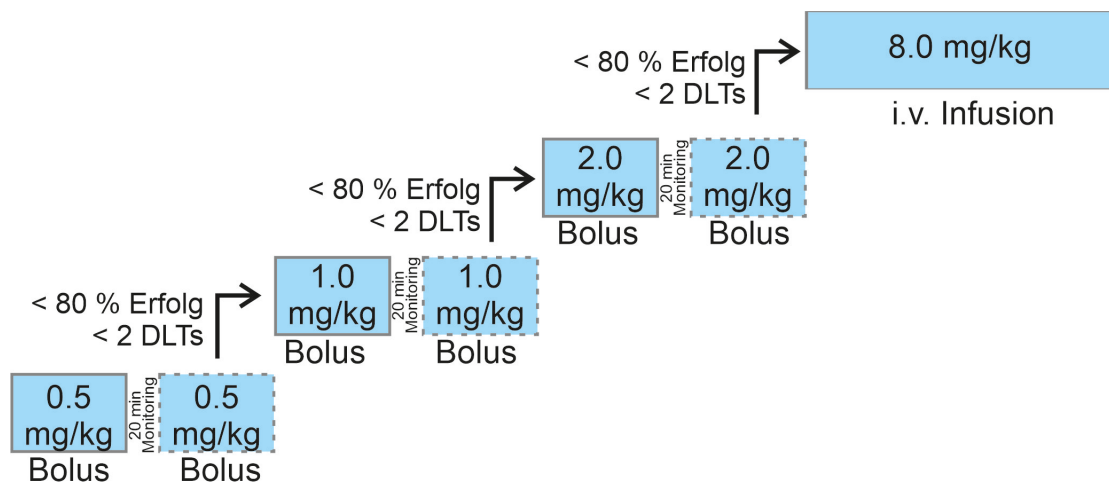


Abbildung 2.1.: Geplante Eskalierungsstufen zur Findung der effektiven Dosierung von Doxapram zur Kardioversion von VHF im Rahmen der DOCTOS-Studie. Eine Dosierungskohorte besteht aus bis zu 10 Probanden. Gestartet wird mit einem *i.v.* Bolus von 0,5 mg/kg, der optional von einem zweiten identischen Bolus gefolgt wird. Erreichen weniger als 80 % der Probanden in einer Kohorte den primären Endpunkt und treten weniger als zwei dosislimitierenden Toxizitäten auf, wird die nächste Kohorte mit einer höheren Dosierung gestartet. In der vierten Kohorte wird anstelle des *i.v.* Bolus eine Dauerinfusion über 8 h verabreicht werden.

DLT: dosislimitierende Toxizität; DOCTOS: Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie; *i.v.*: intravenös; VHF: Vorhofflimmern.

Abbildung modifiziert nach DOCTOS-Studienprotokoll V6.0 Stand 15.05.2022.

2.8.2. Exposition und erster Studientag

Nach der körperlichen Einschussuntersuchung und der schriftlichen Einwilligung eines jeden Probanden wird zur Bestimmung der Ausgangswerte Blutproben in EDTA-, Citrat-, Lithium Heparin- und Serum-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und Vitalparameter (Herzfrequenz, Herzrhythmus, Blutdruck, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur) erhoben. Die EDTA-, Citrat-, und eines der Lithium Heparin-Röhrchen werden zeitnah ins Zentrallabor zur Bestimmung von Blutparame-

tern gebracht. Ein weiteres Lithium Heparin-Röhrchen und das Serum-Röhrchen werden aufrecht stehend für mindestens 30 min bei Raumtemperatur gelagert und danach bei $2\,500 \times g$ und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Aus jeder Probe werden zwei unabhängig Aliquote von mindestens 750 μL erstellt und bei -20°C eingelagert. Zur Bestimmung von Vitalparametern während der Studie werden die Patienten an das Überwachungssystem der kardiologischen Notaufnahme angeschlossen, das kontinuierlich Herzfrequenz, Herzrhythmus (12-Kanal EKG), Blutdruck, Blutsauerstoffsättigung und Atemfrequenz aufzeichnet. Darüber hinaus werden die Probanden an ein 7-Tage Langzeit-EKG angeschlossen, das bis zur Beendigung der Studie getragen wird. Die Körpertemperatur wird manuell mit einem Ohrthermometer gemessen und erfasst.

Parallel zur Bestimmung der Ausgangswerte wird die benötigte Studienmedikation aus dem Fertigarzneimittel Dopram® der Firma Carinopharm (Elze, Deutschland) hergestellt. Hierbei handelt es sich um eine Injektionslösung mit einer Konzentration von 20 mg/mL Doxapram in 5 mL Ampullen. Unter aseptischen Bedingungen wird aus der jeweils benötigten Anzahl Ampullen zwei Injektionsspritzen für Kohorten I–III mit der gewünschten Dosierung befüllt und mit Probandennummer, Inhalt, Datum und genauer Uhrzeit beschriftet. Die Notierung der genauen Uhrzeit auf den Spritzen wird benötigt, da diese 1 h nach dem Aufziehen verworfen und aus frischen Ampullen neu angesetzt werden müssen. Auch werden die geöffneten Ampullen nach Herstellung der beiden Dosen verworfen und für keine weiteren Probanden verwendet.

Für Kohorte IV wird anstelle der zwei Injektionsspritzen die benötigte Anzahl an Infusionsbeuteln mit einer Konzentration von 500 mg/mL Doxapram hergestellt. Hierfür wird aus einem Infusionsbeutel mit 500 mL isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, Deutschland) 25 mL Lösung entfernt und durch 25 mL des Fertigarzneimittels Dopram®, entspricht 5 kompletten Ampullen, ersetzt. Entsprechend des Körpergewichts werden 1–3 Beutel hergestellt, analog der Injektionsspritzen beschriftet und maximal für 24 h ohne Infusionsbesteck gelagert.

Nachdem alle Vorbereitungen abgeschlossen sind und eine sechsstündige Fastenperiode eingehalten wurde, wird mit der Exposition begonnen. Hierfür ist den Probanden ein zweiter *i.v.*-Zugang gelegt worden, so dass die Verabreichung der Studienmedikation über einen, von der Blutentnahme getrennten, Zugang möglich ist. Die Gabe der Medikation erfolgt als langsame Bolusinjektion über einen Zeitraum von 5–15 min (Kohorte I–III). Hierbei wird regelmäßig mit 0,9 % NaCl-Lösung zwischengespült. Der Applikationsbeginn stellt den Zeitpunkt $t = 0$ min dar, auf den sich die folgenden Zeitangaben beziehen und ab dem die sechsstündige Überwachungsperiode beginnt. Innerhalb dieser Periode wird der Herzrhythmus kontinuierlich überwacht, um eine Kardioversion sofort erkennen zu können. Bei erfolgter Kardioversion wird die restliche Periode normal weiter beobachtet und regelmäßig Messwerte erhoben. Kommt es innerhalb der ersten 20 min zu keiner erfolgreichen Wiederherstellung des SR, wird nach 20 min eine zusätzliche zweite identische Doxapram Dosis appliziert. Die Überwachungsperiode wird hierdurch nicht verändert und endete planmäßig nach 6 h mit der Entlassung der

Probanden. Befindet sich der Proband zu dieser Zeit noch im VHF, wird ein Termin zur eCV am darauffolgenden Tag vereinbart, zusammen mit dem ersten Kontrolltermin, der jedoch frühestens 24 h nach Exposition stattfinden darf. Für die Probanden der Kohorte IV erfolgt die Gabe der Medikation als Dauerinfusion über einen Zeitraum von 8 h, gefolgt von einer Überwachungsperiode von 6 h. Befindet sich der Proband am Ende der Periode noch im VHF wird eine eCV für frühestens 24 h nach Ende der Infusion geplant.

Der Blutdruck wird während den ersten zwei Stunden alle fünfzehn Minuten und danach halbstündlich gemessen. Zu den gleichen Zeitpunkten wird auch die Herzfrequenz dokumentiert, während die Körpertemperatur nur noch am Ende der Überwachungsperiode erneut gemessen wird. Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter werden nach erfolgter Applikation weitere Blutproben zu den Zeitpunkten $t = 5, 10, 15, 20, 25, 35, 60, 120, 240, 300$ und 360 min in Lithium Heparin-Röhrchen abgenommen. Die Probe zum Zeitpunkt $t = 25$ min wird nur entnommen, falls die zweite Dosis Doxapram appliziert wird, und die Entnahme der Probe zum Zeitpunkt $t = 20$ min erfolgt stets vor der zweiten Applikation. Ebenfalls wird Blut zur Bestimmung von Biomarkern in Serum-Röhrchen zu den Zeitpunkten $t = 180$ und 360 min abgenommen und zu den Zeitpunkten $t = 0, 5, 25$ und 360 min in speziellen Röhrchen (Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland) für die Bestimmung der Katecholamine.

Für Kohorte IV ändern sich die Zeitpunkte der Probenentnahme und der Erfassung der Vitalparameter. Blutdruck und Herzfrequenz werden unmittelbar vor Beginn der Infusion gemessen und danach halbstündlich bis zum Ende der Überwachungsperiode mit einer zusätzlichen Messung 15 min nach Start der Infusion. Blutproben zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parametern werden zu den Zeitpunkten $t = 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420$ und 480 min nach Start der Infusion und $t = 2, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360$ min nach Ende der Infusion in Lithium-Heparin-Röhrchen abgenommen. Serum-Röhrchen zur Bestimmung von Biomarkern werden zu den Zeitpunkten $t = 0, 180$ und 480 min abgenommen und für die Bestimmung der Katecholamine werden, während die Infusion läuft, stündlich Blutproben in speziellen Blutröhrchen abgenommen.

2.8.3. Nachfolgeuntersuchungen und Beendigung der Studie

Frühestens 24 h nach Applikation der Studienmedikation wird die erste Nachfolgeuntersuchung durchgeführt. Hierbei werden Veränderungen in der Medikation und neu aufgetretene körperliche Beschwerden erfasst sowie eine Blutentnahme durchgeführt um Blutplasmaspiegel der Studienmedikation, verschiedene Biomarker sowie die Katecholaminspiegel (ausschließlich Kohorte IV) zu bestimmen. Befindet sich zu diesem Zeitpunkt der Proband noch oder erneut im VHF wird für die Probanden der Kohorten I—III anschließend eine eCV durchgeführt. Hierbei wird der Proband durch einen *i.v.* Propofol-Bolus anästhesiert und mit Hilfe eines EKG gesteuerten gezielten Stromstoßes wieder in den SR versetzt. Nach erfolgreicher eCV und anschließender Überwachungsphase wird der Proband wieder entlassen. Für die Probanden der Kohorte IV darf die eCV

frühestens 24 h nach Ende der Infusion stattfinden, so dass hierfür ein gesonderter Termin ausgemacht werden muss. Zusätzlich werden in Kohorte IV Nachfolgeuntersuchungen 36 h und 48 h nach Start der Infusion durchgeführt, die in ihrem Umfang der Untersuchung nach 24 h entsprechen.

Nach 7 d erfolgt die Abschlussuntersuchung zum Studienende. Hierbei wird analog zur Einschlussuntersuchung eine komplette körperliche Untersuchung durchgeführt und Veränderungen in der Medikation und neu aufgetretene körperliche Beschwerden erfasst. Ebenso erfolgt eine Blutentnahme zur Bestimmung der erforderlichen Blutparameter und Biomarker. Nach Abschluss der Untersuchung wird der Proband aus der Studie entlassen.

2.9. Datenauswertung

Die Auswertung und Visualisierung der gewonnenen Daten erfolgte mit Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism (V9.4.1; GraphPad Software, San Diego, CA, USA), ImageJ (V1.5f; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und MATLAB (MathWorks, Natick, MA USA). Die Erstellung der linearen Kalibrierungskurven ($1/x^2$) für die Quantifizierung von A293, Doxapram und Ketodoxapram erfolgte mit der Software TargetLynx (V4.1; Waters). Die Kalkulation der pharmakokinetischen Parameter nach einmaliger Gabe erfolgte mit Kinetica (V5.0; Thermo Fisher Scientific) und die nach mehrmaliger Gabe mit Phoenix WinNonLin (V8.0; Certara, Princeton, NJ, USA). Die Auswertung der zellulär-elektrophysiologischen Messungen erfolgte mit Clampfit (V11.2; Molecular Devices).

3. Ergebnisse

3.1. Transkriptionelle Regulation des TASK-1-Kanals

Die Ergebnisse in diesem Kapitel der Arbeit wurden bereits vollständig zusammen mit PD Dr. Felix Wiedmann in geteilter Erst-Autorenschaft in Wiedmann et al. (2022b) publiziert. Teile der hier beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Antonius Büscher und Dr. Dr. Stefan Kallenberger gewonnen und sind an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der transkriptionellen Regulation des TASK-1-Ionenkanals. In der Einleitung wurde bereits die unterschiedliche Expression dieses Kanals bei Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit SR beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.1). Darüber hinaus wurde angesprochen, dass ein Großteil der Gene durch miRNAs reguliert werden (vgl. Abschnitt 1.3.2). Im Folgenden werden diese beiden Themen zusammen gebracht und untersucht, welche miRNAs an der Regulation der TASK-1-Expression beteiligt sind.

3.1.1. Unterschiedliche Expression von miRNAs unter Vorhofflimmern

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Daten beruhen auf Experimenten, die durch Dr. Antonius Büscher durchgeführt wurden. Sie werden hier aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt, wobei die Interpretation der Daten in Eigenleistung erfolgte.

In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe der Datenbanken microRNA.org und TargetScan untersucht, welche miRNAs unter bioinformatischen Gesichtspunkten mit der mRNA des TASK-1-Kanals binden und somit interagieren könnten (Agarwal et al. 2015; Betel et al. 2008). Hierbei wurden die folgenden 16 möglichen miRNAs identifiziert (Abbildung 3.1, Dunkelblau): miRNA-9, miRNA-23a, miRNA-23b, miRNA-25, miRNA-28, miRNA-34a, miRNA-124, miRNA-125b, miRNA-193a, miRNA-202, miRNA-215, miRNA-338, miRNA-449a, miRNA-485, miRNA-708 und miRNA-874. Neben diesen wurden noch sieben weitere miRNAs für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (Abbildung 3.1, Hellblau), für die in der Literatur bereits ein Zusammenhang mit VHF beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um miRNA-1, miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-31 und miRNA-133a, auf deren Funktion teilweise bereits in Abschnitt 1.3.3 eingegangen wurde.

Um die Expression dieser 23 ausgewählten miRNAs zu untersuchen, wurden von insgesamt 61 Patienten, die sich einer Herzoperation mit Herz-Lungen-Maschine unterzogen, rechte Herzhörproben gesammelt, wovon sich zum Zeitpunkt der Operation 23 im SR

befanden, 21 paroxysmales VHF und 17 chronisches VHF hatten (siehe Tabelle 2.9). Aus diesen Proben wurden die 23 obengenannten miRNAs mittels miRNA-Isolationskit isoliert, in cDNA transkribiert und mit dem TaqMan-miRNA-System quantifiziert. Als Referenz hierfür wurde das geometrische Mittel der Expression von miRNA-26b, U47 und RNU6B gewählt. Mit miRNA-133a und miRNA-1 wurden die beiden häufigsten miRNAs bereits im Zusammenhang mit VHF beschrieben, haben jedoch in der bioinformatischen Untersuchung keine mögliche Interaktion mit der TASK-1 mRNA gezeigt. Als drittes folgte mit miRNA-125b die erste miRNA, die in der Voruntersuchung als möglicher Interaktionspartner gezeigt wurde. In absteigender Häufigkeit folgten danach mit miRNA-26a, miRNA-30a, miRNA-21 und miRNA-29b vier weitere, die bereits im Zusammenhang mit VHF beschrieben wurden. Neben miRNA-125b waren miRNA-23a, miRNA-23b, miRNA-28 und miRNA-34a in absteigender Reihenfolge am häufigsten exprimiert von den prädiktierten möglichen Interaktionspartnern.

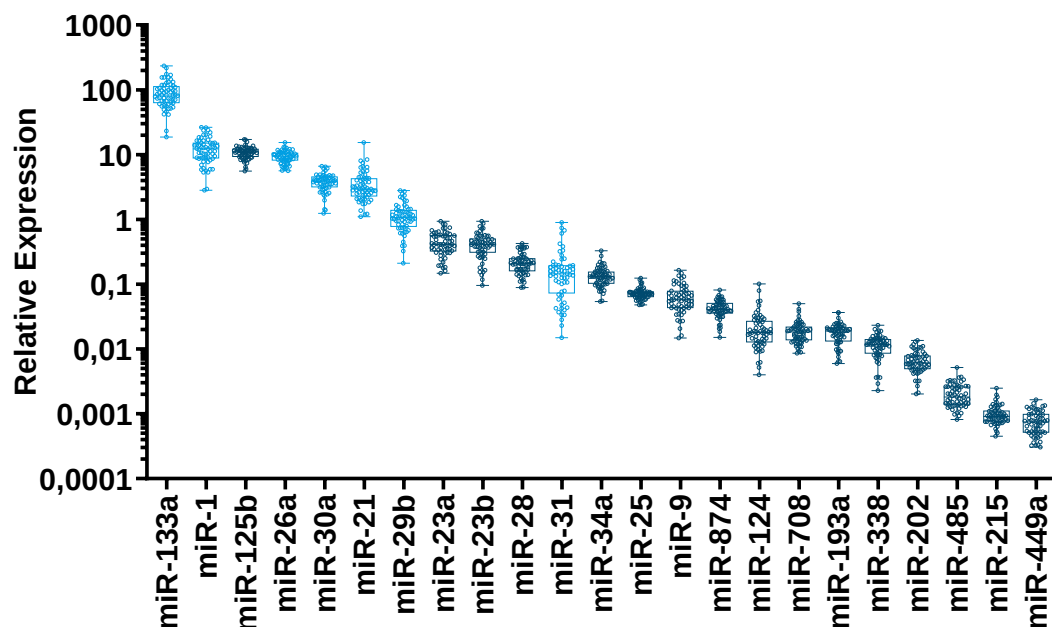


Abbildung 3.1.: Expression der untersuchten miRNAs relativ zum geometrischen Mittel von miRNA-26b, U47 und RNU6B in dem kompletten Patientenkollektiv, bestehend aus SR (n = 23), paroxysmalem VHF (n = 21) und chronischem VHF-Proben (n = 17). Die miRNAs mit prognostizierter Interaktion mit TASK-1 mRNA sind Dunkelblau markiert und die mit bereits beschriebenen Zusammenhang mit VHF sind Hellblau eingefärbt. Die Daten sind dargestellt als Median mit Minimum und Maximum (n = 61).

miR: microRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; SR: Sinusrhythmus; VHF: Vorhofflimmern. *Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).*

In einem nächsten Schritt wurde die VHF-abhängige Regulation der miRNAs untersucht. Hierfür wurde die Expression in den Patienten mit SR der von Patienten im paroxysmalem

und chronischem VHF gegenüber gestellt (Abbildung 3.2). Hierbei zeigte sich, dass miRNA-9, miRNA-485 und miRNA-28 sowohl in Patienten mit paroxysmalem sowie chronischem VHF herunterreguliert sind. Darüber hinaus ist miRNA-338 nur in den chronischen VHF-Proben weniger exprimiert, jedoch nicht unter paroxysmalem VHF. Für miRNA-23a, miRNA-124, miRNA-21, miRNA-34a und miRNA-29b ist hingegen eine Hochregulation unter chronischem VHF zu erkennen, die lediglich für miRNA-21 auch bereits unter paroxysmalem VHF zu sehen ist.

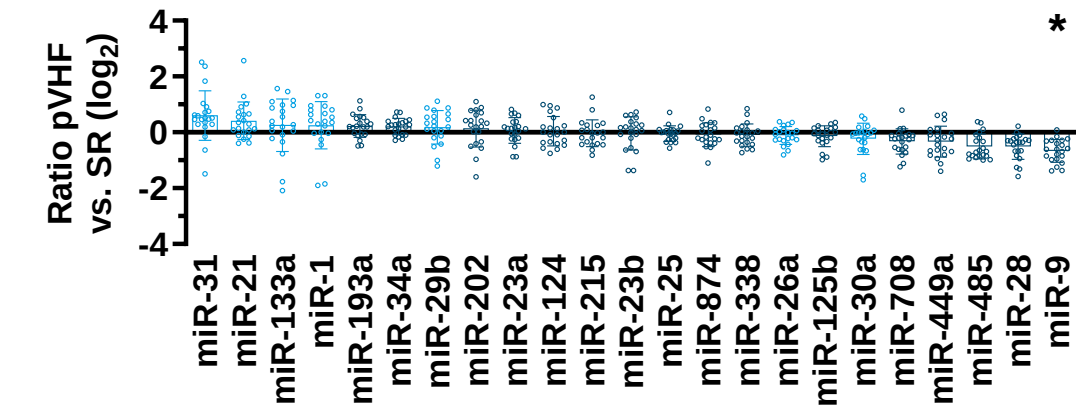
Trägt man nun den negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes gegen den binären Logarithmus der Ratio auf (siehe Abbildung 3.3), so sieht man, dass miRNA-9, miRNA-28 und miRNA-485 signifikant herunterreguliert sind, sowohl unter paroxysmalem als auch chronischem VHF, und das miRNA-338 darüber hinaus nur unter chronischem VHF signifikant herunterreguliert ist. Im Vergleich zwischen SR und paroxysmalem VHF ist keine miRNA signifikant hochreguliert (Abbildung 3.3a), jedoch im Vergleich zum chronischem VHF sind miRNA-124, miRNA-21, miRNA-29b, miRNA-34a und miRNA-23a signifikant erhöht exprimiert (Abbildung 3.3b).

Um nun die miRNAs zu identifizieren, die eine mögliche pathologische Relevanz für VHF haben könnten, wurde die gesamte Expression ein jeder miRNA gegen den Betrag des binären Logarithmus der Ratio von chronischem VHF gegenüber SR, aufgetragen (Abbildung 3.4). In dieser Darstellungsweise sind die miRNAs, die am häufigsten exprimiert sind, oben angeordnet und die, deren Expression sich unter VHF am meisten verändert, auf der rechten Seite. Somit sind die miRNAs, die sowohl sehr häufig als auch stark differenziert exprimiert werden, in der rechten oberen Ecke zu finden. Von den miRNAs, für die bereits eine mögliche Interaktion mit der TASK-1 mRNA vorhergesagt worden war, befinden sich dort miRNA-9, miRNA-23a, miRNA-28, miRNA-34 und miRNA-124. Diese fünf genannten miRNAs wurden daher für die weiteren Untersuchungen selektiert.

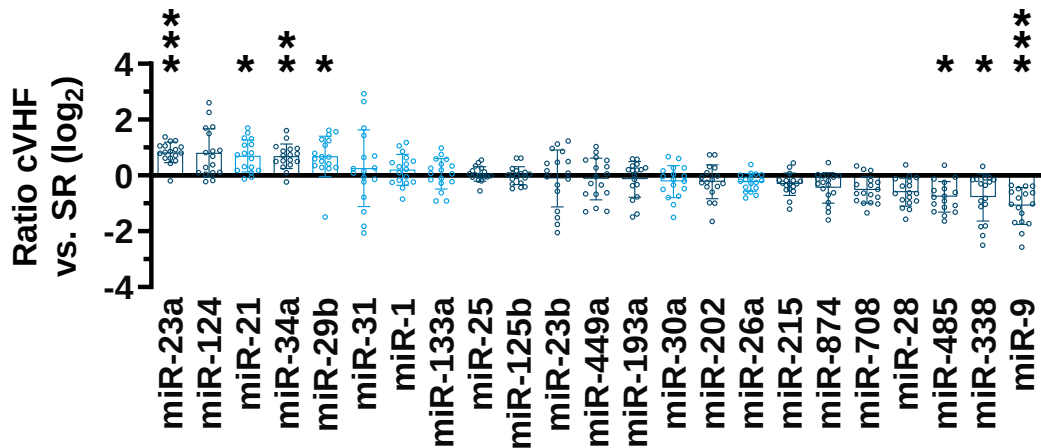
3.1.2. Korrelation zwischen der Expression von miRNAs und TASK-1 mRNA

Die hier gezeigte Auswertung beruht auf Daten, die durch Dr. Antonius Büscher erhoben wurden, wobei die Auswertung in Eigenleistung erfolgte.

Als nächstes wurden die TASK-1 mRNA-Konzentrationen in den gesammelten rechten Herzhörproben untersucht (Abbildung 3.5a bis 3.5k). Hier zeigte sich für die Proben mit chronischem VHF eine signifikante Hochregulation um 44 % ($p = 0,0079$ berechnet mit t Test). Für die Proben der Patienten mit paroxysmalem VHF zeigte sich ein Trend hin zu einer um 28 % erhöhten Expression, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,088$ berechnet mit t Test). Trägt man nun die relative Expression der fünf zuvor selektierten miRNAs getrennt nach Rhythmusstatus auf, so sieht man eine um 48,8 % reduzierte Expression von miRNA-9 unter chronischem VHF ($p < 0,0001$ berechnet mit t Test) und auch für miRNA-28 ist eine Reduktion um 30,1 % zu sehen ($p = 0,0030$ berechnet mit t Test). Eine vermehrte Expression unter chronischem VHF wurde jedoch für miRNA-23a (82,0 %; $p < 0,0001$ berechnet mit t Test), miRNA-34a



a) SR vs. pVHF

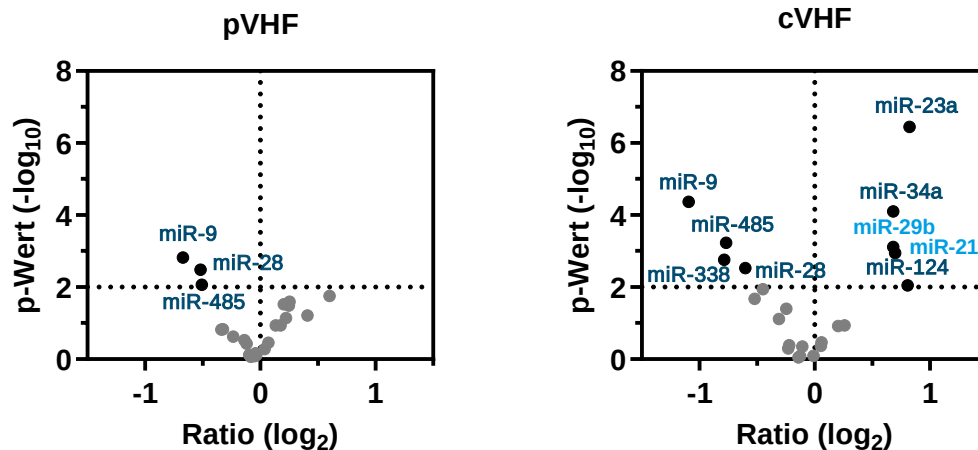


b) SR vs. cVHF

Abbildung 3.2.: Binärer Logarithmus der Ratio der miRNA-Expression von SR-Proben (n = 23) im Vergleich mit paroxysmalem VHF (n = 21; a) und chronischem VHF (n = 17; b). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standfehler. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ berechnet mit t Test gefolgt von einer Bonferroni- Korrektur für n = 23 Testungen.

cVHF: chronisches Vorhofflimmern; pVHF: paroxysmales Vorhofflimmern; miR: microRNA: miRNA: micro Ribonukleinsäure; SR: Sinusrhythmus.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).



a) SR vs. pVHF

b) SR vs. cVHF

Abbildung 3.3.: Binärer Logarithmus der Ratio der miRNA-Expression von paroxysmalem VHF (n = 21; a) und chronischem VHF (n = 17; b) im Vergleich zu SR (n = 23), aufgetragen gegen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes errechnet durch einen *t* Test. Die horizontale gestrichelte Linie entspricht $p = 0,01$.

cVHF: chronisches Vorhofflimmern; pVHF: paroxysmales Vorhofflimmern; miR: microRNA: miRNA: micro Ribonukleinsäure; SR: Sinusrhythmus.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

(67,8%; $p < 0,0001$ berechnet mit *t* Test) und miRNA-124 (111,3%; $p < 0,0001$ berechnet mit *t* Test) beobachtet.

Die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen Expression der TASK-1 mRNA und der jeweiligen miRNA zeigte (Abbildung 3.5g bis 3.5k), dass lediglich miRNA-23a positiv mit TASK-1 korreliert ist (Spearman $r = 0,43$; $p = 0,0005$). Für miRNA-34a ist ein Trend zu einer positiven Korrelation zu erkennen (Spearman $r = 0,24$; $p = 0,062$) und für miRNA-9 hin zu einer negativen Korrelation (Spearman $r = -0,19$; $p = 0,14$). Für miRNA-28 (Spearman $r = -0,061$; $p = 0,64$) und miRNA-124 (Spearman $r = 0,064$; $p = 0,62$) ist keinerlei Korrelation zu erkennen.

3.1.3. miRNA vermittelte Regulation der TASK-1-Expression

Die Generierung, Differenzierung und Bereitstellung der humanen IPS-Zellen erfolgt durch Dr. Timon Seeger.

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Regulation der TASK-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene durch die fünf selektierten miRNAs (miRNA-9, miRNA-23a, miRNA-28, miRNA-34a und miRNA-124), wurden humane IPS-Zellen mit Imitatoren und Inhibitoren der genannten miRNAs transfiziert (Abbildung 3.6). Anschließend wurden aus den Zellen mRNA und Proteine isoliert, die mit Hilfe der qPCR und des Western Blots

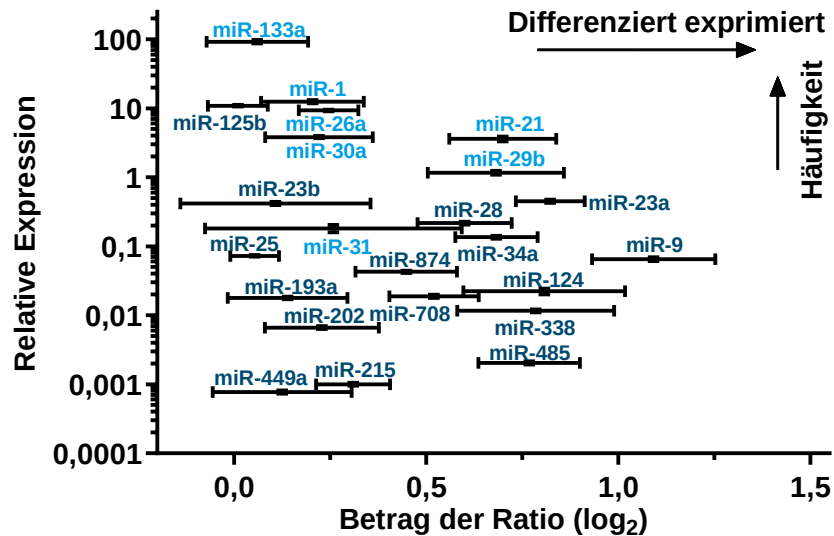


Abbildung 3.4.: Betrag des binären Logarithmus der Ratio der miRNA-Expression von chronischem VHF zu SR aufgetragen gegen die gesamte relative Expression bezogen auf das geometrische Mittel aus miRNA-26b, U47 und RNU6B. Dargestellt ist der Mittelwert ($n = 61$) mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

quantifiziert wurden. Auf Ebene der TASK-1 mRNA zeigte sich nach Transfektion mit dem miRNA-34a-Inhibitor eine signifikante Herunterregulation der TASK-1 mRNA um 42,2 % ($n = 5$; $p = 0,0066$ berechnet mit t Test) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.6a). Die Inhibitoren der vier anderen miRNAs hatten keinen quantifizierbaren Einfluss auf die mRNA-Konzentration. Die Herunterregulation durch den miRNA-34a-Inhibitor konnte ebenfalls auf Ebene der Proteinexpression beobachtet werden (Abbildung 3.6b und 3.6c). Es zeigte sich eine Reduktion um 67,4 % ($n = 5$; $p = 0,0020$ berechnet mit t Test). Darüber hinaus wurde eine reduzierte Expression um 62,2 % durch den miRNA-9-Inhibitor ($n = 5$; $p = 0,0055$ berechnet mit t Test), um 67,1 % durch den miRNA-23a-Inhibitor ($n = 5$; $p = 0,0023$ berechnet mit t Test) und um 76,6 % durch den miRNA-124-Inhibitor ($n = 5$; $p = 0,0013$ berechnet mit t Test) gesehen.

Für die Imitatoren zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Herunterregulation um 40,7 % durch den miRNA-9-Imitator ($n = 6$; $p = 0,00044$ berechnet mit t Test), um 38,9 % durch den miRNA-23a-Imitator ($n = 6$; $p = 0,00028$ berechnet mit t Test) und um 37,8 % durch den miRNA-34a-Imitator ($n = 6$; $p = 0,00034$ berechnet mit t Test; Abbildung 3.6d). Für miRNA-28 und miRNA-124 konnte auf mRNA-Ebene kein Effekt quantifiziert werden. Auf Proteinebene war für alle Imitatoren kein signifikanter Effekt zu sehen, lediglich miRNA-9 und miRNA-124 zeigten einen Trend hinsichtlich einer vermehrten Proteinexpression (Abbildung 3.6e und 3.6f).

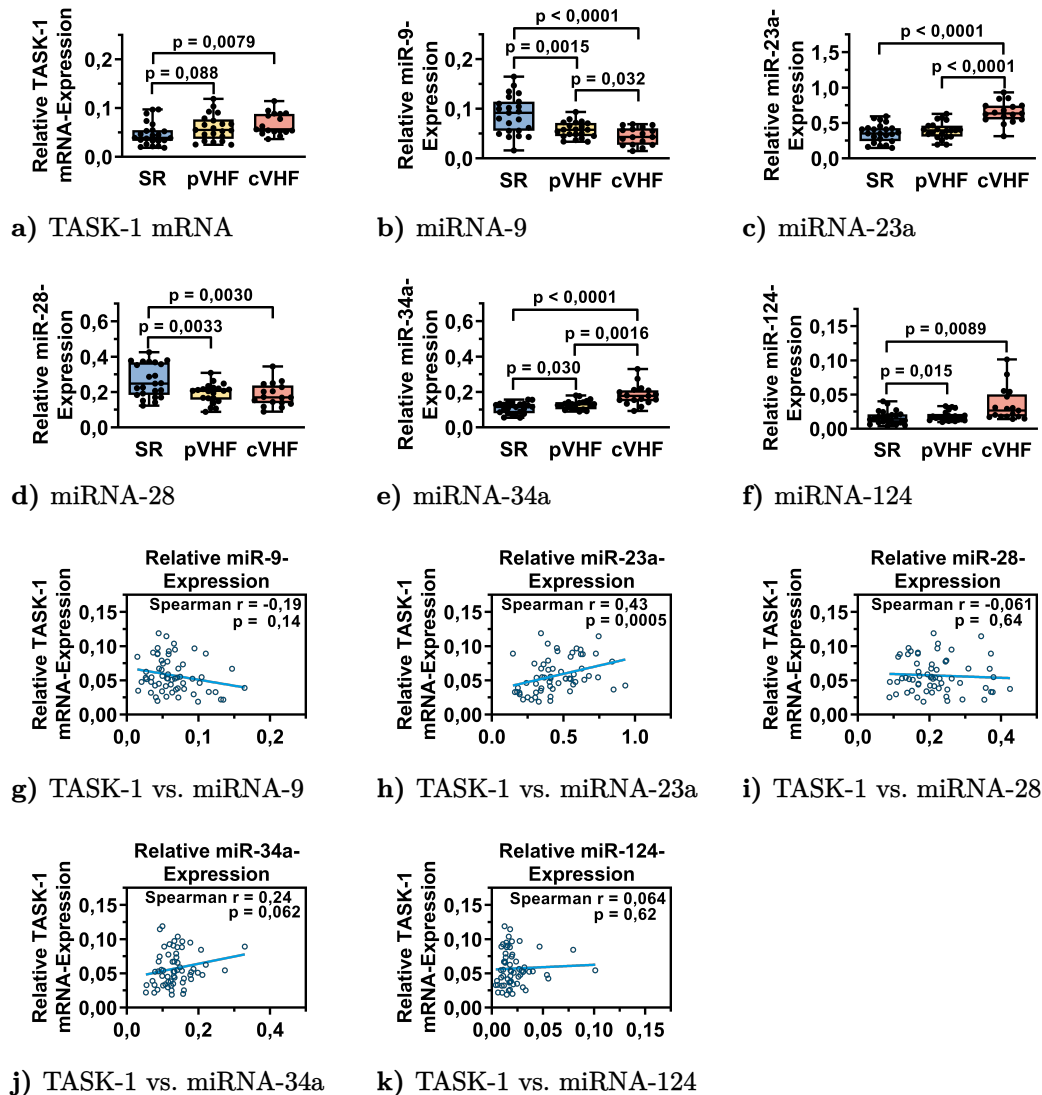


Abbildung 3.5.: Einfluss des Herzrhythmus auf die Expression von TASK-1 und ausgewählten miRNAs. Vergleich der Expression der miRNAs sowie TASK-1 mRNA von Patienten mit SR ($n = 23$), paroxysmalem VHF ($n = 21$) und chronischem VHF ($n = 17$) (a–f). Die Messungen der miRNA-Expression wurden normalisiert zum geometrischen Mittel aus miRNA-26b, U47 und RNU6B. Die TASK-1 mRNA-Expression wurde zu IPO8 normalisiert. Daten sind als Einzelwerte mit Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Box zeigt den Median und geht von den 25 % bis 75 % Perzentilen. Die Balken zeigen den minimalen und maximalen Wert an. Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen t Test berechnet, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Auftragung der Expression von TASK-1 mRNA im Vergleich zu miRNA ($n = 61$; r ist der Korrelationskoeffizienten der Spearman-Rangordnung und p der dazugehörige p-Wert; g–k). cVHF: chronisches Vorhofflimmern; miR: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; mRNA: Boten Ribonukleinsäure; pVHF: paroxysmales Vorhofflimmern; SR: Sinusrhythmus. *Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).*

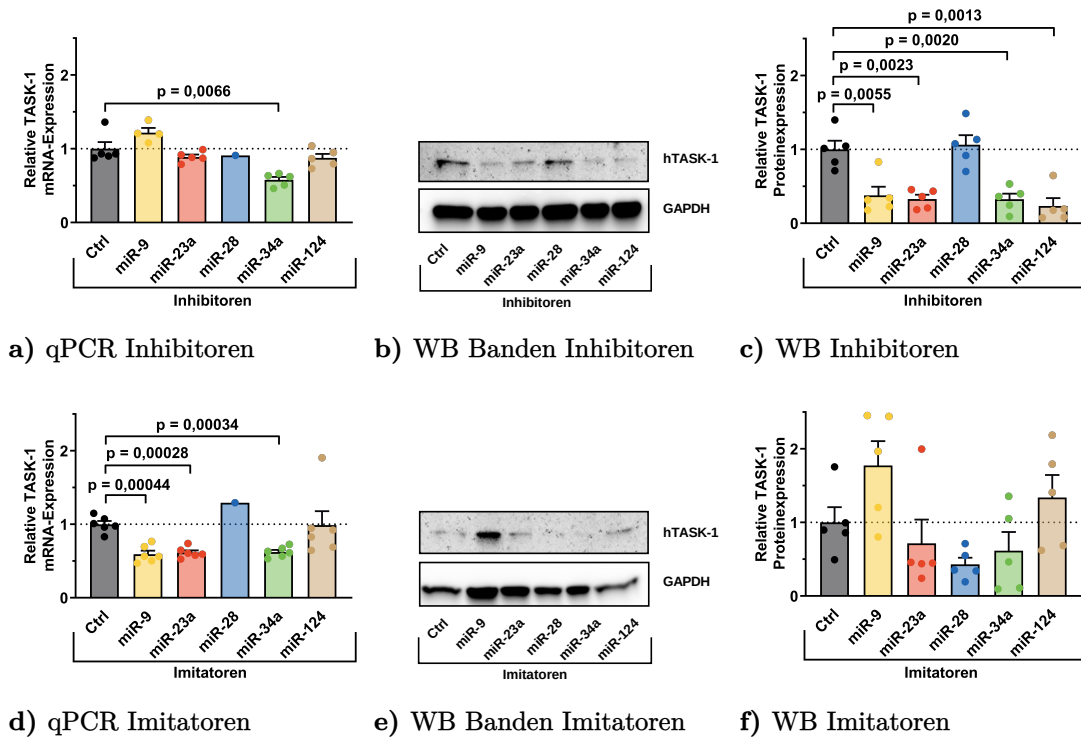


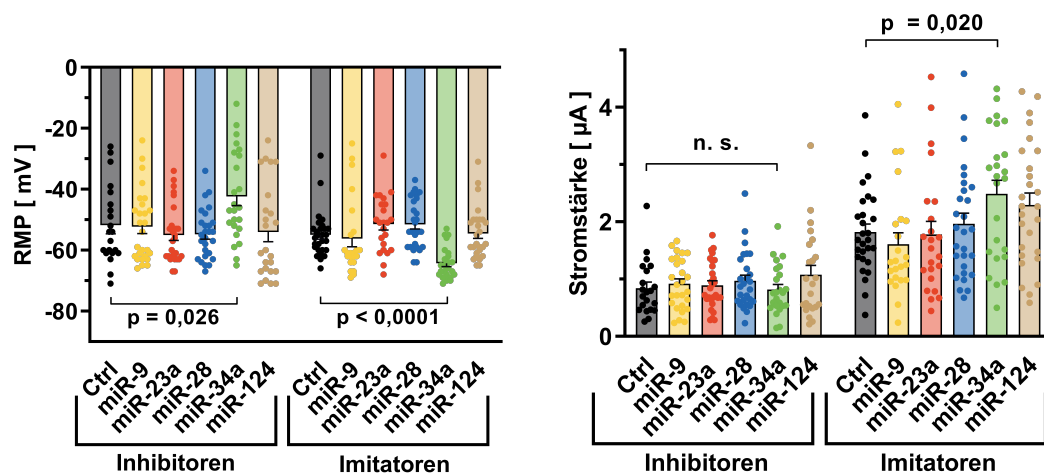
Abbildung 3.6.: Untersuchung der Regulation von TASK-1 auf Protein- und mRNA-Ebene in transfizierten humanen IPS-Zellen. Die humanen IPS-Zellen waren mit miRNA-Imitatoren, -Inhibitoren und entsprechenden Kontrollen transfiziert worden. Die mRNA-Expression wurde per qPCR (a und d) und die Proteinexpression per Western Blot (b, c, e und f) 48 h nach Transfektion bestimmt. Die qPCR Daten wurden normalisiert zur IPO8-Expression nach Transfektion mit miRNA-Inhibitoren (a) und miRNA-Imitatoren (d) und den entsprechenden Kontrollen ($n = 1-6$). Repräsentative Western Blots der Inhibitoren (b) und Imitatoren (e). Proteinexpression von TASK-1 relativ zu GAPDH für die miRNA-Inhibitoren (c) und miRNA-Imitatoren (f) und den entsprechenden Kontrollen ($n = 5$). Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts. Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen t Test berechnet und $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

Ctrl: Kontrolle; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IPO8: Importin 8; IPS: induzierte pluripotente Stammzellen; miR: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; mRNA: Boten Ribonukleinsäure; qPCR: quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; WB: Western Blot.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

3.1.4. Funktionelle Untersuchung der miRNA-Regulation

Nachdem die Einflüsse auf Expressionsebene untersucht worden waren, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, wie die miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren die Funktionalität des TASK-1-Kanals beeinflussen. Hierfür wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten gewählt. Nach einer Ko-Injektion von TASK-1 mRNA gemeinsam mit den verschiedenen Inhibitoren und Imitatoren, wurde das Ruhemembranpotential (RMP) und der Kaliumstrom 24–72 h nach Injektion gemessen, unter Verwendung der TEVC-Technik. Die Zellen wurden, ausgehend von einer Haltespannung von -80 mV, mit Impulsen verschiedener Spannung injiziert, ausgehend von -140 mV bis 60 mV in 20 mV Schritten, um den ausgelösten Strom zu messen. Die Quantifizierung erfolgte am Ende des 20 mV Pulses.



a) Ruhemembranpotential

b) Stromstärke

Abbildung 3.7.: Untersuchung des Einflusses aller untersuchten miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren auf das RMP (a) und die Stromstärke (b) von Oozyten. Nach Ko-Injektion von TASK-1 RNA mit den entsprechenden miRNAs-Imitatoren, -Inhibitoren und Kontrollen in *Xenopus laevis* Oozyten, wurde 48 h später mit der TEVC die Stromstärke sowie das RMP gemessen ($n = 21-28$). Für die Messung der Stromstärke wurden die Oozyten auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt und Spannungspulse mit einer Länge von 500 ms, ausgehend von einer Spannung von -140 mV und in 20 mV Schritten erhöht bis hin zu 60 mV, appliziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts. Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen t Test berechnet, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

Ctrl: Kontrolle; mi-R: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; RMP: Ruhemembranpotential; RNA: Ribonukleinsäure; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

Nach Ko-Injektion von TASK-1 mRNA mit miRNA-34a-Inhibitor zeigten die Oozyten ein signifikant erhöhtes RMP im Vergleich zu Zellen, die mit einer Inhibitor-Kontrolle behandelt wurden ($\text{RMP}_{\text{miRNA-34a-Inhibitor}} -42,4 \pm 3,0$ mV; $\text{RMP}_{\text{Kontroll-Inhibitor}}$

$-51,8 \pm 2,8$ mV; $n = 21-24$; $p = 0,026$ berechnet mit t Test; Abbildung 3.7a). Der auswärtsgerichtete Kaliumstrom, der in injizierten Oozyten fast ausschließlich dem TASK-1-Strom entspricht, war in den Zellen, die mit miRNA-34a-Inhibitor behandelt worden waren, nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Inhibitor-Kontrolle ($n = 21-24$; $p = 0,84$ berechnet mit t Test; Abbildung 3.7b). Die gemeinsame Injektion von TASK-1 mRNA mit miRNA-34a-Imitator führte im Gegensatz zum Inhibitor zu einer signifikanten Reduzierung des RMP ($\text{RMP}_{\text{miRNA-34a-Imitator}} -64,3 \pm 1,1$ mV; $\text{RMP}_{\text{Kontroll-Imitator}} -55,0 \pm 1,4$ mV; $n = 24-28$; $p < 0,0001$ berechnet mit t Test; Abbildung 3.7a). Dieser Effekt konnte auch auf Ebene des TASK-1-Stromes beobachtet werden, der von $1,82 \pm 0,14$ μ A unter Kontrollbedingungen auf $2,49 \pm 0,24$ μ A 48 h nach Ko-Injektion von TASK-1 mRNA und miRNA-34a-Imitator anstieg (Abbildung 3.7b). Weder nach Injektion der Imitatoren noch der Inhibitoren von miRNA-9, miRNA-23a, miRNA-28 und miRNA-124 konnten signifikante Effekte auf das RMP oder den Kaliumstrom gemessen werden.

Die Strom-Spannungs-Kurve des TASK-1-Kanals zeigt nach Ko-Injektion mit dem miRNA-34a-Imitator (Abbildung 3.8a) einen signifikanten Anstieg und nach Ko-Injektion mit dem entsprechenden Inhibitor (Abbildung 3.8d) keinen signifikanten Unterschied. Der Effekt des miRNA-34a-Imitator auf dem Kaliumstrom ist zeitabhängig, so zeigte sich 72 h nach Injektion die größte Differenz zwischen Kontrolle und Imitator (Abbildung 3.8b). Für der Einfluss auf das RMP konnte keine Zeitabhängigkeit identifiziert werden, da der Unterschied zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) annähernd gleich groß war (Abbildung 3.8c). Es zeigt sich auch hier, dass der Effekt des miRNA-Inhibitors im Vergleich zur Inhibitor-Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich war (Abbildung 3.8e). Auch war die Reduktion des RMP durch den Inhibitor nicht zeitabhängig (Abbildung 3.8e).

3.1.5. miRNAs als Biomarker für Vorhofflimmern

Nachdem der Einfluss von miRNA-34a auf die Expression von TASK-1 gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob sich diese miRNA auch als Biomarker für VHF eignet. Hierfür wurde die zirkulierende miRNA-34a in Blutproben aus peripheren Venen von 16 Patienten bestimmt. Es zeigt sich, dass die zirkulierende miRNA-Konzentration in den Patienten mit VHF signifikant höher ist als in denen mit SR ($n = 5-11$; $p = 0,028$; Abbildung 3.9a). Substratifiziert man diese Patienten nach paroxysmalem und chronischem VHF, so zeigte sich weiterhin ein signifikanter Anstieg für paroxysmales VHF ($n = 5$; $p = 0,0046$; Abbildung 3.9b). Für die Gruppe mit chronischem VHF war weiterhin ein Trend hin zu einer erhöhten Expression zu sehen, dieser erreichte jedoch keine Signifikanz ($n = 5-6$; $p = 0,12$). Bei einem Vergleich der Konzentrationen von miRNA-34a im Gewebe mit der im Blut zeigt sich eine positive Korrelation (Abbildung 3.9c). Auch ein Zusammenhang zwischen der TASK-1 mRNA im Gewebe und der zirkulierenden miRNA-34a zeigte sich, höhere mRNA-Konzentrationen waren mit größeren zirkulierenden miRNA-34a-Mengen korreliert (Abbildung 3.9d).

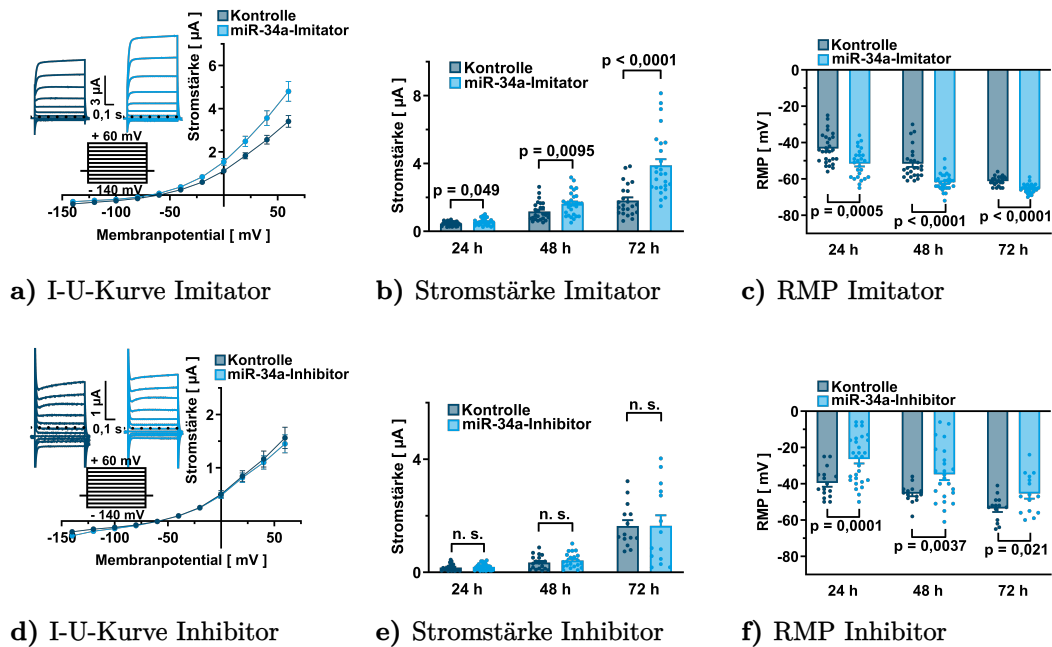


Abbildung 3.8.: Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Einflusses von miRNA-34a-Imitator und -Inhibitor auf die Stromstärke und das RMP von Oozyten. Nach Ko-Injektion von TASK-1 RNA zusammen mit miRNAs-34a-Imitator, -Inhibitor und Kontrollen in *Xenopus laevis* Oozyten, wurde 24–72 h später mit der TEVC die Stromstärke sowie das RMP gemessen ($n = 14–29$). Für die Messung der Stromstärke wurden die Oozyten auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt und Spannungspulse mit einer Länge von 500 ms, ausgehend von einer Spannung von -140 mV und in 20 mV Schritten erhöht bis hin zu 60 mV, appliziert. Auftragung der Stromstärke gegen das Membranpotential nach Ko-Injektion mit miRNA-34a-Imitator (a) und -Inhibitor (d). Das verwendete Spannungsprotokoll sowie repräsentative Stromkurven zu Kontrollbedingungen (dunkelblau) und nach Ko-Injektion (hellblau) sind in die Abbildungen eingefügt. Vergleich der Stromstärke und RMP 24 h, 48 h und 72 h nach Ko-Injektion (hellblau) mit miRNA-34a-Imitator (b und c) und -Inhibitor (e und e) mit Kontrollbedingungen (dunkelblau). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts. Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen t Test berechnet, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. mi-R: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; RMP: Ruhemembranpotential; RNA: Ribonukleinsäure; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. *Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).*

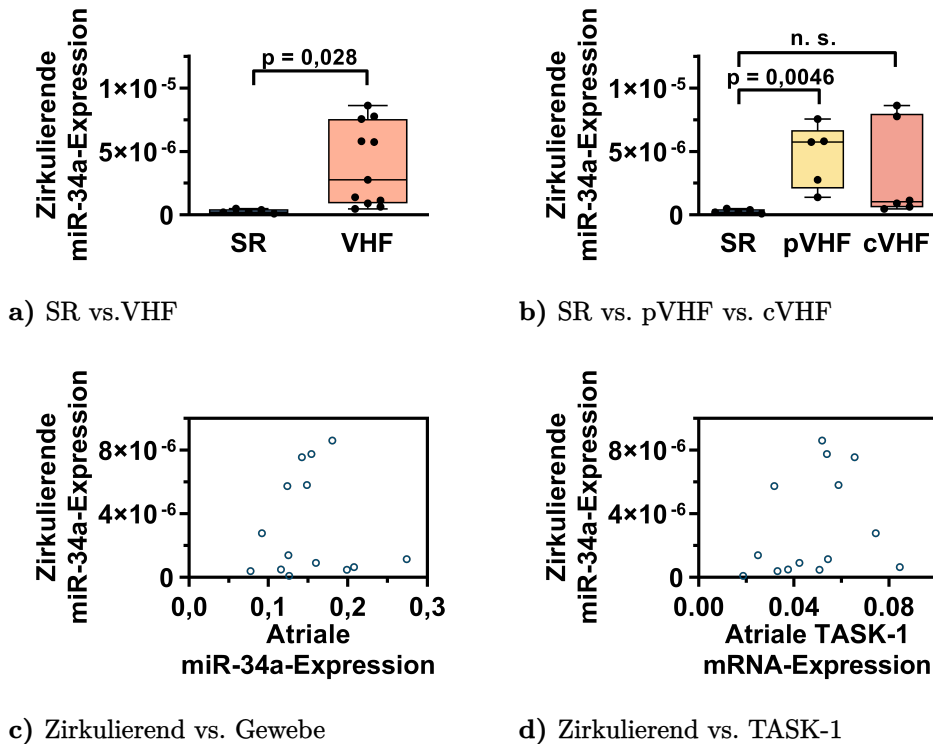


Abbildung 3.9.: Zur Analyse der zirkulierenden miRNA-34a-Konzentrationen wurden periphere Blutproben von fünf Patienten im SR, wobei nur drei aus der ursprünglichen Studienpopulation stammen und zwei zusätzliche SR-Kontrollproben aus einer anderen Studie sind, fünf mit paroxysmalem VHF (alle aus der ursprünglichen Studienpopulation) und sechs mit chronischem VHF (ebenfalls alle aus der ursprünglichen Studienpopulation) untersucht (a bis d). Vergleich der zirkulierenden miRNA-34a zwischen SR und der gesamten VHF-Population (a), sowie aufgeteilt nach paroxysmalem und chronischem VHF (b). Die Daten sind gezeigt als Median mit Minimum und Maximum relative zum internen Standard miRNA-16. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. Zirkulierende miRNA-34a aufgetragen gegen die Konzentrationen aus den Herzhirngewebeproben (c) und gegen die TASK-1 mRNA-Konzentrationen (d). Die Werte sind relativ zum geometrischen Mittel aus RNU6B, U47 und miRNA-26b angegeben. Die angegebenen p-Werte wurden mit einem zweiseitigen *t* Test berechnet, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

chronisches Vorhofflimmern: cVHF; miR: microRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; mRNA: Boten Ribonukleinsäure; pVHF: paroxysmales Vorhofflimmern; SR: Sinusrhythmus.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

3.1.6. Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und klinischen Parametern

Die hier gezeigte Clusteranalysen wurden von Dr. Dr. Stefan Kallenberger durchgeführt und beruhen auf den Expressionsdaten und klinischen Parametern, die durch Dr. Antonius Büscher gewonnen bzw. gesammelt wurden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Eigenleistung.

In einem weiteren Schritt wurde nun der Zusammenhang zwischen der Expression der miRNAs und den klinischen Parametern des Patientenkollektivs untersucht. In diese Untersuchung wurden alle zu Beginn genannten 23 miRNAs eingeschlossen, somit auch die sieben, die bereits im Zusammenhang mit Umbauprozessen unter VHF beschrieben worden waren (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-31 und miRNA-133a). Manche dieser miRNAs sind bereits in Zusammenhang mit strukturellen Umbauprozessen und besonders Fibrose gebracht worden, daher wurden auch Kollagen Typ I Alpha 2 (COL1A2), Discoidin-Domänen-haltiger Rezeptor 2 (DDR2) und S100 Calcium-bindendes Protein A4 (S100A4) mRNA-Spiegel als genetische Marker für Fibrose, inkludiert.

Für kontinuierliche und nach Rangfolge geordnete Parameter, wurde eine hierarchische Clusterung der Korrelationskoeffizienten aus der miRNA-Expression und den Werten der Parameter durchgeführt (Abbildung 3.10). Hierbei zeigte sich, dass mit einer vermehrten Expression von miRNA-25, miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-23a, miRNA-124, miRNA-1 und miRNA-29b ein Cluster von Parametern, die mit Myokarddilatation und VHF (linkes Atrium (LA) Durchmesser ($\emptyset$), linker Ventrikel (LV) enddiastolischer Durchmesser (EDD), LV endsystolischer Durchmesser (ESD) und VHF-Status) sowie TASK-1- und COL1A2-Expression, assoziiert ist (horizontale kastanienbraune und vertikale purpurne Linie). In diesem Cluster lag ebenfalls eine positive Korrelation für miRNA-31, miRNA-449a, miRNA-133a, miRNA-23b, miRNA-125b und miRNA-30a vor, die jedoch keine statistische Signifikanz nach Mehrfachtestung erreichte. Im Gegensatz dazu war diese Gruppe an Parametern mit einer verminderten Expression von miRNA-9 und miRNA-485 assoziiert (horizontale blaue und vertikale purpurne Linie). Auch hier zeigte sich wieder für einige miRNAs ein Trend, der nach Mehrfachtestung nicht mehr signifikant war. Dieser Trend lies sich für miRNA-26a, miRNA-28, miRNA-193a, miRNA-338 und miRNA-708 beobachten.

Des Weiteren konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen Kreatininspiegel und miRNA-193a, sowie zwischen DDR2 und miRNA-34a und miRNA-23a gezeigt werden. Darüber hinaus zeigte der Parameter DDR2 einen Trend hin zu einer positiven Korrelation mit miRNA-193a, miRNA-9 und miRNA-708, sowie hin zu einer negativen Korrelation mit miRNA-21, miRNA-124, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-29b und miRNA-23b.

Für die binären klinischen Parameter wurde der binäre Logarithmus der Ratio bestehend aus der miRNA-Expression bei Anwesenheit und Abwesenheit des entsprechenden Attributes berechnet. Hierbei zeigte sich, dass der Zusammenhang zwischen miRNA-193a und der Einnahme von TAH selbst nach Anpassung mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur für Mehrfachtestung noch signifikant ist (Abbildung 3.11; schwarzer Rahmen). Ein Trend

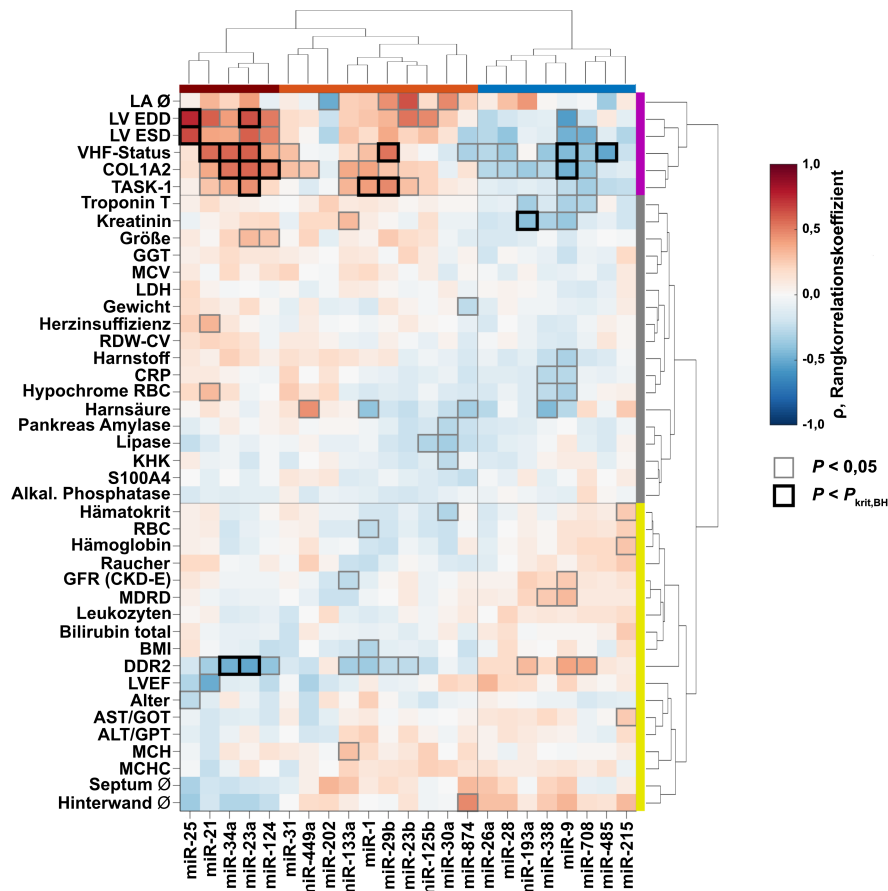


Abbildung 3.10.: Assoziation zwischen miRNA-Expression und klinischen numerischen Parametern. Cluster wurden aus den Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman) für numerische oder nach Rangfolge geordnete Parameter und der miRNA-Expression gebildet. Dendrogramm Gruppen der miRNAs und klinischer Parameter sind durch farbige Balken und graue Trennlinien angezeigt. Die miRNA-Gruppen sind kastanienbraun oder blau markiert, die Parametergruppen in purpur, grau und gelb. Die grauen Quadrate stehen für $p < 0,05$ und die schwarzen für $p < p_{krit,BH} = 7,6E-4$ berechnet mit der Bejamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testung.

ALT/GPT; Alanin-Aminotransferase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase; AST/GOT: Aspartat-Aminotransferase/Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; BMI: Body-Mass-Index; COL1A2: Kollagen Typ I Alpha 2; CRP: C-reaktives Protein; DDR2: Discoidin-Domänen-haltiger Rezeptor 2; EDD: enddiastolischer Durchmesser; ESD; endsystolischer Durchmesser; GFR (CKD-E): glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach der Formel der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; GGT: γ -Glutamyltransferase; KHK: koronare Herzkrankheit; LA: linkes Atrium; LDH: Lactatdehydrogenase; LV: linker Ventrikel; LVEF; linksventrikuläre Ejektionsfraktion; MCH; mittleres korpuskuläres Hämoglobin; MCHC: mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; MCV: mittleres Erythrozytenvolumen; MDRD: Änderung der Ernährung bei Nierenerkrankungen; Ø: Durchmesser; RBC: Erythrozytenanzahl; RDW-CV: Variationskoeffizient der Erythrozytengröße; S100A4: S100 Calcium-bindendes Protein A4; VHF: Vorhofflimmern.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

zu einem Zusammenhang zeigte sich für die Einnahme von TAH und einer verminderten Expression von miRNA-26a, miRNA-708 und miRNA-202. Die Einnahme von Hydrochlorothiazid (HCT) zeigte einen Trend mit der verringerten Expression von miRNA-21, miRNA-34a und miRNA-23a assoziiert zu sein. Diese miRNAs sind auch Teil des Clusters mit den Parametern für Myokarddilatation. Der Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von miRNA-28 ist jedoch nur ein Trend.

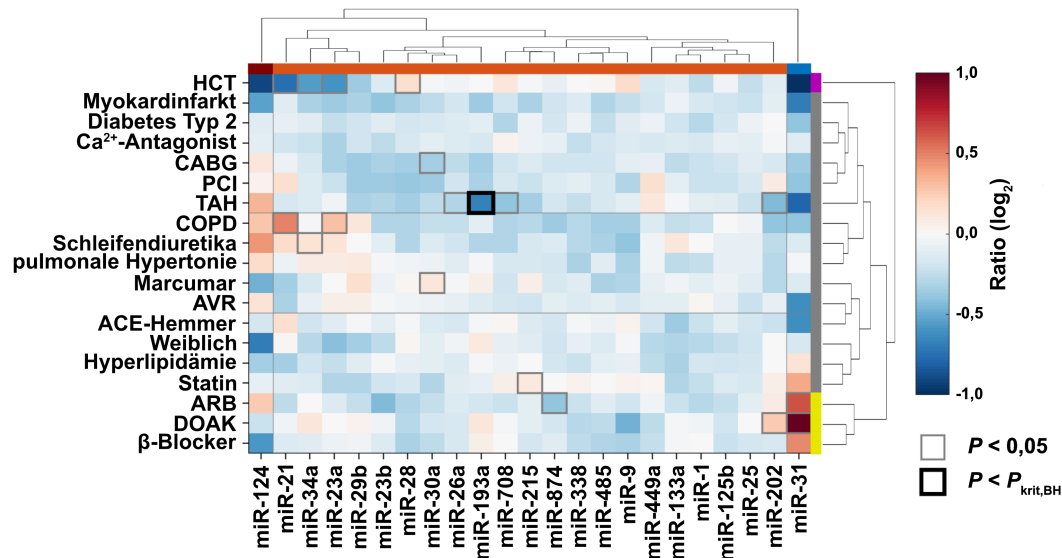


Abbildung 3.11.: Assoziation zwischen miRNA-Expression und klinischen binären Parametern. Cluster wurden aus der Ratio der Änderung der miRNA-Expression abhängig von der An- bzw. Abwesenheit der binären Eigenschaften gebildet. Dendrogramm-Gruppen der miRNAs und klinischen Parameter sind durch farbige Balken und graue Trennlinien angezeigt. Die miRNA-Gruppen sind kastanienbraun, orange und blau markiert, die Parametergruppen in purpur, grau und gelb. Die grauen Quadrate stehen für $p < 0,05$ berechnet mit einseitiger ANOVA und die schwarzen für $p < p_{krit,BH} = 2,2E - 6$ kalkuliert mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testung. ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; AVR: Aortenklappenersatz; CABG: Koronararterien-Bypass; COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung; DOAK: direkte orale Antikoagulanzen; HCT: Hydrochlorothiazid; PCI: perkutane Koronarintervention; TAH: Thrombozytenaggregationshemmer.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

Es zeigte sich auch ein Trend für den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von miRNA-31 und der Einnahme von DOAKs und Angiotensin-II-Rezeptorblockern (ARBs). Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) war mit einem Trend in der Zunahme von miRNA-21- und miRNA-23a-Expression assoziiert, die beide auch positiv mit VHF-Status korreliert sind. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung des Zusammenhangs zwischen miRNA-Expression und Myokardialer dilatation, basierend auf dem gemeinsame Pathomechanismus von COPD, Rechtsherzbelastung und Dilatation.

In einem nächsten Schritt wurden die miRNAs anhand des Korrelationskoeffizienten der miRNA-Expression geclustert, so dass miRNA-Gruppen mit ähnlicher Expressionscharakteristik entstanden sind (Abbildung A.1). Hier zeigten sich im wesentlichen vier Gruppen von miRNAs. Die erste Gruppe bestand aus miRNA-1, miRNA-21, miRNA-23a, miRNA-29b, miRNA-31, miRNA-34a, miRNA-124 und miRNA-133a. Die zweite Gruppe beinhaltete miRNA-23b, miRNA-25, miRNA-125b und miRNA-874. Eine dritte Gruppe wurde von miRNA-9, miRNA-26a, miRNA-28, miRNA-30a, miRNA-193a und miRNA-338 gebildet. Die vierte und letzte Gruppe enthielt miRNA-202, miRNA-215, miRNA-449a, miRNA-485 und miRNA-708.

In der Literatur gibt es bereits einige Hinweise zu elektrischen Umbauprozessen und einem Zusammenhang zu VHF und Herzinsuffizienz (HI), daher wurde abschließend mit Hilfe einer 2-Faktoren ANOVA untersucht, ob es Assoziationen einzelner miRNAs zu einem dieser Faktoren gibt (Abbildung A.2). Hierbei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen VHF und miRNA-26b, miRNA-30a, miRNA-23a, miRNA-23b, miRNA-125b, miRNA-202 und miRNA-449, sowie auch COL1A2. Zwischen HI und den untersuchten miRNAs gab es keine signifikante Assoziation. Einzig miRNA-449a hatte eine signifikante Interaktion mit VHF und HI.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Korrelation von klinischen Parametern und der Expression von miRNAs ein Cluster von klinischen Parametern enthüllte, das mit Myokarddilatation und VHF assoziiert war. Die Parameter, die mit Myokarddilatation im Zusammenhang stehen, zeigten eine signifikante Assoziation mit einer Gruppe von miRNAs bestehend aus miRNA-1, miRNA-9, miRNA-21, miRNA-23a, miRNA-25, miRNA-29b, miRNA-34a, miRNA-124 und miRNA-485.

3.2. Pharmakologische Modulation des TASK-1-Kanals

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise bereits publiziert und sind an entsprechender Stelle als solches gekennzeichnet. Ebenso erfolgt eine Kennzeichnung der Abschnitte, die in Kooperation entstanden sind.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Modulation des TASK-1-Ionenkanals durch pharmakologische Wirkstoffe und deren Pharmakokinetik sowie Pharmakodynamik. Im Detail soll es um die Substanzen Doxapram und Ketodoxapram gehen und einen Vergleich deren Effekte auf einer pharmakologischen und elektrophysiologischen Ebene. Abschließend sollen stereochemische Effekte untersucht werden, um einen Ausblick auf neue Optimierungsansätze zu geben.

3.2.1. Inhibition von TASK-1 und TASK-3 durch Doxapram und Ketodoxapram

Die in diesem Abschnitte gezeigten Daten zu Doxapram wurden in Teilen bereits in Wiedmann et al. (2022a) publiziert. Die Daten zu Ketodoxapram wurden bisher noch nicht publiziert.

Zu Beginn des Projektstrangs wurde mit Hilfe der TEVC in *Xenopus laevis* Oozyten, die entweder den humanen TASK-1, humanen TASK-3 oder den porzinen TASK-1 heterolog exprimierten, IC_{50} -Kurven von Doxapram und Ketodoxapram bestimmt. Hierfür wurden die Zellen auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt und anschließend mit 500 ms langen Spannungsimpulsen, die von -140 mV ausgehend sich um 20 mV steigerten und bei 60 mV endeten, behandelt und die Stromstärke gemessen. Bei beiden Substanzen waren die IC_{50} -Werte für den humane TASK-1 am niedrigsten (Abbildung 3.12a und 3.12d; $0,98 \mu\text{M}$ für Doxapram, $0,81 \mu\text{M}$ für Ketodoxapram), wobei Ketodoxapram die niedrigeren IC_{50} -Werte in allen drei untersuchten Kanälen hatte. Die Werte für den humanen TASK-3-Kanal lagen für Doxapram ($5,94 \mu\text{M}$) und Ketodoxapram ($1,50 \mu\text{M}$) über denen des humanen TASK-1-Kanals (Abbildung 3.12b und 3.12e).

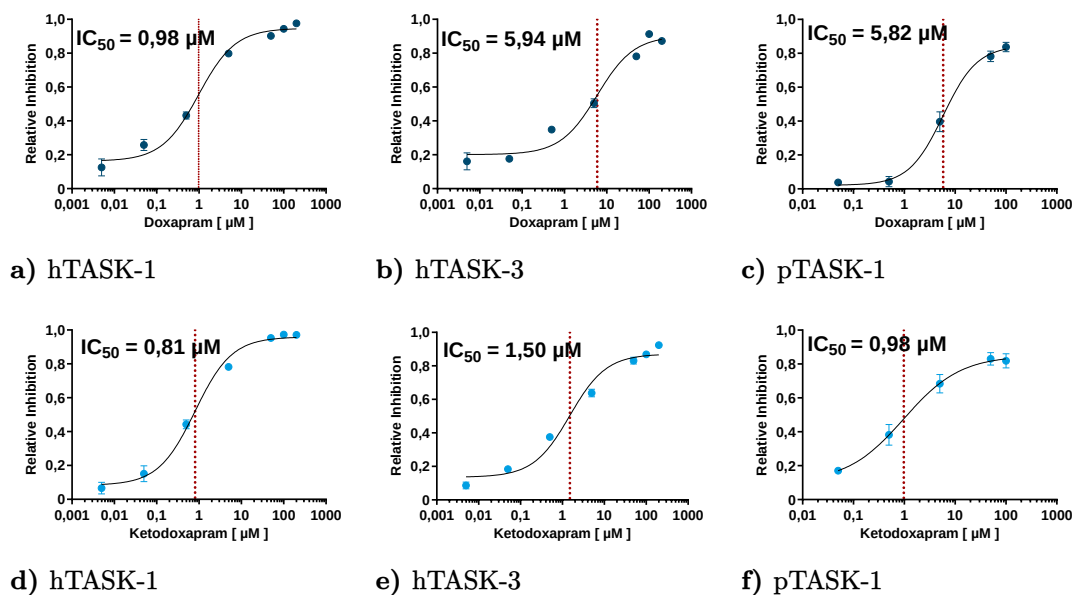


Abbildung 3.12.: Bestimmung des IC_{50} -Wertes für Doxapram (a bis c) und Ketodoxapram (d bis f) auf hTASK-1 ($n = 16-24$), hTASK-3 ($n = 17-26$) und pTASK-1 ($n = 5-8$). Die Kanäle wurden heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit der TEVC vermessen. Hierfür wurden die Zellen auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt und Spannungsimpulse von 500 ms Länge und einer Spannung ausgehend von -140 mV in 20 mV größer werden bin hin zu 60 mV appliziert. Die Inhibition wurde berechnet aus dem Quotient von Stromstärke vor und nach Applikation der jeweiligen Substanz. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts. Die rote gestrichelte Linie zeigt den IC_{50} -Wert an.
hTASK-1: humaner TASK-1; hTASK-3: humaner TASK-3; IC_{50} : halbmaximale inhibitorische Konzentration; pTASK-1: porziner TASK-1; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Ebenfalls wurde der Effekt von Doxapram und Ketodoxapram auf den porzinen TASK-1-Kanal untersucht (Abbildung 3.12c und 3.12f), hierbei zeigte sich, dass die IC_{50} -Werte zwischen denen der humanen TASK-1- und TASK-3-Kanäle lagen. Der Wert für Doxapram lag bei $5,82 \mu\text{M}$ und für Ketodoxapram bei $0,98 \mu\text{M}$.

Die maximale Inhibition beider Substanzen war für den humanen TASK-1 bei annähernd 100 % (96 %), für den humanen TASK-3 etwas niedriger bei 90 % und für den porzinen TASK-1 bei etwa 80 % für beide Substanzen (Abbildungen 3.12a bis 3.12f).

In einem weiteren Schritt wurden alle Messwerte zum inhibitorischen Effekt von 5 μ M Doxapram und Ketodoxapram auf die humanen TASK-1- und TASK-3-Ionenkanäle zusammengekommen (Abbildung 3.13). Hierbei zeigte sich, dass die Effekte der beiden Substanzen auf die verschiedenen Kanäle sich hoch signifikant unterschieden. Die Inhibition durch Ketodoxapram war stets höher als die von Doxapram, wobei der Effekt auf den TASK-1 ausgeprägter war als auf TASK-3.

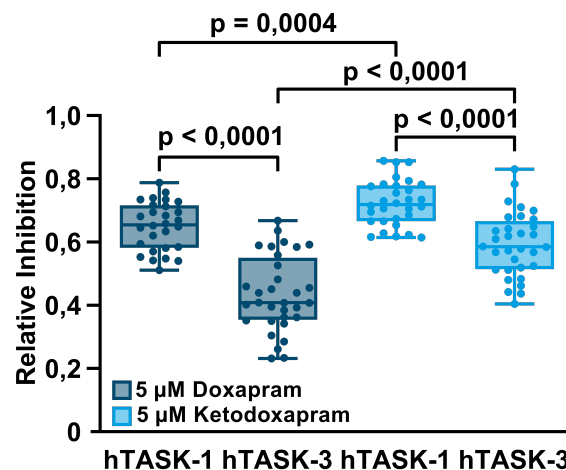


Abbildung 3.13.: Vergleich des inhibitorischen Effekts von 5 μ M Doxapram (Dunkelblau) und Ketodoxapram (Hellblau) auf den hTASK-1 und hTASK-3. Die Kanäle wurden heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Stromstärke unter Basisbedingungen und nach Applikation einer der beiden Substanzen mit der TEVC gemessen. Die Inhibition ist der Quotient aus Basisstromstärke und Stromstärke nach Einwirkung der Wirkstoffe. Die verwendeten Daten stammen sowohl von Einwasch- als auch Einlegemessungen und wurden für den Vergleich zusammengekommen ($n = 28-32$). Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen t Test berechnet. hTASK-1: humaner TASK-1; hTASK-3: humaner TASK-3; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

3.2.2. Inhibitorischer Effekt auf atriale Kaliumkanäle und die Kanalfamilie der Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle

Die in diesem Abschnitte gezeigten Daten zu Doxapram wurden in Teilen bereits in Wiedmann et al. (2022a) publiziert. Die Daten zu Ketodoxapram wurden bisher noch nicht publiziert.

Anschließend an die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde der Effekt von 5 μ M Doxapram (Dunkelblau) und Ketodoxapram (Hellblau) auf die Mitglieder der K_2P -Kanalfamilie und weitere atriale Kaliumkanäle quantifiziert (Abbildung 3.14). Hierfür wurden die

untersuchten Kanäle in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert und mit Hilfe der TEVC vermessen. Für die K_{2P}-Kanäle wurde das bereits im Abschnitt 3.2.1 beschriebene Spannungsprotokoll angewendet, das die Zellen auf ein Haltepotential von -80 mV klemmt und von -140 mV ausgehend in 20 mV Schritten Spannungsimpulse von 500 ms Länge appliziert, bis zu einer maximal Spannung von 60 mV. Für die Kanäle K_v4.3, K_v2.1, K_v1.4 und K_v1.5 wurden die Zellen ebenfalls auf -80 mV geklemmt, jedoch nur ein einziger Spannungsimpuls mit 40 mV über eine Dauer von 1 s appliziert. Für K_{ir}3.1/4 wurde ein Haltepotential von 0 mV gewählt und ein Impuls von -160 mV und 1 s Dauer.

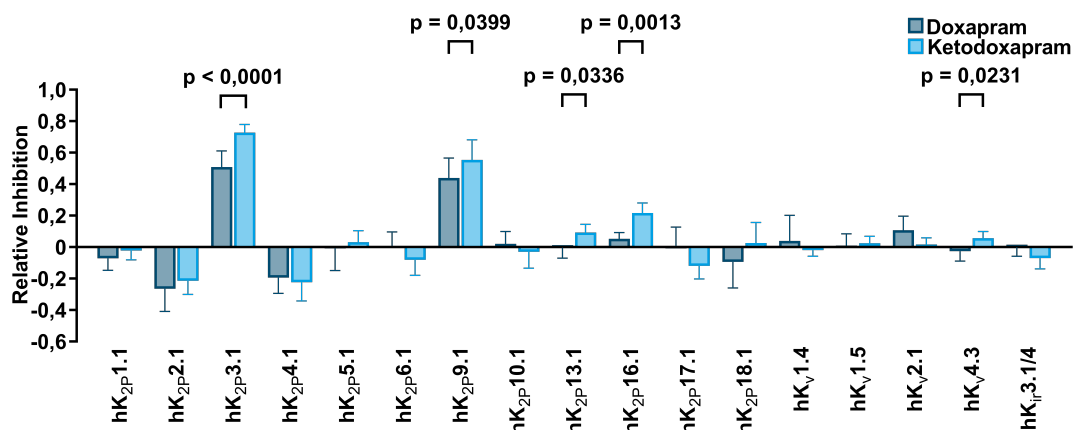


Abbildung 3.14.: Vergleich des inhibitorischen Effekts von $5 \mu\text{M}$ Doxapram (Dunkelblau) und Ketodoxapram (Hellblau) auf die Mitglieder der K_{2P}-Kanalfamilie und weiterer atrialer Kaliumkanäle. Die Kanäle wurden heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit der TEVC vermessen. Für die Mitglieder der K_{2P}-Kanalfamilie wurde ein Haltepotential von -80 mV und Spannungsimpulse von 500 ms Dauer gewählt. Die Impulse starteten bei einer Spannung von -140 mV und steigert sich in 20 mV Schritten bis 60 mV. Die Quantifizierung erfolgt am Ende des 20 mV Impulses. Für die Kanäle K_v4.3, K_v2.1, K_v1.4 und K_v1.5 wurde nur ein einziger Impuls von 40 mV mit einer Länge von 1 s gewählt, wobei die Zellen ebenfalls auf -80 mV geklemmt waren. Die gemessene Stromstärke wurde am Ende des Impulses quantifiziert. Lediglich für K_{ir}3.1/4 wurde eine Haltepotential von 0 mV und ein Impuls von -160 mV und 1 s Länge verwendet. Hier wurde die Höhe des Peaks quantifiziert. Die relative Inhibition wurde als Quotient der Stromstärke zu den Grundbedingungen und der Stromstärke nach Applikation der jeweiligen Substanz gebildet. Die Daten werden angezeigt als Mittelwert mit Standardfehler ($n \geq 5$). Die p-Werte wurden mit einem zweiseitigen t Test berechnet.

K_{2P}: Kalium-Zwei-Porendomänen; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Messungen zeigten die bereits beschriebenen signifikant unterschiedlichen Inhibitionen von Doxapram und Ketodoxapram auf TASK-1 (hK_{2P}3.1) und TASK-3 (hK_{2P}9.1). Darüber hinaus war auch der ausgeprägte inhibitorische Effekt der beiden Substanzen auf diese Kanäle zu sehen (vgl. Abbildung 3.13). Einen signifikanten Unterschied in der Höhe der Inhibition war ebenfalls für hK_{2P}13.1, hK_{2P}16.1 und hK_v4.3 zu sehen, wobei hier der Effekt insgesamt gering war. Doxapram und Ketodoxapram zeigten neben den inhibitorischen Effekten noch einen aktivierenden Effekt auf hK_{2P}2.1 und hK_{2P}4.1 mit

einer Erhöhung der Stromstärke um 20 %. Der Einfluss auf die restlichen Kanäle war sehr gering (unter 10 %).

3.2.3. Inhibitorischer Effekt in humanen Kardiomyozyten

Die in diesem Abschnitte gezeigten Daten zu Doxapram wurden in Teilen bereits in Wiedmann et al. (2022a) zitiert. Die Daten zu Ketodoxapram wurden bisher noch nicht publiziert.

Nach den Messungen von heterolog exprimierten Kanälen in *Xenopus laevis* Oozyten wurden frisch isolierte humane Kardiomyozyten aus Herzohrproben von Patienten, die eine Operation am offenen Herzen benötigten, mit der Patch-Clamp-Technik im Whole-Cell Modus vermessen. Die Zellen wurden hierfür auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt und Spannungsimpulse von -60 mV bis 60 mV in 10 mV Schritten und mit einer Länge von 500 ms appliziert. Der Doxapram sensitive Strom, also die Differenz zwischen dem gemessenen Strom vor Applikation von $100\text{ }\mu\text{M}$ Doxapram und danach, war bei Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme im VHF befanden, um $161,5\text{--}185,1\%$ höher als bei Patienten im SR ($n = 5\text{--}9$; Abbildung 3.15a und 3.15b). Das selbe Bild zeigt sich bei Auftragung des Doxapram sensitiven Stroms gegen das Membranpotential ($n = 7\text{--}10$; Abbildung 3.15c).

Beim Auftragen des Membranpotentials gegen die Stromdichte der Zellen vor und nach Applikation von $100\text{ }\mu\text{M}$ Doxapram, getrennt nach Rhythmusstatus, zeigte sich eine Reduktion des gesamten Kaliumstroms der humanen Kardiomyozyten im SR um $17,3\text{--}18,2\%$ ($n = 10$; Abbildung 3.15d) und um $14,8\text{--}15,1\%$ ($n = 7$; Abbildung 3.15e) unter VHF, wobei die Stromdichte des Kaliumstroms vor Applikation von Doxapram bei den Zellen mit VHF $79,8\text{--}90,1\%$ höher war als im Vergleich zu den SR-Proben.

Für Ketodoxapram zeigte sich ein sehr ähnliches Bild. Der Ketodoxapram sensitive Strom, ebenfalls bestimmt durch die Differenz der Stromdichte vor und nach Applikation von $100\text{ }\mu\text{M}$ Ketodoxapram, war bei den Patienten mit VHF um $334,8\text{--}457,4\%$ höher als bei Patienten im SR ($n = 5\text{--}6$; Abbildung 3.15f und 3.15g). Dies bestätigt sich durch Auftragung des Ketodoxapram sensitiven Stroms gegen das Membranpotential ($n = 5\text{--}6$; Abbildung 3.15h).

Trägt man nun das Membranpotential gegen die Stromdichte der Kardiomyozyten vor und nach Applikation von $100\text{ }\mu\text{M}$ Ketodoxapram auf und trennt dies nach Rhythmusstatus der Patienten, beobachtet man eine Reduktion des gesamten Kaliumstroms um $7,8\text{--}10,0\%$ ($n = 6$; Abbildung 3.15i) unter SR und um $27,3\text{--}31,5\%$ ($n = 5$; Abbildung 3.15j) unter VHF. Die Stromdichte des Kaliumstroms vor Applikation von Ketodoxapram war bei Zellen mit VHF um $103,5\text{--}122,1\%$ größer als bei den SR-Proben.

3.2.4. Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram in Plasma und Gehirngewebe

Die in diesem Abschnitt beschriebene Validierung der Messmethode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Plasma und Gehirngewebe

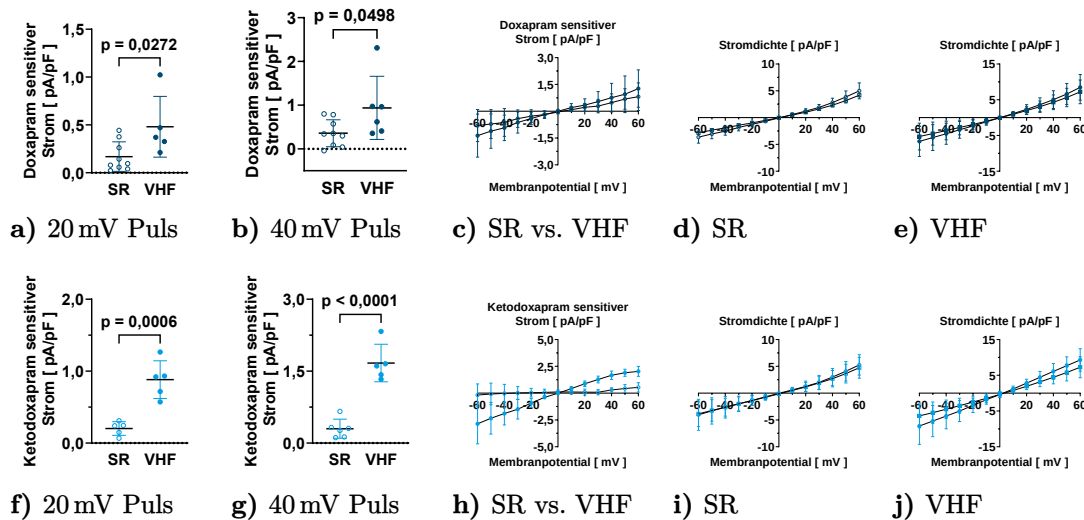


Abbildung 3.15.: Effekte von 100 µM Doxapram (a bis e) und Ketodoxapram (f bis j) auf frisch isolierte humane Kardiomyozyten von SR- (n = 5 für Doxapram und n = 3 für Ketodoxapram) und VHF-Patienten (n = 4 für Doxapram und n = 2 für Ketodoxapram). Die Messungen erfolgten mit der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von –80 mV geklemmt und Spannungsimpulse einer Länge von 500 ms und einer Spannung, die von –60 mV ausging und sich in 10 mV Schritten bis hin zu 60 mV erhöht hat, appliziert. Vergleich des Doxapram sensitiven Stroms (Differenz aus Stromdichte vor Applikation und danach) von SR-Zellen (n = 9: ungefüllte, dunkelblaue Kreise) mit VHF-Zellen (n = 5–6; gefüllte, dunkelblaue Kreise) quantifiziert am Ende des 20 mV (a) und 40 mV (b) Pulses. Vergleich des Doxapram sensitiven Stromes zwischen SR- (ungefüllte, dunkelblaue Kreise) und VHF-Zellen (gefüllte, dunkelblaue Kreise; c) dargestellt als Stromstärke-Spannungs-Kurve. Stromdichte der Zellen im SR (d) und VHF (e) vor (dunkelblaue Kreise) und nach Applikation von 100 µM Doxapram (dunkelblaue Quadrate). Vergleich des Ketodoxapram sensitiven Stroms von SR-Zellen (n = 5: ungefüllte, hellblaue Kreise) mit VHF-Zellen (n = 5; gefüllte, hellblaue Kreise) quantifiziert am Ende des 20 mV (f) und 40 mV (g) Pulses. Vergleich des Ketodoxapram sensitiven Stromes zwischen SR- (ungefüllte, hellblaue Kreise) und VHF-Zellen (gefüllte, hellblaue Kreise; h) dargestellt als Stromstärke-Spannungs-Kurve. Stromdichte der Zellen im SR (i) und VHF (j) vor (hellblaue Kreise) und nach Applikation von 100 µM Ketodoxapram (hellblaue Quadrate). SR: Sinusrhythmus; VHF: Vorhofflimmern

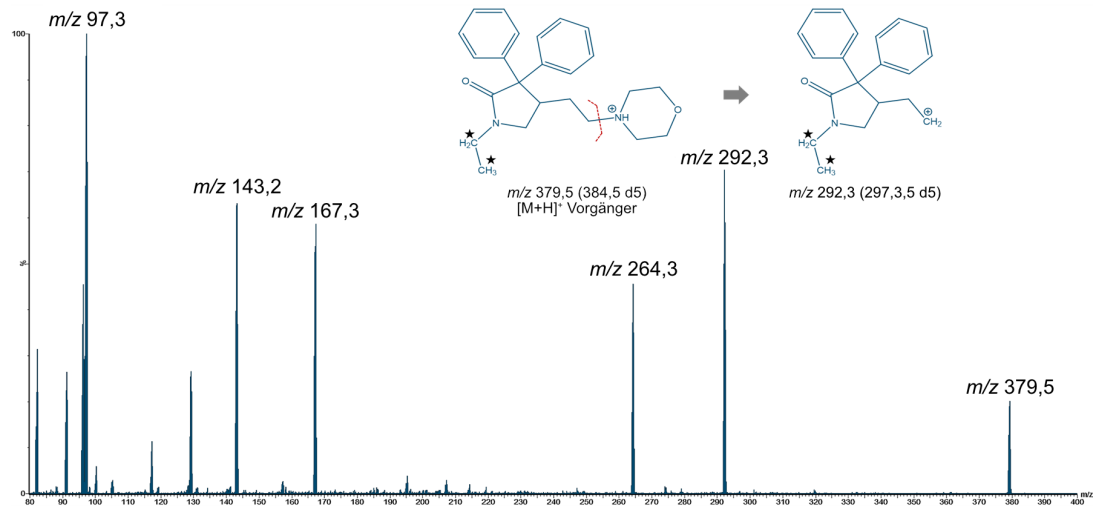
von Schweinen wurde bereits in Kraft et al. (2022) publiziert. Die Validierung der Messmethode zur Quantifizierung in humanen Plasma wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Die hier beschriebenen Experimente erfolgten in Kooperation mit dem analytisch-chemischen Labor der Abteilung für klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie, wobei die Durchführung der Experimente komplett in Eigenleistung an Geräten des analytisch-chemischen Labors erfolgte.

Die Messung der Doxapram- und Ketodoxapram-Proben fand unter leicht sauren Bedingungen statt. Hierbei wurde der Morpholin Heterozyklus des Doxaprams protoniert, wodurch ein deutliches $[M+H]^+$ -Signal bei m/z 379,5 (m/z 384,5 für Doxapram-d5) mit ESI im positiven Ionenmodus erzeugt wurde (Abbildung 3.16a). Unter den gewählten Kollisionsbedingungen (vgl. Tabelle 2.16) war ein deutlicher Basispeak bei m/z 97,3 zu sehen. Während der Methodenentwicklung zeigte sich jedoch, dass das Signal m/z 292,3 (m/z 297,3 für Doxapram-d5) besser geeignet war. Daher wurde der Massenübergang von m/z 379,5 zu 292,3 für die Quantifizierung von Doxapram gewählt (m/z 384,5 > 297,3 für Doxapram-d5). In Abbildung 3.16a sind die Strukturformeln des Doxapram $[M+H]^+$ -Signal und des resultierenden Fragments mit m/z 292,3 gezeigt.

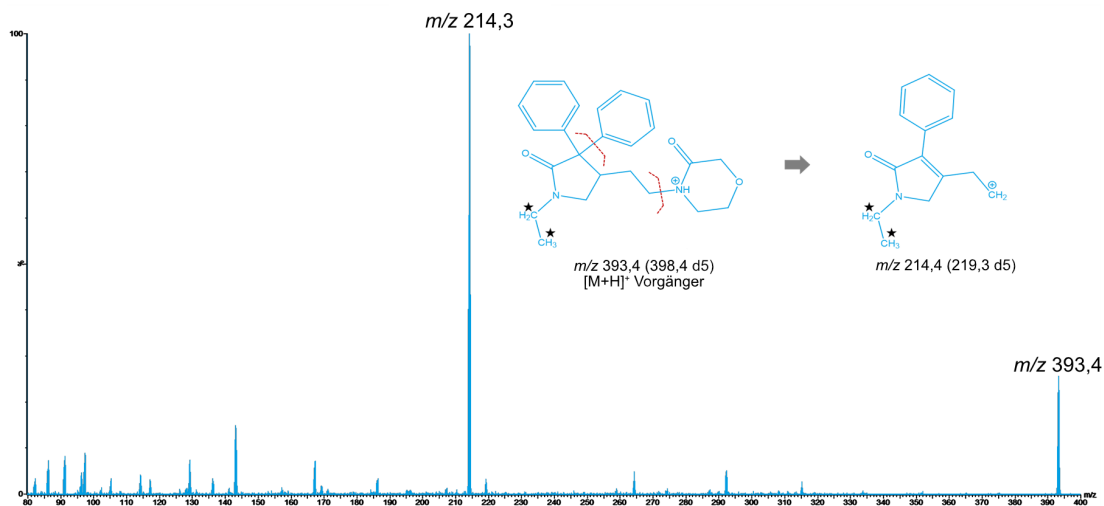
Für Ketodoxapram war unter den gewählten Bedingungen (vgl. Tabelle 2.16) das $[M+H]^+$ -Signal bei m/z 392,4 (m/z 398,4 für Ketodoxapram-d5) und der Basispeak bei m/z 214,3 (m/z 219,3 für Ketodoxapram-d5) sichtbar (Abbildung 3.16b). Der Massenübergang von m/z 393,4 zu 214,4 zeigte während der Methodvalidation gute Eigenschaften und wurde daher für die Quantifikation von Ketodoxapram gewählt (m/z 398,4 > 219,3 für Ketodoxapram-d5).

Unter Verwendung einer UPLC BEH C18 Trennsäule, die auf 40 °C erwärmt wurde, konnte eine gute Trennung von Doxapram und Ketodoxapram erreicht werden (Abbildung A.3, A.4 und A.5). Es wurde ein Gradient gefahren mit einer initial niedrigen ACN-Konzentration von 5 %, die im Verlauf auf 95 % anstieg und beide Analyten deutlich trennte und scharfe Peaks mit einer Breite von 6 s auf Höhe der Grundlinie erzeugte. Die Retentionszeit von Doxapram betrug 1,61 min und 2,18 min für Ketodoxapram. Die längere Retentionszeit von Ketodoxapram gibt einen Hinweis auf eine höhere Lipophilie im Vergleich zu Doxapram.

Für die Isolation von Doxapram und Ketodoxapram aus Plasma und Gehirngewebe wurde eine LLE mit TBME in leicht basischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 9,0 verwendet. Nachdem die ersten Schweineplasmaproben vermessen worden waren, wurde jedoch deutlich, dass die Proben eine sehr große Konzentrationsspanne umfassen und diese die lineare Spanne des Detektors überstieg. Um dennoch alle Proben verlässlich vermessen zu können, wurde die Messmethode aufgeteilt und ein Kalibrationsbereich für die Plasmaproben mit niedrigen Konzentrationen im Bereich von 10–10 000 pg/mL und ein Kalibrationsbereich für die Plasmaproben mit hohen Konzentration im Bereich von 1–2 500 ng/mL entwickelt und validiert. Die beiden Methoden unterschieden sich lediglich im Volumen, das für die Analyse verwendet wurde. Für die Proben mit den hohen Konzentrationen wurden 25 μ L der TBME-Phase zum Eindampfen überführt und anschließend in 500 μ L des Laufmittels gelöst. Höhere Volumina wurden für die



a) Fragmentation Doxapram



b) Fragmentation Ketodoxapram

Abbildung 3.16.: Tandem-Massenspektrum von Doxapram (Dunkelblau, a) und Ketodoxapram (Hellblau, b) nach ESI im positiven Modus. Die Strukturen des $[M+H]^+$ -Molekülsignals und des Fragments, das durch eine Stoßenergie von 18 V für Doxapram und 23 V für Ketodoxapram entstand, wurden in die Spektren eingefügt.

ESI: Elektrosprayionisation.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Proben mit niedrigen Konzentrationen verwendet. Es wurden 1,5 mL der TBME-Phase überführt und nach dem Eindampfen nur in 100 μ L des Laufmittels rekonstituiert. Bei den Gehirngewebeproben war die Konzentrationsspanne deutlich kleiner, so dass ein einziger Kalibrationsbereich von 1–2 500 pg/Probe ausreichend war, wobei 1,5 mL der TBME-Phase eingedampft und anschließend in 500 μ L Laufmittel gelöst wurde.

Die Wiederfindungsrate für alle drei Methoden war zufriedenstellend und erfüllte die Vorgaben der FDA und EMA. Die Ergebnisse aller getesteten QC-Lösungen der drei unterschiedlichen Methoden zeigte für die Wiederfindungsrate eine hohe Konsistenz und Reproduzierbarkeit (Tabelle A.2 bis A.4). Die Untersuchung des Einflusses des Matrixeffektes zeigte, dass der IS-normalisierte Matrixeffekt weder zu einer Unterdrückung noch Verstärkung der Ionen führte. Somit waren auch hier die Vorgaben erfüllt.

Auch die weiteren Voraussetzungen der FDA und EMA an bioanalytische Methoden wurden von den hier beschriebenen Methoden erfüllt. Die linearen Regressionskurven für alle Kalibrationsbereiche, Probenmatrices und Analyte zeigten einen Korrelationskoeffizient (r^2) von $\geq 0,998$. Die Werte für Richtigkeit und Präzision waren aller innerhalb der vorgegebenen Grenzen von $\pm 15\%$ (Tabelle A.5 bis A.7). Um Proben zu vermessen, die oberhalb des Kalibrierbereiches liegen, wurden die Richtigkeit und Präzision nach 10-facher Verdünnung mit Nullplasma bzw. 100-facher Verdünnung mit Nullgehirngewebe getestet. Auch hierbei lagen die beiden Werte innerhalb der geforderten Grenzen von $\pm 15\%$ mit einer Richtigkeit von 93,4–107,1 % und einer maximalen Präzision von 2,4 %.

Um die Selektivität zu testen, wurden sechs verschiedene Schweinegehirngewebeproben sowie sechs Schweineplasmaproben von Kontrolltieren ohne Medikamentengabe vermessen, wobei keine störenden Peaks detektiert wurden. Auch zeigten sich in allen Kalibrierbereichen keine Verschleppungen in reinen Laufmittelpuben, die direkt nach dem höchsten Kalibrator vermessen worden waren. Die Überprüfung der Stabilität von Proben, die nach der Vermessung über Nacht im automatischen Probenzufuhrsystem bei 15 °C gelagert worden waren und anschließend erneut vermessen wurden, zeigte, dass die Präzision und Richtigkeit für alle Konzentrationsbereiche, Probenmatrices und Analyten innerhalb der Grenzen von $\pm 15\%$ lagen (Tabellen A.8 bis A.10). Auch nach drei Einfrier- und Auftauzyklen waren die Präzision und Richtigkeit innerhalb der Grenzen und selbst nach Lagerung bei –20 °C für 16 d waren die Schweineplasmaproben stabil. Die Überprüfung der Stabilität einer Lagerung über 24 h bei Raumtemperatur zeigte ebenfalls keine Veränderungen der Doxapram- und Ketodoxapram-Konzentration über diesen Zeitraum. Die Langzeitlagerung bei –20 °C und die Kurzzeitlagerung bei Raumtemperatur wurde für porcine Gehirngewebeproben nicht getestet, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Plasmaproben analog gültig sind.

Die erneute Vermessung bereits quantifizierter Schweineplasmaproben zeigte für beide Konzentrationsbereiche gute Ergebnisse (Tabelle A.11 und A.12). Im hohen Konzentrationsbereich waren 96,4 % (27 von 28 Proben) innerhalb der Grenzen von $\pm 20\%$ und für den niederen Bereiche 100 % der Ketodoxapram (14 von 14 Proben) und 92,3 % der Doxapram Proben (12 von 13 Proben). Bei den Gehirngewebeproben waren beide erneut getesteten Proben innerhalb des Limits (Tabelle A.13).

Für die Quantifizierung von humanen Plasmaproben wurde die bereits validierte Methode für Schweineplasmaproben mit humanem Lithium-Heparin-Plasma als Leermatrix neu validiert. Die Konzentrationen der humanen Proben erstreckten sich jedoch über einen kleineren Bereich als die Schweineproben, so dass dieser durch die Methode für hohe Plasmakonzentrationen (1–2 500 ng/mL) vollständig abgedeckt wurde. Aus diesem Grund wurde nur diese Methode mit humanem Plasma erneut validiert. Die Extraktion der Proben erfolgte analog der Schweineproben mit Hilfe einer LLE, wobei 25 µL der TBME-Phase überführt, zur Trockne eingedampft und anschließend in 500 µL Laufmittel resuspendiert wurden.

Bei der Validierung der Wiederfindungsrate zeigte sich, dass diese auch bei humanem Plasma konsistent war und eine hohe Reproduzierbarkeit aufwies (Tabelle A.14). Auch der IS-normalisierte Matrixeffekt erfüllte die Anforderungen der FDA und EMA. Zusätzlich zu den sechsfachen Bestimmung in normaler Leermatrix wurde bei den humanen Proben die Wiederfindungsrate und der Matrixeffekt auch im lipämischen und hämolytischen Plasma bestimmt. Die beiden Parameter lagen auch in diesen zwei speziellen Matrices innerhalb der gestellten Anforderungen. Die Überprüfung der Präzision und Richtigkeit ergab, dass alle Werte innerhalb der Grenzen von $\pm 15\%$ lagen und die Korrelationskoeffizienten der linearen Regressionskurven einen Wert von $\geq 0,996$ hatten (Tabelle A.15). Ebenfalls wurde die Integrität einer 10-fachen Verdünnung mit humanem Lithium-Heparin-Nullplasma überprüft, hierbei zeigte sich eine Richtigkeit von 99,9–110,1 % und eine maximale Präzision von 1,8 %, womit auch in diesem Fall die Anforderungen erfüllt waren.

Anschließend wurde die Selektivität der Methode in sechs verschiedenen Chargen Lithium-Heparin-Leermatrix von gesunden humanen Freiwilligen überprüft. Hierbei wurden keine störenden Peaks detektiert und auch die Überprüfung einer möglichen Verschleppung zeigte, dass alle Werte innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen lagen und die Messungen nicht negativ beeinflussten. Die Überprüfung der Stabilität ergab, dass die Lagerung über Nacht im automatischen Probenzufuhrsystem, für 24 h bei Raumtemperatur und für 28 d bei -20°C nicht zu einer Beeinträchtigung dieser führte (Tabelle A.16). Auch nach drei Einfrier- und Auftauzyklen waren Präzision und Richtigkeit innerhalb der Grenzen von $\pm 15\%$.

Bevor die Methode mit Lithium-Heparin-Plasma validiert wurde, war sie auf Grund mangelnder Verfügbarkeit mit humanen Citrat-Plasma validiert worden. Um zu überprüfen, ob dieser Sachverhalt einen Einfluss auf die Quantifizierung hatte, wurden die Proben noch einmal mit humanen Lithium-Heparin-Plasma als Nullplasma für die Kalibratoren und QC-Proben vermessen und die Abweichung bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass von den 42 zweifach gemessenen Proben 41 Proben bei Doxapram (97,6 %) und 38 Proben bei Ketodoxapram (90,5 %) innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 20\%$ für erneute Messungen lagen (Tabelle A.17). Somit hat Citrat-Plasma als Nullplasma für Lithium-Heparin-Plasma-Proben keinen negativen Einfluss auf die Messungen und liefert zuverlässige Werte.

In einem weiteren Schritt wurden mehrere Leermatrices verglichen, um deren Einfluss auf die Quantifizierung zu erfassen und zu überprüfen, ob unterschiedliche Proben zusammen vermessen werden können. Als Matrices wurden humanes Lithium-Heparin-

Plasma, Citrat-Plasma, EDTA-Plasma und Vollblut soweit Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein verwendet (Tabelle A.18 bis A.22). Jede Leermatrix wurde zum Ansetzen der Kalibratoren und QC-Proben verwendet und über Kreuz getestet. Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen Matrices keinen Einfluss auf die Präzision und Richtigkeit hatten. Bei jeder beliebigen Kombination von unterschiedlichen Leermatrices für Kalibratoren und QC-Proben waren besagte Werte innerhalb der geforderten Grenzen.

Zum Abschluss der Validierung wurde noch eine normale erneute Vermessung der Proben durchgeführt. Hierbei wurden mindestens 10 % der DOCTOS-Proben erneut vermessen und ebenfalls die Abweichung bestimmt (Tabelle A.23). Von den 65 getesteten Proben waren bei Doxapram 61 (93,8 %) und bei Ketodoxapram 54 (85,7 %) der Proben innerhalb der Grenzen von ± 20 %, womit die Anforderungen der FDA und EMA an die bioanalytische Methodenentwicklung erfüllt waren.

3.2.5. Quantifizierung von A293 im Plasma von Schweinen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Quantifizierung von A293 im Plasma von Schweinen wurde in Teilen bereits in Wiedmann et al. (2021) publiziert. Die hier beschriebenen Experimente erfolgten in Kooperation mit dem analytisch-chemischen Labor der Abteilung für klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie, wobei die Durchführung der Experimente komplett in Eigenleistung an Geräten des analytisch-chemischen Labors erfolgte.

Die Leitlinien von FDA und EMA beschäftigen sich ausschließlich mit der Validierung von bioanalytischen Messmethoden zur Quantifizierung in Humanproben (FDA 2018; EMA 2011). Die Substanz A293 hat jedoch keine Zulassung, daher ist eine Anwendung im Menschen bisher noch nicht erlaubt. Aus diesem Grund wurde die UPLC-MS/MS-Methode nur in Anlehnung an zuvor genannte Leitlinien validiert.

Die Messung der A293-Proben fand ebenfalls unter leicht sauren Bedingungen statt, wobei es zur Protonierung kam und ein deutliches $[M+H]^+$ -Signal bei m/z 406,0 (m/z 414,0 für A293-d8) mit ESI im positiven Ionenmodus erzeugt wurde (Abbildung 3.17). Unter den gewählten Kollisionsbedingungen (vgl. Tabelle 2.18) war ein deutlicher Basispeak bei m/z 150,0 zu sehen, während der Methodenentwicklung zeigte sich jedoch, dass dieser für die Quantifizierung nicht gut geeignet war. Das Signal bei m/z 122,0 zeigte bessere Eigenschaften und wurde daher für die Messungen verwendet. Somit wurde der Massenübergang von m/z 406,0 zu 122,0 für die Quantifizierung von A293 gewählt und m/z 414,0 zu 122,0 für A293-d8.

Wie bereits bei Doxapram wurde auch bei A293 eine gute Trennung unter Verwendung einer UPLC BEH C18 Trennsäule, die auf 40 °C erwärmt wurde, erreicht (Abbildung A.6). Der Gradient startete mit einer initial niedrigen ACN-Konzentration von 10 %, die sich auf 95 % steigerte und scharfe Peaks mit einer Breite von 6 s auf Höhe der Grundlinie und einer Retentionszeit von 2,46 min erzeugte.

Die Isolation von A293 aus Schweineplasma erfolgte mittels LLE unter Verwendung von TBME und leicht basischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 9,0. Die Methode wurde für einen Konzentrationsbereich von 5–2 500 ng/mL entwickelt und validiert. Für Proben,

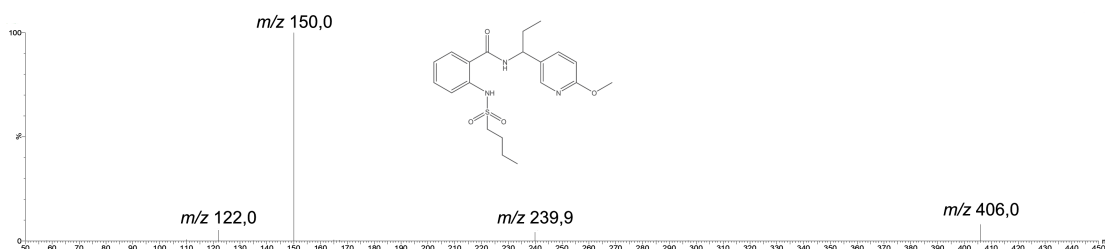


Abbildung 3.17.: Tandem-Massenspektrum von A293 nach ESI im positiven Modus und einer Stoßenergie von 34 V. Die Strukturen der Substanz A293 wurde in das Spektrum eingefügt. ESI: Elektrosprayionisation

die eine höhere Konzentration außerhalb des Bereiches hatten, wurde ein Verdüner-QC in gleicher Weise wie die zu messenden Proben 1:10 oder 1:100 mit Leermatrix verdünnt und bei jedem Lauf zweifach mit vermessen. Eine Erweiterung des Messbereiches war auf Grund der Limitationen des Detektors nicht möglich, da sonst der lineare Bereich verlassen worden wäre. Das Überführen von 25 μ L der organischen Phase zum Eindampfen und der anschließenden Resuspension in 250 μ L lieferte die erforderliche Signalintensität, um die Proben der niedrigsten Konzentration zu vermessen.

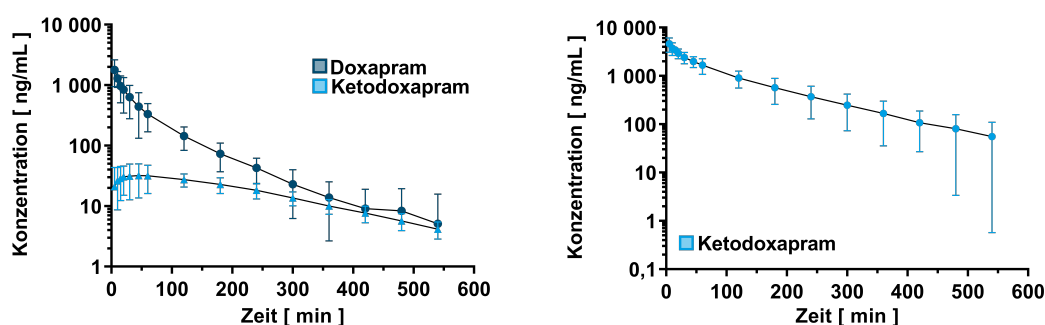
Die Überprüfung der Wiederfindungsrate in lediglich einer Leermatrix zeigte zufriedenstellende und konsistente Ergebnisse bei allen drei getesteten QC-Konzentrationen (93–97 %). Auch die Untersuchung des IS-normalisierten Matrixeffekts, ebenfalls nur in einer Leermatrix und für drei QC-Konzentrationen, zeigte weder eine Unterdrückung noch Verstärkung der Ionen (97–102 %). Die linearen Regressionskurven zeigten einen Korrelationskoeffizient (r^2) von $\geq 0,983$ und die Werte für Richtigkeit und Präzision waren für alle drei getesteten QC-Konzentrationen innerhalb der Grenzen von ± 15 % mit einer maximalen Präzision von 11,8 % und einer Richtigkeit von 97,2–109,8 % (Tabelle A.24).

Die Selektivität wurde in sechs verschiedene Plasmaproben von Schweinen ohne Medikamentengabe vermessen, wobei keine störenden Peaks identifiziert wurden. Es zeigten sich allerdings eine Verschleppung des Analyten, die durch eine Vermessung von reinem Laufmittel nach jeder Probe eliminiert werden konnte. Es erfolgte keine Überprüfung der Stabilität und auch keine erneute Vermessung bereits quantifizierter Proben. Somit wurden die Anforderungen von FDA und EMA nur in Teilen erfüllt und die Methode ist nicht validiert für die Vermessung von humanen Proben.

3.2.6. Bestimmung pharmakokinetischer Parameter im Schwein

Die hier beschriebenen Daten zur Pharmakokinetik von Doxapram und Ketodoxapram nach einmaliger Gabe von Doxapram an Tag 2 wurden bereits in Kraft et al. (2022) publiziert. Die Operationen der Schweine wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Constanze Schmidt und PD Dr. Felix Wiedmann durchgeführt. Die Verabreichung der Studienmedikation, Gewinnung und Quantifizierung der Blutproben sowie die Auswertung der Daten erfolgte in Eigenleistung.

Zur Bestimmung von pharmakokinetischen Parameter wurde die zuvor beschriebene UPLC-MS/MS-Methode verwendet. Jeweils drei Deutsche Landrasse Schweine wurden entweder 14 Tage lang einmal täglich mit 1 mg/kg Doxapram *i.v.* oder Ketodoxapram *i.v.* behandelt. Jeden Tag wurden kurz vor Applikation der Medikation eine Blutprobe zur Bestimmung der Talspiegel abgenommen. Am ersten Tag der Medikamentengabe (Tag zwei nach Operation) sowie an Tag 5, 9 und 13 (Ketodoxapram) bzw. Tag 6, 10 und 13 (Doxapram) nach Operation wurden weitere Proben (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min, 420 min, 480 min und 540 min nach Gabe) zur Bestimmung der Kinetik entnommen. An Tag 1 nach Operation wurde noch keine Medikation verabreicht, daher beginnen die Messungen erst ab Tag 2, dem ersten Applikationstag. Die unterschiedlichen Tage der Probenabnahme liegen in Planungsunterschieden auf Grund von Terminkonflikten begründet.



a) 1 mg/kg Doxapram *i.v.*

b) 1 mg/kg Ketodoxapram *i.v.*

Abbildung 3.18.: Konzentrations-Zeit-Kurve nach einer einmaligen schnellen *i.v.* Applikation (innerhalb von 1 min) von 1 mg/kg Doxapram (Dunkelblau, a) und Ketodoxapram (Hellblau, b) im Deutschen Landrasse Schwein ($n = 3$). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall.

i.v.: intravenös.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Die Konzentrations-Zeit-Kurve nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram zeigte einen biphasischen Verlauf, mit einem initial steilen Abfall und einer flacheren terminalen Phase (Abbildung 3.18a). Typisch für einen Metaboliten, der erst aus der Muttersubstanz gebildet werden muss, nahm die Ketodoxapram-Konzentration nach Doxapram-Gabe innerhalb der ersten 60 min zu und nahm anschließend langsam ab. Die Konzentrations-Zeit-Kurve nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Ketodoxapram zeigte ebenfalls einen biphasischen Verlauf mit initialen steilen Abfall und terminal flacher Phase (Abbildung 3.18b). In Tabelle 3.1 sind die pharmakokinetischen Parameter zusammen gefasst, die auf Grundlage der Blutproben an Tag 1 der Medikamentengabe berechnet wurden.

In Abbildung A.7 sind die Konzentrations-Zeit-Kurven der Schweine nach Gabe von Doxapram detaillierter dargestellt. Der Verlauf der 9 h Kinetik ist zum einen nach Tagen (Abbildung A.7b, A.7e, A.7h und A.7k) sowie nach Schweinen (Abbil-

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung der pharmakokinetischen Parameter von Doxapram und Ketodoxapram im Deutschen Landrasse Schwein ($n = 3$) nach einmaliger *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram (oberhalb der Linie) und Ketodoxapram (unterhalb der Linie).

AUC: Fläche unter der Kurve; CL: Clearance; $C_{\max}$: maximale Plasmakonzentration; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; $t_{\max}$: Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration; V_{ss} : Verteilungsvolumen.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Tier	$C_{\max}$ [ng/mL]	AUC [ng/mL*h]	V_{ss} [L]	Cl [ml/min/kg]	$t_{1/2}$ [h]	$t_{\max}$ [h]
Doxapram						
Nr. 154	2 149	1 169	34,4	14,2	1,18	—
Nr. 155	1 490	986	51,5	16,9	1,26	—
Nr. 156	1 701	1 403	37,1	11,9	1,69	—
Mittelwert	$1\,780 \pm 275$	$1\,186 \pm 170$	$41,0 \pm 7,5$	$14,3 \pm 2,0$	$1,38 \pm 0,22$	—
Ketodoxapram						
Nr. 154	31,2	157	—	—	2,47	0,33
Nr. 155	26,2	139	—	—	2,36	1,00
Nr. 156	39,5	185	—	—	2,42	0,75
Mittelwert	$32,3 \pm 5,5$	160 ± 19	—	—	$2,42 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,28$
Ketodoxapram						
Nr. 179	5 212	6 838	12,3	2,44	1,81	—
Nr. 180	4 616	6 033	13,4	2,76	1,80	—
Nr. 181	3 985	4 885	14,6	3,41	1,52	—
Mittelwert	$4\,604 \pm 501$	$5\,919 \pm 801$	$13,4 \pm 0,9$	$2,87 \pm 0,41$	$1,71 \pm 0,13$	—

dung A.7c, A.7i und A.7j) getrennt aufgetragen. Die Kurven zeigten über die gesamte Zeitspanne einen biphasischen Verlauf. Hierbei ist zu beachten, dass an Tag 6 bei Schwein Nr. 156 nach Abnahme des Talspiegels keine weiteren Blutproben mehr abgenommen werden konnten und daher für diesen Tag keine 9 h-Kinetik verfügbar ist. Des Weiteren ist der Verlauf der Plasmakonzentration über den kompletten Beobachtungszeitraum im Mittel aller Schweine (Abbildung A.7a) sowie aufgetrennt nach Schwein (Abbildung A.7d, A.7g und A.7j) zu sehen. Hierbei sind größere Schwankungen in den Plasmakonzentrationen zu erkennen, die in Problemen mit der Blutentnahme und Verabreichung der Medikamente über den ZVK begründet liegen könnten. Die letzte Gabe von Doxapram erfolgte am Tag 13 morgens und die Blutentnahme am Tag 14 im Zusammenhang mit der terminalen Operation. Diese Blutprobe hatte daher einen größeren zeitlichen Abstand zur Medikamentenapplikation als die anderen Proben.

Für Ketodoxapram ist der Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven in Abbildung A.8 detailliert abgebildet. Analog zu den Doxapram-Schweinen wurde der Verlauf der 9 h-Kinetik nach Tagen (Abbildung A.8b, A.8c, A.8h und A.8k) und nach Schweinen (Abbildung A.8c, A.8f und A.8i) getrennt abgebildet. Es zeigte sich auch hier der bereits beschriebene biphasische Kurvenverlauf. Der Verlauf der Ketodoxapram-Konzentrationen über den Beobachtungszeitraum zeigte ein sehr inhomogenes Bild (Abbildung A.8a). Die

Konzentrationen schwankten über einen großen Bereich (über Faktor 100) und sind für Schwein 181 deutlich niedriger als für die anderen beiden Schweine (Abbildung A.8d, A.8g und A.8j). Auch bei den Ketodoxapram Schweinen erfolgte die letzte Medikamentengabe am Tag 13 und die finale Blutentnahme im Verlauf der terminalen Operation am Tag 14.

Die Veränderung der pharmakokinetischen Parameter (AUC , C_{max} , $t_{1/2}$, Verteilungsvolumen (V_{ss}), CL und Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration (t_{max})) ist für Doxapram in Abbildung A.9 und für Ketodoxapram in Abbildung A.10 im Verlauf des Beobachtungszeitraums dargestellt. Hierbei zeigte sich für die Schweine nach Doxapram-Gabe kein klarer Trend zu einer Veränderung, wobei die Anzahl der Datenpunkte nicht ausreichend war für eine sinnvolle statistische Auswertung. Bei den Ketodoxapram Schweinen war ein Trend hin zu einem Anstieg der C_{max} und AUC zu beobachten, der im Zusammenhang mit den höheren Talspiegeln stehen könnte (vgl. Abbildung A.8a). Die restlichen Parameter zeigten keinen klaren Trend bzw. veränderten sich nicht.

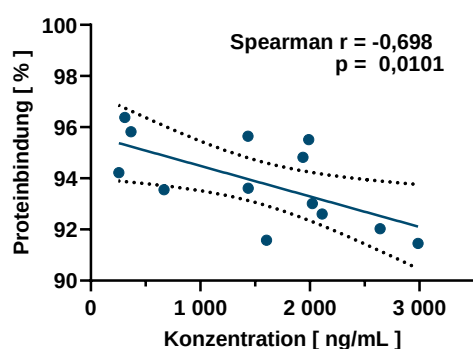
3.2.7. Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis und Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Daten zur Proteinbindung und ZNS-Gängigkeit von Doxapram und Ketodoxapram nach Gabe von Doxapram wurden bereits in Kraft et al. (2022) publiziert.

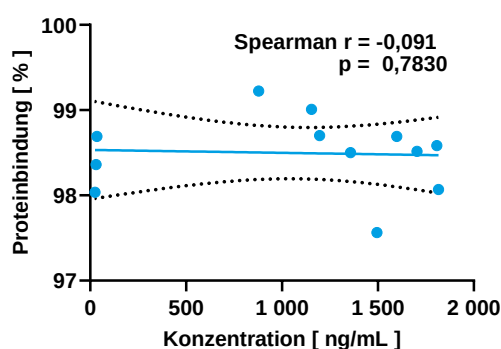
Zum weiteren Vergleich von Doxapram und Ketodoxapram wurde die Proteinbindung der beiden Substanzen in den Blutproben der zuvor beschriebenen Schweine bestimmt. Dies erfolgte durch Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung des RED-Systems. Für die Analysen wurden Proben verwendet, die zum Zeitpunkt 60 min nach *i.v.* Applikation von entweder 1 mg/kg Doxapram oder Ketodoxapram gewonnen wurden. Die totale Konzentration von Doxapram war $332,0 \pm 53,6$ ng/mL und von Ketodoxapram $31,7 \pm 5,1$ ng/mL nach Applikation von Doxapram. Die Proteinbindung der beiden Substanzen war signifikant unterschiedlich ($p = 0,0058$ berechnet mit einseitiger ANOVA und Benferroni-Korrektur für Mehrfachtestung) und wurde mit $95,5 \pm 0,9$ % für Doxapram und $98,4 \pm 0,3$ % für Ketodoxapram bestimmt. Somit war die freie Fraktion von Doxapram mit 4,5 % in etwa dreimal so groß wie die von Ketodoxapram mit 1,6 %. Nach Applikation von Ketodoxapram wurde eine Proteinbindung von $98,6 \pm 0,1$ % und eine freie Fraktion von 1,4 % bestimmt, bei einer totalen Konzentration von $1587,6 \pm 184,1$ ng/mL. Die Proteinbindung von Ketodoxapram als Metabolit und nach Gabe von Ketodoxapram unterschied sich nicht signifikant ($p > 0,9999$ berechnet mit einseitiger ANOVA und Benferroni-Korrektur für Mehrfachtestung), der Vergleich mit der Proteinbindung von Doxapram war auch hier signifikant unterschiedlich ($p = 0,0039$ berechnet mit einseitiger ANOVA und Benferroni-Korrektur für Mehrfachtestung).

Zur Untersuchung einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung wurde diese in zusätzlichen Blutproben bestimmt. Hierbei handelte es sich für Doxapram um Proben, die 5 min nach *i.v.* Applikation von 1 mg/kg ($n = 3$) und um Proben

die wenige Minuten nach *i.v.* Applikation von 0,5 mg/kg abgenommen worden waren ($n = 7$). Für Ketodoxapram wurden Proben verwendet, die wenige Minuten nach *i.v.* Applikation von 0,125 mg/kg abgenommen worden waren ($n = 6$). Es zeigte sich, dass die Proteinbindung von Doxapram im Schwein über den untersuchten Bereich von 250–3 000 ng/mL Konzentrationsabhängig war (Spearman $r = -0,698$ und $p = 0,0101$; Abbildung 3.19a). Mit höheren Konzentrationen an Doxapram nahm die Proteinbindung ab. Für Ketodoxapram hingegen war dies über einen Bereich von 25–1 850 ng/mL nicht zu beobachten (Spearman $r = -0,091$ und $p = 0,7830$; Abbildung 3.19b). Schließt man aus dieser Betrachtung die Proteinbindung der Proben aus, in denen Ketodoxapram nur als Metabolit gebildet wurde, wird der Bereich auf 900–1 850 ng/mL reduziert. Es zeigte sich, dass auch in diesem kleineren Bereich der Zusammenhang weiterhin nicht signifikant war (Spearman $r = -0,667$ und $p = 0,0589$; Daten nicht gezeigt), es jedoch ein Trend hin zu einer negativen Korrelation zwischen Proteinbindung und Plasmakonzentration gab.



a) Doxapram



b) Ketodoxapram

Abbildung 3.19.: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Doxapram (a) und Ketodoxapram (b) im Schwein ($n = 12$ – 13). Für Doxapram wurden die Proteinbindung der Schweine zum einen in Plasmaproben, die 5 min und 60 min nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg abgenommen wurden, bestimmt (jeweils $n = 3$). Zum anderen in Plasmaproben, die wenige Minuten nach *i.v.* Gabe von 0,5 mg/kg abgenommen wurden ($n = 7$). Für Ketodoxapram erfolgte die Bestimmung der Proteinbindung in Plasmaproben, die 60 min nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg abgenommen wurden ($n = 3$), in Plasmaproben, die wenige Minuten nach *i.v.* Gabe von 0,125 mg/kg abgenommen wurden ($n = 6$) und in den bereits oben beschriebenen Proben die 60 min nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram angenommen wurden ($n = 3$). Zur Bestimmung der Proteinbindung wurde das RED-System verwendet. Nach Auftragung der Proteinbindung gegen die Plasmakonzentration wurde eine lineare Regression mit 95 % Konfidenzintervall eingezeichnet. Angegeben ist außerdem der Korrelationskoeffizienten der Spearman-Rangordnung (r) und der dazugehörige p -Wert (p).

RED: schnelle Gleichgewichtsdialyse

Neben der Proteinbindung wurde ebenfalls das Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis in Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 3$) bestimmt, die 14 Tage lang täglich eine *i.v.* Applikation von 1 mg/kg Doxapram (Abbildung 3.20a) bekommen haben. Hierfür wurde während

der terminale Operation eine Blutprobe zeitgleich zur Gehirnentnahme gewonnen und beides mit beschriebener UPLC-MS/MS-Methode quantifiziert. Die Ratio aus Konzentration im Gehirn und Konzentration in der Blutprobe zeigte einen Wert von $0,58 \pm 0,24$ für Doxapram und einen fast fünffach niedrigeren für Ketodoxapram ($0,12 \pm 0,07$). Im Verhältnis zur Plasmakonzentration war die Konzentration von Doxapram im Gehirn somit fast fünfmal höher als dies bei Ketodoxapram der Fall war. Dies zeigt sich auch in der Steilheit der Regressionsgerade, die durch die Datenpunkte gelegt wurde. Diese betrug für Doxapram $0,982 \pm 0,197$ und für Ketodoxapram $0,754 \pm 0,044$. Nach Gabe von Ketodoxapram ($n = 3$; Abbildung 3.20b) war das Verhältnis mit einem Wert von $0,067 \pm 0,070$ um die Hälfte niedriger als in den Tieren, die Doxapram bekommen und Ketodoxapram daraus gebildet haben. Die Ratio war um den Faktor 9 niedriger als die Ratio von Doxapram. Die Steilheit der linearen Regression der Ketodoxapram Tiere wies einen negativen Wert von $-0,082 \pm 0,686$ auf, wobei der Fehler im Vergleich zum Wert sehr groß war.

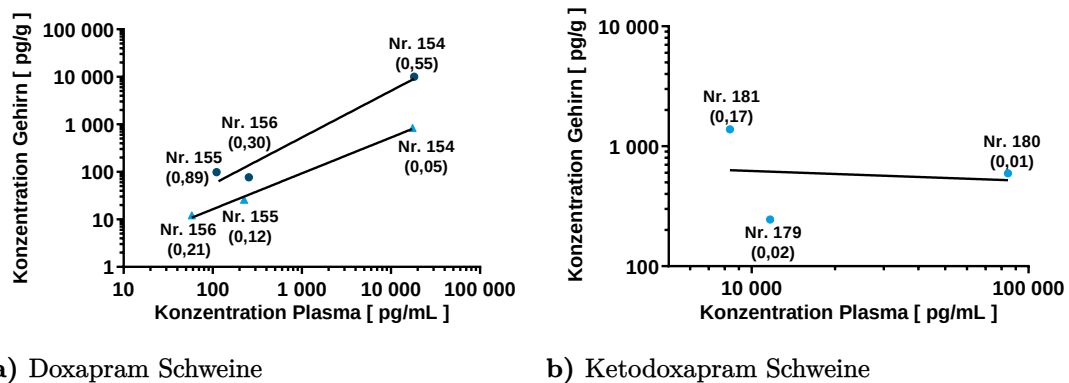


Abbildung 3.20.: Vergleich der Konzentration im Gehirngewebe mit der im Blutplasma am Ende der 14-tägigen *i.v.* Applikation von einmal täglich 1 mg/kg Doxapram (a) bzw. Ketodoxapram (b). In Klammern ist das Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis angegeben. Die dunkelblauen Kreise zeigen die Datenpunkte für Doxapram und die hellblauen Dreiecke für Ketodoxapram nach Doxapram Gabe (a). Die hellblauen Kreise stellen die Werte für Ketodoxapram nach Gabe des selbigen dar (b). Die Linie wurde mit der linearen Regression bestimmt. Eine steilere Gerade bedeutet ein höheres Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis.

i.v.: intravenös.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).

3.2.8. Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Daten wurden in Kooperation mit PD Dr. Felix Wiedmann erhoben. Die Operation der Schweine, sowie die Durchführung der EPU und Bestimmung der hämodynamischen Parametern erfolgte in Zusammenarbeit, jedoch unter Leitung von PD Dr. Felix Wiedmann. Die Verabreichung der Studienmedikation, Entnahme der Blutproben, die

Bestimmung der Plasmakonzentrationen und die anschließende Auswertung der Experimente erfolgte in Eigenleistung. Ein Teil der Daten zu A293 wurde bereits in Wiedmann et al. (2021) publiziert.

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten die Pharmakokinetik sowie Proteinbindung und ZNS-Gängigkeit Thema gewesen waren, sollte noch der Einfluss von Doxapram und Ketodoxapram auf den pulmonalarteriellen Druck untersucht werden. In der Einleitung wurde bereits die Rolle von TASK-1 bei PH (siehe Abschnitt 1.2.2.1) beschrieben sowie näher auf die Inhibition von TASK-1 durch Doxapram eingegangen (siehe Abschnitt 1.4.2.1). Daher sollte im Folgenden im Schweinmodell untersucht werden, ob die Behandlung mit Doxapram durch eine Interaktion mit TASK-1 zu PH führt. Auf Grund des zuvor beschriebenen Effekts von Ketodoxapram auf den TASK-1 sollte auch diese Substanz im Zusammenhang mit PH näher betrachtet werden. Darüber hinaus wurden noch die experimentellen TASK-1-Inhibitoren A293 und Z3217409047 sowie das Antiarrhythmikum Amiodaron und eine Kontrolle untersucht.

Bei der Untersuchung vier unterschiedlicher TASK-1-Inhibitoren im Schweinmodell zeigte sich konzentrationsabhängig ein akuter Anstieg des PA-Drucks für alle Substanzen (Abbildung 3.21). Hierbei war die stärkste Erhöhung unter Verabreichung der Substanz Z3217409047 zu erkennen, gefolgt von Ketodoxapram, Doxapram und A293. Nach Verabreichung von Amiodaron und der Kontrolle war keine Veränderung des Drucks ersichtlich. Im Gegensatz zum PA-Druck wurde durch Gabe der verschiedenen Substanzen der Lungenkapillarenverschlussdruck (PCWP) nicht verändert (Abbildung A.11). Ein Vergleich mit den Normwerten zeigte, dass sich die Werte aller Substanzen innerhalb des physiologischen Bereiches befanden.

Neben dem Anstieg des PA-Drucks wurde unter A293, Doxapram und Ketodoxapram ein mäßiger Anstieg des systemischen Blutdrucks gemessen, der unter Gabe von Z3217409047 etwas deutlicher ausfiel (Abbildung 3.22). Unter Gabe von Amiodaron kam es hingegen zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks, während die Kontrolle keinen Einfluss auf den Blutdruck hatte. Die Kurven des diastolischen und systolischen Wertes verliefen relativ parallel, so dass hier keine unterschiedlichen Effekte zu erkennen waren. Die Messungen der Herzfrequenz (Abbildung A.12) ergaben kein eindeutiges Bild für die untersuchten Substanzen. Für die Kontrolle, Ketodoxapram und Z3217409047 waren ein Anstieg der Frequenz zu erkennen, der jedoch nicht stark ausgeprägt war und mit recht großen Fehlerbalken der jeweiligen Messwerte verbunden war. Für A293 und Doxapram war keinerlei Veränderung der Herzfrequenz sichtbar und Amiodaron zeigte erst eine Absenkung und ab höheren Dosierung einen leichten Anstieg der Frequenz.

Der Index des systemischen Gefäßwiderstands (SVRI) zeigte für fast alle TASK-1-Inhibitoren keine Änderung über die einzelnen Dosierungsschritte, lediglich bei Ketodoxapram war ein leichter Anstieg zu beobachten (Abbildung A.13). Auch nach Gabe der Kontrolle kam es zu keiner Veränderung. Lediglich nach Verabreichung von Amiodaron kam es unter den höheren Dosierungen zu einer Verringerung des SVRI unterhalb des im Menschen geltenden physiologischen Normalbereichs. Ein anderes Bild zeigte sich für den

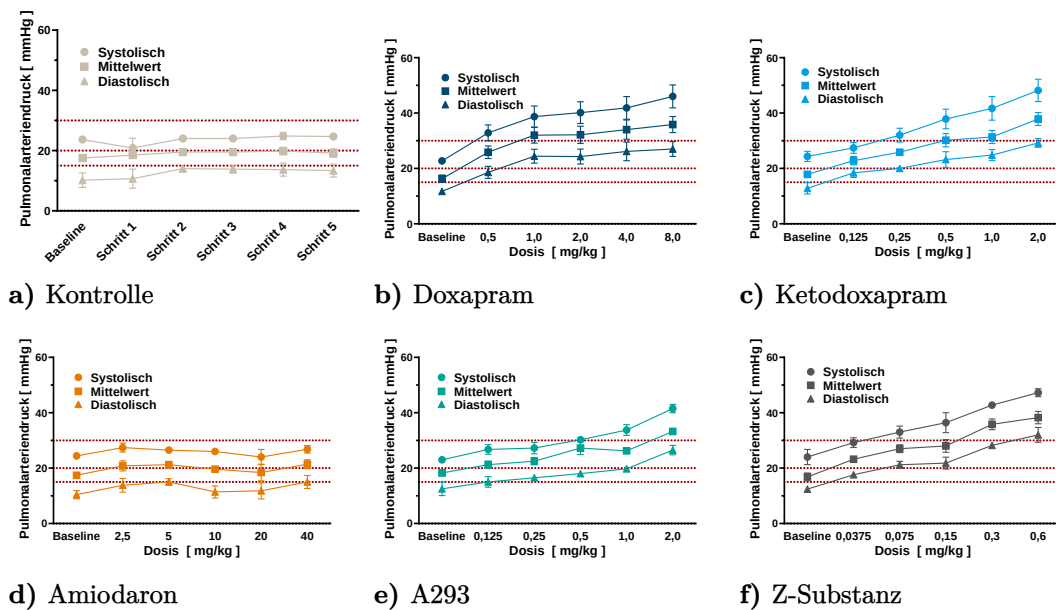


Abbildung 3.21.: Veränderung des Pulmonalarteriendrucks nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und einer Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-7$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen sowie reine isotonsische Kochsalzlösung verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1–5) wurde der Pulmonalarteriendruck gemessen.

Index des pulmonalen Gefäßwiderstands (PVRI) (Abbildung A.14). Hier kam es unter Verabreichung der Kontrolle und Amiodaron zu keiner Änderung, jedoch stieg der Index nach Gabe aller TASK-1-Inhibitoren.

Eine Bestimmung der Plasmaspiegel von Amiodaron durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Heidelberg zeigte (Abbildung A.15), dass die ersten zwei Dosierungsschritte (2,5 mg/kg und 5 mg/kg) innerhalb des therapeutischen Bereichs einer chronischen Anwendung lagen, der dritte Schritt (10 mg/kg) knapp oberhalb der Grenze und die beiden letzten deutlich im supratherapeutischen Bereich lagen. Die Messung der Plasmaspiegel von Ketodoxapram, Doxapram und A293 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch eine unter anderem hierfür entwickelte und validierte UPLC-MS/MS-Methode. Für Ketodoxapram und A293 gibt es keine klinische Indikation und daher auch keinen therapeutischen Bereich, hier ließ sich lediglich sehen, dass die Plasmakonzentration entsprechend der gesteigerten Dosierung anstiegen. Doxapram wird zu Atemantriebssteigerung mit einer Dosierung von 2 mg/kg injiziert, somit lagen die ersten drei Dosierungsstufen im therapeutischen Bereich für diese Anwendung und auch die Plasmaspiegel lagen unter der Grenze von 5 000 ng/mL, ab der mit gesteigerten Nebenwirkungen gerechnet wird. Die letzten beiden Dosierungsschritte waren daher im supratherapeutischen Bereich.

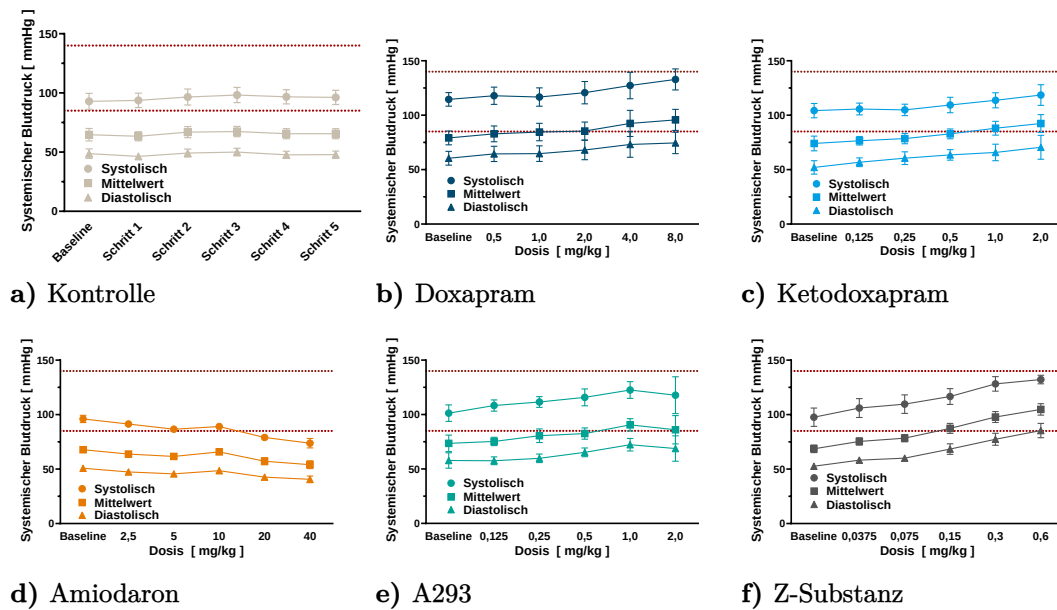


Abbildung 3.22.: Veränderung des systemischen Blutdrucks nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und der Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen und eine Kontrolle verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1-5) wurde der systemische Blutdruck gemessen.

Es wurde jedoch für Doxapram und Ketodoxapram nicht nur der akute Effekt auf den PA-Druck untersucht, sondern auch der chronische Effekt nach täglicher Verabreichung über 14 d. Hierfür wurde bei den Schweinen, die einmal täglich *i.v.* 1 mg/kg Doxapram oder Ketodoxapram erhalten hatten ($n = 3$), zu den Zeitpunkten der initialen und terminalen Operationen die hämodynamischen Parameter bestimmt (Abbildung 3.23). Es zeigt sich hierbei jedoch im Gegensatz zur akuten Gabe, dass weder der PA-Druck, systemischer Blutdruck (RR) und PCWP (Abbildung 3.23a und Abbildung 3.23d) noch der SVRI und der PVRI (Abbildung 3.23b und 3.23e) sich signifikant unterschieden (zweiseitiger t Test) nach chronischer Verabreichung der beiden Substanzen. Auch die Herzfrequenz unterschied sich nach Gabe von Doxapram nicht (Abbildung 3.23c), nur nach Ketodoxapram-Gabe war eine signifikante Erhöhung zu sehen ($p = 0,0381$, berechnet mit zweiseitigen t Test; Abbildung 3.23f).

3.2.9. Verlängerung der arteriellen effektiven Refraktärzeit und Terminierung von Vorhofflimmern durch Ketodoxapram

Die Erhebung der Daten für diesen Abschnitt erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Constanze Schmidt und PD Dr. Felix Wiedmann. Die Operationen und damit verbundene Bestimmung der EPU-Daten wurden unter der Leitung

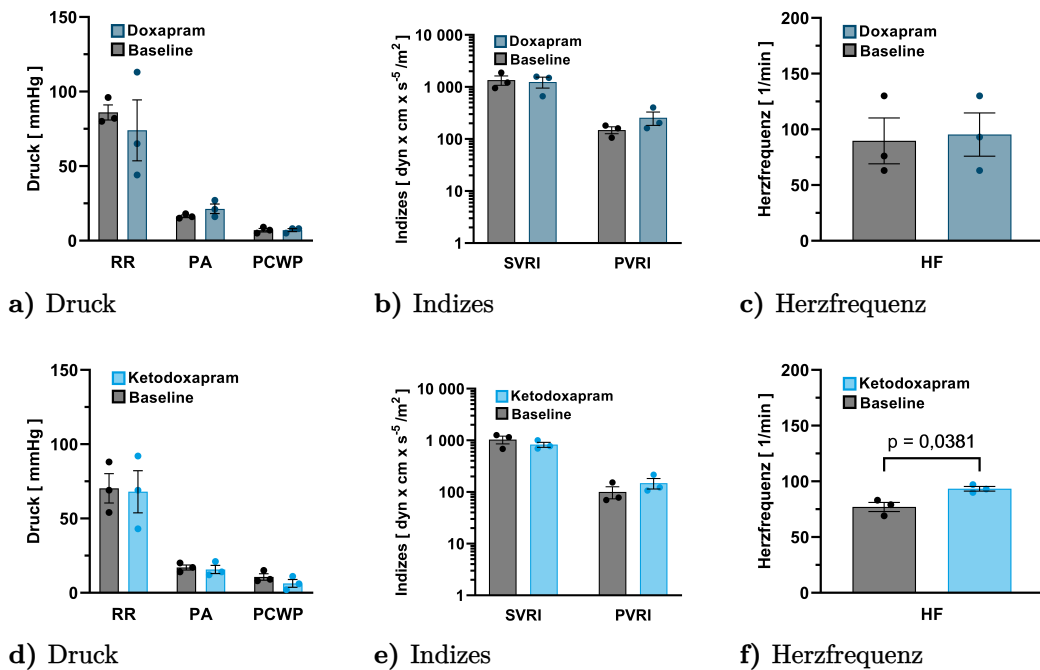


Abbildung 3.23.: Veränderungen der hämodynamischen Parametern nach chronischer *i.v.* Applikation von 1 mg/kg Doxapram (a bis b) und Ketodoxapram (d bis e) über 14 d bestimmt in Schweinen der Deutschen Landrasse (n = 3). Angegeben sind der mittlere systemische Blutdruck, mittlerer PA-Druck und PCWP (a und d), SVRI und PVRI (b und e) sowie die Herzfrequenz (c und f). Die Werte sind angegeben als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts sowie den einzelnen Werten. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen *t* Test berechnet und die Werte $p < 0,05$ angegeben.

AERP: atriale effektive Refraktärzeit; *i.v.*: intravenös; PA: Pulmonalarterien; PCWP: Lungenkapillarenverschlussdruck; PVRI: Index des pulmonalen Gefäßwiderstands; RR: systemischer Blutdruck; SVRI: Index des systemischen Gefäßwiderstands

von Prof. Dr. Constanze Schmidt bzw. PD Dr. Felix Wiedmann durchgeführt. Die Applikation der Studienmedikation, Gewinnung der Blutproben, Quantifizierung der Plasmaspiegel und Auswertung der Daten erfolgte in Eigenleistung.

Zur Untersuchung der akuten Effekte der vier TASK-1-Inhibitoren auf die AERP wurde in den Schweinen, die zur Untersuchung der hämodynamischen Parametern herangezogen worden waren, eine EPU nach jedem Dosierungsschritt durchgeführt. Es zeigte sich hierbei, dass es bei der Kontrollgruppe zu keiner Veränderung der AERP kam (Abbildung 3.24). Bei den TASK-1-Inhibitoren kam es hingegen zu einer Verlängerung der AERP, die bei Ketodoxapm am stärksten ausgeprägt war. Auch Amiodaron verursachte eine Verlängerung der AERP.

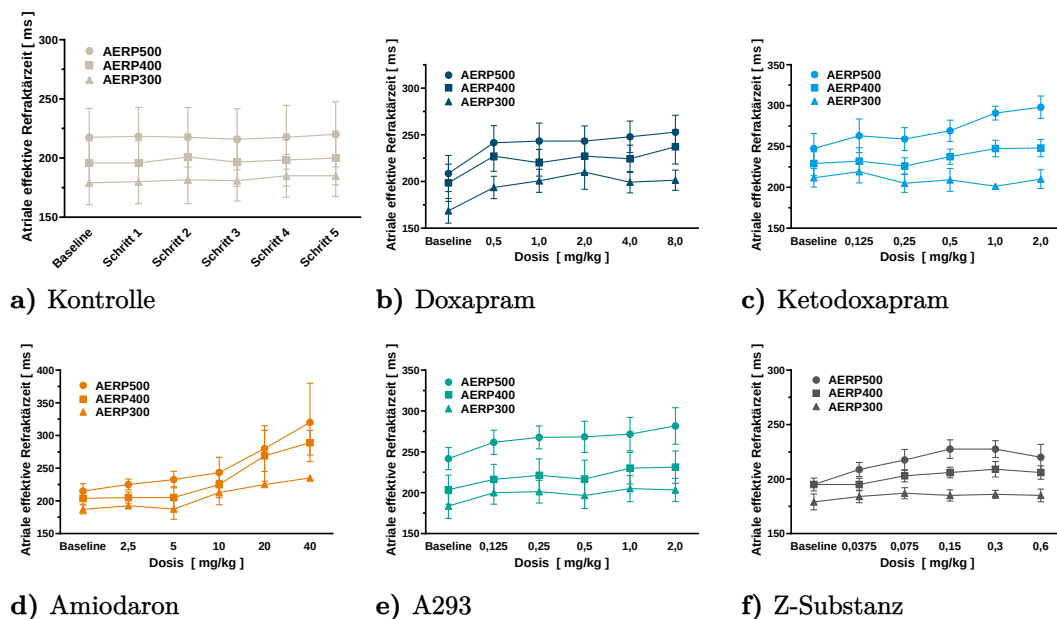


Abbildung 3.24.: Veränderung der AERP nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und einer Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047, Amiodaron und reine isotonische Kochsalzlösung in steigenden Konzentrationen verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1–5) wurde die AERP bestimmt.

AERP: atriale effektive Refraktärzeit

Ebenso wurde der Einfluss einer chronischen *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram und Ketodoxapram über 14 d im Schwein auf die AERP untersucht (Abbildung 3.25a und 3.25b). Hierfür wurde die AERP zum Zeitpunkt der initialen Operation vor der ersten Verabreichung einer der beiden Substanzen bestimmt (Baseline) und bei der initialen Operation nach dem Ende der chronischen Applikation. Es zeigte sich, dass die AERP durch chronische Verabreichung der Substanzen nicht signifikant verändert wurde. Auch

eine Betrachtung des Oberflächen-EKGs zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen Ausgangswert und nach der 14 d Therapie (Abbildung 3.25c und 3.25d). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die letzte Medikamentengabe zum Zeitpunkt der terminalen Operation bereits vor 24 h erfolgte.

Infolge der Vordaten von *in vitro* Experimenten zu Ketodoxapram, vor allem im Vergleich zu Doxapram, den erhobenen EPU-Daten und den bereits zu Doxapram publizierten Daten, wurden erste Untersuchungen durchgeführt, die die Anwendung von Ketodoxapram zur Behandlung von VHF im Schwein testen sollten. Hierfür wurde das bereits beschriebene VHF-Schweinmodell verwendet, um zum einen zu testen, ob Ketodoxapram zur akuten Kardioversion geeignet ist und zum anderen zur Evaluierung der Langzeitanwendung. In einem ersten Pilotversuch führte die akute *i.v.* Applikation von 0,5 mg/kg Ketodoxapram zur Wiederherstellung des SR, nachdem zuvor durch Katheterstimulation VHF ausgelöst worden war (Abbildung 3.26b). Die zweimal tägliche *i.v.* Applikation von 0,5 mg/kg Ketodoxapram führte in den zwei behandelten Tieren zu einer reduzierten VHF-Last auf 30 % im Vergleich zu 100 % der Kontrolltiere (Abbildung 3.26a). Die Vergleichstiere aus früheren Experimenten, die zweimal täglich 2 mg/kg Doxapram *i.v.* erhalten hatten, zeigten eine VHF-Last von unter 10 %.

3.2.10. Pharmakokinetik von Doxapram in humanen Probanden

Die Durchführung der DOCTOS-Studie erfolgt in Kooperation mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie unter Leitung von Prof. Dr. Walter E. Haefeli, Prof. Dr. Constanze Schmidt und PD Dr. Antje Blank. Die Betreuung der Studienpatienten und Gewinnung der Studienproben erfolgt gemeinsam mit PD Dr. Felix Wiedmann und Yannick L'hoste. Alleiniger Anteil ist das Herstellen der Studienmedikation, die Verarbeitung und Quantifizierung der Plasmaproben sowie die Untersuchung der Proteinbindung. Die Modellierung und Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. David Czock.

Im Rahmen der DOCTOS-Studie wird den Studienteilnehmern mit VHF Doxapram *i.v.* verabreicht. Je nach Kohorte werden unterschiedliche Dosierungen gewählt, so dass Probanden der ersten Kohorte zweimal 0,5 mg/kg, die der zweiten Kohorte zweimal 1,0 mg/kg und schließlich die der dritten Kohorte zweimal 2,0 mg/kg Doxapram *i.v.* appliziert bekommen. Die Injektionen haben einen Abstand von 20 min und erfolgen über einen Zeitraum von 5 min. Die Probanden der vierten Kohorte bekommen 8 mg/kg Doxapram als *i.v.* Dauerinfusion verabreicht. An zuvor festgelegten Zeitpunkten (siehe Abschnitt 2.8.2) werden Blutproben in Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen und die Plasmakonzentration von Doxapram und Ketodoxapram mit der zuvor entwickelten und validierten UPLC-MS/MS-Methode quantifiziert.

Bei der Betrachtung der repräsentativen Konzentrations-Zeit-Kurven zeigten sich zum einen die zwei Maxima, die den zwei Injektionen entsprechen, zum anderen, ähnlich der bereits beschriebenen Kinetik in den Schweinen, ein biphasischer Verlauf mit einer kürzeren initialen und einer längeren terminalen $t_{1/2}$ (Abbildung 3.27). Des Weiteren

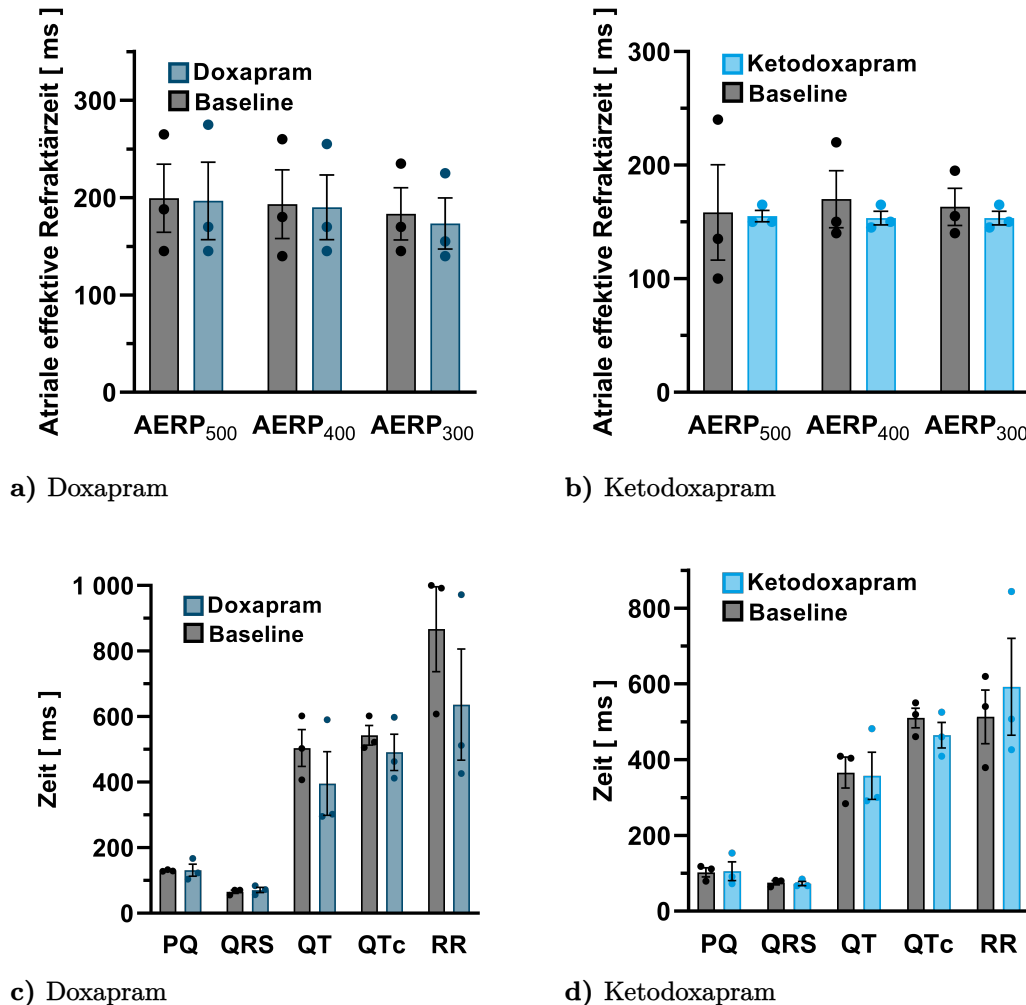


Abbildung 3.25.: Veränderungen der AERP (a und b) und im Oberflächen-EKG (c und d) nach chronischer *i.v.* Verabreichung von 1 mg/kg Doxapram (a und c) und Ketodoxapram (b und d) über 14 d in Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 3$). Die Bestimmung der Ausgangswerte (Baseline) erfolgte im Rahmen der initialen Operation und die Werte nach Substanzeinnahme erfolgte während der terminalen Operation, wobei der Abstand zur letzten Medikamentengabe über 24 h betrug. Die Daten sind angegeben als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts sowie den Einzelwerten. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mit einem zweiseitigem *t* Test. AERP: atriale effektive Refraktärzeit; *i.v.*: intravenös

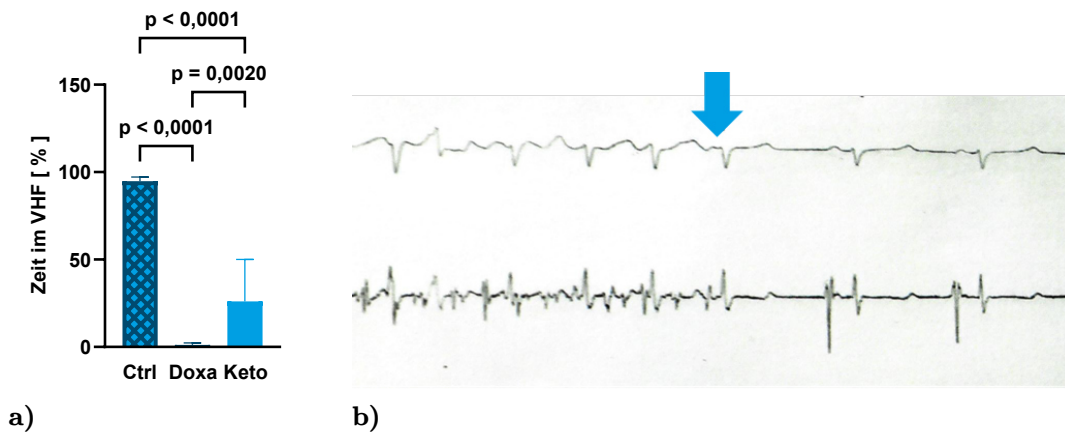


Abbildung 3.26.: Zur Kardioversion von VHF im Schweinemodell wurde Deutschen Landrasse Schweinen ein Zwei-Kammer-Herzschriltmacher implantiert und der AV-Knoten abladiert. Durch hochfrequente Stimulation des Schrittmachers und unter Einsatz eines Biofeedback Stimulationsalgorithmus wurde anschließend VHF ausgelöst. Nach 14-tägiger zweimal täglichen *i.v.* Gabe von 0,5 mg/kg Ketodoxapram wurde die VHF-Last (Zeit, die sich die Schweine im VHF befanden, geteilt durch die Gesamtzeit) berechnet (n = 2; a). Die Kontrolltiere (n = 8) wurden zweimal täglich mit DMSO *i.v.* und die Doxapram-Tiere (n = 8) mit zweimal täglich 2 mg/kg Doxapram *i.v.* behandelt. Die Werte der Kontroll- und Doxapram-Tiere stammen aus früheren Experimenten und sind teilweise bereits veröffentlicht von Wiedmann et al. (2022a). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts und die p-Werte wurden mit einer einseitigen ANOVA berechnet. Durch schnelle Stimulation mit Hilfe von temporären Kathetern wurde in einem weiteren Schwein VHF ausgelöst, das durch *i.v.* Gabe von 0,5 mg/kg Ketodoxapram erfolgreich terminiert werden konnte. EKG der erfolgreichen Kardioversion (b) mit Markierung des Kardioversionszeitpunktes (blauer Pfeil).

AV: atrioventrikular; Ctrl: Kontrolle; DMSO: Dimethylsulfoxid; Doxa: Doxapram; EKG: Elektrokardiogramm; *i.v.*: intravenös; Keto: Ketodoxapram; SR: Sinusrhythmus; VHF: Vorhofflimmern

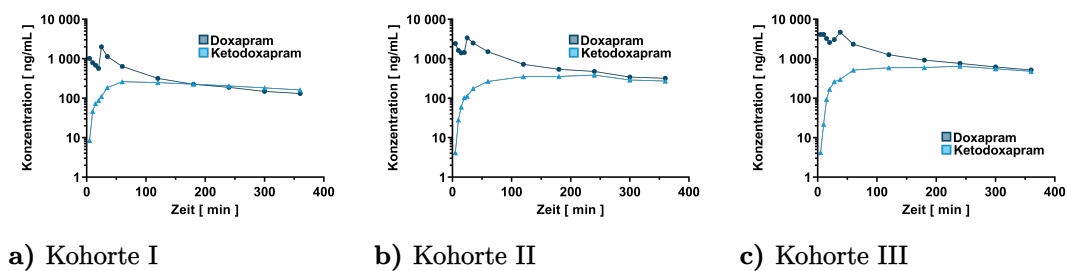


Abbildung 3.27.: Konzentrations-Zeit-Kurven ausgewählter Probanden der DOCTOS-Studie nach zwei *i.v.* Applikation (innerhalb von 5 min) im Abstand von mindestens 20 min von 0,5 mg/kg Doxapram in Kohorte I (a; Proband 109), 1,0 mg/kg Doxapram in Kohorte II (b; Proband 114) und 2,0 mg/kg Doxapram in Kohorte III (a; Proband 119). Die Werte für Doxapram sind dargestellt in Dunkelblau und die für Ketodoxapram in Hellblau.

DOCTOS: Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie; *i.v.*: intravenös

war zu erkennen, dass sich im Verlauf der Beobachtungsdauer die Konzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram annäherten und bis zum Ende der Messungen auf einem ähnlichen Niveau parallel verliefen. Die pharmakokinetischen Parameter wurden auf Grundlage eines 2-Kompartiment-Modell für Doxapram und eines 1-Kompartiment-Modell für Ketodoxapram in WinNonlin modelliert und sind in Tabelle 3.2 für alle drei Kohorten zusammengefasst. Da die Studie noch nicht abgeschlossen ist, sind noch keine Daten der vierten Kohorte verfügbar.

Tabelle 3.2.: Zusammenfassung der pharmakokinetischen Parameter von Doxapram und Ketodoxapram in den Probanden der DOCTOS-Studie nach zweimaliger *i.v.* Applikation (innerhalb von 5 min) im Abstand von mindestens 20 min von 0,5 mg/kg Doxapram in Kohorte I, 1,0 mg/kg Doxapram in Kohorte II und 2,0 mg/kg Doxapram in Kohorte III. Die Parameter wurden basierend auf einem 2-Kompartiment-Modell für Doxapram und einem 1-Kompartiment-Modell für Ketodoxapram in WinNonlin modelliert und berechnet. Die Mittelwerte sind angegeben mit Standardfehler.

CL: Clearance (Ausscheidung); CL_d: Clearance (Verteilung); CL_m: Clearance (Metabolit); t_{1/2α}: Halbwertszeit (initial); t_{1/2β}: Halbwertszeit (terminal); t_{1/2m}: Halbwertszeit (Metabolit); V₁: Verteilungsvolumen Kompartiment 1; V₂: Verteilungsvolumen Kompartiment 2; V_m: Verteilungsvolumen Metabolit

Parameter	Doxapram			Ketodoxapram		
	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III
CL [L/min]	0,33 ± 0,05	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,06	—	—	—
CL _d [L/min]	0,85 ± 0,21	0,60 ± 0,27	0,85 ± 0,35	—	—	—
CL _m [L/min]	—	—	—	0,47 ± 0,12	0,42 ± 0,14	0,72 ± 0,52
V ₁ [L]	44,0 ± 11,7	45,0 ± 18,1	37,00 ± 9,80	—	—	—
V ₂ [L]	157,0 ± 39,7	131,0 ± 35,3	181,0 ± 74,6	—	—	—
V _m [L]	—	—	—	75,0 ± 25,7	95,8 ± 17,2	121,3 ± 23,8
t _{1/2α} [h]	0,38 ± 0,10	0,56 ± 0,30	0,34 ± 0,07	—	—	—
t _{1/2β} [h]	9,08 ± 2,30	9,33 ± 2,90	10,55 ± 3,60	—	—	—
t _{1/2m} [h]	—	—	—	2,01 ± 0,97	2,87 ± 0,93	2,78 ± 1,30

Basierend auf den Blutproben wurde die Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram im humanen Plasma bestimmt (Abbildung 3.28a). Für Kohorte I wurden die Proben 5 min, Kohorte II 15 min und Kohorte III 60 min nach Applikation der entsprechenden ersten Dosierung für die Bestimmung der Bindung von Doxapram gewählt. Die Proteinbindung von Ketodoxapram wurde für alle Kohorten aus den Proben, die 3 h nach Applikation der ersten Dosierung abgenommen wurden, bestimmt.

In der ersten Kohorte betrug die Proteinbindung für Doxapram 87,4 ± 1,4 % bei einer Plasmakonzentration von 1 019,8 ± 313,2 ng/mL und 97,90 ± 0,39 % bei 185,2 ± 51,8 ng/mL für Ketodoxapram, in der zweiten Kohorte 87,2 ± 1,5 % bei 1 261,9 ± 341,7 ng/mL für Doxapram und 97,90 ± 0,38 % bei 344,6 ± 62,3 ng/mL für Ketodoxapram und in der dritten Kohorte 86,7 ± 1,0 % bei 1 881,2 ± 391,3 ng/mL für Doxapram und 97,90 ± 0,19 % bei 506,1 ± 151,3 ng/mL für Ketodoxapram. Es gab für Doxapram und Ketodoxapram keine signifikanten Unterschiede in der Proteinbindung zwischen den unterschiedlichen

Dosis-Kohorten, jedoch war die Proteinbindung von Ketodoxapram immer signifikant höher ($p < 0,0001$ berechnet mit einseitiger ANOVA) als die von Doxapram. Dies führte zu einer 12-fach höheren freien Fraktion von Doxapram im Vergleich zu Ketodoxapram.

Für die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Doxapram (Abbildung 3.28b) wurden die Werte aller drei Kohorten zusammengefasst und gegen die Plasmakonzentration aufgetragen. Hierbei zeigte sich, dass die Proteinbindung in dem untersuchten Bereich von 500–2400 ng/mL nicht konzentrationsabhängig war (Spearman $r = 0,025$ und $p = 0,9205$). Ein ähnliches Bild zeigte sich für Ketodoxapram im Bereich von 100–650 ng/mL (Abbildung 3.28c). Es konnte auch hier keine Abhängigkeit der Proteinbindung von der Plasmakonzentration festgestellt werden (Spearman $r = -0,078$ und $p = 0,6851$). Für den Vergleich der Proteinbindung von Ketodoxapram wurde neben den Werten nach 3 h noch die Werte der Proben nach 15 min und 60 min hinzugezogen.

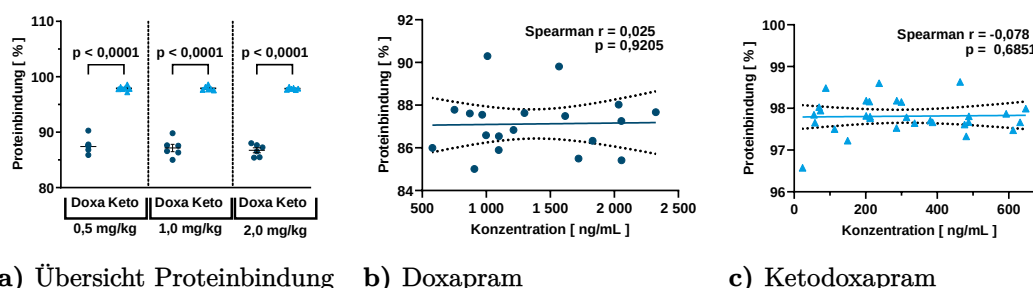


Abbildung 3.28.: Vergleich der Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram nach zweimaliger *i.v.* Applikation von 0,5 mg/kg (Kohorte I), 1,0 mg/kg (Kohorte II) und 2,0 mg/kg Doxapram (Kohorte III) in den Blutproben der Teilnehmer der DOCTOS-Studie ($n = 6-7$; a). Die Bestimmung der Proteinbindung erfolgte mit dem RED-System in Plasmaproben die 5 min (Kohorte I), 15 min (Kohorte II) und 60 min (Kohorte III) nach Applikation abgenommen worden waren für die Proteinbindung von Doxapram und 3 h nach Applikation für die Bestimmung der Bindung von Ketodoxapram. Die Datenpunkte für Doxapram werden mit dunkelblauen Kreisen und die für Ketodoxapram mit hellblauen Dreiecken dargestellt und es werden die einzelnen Datenpunkte zusammen mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts gezeigt. Die p-Werte wurden mit einer einseitigen ANOVA berechnet, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Für die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Doxapram wurden die oben genannten Proben gegen die Proteinbindung aufgetragen ($n = 19$; b). Für Ketodoxapram wurden zusätzlich zu den 3 h Werten noch die nach 15 min und 60 min hinzugenommen, die bereits für Doxapram vermessen worden waren ($n = 30$; c). Gezeigt ist eine lineare Regression mit 95 % Konfidenzintervall. Angegeben ist der Korrelationskoeffizienten der Spearman-Rangordnung (r) und der dazugehörige p-Wert (p).

DOCTOS: Doxapram Konversion in Sinusrhythmus Studie; Doxa: Doxapram; Keto: Ketodoxapram; *i.v.*: intravenös; RED: schnelle Gleichgewichtsdialyse

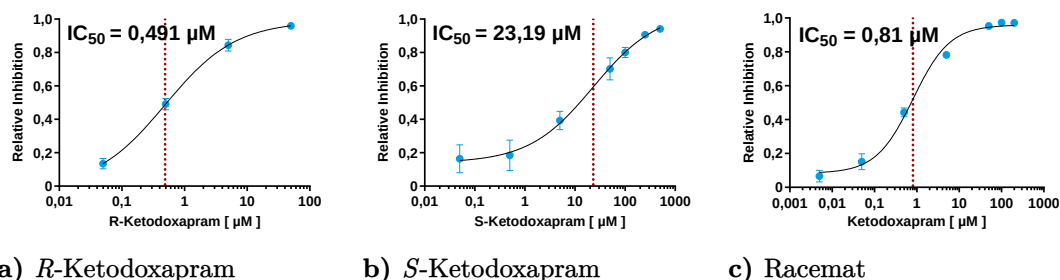


Abbildung 3.29.: Inhibitorischer Effekt der Ketodoxapram Enantiomere auf hTASK-1 im Vergleich zum Racemat. Der TASK-1-Kanal wurde heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit der TEVC vermessen. Hierfür wurden die Zellen auf -80 mV geklemmt und Spannungspulse von 500 ms Länge appliziert. Die Spannung begann bei -140 mV und wurde von Puls zu Puls um 20 mV größer bis eine Spannung von 60 mV erreicht worden war. Die Werte sind gezeigt als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts und die gestrichelte rote Linie stellt den IC_{50} -Wert dar.

IC_{50} : halbmaximale inhibitorische Konzentration; TEVC: Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

3.2.11. Unterschiedliche Effekte der beiden Enantiomere von Ketodoxapram

Zum Abschluss dieses Projektstrangs im Rahmen der vorliegenden Arbeit und als Ausblick auf weitere Forschungsprojekte in diesem Gebiet, wurde sich die Chiralität von Ketodoxapram genauer angeschaut. Einleitend (siehe Abschnitt 1.4.3) wurde bereits auf die unterschiedlichen Effekte eingegangen, die Enantiomere einer Substanz haben können. Hier wurde bereits erwähnt, dass die Enantiomere von Doxapram bereits untersucht wurden und unterschiedliche Wirkungsweisen im Tierversuch und in *in vitro* Modellen zeigten. Diese Daten dienten als Grundlage für die Untersuchung der beiden Ketodoxapram Enantiomere. Erste *in vitro* Experimente in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten, dass die Inhibition von *R*-Ketodoxapram mit einem IC_{50} -Wert von $0,491 \mu\text{M}$ (Abbildung 3.29a) über 47-fach niedriger ist als der Wert von *S*-Ketodoxapram ($23,19 \mu\text{M}$; Abbildung 3.29b). Im Vergleich zum Racemat (Abbildung 3.29c) zeigt sich somit für *S*-Ketodoxapram ein fast 30-fach höhere IC_{50} -Wert und für *R*-Ketodoxapram ein um den Faktor 1,6 kleinerer Wert.

4. Diskussion

4.1. Regulation der Expression des TASK-1-Kanals

Im ersten Teil dieser Arbeit war das Ziel, weitere Erkenntnisse über den Mechanismus zu erhalten, der für die bereits beschriebene Hochregulation der TASK-1-Expression in Patienten mit VHF verantwortlich ist. Hierfür wurde der Einfluss von miRNAs auf die TASK-1-Expression untersucht, um herauszufinden, ob eine direkte Regulation auf mRNA-Ebene statt findet und dadurch die TASK-1-Proteinkonzentration verändert wird. Hierbei konnten miRNAs identifiziert werden, die sehr häufig im Vorhofgewebe exprimiert sind und deren Expression stark vom Rhythmusstatus des Patienten abhängt. Diese Kandidaten wurden anhand einer möglichen Assoziation mit der TASK-1-Expression weiter stratifiziert. Mit miRNA-34a konnte eine miRNA identifiziert werden, die auch auf funktioneller Ebene in zellulär-elektrophysiologischen Experimenten eine Beeinflussung des TASK-1-Kanals zeigte. Des Weiteren konnten Cluster aus miRNAs und klinischen Parametern identifiziert werden, die einen Zusammenhang zur Myokarddilatation zeigten.

4.1.1. TASK-1-Regulation durch miRNA-34a

Die Untersuchungen der Expression der miRNAs zeigen, dass vor allem die miRNAs, für die bereits eine bekannte Assoziation mit VHF beschrieben wurde, am stärksten exprimiert waren. Insgesamt erstreckten sich die Expressionsspiegel über fünf Log-Stufen, wodurch die häufigste miRNA, miRNA-133a, ungefähr 10 000-fach höhere Spiegel hatte als miRNA-449a, die am geringsten exprimiert wurde. Die Ergebnisse stimmen mit den bereits publizierten Expressionsdaten überein, die miRNA-1 und miRNA-133 als am häufigsten exprimiert im Herzmuskel beschreiben (Wang et al. 2008b). Auch miRNA-125b, miRNA-26a und weitere als stark exprimiert gemessenen miRNAs wurden schon in der Literatur als solche beschrieben (Lagos-Quintana et al. 2002; Ji et al. 2007). Dies spricht dafür, dass das miRNA-Profil des verwendeten Patientenkollektiv mit den bereits publizierten Daten übereinstimmt.

Bei der Stratifizierung der Expressionsdaten nach Rhythmusstatus und dem Vergleich mit der Expression bei Patienten im SR zeigten sich unter paroxysmalem und chronischem VHF verschiedene miRNAs unterschiedlich exprimiert. Während miRNA-23a, miRNA-124 und miRNA-34a in den Proben mit paroxysmalem VHF im Vergleich zu SR noch nicht hochreguliert waren, zeigte sich im Vergleich zum chronischem VHF eine deutliche Hochregulation. Dies könnte dafür sprechen, dass die miRNAs an Umbauprozessen beteiligt sind, die erst mit längerer VHF Dauer einsetzen und somit später zu einer

erhöhten Expression führen. Analog verhält es sich wahrscheinlich im Fall von miRNA-338, für die unter paroxysmalem VHF noch keine veränderte Regulation im Vergleich zu SR zu erkennen war, die jedoch unter chronischem VHF deutlich herunterreguliert war.

Für miRNA-1, miRNA-26a und miRNA-133 ist in der Literatur eine Herunterregulation beschrieben (Wang et al. 2011; Girmatsion et al. 2009; Lu et al. 2015), die sich in den hier gezeigten Daten jedoch nicht erkennen lässt. Während unter paroxysmalem VHF ein leichter Trend zu einer Hochregulation für miRNA-1 und miRNA-133 zu sehen ist, gibt es unter chronischem VHF keinen Effekt. Für miRNA-26a ist jedoch auch hier eine minimale Herunterregulation zu erkennen, die mit der Literatur übereinstimmt. Und auch die beobachtete Hochregulation von miRNA-21 unter VHF ist in der Literatur beschrieben (Adam et al. 2012). Die Unterschiede in der Regulation zwischen den Daten aus der Literatur und den hier beobachteten Effekten können verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurden in den Studien teilweise linke Herzohrproben verwendet (Girmatsion et al. 2009; Lu et al. 2015), während die hier gezeigten Daten auf rechten Herzohrproben beruhen. Auf Grund der gewebespezifischen Expression der miRNAs kann es hierdurch zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von verschiedenen VHF-Entitäten, die mit unterschiedlichen Umbauprozessen einhergehen, somit sind auch verschiedene Begleiterkrankungen und Pathologien des VHF eine mögliche Ursache.

Vergleicht man die fünf miRNAs, die auf Grund ihrer Häufigkeit und unterschiedlichen Regulation im Vergleich mit SR als weitere Kandidaten ausgewählt wurden und noch nicht im Zusammenhang mit der Pathologie von VHF beschrieben worden waren, mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Daten (siehe Tabelle 4.1), so zeigt sich, dass diese Daten nur teilweise mit den hier gezeigten übereinstimmen. Während die beschriebene Hochregulation von miRNA-34a und miRNA-23a auch hier zu sehen ist, konnte die beschriebene Hochregulation von miRNA-9 und miRNA-28 nicht bestätigt werden, da stattdessen eine Herunterregulation zu beobachten war. Die unterschiedlichen Angaben zu miRNA-23a lassen sich zum einen durch die unterschiedlichen Probenmatrices (Gewebe vs. Blut) und zum anderen durch verschiedene VHF-Entitäten (chronisches VHF vs. postoperatives VHF) erklären. Die Expressionsdaten zu den Gewebeproben stimmen daher überein und nur die Daten bei postoperativen VHF unterscheiden sich, welches eine andere Entität hat.

Bei weiteren Untersuchungen der miRNAs, für die eine Interaktion mit der TASK-1 mRNA prognostiziert worden war, zeigte sich für miRNA-23a, miRNA-34a und miRNA-124 eine positive Korrelation und für miRNA-9 und miRNA-28 eine negative. In der Einleitung wurde bereits genauer auf die Funktionsweise der miRNAs eingegangen (vgl. Abschnitt 1.3.2). Hierbei zeigte sich, dass eine negative Korrelation plausibel und wahrscheinlich ist, da eine Bindung der miRNA zur Ziel-mRNA die Translation unterdrücken oder sogar die mRNA abbauen kann und somit zu einer verringerten Proteinexpression führt. Eine positive Korrelation wurde ebenfalls bereits in der Einleitung erwähnt und ist daher auch nicht auszuschließen. Dies kann zum einen auf regulatorischen Netzwerken mit Rückkopplungsmechanismen beruhen. Durch externe Faktoren kann es zu einer

Tabelle 4.1.: Bereits publizierte Literaturdaten über die fünf ausgewählten miRNA-Kandidaten für eine weitere Untersuchung bezüglich einer Regulation von TASK-1 im Zusammenhang mit VHF.

Tabelle modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

miRNA	Zielstruktur	Regulation	Patienten	Referenz
miRNA-9	Unbekannt	Hoch	VHF	Lu et al. (2015)
	Unbekannt	Hoch	VHF	Liu et al. (2016)
miRNA-23a	Unbekannt	Herunter	POAF	Feldman et al. (2017)
	Unbekannt	Hoch	VHF	Slagsvold et al. (2014)
miRNA-28	Unbekannt	Hoch	VHF	McManus et al. (2014)
miRNA-34a	AnK-B	Hoch	VHF	Zhu et al. (2018)
miRNA-124		keine Studien verfügbar		

vermehrten Expression einer mRNA kommen, die in einem negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer gesteigerten miRNA-Expression führt, um die mRNA-Konzentration und somit die Genexpression zu verringern. Hierbei würde es zu gesteigerten mRNA- und miRNA-Spiegeln, also einer positiven Korrelation, kommen (Sun et al. 2012; Inui et al. 2010; Martinez et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass mRNA und miRNA durch die gleichen Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden oder Bestandteil der selben transkriptionellen Einheit sind (Nunez et al. 2013; Sun et al. 2012; Martinez et al. 2008). Darüber hinaus wurde auch ein Mechanismus beschrieben, bei dem es durch die bindenden miRNAs zur Rekrutierung und Anlagerung eines Komplexes kommt, der die Translation aktiviert (Vasudevan et al. 2007; Vasudevan 2012).

Die Transfektion der IPS-Zellen mit den miRNA-Inhibitoren und -Imitatoren und anschließender Analyse mittels qPCR und WB führte zu einigen signifikanten Ergebnissen. Für die Inhibitoren von miRNA-23a, miRNA-34a und miRNA-124, jenen miRNAs die positiv mit TASK-1 korreliert sind, zeigte sich ein verminderter TASK-1-Proteinspiegel. Dies lässt sich durch das Ausbleiben des expressionsfördernden Effekt dieser miRNAs erklären. Während für miRNA-23a und miRNA-124 nur auf Proteinebene ein Effekt sichtbar war, zeigte sich für miRNA-34a auch eine reduzierte mRNA-Expression. Eine Ursache hierfür könnte der zeitliche Abstand zwischen Proteine- sowie mRNA-Isolation und der Transfektion sein. Eventuell wurde ein Zeitpunkt getroffen, zu dem die abgebaute mRNA bereits wieder neu synthetisiert worden ist, die Synthese der Proteine jedoch noch andauert und die Proteinkonzentration daher noch nicht wieder normalisiert wurde. Somit würde die Quantifizierung zu normalen mRNA-Spiegel bei verminderter Proteinkonzentration führen. Eine weitere Möglichkeit sind Rückkopplungsschleifen, bei denen verminderte Proteinkonzentrationen zu einer vermehrten mRNA-Synthese führen (Krishna et al. 2006; Mitrophanov und Groisman 2008).

Im Gegensatz zu den Inhibitoren zeigten die Imitatoren keine eindeutigen Ergebnisse bzw. nur sehr geringe Effekte. Auf Ebene der Proteinexpression konnten keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden, lediglich ein Trend hin zu einer vermehrten Expression konnte für miRNA-124 ausgemacht werden, während miRNA-23a und miRNA-34a norma-

le Werte im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Auf mRNA-Ebene zeigte sich für miRNA-124 eine normale Expression und für miRNA-23a und miRNA-34a eine verringerte. Die reduzierten mRNA-Konzentration unter der Behandlung mit den Imitatoren lässt sich nicht ohne weiteres erklären. Eventuell liegt auch hier ein Regelkreis zu Grunde, der bei stark erhöhten miRNA-Konzentrationen zu einer reduzierten Expression führt.

In der Literatur wurde bereits ein regulatorischer Einfluss von miRNA-124 und miRNA-34a auf die TASK-1-Expression beschrieben. Allerdings erfolgten diese Beobachtungen in Zellen, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) infiziert waren (Farberov et al. 2015). In dieser speziellen Situation wurde eine verminderte Expression von TASK-1 durch miRNA-124 und miRNA-34a beschrieben. Obwohl diese Beobachtungen im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten stehen, kann dies wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Umstände aufgeklärt werden. Eingangs wurde bereits ausführlich beschrieben, dass das regulatorische Netzwerk, bestehend aus mRNA und miRNA, hoch komplex und damit auch anfällig für äußere Einflüsse ist. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Infektion mit HIV-1 dieses System dermaßen beeinflusst, dass die Ergebnisse nicht mit den Beobachtungen in Zellen ohne Infektion zu vergleichen sind. Dafür spricht auch, dass menschliche pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (HPASMC), die mit einem Imitator von miRNA-34a transfiziert wurden, eine erhöhte TASK-1-Expression aufweisen (Wang et al. 2016). Diese Ergebnisse bestätigen somit die hier gemachten Beobachtungen.

Bei den negativ korrelierten miRNAs zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse. Während eine Transfektion mit Inhibitoren von miRNA-9 und miRNA-28 auf mRNA-Ebene zu keiner Regulation führte, zeigte sich immerhin für miRNA-9 eine signifikant niedrigere Expression auf Proteinebene. Im Gegensatz dazu war unter miRNA-9-Imitator eine Reduktion der mRNA aber ein Trend zu einer vermehrten Proteinexpression zu sehen, während miRNA-28 auch bei den Imitatoren keinen Effekt zeigte. Die beobachteten Effekte sind ungewöhnlich für miRNAs, die negativ korreliert sind, da eine Hochregulation der miRNA zu einer verminderten Expression des Proteins führen sollte. Aus diesem Grund ist eine Regulation der TASK-1-Expression durch miRNA-9 oder miRNA-28 auf Grundlage der vorliegenden Daten als nicht wahrscheinlich anzusehen.

Zur weiteren Validierung der bisherigen Beobachtungen von einer veränderten Expression im Vergleich zwischen SR und VHF, einer Korrelation von miRNA und TASK-1 mRNA und den daraus resultierenden Einflüssen auf TASK-1 mRNA-Konzentration und Proteinexpression, wurden elektrophysiologische Experimente mit den Kandidaten miRNAs durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Ko-Injektion und damit die gemeinsame Expression von miRNA-34a-Imitator und TASK-1 mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten zu einem erhöhten TASK-1-Strom führte. Diese Messungen bestätigen die zuvor beschriebene vermehrte TASK-1-Expression durch miRNA-34a. Die ebenfalls beobachtete Reduktion des RMP durch miRNA-34a-Imitator und die Erhöhung dieses durch den entsprechenden Inhibitor sind konsistent mit früheren Studien, die eine Destabilisierung des RMP nach Ausschaltung von TASK-1 beschrieben haben (Olschewski et al. 2006). Zusammengekommen zeigen die hier besprochenen Daten eine mögliche positive Regulation von TASK-1 durch die miRNA-34a.

4.1.2. miRNA-34a als Biomarker für Vorhofflimmern

In einem kleinen Teil des Patientenkollektiv, bei dem Blutproben vorhanden waren, wurde die im Blut zirkulierende miRNA-34a quantifiziert und es zeigte sich eine signifikante Hochregulation dieser in den peripheren Blutproben. Der Sachverhalt war jedoch nur für die Patienten im paroxysmalem VHF signifikant und bei chronischem VHF zeigte sich nur ein Trend zu einer vermehrten Expression. Aus diesem Grund werden weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven benötigt, um beurteilen zu können, ob die zirkulierende miRNA-34a aus dem Vorhofgewebe stammt und daher als Biomarker für atriale Kardiomyopathie geeignet ist.

Veränderungen in der Konzentration an zirkulierender miRNA-34a wurden jedoch bereits schon im Zusammenhang mit einer Reihe von verschiedenen Krankheiten beschrieben. Hierbei seien Krebserkrankungen wie Ewing-Sarkom, akute myeloische Leukämie, Prostatakrebs und Brustkrebs zu nennen, aber auch Alzheimer oder koronare Herzkrankheiten (Sciandra et al. 2020; Kassem et al. 2019; Huang et al. 2018; Corcoran et al. 2014; Han et al. 2015; Cosín-Tomás et al. 2017). Aus diesem Grund könnte die diagnostische Aussagekraft der zirkulierenden miRNA-34a als Marker zur Erkennung von atrialer Kardiomyopathie eingeschränkt sein.

4.1.3. miRNAs sind assoziiert mit Myokarddilatation

Im Rahmen der Studie wurden einige miRNAs identifiziert, die unter VHF im Vergleich zu SR unterschiedlich exprimiert sind. Bereits in früheren Studien war eine verminderte Expression von miRNA-9 mit kardialer Fibrose und Hypertrophie assoziiert, die beide eine Rolle bei kardialen Umbauprozessen im Zusammenhang mit VHF spielen (Jin et al. 2019; Wang et al. 2010). Auch miRNA-23a wurde als Hypertrophie fördernd identifiziert und wird durch den Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen zytoplasmatisch 3 (NFATc3) reguliert (Lin et al. 2009). Ebenso wurde für miRNA-34a eine mögliche Rolle bei den frühen elektrophysiologischen Umbauprozessen unter VHF postuliert, die über eine Regulation von Ankyrin-B abläuft (Zhu et al. 2018). Darüber hinaus wurde für miRNA-34a beschrieben, dass sie im alternden Herzen vermehrt gebildet wird und zu einer Verschlechterung der kardialen Kontraktilität führt, indem sie Antwortreaktionen auf DNA Schädigungen auslöst und zu Telomerverschleiß führt (Boon et al. 2013). In Anbetracht der Tatsache, dass VHF eine Erkrankung ist, die mit steigendem Alter zunimmt, könnte es gut sein, dass die Hochregulation von miRNA-34a eine Rolle in der Pathologie von VHF spielt.

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen der Expression von miRNAs und klinischen Patientencharakteristiken wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt, die eine Vielzahl von Korrelation zwischen der miRNA-Expression und verschiedenen klinischen Parametern aufzeigte. Interessanterweise bildeten die Parameter LA Durchmesser, LV ESD, LV EDD, VHF-Status und die Expression von TASK-1 sowie COL1A2 in den Herzhörproben ein Cluster mit einer Gruppe von miRNAs. Dieses Cluster weist auf pathophysiologische Prozesse hin, die mit Dilatation und Fibrose assoziiert und eng mit VHF verbunden sind. Bereits zuvor wurde LV ESD und LV EDD sowie LA Durchmesser

als zuverlässige Prädiktoren von VHF identifiziert (Schmidt et al. 2021). In der Zukunft könnte die Analyse von Transkriptionsmodulen, die mit diesen miRNAs assoziiert sind, unterschiedliche Faktoren aufweisen, die mit der molekularen Pathologie von VHF im Verbindung stehen. Bereits jetzt konnte der bekannte Zusammenhang zwischen miRNA-21, miRNA-29b und miRNA-34a bestätigt werden und eine neue Assoziation von miRNA-9, miRNA-23a und miRNA-485 enthüllt werden.

Die Analyse der miRNA-Expression zeigte einen Zusammenhang zwischen VHF-Status, der Expression von TASK-1 und COL1A2, einem Marker für Gewebsfibrose, und Parametern für Myokarddilatation, wie LA Durchmesser, LV ESD und LV EDD. Dieser rein auf der experimentellen Messung der miRNA-Expression beruhende Zusammenhang ist aus pathophysiologischen Gesichtspunkten als nicht unwahrscheinlich einzustufen. Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen in der Expression von miRNAs in Zusammenhang stehen mit der fortschreitenden Pathophysiologie von Herzmuskelbelastung, Dilatation, Gewebsfibrose und dem Auftreten von VHF. Die funktionellen Zusammenhänge zwischen miRNAs und zellulären Abläufen während des Zellwachstums, bei Entzündungsprozessen und der Zelldifferenzierung sind bereits gut beschrieben. Aus diesem Grund ist ein tieferes Verständnis über den Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und klinischen Einflussfaktoren der atrialen Kardiomyopathie erforderlich, um die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen mit diesen in Verbindung zu bringen und um anschließend mit Modulatoren der betroffenen zellulären Signalwege eine Beeinflussung zu erreichen.

4.1.4. Limitationen der Studie

Die Ergebnisse der Studie unterliegen Limitation, die hier nicht unerwähnt bleiben sollen. Die Probenanzahl der Studie war auf Grund der eingeschränkten Verfügbarkeit von humanen Gewebeproben begrenzt. Obwohl diese Studie mit ihren 61 eingeschlossenen Patienten im Vergleich zu anderen Studien, die Veränderungen in der miRNA-Expression unter VHF untersuchten, ein großes Kollektiv enthält, würde eine noch größere Anzahl an Proben dafür sorgen, dass Assoziationen zwischen einzelnen klinischen Parametern und der Expression von miRNAs mit einer höheren statistischen Signifikanz erkannt werden können.

Eine weitere Einschränkung ist, dass auf Grund des Verfahrens zur Probengewinnung nur Gewebeproben des rechten Herzhohrs verfügbar waren. Aus diesem Grund können mögliche signifikante Unterschiede zwischen Herzhohr, restlichen rechtsatrialen Gewebe und dem LA nicht untersucht werden. Die Erkenntnisse sind daher auf das rechte Herzhohr beschränkt. Eine weitere Einschränkung im Bezug auf die Probenakquise ist, dass es keine komplett gesunde Kontrollgruppe gibt. Alle Proben sind von Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen haben und daher unter Herzerkrankungen leiden.

Ein Teil der untersuchten miRNAs wurde eingeschlossen auf Grund der bereits beschriebenen Assoziation mit atrialer Kardiomyopathie. Hierbei handelte es sich um miRNA-1, miRNA-21, miRNA-26a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-31 und miRNA-133a. Es könnte daher sein, dass Korrelationen zwischen miRNA-Spiegel und TASK-1-Expression rein auf eine gemeinsame Assoziation mit VHF zurückzuführen sind.

Weiterhin muss beachtet werden, dass obwohl miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren prinzipiell durchaus geeignet sind, um den Effekt von miRNAs auf bestimmte Zielgene zu untersuchen, sollten die Ergebnisse dennoch mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden. Die transiente Transfektion von Zellen mit Imitatoren und Inhibitoren von miRNAs kann zu unspezifischen Effekten führen. Abschließend kann es sein, dass die Imitatoren und Inhibitoren in die Zelle aufgenommen werden, dort aber in intrazellulären Vesikeln verbleiben und nicht für die Bildung des RISC zur Verfügung stehen. Somit wird kein funktionsfähiger Komplex gebildet und die Regulation von mRNAs bleibt aus (Søskilde et al. 2015; Thomson et al. 2013).

4.2. Modulation des TASK-1-Kanals durch pharmazeutische Wirkstoffe

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Doxapram sowie seinem Metaboliten Ketodoxapram. Der Metabolit wurde mit seiner Muttersubstanz auf einer elektrophysiologischen und pharmakologischen Ebene verglichen, um die Frage zu klären, ob Ketodoxapram eine mögliche Therapieoption für die Behandlung von VHF darstellt. Hierbei zeigte sich, dass Doxapram und Ketodoxapram über weite Teile der Experimente sehr ähnliche Effekte verursachten. Für beide Substanzen war eine selektive und starke Inhibition des TASK-1-Kanals gezeigt worden, sowie sehr ähnliche pharmakokinetische Parameter im Schwein. Auch der Effekt auf den PA-Druck unterschied sich nicht wesentlich. Erste Experimente im Schweinmodell für VHF lieferten vielversprechende Ergebnisse für eine mögliche Therapie mit Ketodoxapram. Die Anwendung von Doxapram wird aktuell in der laufenden DOCTOS-Studie getestet, aus der hier exemplarisch erste Patientenproben analysiert wurden. Den Abschluss des zweiten Teils der Arbeit bildet einen Ausblick auf geplante weitere Experimente in Richtung des Effekts der beiden Enantiomere von Ketodoxapram.

4.2.1. Doxapram und Ketodoxapram inhibieren selektiv TASK-1 und TASK-3

Die Untersuchung des Einflusses von Doxapram und Ketodoxapram auf den humanen TASK-1 in *Xenopus laevis* Oozyten zeigte eine Inhibition im niedrigen μM -Bereich. Diese Ergebnisse werden durch Cunningham et al. (2019) bestätigt, der einen IC_{50} -Wert in humanen Nierenzellen (tsA201) von $4,0 \mu\text{M}$ mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gemessen hat. Ähnliche inhibitorische Effekte (IC_{50} : $0,41 \mu\text{M}$; gemessen in Oozyten) waren zuvor bereits für den TASK-1 von Ratten publiziert worden (Cotten et al. 2006). Auch für den humanen TASK-3 wurde eine Inhibition im niedrigen μM -Bereich gemessen, die jedoch sowohl bei Doxapram als auch bei Ketodoxapram etwas schwächer ausfällt im Vergleich zu TASK-1. Diese Messungen werden ebenfalls durch Cunningham et al. (2019) in tsA201-Zellen bestätigt, wobei eine IC_{50} von $2,5 \mu\text{M}$ gemessen wurde. Hierbei fällt auf, dass bei den Oozyten Messungen im Rahmen dieser Arbeit eine signifikant höhere Inhibition von TASK-1 im Vergleich zu TASK-3 beobachtet wurde, die in den tsA201-Zellen nicht

bestätigt werden konnte. Bei Messungen am TASK-3 von Ratten konnte eine IC_{50} von $37 \mu M$ bestimmt werden, die sowohl deutlich größer ist als der Wert für den TASK-1 von Ratten, aber auch als für die humanen Kanäle (Cotten et al. 2006). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine in etwa gleichstark ausgeprägte Inhibition des humanen TASK-1 und TASK-3 hin, wobei in Ratten eine deutlich schwächere Inhibition von TASK-3 zu beobachten ist. Diese Unterschiede in der Blockade beider Kanäle könnten die teilweise kontroversen Ergebnisse in Studien zu TASK-1/TASK-3 zwischen Menschen und Ratten erklären.

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte von Doxapram und Ketodoxapram auf den porzinen TASK-1 zeigte, dass diese zwischen den Werten für humanen TASK-1 und TASK-3 liegen, insgesamt jedoch sehr ähnlich sind. Dies deutet darauf hin, dass der humane und porzine TASK-1 sich in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, zumindest die Bindungsstelle der Inhibitoren konserviert ist. Vergleicht man die Struktur der beiden Kanäle miteinander, so stellt man eine hohe Homologie ($>95,4\%$) zwischen humanen und porzinen TASK-1 fest (Schmidt et al. 2014). Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass die im Schwein bestimmten wirksamen Plasmaspiegel einen ähnlichen Effekt im Menschen zeigen könnten, da in etwa gleiche Konzentrationen zur Inhibition der zwei Kanalvarianten benötigt werden. Somit wird einmal mehr bestätigt, dass das VHF-Modell im Schwein eine gute Grundlage für die translativ-forschung bildet.

Der inhibitorische Effekt von Ketodoxapram übersteigt den von Doxapram in allen drei untersuchten Kanälen. Dies spricht dafür, dass eine niedrigere Ketodoxapram Dosis benötigt wird, um vergleichbare Effekte zu erzielen. Somit kann möglicherweise das Auftreten von Nebenwirkungen reduziert werden. Jedoch könnte je nach Mechanismus der Entstehung der Nebenwirkungen die stärkere Potenz von Ketodoxapram auch zu stärkeren Nebenwirkungen bei niedrigeren Dosierungen führen, vor allem dann, falls diese auf einer Hemmung von TASK-1 bzw. TASK-3 in extrakardialen Gewebe beruht. Des Weiteren hängt die Dosierung noch von anderen Faktoren ab, so dass die wirksame Dosierung nicht rein durch einen Vergleich der IC_{50} -Werte bestimmt werden kann und erst noch durch tierexperimentelle und klinische Studien bestimmt werden muss.

Bei einer Betrachtung der Effekte von Ketodoxapram und Doxapram fällt auf, dass beide relativ selektiv TASK-1 und TASK-3 inhibieren und keine nennenswerten Effekte auf die anderen untersuchten Kanäle aufweisen. Hierbei sind — mit Ausnahme der sehr geringen Effekte auf $K_{2P13.1}$, $K_{2P16.1}$ und $K_v4.3$ und der bereits beschriebenen auf TASK-1 und TASK-3 — keine Unterschiede zwischen Doxapram und Ketodoxapram zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass die Oxidierung des Morpholin-Rings Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Inhibitors an genannte Kanäle hat und zu einer höheren Inhibition führt.

Die beobachtete Inhibition von sowohl TASK-1 als auch TASK-3 lässt sich dadurch erklären, dass ungefähr 60% der Aminosäuresequenz beider Kanäle identisch ist und bereits für andere Substanzen ähnliches beschrieben wurde (Cotten et al. 2006; Talley und Bayliss 2002). Unter einer Therapie von Doxapram bzw. Ketodoxapram ist dennoch

nicht mit kardialen Nebenwirkungen auf Grund einer TASK-3-Blockade zu rechnen, da Analysen der Expression gezeigt haben, dass TASK-3 im Herzen nicht exprimiert wird (Schmidt et al. 2015; Wiedmann et al. 2018). Nebenwirkungen durch eine extrakardiale Inhibition von TASK-1 sowie TASK-3 können jedoch nicht ausgeschlossen werden und sind bei einer möglichen Therapie zu berücksichtigen.

Die Patch-Clamp-Messungen an atrialen HCM zeigten, dass Patienten mit VHF erhöhte Doxapram und Ketodoxapram sensitive Ströme haben, die sehr wahrscheinlich fast ausschließlich dem TASK-1-Strom entsprechen. Dies bestätigt bereits gemachte Beobachtungen über die unterschiedliche Expression von TASK-1 in SR- und VHF-Patienten (Schmidt et al. 2015; Schmidt et al. 2017). Darüber hinaus ist eine Reduktion des gesamten Kaliumstroms von bis zu 15,1 % durch Doxapram und 31,5 % durch Ketodoxapram in VHF-Patienten zu sehen gewesen. Dies deutet darauf hin, dass der repolarisierenden Strom vermindert ist und es zu einer Verlängerung der APD kommt. Dieser Effekt auf die APD konnte bereits für den TASK-1-Inhibitor A293 gezeigt werden, unter dessen Anwendung die APD₉₀ um etwa 60 % in VHF-Patienten verlängert wurde (Schmidt et al. 2015).

Zusammenfassend zeigen die Daten der zellulär-elektrophysiologischen Messungen, dass die Effekte von Ketodoxapram denen seiner Muttersubstanz Doxapram in weiten Teilen entspricht und teilweise sogar überlegen ist. Diese Ergebnisse bildeten somit die Grundlage für weitere Untersuchungen von Ketodoxapram.

4.2.2. Zuverlässige Konzentrationsbestimmung in Plasma und Gewebe

Die entwickelte und validierte Methode zur simultanen Bestimmung von Doxapram und Ketodoxapram im Blutplasma von Schweinen und Menschen sowie im porzinen Gehirngewebe erfüllte alle Anforderung die FDA und EMA an die Entwicklung bioanalytischer Methoden stellen (FDA 2018; EMA 2011). Die chromatografische Auftrennung war in der Lage, scharf getrennte Peaks für Doxapram und Ketodoxapram zu erzeugen, die Überprüfung des Matrixeffekts und der Wiederfindungsrate lieferten zufriedenstellende Ergebnisse und auch die Richtigkeit und Präzision waren für alle untersuchten QC-Konzentrationen sowie der LLOQ innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen. Während die Struktur des Fragmentes zur Bestimmung von Doxapram durch Ma et al. (2011) sowie Messungen an einem hochauflösenden Massenspektrometer bestätigt werden konnte, erfordert die Struktur des Fragmentes von Ketodoxapram weitere Untersuchungen. Das abgebildete Fragment beruht auf Messungen der Substanz an einem hochauflösenden Massenspektrometer und anschließender Bestimmung der wahrscheinlichen Summenformel über die exakte Masse. Anschließend wurde anhand der Summenformel und möglicher Fragmentierungsmechanismen die angegebene Strukturformel entwickelt. Zur endgültigen Klärung der Struktur sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich, so dass das angegebene Fragment nur als Vorschlag anzusehen ist und durch eventuelle Umlagerungsprozesse während der Fragmentierung eine andere Struktur haben könnte.

Bei den Untersuchungen der Stabilität zeigte sich, dass die Proben sowohl bei Raumtemperatur als auch im automatischen Probenzufuhrsystem bei 15 °C und während einer Langzeitlagerung bei -20 °C die geforderten Kriterien erfüllten. Obwohl die Langzeitlage-

rung der Schweineplasmaproben nur für einen Zeitraum von 16 d getestet wurde, wurden die Humanplasmaproben für 4 Wochen gelagert, ohne dass sich Stabilitätsprobleme zeigten. Suzuki et al. (2017) konnte ebenfalls eine ausreichende Stabilität über 4 Wochen im humanem Serum nachweisen und Komatsu et al. (2005) konnte sogar eine Stabilität über 2 Monate in humanen Plasma zeigen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Humanproben mindestens für 2 Monate bei -20°C gelagert werden können, ohne dass es zu negativen Auswirkungen auf die Messung kommt. Obwohl die Untersuchungen über den längeren Zeitraum von 2 Monate nicht auf Schweineplasmaproben beruhten, kann auf Basis der vorliegenden Daten auch hier davon ausgegangen werden, dass diese über den genannten Zeitraum stabil sind. Auch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen hatten keinen negativen Effekt auf die Plasmaproben von Schwein und Mensch sowie die Gehirngewebeproben. Das selbe konnte bereits für humane Serumproben gezeigt werden (Suzuki et al. 2017).

Die Überprüfung der Lagerung im automatischen Probenzufuhrsystem zeigte eine Stabilität über mindestens 24 h für Doxapram sowie Ketodoxapram im Human- und Schweineplasma sowie Gehirngewebe. Untersuchungen von Suzuki et al. (2017) konnten eine Stabilität bei 10°C über 48 h im humanen Serum und Flint et al. (2018) bei 15°C über mindestens 120 h für Doxapram und 48°C für Ketodoxapram im humanen Plasma nachweisen. Auch die wärmeren Bedingungen, während der Probenextraktion bei Raumtemperatur, führten über 24 h zu keiner Beeinträchtigung der getesteten Blutplasmaproben. Dies stimmt überein mit der bereits gezeigten Stabilität für 4 h bei Raumtemperatur von humanen Serumproben (Suzuki et al. 2017). Darüber hinaus konnten Suzuki et al. (2017) zeigen, dass humane Serumproben bei 4°C für 4 Wochen stabil waren. Die Langzeitlagerung und die Lagerung bei Raumtemperatur wurden für die Gehirngewebeproben nicht überprüft, anhand der Daten für die Plasmaproben kann jedoch von einer ausreichenden Stabilität auch für die Gewebeproben ausgegangen werden.

Die erneute Analyse bereits vermessener Proben zeigte, dass auch hier die Vorgaben für Human- und Schweineplasma sowie für Gehirngewebe erfüllt wurden. Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen, dass ein Unterschied in Leer- und Probenmatrix keinen Einfluss auf die Quantifizierung der Proben hat. Die Vermessung der humanen Lithium-Heparin-Plasmaproben mit Kalibratoren in Lithium-Heparin-Plasma-Leermatrix zeigte im Vergleich zur Quantifizierung mit Citratplasma-Leermatrix keine Abweichung außerhalb der zugelassenen Grenzen. Weitere Untersuchungen mit Kalibratoren und QC-Proben in unterschiedlichen Matrices zeigten ebenfalls keine Abweichungen. Zusammengefasst sprechen diese Daten für die Robustheit der Methode und ermöglichen eine Vermessung von verschiedenen Probenmatrices in einer gemeinsamen Messreihe. Auch ist eine zuverlässige Quantifizierung durch Umsteigen auf eine andere Leermatrix ohne Einschränkungen möglich, falls die Verfügbarkeit der passenden Leermatrix nicht weiter gegeben ist.

In den letzten 45 Jahren wurden bereits eine Vielzahl von Methoden zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram in Serum und Plasma publiziert, die eine große Bandbreite von verschiedenen Techniken und Gerätschaften verwendeten. Ein Überblick

über alle bisher publizierten Methoden bietet Tabelle 4.2. Für die Bestimmung der beiden Substanzen in Gewebe jedweder Art ist die hierin beschrieben, die erste vollständig validierte. Auch für die Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram in Plasma- und Serumproben ist die hier entwickelte die erste, die nach den aktuellen Leitlinien von FDA und EMA validiert wurde. Für die meisten publizierten Methoden sind keine Daten zur Validierung verfügbar, lediglich Flint et al. (2021) führten eine Validierung anhand der alten Leitlinien der FDA aus dem Jahre 2003 durch und Suzuki et al. (2017) machten keine Angaben zur verwendeten Leitlinie.

Tabelle 4.2.: Überblick über die bereits publizierten Methoden zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram.

BHPT: β -Hydroxyphenyltheophyllin; FID: Flammenionisationsdetektor; GC: Gaschromatographie; HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; IS: interner Standard; LC: Flüssigchromatographie; LLE: Flüssig-Flüssig-Extraktion; MS: Massenspektrometer; MS/MS: Tandem-Massenspektrometer; N-D: Stickstoffdetektor; N/P-D: Stickstoff-Phosphor-Detektor; PP: Proteinfällung; UPLC: Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie; UV: Ultraviolett Detektor; UV/VIS: Ultraviolett/Sichtbares Licht Detektor.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Studie	Geräte	Bereich [ng/mL]	Analyten	Proben- matrix	Proben- volumen	Zeit [min]	IS	Proben- extrakt
Aranda et al. (1988)	HPLC- UV	1 000– 15 000	Doxapram, Ketodoxapram, AHR5904, AHR0914	Human- serum	50 μ L	15	BHPT	LLE
Barbé et al. (1999)	HPLC- UV/VIS	100– 20 000	Doxapram, Ketodoxapram, AHR5904, AHR0914	Human- plasma	60 μ L	10	Butobar- bital	LLE
Coutts et al. (1991)	GC- N/P-D	— ¹	Doxapram, viele Metabolite	Human- urin	0,5– 1,0 mL	— ²	— ¹	LLE
Flint et al. (2021)	UPLC- MS/MS	50–4 500 50–5 000	Doxapram Ketodoxapram	Human- plasma	50 μ L	5	Fentanyl- d5	PP
Komatsu et al. (2005)	GC-MS	250–5 000	Doxapram	Human- plasma	— ²	— ²	Diaze- pam	SPE
LeGatt et al. (1986)	GC- N/P-D	100– 10 000	Doxapram, Ketodoxapram	Human- plasma	200 μ L	6 ³	AHR 755 (Doxa Analog)	LLE
Lin et al. (2011)	LC- MS/MS	2–1 000	Doxapram	Hasen- plasma Human- plasma,	100 μ L 50– 100 μ L	10	Urapidil	PP
Nichol et al. (1980)	GC-MS GC-FID	— ²	Doxapram	-blut Human- urin	0,5– 2,0 mL	— ²	Dextro- moramid	LLE

4. Diskussion

Tabelle 4.2.: (fortgesetzt)

Studie	Geräte	Bereich [ng/mL]	Analyten	Proben- matrix	Proben- volumen	Zeit [min]	IS	Proben- extrakt
Ogawa et al. (2015)	HPLC- UV/VIS	30–? ⁴ 10–? ⁴	Doxapram Ketodoxapram	Human- serum	50 µL	25 ³	Butobar- bital	LLE
Robson und Prescott (1977)	GC-N-D	10–5 000 250–5 000	Doxapram Ketodoxapram	Human- plasma	2 mL	— ²	Naftidro- furyl- oxalt	LLE
Roozekrans et al. (2017)	LC- MS/MS	2–5 000	Doxapram	Human- plasma	— ²	— ²	— ²	PP
Sams et al. (1992)	GC- N/P-D	25–5 000	Doxapram	Pferde- plasma	1 mL	— ²	Diaze- pam	LLE
Suzuki et al. (2017)	LC- MS/MS	20–5 000	Doxapram, Ketodoxapram	Human- serum	25 µL	17	Propran- olol	PP
Torok- Both et al. (1985)	GC- N/P-D	— ²	Doxapram	Human- plasma Human- urin	20– 100 µL 2–5 µL	8 ³	Diaze- pam	PP, LLE

¹ Keine Quantifikation

² Keine Informationen verfügbar

³ Laufzeit geschätzt auf Grund der Beschreibungen im Manuskript

⁴ Unbekannte obere Grenze

Des Weiteren hat die hier beschriebene Methode die niedrigste LLOQ mit 10 pg/mL, die eine Überwachung der Plasmakonzentration über eine längere Zeitspanne und nach der Verabreichung niedriger Substanzmengen sowie eine Bestimmung der Proteinbindung erlaubt. Doxapram und Ketodoxapram sind zu einem großen Teil an Proteine gebunden, daher ist die freie Fraktion sehr klein und erforderte für eine verlässliche Bestimmung entweder ein großes Probenvolumen oder eine niedrige LLOQ. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal der entwickelten Methode ist die Verwendung eines stabilen isotoopenmarkierten Analyten als IS.

Die Methode zur Quantifizierung von A293 im Schweineplasma wurde nur partiell validiert, da eine Anwendung für humane Proben bisher nicht vorgesehen ist. Die validierten Teile der Methode erfüllen jedoch die Anforderung von FDA und EMA. Durch die Chromatographie wurden scharfe Peaks für A293 erzeugt und auch der Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate beeinflussten die Messung nicht negativ. Bei der Überprüfung der Präzision und Richtigkeit für die drei untersuchten QC-Konzentrationen und der LLOQ zeigte sich, dass diese innerhalb der Grenzen waren. Die Überprüfung der Verschleppung zeigte, dass diese höher als die geforderten 20 % der LLOQ waren. Die Vermessung von reinem Laufmittel nach jeder Probe reduzierte die Verschleppung jedoch auf akzeptable Werte. Dies verlängerte die Messdauer und den Verbrauch an Lösungsmittel, jedoch war eine kombinierte Messdauer von 9 min pro Probe noch im akzeptablen Bereich.

Zur Struktur des Fragmentes zur Quantifizierung von A293 gibt es bisher keine publizierten Ergebnisse und auch in dieser Arbeit wurden keine näheren Untersuchungen hierzu durchgeführt. Darüber hinaus ist auch nicht bekannt, an welcher Stelle der IS A293-d8 deuteriert ist, um über dessen Fragmentierung Rückschlüsse auf die entstehenden Fragmente zu ziehen. Aus diesem Grund sind zu den entstehenden Fragmenten keine Strukturvorschläge angegeben, da diese auf reinen Spekulationen beruhen würden. Um die Struktur identifizieren zu können, müssten auch hier weitere Strukturaufklärung erfolgen. Eine Untersuchung der Stabilität bei Raumtemperatur, im automatischen Probenzufuhrsystem, bei -20°C zur Langzeitlagerung oder nach mehrmaligen Einfrieren und Auftauen wurde nicht untersucht. Bisher wurden auch noch keine Daten zur Stabilität von A293 publiziert, so dass dies für eine vollständige Validierung erfolgen müsste. Im Rahmen der üblichen Probenaufbereitung und Vermessung wurden bisher jedoch keine Probleme im Bezug auf die Stabilität festgestellt.

Durch die Verwendung eines stabilen isopenmarkierten Analyten als IS ist mit einer großen Robustheit der Methode zu rechnen, die jedoch erst noch in einer vollständigen Validierung bestätigt werden muss. Betrachtet man die Daten zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram, sollten jedoch auch bei A293 ähnliche Ergebnisse zu erwarten sein. Des Weiteren ist die hier beschriebene Methode die erste publizierte zur Bestimmung von A293 im Schweineplasma mittels UPLC-MS/MS. Bisher ist in der Literatur keine einzige Methode zur Quantifizierung von A293 verfügbar, auch in keiner anderen Probenmatrix oder mit anderen Messgeräten. Für eine großflächigere Anwendung der Methode und zur Bestätigung der bisherigen Messwerte muss in Zukunft jedoch eine vollständige Validierung erfolgen, um alle Anforderung der Leitlinien zu erfüllen.

4.2.3. Pharmakokinetik von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein

Die intravenöse Verabreichung von Doxapram sowie Ketodoxapram zeigte eine biphasische Pharmakokinetik. In jungen Lämmern (Bairam et al. 1990), Pferden (Sams et al. 1992) und Hasen (Lin et al. 2011) wurden ähnliche Profile bereits beschrieben, wobei nur die Lämmer Ketodoxapram verabreicht bekommen haben und daher auch eine Untersuchungen der dazugehörigen Kinetik erfolgte. In gesunden menschlichen Probanden wurde zu Beginn eine biphasische Kinetik beschrieben, die ungefähr 12 h nach *i.v.* Injektion in eine dritte Phase mit einer noch geringeren Ausscheidungsrate überging (Robson und Prescott 1979; Clements et al. 1979). Die hier beschriebene Studie beobachtete den Verlauf über 9 h, daher konnte eine mögliche dritte Phase in den Schweinen bisher nicht beobachtet werden. Mit einer Verlängerung der Beobachtungsperiode wäre eine Beurteilung der Phasenanzahl möglich. In den vorliegenden Daten kann das Vorhandensein einer dritten Phase jedoch vernachlässigt werden, da die Extrapolation der AUC_{∞} für die Schweine nach Gabe von Doxapram einen Wert von $0,66 \pm 0,42\%$ für Doxapram und $8,60 \pm 0,26\%$ für Ketodoxapram zeigte und somit der überwiegende Teil bereits abgedeckt ist. Für die Schweine nach Gabe von Ketodoxapram errechnete sich eine AUC_{∞} von $2,14 \pm 0,59\%$, wodurch auch hier eine dritte Phase vernachlässigt werden kann.

In der Studie mit jungen Lämmern, in der sowohl Ketodoxapram als auch Doxapram untersucht wurde, war die Beobachtungsperiode 24 h, es wurden jedoch nur die ersten 6 h

für die Erstellung des pharmakologischen Profils verwendet (Bairam et al. 1990). Auch in der Studie mit den Hasen war die Beobachtungsperiode 24 h, wobei hier keine Angaben gemacht wurden, ob alle Proben auch für die Pharmakokinetik verwendet wurden (Lin et al. 2011). In der Pferdestudie war bereits der Beobachtungszeitraum mit 8 h zu kurz um eine dritte Phase zu identifizieren (Sams et al. 1992). Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass der Zeitraum, in dem die Proben gesammelt wurden, bei allen Tierstudien zu kurz war, um zuverlässig entscheiden zu können, ob es sich um eine bi- oder triphasische Kinetik handelt.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter nach einer einzelnen schnellen *i.v.* Applikation (innerhalb 1 min) von 1 mg/kg Doxapram sowie Ketodoxapram in Deutsche Landrasse Schweine ergaben eine Halbwertszeit von $1,38 \pm 0,22$ h für Doxapram und $2,42 \pm 0,04$ h für Ketodoxapram nach Gabe von Doxapram. Im Vergleich mit anderen Spezies zeigte sich für die Doxapram-Werte, dass diese sich zwischen denen in Hasen mit $0,47 \pm 0,17$ h (Lin et al. 2011), in Lämmern mit 5,2 h (1,2–11,6 h) (Bairam et al. 1990), in Pferden mit 2,62–3,29 h (Sams et al. 1992) und in Menschen mit $3,4 \pm 0,7$ h befinden (Robson und Prescott 1979). Auch ist für die Daten eine gute Übereinstimmung mit einer Studie an sechs gesunden Probanden, für die eine triphasische Pharmakokinetik berechnet wurde, gegeben. Hier wurde eine intermediäre $t_{1/2}$ von $1,03 \pm 0,16$ h und einer terminale von $5,92 \pm 1,37$ h angegeben (Clements et al. 1979).

Die Datenlage zur Pharmakokinetik nach Applikation von Ketodoxapram ist unzureichend. Bisher wurde lediglich eine Studie in Lämmern publiziert, in der Ketodoxapram direkt verabreicht wurde (Bairam et al. 1990). Die ermittelte $t_{1/2}$ betrug 2,6 h (0,7–3,4 h), womit dieser Wert ähnlich dem hier berechneten für Ketodoxapram nach Applikation von Doxapram ist ($2,42 \pm 0,04$ h) und auch vergleichbar mit dem Wert nach Applikation von Ketodoxapram ist ($1,71 \pm 0,13$ h).

Die $C_{\max}$ nach obig beschriebener Bolusinjektion von Doxapram betrug 1780 ± 275 ng/mL und lag damit in einem Bereich, der ähnlich auch in anderen Spezies gemessen worden war. In gesunden menschlichen Probanden waren Werte von 2,6 µg/mL (Clements et al. 1979) und 3 µg/mL (Robson und Prescott 1979) nach Verabreichung von 1,5 mg/kg Doxapram (innerhalb von 2–3 min) registriert worden. In Pferden wurde ein Wert von 1341 ± 256 ng/mL nach 1,1 mg/kg Doxapram gemessen, wobei hier keine Injektionsdauer angegeben worden war (Sams et al. 1992). Auch in Hasen konnte eine $C_{\max}$ von 1515 ± 130 ng/mL nach Injektion von 5 mg/kg Doxapram innerhalb 1 min beobachtet werden (Lin et al. 2011). Letztlich konnten auch in Lämmern ähnliche Werte nach Gabe von 2,5 mg/kg Doxapram innerhalb 1 min berichtet werden (3,1 µg/mL; 2,7–3,6 µg/mL) (Bairam et al. 1990). Auch der Wert von 4604 ± 501 ng/mL nach Bolusinjektion von 1 mg/kg Ketodoxapram innerhalb 1 min im Schwein lag in einem ähnlichen Bereich wie die Gabe von 2,5 mg/kg Ketodoxapram innerhalb 1 min in Lämmern mit einer $C_{\max}$ von 5,26 µg/mL (2,5–9,3 µg/mL) (Bairam et al. 1990).

Die CL in Schweinen betrug $14,3 \pm 2,0$ mL/(min kg) für Doxapram und für Ketodoxapram $2,87 \pm 0,41$ mL/(min kg). In Lämmern konnten Werte von 9,0 mL/(min kg) (5,7–13,3 mL/(min kg)) für Doxapram und 14,8 mL/(min kg) (8,2–30,0 mL/(min kg)) für Ketodoxapram beobachtet werden (Bairam et al. 1990). In humanen Probanden wurden Werte

von $5,2 \pm 1,7$ mL/(min kg) und $5,9 \pm 1,0$ mL/(min kg) für Doxapram gemessen (Robson und Prescott 1979; Clements et al. 1979) und $11,1 \pm 2,4$ mL/(min kg) für Doxapram in Pferden nach Gabe von 1,1 mg/kg (Sams et al. 1992).

Die AUC für Doxapram in Schweinen betrug 1186 ± 170 ng/(mL h) und 5919 ± 801 ng/(mL h) für Ketodoxapram. Der Wert von Doxapram ist ähnlich dem in Pferden nach *i.v.* Gabe von 1,1 mg/kg mit 1728 ± 400 ng/(mL h) (Sams et al. 1992), niedriger als in Menschen nach Gabe von 1,5 mg/kg mit einem Wert von 4533 ± 1683 ng/(mL h) (Robson und Prescott 1979) und höher als in Hasen mit 2094 ± 100 ng/(mL h) nach 5 mg/kg Doxapram (Lin et al. 2011), unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dosierungen. Ein Vergleich des V_{ss} mit Literaturdaten gestaltet sich als schwierig, da oft wichtige Daten zum Umrechnen fehlen. In den Schweinen wurden ein V_{ss} von $41,0 \pm 7,5$ L für Doxapram und $13,4 \pm 0,9$ L für Ketodoxapram gemessen. Im Vergleich dazu wurde in gesunden menschlichen Probanden ein Wert von 110 ± 48 L bestimmt, nach Injektion von 1,5 mg/kg Doxapram (Robson und Prescott 1979). In der Studie mit den Lämmern wurde ein Volumen von 1,2 L/kg für Doxapram (0,5–2,0 L/kg) und 1,1 L/kg für Ketodoxapram (0,34–2,05 L/kg) gemessen (Bairam et al. 1990). Obwohl diese Daten nicht direkt vergleichbar sind, lässt sich dennoch sagen, dass bei den Lämmern das V_{ss} von Ketodoxapram geringfügig niedriger ist als das von Doxapram, was bei den Schweinen deutlich ausgeprägter zu beobachten ist.

Im Vergleich zwischen Doxapram und Ketodoxapram lässt sich sagen, dass Ketodoxapram eine höhere C_{max} und AUC hat. Dies bestätigt sich durch niedrigere V_{ss} , $t_{1/2}$ und CL, die zum einen auf einer geringeren Verteilung ins Gewebe hinweisen als auch auf eine langsamere Ausscheidung. In Lämmern ist nach Gabe von Ketodoxapram die C_{max} ebenfalls erhöht und V_{ss} sowie $t_{1/2}$ erniedrigt, jedoch im Gegensatz zu den Schweinen ist auch die AUC niedriger und CL höher (Bairam et al. 1990). Dies spricht dafür, dass eine geringere Verteilung ins Gewebe stattfindet und die Substanz aus dem Blut schneller ausgeschieden wird. Dieser Unterschied könnte eventuell in einer unterschiedlichen Proteinbindung begründet liegen, jedoch gibt es hierzu keine Werte für Lämmer. Im Zuge dieser Arbeit wurde jedoch die Proteinbindung in Schweinen untersucht und hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl Doxapram mit $95,5 \pm 0,9\%$ als auch Ketodoxapram mit $98,6 \pm 0,1\%$ überwiegend an Proteine gebunden sind. Während die freie Fraktion in beiden Fällen sehr gering ist, ist sie bei Doxapram mit einem Wert von 4,5 % dennoch dreimal größer als bei Ketodoxapram mit 1,4 %. Dies könnte ein Grund für den Unterschied in den Parametern zwischen Doxapram und Ketodoxapram im Schweineplasma sein. Durch die höhere Proteinbindung liegt Ketodoxapram vor allem gebunden im Blut vor und wird daher weniger ins Gewebe verteilt und auch langsamer ausgeschieden.

Wie bereits erwähnt, sind in der Literatur wenig Daten zur Proteinbindung von Doxapram und Ketodoxapram verfügbar. Lediglich eine Studie in Pferden untersuchte die Proteinbindung von Doxapram und konnte dort einen Wert von 76,0–85,4 % bestimmen (Sams et al. 1992). In selbiger Studie wurde eine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung entdeckt, die auch in Schweinen für Doxapram jedoch nicht für Ketodoxapram bestätigt werden konnte. Bei der Untersuchung zu Ketodoxapram

wurden jedoch auch Daten von Ketodoxapram als Metabolit eingebunden, die eine deutlich niedrigeren Konzentration als die restlichen Proben hatten, was zu einer Aufteilung in einen hohen und niedrigen Konzentrationsbereich führte. Eine ausschließliche Betrachtung des hohen Bereiches zeigte einen Trend zu einer reduzierten Proteinbindung bei höheren Plasmakonzentrationen, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Beobachtungen könnten der kleinere Konzentrationsbereich und die reduzierte Anzahl an Datenpunkten sein, wodurch einzelne Werte einen stärkeren Einfluss haben und der Effekt eventuell überschätzt wird. Auch könnte die Proteinbindung in Proben mit Ketodoxapram als Metabolit durch die vergleichsweise hohe Doxapram-Konzentration negativ beeinflusst sein. Durch eine mögliche Verdrängung von Ketodoxapram durch Doxapram an den Bindungsstellen könnte es zu einer reduzierten Proteinbindungen kommen. Die so gewonnenen Werte könnten daher die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit von Ketodoxapram beeinflussen. Dem spricht jedoch entgegen, dass die Werte von Ketodoxapram als Metabolit und nach Gabe von Ketodoxapram fast identische sind. Es ist daher davon auszugehen, dass die Bindungsstellen nicht gesättigt sind und die Substanzen nicht in Konkurrenz stehen um die Proteinbindungsstellen. Somit sind für eine endgültige Beurteilung weitere Messungen notwendig. Die deutlich höhere freie Fraktion in Pferden könnte in Spezies-spezifischen Unterschieden begründet sein, wie sie bereits für andere Substanzen beschrieben wurden (Schmidt und Jähnchen 1978). Die Bindestellen der Plasmaproteine sind von Spezies zu Spezies unterschiedlich und führen somit zu veränderten Bindungsaffinitäten (Kosa et al. 1997). Andererseits könnten die Unterschiede auch in der Verwendung verschiedener Methoden zu Quantifizierung der freien Fraktion begründet liegen.

Das Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis zeigte, dass im Vergleich zum Plasma sowohl Ketodoxapram als auch Doxapram zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz im Gehirn nachweisbar waren. Ähnliches wurde bereits für Doxapram in einem Vergleich zwischen Serum Neugeborener und deren Liquor nachgewiesen. Hier wurden höhere Serumkonzentrationen und ein Liquor-Serum-Verhältnis von $0,48 \pm 0,13$ gemessen (Kumita et al. 1991). Weiterhin konnte dies durch Daten in Hunden bestätigt werden, bei denen sehr niedrige Doxapram-Konzentrationen im Liquor gemessen wurden (Bruce et al. 1965). Bei einem Vergleich der Verhältnisse von Doxapram und Ketodoxapram zeigte sich, dass der Wert für Ketodoxapram als Metabolit 5-fach und nach Gabe von Ketodoxapram sogar 9-fach niedriger war als für Doxapram. In Anbetracht des lipophileren Charakters von Ketodoxapram überrascht dieses Ergebnis, da lipophile Substanzen per passive Diffusion einfacher über die Blut-Hirn-Schranke diffundieren sollten als hydrophile Substanzen. Viele kleine lipophile Moleküle sind jedoch Substrate von auswärtsgerichteten Transportern, die die Substanzen aktiv wieder aus dem Liquorraum bzw. Gehirn entfernen (Banks 2009). Eine weitere mögliche Erklärung ist die größere freie Fraktion von Doxapram, wodurch mehr freies Doxapram im Blut und somit an der Blut-Hirn-Schranke vorliegt und möglicherweise auch im Gehirn. Jedoch sei auch an dieser Stelle erwähnt, dass die Ergebnisse nur auf $n = 3$ Tieren für Doxapram sowie Ketodoxapram beruhen und daher die Werte vorsichtig interpretiert werden sollten.

Die Blutspiegel der Schweine über die Beobachtungsdauer von 14 d zeigte, dass diese größeren Schwankungen unterliegen und sowohl für Doxapram als auch für Ketodoxapram über vier Zehnerpotenzen streuen. Diese großen Unterschieden könnten in der schnellen Blutgerinnung der Schweine begründet liegen. Obwohl die ZVKs nach jeder Manipulation mit Heparin gefüllt wurden, um eine Verschließung durch Thromben zu verhindern, traten immer wieder Probleme bei der Medikamentengabe und Blutentnahme durch verstopfte Zugänge auf.

Diese möglichen Ursachen führten dazu, dass den Tieren teilweise innerhalb der Beobachtungsperiode unter Vollnarkose ein neuer ZVK implantiert werden musste, da eine zuverlässig Medikamentenapplikation und Blutentnahme über den alten ZVK nicht mehr gewährleistet war. Da dies jedoch mit einer größeren Belastung für die Tiere sowie einer möglichen Beeinflussung des Experimentes durch die Narkose, die den Metabolismus des Tieres und insbesondere der gegebenen Studienmedikation beeinflussen kann, verbunden ist und auch logistisch und zeitlich nicht immer sofort durchführbar war, wurde dies nur als Ultima Ratio gesehen. Dieser Eingriff wurde daher nur durchgeführt, falls keines der fünf Lumen des ZVKs mehr durchgängig war, auch wenn dies bedeutete, dass die Blutentnahme und Medikamentengabe über das selbe Lumen erfolgen musste. Um das Risiko von Rückständen im Lumen zu minimieren, wurde nach jeder Medikamentengabe ausgiebig mit 0,9 % NaCl gespült.

Für Doxapram als hydrophile Substanz sollten sich auf diese Weise eventuelle Rückstände erfolgreich entfernen lassen. Dies zeigen auch die Messungen der Plasmaspiegel über die Zeit nach Gabe von Doxapram. Es sind keine extremen Anstiege zu sehen und nach der letzten Gabe kommt es bei allen Tieren zu einem deutliche Abfall der gemessenen Konzentration. Bei Schwein Nr. 154 musste die terminale Operation aus individuellen Gründen vorgezogen werden, weshalb die Plasmakonzentration an Tag 14 höher ist als bei den anderen Tagen und nicht den üblichen Talspiegeln entspricht. Der deutliche Abfall an Tag 13 lässt sich dadurch erklären, dass das Tier an diesem Tag keine Dosis erhalten hat. Bei Tieren Nr. 155 und Nr. 156 mussten in der Mitte des Beobachtungszeitraums der ZVK gewechselt werden, da die Medikamentengabe und Blutentnahme nicht mehr möglich gewesen war. Dies erklärt den Einbruch der Konzentration bei den beiden Tieren. Während bei Tier Nr. 155 dennoch alle 9 h-Kinetiken durchgeführt werden konnten, musste bei Tier Nr. 156 diese am Tag 6 ausfallen, da der ZVK defekt war und bis zur Neuanlage keine Blutentnahme mehr möglich war.

Es zeigte sich des Weiteren, dass die Konzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram sich bei der letzten Blutentnahme annäherten. Zu diesem Zeitpunkt lag die letzte Medikamentengabe schon länger zurück und seitdem wurde Doxapram weiter zu Ketodoxapram metabolisiert, wodurch dessen Spiegel relative konstant blieben und die von Doxapram niedriger wurden.

Die Blutspiegel der Schweine nach Gabe von Ketodoxapram zeigten ebenfalls ein unerwartetes Muster. Während die Konzentrationen für die ersten Tage auf einem niedrigen Niveau blieben, stiegen diese zur Mitte des Beobachtungszeitraums deutlich an und blieben auf einem hohen Niveau. Höchstwahrscheinlich lässt sich diese Beobachtung auf die bereits beschriebenen Probleme mit den ZVKs zurückführen, wodurch es zur Beein-

trächtigung bei der Blutentnahme kam. Ketodoxapram als lipophile Substanz ist schlecht wasserlöslich und kann daher nicht so gut wie Doxapram durch 0,9 % NaCl weggespült werden. Es könnte daher über die Zeit zu Ketodoxapram-Rückständen gekommen sein, die die Konzentrationen der Blutproben beeinflusst haben.

Die Auftragung der pharmakokinetischen Parametern im Zeitverlauf ergab in den Schweine nach Gabe von Doxapram keine wesentliche Veränderung. Für die Schweine nach Gabe von Ketodoxapram zeigten sich allerdings erwartbare Ergebnisse. Durch die mehrfache Gabe von Ketodoxapram kam es zu einer Aufsättigung und daher einer höheren $C_{\max}$ und AUC. Hierbei blieb V_{ss} , $t_{1/2}$ und CL relativ gleich, zumindest ist kein klarer Trend in eine Richtung zu erkennen. Es lässt sich also sagen, dass es mit Ausnahme des Anstiegs von $C_{\max}$ und AUC zu keinen Änderungen kam.

4.2.4. Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks durch Doxapram und Ketodoxapram

Eine Untersuchung der hämodynamischen Parameter im Schwein zeigte, dass sowohl Doxapram als auch Ketodoxapram den PA-Druck erhöhten, wobei der Effekt unter Ketodoxapram etwas stärker ausgeprägt war — zumindest bezogen auf die untersuchten Dosierungen. Beide Substanzen führten zu einem akuten Anstieg des PA-Drucks von über 20 mmHg und einem PVRI von über 3 Wood Einheiten (entspricht: $240 \text{ dyn cm s}^{-5}/\text{m}^2$), womit die Definition einer PH erfüllt war. Eine Betrachtung des PCWP zeigte, dass dieser im Normbereich von 4–12 mmHg lag und somit der Anstieg des PA-Drucks nicht durch einen Anstieg des enddiastolischen Drucks im LV verursacht war und somit am ehesten durch eine reine Zunahme des pulmonale Gefäßwiderstandes bedingt war. Unter der Anwendung von Doxapram und Ketodoxapram kam es ebenfalls zu einem systemischen Blutdruckanstieg, wobei die Werte dabei unter den Grenzen einer Hypertonie blieben. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Grenzwerte aus der Humanmedizin stammen und nicht für Schweine gelten und dass die Messungen an narkotisierten Schweinen stattgefunden haben. In einer Untersuchung an 200 gesunden weiblichen Patienten, die für eine Biopsie des Brustgewebes narkotisiert wurden, konnte ebenfalls ein milder Anstieg des systemischen Blutdrucks nach Doxapram-Verabreichung festgestellt werden, der jedoch klinisch keine Probleme bereitete (Winnie und Collins 1966). Allerdings muss auch in dieser Studie berücksichtigt werden, dass die Patienten sich unter Narkose befunden haben. In narkotisierten Lämmern wurde ein Vergleich von Ketodoxapram zu Doxapram durchgeführt und nur ein moderater Blutdruckanstieg für Doxapram und kein Effekt für Ketodoxapram gesehen (Bairam et al. 1990). Diese Ergebnisse stehen etwas im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten, bei denen für beide Substanzen ein Blutdruckanstieg zu beobachten war. Dies könnte jedoch an speziesspezifischen Unterschieden liegen oder an der untersuchten Dosis, da der Blutdruckanstieg für Ketodoxapram und vergleichbare Doxapram-Dosierungen gering war und erst mit höheren Doxapram-Dosen stark anstieg. Diese Dosierungen wurden in der Studie mit den Lämmern jedoch nicht getestet.

Eine Bestimmung des SVRI zeigte nur bei Ketodoxapram einen leichten Anstieg und bei Doxapram keine Veränderung, es kam somit unter der Anwendung von Doxapram zu keiner Vasodilatation oder Konstriktion der Blutgefäße außerhalb der Lunge und unter

Ketodoxapram-Gabe zu einer gering ausgeprägten Konstriktion. Der SVRI wird jedoch auch durch den Volumenzustand beeinflusst, wodurch die beobachteten Effekte nicht unbedingt auf die Wirkung von Ketodoxapram zurückzuführen sind. Die beiden weiteren untersuchten TASK-1-Inhibitoren, A293 und Z3217409047 verhielten sich sehr ähnlich zu Doxapram und Ketodoxapram, so dass hier von einem Klasseneffekt auszugehen ist, der auf einer Hemmung von TASK-1 beruht.

Einleitend wurde bereits beschrieben, dass in zellulären Experimenten gezeigt werden konnte, dass TASK-1 eine wichtige Rolle spielt in der Regulation des pulmonalen Gefäßwiderstands (Olschewski et al. 2017). Eine Herunterregulation, Inhibition oder Mutation, die zum Funktionsverlust von TASK-1 führte, trugen zur Vasokonstriktion, Zellproliferation und Resistenz gegenüber Apoptose von PASMC bei (Antigny et al. 2016; Cunningham et al. 2019). Durch die überschießende Proliferation der PASMC und deren erhöhten Muskeltonus, vermittelt durch eine Reduktion des TASK-1-Stroms und der daraus folgenden Depolarisation der Zellen, wurde in Patienten PH ausgelöst (Olschewski et al. 2006). Lange Zeit wurde darüber diskutiert, ob eine TASK-1-Inhibition PH verursachen kann (Olschewski et al. 2016; Schmidt et al. 2016; Wiedmann et al. 2021). Mit den hier durchgeführten Experimenten kann nun erstmals gezeigt werden, dass eine Applikation von pharmakologischen TASK-1-Inhibitoren im Schwein zu einem akuten Anstieg des PA-Drucks führt. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Experimente an narkotisierten Schweinen erfolgten, bei denen eventuell autonome Regulationsmechanismen nicht in der Weise funktionieren, wie es in wachen Tieren der Fall ist.

In der Kontrolle kam es zu keinen Veränderungen der gemessenen Parametern. Bei der Untersuchung von Amiodaron, einem klinisch etablierten Antiarrhythmikum, konnte der in der Literatur bereits ausführlich beschriebene Blutdruckabfall beobachtet werden und ein Anstieg des PA-Drucks blieb aus. Dies bestätigt somit einmal mehr, dass die beobachteten Effekte auf einer Wirkung der TASK-1-Inhibition beruhen. Eine Untersuchung der hämodynamischen Parametern nach chronischer Applikation von Ketodoxapram und Doxapram zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede, außer eine geringfügige Steigerung der Herzfrequenz in den Ketodoxapram Tieren. Diese kann jedoch in der unterschiedlichen Narkosetiefe begründet liegen und unterliegt allgemein großen Schwankungen. Für die Beurteilung der chronischen Daten ist zu beachten, dass zum Zeitpunkt der Messung nach 14 d die letzte Applikation bereits mehr als 24 h entfernt lag und die Effekte somit eventuell unterschätzt wurden. Eine eventuelle klinische Relevanz für die Anwendung zur Kardioversion von VHF muss daher noch genauer evaluiert werden. Die hier gezeigten Daten unterliegen der Limitation, dass die Messung der hämodynamischen Parameter zum einen nur in Schweinen erfolgte und somit die Gegebenheiten im Menschen nicht exakt darstellt, zum anderen konnte die Messung nur an narkotisierten Tieren erfolgen, wodurch ebenfalls mit einer Beeinflussung der Messwerte zu rechnen ist. Mit den vorliegenden Daten ist daher noch keine abschließende Beurteilung möglich.

Unabhängig von der klinischen Evaluation und den Daten in Menschen wäre eine mögliche Alternative zur Verabreichung von Doxapram und Ketodoxapram als Race-

mant die Verwendung von reinen Enantiomeren. Während für Doxapram jedoch bereits gezeigt wurde, dass das Eutomer *R*-Doxapram auch zu einem Anstieg des Blutdrucks in Ratten führte, wobei der PA-Druck nicht untersucht wurde, sind die Daten zu Ketodoxapram bisher vielversprechend und zeigten für *R*-Ketodoxapram ein reduziertes Nebenwirkungsprofil (US Patent PCT/US2012/040195).

4.2.5. Ketodoxapram führt zur Verlängerung der arteriellen effektiven Refraktärzeit und Kardioversion von Vorhofflimmern

Nach den positiven Ergebnissen der pharmakologischen und zellulär-elektrophysiologischen Messungen zeigte auch die Messung der AERP vielversprechende Ergebnisse. Hierbei zeigte sich, dass die AERP durch Doxapram deutlich verlängert wird. Dies konnte bereits in früheren Experimenten im Schwein gezeigt werden und führte zur erfolgreichen Terminierung von VHF (Wiedmann et al. 2022a) durch Doxapram. In den bereits veröffentlichten Daten von Wiedmann et al. (2022a) wurden ähnliche Werte gemessen, mit einem Anstieg der AERP₅₀₀ von $216,4 \pm 24,4$ ms hin zu $251,4 \pm 22,1$ ms nach *i.v.* Injektion von 1 mg/kg Doxapram und bis auf $254,7 \pm 19,7$ ms nach 2 mg/kg Doxapram. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die AERP₄₀₀ ($212,1 \pm 19,8$ ms, $232,9 \pm 18,4$ ms, $237,9 \pm 20,9$ ms) und AERP₃₀₀ ($170,0 \pm 15,7$ ms, $205,0 \pm 13,5$ ms, $212,5 \pm 23,5$ ms) gemessen.

Auch die beobachtete Veränderung der AERP in Schweinen nach Verabreichung von A293 bestätigten die bereits veröffentlichten Daten (Wiedmann et al. 2020). Es wurde eine Verlängerung der AERP₅₀₀ von $200,0 \pm 4,1$ ms hin zu $220,0 \pm 4,1$ ms nach *i.v.* Injektion von 1 mg/kg A293 beobachtet. Ähnliches wurde auch für die AERP₄₀₀ ($175,0 \pm 9,6$ ms, $198,0 \pm 9,5$ ms) und AERP₃₀₀ ($155,0 \pm 13,2$ ms, $172,5 \pm 13,1$ ms) bestimmt. Auch hier führte die Verlängerung der AERP zur Kardioversion von VHF.

Amiodaron verursachte ebenfalls eine ausgeprägte Verlängerung der AERP, die jedoch vor allem mit höheren Dosierungen zu beobachten war. In bereits publizierten Daten zeigte sich nach *i.v.* Gabe von 5 mg/kg Amiodaron eine Verlängerung der AERP von 232 ± 41 ms zu 256 ± 42 ms in gesunden humanen Probanden (Wellens et al. 1984). Hierbei wurde jedoch nicht angegeben, bei welcher Zykluslänge die AERP bestimmt wurde. Auch wurden keine höheren Dosen getestet, was erklären könnte, weshalb die Effekte niedriger ausfielen. Bei der Untersuchung der Kontrolle zeigte sich keine Veränderung der AERP, woraus sich schließen lässt, dass die beobachteten Effekte durch die getesteten Substanzen verursacht worden waren.

Für die weiteren TASK-1-Inhibitoren Substanz Z3217409047 und Ketodoxapram wurden bisher noch keine Daten zur AERP veröffentlicht, jedoch war die beobachtete Verlängerung der AERP im Vergleich mit anderen TASK-1-Inhibitor zu erwarten. Während der Effekt für Z3217409047 eher gering ausfiel und bei den höheren Dosierung rückläufig zu sein scheint, war bei Ketodoxapram ein ausgeprägter Effekt zu sehen, der in seiner Ausprägung dem von Doxapram und A293 entspricht. Es ist daher zu erwarten, dass eine Anwendung von Ketodoxapram im VHF-Schweinmodell auch zu einer erfolgreichen Kardioversion führt.

Die chronische *i.v.* Anwendung von Doxapram und Ketodoxapram im Schwein mit einer Dosierung von 1 mg/kg täglich zeigte keine Veränderungen der AERP und im

Oberflächen-EKG bei einem Vergleich der Ausgangswerte mit denen nach 14 d. Für die Parameter, die aus dem Oberflächen-EKG gewonnen wurden, ist dies zu erwarten und zeigt die spezifische Wirkungsweise einer TASK-1-Inhibition zur Behandlung von VHF. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben für die Anwendung von A293 und Doxapram im Schwein (Wiedmann et al. 2021; Wiedmann et al. 2022a). In Bezug auf die ausbleibende Verlängerung der AERP ist hierbei jedoch zu beachten, dass auch hier die letzte Gabe vor über 24 h erfolgte und bei einer $t_{1/2}$ von unter 3 h für Doxapram und Ketodoxapram bereits eine bedeutende Menge des Wirkstoffs abgebaut worden ist. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Messung zu einem früheren Zeitpunkt auch bei der chronischen Anwendung eine Verlängerung der AERP zeigen würde, wie es bereits für A293 und Doxapram in der Literatur publiziert ist (Wiedmann et al. 2022a; Wiedmann et al. 2021). Auch liefert dies erste Hinweise, dass eine Dosierung von einmal täglich nicht den gewünschten Effekt auf die AERP erzielt und eine zweimal tägliche Gabe der halben Dosierung vorzuziehen ist.

Aus diesem Grund wurden Untersuchungen mit Ketodoxapram im VHF-Schweinmodell durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Ketodoxapram sowohl in der Lage war akut VHF zu terminieren, als auch in der Daueranwendung die VHF-Last signifikant zu senken. Diese Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Studien, in denen eine Gabe des experimentellen TASK-1-Inhibitor A293 (Wiedmann et al. 2020; Wiedmann et al. 2021) sowie von Doxapram (Wiedmann et al. 2022a) zur Kardioversion von VHF führte und die VHF-Last signifikant reduzieren konnte. Auf Grund der niedrigen Anzahl an Tieren können diese Ergebnisse nur als erste Vorversuche angesehen werden, auf die noch weitere Versuche zur Findung der effektivsten Dosis und zum Beweis der Wirksamkeit folgen müssen. Trotz alledem liefern diese Experimente erste Hinweise darauf, dass Ketodoxapram eine erfolgreiche Alternative für eine TASK-1 basierte VHF-Behandlung sein könnte.

4.2.6. Pharmakokinetik und Proteinbindung von Doxapram in humanen Probanden mit Vorhofflimmern

Die Zwischenanalyse der noch nicht beendeten DOCTOS-Studie zeigte für die Konzentrations-Zeit-Kurven aller drei bisher abgeschlossenen Kohorten einen biphasischen Verlauf, der zuvor bereits in den Schweinen beobachtet worden war. Auch Robson und Prescott (1979) sahen diesen Verlauf in gesunden Freiwilligen. Eine dritte Phase wurde von Clements et al. (1979) in ebenfalls gesunden Probanden entdeckt. In den vorliegenden Daten war diese jedoch nicht erkennbar, eventuell auf Grund des großen Zeitraums von 18 h zwischen den letzten beiden Proben, in dem keine Blutprobe und damit Plasmaspiegel vorliegen. Betrachtet man die $t_{1/2}$, die von Clements et al. (1979) angegeben wurden, so fällt auf, dass die in dieser Arbeit modellierte $t_{1/2\alpha}$ zwischen $t_{1/2\alpha}$ ($5,5 \pm 2,3$ min) und $t_{1/2\beta}$ ($62,0 \pm 9,7$ min) aus dem Manuskript liegt. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Zeitpunkt der ersten Blutproben zu spät und die zeitlichen Abstände zu groß gewählt wurden. Es sind daher keine zwei getrennten Phasen erkennbar, sondern nur eine Phase mit einer $t_{1/2}$, die zwischen denen der eigentlichen zwei Phasen liegt. In den repräsentativen Konzentrations-Zeit-Kurven war bei allen die zu erwartenden zwei Maxima zu

erkennen, die typisch sind für zwei Injektionen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls. Auch nähern sich bei allen Kurven die Konzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram an und verlaufen danach parallel weiter. Dieses Verhalten wäre vorstellbar, falls Doxapram nicht nur zu Ketodoxapram umgewandelt wird, sondern auch Ketodoxapram in Doxapram und sich somit ein Gleichgewicht zwischen den beiden Substanzen einstellt. Dem widerspricht jedoch, dass in den Blutproben der Schweine nach Gabe von Ketodoxapram kein Doxapram nachweisbar war. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Umwandlung von Doxapram zu Ketodoxapram der geschwindkeitsbestimmende Schritt ist. Durch eine mögliche Sättigung dieses Vorgangs kann Doxapram nicht schneller abgebaut, aber auch nicht mehr Ketodoxapram gebildet werden. Ist dieser Vorgang in etwa im Gleichgewicht mit der CL_m von Ketodoxapram, könnte es zu dem hier zu sehenden Vorgang kommen.

Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parametern nach zweifacher Injektion wurden die Daten für Doxapram auf Grundlage eines 2-Kompartiment-Modells ausgewertet. Eine Modellierung der Messwerte mit einem 3-Kompartiment-Modell lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse und wurde daher verworfen. Vergleicht man die berechneten Werte mit einer Studie, die ebenfalls Doxapram-Plasmakonzentrationen mit einem 2-Kompartiment-Modell modelliert hat, sind die Werte für CL mit 0,36 L/min und CL_d mit 1,0 L/min sehr ähnlich, die Verteilungsvolumina V_1 mit 9,0 L und V_2 mit 32,5 L jedoch deutlich kleiner als die hier berechneten (Roozekrans et al. 2017). Folglich ist auch die initiale sowie terminale $t_{1/2}$ mit 0,07 h und 1,64 h deutlich kürzer als die auf Grundlage der DOCTOS-Probanden berechnete. Ursachen hierfür könnte der deutlich kürzere Beobachtungszeitraum von 240 min sein oder auch die Unterschiede im Patientenkollektiv. Roozekrans et al. (2017) führte die Untersuchungen an jungen gesunden Probanden durch, während die DOCTOS-Patienten älter waren und mindestens an VHF erkrankt waren. Die pharmakokinetischen Parameter für Ketodoxapram wurden mit einem 1-Kompartiment-Modell bestimmt, ein 2-Kompartiment-Modell zeigte sich hier als nicht geeignet. Ein Vergleich der Daten mit Literaturwerten ist leider nicht möglich, da bisher keine Daten in humanen Probanden zu Ketodoxapram veröffentlicht wurden. Ein Vergleich mit den bereits beschriebenen Daten zu Ketodoxapram als Metabolit in Schwein zeigt, dass die beiden $t_{1/2}$ sehr ähnlich sind mit 2,42 h im Schwein und 2,01–2,87 h in den humanen Probanden. Dies bietet einen weiteren Hinweis darauf, dass die Anwendung zwischen Mensch und Schwein eine hohe Vergleichbarkeit hat.

Die Bestimmung der Proteinbindung ergab Werte von ungefähr 87 % für Doxapram und 98 % für Ketodoxapram. Während der Wert für Ketodoxapram ziemlich genau mit dem in Schweinen gemessenen übereinstimmt, ist der Wert für Doxapram geringer (96 %). Nach Betrachtung der Einzelwerte lässt sich sagen, dass zumindest innerhalb des Konzentrationsbereichs der vermessenen Proben keine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung erkennbar war. Während dies für Ketodoxapram die bereits bei den Schweinen gemachten Beobachtungen bestätigt, widerspricht es für Doxapram den Daten. Hier wurde sowohl im Schwein als auch im Pferd eine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung gesehen (Sams et al. 1992). Dies liegt sehr wahrscheinlich an den bereits angesprochenen Speziesunterschieden in den Plasmaproteinen und der damit verbundenen unterschiedlichen Proteinbindung.

4.2.7. *R*-Ketodoxapram konnte als Eutomer identifiziert werden

Die Untersuchung der beiden Enantiomere von Ketodoxapram zeigte einen deutlich stärkeren Effekt für *R*-Ketodoxapram im Vergleich zu *S*-Ketodoxapram. Im Bezug auf die Inhibition von TASK-1 kann daher *R*-Ketodoxapram als Eutomer und *S*-Ketodoxapram als Distomer bezeichnet werden. Ähnliches konnte bereits für Doxapram in humanen Nierenzellen (tsA201) beobachtet werden. Es wurde für *R*-Doxapram eine stärkere Inhibition ($1,6 \mu\text{M}$) des TASK-1 gemessen im Vergleich zu *S*-Doxapram mit $336 \mu\text{M}$ (Cunningham et al. 2020). Während bei Ketodoxapram sich die Wirkung um den Faktor 47 unterscheidet, scheint der Unterschied bei Doxapram mit einem Faktor von 210 erheblich stärker ausgeprägt zu sein. Die Auswirkung der unterschiedlichen Effektstärken wurde für Doxapram bereits in Ratten untersucht, wobei sich zeigte, dass *S*-Doxapram für die Arrhythmien, Krämpfe und Todesfälle verantwortlich war und *R*-Doxapram für die Atemantriebssteigerung (Golder et al. 2012a; Golder et al. 2012b). Jedoch zeigte sich auch, dass *R*-Doxapram in Ratten zu einem Blutdruckanstieg von 15–20 % über den Ausgangswert führte (Golder et al. 2013).

Zu den Enantiomeren von Ketodoxapram gab es bisher keine Studien auf Ionenkanalebene. Es gibt lediglich eine Patentschrift zur Synthese von enantiomerenreinem *R*-Ketodoxapram, dem die atemantriebssteigernde Wirkung und der positive Einfluss auf die Blutgase bescheinigt wird. Darüber hinaus sollen die Nebenwirkungen im Vergleich zu einer Gabe von racemischem Ketodoxapram signifikant reduziert sein (US Patent PCT/US2012/040195). Zusammen mit den bereits publizierten Daten, geben die hier beschriebenen Ergebnisse ausreichend Hinweise darauf, dass eine Therapie mit *R*-Ketodoxapram einer mit dem Racemat und besonders mit *S*-Ketodoxapram überlegen sein sollte.

4.3. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass miRNA-34a eine Rolle spielt in der veränderten Expression von TASK-1, die unter VHF zu beobachten ist. Ob sich im Blut zirkulierende miRNA-34a als Biomarker für VHF eignet, muss in weiteren Studien erst noch geklärt werden. Es konnte jedoch bereits durch eine Korrelation der atrialen miRNA-Konzentrationen mit klinischen Parametern gezeigt werden, dass durch Untersuchungen der miRNA-Expression Untergruppen des VHF unterschieden werden können.

Im Vergleich von Doxapram und Ketodoxapram zeigte sich, dass beide Substanzen sehr ähnlich sind auf einer elektrophysiologischen und pharmakologischen Ebene. Beide haben einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf TASK-1, führen zu einer Erhöhung des PA-Drucks und einer Verlängerung der AERP im Schwein. Des Weiteren konnte für Ketodoxapram in ersten Untersuchungen gezeigt werden, dass es im VHF-Modell des Hausschweins den SR wiederherstellen kann. Somit konnte Ketodoxapram als mögliche Alternative für eine TASK-1 basierte VHF-Therapie identifiziert werden und mit der Untersuchung der Enantiomere steht eine potentielle Möglichkeit bereit, die Therapie noch weiter zu verbessern.

4. Diskussion

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen eine transkriptionelle Regulation von TASK-1 durch miRNA-34a identifiziert als auch eine pharmakologische Modulation durch Doxapram und Ketodoxapram elektrophysiologisch und pharmakologisch charakterisiert, mit dem Ziel eine TASK-1 basierte VHF-Therapie weiter voran zu bringen.

5. Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit einer Prävalenz von 4 % in der westlichen Bevölkerung. Auf Grund des demographischen Wandels ist jedoch mit einem immer häufigeren Auftreten von Vorhofflimmern zu rechnen. Trotz dieser weiten Verbreitung sind die momentanen Behandlungsmöglichkeiten ungenügend, da sie entweder mit starken Nebenwirkungen oder einer mangelnden Wirkung assoziiert sind. In den letzten Jahren konnte jedoch mit dem TASK-1-Kaliumionenkanal eine neue Zielstruktur identifiziert werden, die auf Grund der fast ausschließlichen Expression im Vorhof und der Hochregulation unter Vorhofflimmern eine vorhofspezifische Vorhofflimmertherapie ermöglicht. Im Schweinemodell des Vorhofflimmerns konnte mit A293, einem experimentellen TASK-1-Inhibitor, und Doxapram, einem bereits zugelassenen Medikament zur Atemantriebssteigerung, erhebliche Erfolge in der Terminierung und Suppression von Vorhofflimmern erzielt werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend und um ein tieferes Verständnis der ablaufenden pathophysiologischen Prozesse zu bekommen, wurde in dieser Arbeit zum einen die transkriptionelle Regulation von TASK-1 durch miRNAs untersucht, zum anderen die Modulation von TASK-1 durch Doxapram und seinem Metaboliten Ketodoxapram pharmakologisch und elektrophysiologisch charakterisiert.

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von TASK-1 wurden Herzohrproben von 61 Patienten gesammelt und die Expression ausgewählter miRNAs mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert und nach Rhythmusstatus stratifiziert. Hierbei konnten fünf miRNAs (miR-9, miR-23a, miR-28, miR-34a und miR-124) identifiziert werden, die eine hohe Prävalenz aufwiesen und im Vergleich von Sinusrhythmus zu Vorhofflimmern signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Eine weitere Untersuchung dieser fünf miRNAs zeigte, dass die Transfektion von Imitatoren und Inhibitoren in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zu einer veränderten Expression von TASK-1 auf mRNA-, quantifiziert mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, und Proteinebene, bestimmt mittels Western Blot, führt. In elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten führte miR-34a zu einer vermehrten Expression von TASK-1 und damit einem höheren Kaliumstrom und einem negativeren Ruhemembranpotential. Bei einer Untersuchung von zirkulierender miR-34a auf ihre Eignung als potenzieller Biomarker hin konnte unter Vorhofflimmern eine signifikant höhere Expression beobachtet werden und auch ein Zusammenhang mit einer verstärkten TASK-1-Expression. Eine Cluster-Analyse der miRNA-Expression und klinischen Parametern der Patienten enthüllte eine Gruppe von miRNAs (miR-1, miR-9, miR-21, miR-23a, miR-25, miR-29b, miR-34a, miR-124 und miR-485), die mit Myokarddilatation und Vorhofflimmerstatus signifikant assoziiert sind.

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Doxapram und Ketodoxapram mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten enthüllte eine ausgeprägte Inhibition des humanen TASK-1 im sehr niedrigen Konzentrationsbereich für beide Substanzen (0,81 μM Ketodoxapram, 0,98 μM Doxapram) und auch der porcine TASK-1 wurde in einem ähnlichen Konzentrationsbereich der Substanzen inhibiert. Eine Untersuchung des Effekts auf weitere atriale Kaliumkanäle und die Mitglieder der Zwei-Porendomänen-Kanalfamilie zeigte nur einen ausgeprägten Effekt auf den TASK-3-Kanal, der im humanen Herzen nicht exprimiert wird, und weist auf eine sehr selektive Inhibition im Atrium. In Patch-Clamp-Untersuchungen an frisch isolierten humanen Kardiomyozyten war der bereits beschriebene Effekt von erhöhten TASK-1-Strömen in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus zu erkennen, wodurch dessen Hochregulation in diesem Kollektiv bestätigt werden konnte. Mit Hilfe einer nach Leitlinien der FDA und EMA validierten bioanalytischen Messmethode (UPLC-MS/MS) wurde zur pharmakologischen Charakterisierung in Schweinen die Pharmakokinetik nach intravenöser Einmalgabe von 1 mg/kg Doxapram und Ketodoxapram bestimmt, sowie die Proteinbindung und das Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis. Hierbei konnte für Ketodoxapram im Vergleich zu Doxapram eine deutlich reduzierte Verfügbarkeit im zentralen Nervensystem, ein Hinweis auf weniger zentralnervöse Nebenwirkungen, beobachtet werden und eine sehr hohe Proteinbindung von 99 %, die bei Doxapram mit 96 % geringer ist. Die Bestimmung der Halbwertszeit lag mit Werten von 1,7 h für Ketodoxapram und 1,4 h für Doxapram in einem ähnlichen Bereich. Nach intravenöser Bolusgabe von Doxapram und Ketodoxapram konnte in narkotisierten Schweinen ein akuter Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks beobachten werden, der unter chronischer Anwendung nicht beobachtet wurde.

In Folge der positiven Ergebnisse der elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakterisierung von Ketodoxapram im Vergleich zu Doxapram wurde die Anwendung von Ketodoxapram im Schweinmodell des Vorhofflimmerns getestet und es konnte eine reduzierte Vorhofflimmerlast sowie eine Verlängerung der atrialen effektiven Refraktärzeit gemessen werden. Auch kam es unter der akuten Anwendung von Ketodoxapram zur Terminierung von Vorhofflimmern.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die miR-34a einen bedeutenden Anteil an der Regulation der TASK-1-Expression hat und das Ketodoxapram seiner Muttersubstanz Doxapram sehr ähnlich ist, aber entscheidende Vorteile in Bezug auf Verfügbarkeit im zentralen Nervensystem hat. Auch konnte eine ausgeprägtere Inhibition von TASK-1 gezeigt werden, die der von Doxapram überlegen ist. Somit konnte Ketodoxapram als ideale Substanz für eine TASK-1 basierte Vorhofflimmertherapie identifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Adam, O., Löhlfelm, B., Thum, T., Gupta, S. K., Puhl, S.-L., Schäfers, H.-J., Böhm, M. und Laufs, U. (2012). **Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis**. *Basic Res Cardiol* 107, 278. DOI: 10.1007/s00395-012-0278-0.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W. und Bartel, D. P. (2015). **Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs**. *Elife* 4, e05005. DOI: 10.7554/elife.05005.
- Ameres, S. L., Horwich, M. D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z. und Zamore, P. D. (2010). **Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs**. *Science* 328, 1534–1539. DOI: 10.1126/science.1187058.
- Antigny, F., Hautefort, A., Maloche, J., Belacel-Ouari, M., Manoury, B., Rucker-Martin, C., Péchoux, C., Potus, F., Nadeau, V., Tremblay, E., Ruffenach, G., Bourgeois, A., Dorfmueller, P., Breuils-Bonnet, S., Fadel, E., Ranchoux, B., Jourdon, P., Girerd, B., Montani, D., Provencher, S., Bonnet, S., Simonneau, G., Humbert, M. und Perros, F. (2016). **Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension**. *Circulation* 133, 1371–1385. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.
- Antzelevitch, C. und Burashnikov, A. (2009). **Atrial-selective sodium channel block as a novel strategy for the management of atrial fibrillation**. *J Electrocardiol* 42, 543–548. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.07.007.
- Aranda, J. V., Beharry, K., Rex, J., Linder, N. und Blanchard, P. (1988). **High Pressure Liquid Chromatographic Microassay for Simultaneous Measurement of Doxapram and its Metabolites in Premature Newborn Infants**. *J Liq Chromatogr* 11, 2983–2991. DOI: 10.1080/01483918808076774.
- Arnar, D. O., Thorvaldsson, S., Manolio, T. A., Thorgeirsson, G., Kristjansson, K., Hakonarson, H. und Stefansson, K. (2006). **Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland**. *Eur Heart J* 27, 708–712. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi727.
- Asatsuma-Okumura, T., Ando, H., De Simone, M., Yamamoto, J., Sato, T., Shimizu, N., Asakawa, K., Yamaguchi, Y., Ito, T., Guerrini, L. und Handa, H. (2019). **p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity**. *Nat Chem Biol* 15, 1077–1084. DOI: 10.1038/s41589-019-0366-7.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. und McCarty, M. (1944). **Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III**. *J Exp Med* 79, 137–158. DOI: 10.1084/jem.79.2.137.
- Backes, S., Shapiro, J. S., Sabin, L. R., Pham, A. M., Reyes, I., Moss, B., Cherry, S. und tenOever, B. R. (2012). **Degradation of Host MicroRNAs by Poxvirus Poly(A)**

- Polymerase Reveals Terminal RNA Methylation as a Protective Antiviral Mechanism.** *Cell Host Microbe* 12, 200–210. DOI: 10.1016/j.chom.2012.05.019.
- Bairam, A., Blanchard, P. W., Mullahoo, K., Beharry, K., Laudignon, N. und Aranda, J. V. (1990). **Pharmacodynamic Effects and Pharmacokinetic Profiles of Keto-Doxapram and Doxapram ind Newborn Lambs.** *Pediatr Res* 28, 142–146. DOI: 10.1203/00006450-199008000-00013.
- Bairam, A., Canet, E., Praud, J. P., Aranda, J. V. und Bureau, M. A. (1991). **Ventilatory response to keto-doxapram in intact and carotid body denervated lambs.** *Respir Physiol* 86, 345–354. DOI: 10.1016/0034-5687(91)90105-r.
- Banks, W. A. (2009). **Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier.** *BMC Neurology* 9, S3. DOI: 10.1186/1471-2377-9-S1-S3.
- Barbé, F., Hansen, C., Badonnel, Y., Legagneur, H., Vert, P. und Boutroy, M.-J. (1999). **Severe Side Effects and Drug Plasma Concentrations in Preterm Infants Treated With Doxapram.** *Ther Drug Monit* 21, 547–552. DOI: 10.1097/00007691-199910000-00011.
- Barnard, E. A., Miledi, R. und Sumikawa, K. (1982). **Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215, 241–246. DOI: 10.1098/rspb.1982.0040.
- Bartel, D. P. (2004). **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.** *Cell* 116, 281–297. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Barth, A. S., Merk, S., Arnoldi, E., Zwermann, L., Kloos, P., Gebauer, M., Steinmeyer, K., Bleich, M., Kääb, S., Hinterseer, M., Kartmann, H., Kreuzer, E., Dugas, M., Steinbeck, G. und Nabauer, M. (2005). **Reprogramming of the Human Atrial Transcriptome in Permanent Atrial Fibrillation: Expression of a Ventricular-Like Genomic Signature.** *Circ Res* 96, 1022–1029. DOI: 10.1161/01.RES.0000165480.82737.33.
- Bayliss, D. A., Barhanin, J., Gestreau, C. und Guyenet, P. G. (2015). **The role of pH-sensitives TASK channels in central respiratory chemoreception.** *Pflugers Arch* 467, 917–929. DOI: 10.1007/s00424-014-1633-9.
- Bayliss, D. A., Talley, E. M., Sirois, J. E. und Lei, Q. (2001). **TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive ‘leak’ K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons.** *Respir Physiol* 129, 159–174. DOI: 10.1016/S0034-5687(01)00288-2.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. und Izaurralde, E. (2006). **mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes.** *Genes Dev* 20, 1885–1898. DOI: 10.1101/gad.1424106.
- Benjamin, E. J., Rice, K. M., Arking, D. E., Pfeufer, A., van Noord, C., Smith, A. V., Schnabel, R. B., Bis, J. C., Boerwinkle, E., Sinner, M. F., Dehghan, A., Lubitz, S. A., D’Agostino, R. B., Lumley, T., Ehret, G. B., Heeringa, J., Aspelund, T., Newton-Cheh, C., Larson, M. G., Marcianti, K. D., Soliman, E. Z., Rivadeneira, F., Wang, T. J., Eirísdottir, G., Levy, D., Psaty, B. M., Li, M., Chamberlain, A. M., Hofman, A., Vasan, R. S., Harris, T. B., Rotter, J. I., Kao, W. H. L., Agarwal, S. K., Stricker, B. H. C.,

- Wang, K., Launer, L. J., Smith, N. L., Chakravarti, A., Uitterlinden, A. G., Wolf, P. A., Sotoodehnia, N., Köttgen, A., van Duijn, C. M., Meitinger, T., Mueller, M., Perz, S., Steinbeck, G., Wichmann, H.-E., Lunetta, K. L., Heckbert, S. R., Gudnason, V., Alonso, A., Kääb, S., Ellinor, P. T. und Witteman, J. C. M. (2009). **Variants in *ZFHX3* are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry**. *Nat Genet* 41, 879–881. DOI: 10.1038/ng.416.
- Besana, A., Barbuti, A., Tateyama, M. A., Symes, A. J., Robinson, R. B. und Feinmark, S. J. (2004). **Activation of Protein Kinase C ϵ Inhibits the Two-pore Domain K^+ Channel, TASK-1, Inducing Repolarization Abnormalities in Cardiac Ventricular Myocytes**. *J Biol Chem* 279, 33154–33160. DOI: 10.1074/jbc.M403525200.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. und Sander, C. (2008). **The microRNA.org resource: targets and expression**. *Nucleic Acids Res* 36, D149–D153. DOI: 10.1093/nar/gkm995.
- Bikou, O., Thomas, D., Trappe, K., Lugenbiel, P., Kelemen, K., Koch, M., Soucek, R., Voss, F., Becker, R., Katus, H. A. und Bauer, A. (2011). **Connexin 43 gene therapy prevents persistent atrial fibrillation in a porcine model**. *Cardiovasc Res* 92, 218–225. DOI: 10.1093/cvr/cvr209.
- Billette, J. und Tadros, R. (2019). **An integrated overview of AV node physiology**. *Pacing Clin Electrophysiol* 42, 805–820. DOI: 10.1111/pace.13734.
- Bohnsack, M. T., Czapinski, K. und Görlich, D. (2004). **Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs**. *RNA* 10, 185–191. DOI: 10.1261/rna.5167604.
- Bono, J. d. und Kirchhof, P. (2018). **Is there a CASTLE-AF on the hill?** *Eur Heart J* 39, 1324–1325. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy172.
- Boon, R. A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S., Kaluza, D., Tréguer, K., Carmona, G., Bonauer, A., Horrevoets, A. J. G., Didier, N., Girmatsion, Z., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Katus, H. A., Müller, O. J., Potente, M., Zeiher, A. M., Hermeking, H. und Dimmeler, S. (2013). **MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function**. *Nature* 495, 107–110. DOI: 10.1038/nature11919.
- Botto, G. L. und Tortora, G. (2020). **Is delayed cardioversion the better approach in recent-onset atrial fibrillation? Yes**. *Intern Emerg Med* 15, 1–4. DOI: 10.1007/s11739-019-02225-x.
- Boucherat, O., Chabot, S., Antigny, F., Perros, F., Provencher, S. und Bonnet, S. (2015). **Potassium channels in pulmonary arterial hypertension**. *Eur Respir J* 46, 1167–1177. DOI: 10.1183/13993003.00798-2015.
- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M. und Izaurralde, E. (2012). **A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation**. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1324–1331. DOI: 10.1038/nsmb.2413.
- Bruce, R. B., Pitts, J. E., Pinchbeck, F. und Newman, J. (1965). **Excretion, Distribution, and Metabolism of Doxapram Hydrochloride**. *J Med Chem* 8, 157–164. DOI: 10.1021/jm00326a004.

- Buckler, K. J. (2015). **TASK channels in arterial chemoreceptors and their role in oxygen and acid sensing.** *Pflugers Arch* 467, 1013–1025. DOI: 10.1007/s00424-015-1689-1.
- Buckler, K. J., Williams, B. A. und Honore, E. (2000). **An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells.** *J Physiol* 525, 135–142. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.00135.x.
- Burridge, P. W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z. C., Jared, M., Gold, J. D. und Wu, J. C. (2014). **Chemically defined and small molecule-based generation of human cardiomyocytes.** *Nat Methods* 11, 855–860. DOI: 10.1038/nmeth.2999.
- Burstein, B., Comtois, P., Michael, G., Nishida, K., Villeneuve, L., Yeh, Y.-H. und Nattel, S. (2009). **Changes in Connexin Expression and the Atrial Fibrillation Substrate in Congestive Heart Failure.** *Circ Res* 105, 1213–1222. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183400.
- Burstein, B. und Nattel, S. (2008). **Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation.** *J Am Coll Cardiol* 51, 802–809. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.09.064.
- Caballero, R., de la Fuente, M. G., Gómez, R., Barana, A., Amorós, I., Dolz-Gaitón, P., Osuna, L., Almendral, J., Atienza, F., Fernández-Avilés, F., Pita, A., Rodríguez-Roda, J., Pinto, Á., Tamargo, J. und Delpón, E. (2010). **In Humans, Chronic Atrial Fibrillation Decreases the Transient Outward Current and Ultrarapid Component of the Delayed Rectifier Current Differentially on Each Atria and Increases the Slow Component of the Delayed Rectifier Current in Both.** *J Am Coll Cardiol* 55, 2346–2354. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.02.028.
- Cai, X., Hagedorn, C. H. und Cullen, B. R. (2004). **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *RNA* 10, 1957–1966. DOI: 10.1261/rna.7135204.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R.-H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.-P., Chen, J.-F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H. und Wang, D.-Z. (2009). **MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice.** *J Clin Invest* 119, 2772–2786. DOI: 10.1172/JCI36154.
- Calverley, P. M., Robson, R. H., Wraith, P. K., Prescott, L. F. und Flenley, D. C. (1983). **The Ventilatory Effects of Doxapram in Normal Man.** *Clin Sci* 65, 65–69. DOI: 10.1042/cs0650065.
- Campbell, T. J. und Vaughan Williams, E. M. (1983). **Voltage-and time-dependent depression of maximum rate of depolarisation of guinea-pig ventricular action potentials by two new antiarrhythmic drugs, flecainide and lorcainide.** *Cardiovasc Res* 17, 251–258. DOI: 10.1093/cvr/17.5.251.
- Canter, H. G. (1963). **Comparative study of three respiratory stimulants in chronic obstructive emphysema.** *Am Rev Respir Dis* 87, 830–835. DOI: 10.1164/arrd.1963.87.6.830.

- Capucci, A. und Boriani, G. (1995). **Propafenone in the Treatment of Cardiac Arrhythmias. A Risk-Benefit Appraisal.** *Drug Saf* 12, 55–72. DOI: 10.2165/00002018-199512010-00005.
- Capucci, A. und Compagnucci, P. (2020). **Is delayed cardioversion the better approach in recent-onset atrial fibrillation?** *No. Intern Emerg Med* 15, 5–7. DOI: 10.1007/s11739-019-02224-y.
- Carinopharm (2021). **Fachinformation: Dopram.** [Stand: September 2021].
- Cha, T.-J., Ehrlich, J. R., Chartier, D., Qi, X.-Y. und Nattel, S. (2006). **Kir3-Based Inward Rectifier Potassium Current - Potential Role in Atrial Tachycardia Remodeling Effects on Atrial Repolarization and Arrhythmias.** *Circulation* 114, 1730–1737. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561738.
- Chang, S., Wang, R.-H., Akagi, K., Kim, K.-A., Martin, B. K., Cavallone, L., Haines, D. C., Basik, M., Mai, P., Poggi, E., Isaacs, C., Looi, L. M., Mun, K. S., Greene, M. H., Byers, S. W., Teo, S. H., Deng, C.-X. und Sharan, S. K. (2011). **Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic mircoRNA-155.** *Nat Med* 17, 1275–1282. DOI: 10.1038/nm.2459.
- Change, C.-M., Wu, T.-J., Thou, S., Doshi, R. N., Lee, M.-H., Ohara, T., Fishbein, M. C., Karagueuzian, H. S., Chen, P.-S. und Chen, L. S. (2001). **Nerve Sprouting and Sympathetic Hyperinnervation in a Canine Model of Atrial Fibrillation Produced by Prolonged Right Atrial Pacing.** *Circulation* 103, 22–25. DOI: 10.1161/01.CIR.103.1.22.
- Chaulin, A. M. und Duplyakov, D. V. (2020). **MicroRNAs in Atrial Fibrillation: Pathophysiological Aspects and Potential Biomarkers.** *Int J Biomed* 10, 198–205. DOI: 10.21103/article10(3)_ra3.
- Chen, Y.-H., Xu, S.-J., Bendahhou, S., Wang, X.-L., Wang, Y., Xu, W.-Y., Jin, H.-W., Sun, H., Su, X.-Y., Zhuang, Q.-N., Yang, Y.-Q., Li, Y.-B., Liu, Y., Yu, H.-J., Li, X.-F., Ma Ning amd Mou, C.-P., Chen, Z., Barhanin, J. und Huang, W. (2003). **KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation.** *Science* 299, 251–254. DOI: 10.1126/science.1077771.
- Chen, P.-S., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Lin, S.-F. und Nattel, S. (2014). **Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation.** *Circ Res* 114, 1500–1515. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772.
- Chen, W. S., Gao, B. R., Chen, W. Q., Li, Z. Z., Xu, Z. Y., Zhang, Y. H., Yang, K. und Guan, X. Q. (2013). **Comparison of pharmacological and electrical cardioversion in permanent atrial fibrillation after prosthetic cardiac valve replacement: A prospective randomized trial.** *J Int Med Res* 41, 1067–1073. DOI: 10.1177/0300060513489800.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. und Shiekhattar, R. (2005). **TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.** *Nature* 436, 740–744. DOI: 10.1038/nature03868.
- Cheng, T.-L., Wang, Z., Liao, Q., Zhu, Y., Zhou, W.-H., Xu, W. und Qiu, Z. (2014). **MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth**

- by **Regulating the DGCR8/Drosha Complex**. *Dev Cell* **28**, 547–560. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.01.032.
- Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W. K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J. E., Belloch, R., Schroth, G. P., Nusbaum, C. und Bartel, D. P. (2010). **Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes**. *Genes Dev* **24**, 992–1009. DOI: 10.1101/gad.1884710.
- Choi, E.-K., Shen, M. J., Han, S., Kim, D., Hwang, S., Sayfo, S., Piccirillo, G., Frick, K., Fishbein, M. C., Hwang, C., Lin, S.-F. und Chen, P.-S. (2010). **Intrinsic Cardiac Nerve Activity and Paroxysmal Atrial Tachyarrhythmia in Ambulatory Dogs**. *Circulation* **121**, 2615–2623. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919829.
- Christ, T., Boknik, P., Wohrl, S., Wettwer, E., Graf, E. M., Bosch, R. F., Knaut, M., Schmitz, W., Ravens, U. und Dobrev, D. (2004). **L-type Ca^{2+} Current Down-regulation in Chronic Human Atrial Fibrillation is Associated with Increased Activity of Protein Phosphatases**. *Circulation* **110**, 2651–2657. DOI: 10.1161/01.CIR.0000145659.80212.6A.
- Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O. und Izaurralde, E. (2013). **Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins**. *Mol Cell* **51**, 360–373. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.011.
- Christophersen, I. E., Ravn, L. S., Budtz-Joergensen, E., Skytthe, A., Haunsoe, S., Svendsen, J. H. und Christensen, K. (2009). **Familial Aggregation of Atrial Fibrillation: A Study in Danish Twins**. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **2**, 378–383. DOI: 10.1161/CIRCEP.108.786665.
- Cintra, F. D. und Figueriredo, M. J. d. O. (2021). **Atrial Fibrillation (Part 1): Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Basis**. *Arq Bras Cardiol* **116**, 129–139. DOI: 10.36660/abc.20200485.
- Clauss, S., Sinner, M. F., Kääb, S. und Wakili, R. (2015). **The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation**. *Arrhythm Electrophysiol Rev* **4**, 146–155. DOI: 10.15420/aer.2015.4.3.146.
- Clements, J. A., Robson, R. H. und Prescott, L. F. (1979). **The disposition of intravenous doxapram in man**. *Eur J Clin Pharmacol* **16**, 411–416. DOI: 10.1007/BF00568202.
- Colilla, S., Crow, A., Petkun, W., Singer, D. E., Simon, T. und Liu, X. (2013). **Estimates of Current and Future Incidence and Prevalence of Atrial Fibrillation in the US Adult Population**. *Am J Cardiol* **112**, 1142–1147. DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.05.063.
- Connolly, S. J., Camm, A. J., Halperin, J. L., Joyner, C., Alings, M., Amerena, J., Atar, D., Avezum, Á., Blomström, P., Borggrefe, M., Budaj, A., Chen, S.-A., Ching, C. K., Commerford, P., Dans, A., Davy, J.-M., Delacretaz, Pasquale, G. D., Diaz, R., Dorian, P., Flaker, G., Golitsyn, S., Gonzalez-Hermosillo, A., Granger, C. B., Heidbüchel, H., Kautzner, J., Kim, J. S., Lanas, F., Lewis, B. S., Merino, J. L., Morillo, C., Murin, J., Narasimhan, C., Paolasso, E., Parkhomenko, A., Peters, N. S., Sim, K.-H., Stiles, M. K.,

- Tanomsup, S., Toivonen, L., Tomcsányi, J., Torp-Pedersen, C., Tse, H.-F., Vardas, P., Vinereanu, D., Xavier, D., Zhu, J., Zhu, J.-R., Baret-Cormel, L., Weinling, E., Staiger, C., Yusuf, S., Chrolavicius, S., Afzal, R. und Hohnloser, S. H. (2011). **Dronedarone in High-Risk Permanent Atrial Fibrillation**. *N Engl J Med* 365, 2268–2276. DOI: 10.1056/NEJMoA1109867.
- Connolly, S. J., Ezekowitz, M. D., Yusuf, S., Eikelboom, J., Oldgren, J., Parekh, A., Pogue, J., Reilly, P. A., Themeles, E., Varrone, J., Wang, S., Alings, M., Xavier, D., Zhu, J., Diaz, R., Lewis, B. S., Darius, H., Diener, H. C., Joyner, C. D. und Wallentin, L. (2009). **Dabigatran versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation**. *N Engl J Med* 361, 1139–1151. DOI: 10.1056/NEJMoA0905561.
- Connolly, S. J., Pogue, J., Hart, R., Pfeffer, M., Hohnloser, S., Chrolavicius, S. und Yusuf, S. (2006). **Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Artoal fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial**. *Lancet* 367, 1903–1912. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68845-4.
- Corcoran, C., Rani, S. und O'Driscoll, L. (2014). **miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression**. *Prostate* 74, 1320–1334. DOI: 10.1002/pros.22848.
- Corradi, D. (2014). **Atrial fibrillation from the pathologist's prespective**. *Cardio-vasc Pathol* 23, 71–84. DOI: 10.1016/j.carpath.2013.12.001.
- Cosín-Tomás, M., Antonell, A., Lladó, A., Alcolea, D., Fortea, J., Ezquerra, M., Lleó, A., Martí, M. J., Pallás, M., Sanchez-Valle, R., Molinuevo, J. L., Sanfeliu, C. und Kaliman, P. (2017). **Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: Potential and Limitations**. *Mol Neurobiol* 54, 5550–5562. DOI: 10.1007/s12035-016-0088-8.
- Costanzo, M. R., Khayat, R., Ponikowski, P., Augostini, R., Stellbrink, C., Mianulli, M. und Abraham, W. T. (2015). **Mechanisms and Clinical Consequences of Untreated Central Sleep Apnea in Heart Failure**. *J Am Coll Cardiol* 65, 72–84. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.10.025.
- Cotten, J. F., Keshavaprasad, B., Laster, M. J., Eger, E. I. und Yost, C. S. (2006). **The Ventilatory Stimulant Doxapram Inhibits TASK Tandem Pore (K2P) Potassium Channel Function but Does Not Affect Minimum Alveolar Anesthetic Concentration**. *Anesth Analg* 102, 779–785. DOI: 10.1213/01.ane.0000194289.34345.63.
- Courtemanche, M., Ramirez, R. J. und Nattel, S. (1999). **Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model**. *Cardiovasc Res* 42, 477–489. DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00034-6.
- Coutts, R. T., Jamali, F., Malek, F., Peliowski, A. und Finer, N. N. (1991). **Urinary metabolites of doxapram in premature neonates**. *Xenobiotica* 21, 1407–1418. DOI: 10.3109/00498259109043215.
- Crosswhite, P. und Sun, Z. (2014). **Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling**. *Mol Med* 20, 191–201. DOI: 10.2119/molmed.2013.00165.

- Cunningham, K. P., Holden, R. G., Escribano-Subias, P. M., Cogolludo, A., Veale, E. L. und Mathie, A. (2019). **Characterization and regulation of wild-type and mutant TASK-1 two pore domain potassium channels indicated in pulmonary arterial hypertension.** *J Physiol* 597, 1087–1101. DOI: 10.1113/JP277275.
- Cunningham, K. P., MacIntyre, D. E., Mathie, A. und Veale, E. L. (2020). **Effects of the ventilatory stimulant, doxapram on human TASK-3 (KCNK9, K2P9.1) channels and TASK-1 (KCNK3, K2P3.1) channels.** *Acta Physiol* 228, e13361. DOI: 10.1111/apha.13361.
- Cushny, A. R. (1903). **Atropine and the hyoscyamines — a study of the action of optical isomers.** *J Physiol* 30, 176–194. DOI: 10.1113/jphysiol.1903.sp000988.
- Cutler, M. J., Jeyaraj, D. und Rosenbaum, D. S. (2011). **Cardiac electrical remodeling in health and disease.** *Trends Pharmacol Sci* 32, 174–180. DOI: 10.1016/j.tips.2010.12.001.
- Czirják, G., Petheo, G. L., Spät, A. und Enyedi, P. (2001). **Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C.** *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C700–C708. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.2.c700.
- Dankner, R., Shahar, A., Novikov, I., Agmon, U., Ziv, A. und Hod, H. (2009). **Treatment of Stable Atrial Fibrillation in the Emergency Department: A Population-Based Comparison of Electrical Direct-Current versus Pharmacological Cardioversion or Conservative Management.** *Cardiology* 112, 270–278. DOI: 10.1159/000151703.
- Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. und Hata, A. (2008). **SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation.** *Nature* 454, 56–61. DOI: 10.1038/nature07086.
- Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. und Hata, A. (2010). **Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha.** *Mol Cell* 39, 373–384. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.07.011.
- Davis-Dusenbery, B. N. und Hata, A. (2010). **Mechanisms of control of microRNA biogenesis.** *J Biochem* 148, 381–392. DOI: 10.1093/jb/mvq096.
- De Caterina, R., Husted, S., Wallentin, L., Andreotti, F., Arnesen, H., Bachmann, F., Baigent, C., Huber, K., Jaspersen, J., Kristensen, S. D., Lip, G. Y. H., Morais, J., Rasmussen, L. H., Siegbahn, A., Verheugt, F. W. A. und Weitz, J. I. (2013). **Vitamin K antagonists in heart disease: Current status and perspectives (Section III).** *Thromb Haemost* 110, 1087–1107. DOI: 10.1160/TH13-06-0443.
- De Simone, A., De Pasquale, M., De Matteis, C., Canciello, M., Manzo, M., Sabino, L., Alfano, F., Di Mauro, M., Campana, A., De Fabrizio, G., Vitale, D. F., Turco, P. und Stabile, G. (2003). **Verapamil Plus Antiarrhythmic drugs Reduce Atrial Fibrillation recurrences after an electrical cardioversion (VEPARAF Study).** *Eur Heart J* 24, 1425–1429. DOI: 10.1016/S0195-668X(03)00311-7.
- De Villiers, G. S., Walele, A., Van der Merwe, P. L. und Kalis, N. N. (1998). **Second-degree atrioventricular heart block after doxapram administration.** *J Pediatr* 133, 149–150. DOI: 10.1016/s0022-3476(98)70197-0.

- de Wildt, S. N., Sie, S. D., Dullemond, R. C., Vulto, A. P. und van den Anker, J. N. (2005). **Oral pharmacokinetics of doxapram in preterm infants.** Clin Pharmacol Ther 77, P68. DOI: 10.1016/j.clpt.2004.12.153.
- Delgado, V., Di Biase, L., Leung, M., Romero, J., Tops, L. F., Casadei, B. und Marrouche Nassir Bax, J. J. (2017). **Structure and Function of the Left Atrium and Left Atrial Appendage: AF and Stroke Implications.** J Am Coll Cardiol 70, 3157–3172. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.10.063.
- Diederichs, S. und Haber, D. A. (2007). **Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression.** Cell 131, 1097–1108. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.032.
- Diness, J. G., Sørensen, U. S., Nissen, J. D., Al-Shahib, B., Jespersen, T., Grunnet, M. und Hansen, R. S. (2010). **Inhibition of Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels Terminates and Protects Against Atrial Fibrillation.** Circ Arrhythm Electrophysiol 3, 380–390. DOI: 10.1161/CIRCEP.110.957407.
- Dobrev, D., Carlsson, L. und Nattel, S. (2012). **Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy.** Nat Rev Drug Discov 11, 275–291. DOI: 10.1038/nrd3682.
- Dobrev, D., Friedrich, A., Voigt, N., Jost, N., Wettwer, E., Christ, T., Knaut, M. und Ravens, U. (2005). **The G Protein-Gated Potassium current $\text{I}_{\text{K,ACh}}$ is Constitutively Active in Patients with Chronic Atrial Fibrillation.** Circulation 112, 3697–3706. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.575332.
- Dobrev, D. und Nattel, S. (2008). **Calcium Handling Abnormalities in Atrial Fibrillation as a Target for Innovative Therapeutics.** J Cardiovasc Pharmacol 52, 293–299. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318171924d.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E. und Meister, G. (2012). **microRNAs associated with the different human Argonaute proteins.** Nucleic Acids Res 40, 9850–9862. DOI: 10.1093/nar/gks705.
- Dukes, I. D. und Vaughan Williams, E. M. (1984). **Effects of selective alpha 1-, alpha 2-, beta 1-and beta 2-adrenoceptor stimulation on potentials and contractions in the rabbit heart.** J Physiol 355, 523–546. DOI: 10.1113/jphysiol.1984.sp015436.
- Echt, D. S., Liebson, P. R., Mitchell, L. B., Peters, R. W., Obias-Manno, D., Barker, A. H., Arensberg, D., Baker, A., Friedman, L., Greene, H. L., Huther, M. L. und Richardson, D. W. (1991). **Mortality and Morbidity in Patients Receiving Encainide, Flecainide, or Placebo — The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial.** N Engl J Med 324, 781–788. DOI: 10.1056/NEJM199103213241201.
- Edvardsson, N., Hirsch, I., Emanuelsson, H., Ponten, J. und Olsson, S. B. (1980). **Sotalol-induced delayed ventricular repolarization in man.** Eur Heart J 1, 335–343. DOI: 10.1093/eurheartj/1.5.335.
- Ehrlich, J. R., Nattel, S. und Hohnloser, S. H. (2007). **Novel Anti-Arrhythmic Drugs for Atrial Fibrillation Management.** Curr Vasc Pharmacol 5, 185–194. DOI: 10.2174/157016107781024073.
- Eikelboom, J. W. und Weitz, J. I. (2010). **New Anticoagulants.** Circulation 121, 1523–1532. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853119.

- Ellinor, P. T., Lunetta, K. L., Glazer, N. L., Pfeufer, A., Alonso, A., Chung, M. K., Sinner, M. F., de Bakker, P. I. W., Mueller, M., Lubitz, S. A., Fox, E., Darbar, D., Smith, N. L., Smith, J. D., Schnabel, R. B., Soliman, E. Z., Rice, K. M., van Wagoner, D. R., Beckmann, B.-M., van Noord, C., Wang, K., Ehret, G. B., Rotter, J. I., Hazen, S. L., Steinbeck, G., Smith, A. V., Launer, L. J., Harris, T. B., Makino, S., Nelis, M., Milan, D. J., Perz, S., Esko, T., Köttgen, A., Moebus, S., Newton-Cheh, C., Li, M., Möhlenkamp, S., Wang, T. J., Kao, W. H. L., Vasan, R. S., Nöthen, M. M., MacRae, C. A., Stricker, B. H. C., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Levy, D., Boerwinkle, E., Metspalu, A., Topol, E. J., Chakravarti, A., Gudnason, V., Psaty, B. M., Roden, D. M., Meitinger, T., Wichmann, H.-E., Witteman, J. C., Barnard, J., Arking, D. E., Benjamin, E. J., Hackbert, S. R. und Kääb, S. (2010). **Common variants in *KCNJ3* are associated with lone atrial fibrillation**. *Nat Genet* 42, 240–244. DOI: 10.1038/ng.537.
- Ellinor, P. T., Yoerger, D. M., Ruskin, J. N. und MacRae, C. A. (2005). **Familial aggregation in lone atrial fibrillation**. *Hum Genet* 118, 179–184. DOI: 10.1007/s00439-005-0034-8.
- Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B., Fyge, Å. und Höglund, P. (1995). **Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide**. *Chirality* 7, 44–52. DOI: 10.1002/chir.530070109.
- European Medicines Agency (2011). **Guideline on Bioanalytical Method Validation: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. [Stand: 06.11.2022].
- Farberov, L., Herzig, E., Modai, S., Isakov, O., Hizi, A. und Shomron, N. (2015). **MicroRNA-mediated regulation of p21 and TASK1 cellular restriction factors enhances HIV-1 infection**. *J Cell Sci* 128, 1607–1616. DOI: 10.1242/jcs.167817.
- Fatkin, D., Santiago, C. F., Huttner, I. G., Lubitz, S. A. und Ellinor, P. T. (2017). **Genetics of Atrial Fibrillation: State of the Art in 2017**. *Heart Lung Circ* 26, 894–901. DOI: 10.1016/j.hlc.2017.04.008.
- Fedida, D., Wible, B., Wang, Z., Fermini, B., Faust, F., Nattel, S. und Brown, A. M. (1993). **Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current**. *Circ Res* 73, 210–216. DOI: 10.1161/01.RES.73.1.210.
- Fedida, D. (2007). **Vernakalant (RSD1235): a novel, atrial-selective antifibrillatory agent**. *Expert Opin Invest Drugs* 16, 519–532. DOI: 10.1517/13543784.16.4.519.
- Fedida, D., Orth, P. M. R., Chen, J. Y. C., Lin, S., Plouvier, B., Jung, G., Ezrin, A. M. und Beatch, G. N. (2005). **The Mechanism of Atrial Antiarrhythmic Action of RSD1235**. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16, 1227–1238. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2005.50028.x.
- Feldman, A., Moreira, D. A. R., Gun, C., Wang, H.-T. L., Hirata, M. H., Germano, J. d. F., Leite, G. G. S. und Farsky, P. (2017). **Analysis of Circulating miR-1, miR-23a, and miR-26a in Atrial Fibrillation Patients Undergoing Coronary Bypass Artery Grafting Surgery**. *Ann Hum Genet* 81, 99–105. DOI: 10.1111/ahg.12188.

- Feldman, J. L., Mitchell, G. S. und Nattie, E. E. (2003). **Breathing: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity**. *Annu Rev Neurosci* 26, 239–266. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103.
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D. und Lesage, F. (2015). **The family of K₂P channels: salient structural and functional properties**. *J Physiol* 593, 2587–2603. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.287268.
- Fischer, E. S., Böhm, K., Lydeard, J. R., Yang, H., Stadler, M. B., Cavadini, S., Nagel, J., Serluca, F., Acker, V., Lingaraju, G. M., Tichkule, R. B., Schebesta, M., Forrester, W. C., Schirle, M., Hassiepen, U., Ottl, J., Hild, M., Beckwith, R. E. J., Harper, J. W., Jenkins, J. L. und Thomä, N. H. (2014). **Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide**. *Nature* 512, 49–53. DOI: 10.1038/nature13527.
- Flack, H. D. (2009). **Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work**. *Acta Crystallogr A* 65, 371–389. DOI: 10.1107/S0108767309024088.
- Flint, R. B., Bahmany, S., van der Nagel, B. C. H. und Koch, B. C. P. (2018). **Simultaneous quantification of fentanyl, sufentanil, cefazolin, doxapram and keto-doxapram in plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. *Biomed Chromatogr* 32, e4290. DOI: 10.1002/bmc.4290.
- Flint, R. B., Simons, S. H. P., Andriessen, P., Liem, K. D., Degraeuwe, P. L. J., Reiss, I. K. M., Heine, R. T., Engbers, A. G. J., Koch, B. C. P., de Groot, R., Burger, D. M., Knibbe, C. A. J. und Völler, S. (2021). **The bioavailability and maturing clearance of doxapram in preterm infants**. *Pediatr Res* 89, 1268–1277. DOI: 10.1038/s41390-020-1037-9.
- Florence, A. L. (1960). **Is Thalidomide to Blame?** *Br Med J* 2, 1954. DOI: 10.1136/bmj.2.5217.1954.
- Food and Drug Administration (2018). **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry**. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. [Stand: 06.11.2022].
- Forman, J. J., Legesse-Miller, A. und Collier, H. A. (2008). **A search for conserved sequences in coding regions reveals that the *let-7* microRNA targets Dicer within its coding sequence**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14879–14884. DOI: 10.1073/pnas.0803230105.
- Fox, C. S., Parise, H., D'Agostino Sr, R. B., Lloyd-Jones, D. M., Vasan, R. S., Wang, T. J., Levy, D., Wolf, P. A. und Benjamin, E. J. (2004). **Parental Atrial Fibrillation as a Risk Factor for Atrial Fibrillation in Offspring**. *JAMA* 291, 2851–2855. DOI: 10.1001/jama.291.23.2851.
- Fraser, H. R. L. und Turner, R. W. D. (1955). **Auricular Fibrillation with Special Reference to Rheumatic Heart Disease**. *Br Med J* 2, 1414–1418. DOI: 10.1136/bmj.2.4953.1414.
- Frey, W. (1918). **Ueber Vorhofflimmern beim Menschen und seine Beseitigung durch Chiniden**. *Berl klin Wschr* 55, 417–419 und 450–452.

- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. und Bartel, D. P. (2009). **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 19, 92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- Funck-Brentano, C. (1993). **Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of d-sotalol and d,l-sotalol.** *Eur Heart J* 14, 30–35. DOI: 10.1093/eurheartj/14.suppl_H.30.
- Funck-Brentano, C., Kroemer, H. K., Lee, J. T. und Roden, D. M. (1990). **Propafenone.** *N Engl J Med* 322, 518–525. DOI: 10.1056/NEJM19900223220806.
- Funderburk, W. H., Oliver, K. L. und Ward, J. W. (1966). **Electrophysiologic Analysis of the Site of Action of Doxapram Hydrochloride.** *J Pharmacol Exp Ther* 151, 360–368. DOI: 10.1097/00132586-196702000-00020.
- Furniss, S. S. und Sneyd, J. R. (2015). **Safe sedation in modern cardiological practice.** *Heart* 101, 1526–1530. DOI: 10.1136/heartjnl-2015-307656.
- Fürnkranz, A., Brugada, J., Albenque, J.-P., Tondo, C., Bestehorn, K., Wegscheider, K., Ouyang, F. und Kuck, K.-H. (2014). **Rationale and Design of FIRE AND ICE: A Multicenter Randomized Trial Comparing Efficacy and Safety of Pulmonary Vein Isolation Using a Cryoballoon versus Radiofrequency Ablation with 3D-Reconstruction.** *J Cardiovasc Electrophysiol* 25, 1314–1320. DOI: 10.1111/jce.12529.
- Fye, W. B. (1987). **The origin of the heart beat: a tale of frogs, jellyfish, and turtles.** *Circulation* 76, 493–500. DOI: 10.1161/01.CIR.76.3.493.
- Gaborit, N., Steenman, M., Lamirault, G., Le Meur, N., Le Bouter, S., Lande, G., Léger, J., Charpentier, F., Christ, T., Dobrev, D., Escande, D., Nattel, S. und Demolombe, S. (2005). **Human Atrial Ion Channel and Transporter Subunit Gene-Expression Remodeling Associated With Valvular Heart Disease and Atrial Fibrillation.** *Circulation* 112, 471–481. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857.
- Gainé, S. und McLaughlin, V. (2017). **Pulmonary arterial hypertension: tailoring treatment to risk in the current era.** *Eur Respir Rev* 26, 170095. DOI: 10.1183/16000617.0095-2017.
- Garcia, D., Libby, E. und Crowther, M. A. (2010). **The new oral anticoagulants.** *Blood* 115, 15–20. DOI: 10.1182/blood-2009-09-241851.
- Gastaut, H., Tassinari, C. A. und Duron, B. (1966). **Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the Pickwick syndrome.** *Brain Res* 1, 167–186. DOI: 10.1016/0006-8993(66)90117-X.
- Girmatsion, Z., Biliczki, P., Bonauer, A., Wimmer-Greinecker, G., Scherer, M., Moritz, A., Bukowska, A., Goette, A., Nattel, S., Hohnloser, S. H. und Ehrlich, J. R. (2009). **Changes in microRNA-1 expression and I_{K1} up-regulation in human atrial fibrillation.** *Heart Rhythm* 6, 1802–1809. DOI: 10.1016/j.hrthm.2009.08.035.
- Giugliano, R. P., Ruff, C. T., Braunwald, E., Murphy, S. A., Wiviott, S. D., Halperin, J. L., Waldo, A. L., Ezekowitz, M. D., Weitz, J. I., Špinar, J., Ruzyllo, W., Ruda, M., Koretsune, Y., Betcher, J., Shi, M., Grip, L. T., Patel, S. P., Patel, I., Hanyok, J. J., Mercuri, M. und Antman, E. M. (2013). **Edoxaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 369, 2093–2104. DOI: 10.1056/NEJMoa1310907.

- Goldberger, Z. D. und Alexander, G. C. (2014). **Digitalis Use in Contemporary Clinical Practice: Refitting the Foxglove**. *JAMA Intern Med* 174, 151–154. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.10432.
- Golder, F. J., Hewitt, M. M. und McLeod, J. F. (2013). **Respiratory stimulant drugs in the post-operative setting**. *Respir Physiol Neurobiol* 189, 395–402. DOI: 10.1016/j.resp.2013.06.010.
- Golder, F. J., Gruber, R. B., Baby, S. M., Puskovic, V., Ideo, C. M., Peng, S., Dax, S. L., MacIntyre, D. E. und Mannion, J. C. (2012a). **Enantiomeric separation of doxapram reveals a superior respiratory stimulant, GAL-054**. *FASEB J* 26, 894.22. DOI: 10.1096/fasebj.26.1_supplement.894.22.
- Golder, F. J., Gruber, R. B., Puskovic, V., Peng, S., Dax, S. L., MacIntyre, D. E. und Mannion, J. C. (2012b). **Reversal of opioid-induced respiratory depression by the (+)-enantiomer, GAL-054, but not the (-)-enantiomer, GAL-053, of doxapram**. *FASEB J* 26, 704.26. DOI: 10.1096/fasebj.26.1_supplement.704.26.
- Goldschlager, N., Epstein, A. E., Naccarelli, G. V., Olshansky, B., Singh, B., Collard, H. R. und Murphy, E. (2007). **A Practical Guide for Clinicians Who Treat Patients with Amiodarone: 2007**. *Heart Rhythm* 4, 1250–1259. DOI: 10.1016/j.hrthm.2007.07.020.
- Goldstein, S. A. N., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D. und Rajan, S. (2005). **International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels**. *Pharmacol Rev* 57, 527–540. DOI: 10.1124/pr.57.4.12.
- Goldstein, S. A. N., Bockenhauer, D., O’Kelly, I. und Zilberberg, N. (2001). **Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits**. *Nat Rev Neurosci* 2, 175. DOI: 10.1038/35058574.
- Grandi, E., Pandit, S. V., Voigt, N., Workman, A. J., Dobrev, D., Jalife, J. und Bers, D. M. (2011). **Human Atrial Action Potential and Ca²⁺ Model: Sinus Rhythm and Chronic Atrial Fibrillation**. *Circ Res* 109, 1055–1066. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253955.
- Granger, C. B., Alexander, J. H., McMurray, J. J. V., Lopes, R. D., Hylek, E. M., Hanna, M., Al-Khalidi, H. R., Ansell, J., Atar, D., Avezum, A., Bahit, M. C., Diaz, R., Easton, J. D., Ezvckowitz, J. A., Flaker, G., Garcia, D., Gerald, M., Gersh, B. J., Golitsyn, S., Goto, S., Hermosillo, A. G., Hohnloser, S. H., Horowitz, J., Mohan, P., Jansky, P., Lewis, B. S., Lopez-Sendon, J. L., Pais, P., Parkhomenko, A., Verheugt, F. W., Zhu, J. und Wallentin, L. (2011). **Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation**. *N Engl J Med* 365, 981–992. DOI: 10.1056/NEJMoa1107039.
- Gregory, R. I., Yan, K.-p., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. und Shiekhattar, R. (2004). **The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs**. *Nature* 432, 235–240. DOI: 10.1038/nature03120.
- Griffin, W. R., Nelson, H. G. und Seal, J. R. (1950). **Hemochromatosis with auricular fibrillation: A case report**. *Am Heart J* 39, 904–908. DOI: 10.1016/0002-8703(50)90304-8.

- Grimaldi-Bensouda, L., Wedemeyer, H., Wiegand, J., Lohse, A. W., Benichou, J., Rossignol, M., Larrey, D., Abenhaim, L., Poynard, T. und Schott, E. (2018). **Dronedarone, amiodarone and other antiarrhythmic drugs, and acute liver injuries: a case-referent study.** *Int J Cardiol* 266, 100–105. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.04.007.
- Groenveld, H. F., Crijns, H. J. G. M., Van den Berg, M. P., Van Sonderen, E., Alings, A. M., Tijssen, J. G. P., Hillege, H. L., Tuininga, Y. S., Van Veldhuisen, D. J., Ranchor, A. V. und Van Gelder, I. C. (2011). **The Effect of Rate Control on Quality of Life in Patients With Permanent Atrial Fibrillation: Data From the RACE II (Rate Control Efficacy in Permanent Atrial Fibrillation II) Study.** *J Am Coll Cardiol* 58, 1795–1803. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.055.
- Gudbjartsson, D. F., Arnar, D. O., Helgadóttir, A., Gretarsdóttir, S., Holm, H., Sigurdsson, A., Jonasdóttir, A., Baker, A., Thorleifsson, G., Kristjansson, K., Pálsson, A., Blondal, T., Sulem, P., Backman, V. M., Hardarson, G. A., Palsdóttir, E., Helgason, A., Sigurjonsdóttir, R., Sverrisson, J. T., Kostulas, K., Ng, M. C. Y., Baum, L., So, W. Y., Wong, K. S., Chan, J. C. N., Furie, K. L., Greenberg, S. M., Sale, M., Kelly, P., MacRae, C. A., Smith, E. E., Rosand, J., Hillert, J., Ma, R. C. W., Ellinor, P. T., Thorgeirsson, G., Gulcher, J. R., Kong, A., Thorsteinsdóttir, U. und Stefansson, K. (2007). **Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25.** *Nature* 448, 353–357. DOI: 10.1038/nature06007.
- Gudbjartsson, D. F., Holm, H., Gretarsdóttir, S., Thorleifsson, G., Walters, G. B., Thorgeirsson, G., Gulcher, J., Mathiesen, E. B., Njølstad, I., Nyrnes, A., Wilsgaard, T., Hald, E. M., Hveem, K., Stoltenberg, C., Kucera, G., Stubblefield, T., Carter, S., Roden, D., Ng, M. C. Y., Baum, L., So, W. Y., Wong, K. S., Chan, J. C. N., Gieger, C., Wichmann, H.-E., Gschwendtner, A., Dichgans, M., Kühlenbäumer, G., Berger, K., Ringelstein, E. B., Bevan, S., Markus, H. S., Kostulas, K., Hillert, J., Sveinbjörnsdóttir, S., Valdimarsson, E. M., Løchen, M.-L., Ma, R. C. W., Darbar, D., Kong, A., Arnar, D. O., Thorsteinsdóttir, U. und Stefansson, K. (2009). **A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke.** *Nat Genet* 41, 876–878. DOI: 10.1038/ng.417.
- Guilleminault, C., Tilkian, A. und Dement, W. C. (1976). **The Sleep Apnea Syndromes.** *Annu Rev Med* 27, 465–484. DOI: 10.1146/annurev.me.27.020176.002341.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. und Marbaix, G. (1971). **Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living cells.** *Nature* 233, 177–182. DOI: 10.1038/233177a0.
- Ha, M. und Kim, V. N. (2014). **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509–524. DOI: 10.1038/nrm3838.
- Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A. und Filipowicz, W. (2005). **TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.** *EMBO Rep* 6, 961–967. DOI: 10.1038/sj.embor.7400509.
- Haegeli, L. M. und Calkins, H. (2014). **Catheter ablation of atrial fibrillation: an update.** *Eur Heart J* 35, 2454–2459. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu291.

- Haissaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Métayer, P. und Clémenty, J. (1998). **Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins.** *N Engl J Med* 339, 659–666. DOI: 10.1056/NEJM199809033391003.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. und Hannon, G. J. (2001). **Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi.** *Science* 293, 1146–1150. DOI: 10.1126/science.1064023.
- Han, H., Qu, G., Han, C., Wang, Y., Sun, T., Li, F., Wang, J. und Luo, S. (2015). **MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort.** *Exp Mol Med* 47, e138–e138. DOI: 10.1038/emmm.2014.81.
- Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Belloch, R. und Kim, V. N. (2009). **Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8.** *Cell* 136, 75–84. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.053.
- Harrison, R. G. (1910). **The Outgrowth of the Nerve Fiber as a Mode of Protoplasmic Movement.** *J Exp Zool* 9, 787–846. DOI: 10.1002/jez.1400090405.
- Hart, R. G., Pearce, L. A. und Aguilar, M. I. (2007). **Meta-analysis: Antithrombotic Therapy to Prevent Stroke in Patients Who Have Nonvalvular Atrial Fibrillation.** *Ann Intern Med* 146, 857–867. DOI: 10.7326/0003-4819-146-12-200706190-00007.
- Heijman, J., Rahm, A.-K. und Dobrev, D. (2021). **Stretching the limits of antiarrhythmic drug therapy: The promise of small-conductance calcium-activated potassium channel blockers.** *Int J Cardiol Heart Vasc* 37, 100924. DOI: 10.1016/j.ijcha.2021.100924.
- Heijman, J., Voigt, N., Nattel, S. und Dobrev, D. (2012). **Calcium handling and atrial fibrillation.** *Wien Med Wochenschr* 162, 287–291. DOI: 10.1007/s10354-012-0109-9.
- Henriksson, K. M., Farahmand, B., Åsberg, S., Edvardsson, N. und Terént, A. (2012). **Comparison of Cardiovascular Risk Factors and Survival in Patients with Ischemic or Hemorrhagic Stroke.** *Int J Stroke* 7, 276–281. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2011.00706.x.
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J. und Kim, V. N. (2008). **Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA.** *Mol Cell* 32, 276–284. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.014.
- Herbert, K. M., Pimental, G., DeGregorio, S. J., Alexandrov, A. und Steitz, J. A. (2013). **Phosphorylation of DGCR8 Increases Its Intracellular Stability and Induces a Progrowth miRNA Profile.** *Cell Rep* 5, 1070–1081. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.017.
- Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J. J., Blomström-Lundqvist, C., Boriani, G., Castella, M., Dan, G.-A., Dilaveris, P. E., Fauchier, L., Filippatos, G., Kalman, J. M., La Meir, M., Lane, D. A., Lebeau, J.-P., Lettino, M., Lip, G. Y. H., Pinto, F. J., Thomas, G. N., Valgimigli, M., Van Gelder, I. C., Van Putte, B. P. und Watkins, C. L. (2021). **2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for**

- Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC.** *Eur Heart J* 42, 373–498. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa612.
- Hirsh, K. und Wang, S. C. (1974). **Selective Respiratory Stimulating Action of Doxapram Compared to Pentylenetetrazol.** *J Pharmacol Exp Ther* 19, 129–130. DOI: 10.1097/00132586-197504000-00015.
- Hla, K. M., Young, T., Hagen, E. W., Stein, J. H., Finn, L. A., Nieto, F. J. und Peppard, P. E. (2015). **Coronary Heart Disease Incidence in Sleep Disordered Breathing: The Wisconsin Sleep Cohort Study.** *Sleep* 38, 677–684. DOI: 10.5665/sleep.4654.
- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952). **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.** *J Physiol* 117, 500–544. DOI: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764.
- Höglund, P., Eriksson, T. und Björkman, S. (1998). **A Double-blind Study of the Sedative Effects of the Thalidomide Enantiomers in Humans.** *J Pharmacokinet Biopharm* 26, 363–383. DOI: 10.1023/A:1021008016719.
- Hohnloser, S. H., Crijns, H. J. G. M., Van Eickels, M., Gaudin, C., Page, R. L., Torp-Pedersen, C. und Connolly, S. J. (2009). **Effect of Dronedarone on Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 360, 668–678. DOI: 10.1056/NEJMoa0803778.
- Holmes, B. und Heel, R. C. (1985). **Flecainide. A Preliminary Review of its Pharmacodynamic Properties and Therapeutic Efficacy.** *Drugs* 29, 1–33. DOI: 10.2165/00003495-198529010-00001.
- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D. und Orth, A. P. (2013). **Akt-Mediated Phosphorylation of Argonaute 2 Downregulates Cleavage and Upregulates Translational Repression of MicroRNA Targets.** *Mol Cell* 50, 356–367. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.03.015.
- Hsueh, C.-H., Chang, P.-C., Hsieh, Y.-C., Reher, T., Chen, P.-S. und Lin, S.-F. (2013). **Proarrhythmic effect of blocking the small conductance calcium activated potassium channel in isolated canine left atrium.** *Heart Rhythm* 10, 891–898. DOI: 10.1016/j.hrthm.2013.01.033.
- Huang, Y., Zou, Y., Lin, L., Ma, X. und Chen, H. (2018). **Identification of serum miR-34a as a potential biomarker in acute myeloid leukemia.** *Cancer Biomark* 22, 799–805. DOI: 10.3233/CBM-181381.
- Hudgel, D. W., Gordon, E. A., Thanakitcharu, S. und Bruce, E. N. (1998). **Instability of Ventilatory Control in Patients with Obstructive Sleep Apnea.** *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1142–1149. DOI: 10.1164/ajrccm.158.4.9712105.
- Huffington, P. und Craythorne, N. W. (1966). **Effect of doxapram on heart rhythm during anesthesia in dog and man.** *Anesth Analg*, 558–563. DOI: 10.1213/00000539-196609000-00008.

- Humbert, M., Sitbon, O. und Simonneau, G. (2004). **Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension**. *N Engl J Med* 351, 1425–1436. DOI: 10.1056/NEJMra040291.
- Hurdman, J., Condliffe, R., Elliot, C. A., Davies, C., Hill, C., Wild, J. M., Capener, D., Sephton, P., Hamilton, N., Armstrong, I. J., Billings, C., Lawrie, A., Sabroe, I., Akil, M., O’Toole, L. und Kiely, D. G. (2012). **ASPIRE registry: Assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a REferral centre**. *Eur Respir J* 39, 945–955. DOI: 10.1183/09031936.00078411.
- Inui, M., Martello, G. und Piccolo, S. (2010). **MicroRNA control of signal transduction**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 252–263. DOI: 10.1038/nrm2868.
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. und Handa, H. (2010). **Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity**. *Science* 327, 1345–1350. DOI: 10.1126/science.1177319.
- Ito, T. und Handa, H. (2020). **Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives**. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 96, 189–203. DOI: 10.2183/pjab.96.016.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T. und Tomari, Y. (2010). **Hsc70/hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes**. *Mol Cell* 39, 292–299. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.
- Jacques, V., Czarnik, A. W., Judge, T. M., Van der Ploeg, L. H. T. und DeWitt, S. H. (2015). **Differentiation of antiinflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E1471–E1479. DOI: 10.1073/pnas.1417832112.
- James, T. N. (1977). **The sinus node**. *Am J Cardiol* 40, 965–986. DOI: 10.1016/0002-9149(77)90048-0.
- James, T. N. (1982). **The development of ideas concerning the conduction system of the heart**. *Ulster Med J* 51, 81–97.
- January, C. T., Wann, L. S., Alpert, J. S., Calkins, H., Cigarroa, J. E., Cleveland, J. C., Conti, J. B., Ellinor, P. T., Ezekowitz, M. D., Field, M. E., Murray, K. T., Sacco, R. L., Stevenson, W. G., Tchou, P. J., Tracy, C. M. und Yancy, C. W. (2014). **2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society**. *J Am Coll Cardiol* 64, e1–e76. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.03.022.
- Ji, R., Cheng, Y., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H., Dean, D. B. und Zhang, C. (2007). **MicroRNA Expression Signature and Antisense-Mediated Depletion Reveal an Essential Role of MicroRNA in Vascular Neointimal Lesion Formation**. *Circ Res* 100, 1579–1588. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.106.141986.
- Jiang, C., Rojas, A., Wang, R. und Wang, X. (2005). **CO₂ central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules?** *Respir Physiol Neurobiol* 145, 115–126. DOI: 10.1016/j.resp.2004.07.005.
- Jin, X., Yu, L.-L. und Yu, C.-X. (2019). **Effect of miR-9 on myocardial fibrosis in rats via TGF- β 1/Smads signaling pathway**. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23, 7083–7088. DOI: 10.26355/eurrev_201908_18752.

- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J. und Hohng, S. (2015). **Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs**. *Mol Cell* *59*, 117–124. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.027.
- Jonas, S. und Izaurralde, E. (2015). **Towards a molecular understanding of micro-RNA-mediated gene silencing**. *Nat Rev Genet* *16*, 421–433. DOI: 10.1038/nrg3965.
- Kadener, S., Rodriguez, J., Abruzzi, K. C., Khodor, Y. L., Sugino, K., Marr, M. T., Nelson, S. und Rosbash, M. (2009). **Genome-wide identification of targets of the *drosha-pasha/DGCR8* complex**. *RNA* *15*, 537–545. DOI: 10.1261/rna.1319309.
- Kambayashi, R., Hagiwara-Nagasawa, M., Ichikawa, T., Goto, A., Chiba, K., Nunoi, Y., Izumi-Nakaseko, H., Matsumoto, A., Takahara, A. und Sugiyama, A. (2020). **Analysis of electropharmacological effects of AVE0118 on the atria of chronic atrioventricular block dogs: characterization of anti-atrial fibrillatory action by atrial repolarization-delaying agent**. *Heart Vessels* *35*, 1316–1322. DOI: 10.1007/s00380-020-01612-1.
- Kang, D., Han, J., Talley, E. M., Bayliss, D. A. und Kim, D. (2004). **Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells**. *J Physiol* *554*, 64–77. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.054387.
- Kassem, N. M., Makar, W. S., Kassem, H. A., Talima, S., Tarek, M., Hesham, H. und El-Desouky, M. A. (2019). **Circulating miR-34a and miR-125b as Promising non Invasive Biomarkers in Egyptian Locally Advanced Breast Cancer Patients**. *Asian Pac J Cancer Prev* *20*, 2749–2755. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.9.2749.
- Kato, H. und Buckley, J. P. (1964). **Possible sites of action of the respiratory stimulant effect of doxapram hydrochloride**. *J Pharmacol Exp Ther* *144*, 260–264. DOI: 10.1097/00132586-196504000-00016.
- Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kaschiwabara, S.-i., Baba, T. und Suzuki, T. (2009). **Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2**. *Genes Dev* *23*, 433–438. DOI: 10.1101/gad.1761509.
- Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T. P., Shiekhattar, R. und Nishikura, K. (2007). **RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex**. *EMBO Rep* *8*, 763–769. DOI: 10.1038/sj.embor.7401011.
- Kawamata, T. und Tomari, Y. (2010). **Making RISC**. *Trends Biochem Sci* *35*, 368–376. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.03.009.
- Keller, H., Kunz, W. und Muckert, H. (1956). **N-phthalyl-glutamic acid imide; experimental studies on a new synthetic product with sedative properties**. *Arzneimittelforschung* *6*, 426–430.
- Keller, H. und Kunz, W. (1960). **Verfahren zur Herstellung von Derivaten von Amino-piperidin-2,6-dionen**. DE Patent 1074584. Chemie Grünenthal GmbH. URL: <https://depatisnet.dpma.de/DepatisNet/depatisnet?action=pdf&docid=DE000001074584B>. [Stand: 11.11.2022].
- Khan, I. A. (2003). **Oral loading single dose flecainide for pharmacological cardioversion of recent-onset atrial fibrillation**. *Int J Cardiol* *87*, 121–128. DOI: 10.1016/S0167-5273(02)00467-9.

- Khoo, M. C., Kronauer, R. E., Strohl, K. P. und Slutsky, A. S. (1982). **Factors inducing periodic breathing in humans: a general model.** *J Appl Physiol* 53, 644–659. DOI: 10.1152/jappl.1982.53.3.644.
- Khoo, M. C. K. (2000). **Determinants of ventilatory instability and variability.** *Respir Physiol* 122, 167–182. DOI: 10.1016/S0034-5687(00)00157-2.
- Khvorova, A., Reynolds, A. und Jayasena, S. D. (2003). **Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias.** *Cell* 115, 209–216. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00801-8.
- Kim, D., Kang, D., Martin, E. A., Kim, I. und Carroll, J. L. (2014). **Effects of modulators of AMP-activated protein kinase on TASK-1/3 and intracellular Ca^{2+} concentration in rat carotid body glomus cells.** *Respir Physiol Neurobiol* 195, 19–26. DOI: 10.1016/j.resp.2014.01.020.
- Kim, S. I., Winnie, A. P., Collins, V. J. und Shoemaker, W. C. (1971). **Hemodynamic Response to Doxapram in Normovolemic and Hypovolemic Dogs.** *Anesth Analg* 50, 705–710. DOI: 10.1213/00000539-197150050-00003.
- Kim, V. N., Han, J. und Siomi, M. C. (2009). **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 126–139. DOI: 10.1038/nrm2632.
- Kindler, C. H., Yost, C. S. und Gray, A. T. (1999). **Local Anesthetic Inhibition of Baseline Potassium Channels with Two Pore Domains in Tandem.** *Anesthesiology* 90, 1092–1102. DOI: 10.1097/00000542-199904000-00024.
- Kiper, A. K., Rinné, S., Rolfes, C., Ramírez, D., Seeböhm, G., Netter, M. F., González, W. und Decher, N. (2015). **Kv1. 5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea?** *Pflugers Arch* 467, 1081–1090. DOI: 10.1007/s00424-014-1665-1.
- Kirchhof, P., Breithardt, G., Camm, A. J., Crijns, H. J., Kuck, K.-H., Vardas, P. und Wegscheider, K. (2013). **Improving outcomes in patients with atrial fibrillation: Rationale and design of the Early treatment of Atrial fibrillation for Stroke prevention Trial.** *Am Heart J* 166, 442–448. DOI: 10.1016/j.ahj.2013.05.015.
- Kirchhof, P., Camm, A. J., Goette, A., Brandes, A., Eckardt, L., Elvan, A., Fetsch, T., van Gelder, I. C., Haase, D., Haegeli, L. M., Hamann, F., Heidbüchel, H., Hindricks, G., Kautzner, J., Kuck, K.-H., Mont, L., Ng, G. A., Rekosz, J., Schoen, N., Schotten, U., Suling, A., Taggeselle, J., Themistoclakis, S., Vettorazzi, E., Vardas, P., Wegscheider, K., Willems, S., Crijns, H. J. G. M. und Breithardt, G. (2020). **Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 383, 1305–1316. DOI: 10.1056/NEJMoa2019422.
- Knill, R. L. und Gelb, A. W. (1978). **Ventilatory Responses to Hypoxia and Hypercapnia during Halothane Sedation and Anesthesia in Man.** *Anesthesiology* 49, 244–251. DOI: 10.1097/00000542-197810000-00004.
- Knobloch, K., Brendel, J., Peukert, S., Rosenstein, B., Busch, A. E. und Wirth, K. J. (2002). **Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I_{Kur} channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I_{Kr} blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and**

- ibutilide.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol *366*, 482–487. DOI: 10.1007/s00210-002-0599-x.
- Knobloch, K., Brendel, J., Rosenstein, B., Bleich, M., Busch, A. E. und Wirth, K. J. (2004). **Atrial-selective antiarrhythmic actions of novel I_{kur} vs. I_{kr} , I_{ks} , and I_{KAch} class Ic drugs and beta blockers in pigs.** Med Sci Monit *10*, BR221–BR228.
- Kobayashi, H. und Tomari, Y. (2016). **RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins.** Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech *1859*, 71–81. DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.08.007.
- Køber, L., Torp-Pedersen, C., McMurray, J. J. V., Gøtzsche, O., Lévy, S., Crijns, H., Amlie, J. und Carlsen, J. (2008). **Increased Mortality after Dronedarone Therapy for Severe Heart Failure.** N Engl J Med *358*, 2678–2687. DOI: 10.1056/NEJMoa0800456.
- Kodama, I., Kamiya, K. und Toyama, J. (1999). **Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent.** Am J Cardiol *84*, 20–28. DOI: 10.1016/S0002-9149(99)00698-0.
- Koehler, U., Hildebrandt, O., Hildebrandt, W. und Aumüller, G. (2021). **Herz und Herz-Kreislauf-System in der (kultur-) historischen Betrachtung.** Herz *46*, 33–40. DOI: 10.1007/s00059-020-04914-2.
- Komal, S., Yin, J.-J., Wang, S.-H., Huang, C.-Z., Tao, H.-L., Dong, J.-Z., Han, S.-N. und Zhang, L.-R. (2019). **MicroRNAs: Emerging biomarkers for atrial fibrillation.** J Cardiol *74*, 475–482. DOI: 10.1016/j.jjcc.2019.05.018.
- Komatsu, R., Sengupta, P., Cherynak, G., Wadhwa, A., Sessler, D. I., Liu, J., Hurst, H. E. und Lenhardt, R. (2005). **Doxapram Only Slightly Reduces the Shivering Threshold in Healthy Volunteers.** Anesth Analg *101*, 1368–1373. DOI: 10.1213/01.ANE.0000180198.13467.DF.
- Kosa, T., Maruyama, T. und Otagiri, M. (1997). **Species Differences of Serum Albumins: I. Drug Binding Sites.** Pharm Res *14*, 1607–1612. DOI: 10.1023/A:1012138604016.
- Kossel, A. (1911). **Über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns.** Münchener Medizinische Wochenschrift *58*, 65–69.
- Kotecha, D., Holmes, J., Krum, H., Altman, D. G., Manzano, L., Cleland, J. G. F., Lip, G. Y. H., Coats, A. J. S., Andersson, B., Kirchhof, P., von Lueder, T. G., Wedel, H., Rosano, G., Shibata, M. C., Rigby, A. und Flather, M. D. (2014). **Efficacy of β blockers in patients with heart failure plus atrial fibrillation: an individual-patient data meta-analysis.** Lancet *384*, 2235–2243. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61373-8.
- Kotecha, D., Manzano, L., Krum, H., Rosano, G., Holmes, J., Altman, D. G., Collins, P. D., Packer, M., Wikstrand, J., Coats, A. J. S., Cleland, J. G. F., Kirchhof, P., von Lueder, T. G., Rigby, A. S., Andersson, B., Lip, G. Y. H., van Veldhuisen, D. J., Shibata, M. C., Wedel, H., Böhm, M. und Flather, M. D. (2016). **Effect of age and sex on efficacy and tolerability of β blockers in patients with heart failure with reduced ejection fraction: individual patient data meta-analysis.** BMJ *353*, i1855. DOI: 10.1136/bmj.i1855.

- Koumi, S.-I. und Wasserstorm, J. A. (1994). **Acetylcholine-sensitive muscarinic K⁺ channels in mammalian ventricular myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266, H1812–H1821. DOI: 10.1152/ajpheart.1994.266.5.H1812.
- Kowey, P. R., Marinchak, R. A., Rials, S. J. und Filart, R. A. (1998). **Acute Treatment of Atrial Fibrillation.** *Am J Cardiol* 81, 16C–22C. DOI: 10.1016/S0002-9149(98)00182-9.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. und Griffiths-Jones, S. (2019). **miRBase: from microRNA sequences to function.** *Nucleic Acids Res* 47, D155–D162. DOI: 10.1093/nar/gky1141.
- Kraft, M., Büscher, A., Wiedmann, F., L’hoste, Y., Haefeli, W. E., Frey, N., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2021). **Current Drug Treatment Strategies for Atrial Fibrillation and TASK-1 Inhibition as an Emerging Novel Therapy Option.** *Front Pharmacol* 12, 638445. DOI: 10.3389/fphar.2021.638445.
- Kraft, M., Foerster, K. I., Wiedmann, F., Sauter, M., Paasche, A., Blochberger, P. L., Yesilgöz, B., L’hoste, Y., Frey, N., Haefeli, W. E., Burhenne, J. und Schmidt, C. (2022). **Simultaneous Quantification and Pharmacokinetic Characterization of Doxapram and 2-Ketodoxapram in Porcine Plasma and Brain Tissue.** *Pharmaceutics* 14, 762. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040762.
- Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X. und Liang, M. (2012). **The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury.** *Physiol Genomics* 44, 237–244. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00141.2011.
- Krishna, S., Andersson, A. M. C., Semsey, S. und Sneppen, K. (2006). **Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks.** *Nucleic Acids Res* 34, 2455–2462. DOI: 10.1093/nar/gkl140.
- Krol, J., Loedige, I. und Filipowicz, W. (2010). **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nat Rev Genet* 11, 597–610. DOI: 10.1038/nrg2843.
- Kuck, K.-H., Brugada, J., Fürnkranz, A., Metzner, A., Ouyang, F., Chun, K. R. J., Elvan, A., Arentz, T., Bestehorn, K., Pocock, S. J., Albenque, J.-P. und Tondo, C. (2016). **Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 374, 2235–2245. DOI: 10.1056/NEJMoa1602014.
- Kumita, H., Mizunu, S., Shinohara, M., Ichikawa, T. und Yamazaki, T. (1991). **Low-Dose Doxapram Therapy in Premature Infants and Its CSF and Serum Concentrations.** *Acta Paediatrica* 80, 786–791. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1991.tb11949.x.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2002). **Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse.** *Curr Biol* 12, 735–739. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00809-6.
- Laratta, C. R., Ayas, N. T., Povitz, M. und Pendharkar, S. R. (2017). **Diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea in adults.** *CMAJ* 189, E1481–E1488. DOI: 10.1503/cmaj.170296.
- Lazarenko, R. M., Willcox, S. C., Shu, S., Berg, A. P., Jevtovic-Todorovic, V., Talley, E. M., Chen, X. und Bayliss, D. A. (2010). **Motoneuronal TASK Channels Contribute**

- to Immobilizing Effects of Inhalational Gernerl Anesthetics.** *J Neurosci* 30, 7691–7704. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1655-10.2010.
- Lee, H. Y., Zhou, K., Smith, A. M., Noland, C. L. und Doudna, J. A. (2013). **Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing.** *Nucleic Acids Res* 41, 6568–6576. DOI: 10.1093/nar/gkt361.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. (1993). **The C. elegans Heterochronic Gne *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*.** *Cell* 75, 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Lee, Y., Ahn, C., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, Kim, S. und Kim, V. N. (2003). **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature* 425, 415–419. DOI: 10.1038/nature01957.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M. R. und Kim, V. N. (2006). **The role of PACT in the RNA silencing pathway.** *EMBO J* 25, 522–532. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600942.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. und Kim, V. N. (2002). **MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.** *EMBO J* 21, 4663–4670. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H. und Kim, V. N. (2004). **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 23, 4051–4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- LeGatt, D. F., Beaudry, M. A. und Bradley, J. M. (1986). **Simultaneous determination of doxapram and 2-ketodoxapram in plasma of neonates by gas chromatography.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 378, 478–481. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)80746-X.
- Lei, M., Wu, L., Terrar, D. A. und Huang, C. L.-H. (2018). **Modernized Classification of Cardiac Antiarrhythmic Drugs.** *Circulation* 138, 1879–1896. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035455.
- Lenz, W. und Knapp, K. (1962). **Die Thalidomid-Embryopathie.** *Dtsch Med Wochenschr* 87, 1232–1242. DOI: 10.1055/s-0028-1111892.
- Leone, O., Boriani, G., Chiappini, B., Pacini, D., Cenacchi, G., Suarez, S. M., Rapezzi, C., Reggiani, M. L. B. und Marinelli, G. (2004). **Amyloid Deposition As a Cause of Atrial Remodelling in Persistent Valvular Atrial Fibrillation.** *Eur Heart J* 25, 1237–1241. DOI: 10.1016/j.ehj.2004.04.007.
- Lesage, F. (2003). **Pharmacology of neuronal background potassium channels.** *Neuropharmacology* 44, 1–7. DOI: 10.1016/S0028-3908(02)00339-8.
- Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000). **Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels.** *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F793–F801. DOI: 10.1152/ajprenal.2000.279.5.F793.
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. J. und Palecek, S. P. (2013). **Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions.** *Nat Protoc* 8, 162–175. DOI: 10.1038/nprot.2012.150.

- Limberg, S. H., Netter, M. F., Rolfes, C., Rinné, S., Schlichthörl, G., Zuzarte, M., Vassiliou, T., Moosdorf, R., Wulf, H., Daut, J., Sachse, F. B. und Decher, N. (2011). **TASK-1 Channels May Modulate Action Potential Duration of Human Atrial Cardiomyocytes.** *Cell Physiol Biochem* 28, 613–624. DOI: 10.1159/000335757.
- Lin, G., Ma, J., Hu, L., Wang, X., Zhu, J. und Wang, X. (2011). **Determination of doxapram hydrochloride in rabbit plasma by LC-MS-MS and its application.** *Chromatographia* 73, 183–187. DOI: 10.1007/s10337-010-1815-3.
- Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J. und Li, P.-F. (2009). **miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12103–12108. DOI: 10.1073/pnas.0811371106.
- Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R. V. und Oliver, D. (2011). **Probing the regulation of TASK potassium channels by PI(4,5)P₂ with switchable phosphoinositide phosphatases.** *J Physiol* 589, 3149–3162. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.208983.
- Ling, T.-Y., Wang, X.-L., Chai, Q., Lau, T.-W., Koestler, C. M., Park, S. J., Daly, R. C., Greason, K. L., Jen, J., Wu, L.-Q., Shen, W.-F., Shen, W.-K., Cha, Y.-M. und Lee, H.-C. (2013). **Regulation of the SK3 channel by microRNA-499 — Potential role in atrial fibrillation.** *Heart Rhythm* 10, 1001–1009. DOI: 10.1016/j.hrthm.2013.03.005.
- Linz, D., Elliott, A. D., Hohl, M., Malik, V., Schotten, U., Dobrev, D., Nattel, S., Böhm, M., Floras, J., Lau, D. H. und Sanders, P. (2019). **Role of autonomic nervous system in atrial fibrillation.** *Int J Cardiol* 287, 181–188. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.11.091.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-j., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L. und Hannon, G. J. (2004). **Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi.** *Science* 305, 1437–1441. DOI: 10.1126/science.1102513.
- Liu, T., Zhong, S., Rao, F., Xue, Y., Qi, Z. und Wu, S. (2016). **Catheter ablation restores decreased plasma miR-409-3p und miR-432 in atrial fibrillation patients.** *Europace* 18, 92–99. DOI: 10.1093/europace/euu366.
- Loose, S., Mueller, J., Wettwer, E., Knaut, M., Ford, J., Milnes, J. und Ravens, U. (2014). **Effects of I_{Kur} blocker MK-0448 on human right atrial action potentials from patients in sinus rhythm and in permanent atrial fibrillation.** *Front Pharmacol* 5, 26. DOI: 10.3389/fphar.2014.00026.
- Lown, B., Perloth, M. G., Kaidbey, S., Abe, T. und Harken, D. E. (1963). **Cardioversion of Atrial Fibrillation: A Report on the Treatment of 65 Episodes in 50 Patients.** *N Engl J Med* 269, 325–331. DOI: 10.1056/NEJM196308152690701.
- Lu, Y., Zhang, Y., Wang, N., Pan, Z., Gao, X., Zhang, F., Zhang, Y., Shan, H., Luo, X., Bai, Y., Sun, L., Song, W., Xu, C., Wang, Z. und Yang, B. (2010). **MicroRNA-328 Contributes to Adverse Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation.** *Circulation* 122, 2378–2387. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958967.
- Lu, Y., Hou, S., Huang, D., Luo, Y., Zhang, J., Chen, J. und Xu, W. (2015). **Expression profile analysis of circulating microRNAs and their effects on ion channels in Chinese atrial fibrillation patients.** *Int J Clin Exp Med* 8, 845–853.

- Lubitz, S. A., Yin, X., Fontes, J. D., Magnani, J. W., Rienstra, M., Pai, M., Villalon, M. L., Vasan, R. S., Pencina, M. J., Levy, D., Larson, M. G., Ellinor, P. T. und Benjamin, E. J. (2010). **Association Between Familial Atrial Fibrillation and Risk of New-Onset Atrial Fibrillation**. *JAMA* *304*, 2263–2269. DOI: 10.1001/jama.2010.1690.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. und Kutay, U. (2004). **Nuclear Export of MicroRNA Precursors**. *Science* *303*, 95–98. DOI: 10.1126/science.1090599.
- Lunsford, C. D., Cale Jr, A. D., Ward, J. W., Franko, B. V. und Jenkins, H. (1964). **4-(β -Substituted ethyl)-3,3-diphenyl-2-pyrrolidinones. A New Series of CNS Stimulants**. *J Med Chem* *7*, 302–310. DOI: 10.1021/jm00333a012.
- Luo, X., Pan, Z., Shan, H., Xiao, J., Sun, X., Wang, N., Lin, H., Xiao, L., Maguy, A., Qi, X.-Y., Li, Y., Gao, X., Dong, D., Zhang, Y., Bai, Y., Ai, J., Sun, L., Lu, H., Luo, X.-Y., Wang, Z., Lu, Y., Yang, B. und Nattel, S. (2013). **MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation**. *J Clin Invest* *123*, 1939–1951. DOI: 10.1172/JCI62185.
- Luo, X., Yang, B. und Nattel, S. (2015). **MicroRNAs and atrial fibrillation: mechanisms and translational potential**. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 80–90. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.178.
- Ma, J., Lin, G., Wang, X., Li, J., Wang, X. und Hu, L. (2011). **Determination of Urapidil Hydrochloride in Rabbit Plasma by LC-MS-MS and its Application to a Pharmacokinetic Study**. *J Liq Chromatogr Relat Technol* *34*, 307–316. DOI: 10.1080/10826076.2011.547413.
- Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E. D., Eyries, M., Sampson, K. S., Soubrier, F., Germain, M., Trégouët, D.-A., Borczuk, A., Rosenzweig, E. B., Girerd, B., Montani, D., Humbert, M., Loyd, J. E., Kass, R. S. und Chung, W. K. (2013). **A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension**. *N Engl J Med* *369*, 351–361. DOI: 10.1056/NEJMoa1211097.
- Ma, L., Zhang, X., Zhou, M. und Chen, H. (2012). **Acid-sensitive TWIK and TASK Two-pore Domain Potassium Channels Change Ion Selectivity and Become Permeable to Sodium in Extracellular Acidification**. *J Biol Chem* *287*, 37145–37153. DOI: 10.1074/jbc.M112.398164.
- Machida, T., Hashimoto, N., Kuwahara, I., Ogino, Y., Matsuura, J., Yamamoto, W., Itano, Y., Zamma, A., Matsumoto, R., Kamon, J., Kobayashi, T., Ishiwata, N., Yamashita, T., Ogura, T. und Nakaya, H. (2011). **Effects of a Highly Selective Acetylcholine-Activated K⁺ Channel Blocker on Experimental Atrial Fibrillation**. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *4*, 94–102. DOI: 10.1161/CIRCEP.110.951608.
- MacNeil, D. J., Davies, R. O. und Deitchman, D. (1993). **Clinical Safety Profile of Sotalol in the Treatment of Arrhythmias**. *Am J Cardiol*, 44A–50A. DOI: 10.1016/0002-9149(93)90024-7.
- Maillard, C., Boutroy, M.-J., Fresson, J., Barbé, F. und Hascoët, J.-M. (2001). **QT interval lengthening in premature infants treated with doxapram**. *Clin Pharmacol Ther* *70*, 540–545. DOI: 10.1067/mcp.2001.120761.

- Mannion, J. C., Dax, S. L., Woodward, R. und Ozola, V. (2012). **Compositions and methods for treating breathing control disorders or diseases**. US Patent PCT/US2012/040195. Galleon Pharmaceuticals Inc. URL: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012166909>. [Stand: 07.11.2022].
- Mant, J., Hobbs, F. D. R., Fletcher, K., Roalfe, A., Fitzmaurice, D., Lip, G. Y. H. und Murray, E. (2007). **Warfarin versus aspirin for stroke prevention in an elderly community population with atrial fibrillation (the Birmingham Atrial Fibrillation Treatment of the Aged Study, BAFTA): a randomised controlled trial**. *Lancet* 370, 493–503. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61233-1.
- Mantri, S., Wu, S. M. und Goodyer, W. R. (2021). **Molecular Profiling of the Cardiac Conduciton System: the Dawn of a New Era**. *Curr Cardiol Rep* 23, 103. DOI: 10.1007/s11886-021-01536-w.
- Marrouche, N. F. und Brachmann, J. (2009). **Catheter Ablation versus Standard Conventional Treatment in Patients with Left Ventricular Dysfunction and Atrial Fibrillation (CASTLE-AF)-Study Design**. *Pacing Clin Electrophysiol* 32, 987–994. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2009.02428.x.
- Marrouche, N. F., Brachmann, J., Andresen, D., Siebels, J., Boersma, L., Jordaens, L., Merkely, B., Pokushalov, E., Sanders, P., Proff, J., Schunkert, H., Christ, H., Vogt, J. und Bänsch, D. (2018). **Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure**. *N Engl J Med* 378, 417–427. DOI: 10.1056/NEJMoa1707855.
- Martinez, N. J., Ow, M. C., Barrasa, M. I., Hammell, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Roth, F. P., Ambros, V. R. und Walhout, A. J. M. (2008). **A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity**. *Genes Dev* 22, 2535–2549. DOI: 10.1101/gad.1678608.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. und Chavez-Eng, C. M. (2003). **Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS**. *Anal Chem* 75, 3019–3030. DOI: 10.1021/ac020361s.
- McBride, W. G. (1961). **Thalidomide and congenital abnormalities**. *Lancet* 278, 1358. DOI: 10.1016/s0140-6736(61)90927-8.
- McManus, D. D., Lin, H., Tanriverdi, K., Quercio, M., Yin, X., Larson, M. G., Ellinor, P. T., Levy, D., Freedman, J. E. und Benjamin, E. J. (2014). **Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: Data from the Framingham Offspring Study**. *Heart Rhythm* 11, 663–669. DOI: 10.1016/j.hrthm.2014.01.018.
- McManus, D. D., Tanriverdi, K., Lin, H., Esa, N., Kinno, M., Mandapati, D., Tam, S., Okike, O. N., Ellinor, P. T., Keaney Jr, J. F., Donahue, K., Benjamin, E. J. und Freedman, J. E. (2015). **Plasma microRNAs are associated with atrial fibrillation and change after catheter ablation (the miRhythm study)**. *Heart Rhythm* 12, 3–10. DOI: 10.1016/j.hrthm.2014.09.050.
- Mellin, G. W. und Katzenstein, M. (1962). **The Saga of Thalidomide: Neuropathy to Embryopathy, with Case Reports of Congenital Anomalies**. *N Engl J Med* 267, 1184–1193. DOI: 10.1056/NEJM196212062672305.
- Miescher, F. (1871). **Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen**. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 4, 441–460.

- Mitchell, R. A. und Herbert, D. A. (1975). **Potencies of Doxapram and Hypoxia in Stimulating Carotid-Body Chemoreceptors and Ventilation in Anesthetized Cats.** *Anesthesiology* 42, 559–566. DOI: 10.1097/00000542-197505000-00009.
- Mitrophanov, A. Y. und Groisman, E. A. (2008). **Positive feedback in cellular control systems.** *Bioessays* 30, 542–555. DOI: 10.1002/bies.20769.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T. und Siomi, H. (2010). **Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production.** *Mol Genet Genomics* 284, 95–103. DOI: 10.1007/s00438-010-0556-1.
- Mont, L., Bisbal, F., Hernandez-Madrid, A., Perez-Castellano, N., Vinolas, X., Arenal, A., Arribas, F., Fernández-Lozano, I., Bodegas, A., Cobos, A., Cobos, A., Matía, Pérez-Villacastín, J., Guerra, J. M., Ávila, P., López-Gil, M., Castro, V., Arana, J. I. und Brugada, J. (2014). **Catheter ablation vs. antiarrhythmic drug treatment of persistent atrial fibrillation: a multicentre, randomized, controlled trial (SARA study).** *Eur Heart J* 35, 501–507. DOI: 10.1093/eurheartj/eh457.
- Montani, D., Bergot, E., Günther, S., Savale, L., Bergeron, A., Bourdin, A., Bouvaist, H., Canuet, M., Pison, C., Macro, M., Poubeau, P., Girerd, B., Nataloi, D., Guignabert, C., Perros, F., O’Callaghan, D. S., Jaïs, X., Tubert-Bitter, P., Zalcman, G., Sitbon, O., Simonneau, G. und Humbert, M. (2012). **Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib.** *Circulation* 125, 2128–2137. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079921.
- Morani, G., Borio, G., Bolzan, B. und Ribichini, F. L. (2019). **Safety and efficacy of a cardiologist-only approach to deep sedation for electrical cardioversion.** *J Cardiovasc Med* 20, 16–22. DOI: 10.2459/JCM.0000000000000731.
- Morton, M. J., O’Connell, A. D., Sivaprasadarao, A. und Hunter, M. (2003). **Determinants of pH sensing in the two pore domain K⁺ channels TASK-1 and -2.** *Pflügers Arch* 445, 577–583. DOI: 10.1007/s00424-002-0901-2.
- Murray, K. T. (1998). **Ibutilide.** *Circulation* 97, 493–497. DOI: 10.1161/01.CIR.97.5.493.
- Nagaraj, C., Tang, B., Bálint, Z., Wygrecka, M., Hrzenjak, A., Kwapiszewska, G., Stacher, E., Lindenmann, J., Weir, E. K., Olschewski, H. und Olschewski, A. (2013). **Src tyrosine kinase is crucial for potassium channel function in human pulmonary arteries.** *Eur Respir J* 41, 85–95. DOI: 10.1183/09031936.00211811.
- Natsume, Y., Oaku, K., Takahashi, K., Nakamura, W., Oono, A., Hamada, S., Yamazoe, M., Ihara, K., Sasaki, T., Goya, M., Hirao, K., Furukawa, T. und Sasano, T. (2018). **Combined Analysis of Human and Experimental Murine Samples Identified Novel Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Atrial Fibrillation.** *Circ J* 82, 965–973. DOI: 10.1253/circj.CJ-17-1194.
- Nattel, S. (2002). **New ideas about atrial fibrillation 50 years on.** *Nature* 415, 219–226. DOI: 10.1038/415219a.
- Nattel, S. (2017). **Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation.** *JACC Clin Electrophysiol* 3, 425–435. DOI: 10.1016/j.jacep.2017.03.002.
- Nattel, S., Burstein, B. und Dobrev, D. (2008). **Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: Mechanisms and Implications.** *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 62–73. DOI: 10.1161/CIRCEP.107.754564.

- Nattel, S. und Harada, M. (2014). **Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: Recent Advances and Translational Perspectives.** *J Am Coll Cardiol* 63, 2335–2345. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.555.
- Nattel, S., Heijman, J., Zhou, L. und Dobrev, D. (2020). **Molecular Basis of Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: A Translational Perspective.** *Circ Res* 127, 51–72. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316363.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S. und Yeh, Y.-H. (2007). **Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation.** *Physiol Rev* 87, 425–456. DOI: 10.1152/physrev.00014.2006.
- Nattel, S. und Singh, B. N. (1999). **Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions.** *Am J Cardiol* 84, 11–19. DOI: 10.1016/S0002-9149(99)00697-9.
- Navas Tejedor, P., Tenorio Castano, J., Palomino Doza, J., Arias Lajara, P., Gordo Trujillo, G., López Meseguer, M., Román Broto, A., Lapunzina Abadía, P. und Escribano Subía, P. (2017). **An homozygous mutation in *KCNK3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension.** *Clin Genet* 91, 453–457. DOI: 10.1111/cge.12869.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). **Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.** *Nature* 260, 799–802. DOI: 10.1038/260799a0.
- Nguyen, B. L., Fishbein, M. C., Chen, L. S., Chen, P.-S. und Masroor, S. (2009). **Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans.** *Heart Rhythm* 6, 454–460. DOI: 10.1016/j.hrthm.2009.01.010.
- Nichol, H., Vine, J., Thomas, J. und Moore, R. G. (1980). **Quantitation of doxapram in blood, plasma and urine.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 182, 191–200. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)81623-0.
- Nishida, K., Maguy, A., Sakabe, M., Comtois, P., Inoue, H. und Nattel, S. (2011a). **The role of pulmonary veins vs. autonomic ganglia in different experimental substrates of canine atrial fibrillation.** *Cardiovasc Res* 89, 825–833. DOI: 10.1093/cvr/cvq332.
- Nishida, K., Qi, X. Y., Wakili, R., Comtois, P., Chartier, D., Harada, M., Iwasaki, Y.-k., Romeo, P., Maguy, A., Dobrev, D., Michael, G., Talajic, M. und Nattel, S. (2011b). **Mechanisms of Atrial Tachyarrhythmias Associated With Coronary Artery Occlusion in a Chronic Canine Model.** *Circulation* 123, 137–146. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778.
- Nunez, Y. O., Truitt, J. M., Gorini, G., Ponomareva, O. N., Blednov, Y. A., Harris, R. A. und Mayfield, R. D. (2013). **Positively correlated miRNA-mRNA regulatory networks in mouse frontal cortex during early stages of alcohol dependence.** *BMC Genomics* 14, 725. DOI: 10.1186/1471-2164-14-725.
- O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. und Peng, C. (2018). **Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.** *Front Endocrinol* 9, 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.
- Ogawa, Y., Irikura, M., Kobaru, Y., Tomiyasu, M., Kochiyama, Y., Uriu, M., Ishitsuka, Y., Kondo, Y., Yukawa, E., Kamada, N., Ohno, H., Yamazaki, T. und Irie, T. (2015).

- Population pharmacokinetics of doxapram in low-birth-weight Japanese infants with apnea.** *Eur J Pediatr* 174, 509–518. DOI: 10.1007/s00431-014-2416-1.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y. und Tsukihara, T. (2009). **A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery.** *Science* 326, 1275–1279. DOI: 10.1126/science.1178705.
- Olschewski, A., Chandran, N. und Olschewski, H. (2016). **Letter by Olschewski et al Regarding Article, “Upregulation of $K_{2P3.1}$ K^+ Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation”.** *Circulation* 133, e439. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018800.
- Olschewski, A., Li, Y., Tang, B., Hanze, J., Eul, B., Bohle, R. M., Wilhelm, J., Morty, R. E., Brau, M. E., Weir, E. K., Kwapiszewska, G., Klepetko, W., Seeger, W. und Olschewski, H. (2006). **Impact of TASK-1 in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells.** *Circ Res* 98, 1072–1080. DOI: 10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9.
- Olschewski, A., Veale, E. L., Nagy, B. M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Czirják, G., Enyedi, P. und Mathie, A. (2017). **TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications.** *Eur Respir J* 50, 1700754. DOI: 10.1183/13993003.00754-2017.
- Orang, A. V., Safaralizadeh, R. und Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). **Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation.** *Int J Genomics* 2014, 970607. DOI: 10.1155/2014/970607.
- Packer, D. L., Mark, D. B., Robb, R. A., Monahan, K. H., Bahnson, T. D., Moretz, K., Poole, J. E., Mascette, A., Rosenberg, Y., Jeffries, N., Al-Khalidi, H. und Lee, K. L. (2018). **Catheter Ablation versus Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation (CABANA) trial: study rationale and design.** *Am Heart J* 199, 192–199. DOI: 10.1016/j.ahj.2018.02.015.
- Packer, D. L., Mark, D. B., Robb, R. A., Monahan, K. H., Bahnson, T. D., Poole, J. E., Noseworthy, P. A., Rosenberg, Y. D., Jeffries, N., Mitchell, L. B., Flaker, G. C., Pokushalov, E., Romanov, A., Bunch, T. J., Noelker, G., Ardashev, A., Revishvili, A., Wilber, D. J., Cappato, R., Kuck, K.-H., Hindricks, G., Davies, W., Kowey, P. R., Naccarelli, G. V., Reiffel, J. A., Piccini, J. P., Silverstein, A. P., Al-Khalidi, H. R. und Lee, K. L. (2019). **Effect of Vatheter Ablation vs Antiarrhythmic Drug Therapy on Mortality, Stroke, Bleeding, and Cardiac Arrest Among Patients with Atrial Fibrillation: The CABANA Randomized Clinical Trial.** *JAMA* 321, 1261–1274. DOI: 10.1001/jama.2019.0693.
- Pandit, S. V. und Workman, A. J. (2016). **Atrial Electrophysiological Remodeling and Fibrillation in Heart Failure.** *Clin Med Insights Cardiol* 10, 41–46. DOI: 10.4137/CMC.S39713.
- Park, B. K. (1988). **Warfarin: Metabolism and mode of action.** *Biochem Pharmacol* 37, 19–27. DOI: 10.1016/0006-2952(88)90750-2.
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S. und Liu, Q. (2009). **Phosphorylation of the Human MircoRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling.** *Cell* 139, 112–122. DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.044.

- Patel, A. J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G. und Lazdunski, M. (1999). **Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K^+ channels.** *Nat Neurosci* 2, 422–426. DOI: 10.1038/8084.
- Patel, M. R., Mahaffey, K. W., Garg, J., Pan, G., Singer, D. E., Hacke, W., Breithardt, G., Halperin, J. L., Hankey, G. J., Piccini, J. P., Becker, R. C., Nessel, C. C., Paolini, J. F., Berkowitz, S. D., Fox, K. A. und Califf, R. M. (2011). **Rivaroxaban versus Warfarin in Bonvalvular Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 365, 883–891. DOI: 10.1056/NEJMoa1009638.
- Peers, C. (1991). **Effects of doxapram on ionic currents recorded in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body.** *Brain Res* 568, 116–122. DOI: 10.1016/0006-8993(91)91386-F.
- Peyronnet, R. und Ravens, U. (2019). **Atria-selective antiarrhythmic drugs in need of alliance partners.** *Pharmacol Res* 145, 104262. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104262.
- Pitts, J. E., Bruce, R. B. und Forehand, J. B. (1973). **Identification of Doxapram Metabolites using High Pressure Ion Exchange Chromatography and Mass Spectroscopy.** *Xenobiotica* 3, 73–83. DOI: 10.3109/00498257309151502.
- Pluymaekers, N. A. H. A., Dudink, E. A. M. P., Luermans, J. G. L. M., Meeder, J. G., Lenderink, T., Widdershoven, J., Bucx, J. J. J., Rienstra, M., Kamp, O., van Opstal, J. M., Alings, M., Oomen, A., Kirchhof, C. J., van Dijk, V. F., Ramanna, H., Liem, A., Dekker, L. R., Essers, B. A. B., Tijssen, J. G. P., van Gelder, I. C. und Crijns, H. J. G. M. (2019). **Early or Delayed Cardioversion in Recent-Onset Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 380, 1499–1508. DOI: 10.1056/NEJMoa1900353.
- Podd, S. J., Freemantle, N., Furniss, S. S. und Sulke, N. (2016). **First clinical trial of specific I_{KACH} blocker shows no reduction in atrial fibrillation burden in patients with paroxysmal atrial fibrillation: pacemaker assessment of BMS 914392 in patients with paroxysmal atrial fibrillation.** *Europace* 18, 340–346. DOI: 10.1093/europace/euv263.
- Polak, A. und Plum, F. (1964). **Comparison of new analeptics in barbiturate-poisoned animals.** *J Pharmacol Exp Ther* 145, 27–33.
- Psaty, B. M., Manolio, T. A., Kuller, L. H., Kronmal, R. A., Cushman, M., Fried, L. P., White, R., Furberg, C. D. und Rautaharju, P. M. (1997). **Incidence of and Risk Factors for Atrial Fibrillation in Older Adults.** *Circulation* 96, 2455–2461. DOI: 10.1161/01.CIR.96.7.2455.
- Putzke, C., Hanley, P. J., Schlichthörl, G., Preisig-Müller, R., Rinné, S., Anetseder, M., Eckenhoff, R., Berkowitz, C., Vassiliou, T., Wulf, H. und Eberhart, L. (2007a). **Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1.** *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1319–C1326. DOI: 10.1152/ajpcell.00100.2007.
- Putzke, C., Wemhöner, K., Sachse, F. B., Rinné, S., Schlichthörl, G., Li, X. T., Jaé, L., Eckhardt, I., Wischmeyer, E., Wulf, H., Preisig-Müller, R., Daut, J. und Decher, N. (2007b). **The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle.** *Cardiovasc Res* 75, 59–68. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.02.025.

- Qi, H. H., Ongusaha, P. P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S. W., Peng, J. und Shi, Y. (2008). **Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability.** *Nature* 455, 421–424. DOI: 10.1038/nature07186.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. und Wang, Y. (2005). **Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation.** *Cell* 123, 621–629. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.020.
- Ravens, U. (2017). **Atrial-selective K⁺ channel blockers: potential antiarrhythmic drugs in atrial fibrillation?** *Can J Physiol Pharmacol* 95, 1313–1318. DOI: 10.1139/cjpp-2017-0024.
- Rawles, J. M. (1990). **What is meant by a "controlled" ventricular rate in atrial fibrillation?** *Heart* 63, 157–161. DOI: 10.1136/hrt.63.3.157.
- Richer, L.-P., Vinet, A., Kus, T., Cardinal, R., Ardell, J. L. und Armour, J. A. (2008). **α -adrenoceptor blockade modifies neurally induced atrial arrhythmias.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1175–R1180. DOI: 10.1152/ajpregu.00840.2007.
- Rinné, S., Kiper, A. K., Schmidt, C., Ortiz-Bonnin, B., Zwiener, S., Seeböhm, G. und Decher, N. (2017). **Stress-Kinase Regulation of TASK-1 and TASK-3.** *Cell Physiol Biochem* 44, 1024–1037. DOI: 10.1159/000485402.
- Robson, R. H. und Prescott, L. F. (1977). **Rapid gas — liquid chromatographic estimation of doxapram in plasma.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 143, 527–529. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)81800-9.
- Robson, R. H. und Prescott, L. F. (1979). **A pharmacokinetic study of doxapram in patients and volunteers.** *Br J Clin Pharmacol* 7, 81–87. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1979.tb00901.x.
- Röcken, C., Peters, B., Juenemann, G., Saeger, W., Klein, H. U., Huth, C., Roessner, A. und Goette, A. (2002). **Atrial Amyloidosis: An Arrhythmogenic Substrate for Persistent Atrial Fibrillation.** *Circulation* 106, 2091–2097. DOI: 10.1161/01.CIR.0000034511.06350.DF.
- Roden, D. M. und Woosley, R. L. (1986). **Flecainide.** *N Engl J Med* 315, 36–41. DOI: 10.1056/NEJM198607033150106.
- Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinné, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L. J., Delbeck, M., Hahn, M. G., Meier, H., Platzk, M., Quigley, A., Speedman, D., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Tucker, S. J., Müller, T., Decher, N. und Carpenter, E. P. (2020). **A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule.** *Nature* 582, 443–447. DOI: 10.1038/s41586-020-2250-8.
- Roozkrans, M., Olofsen, E., van der Schrier, R., Boom, M., Mooren, R. und Dahan, A. (2017). **Doxapram-mediated Increase in Cardiac Output Reduces Opioid Plasma Concentrations: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic-Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling Study in Healthy Volunteers.** *Clin Pharmacol Ther* 102, 115–122. DOI: 10.1002/cpt.601.

- Roselli, C., Rienstra, M. und Ellinor, P. T. (2020). **Genetics of Atrial Fibrillation in 2020: GWAS, Genome Sequencing, Polygenic Risk, and Beyond**. *Circ Res* 127, 21–33. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316575.
- Ruff, C. T., Giugliano, R. P., Braunwald, E., Hoffman, E. B., Deenadayalu, N., Ezekowitz, M. D., Camm, A. J., Weitz, J. I., Lewis, B. S., Parkhomenko, A., Yamashita, T. und Antman, E. M. (2014). **Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials**. *Lancet* 383, 955–962. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62343-0.
- Ryan, B., Robles, A. I. und Harris, C. C. (2010). **Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research**. *Nat Rev Cancer* 10, 389–402. DOI: 10.1038/nrc2867.
- Saito, T., Tamura, K., Uchida, D., Saito, T., Nitta, T. und Sugisaki, Y. (2007). **Histopathological Features of the Resected Left Atrial Appendage as Predictors of Recurrence After Surgery for Atrial Fibrillation in Valvular Heart Disease**. *Circ J* 71, 70–78. DOI: 10.1253/circj.71.70.
- Sams, R. A., Detra, R. L. und Muir, W. W. (1992). **Pharmacokinetics and metabolism of intravenous doxapram in horses**. *Equine Vet J* 24, 45–51. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1992.tb04772.x.
- Savelieva, I., Graydon, R. und Camm, A. J. (2013). **Pharmacological cardioversion of atrial fibrillation with vernakalant: evidence in support of the ESC Guidelines**. *Europace* 16, 162–173. DOI: 10.1093/europace/eut274.
- Schatzmann, H. J. (1953). **Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium-Transport durch die Erythrocytemembran**. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11, 346–354.
- Schiekel, J., Lindner, M., Hetzel, A., Wemhöner, K., Renigunta, V., Schlichthörl, G., Decher, N., Oliver, D. und Daut, J. (2013). **The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C**. *Cardiovasc Res* 97, 97–105. DOI: 10.1093/cvr/cvs285.
- Schmidt, C., Benda, S., Kraft, P., Wiedmann, F., Pleger, S., Büscher, A., Thomas, D., Wachter, R., Schmid, C., Eils, R., Katus, H. A. und Kallenberger, S. M. (2021). **Prospective multicentric validation of a novel prediction model for paroxysmal atrial fibrillation**. *Clin Res Cardiol* 110, 868–876. DOI: 10.1007/s00392-020-01773-z.
- Schmidt, C. und Peyronnet, R. (2018). **Voltage-gated and stretch-activated potassium channels in the human heart. Pathophysiological and clinical significance**. *Herzschr Elektrophys* 29, 36–42. DOI: 10.1007/s00399-017-0541-z.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhao, Z.-h., El-Battrawy, I., Lan, H., Szabo, G., Li, X., Lang, S., Korkmaz-Icöz, S., Rapti, K., Jungmann, A., Ratte, A., Müller, O. J., Karck, M., Seemann, G., Akin, I., Borggrefe, M., Zhou, X.-B., Katus, H. A. und Thomas, D. (2019). **Genetic Ablation of TASK-1 (Tandem of P Domains in a Weak Inward Rectifying K⁺ Channel–Related Acid-Sensitive K⁺ Channel-1) (K_{2P}3.1) K⁺ Channels Suppresses Atrial Fibrillation and Prevents Electrical**

- Remodeling.** *Circ Arrhythm Electrophysiol* 12, e007465. DOI: 10.1161/CIRCEP.119.007465.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Langer, C., Tristram, F., Anand, P., Wenzel, W., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Katus, H. A. und Thomas, D. (2014). **Cloning, functional characterization, and remodeling of K_{2P3.1} (TASK-1) potassium channels in a porcine model of atrial fibrillation and heart failure.** *Heart Rhythm* 11, 1798–1805. DOI: 10.1016/j.hrthm.2014.06.020.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Voigt, N., Zhou, X.-B., Heijman, J., Lang, S., Albert, V., Kallenberger, S., Ruhparwar, A., Szabó, G., Kallenbach, K., Karck, M., Borggrefe, M., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Baczkó, I., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Donner, B. C., Katus, H. A., Dobrev, D. und Thomas, D. (2015). **Upregulation of K_{2P3.1} K⁺ Current Causes Action Potential Shortening in Patients with Chronic Atrial Fibrillation.** *Circulation* 132, 82–92. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012657.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Voigt, N., Zhou, X.-B., Heijman, J., Lang, S., Albert, V., Kallenberger, S., Ruhparwar, A., Szabó, G., Kallenbach, K., Karck, M., Borggrefe, M., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Baczkó, I., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Donner, B. C., Katus, H. A., Dobrev, D. und Thomas, D. (2016). **Response to Letter Regarding Article, “Upregulation of K_{2P3.1} K⁺ Current Causes Action Potential Shortening in Patients With Chronic Atrial Fibrillation”.** *Circulation* 133, e440–e441. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020662.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Zhou, X.-B., Heijman, J., Voigt, N., Ratte, A., Lang, S., Kallenberger, S. M., Campana, C., Weymann, A., De Simone, R., Szabo, G., Ruhparwar, A., Kallenbach, K., Karck, M., Ehrlich, J. R., Baczkó, I., Borggrefe, M., Ravens, U., Dobrev, D., Katus, H. A. und Thomas, D. (2017). **Inverse remodelling of K_{2P3.1} K⁺ channel expression and action potential duration in left ventricular dysfunction and atrial fibrillation: implications for patient-specific antiarrhythmic drug therapy.** *Eur Heart J* 38, 1764–1774. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw559.
- Schmidt, W. und Jähnchen, E. (1978). **Species-dependent stereospecific serum protein binding of the oral anticoagulant drug phenprocoumon.** *Experientia* 34, 1323–1325. DOI: 10.1007/BF01981447.
- Schotten, U., Neuberger, H.-R. und Allessie, M. A. (2003). **The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation.** *Prog Biophys Mol Biol* 82, 151–162. DOI: 10.1016/S0079-6107(03)00012-9.
- Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. und Goette, A. (2011). **Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal.** *Physiol Rev* 91, 265–325. DOI: 10.1152/physrev.00031.2009.
- Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. und Zamore, P. D. (2003). **Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex.** *Cell* 115, 199–208. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1.
- Sciandra, M., De Feo, A., Parra, A., Landuzzi, L., Lollini, P.-L., Manara, M. C., Mattia, G., Pontecorvi, G., Baricordi, C., Guerzoni, C., Bazzocchi, A., Longhi, A. und Scotlandi, K. (2020). **Circulating miR34a levels as a potential biomarker in the follow-up**

- of Ewing sarcoma. *J Cell Commun Signal* 14, 335–347. DOI: 10.1007/s12079-020-00567-2.
- Seyler, C., Duthil-Straub, E., Zitron, E., Gierten, J., Scholz, E. P., Fink, R. H. A., Karle, C. A., Becker, R., Katus, H. A. und Thomas, D. (2012). **TASK1 ($K_{2P3.1}$) K^+ channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation.** *Br J Pharmacol* 165, 1467–1475. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01626.x.
- Shen, M. J., Shinohara, T., Park, H.-W., Frick, K., Ice, D. S., Choi, E.-K., Han, S., Maruyama, M., Sharma, R., Shen, C., Fishbein, M. C., Chen, L. S., Lopshire, J. C., Zipes, D. P., Lin, S.-F. und Chen, P.-S. (2011). **Continuous Low-Level Vagus Nerve Stimulation Reduces Stellate Ganglion Nerve Activity and Paroxysmal Atrial Tachyarrhythmias in Ambulatory Canines.** *Circulation* 123, 2204–2212. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.018028.
- Shi, K.-H., Tao, H., Yang, J.-J., Wu, J.-X., Xu, S.-S. und Zhan, H.-Y. (2013). **Role of microRNAs in atrial fibrillation: New insights and perspectives.** *Cell Signal* 25, 2079–2084. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.06.009.
- Shu, J., Gao, T., Xu, Z., Cui, J. et al. (2017). **Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers.** *Sci Rep* 7, 13356. DOI: 10.1038/s41598-017-13470-5.
- Silverman, M. E., Grove, D. und Upshaw, C. B. (2006). **Why Does the Heart Beat? The Discovery of the Electrical System of the Heart.** *Circulation* 113, 2775–2781. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616771.
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G. und Souza, R. (2019). **Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 53, 1801913. DOI: 10.1183/13993003.01913-2018.
- Själänder, S., Sjaländer, A., Svensson, P. J. und Friberg, L. (2014). **Atrial fibrillation patients do not benefit from acetylsalicylic acid.** *Europace* 16, 631–638. DOI: 10.1093/europace/eut333.
- Skibsbjerg, L., Poulet, C., Diness, J. G., Bentzen, B. H., Yuan, L., Kappert, U., Matschke, K., Wettwer, E., Ravens, U., Grunnet, M., Chris, T. und Jespersen, T. (2014). **Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria.** *Cardiovasc Res* 103, 156–167. DOI: 10.1093/cvr/cvu121.
- Slagsvold, K. H., Johnsen, A. B., Rognmo, Ø., Høydal, M. A., Wisløff, U. und Wahba, A. (2014). **Mitochondrial respiration and microRNA expression in right and left atrium of patients with atrial fibrillation.** *Physiol Genomics* 46, 505–511. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00042.2014.
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. und Feldman, J. L. (1991). **Pre-Bötzinger complex: a Brainstem Region that May Generate Respiratory Rhythm in Mammals.** *Science* 254, 726–729. DOI: 10.1126/science.1683005.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985).

- Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 150, 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Søskilde, R., Newie, I., Persson, H., Borg, Å. und Rovira, C. (2015). **Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics.** *RNA Biol* 12, 787–791. DOI: 10.1080/15476286.2015.1020270.
- Sorgente, A., Tung, P., Wylie, J. und Josephson, M. E. (2012). **Six Year Follow-Up After Catheter Ablation of Atrial Fibrillation: A Palliation More Than a True Cure.** *Am J Cardiol* 109, 1179–1186. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.11.058.
- Staerk, L., Sherer, J. A., Ko, D., Benjamin, E. J. und Helm, R. H. (2017). **Atrial fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes.** *Circ Res* 120, 1501–1517. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309732.
- Stavast, C. J. und Erkeland, S. J. (2019). **The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation.** *Cells* 8, 1465. DOI: 10.3390/cells8111465.
- Stephen, C. R. und Talton, I. H. (1964). **Investigation of doxapram as a postanesthetic respiratory stimulant.** *Anesth Analg* 43, 628–640. DOI: 10.1213/00000539-196411000-00006.
- Stieger, P., Rana, O. R., Saygili, E., Zazai, H., Rauwolf, T., Genz, C., Bali, R., Braun-Dullaeus, R. C. und Said, S. M. (2018). **Impact of internal and external electrical cardioversion on cardiac specific enzymes and inflammation in patients with atrial fibrillation and heart failure.** *J Cardiol* 72, 135–139. DOI: 10.1016/j.jjcc.2018.01.016.
- Streit, A. K., Netter, M. F., Kempf, F., Walecki, M., Rinné, S., Bollepalli, M. K., Preisig-Müller, R., Renigunta, V., Daut, J., Baukrowitz, T., Sansom, M. S. P., Stansfeld, P. J. und Decher, N. (2011). **A Specific Two-pore Domain Potassium Channel Blocker Defines the Structure of the TASK-1 Open Pore.** *J Biol Chem* 286, 13977–13984. DOI: 10.1074/jbc.M111.227884.
- Su, H., Trombly, M. I., Chen, J. und Wang, X. (2009). **Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing.** *Genes Dev* 23, 304–317. DOI: 10.1101/gad.1749809.
- Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M. und Barnard, E. A. (1981). **Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes.** *Nature* 292, 862–864. DOI: 10.1038/292862a0.
- Sun, H.-L., Cui, R., Zhou, J., Teng, K.-y., Hsiao, Y.-H., Nakanishi, K., Fassan, M., Luo, Z., Shi, G., Tili, E., Kutay, H., Lovat, F., Vincentini, C., Huang, H.-L., Wang, S.-W., Kim, T., Zanesi, N., Jeon, Y.-J., Lee, T. J., Guh, J.-H., Hung, M.-C., Ghoshal, K., Teng, C.-M., Peng, Y. und Croce, C. M. (2016). **ERK Activation Globally Downregulates miRNAs through Phosphorylating Exportin-5.** *Cancer Cell* 30, 723–736. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.001.
- Sun, J., Gong, X., Purow, B. und Zhao, Z. (2012). **Uncovering microRNA and Transcription Factor Mediated Regulatory Networks in Glioblastoma.** *PLoS Comput Biol* 8, e1002488. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002488.

- Suttie, J. W. und Nelsestuen, G. L. (1980). **Mechanism of Action of Vitamin K: Synthesis of γ -Carboxyglutamic Acid.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 8, 191–223. DOI: 10.3109/10409238009105469.
- Suzuki, H. I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y. L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K. und Miyazono, K. (2011). **MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation.** *Mol Cell* 44, 424–436. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.09.012.
- Suzuki, Y., Kamada, N., Ohno, H., Abe, Y., Endo, T. und Kobayashi, M. (2017). **Development and validation of an LC–MS/MS method for simultaneously determining doxapram and keto-doxapram in human serum.** *Bioanalysis* 9, 503–515. DOI: 10.4155/bio-2016-0267.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** *Cell* 126, 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Talley, E. M. und Bayliss, D. A. (2002). **Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) Potassium Channels: Volatile Anesthetics and Neurotransmitters Share a Molecular Site of Action.** *J Biol Chem* 277, 17733–17742. DOI: 10.1074/jbc.M200502200.
- Talley, E. M., Lei, Q., Sirois, J. E. und Bayliss, D. A. (2000). **TASK-1, a Two-Pore Domain K⁺ Channel, Is Modulated by Multiple Neurotransmitters in Motoneurons.** *Neuron* 25, 399–410. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80903-4.
- Tan, A. Y., Zhou, S., Ogawa, M., Song, J., Chu, M., Li, H., Fishbein, M. C., Lin, S.-F., Chen, L. S. und Chen, P.-S. (2008). **Neural Mechanisms of Paroxysmal Atrial Fibrillation and Paroxysmal Atrial Tachycardia in Ambulatory Canines.** *Circulation* 118, 916–925. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.776203.
- Tang, B., Li, Y., Nagaraj, C., Morty, R. E., Gabor, S., Stacher, E., Voswinckel, R., Weissmann, N., Leithner, K., Olschewski, H. und Olschewski, A. (2009). **Endothelin-1 Inhibits Background Two-Pore Domain Channel TASK-1 in Primary Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 476–483. DOI: 10.1165/rcmb.2008-0412OC.
- Tang, X., Li, M., Tucker, L. und Ramratnam, B. (2011). **Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 β) Phosphorylated the RNase III Enzym Drosha at S300 and S302.** *PloS One* 6, e20391. DOI: 10.1371/journal.pone.0020391.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S. F. und Ramratnam, B. (2013). **Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination.** *PLoS One* 8, e72503. DOI: 10.1371/journal.pone.0072503.
- Tang, X., Zhang, Y., Tucker, L. und Ramratnam, B. (2010). **Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization.** *Nucleic Acids Res* 38, 6610–6619. DOI: 10.1093/nar/gkq547.
- Thompson, A. A. R. und Lawrie, A. (2017). **Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension.** *Trends Mol Med* 23, 31–45. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.11.005.

- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M. und Goodall, G. J. (2013). **On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors.** *PloS One* 8, e55214. DOI: 10.1371/journal.pone.0055214.
- Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M. und Takahashi, T. (2008). **let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop.** *Carcinogenesis* 29, 2073–2077. DOI: 10.1093/carcin/bgn187.
- Torok-Both, G. A., Coutts, R. T., Jamali, F., Pasutto, F. M. und Barrington, K. J. (1985). **Sensitive nitrogen—phosphorus capillary gas chromatographic assay for doxapram in premature infants.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 344, 372–377. DOI: 10.1016/s0378-4347(00)82043-5.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. und Blaxall, B. C. (2016). **Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens.** *Circ Res* 118, 1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
- Tuteja, D., Xu, D., Timofeyev, V., Lu, L., Sharma, D., Zhang, Z., Xu, Y., Nie, L., Vázquez, A. E., Young, J. N., Glatzer, K. A. und Chiamvimonvat, N. (2005). **Differential expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2714–H2723. DOI: 10.1152/ajpheart.00534.2005.
- Ulimoen, S. R., Enger, S., Carlson, J., Platonov, P. G., Pripp, A. H., Abdelnoor, M., Arnesen, H., Gjesdal, K. und Tveit, A. (2013). **Comparison of Four Single-Drug Regimens on Ventricular Rate and Arrhythmia-Related Symptoms in Patients With Permanent Atrial Fibrillation.** *Am J Cardiol* 111, 225–230. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.09.020.
- Umana, E., Solares, C. A. und Alpert, M. A. (2003). **Tachycardia-induced cardiomyopathy.** *Am J Med* 114, 51–55. DOI: 10.1016/S0002-9343(02)01472-9.
- Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R. und Oakes, S. A. (2012). **IRE1 α Cleaves Select microRNAs During ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2.** *Science* 338, 818–822. DOI: 10.1126/science.1226191.
- Valembois, L., Audureau, E., Takeda, A., Jarzebowski, W., Belimn, J. und Lafuente-Lafuente, C. (2019). **Antiarrhythmics for maintaining sinus rhythm after cardioversion of atrial fibrillation.** *Cochrane Db Syst Rev*, CD005049. DOI: 10.1002/14651858.CD005049.pub5.
- Van Gelder, I. C., Groenveld, H. F., Crijns, H. J. G. M., Tuininga, Y. S., Tijssen, J. G. P., Alings, A. M., Hillege, H. L., Bergsma-Kadijk, J. A., Cornel, J. H., Kamp, O., Tukkier, R., Bosker, H. A., van Veldhuisen, D. J. und van den Berg, M. P. (2010). **Lenient versus Strict Rate Control in Patients with Atrial Fibrillation.** *N Engl J Med* 362, 1363–1373. DOI: 10.1056/NEJMoa1001337.
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S. und Nerbonne, J. M. (1997). **Outward K^{+} Current Densities and Kv1. 5 Expression are**

- Reduced in Chronic Human Atrial Fibrillation.** *Circ Res* 80, 772–781. DOI: 10.1161/01.RES.80.6.772.
- Vargesson, N. (2015). **Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 105, 140–156. DOI: 10.1002/bdrc.21096.
- Vasudevan, S. (2012). **Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs.** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 311–330. DOI: 10.1002/wrna.121.
- Vasudevan, S., Tong, Y. und Steitz, J. A. (2007). **Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation.** *Science* 318, 1931–1934. DOI: 10.1126/science.1149460.
- Vaughan Williams, E. M. (1984). **A Classification of Antiarrhythmic Actions Reassessed After a Decade of New Drugs.** *J Clin Pharmacol* 24, 129–147. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1984.tb01822.x.
- Viskins, S., Golovner, M., Malov, N., Fish, R., Alroy, I., Vila, Y., Laniado, S., Kaplinsky, E. und Roth, A. (1999). **Circadian variation of symptomatic paroxysmal atrial fibrillation. Data from almost 10 000 episodes.** *Eur Heart J* 20, 1429–1434. DOI: 10.1053/euhj.1999.1632.
- Voigt, N., Heijman, J., Wang, Q., Chiang, D. Y., Li, N., Karck, M., Wehrens, X. H. T., Nattel, S. und Dobrev, D. (2014). **Cellular and Molecular Mechanisms of Atrial Arrhythmogenesis in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation.** *Circulation* 129, 145–156. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006641.
- Voigt, N., Li, N., Wang, Q., Wang, W., Trafford, A. W., Abu-Taha, I., Sun, Q., Wieland, T., Ravens, U., Nattel, S., Wehrens, X. H. T. und Dobrev, D. (2012). **Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak and Increased Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger Function Underlie Delayed Afterdepolarizations in Patients With Chronic Atrial Fibrillation.** *Circulation* 125, 2059–2070. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306.
- Wada, T., Kikuchi, J. und Furukawa, Y. (2012). **Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8.** *EMBO Rep* 13, 142–149. DOI: 10.1038/embor.2011.247.
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F. und Bröer, S. (2000). **The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins.** *Cell Physiol Biochem* 10, 1–12. DOI: 10.1159/000016341.
- Walfridsson, H., Anfinsen, O.-G., Berggren, A., Frison, L., Jensen, S., Linhardt, G., Nordkam, A.-C., Sundqvist, M. und Carlsson, L. (2015). **Is the acetylcholin-regulated inwardly rectifying potassium current a viable antiarrhythmic target? Translational discrepancies of AZD2927 and A7071 in dogs and humans.** *Europace* 17, 473–482. DOI: 10.1093/europace/euu192.
- Wang, J., Zhang, C., Li, N., Su, L. und Wang, G. (2008a). **Expression of TASK-1 in brainstem and the occurrence of central sleep apnea in rats.** *Respir Physiol Neurobiol* 161, 23–28. DOI: 10.1016/j.resp.2007.11.008.

- Wang, K., Long, B., Zhou, J. und Li, P.-F. (2010). **miR-9 and NFATc3 Regulate Myocardin in Cardiac Hypertrophy**. *J Biol Chem* 285, 11903–11912. DOI: 10.1074/jbc.M109.098004.
- Wang, P., Xu, J., Hou, Z., Wang, F., Song, Y., Wang, J., Zhu, H. und Jin, H. (2016). **miRNA-34a promotes proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells by targeting PDGFRA**. *Cell Prolif* 49, 484–493. DOI: 10.1111/cpr.12265.
- Wang, Z., Lu, Y. und Yang, B. (2011). **MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals**. *Cardiovasc Res* 89, 710–721. DOI: 10.1093/cvr/cvq350.
- Wang, Z., Luo, X., Lu, Y. und Yang, B. (2008b). **miRNAs at the heart of the matter**. *J Mol Med* 86, 771–783. DOI: 10.1007/s00109-008-0341-3.
- Ward, J. W. und Franko, B. V. (1961). **A new centrally acting agent (AHR-619) with marked respiratory stimulating, pressor, and awakening effects**. *Fed Proc* 21, 325.
- Washburn, C. P., Bayliss, D. A. und Guyenet, P. G. (2003). **Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA**. *Respir Physiol Neurobiol* 138, 19–35. DOI: 10.1016/S1569-9048(03)00185-X.
- Washburn, C. P., Sirois, J. E., Talley, E. M., Guyenet, P. G. und Bayliss, D. A. (2002). **Serotonergic Raphe Neurons Express TASK Channel Transcripts and a TASK-Like pH-and Halothane-Sensitive K⁺ Conductance**. *J Neurosci* 22, 1256–1265. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-04-01256.2002.
- Watson, J. D. und Crick, F. H. C. (1953). **Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid**. *Nature* 171, 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
- Weber, K. T., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Ahokas, R. A. und Gerling, I. C. (2013). **Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart**. *Nat Rev Cardiol* 10, 15–26. DOI: 10.1038/nrcardio.2012.158.
- Wellens, H. J. J., Brugada, P., Abdollah, H. und Dassen, W. R. (1984). **A comparison of the electrophysiologic effects of intravenous and oral amiodarone in the same patient**. *Circulation* 69, 120–124. DOI: 10.1161/01.CIR.69.1.120.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V. G., Morton, J., Sansom, O., Schüler, J., Stemmler, M. P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S. und Brabletz, T. (2009). **The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs**. *Nat Cell Biol* 11, 1487–1495. DOI: 10.1038/ncb1998.
- Weng, L.-C., Choi, S. H., Klarin, D., Smith, J. G., Loh, P.-R., Chaffin, M., Roselli, C., Hulme, O. L., Lunetta, K. L., Dupuis, J., Benjamin, E. J., Newton-Cheh, C., Kathiresan, S., Ellinor, P. T. und Lubitz, S. A. (2017). **Heritability of Atrial Fibrillation**. *Circ Cardiovasc Genet* 10, e001838. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.117.001838.
- Wettwer, E., Hála, O., Christ, T., Heubach, J. F., Dobrev, D., Knaut, M., Varró, A. und Ravens, U. (2004). **Role of I_{Kur} in Controlling Action Potential Shape and**

- Contractility in the Human Atrium: Influence of Chronic Atrial Fibrillation.** *Circulation* 110, 2299–2306. DOI: 10.1161/01.CIR.0000145155.60288.71.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.-B., Kraft, M., Foerster, K. I., El-Battrawy, I., Lang, S., Borggrefe, M., Haefeli, W. E., Frey, N. und Schmidt, C. (2021). **The Experimental TASK-1 Potassium Channel Inhibitor A293 Can Be Employed for Rhythm Control of Persistent Atrial Fibrillation in a Translational Large Animal Model.** *Front Physiol* 11, 629241. DOI: 10.3389/fphys.2020.629421.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.-B., Kraft, M., Paasche, A., Jávorszky, N., Rinné, S., Sutanto, H., Büscher, A., Foerster, K. I., Blank, A., El-Battrawy, I., Li, X., Lang, S., Tochtermann, U., Kremer, J., Arif, R., Karck, M., Decher, N., van Loon, G., Akin, I., Borggrefe, M., Kallenberger, S., Heijman, J., Haefeli, W. E., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2022a). **Treatment of atrial fibrillation with doxapram: TASK-1 potassium channel inhibition as a novel pharmacological strategy.** *Cardiovasc Res* 118, 1728–1741. DOI: 10.1093/cvr/cvab177.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X., Büscher, A., Kraft, M., Nietfeld, J., Walz, T. P., Unger, L. A., Loewe, A., Schmack, B., Ruhparwar, A., Karck, M., Thomas, D., Borggrefe, M., Seemann, G., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2020). **Pharmacologic TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ Channel (TASK-1) Potassium Channel Inhibitor A293 Facilitates Acute Cardioversion of Paroxysmal Atrial Fibrillation in a Porcine Large Animal Model.** *J Am Heart Assoc* 9, e015751. DOI: 10.1161/JAHA.119.015751.
- Wiedmann, F., Kraft, M., Kallenberger, S., Büscher, A., Paasche, A., Blochberger, P. L., Seeger, T., Jávorszky, N., Warnecke, G., Arif, R., Kremer, J., Karck, M., Frey, N. und Schmidt, C. (2022b). **MicroRNAs Regulate TASK-1 and Are Linked to Myocardial Dilatation in Atrial Fibrillation.** *J Am Heart Assoc* 11, e023472. DOI: 10.1161/JAHA.121.023472.
- Wiedmann, F., Schulte, J. S., Gomes, B., Zafeiriou, M.-P., Ratte, A., Rathjens, F., Fehrmann, E., Scholz, B., Voigt, N., Müller, F. U., Thomas, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2018). **Atrial fibrillation and heart failure-associated remodeling of two-pore-domain potassium (K_{2P}) channels in murine disease models: focus on TASK-1.** *Basic Res Cardiol* 113, 27. DOI: 10.1007/s00395-018-0687-9.
- Wightman, B., Ha, I. und Ruvkun, G. (1993). **Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*.** *Cell* 75, 855–862. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
- Wijesurendra, R. S., Liu, A., Eichhorn, C., Ariga, R., Levelt, E., Clarke, W. T., Rodgers, C. T., Karamitsos, T. D., Bashir, Y., Ginks, M., Rajappan, K., Betts, T., Ferreira, V. M., Neubauer, S. und Casadei, B. (2016). **Lone Atrial Fibrillation Is Associated With Impaired Left Ventricular Energetics That Persists Despite Successful Catheter Ablation.** *Circulation* 134, 1068–1081. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022931.
- Wijffels, M. C. E. F., Kirchhof, C. J. H. J., Dorland, R. und Allessie, M. A. (1995). **Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation: A Study in Awake Chronically Instrumented Goats.** *Circulation* 92, 1954–1968. DOI: 10.1161/01.CIR.92.7.1954.

- Wilke, B. U., Lindner, M., Greifenberg, L., Albus, A., Kronimus, Y., Bünemann, M., Leitner, M. G. und Oliver, D. (2014). **Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors.** *Nat Commun* 5, 5540. DOI: 10.1038/ncomms6540.
- Williams, S., Bateman, A. und O’Kelly, I. (2013). **Altered Expression of Two-Pore Domain Potassium (K_{2P}) Channels in Cancer.** *PLoS One* 8, e74589. DOI: 10.1371/journal.pone.0074589.
- Winnie, A. P. und Collins, V. J. (1966). **The Search for a Pharmacologic Ventilator.** *Acta Anaesthesiol Scand* 10, 63–71. DOI: 10.1111/j.1399-6576.1966.tb00993.x.
- Wirth, K. J., Brendel, J., Steinmeyer, K., Linz, D. K., Rütten, H. und Gögelein, H. (2007). **In Vitro and In Vivo Effects of the Atrial Selective Antiarrhythmic Compound AVE1231.** *J Cardiovasc Pharmacol* 49, 197–206. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318032002f.
- Wolf, P. A., Abbott, R. D. und Kannel, W. B. (1991). **Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study.** *Stroke* 22, 983–988. DOI: 10.1161/01.STR.22.8.983.
- Wollaston, W. H. (1808). **V. On super-acid and sub-acid salts.** *Philos Trans R Soc* 98, 96–102. DOI: 10.1098/rstl.1808.0006.
- Wu, K., He, J., Pu, W. und Peng, Y. (2018). **The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer.** *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16, 120–126. DOI: 10.1016/j.gpb.2017.09.004.
- Xhemalce, B., Robson, S. C. und Kouzarides, T. (2012). **Human RNA Methyltransferase BCDIN3D Regulates MicroRNA Processing.** *Cell* 151, 278–288. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.041.
- Xu, X., Zhao, Z. und Li, G. (2020). **The Therapeutic Potential of MicroRNAs in Atrial Fibrillation.** *Mediators Inflamm* 2020, 3053520. DOI: 10.1155/2020/3053520.
- Yamamoto, Y., Kummer, W., Atoji, Y. und Suzuki, Y. (2002). **TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body.** *Brain Res* 950, 304–307. DOI: 10.1016/S0006-8993(02)03181-5.
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G. und Wang, Z. (2007). **The muscle-specific microRNA *miR-1* regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting *GJA1* and *KCNJ2*.** *Nat Med* 13, 486–491. DOI: 10.1038/nm1569.
- Yang, W., Chendrimada, T. P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P. H., Shiekhattar, R. und Nishikura, K. (2006). **Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases.** *Nat Struct Mol Biol* 13, 13–21. DOI: 10.1038/nsmb1041.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. und Cullen, B. R. (2003). **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** *Genes Dev* 17, 3011–3016. DOI: 10.1101/gad.1158803.
- Yost, C. S. (2006). **A New Look at the Respiratory Stimulant Doxapram.** *CNS Drug Rev* 12, 236–249. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2006.00236.x.

- Younes, M., Ostrowski, M., Thompson, W., Leslie, C. und Shewchuk, W. (2001). **Chemical Control Stability in Patients with Obstructive Sleep Apnea**. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1181–1190. DOI: 10.1164/ajrccm.163.5.2007013.
- Yu, T., Deng, C., Wu, R., Guo, H., Zheng, S., Yu, X., Shan, Z., Kuang, S. und Lin, Q. (2012). **Decreased expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation**. *Life Sci* 90, 219–227. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.11.008.
- Zarauza, J., Lera, M. J. R., Álvarez, C. F., Hernando, J. P., Ceballos, B., Gutiérrez, B., Pérez, J. und Cuesta, J. M. (2006). **Relationship Between C-Reactive Protein Level and Early Recurrence of Atrial Fibrillation After Electrical Cardioversion**. *Rev Esp Cardiol* 59, 125–129. DOI: 10.1016/S1885-5857(06)60120-5.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X. und Graves, P. R. (2008). **Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies**. *Biochem J* 413, 429–436. DOI: 10.1042/BJ20080599.
- Zhu, Y., Feng, Z., Cheng, W. und Xiao, Y. (2018). **MicroRNA-34a mediates atrial fibrillation through regulation of Ankyrin-B expression**. *Mol Med Rep* 17, 8457–8456. DOI: 10.3892/mmr.2018.8873.
- Ziff, O. J., Lane, D. A., Samra, M., Griffith, M., Kirchhof, P., Lip, G. Y. H., Steeds, R. P., Townend, J. und Kotecha, D. (2015). **Safety and efficacy of digoxin: systematic review and meta-analysis of observational and controlled trial data**. *BMJ* 351, h4451. DOI: 10.1136/bmj.h4451.
- Zoll, P. M., Linenthal, A. J., Gibson, W., Paul, M. H. und Norman, L. R. (1956). **Termination of Ventricular Fibrillation in Man by Externally Applied Electric Countershock**. *N Engl J Med* 254, 727–732. DOI: 10.1056/NEJM195604192541601.
- Zoni-Berisso, M., Lercari, F., Carazza, T. und Domenicucci, S. (2014). **Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective**. *Clin Epidemiol* 6, 213–220. DOI: 10.2147/CLEP.S47385.
- Zulkifly, H., Lip, G. Y. H. und Lane, D. A. (2018). **Epidemiology of atrial fibrillation**. *Int J Clin Pract* 72, e13070. DOI: 10.1111/ijcp.13070.

7. Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung und eigene Veröffentlichungen

7.1. Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung

Die Dissertation gliedert sich in zwei separate Teilprojekte: 1. die transkriptionelle Regulation der TASK-1-Expression durch miRNAs und 2. die pharmakologische Modulation des TASK-1 durch Doxapram und Ketodoxapram.

1. Die Bearbeitung des ersten Teilprojekts war bereits durch Dr. Antonius Büscher begonnen worden, bevor ich mit der weiteren Bearbeitung betraut wurde. Die Akquise der Herzohrproben (in Kooperation mit der Klinik für Herzchirurgie in Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. Karck), die Isolation der miRNAs, RNAs und Proteinen aus diesen, sowie deren Quantifizierung mittel qPCR und Western Blot erfolgte daher unter Leitung von Prof. Dr. Constanze Schmidt und wurde von Dr. Antonius Büscher in Kombination mit dem Laborteam durchgeführt (Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.3). Die Planung und Durchführung der Transfektionsexperimente, der elektrophysiologischen Messungen und Bestimmung der miRNA-Konzentrationen im Blut wurde durch mich durchgeführt. Die Sammlung der klinische Daten der Patienten erfolgte durch Prof. Dr. Constanze Schmidt, PD Dr. Felix Wiedmann und Dr. Antonius Büscher und die Cluster-Analyse dieser durch Dr. Dr. Stefan Kallenberger (Abschnitt 3.1.6). Die Auswertung, mit Ausnahme der Cluster-Analysen, und Diskussion der Daten erfolgte hauptsächlich durch mich unter Beteiligung von Prof. Dr. Constanze Schmidt, PD Dr. Felix Wiedmann, Dr. Dr. Stefan Kallenberger und Dr. Antonius Büscher.
2. Die Bearbeitung des zweiten Teilprojektes erfolgte teilweise in Kooperation mit dem analytisch-chemischen Labor und dem klinischen Studienzentrum der Abteilung für Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie. Die TEVC Messungen der Oozyten und Patch-Clamp-Messungen der humanen Kardiomyozyten erfolgte durch mich, wobei die dafür notwendige Sammlung der Herzohrproben und anschließende Isolierung von Kardiomyozyten durch mich in Zusammenarbeit mit dem restlichen Laborteam durchgeführt wurde. Die Sammlung der klinischen Charakteristiken der Patienten erfolgte durch Prof. Dr. Constanze Schmidt, PD Dr. Felix Wiedmann und Leo Weirauch. Die Entwicklung und Validierung der Messmethoden zur Bestimmung von Doxapram und Ketodoxapram in porzinen und humanen

Blutplasma sowie porzinen Gehirngewebe, sowie die Entwicklung und Validierung der Messmethode zur Bestimmung von A293 erfolgte durch mich an den Geräten des analytisch-chemischen Labors. Die Operationen der Schweine erfolgte unter Leitung von Prof. Dr. Constanze Schmidt und PD Dr. Felix Wiedmann. Die EPU und hämodynamischen Messungen wurden von PD Dr. Felix Wiedmann durchgeführt. Die Vorbereitung und Verabreichung der Studienmedikation, die Gewinnung und Quantifizierung der Blut- und Gewebeprobe sowie die Bestimmung der Proteinbindung in den Schweinen erfolgte durch mich. Auch an der Betreuung der DOCTOS-Probanden und Entnahme der Blutproben war ich zusammen mit Yannick L'hoste beteiligt. Die anschließende Quantifizierung dieser und die Bestimmung der Proteinbindung wurde durch mich durchgeführt. Die komplette Auswertung und Diskussion dieses Teilprojekts erfolgte durch mich, mit Ausnahme der Modellierung der pharmakokinetischen Daten in den humanen Probanden die durch Prof. Dr. David Czock (Tabelle 3.2) und die Auswertung der Oberflächen-EKGs die durch Max Jamros (Abbildung 3.25c und 3.25d) erfolgte.

7.2. Eigene Veröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Aufsätzen publiziert:

1. Kraft, M., Büscher, A., Wiedmann, F., L'hoste, Y., Haefeli, W. E., Frey, N., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2021b). **Current Drug Treatment Strategies for Atrial Fibrillation and TASK-1 Inhibition as an Emerging Novel Therapy Option.** *Front Pharmacol* 12, 638445. DOI: 10.3389/fphar.2021.638445
2. Kraft, M., Foerster, K. I., Wiedmann, F., Sauter, M., Paasche, A., Blochberger, P. L., Yesilgöz, B., L'hoste, Y., Frey, N., Haefeli, W. E., Burhenne, J. und Schmidt, C. (2022a). **Simultaneous Quantification and Pharmacokinetic Characterization of Doxapram and 2-Ketodoxapram in Porcine Plasma and Brain Tissue.** *Pharmaceutics* 14, 762. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040762
3. Wiedmann, F. *, Kraft, M. *, Kallenberger, S., Büscher, A., Paasche, A., Blochberger, P. L., Seeger, T., Jávorszky, N., Warnecke, G., Arif, R., Kremer, J., Karck, M., Frey, N. und Schmidt, C. (2022j). **MicroRNAs Regulate TASK-1 and Are Linked to Myocardial Dilatation in Atrial Fibrillation.** *J Am Heart Assoc* 11.7, e023472. DOI: 10.1161/JAHA.121.023472
4. Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.-B., Kraft, M., Foerster, K. I., El-Battrawy, I., Lang, S., Borggreffe, M., Haefeli, W. E., Frey, N. und Schmidt, C. (2021d). **The Experimental TASK-1 Potassium Channel Inhibitor A293 Can Be Employed for Rhythm Control of Persistent Atrial Fibrillation in a Translational Large Animal Model.** *Front Physiol* 11, 629241. DOI: 10.3389/fphys.2020.629421

5. Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X.-B., **Kraft, M.**, Paasche, A., Jávorszky, N., Rinné, S., Sutanto, H., Büscher, A., Foerster, K. I., Blank, A., El-Battrawy, I., Li, X., Lang, S., Tochtermann, U., Kremer, J., Arif, R., Karck, M., Decher, N., van Loon, G., Akin, I., Borggreffe, M., Kallenberger, S., Heijman, J., Haefeli, W. E., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2022h). **Treatment of atrial fibrillation with doxapram: TASK-1 potassium channel inhibition as a novel pharmacological strategy.** *Cardiovascular Research* 118.7, 1728–1741. DOI: 10.1093/cvr/cvab177

* geteilte Erstautorenschaft

Bei **Publikation 1** handelt es sich um einen Übersichtsartikel, dessen Inhalt in Abschnitten der Einleitung aufgegriffen wurde (Abschnitt 1.1, 1.2 und 1.4). Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst die Konzeption, Literaturrecherche und Abfassung des Textes, sowie die Einarbeitung der Anmerkungen der Koautoren und Begutachter.

Publikation 2 beinhaltet Teile der Ergebnisse aus den Abschnitten 3.2.4, 3.2.6 und 3.2.7, der Diskussion aus den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 und des Methodenteils aus Abschnitt 2.6. In der Publikation wurden nur die Daten nach Verabreichung von Doxapram aufgenommen und die Validierung und Quantifizierung im Schwein. Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst die Planung und Durchführung der Experimente, die Auswertung und Diskussion der Daten sowie die Konzeption und das Verfassen des Manuskripts.

Publikation 3 umfasst Teile der Einleitung (Abschnitt 1.3), der Methoden (Abschnitte 2.2 bis 2.5), der Ergebnisse (Abschnitt 3.1) und der Diskussion (Abschnitt 4.1). Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst die Planung und Durchführung der Experimente zur Transkription der Zellen, elektrophysiologischen Messung der Oozyten und Analyse der zirkulierenden miRNA, sowie die Auswertung der Ergebnissen, mit Ausnahme der Cluster-Analysen, und Diskussion aller Ergebnisse. Ebenso war ich beteiligt an der Abfassung des Manuskripts, besonders Methoden-, Ergebnis und Diskussionsteil der von mir durchgeführten Experimente. Auch wurde die finale Fassung des Manuskripts von mir überprüft.

In **Publikation 4** sind Teile der Methoden aus Abschnitt 2.6.3 und der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.5 und 3.2.8 enthalten. Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst die Entwicklung und Validierung der Messmethode zur Quantifizierung von A293, die Quantifizierung der Plasmaproben und die Mitarbeit bei den Experimenten zur Bestimmung der hämodynamischen Parametern. Darüber hinaus war ich beteiligt am Verfassen des Manuskripts, besonders des Teils zur Methodenbeschreibung des Messverfahrens und habe die finale Fassung des Manuskripts überprüft.

Publikation 5 beinhaltet Teile der Ergebnisse aus den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.4 sowie den Methoden aus Abschnitt 2.6.2. Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst Teile der Messungen in Oozyten und HCM, sowie die Quantifizierung der Plasmaproben der

Schweine. Darüber hinaus war ich beteiligt am Verfassen des Manuskripts, besonders der Teil der quantitativen Analytik, und habe die finale Fassung des Manuskripts überprüft.

Weitere eigene Veröffentlichungen

- Ratte, A., Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019b). **Antiarrhythmic properties of ranolazine: Inhibition of atrial fibrillation associated TASK-1 potassium channels.** *Front Pharmacol* 10, 1367. DOI: 10.3389/fphar.2019.01367.
- Weissenborn, M., Schulz, M., **Kraft, M.**, Haefeli, W. E. und Seidling, H. M. (2019). **Potentielle Erfolgsindikatoren für die Durchführung von Projekten zur Arzt-Apotheker-Zusammenarbeit—eine systematische Übersicht.** *Gesundheitswesen* 81, 1057–1068. DOI: 10.1055/a-0592-7184.
- Wiedmann, F., Kiper, A. K., Bedoya, M., Ratte, A., Rinné, S., **Kraft, M.**, Waibel, M., Anad, P., Wenzel, W., González, W., Katus, H. A., Decher, N. und Schmidt, C. (2019d). **Identification of the A293 (AVE1231) Binding Site in the Cardiac Two-Pore-Domain Potassium Channel TASK-1: a Common Low Affinity Antiarrhythmic Drug Binding Site.** *Cell Physiol Biochem* 52, 1223–1235. DOI: 10.33594/0000000083.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhou, X., Büscher, A., **Kraft, M.**, Nietfeld, J., Walz, T. P., Unger, L. A., Loewe, A., Schmack, B., Ruhparwar, A., Karck, M., Thomas, D., Borggreffe, M., Seemann, G., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2020d). **Pharmacologic TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ Channel (TASK-1) Potassium Channel Inhibitor A293 Facilitates Acute Cardioversion of Paroxysmal Atrial Fibrillation in a Porcine Large Animal Model.** *J Am Heart Assoc* 9, e015751. DOI: 10.1161/JAHA.119.015751.
- Wiedmann, F., Schlund, D., Faustino, F., **Kraft, M.**, Ratte, A., Thomas, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019g). **N-Glycosylation of TREK-1/hK_{2P}2.1 Two-Pore-Domain Potassium (K_{2P}) Channels.** *Int J Mol Sci* 20, 5193. DOI: 10.3390/ijms20205193.
- Wiedmann, F., Schlund, D., **Kraft, M.**, Nietfeld, J., Katus, H. A., Schmidt, C. und Thomas, D. (2020e). **Electrophysiological effects of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants on atrial repolarizing potassium channels.** *Europace* 22, 1409–1418. DOI: 10.1093/europace/eaal29.
- Wiedmann, F., Schlund, D., Voigt, N., Ratte, A., **Kraft, M.**, Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019h). **N-glycosylation-dependent regulation of hK_{2P}17.1 currents.** *Mol Biol Cell* 30, 1425–1436. DOI: 10.1091/mbc.E18-10-0687.

Eigene Kongressbeiträge

- Kraft, M.** (2019a). **DOCTOS — TASK-1 inhibition from bench to bedside.** 3. Science Day, Tübingen, Deutschland. Februar 2019.

- Kraft, M.** (2019b). **TASK-1 Inhibitoren als potente Inhibitoren von Vorhofflimmern — from bench to bedside.** 8. CCP Symposium, Heidelberg, Deutschland. Februar 2019.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Ratte, A., Thomas, D., Haefeli, W. E., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019). **BS279: Pharmacological profile of doxapram at atrial potassium channels.** Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin, Deutschland. Oktober 2019.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Foerster, K. I., Paasche, A., Yesilgöz, B., Blochberg, P. L., L'hoste, Y., Arif, R., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N., Burhenne, J., Haefeli, W. E. und Schmidt, C. (2022c). **Differences in TASK-1 modulation by doxapram and ketodoxapram on an electrophysiological and pharmacological level.** Copenhagen Meeting on Cardiac Arrhythmia, Kopenhagen, Dänemark. September 2022.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Foerster, K. I., Paasche, A., Yesilgöz, B., Blochberg, P. L., L'hoste, Y., Arif, R., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N., Burhenne, J., Haefeli, W. E. und Schmidt, C. (2022d). **Differences in TASK-1 modulation by doxapram and ketodoxapram on an electrophysiological and pharmacological level.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2022.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Foerster, K. I., Paasche, A., Yesilgöz, B., Blochberg, P. L., L'hoste, Y., Arif, R., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N., Burhenne, J., Haefeli, W. E. und Schmidt, C. (2022e). **Differences in TASK-1 modulation by doxapram and ketodoxapram on an electrophysiological and pharmacological level.** DZHK Standortretreat Heidelberg/Mannheim, Heidelberg, Deutschland. Juli 2022.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Foerster, K. I., Sauter, M., Paasche, A., Blochberg, P. L., Yesilgöz, B., L'hoste, Y., Arif, R., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N., Burhenne, J., Haefeli, W. E. und Schmidt, C. (2022f). **Comparison of the antiarrhythmic potential of doxapram and its metabolite ketodoxapram.** ESC Congress 2022, Barcelona, Spanien. August 2022.
- Kraft, M.,** Wiedmann, F., Paasche, A., Yesilgöz, B. und Schmidt, C. (2022g). **P16: Novel Therapeutic Approach in Atrial Fibrillation: TASK-1 Inhibitor Ketodoxapram.** SFB 1425 Retreat, Schluchsee, Deutschland. Juli 2022.

Weitere Kongressbeiträge

- Beyersdorf, C., Wiedmann, F., Zhao, Z., Lan, H., El-Battrawy, I., Li, X., **Kraft, M.,** Ratte, A., Lang, S., Szabó, G., Karck, M., Zhou, X., Borggrefe, M., Thomas, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019). **Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin, Deutschland. Oktober 2019.** P261: Antiarrhythmische Vorhofflimmertherapie mittels gentherapeutischer und pharmakologischer Inhibition des TASK-1 Zweiporendomänen-Kaliumkanals.
- Paasche, A., Wiedmann, F., Jávorsky, N., Yesilöz, B., Blochberger, P. L., **Kraft, M.,** Frey, N. und Schmidt, C. (2022a). **Dapagliflozin exhibits class I antiarrhythmic effects which suppress action potential formation in human atrial cardiomyocytes.** ESC Congress 2022, Barcelona, Spanien. August 2022.

- Paasche, A., Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Jávorszky, N., Blochberger, P. L., Yesilöz, B., Karck, M., Frey, N. und Schmidt, C. (2022b). **P1999: Antiarrhythmic potential of SGLT2 inhibitors — Dapagliflozin suppresses action potential formation in atrial cardiomyocytes.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2022.
- Paasche, A., Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Yesilöz, B., Blochberger, P. L., Seibertz, F., Voigt, N., Frey, N. und Schmidt, C. (2022c). **Effects of dapagliflozin on fast inward sodium currents in human atrial cardiomyocytes.** Copenhagen Meeting on Cardiac Arrhythmia, Kopenhagen, Dänemark. September 2022.
- Paasche, A., Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Yesilöz, B. und Schmidt, C. (2022d). **P16: Novel Therapeutic Approach in Atrial Fibrillation: SGLT2 inhibitor dapagliflozin.** SFB 1425 Retreat, Schluchsee, Deutschland. Juli 2022.
- Paasche, A., Wiedmann, F., Yesilgöz, B., **Kraft, M.**, Blochberger, P. L., Frey, N. und Schmidt, C. (2022e). **P2000: Reversibility of atrial fibrillation-associated electrical and structural remodelling on a clinical and cellular level.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2022.
- Ratte, A., Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019a). **The anti-anginal agent ranolazine acts as an inhibitor of atrial fibrillation associated TASK-1 potassium channels.** Basic Science Meeting der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin, Deutschland. Oktober 2019.
- Schmidt, C., Paasche, A., Wiedmann, F. und **Kraft, M.** (2021a). **P16: Atrial Fibrillation and Atrial Tissue Lesions: Dynamics of Functional and Structural Remodelling, and Their Reversibility.** SFB 1425 Retreat, Schluchsee, Deutschland. Juni 2021.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhao, Z., El-Battrawy, I., **Kraft, M.**, Lang, S., Szabo, G., Karck, M., Zhou, X., Borggreffe, M., Thomas, D., Haefeli, W. E., Decher, N. und Katus, H. A. (2019a). **Doxapram is a promising new antiarrhythmic drug for an atrial-specific therapy of atrial fibrillation.** ESC Congress 2019, Paris, Frankreich. September 2019.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Blochberger, P. L., Paasche, A., Yesilgöz, B., **Kraft, M.**, Loewe, A., Kallenberger, S. und Frey, N. (2022a). **A new method to terminate atrial fibrillation.** ESC Congress 2022, Barcelona, Spanien. August 2022.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Blochberger, P. L., Sánchez, J., Martínez-Díaz, P., Paasche, A., Yesilgöz, B., **Kraft, M.**, Loewe, A., Kallenberger, S. und Frey, N. (2022b). **P1172: Atrial tattoos lines: A new method to terminate atrial fibrillation by creating pathways of increased tissue conductivity.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2022.
- Schmidt, C., Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Zhao, Z., Lan, H., El-Battrawy, I., Li, X., **Kraft, M.**, Ratte Antonius Lang, S., Szabó, G., Karck, M., Zhou, X., Akin, I., Borggreffe, M., Thomas, D., Haefeli, W. E., Decher, N. und Katus, H. A. (2019b). **V1506 - A promising novelty for antiarrhythmic therapy: doxapram inhibition of TASK-1 K⁺ channels suppresses atrial fibrillation in a large animal model.**

- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2019.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Ratte, A., Waibel, M., **Kraft, M.**, Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019a). **The pharmacological TASK-1 potassium channel inhibitor A293 facilitates rhythm control of persistent atrial fibrillation in a large animal model.** HRS Congress 2019, San Francisco, CA, USA. Mai 2019.
- Wiedmann, F., Beyersdorf, C., Ratte, A., Waibel, M., **Kraft, M.**, Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019b). **V981: Pharmacological inhibition of atrial TASK-1 channels facilitates acute cardioversion of atrial fibrillation in a porcine large animal model.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2019.
- Wiedmann, F., Boondej, E., Stanifer, M., Paasche, A., **Kraft, M.**, Seeger, T., Frey, N., Uhrig, U., Boulant, S. und Schmidt, C. (2022a). **P1514: The Covid-19 viral 3a protein forms a potassium channel that can be inhibited by antiarrhythmic drugs.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2022.
- Wiedmann, F., Boondej, E., Stanifer, M., Paasche, A., **Kraft, M.**, Seeger, T., Uhrig, U., Frey, N., Boulant, S. und Schmidt, C. (2022b). **The COVID-19 viral 3a protein forms a potassium channel that can be inhibited by antiarrhythmic drugs.** EHRA Congress 2022, Kopenhagen, Dänemark. April 2022.
- Wiedmann, F., Jávorszky, N., Paasche, A., Weirauch, L. P., **Kraft, M.**, Braun, O., Decloedt, A., Verhaeghe, L.-M., van Loon, G., Frey, N. und Schmidt, C. (2022c). **The equine TASK-1 channel ortholog: functional expression and pharmacological characterization.** The Annual Meeting of the ESC Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology, Toledo, Spanien. Juni 2022.
- Wiedmann, F., Jávorszky, N., Paasche, A., Weirauch, L. P., **Kraft, M.**, Braun, O., Decloedt, A., Verhaeghe, L.-M., van Loon, G., Frey, N. und Schmidt, C. (2022d). **The equine TASK-1 channel ortholog: functional expression and pharmacological characterization.** Copenhagen Meeting on Cardiac Arrhythmia, Kopenhagen, Dänemark. September 2022.
- Wiedmann, F., Kiper, A. K., Bedoya, M., Ratte, A., **Kraft, M.**, Waibel, M., Anand, P., Wenzel, W., Gonzales, W., Katus, H. A., Decher, N. und Schmidt, C. (2019c). **Identification of the A293 binding site in the cardiac K2P channel TASK-1: A common low affinity antiarrhythmic drug binding site.** EHRA Congress 2019, Lissabon, Portugal. März 2019.
- Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Büscher, A., Kallenberger, S., Paasche, A., Blochberger, P. L., Arif, R., Kremer, J., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N. und Schmidt, C. (2021a). **BS656: Atrial micro-RNAs regulate expression of the TASK-1 potassium channel and are associated with myocardial dilatation in patients with atrial fibrillation.** Basic Science Meeting der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Bonn, Deutschland. Oktober 2021.
- Wiedmann, F., **Kraft, M.**, Ratte, A., Benda, S., Ruhparwar, A., Karck, M., Haefeli, W. E., Will, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2020a). **P1564: Molecular characterization**

- of TASK-1 inhibition reveals novel candidates for pharmacotherapy of AF.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland. April 2020. (Abgesagt. Nur Abstract publiziert.)
- Wiedmann, F., Nietfeld, J., Paasche, A., **Kraft, M.**, Arif, R., Kremer, J., Warnecke, G., Karck, M., Frey, N. und Schmidt, C. (2021b). **BS655: Neuropeptides as novel regulators of human atrial TASK-1 potassium currents.** Basic Science Meeting der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Bonn, Deutschland. Oktober 2021.
- Wiedmann, F., Nietfeld, N., **Kraft, M.**, Ratte, A., Benda, S., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2020b). **Neuropeptides as novel regulators of human atrial TASK-1 currents.** ESC Congress 2020, Online. August 2022.
- Wiedmann, F., Paasche, A., **Kraft, M.**, Yesilgöz, B. und Schmidt, C. (2022e). **P16: Reversibility of atrial cardiomyopathy: Evaluation on a clinical and cellular level.** SFB 1425 Retreat, Schluchsee, Deutschland. Juli 2022.
- Wiedmann, F., Paasche, A., Yesilgöz, B., **Kraft, M.**, Blochberger, P. L., Frey, N. und Schmidt, C. (2022f). **Evaluating the reversibility potential of atrial cardiomyopathy on a clinical and cellular level.** ESC Congress 2022, Barcelona, Spanien. August 2022.
- Wiedmann, F., Ratte, A., Waibel, M., **Kraft, M.**, Thomas, D., Anand, P., Wenzel, W., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2018a). **High and low affinity inhibitors of the atrial two-pore-domain (K2P) potassium channel TASK-1 share on common drug binding site.** Basic Science Meeting der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin, Deutschland. Oktober 2018.
- Wiedmann, F., Schlund, D., Faustino, F., **Kraft, M.**, Nietfeld, J., Ratte A. Thomas, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2019e). **BS277: N-glycosylation regulates mechanosensitive TREK-1/hK2P2.1 two-pore-domain (K2P) potassium channels.** Basic Science Meeting der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Berlin, Deutschland. Oktober 2019.
- Wiedmann, F., Schlund, D., Ratte, A., Katus, H. A., **Kraft, M.**, Thomas, D. und Schmidt, C. (2019f). **N-glycosylation of TREK-1/hK_{2P}2.1 two-pore-domain (K_{2P}) potassium channels.** ESC Congress 2019, Paris, Frankreich. September 2019.
- Wiedmann, F., Schulte, J., Gomes, B., Ratte, A., **Kraft, M.**, Waibel, M., Zafeiriou, M.-P., Scholz, B., Voigt, N., Müller, F. U., Thomas, D., Katus, H. A. und Schmidt, C. (2018b). **Atrial arrhythmopathy-associated remodeling of two-pore-domain potassium (K2P) channels in murine disease models — focus on TASK-1.** HRS Congress 2018, Boston, MA, USA. Mai 2018.

A. Anhang

Zusatztabellen

Tabelle A.1.: Übersicht der Antiarrhythmika, die in den Leitlinien der ESC oder den Leitlinien eines Konsortiums aus Amerikanische Herzvereinigung (AHA), Amerikanisches Kollegium für Kardiologie (ACC) und der Gesellschaft für Herzrhythmusstörungen (HRS) für die Behandlung von VHF^F empfohlen werden. Die Substanzen sind angegeben mit ihrer Klasse nach Vaughan Williams, Strukturformel und der Leitlinie in der sie aufgeführt werden.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2021).

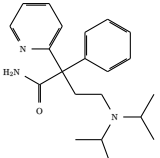
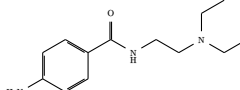
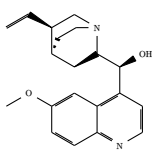
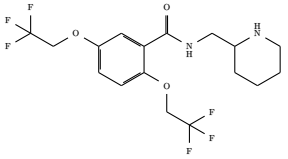
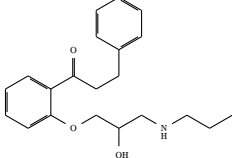
Klasse	Substanz	ESC ¹	USA ²	Chemische Struktur
Ia	Disopyramid	Nein	Ja	
Ia	Procainamid	Nein	Ja	
Ia	Quinidin	Nein	Ja	
Ic	Flecainid	Ja	Ja	
Ic	Propafenon	Ja	Ja	

Tabelle A.1.: (fortgeführt)

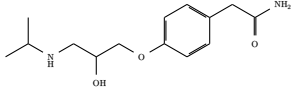
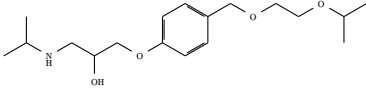
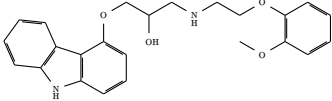
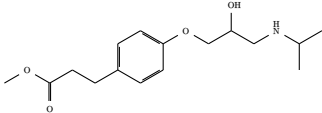
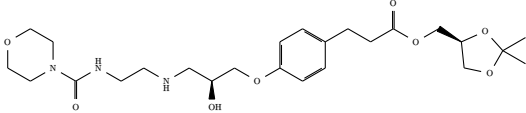
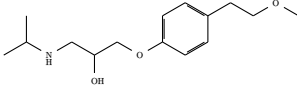
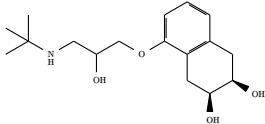
Klasse	Substanz	ESC ¹	USA ²	Chemische Struktur
II	Atenolol	Ja	Ja	
II	Bisoprolol	Ja	Ja	
II	Carvedilol	Ja	Ja	
II	Esmolol	Ja	Ja	
II	Landiolol	Ja	- ³	
II	Metoprolol	Ja	Ja	
II	Nadolol	- ³	Ja	

Tabelle A.1.: (fortgeführt)

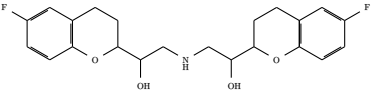
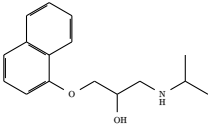
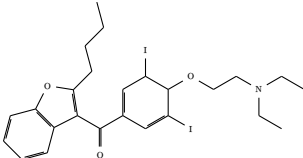
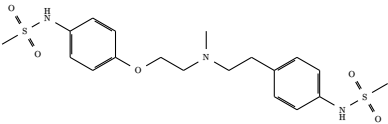
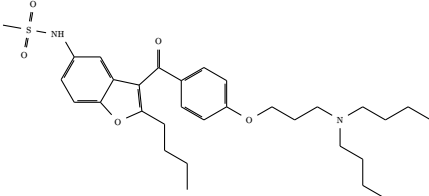
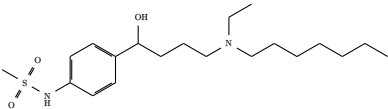
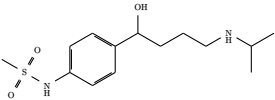
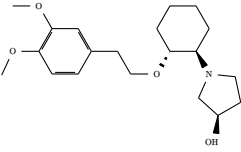
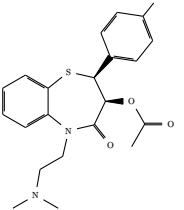
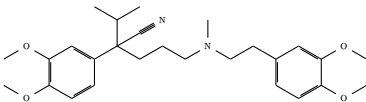
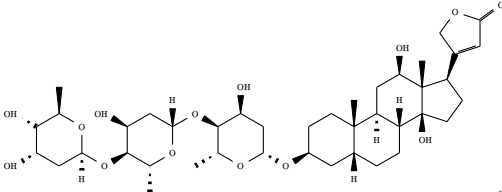
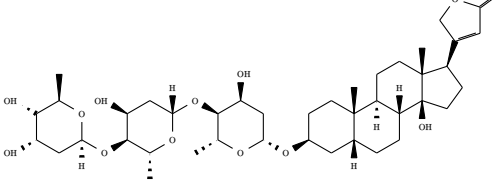
Klasse	Substanz	ESC ¹	USA ²	Chemische Struktur
II	Nebivolol	Ja	- ³	
II	Propranolol	Nein	Ja	
III	Amiodaron	Ja	Ja	
III	Dofetilid	Ja	Ja	
III	Dronedaron	Ja	Ja	
III	Ibutilid	Ja	Ja	
III	Sotalol	Ja	Ja	

Tabelle A.1.: (fortgeführt)

Klasse	Substanz	ESC ¹	USA ²	Chemische Struktur
III	Vernakalant	Ja	- ³	
IV	Diltiazem	Ja	Ja	
IV	Verapamil	Ja	Ja	
N/A	Digoxin	Ja	Ja	
N/A	Digitoxin	yes	- ³	

¹ Empfohlen in der ESC Leitlinie von 2020 (Hindricks et al. 2021)² Empfohlen in der AHA/ACC/HRS Leitlinie von 2014 (January et al. 2014)³ Substanz wird in der Leitlinie nicht erwähnt

Tabelle A.2.: Validierung des Matrixeffekts und der Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Der mit dem IS normalisierte Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate wurden in sechs verschiedenen Chargen von Leermatrix und bei allen vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

IS: interner Standard; QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Hohe Plasmakonzentrationen Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Matrixeffekt [%]								
Lot #1	95,0	99,7	100,9	99,5	96,9	99,4	101,1	100,1
Lot #2	98,8	99,4	99,7	100,0	103,6	99,4	100,0	100,4
Lot #3	95,0	99,7	100,5	99,8	101,8	99,3	100,1	100,1
Lot #4	100,6	99,6	100,8	99,5	101,8	99,8	100,0	100,4
Lot #5	98,8	100,5	100,3	99,9	100,0	99,0	100,3	100,2
Lot #6	96,3	101,0	100,8	99,3	100,4	99,4	99,4	99,7
Mittelwert	97,4	100,0	100,5	99,7	100,8	99,3	100,1	100,2
Wiederfindungsrate [%]								
Lot #1	99,3	98,1	97,7	99,0	100,2	98,5	97,8	98,6
Lot #2	95,6	98,3	98,9	98,5	93,7	98,6	98,9	98,3
Lot #3	99,3	98,1	98,1	98,6	95,4	98,6	98,8	98,6
Lot #4	93,8	98,2	97,8	98,9	95,4	98,1	98,9	98,3
Lot #5	95,6	97,3	98,3	98,6	97,1	98,9	98,6	98,6
Lot #6	98,1	96,8	97,8	99,2	96,7	98,5	99,5	99,0
Mittelwert	96,9	97,8	98,1	98,8	96,4	98,6	98,7	98,6

Tabelle A.3.: Validierung des Matrixeffekts und der Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Der mit dem IS normalisierte Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate wurden in sechs verschiedenen Chargen von Leermatrix und bei allen vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

IS: interner Standard; QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Niedrige Plasmakonzentrationen Nominalwert [pg/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	30	150	1 500	7 500	30	150	1 500	7 500
Matrixeffekt [%]								
Lot #1	113,4	101,8	100,4	99,7	97,6	99,0	98,3	98,3
Lot #2	112,9	104,4	100,4	99,2	99,6	99,9	98,1	98,7
Lot #3	105,5	100,7	100,7	99,2	99,1	99,2	98,5	99,0
Lot #4	106,5	101,3	100,3	99,2	99,3	99,0	98,4	98,7
Lot #5	111,0	103,5	99,6	99,9	98,9	98,6	98,4	98,6
Lot #6	113,4	101,3	101,0	98,9	99,7	99,2	98,9	99,2
Mittelwert	110,4	102,1	100,4	99,4	98,9	99,2	98,4	98,7
Wiederfindungsrate [%]								
Lot #1	95,4	98,6	97,5	98,8	98,6	99,6	98,3	99,8
Lot #2	95,8	96,1	97,6	99,4	96,6	98,7	98,6	99,4
Lot #3	102,6	99,6	97,3	99,3	97,2	99,5	98,2	99,0
Lot #4	101,7	99,0	97,6	99,3	97,0	99,6	98,2	99,4
Lot #5	97,5	96,9	98,3	98,6	97,3	100,1	98,3	99,5
Lot #6	95,1	99,0	96,9	99,6	97,2	99,5	97,7	98,9
Mittelwert	98,0	98,3	97,5	99,2	97,3	99,5	98,2	99,3

Tabelle A.4.: Validierung des Matrixeffekts und der Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Gehirngewebe von Schweinen. Der mit dem IS normalisierte Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate wurden in sechs verschiedenen Chargen von Leermatrix und bei allen vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

IS: interner Standard; QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Gehirngewebe	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [pg/Probe]	1,5	15	150	1 500	1,5	15	150	1 500
Matrixeffekt [%]								
Lot #1	107,8	98,6	100,4	100,6	100,0	101,9	103,4	102,7
Lot #2	107,8	100,4	99,1	99,7	114,1	102,5	102,8	102,7
Lot #3	103,2	101,1	100,4	99,3	114,1	103,0	103,0	102,5
Lot #4	109,1	99,0	99,5	101,5	101,3	104,3	101,8	101,6
Lot #5	110,4	100,3	99,6	99,8	110,3	100,6	101,0	100,2
Lot #6	109,1	101,5	101,0	100,7	107,7	100,6	100,1	101,9
Mittelwert	108,1	100,2	100,0	100,3	107,9	102,1	102,0	102,0
Wiederfindungsrate [%]								
Lot #1	91,6	103,0	100,6	98,2	100,0	98,6	99,1	98,6
Lot #2	91,6	101,2	101,9	99,1	87,6	98,0	99,7	98,6
Lot #3	95,6	100,5	100,6	99,5	87,6	97,5	99,5	98,8
Lot #4	90,5	102,6	101,5	97,3	98,7	96,4	100,7	99,6
Lot #5	89,4	101,3	101,4	99,0	90,7	99,9	101,6	101,1
Lot #6	90,5	100,1	100,0	98,1	92,9	99,6	102,4	99,4
Mittelwert	91,0	101,4	101,0	98,5	92,7	98,4	100,5	99,3

Tabelle A.5.: Validierung der Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden innerhalb jeder einzelnen Messreihe und im Vergleich dreier verschiedener Messreihen zueinander sechsfach für alle vier QC-Konzentrationen sowie der LLOQ bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$. LLOQ: untere Quantifizierungsgrenze; QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Hohe Plasmakonzentrationen Nominalwert [ng/mL]	Doxapram					Ketodoxapram				
	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D
	1	3	15	150	1500	1	3	15	150	1500
Innerhalb der Messreihen										
1 Mittelwert [ng/mL]	1,0	2,7	14,0	145,2	1447	1,1	3,2	15,7	160,5	1555
Richtigkeit [%]	99,8	90,3	93,1	96,8	96,5	107,4	105,0	104,6	107,0	103,6
Präzision [%]	7,9	3,3	4,0	0,9	0,9	3,6	3,5	2,8	0,7	1,1
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
2 Mittelwert [ng/mL]	1,0	2,8	13,9	144,2	1435	1,0	3,1	15,6	159,2	1566
Richtigkeit [%]	104,3	93,3	92,9	96,1	95,7	103,1	102,3	104,0	106,1	104,4
Präzision [%]	5,4	3,3	1,0	1,1	1,1	7,6	3,8	0,6	0,6	0,9
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
3 Mittelwert [ng/mL]	1,1	2,8	14,0	142,1	1431	1,1	3,1	15,6	158,3	1562
Richtigkeit [%]	107,7	91,9	93,4	94,7	95,4	108,1	103,9	103,7	105,5	104,1
Präzision [%]	4,0	2,8	2,9	2,3	3,0	6,4	4,2	2,1	1,5	3,1
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
Vergleich zwischen Messreihen										
Mittelwert [ng/mL]	1,0	2,8	14,0	143,8	1438	1,1	3,1	15,6	159,3	1561
Richtigkeit [%]	103,7	91,8	93,1	95,9	95,8	106,1	103,7	104,1	106,2	104,0
Präzision [%]	6,5	3,3	2,7	1,7	1,9	6,0	3,8	2,0	1,1	1,9

Tabelle A.6.: Validierung der Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden innerhalb jeder einzelnen Messreihe und im Vergleich dreier verschiedener Messreihen zueinander sechsfach für alle vier QC-Konzentrationen sowie der LLOQ bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$. LLOQ: untere Quantifizierungsgrenze; QC: Qualitätskontrolle.
Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Niedrige Plasmakonzentrationen Nominalwert [pg/mL]	Doxapram					Ketodoxapram				
	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D
	10	30	150	1 500	7 500	10	30	150	1 500	7 500
Innerhalb der Messreihen										
1 Mittelwert [pg/mL]	10,7	28,4	143	1 437	7 157	10,6	31,6	158	1 580	7 864
Richtigkeit [%]	106,8	94,8	95,2	95,8	95,4	106,4	105,2	105,5	105,3	104,9
Präzision [%]	3,6	5,5	0,9	1,3	0,4	4,3	1,0	1,4	0,9	0,7
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
2 Mittelwert [pg/mL]	10,0	27,0	142	1 419	6 939	10,6	31,7	157	1 568	7 712
Richtigkeit [%]	99,5	90,0	94,5	94,6	92,5	105,8	105,8	104,6	104,6	102,8
Präzision [%]	2,4	2,5	0,5	1,5	1,0	3,4	2,2	1,5	1,6	0,9
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
3 Mittelwert [pg/mL]	10,6	27,5	142	1 442	7 192	10,1	31,1	158	1 589	7 802
Richtigkeit [%]	106,1	91,5	94,5	96,1	95,9	100,6	103,6	105,5	105,9	104,0
Präzision [%]	6,4	3,0	1,8	0,7	2,6	3,8	1,7	0,6	0,8	4,8
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
Vergleich zwischen Messreihen										
Mittelwert [pg/mL]	10,4	27,6	142	1 433	7 096	10,5	31,5	158	1 579	7 793
Richtigkeit [%]	104,0	91,9	94,7	95,5	94,6	104,5	104,9	105,2	105,3	103,9
Präzision [%]	5,3	4,2	1,2	1,3	2,3	4,4	1,8	1,2	1,2	2,8

Tabelle A.7.: Validierung der Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Gehirngewebe von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden innerhalb jeder einzelnen Messreihe und im Vergleich dreier verschiedener Messreihen zueinander sechsfach für alle vier QC-Konzentrationen sowie der LLOQ bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

LLOQ: untere Quantifizierungsgrenze; QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Gehirngewebe	Doxapram					Ketodoxapram				
	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [pg/Probe]	1	1,5	15	150	1500	1	1,5	15	150	1500
Innerhalb der Messreihen										
1 Mittelwert [pg/Probe]	1,0	1,4	14,1	148	1496	1,1	1,6	16,3	163	1652
Richtigkeit [%]	96,4	93,8	93,7	98,6	99,7	107,5	105,8	108,4	108,7	110,1
Präzision [%]	5,6	3,2	3,9	1,2	1,8	4,7	2,2	1,3	0,7	0,9
Korrelationskoeffizient			0,998					0,998		
2 Mittelwert [pg/Probe]	1,0	1,6	14,5	149	1473	1,0	1,6	15,7	155	1649
Richtigkeit [%]	101,6	106,6	96,7	99,1	98,2	98,8	105,5	104,8	110,7	109,9
Präzision [%]	7,6	3,7	1,9	0,9	0,9	8,4	3,9	1,3	1,0	0,8
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
3 Mittelwert [pg/Probe]	1,0	1,5	15,2	152	1544	1,0	1,4	15,8	161	1603
Richtigkeit [%]	101,6	99,6	101,4	101,5	102,9	98,1	95,3	105,4	107,2	106,9
Präzision [%]	6,0	8,0	2,4	2,2	0,8	8,3	6,3	2,9	1,7	2,2
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
Vergleich zwischen Messreihen										
Mittelwert [pg/Probe]	1,0	1,5	14,6	150	1504	1,0	1,5	15,9	163	1635
Richtigkeit [%]	99,8	100,0	97,3	99,7	100,3	101,6	102,6	106,2	108,9	109,0
Präzision [%]	6,6	7,4	4,3	2,0	2,3	8,0	6,2	2,4	1,8	1,9

Tabelle A.8.: Überprüfung der Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung hoher Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden nach drei Einfrier- und Auftauzirkeln, nach über Nacht Lagerung im Autosampler bei 15 °C und nach Lagerung bei –20 °C für 16 d sowie bei Raumtemperatur für 24 h bestimmt. Die Messungen erfolgten in Tripletten für alle vier-QC-Konzentrationen. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Hohe Plasmakonzentrationen Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Einfrier- und Auftauzirkel								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	14,0	143,2	1 421	3,1	15,7	158,5	1 546
Richtigkeit [%]	92,9	93,2	95,5	94,8	101,7	104,4	105,6	103,1
Präzision [%]	1,9	0,6	0,7	1,0	2,3	1,4	0,5	0,5
Lagerung im Probenzufuhrsystem								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	13,1	141,1	1 410	3,1	15,3	157,3	1 538
Richtigkeit [%]	93,1	91,1	94,1	94,0	103,3	101,9	104,8	102,5
Präzision [%]	1,6	5,6	0,6	0,6	5,3	4,8	0,6	0,9
Lagerung bei –20 °C								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	14,3	146,1	1 421	3,1	16,1	160,2	1 534
Richtigkeit [%]	94,1	95,1	97,4	94,7	103,7	107,3	106,8	102,2
Präzision [%]	3,3	2,8	1,6	0,6	2,3	2,6	0,9	0,8
Lagerung bei Raumtemperatur								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,2	145,4	1 447	3,1	15,9	162,3	1 562
Richtigkeit [%]	96,1	94,7	96,9	96,5	104,2	105,9	108,2	104,2
Präzision [%]	1,1	6,2	0,9	2,3	0,6	2,0	1,5	1,8

Tabelle A.9.: Überprüfung der Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung niedriger Plasmakonzentrationen von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden nach drei Einfrier- und Auftauzirkeln, nach über Nacht Lagerung im Autosampler bei 15 °C und nach Lagerung bei –20 °C für 16 d sowie bei Raumtemperatur für 24 h bestimmt. Die Messungen erfolgten in Tripletten für alle vier QC-Konzentrationen. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$. QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Niedrige Plasmakonzentrationen Nominalwert [pg/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	30	150	1 500	7 500	30	150	1 500	7 500
Einfrier- und Auftauzirkel								
Mittelwert [pg/mL]	27,2	140,2	1 446	7 092	31,1	156,0	1 581	7 775
Richtigkeit [%]	90,8	93,4	96,4	94,6	103,7	104,0	105,4	103,7
Präzision [%]	7,7	1,3	1,0	1,5	1,7	1,0	0,4	1,9
Lagerung im Probenzufuhrsystem								
Mittelwert [pg/mL]	26,7	138,9	1 414	6 997	32,7	157,3	1 568	7 868
Richtigkeit [%]	89,0	92,6	94,3	93,3	109,1	104,9	104,6	104,9
Präzision [%]	3,6	1,4	1,0	0,9	2,0	0,7	0,9	0,4
Lagerung bei –20 °C								
Mittelwert [pg/mL]	26,7	142,9	1 425	7 123	31,1	161,0	1 580	7 769
Richtigkeit [%]	89,1	95,3	95,0	95,0	103,6	107,3	105,3	103,6
Präzision [%]	1,6	1,2	2,6	0,2	0,4	0,6	1,9	0,9
Lagerung bei Raumtemperatur								
Mittelwert [pg/mL]	27,1	142,3	1 432	7 088	30,8	157,1	1 566	7 736
Richtigkeit [%]	90,3	94,8	95,4	94,5	102,7	104,7	104,4	103,2
Präzision [%]	3,0	1,8	1,0	0,5	1,3	0,5	1,2	0,8

Tabelle A.10.: Überprüfung der Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Gehirngewebe von Schweinen. Die Präzision und Richtigkeit wurden nach drei Einfrier- und Auftauzirkeln sowie nach über Nacht Lagerung im Autosampler bei 15 °C bestimmt. Die Messungen erfolgten in Tripletten für alle vier QC-Konzentrationen. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Gehirngewebe	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [pg/Probe]	1,5	15	150	1 500	1,5	15	150	1 500
Einfrier- und Auftauzirkel								
Mittelwert [pg/Probe]	1,4	14,1	146,7	1 522	1,7	16,6	167,8	1 687
Richtigkeit [%]	91,2	93,9	97,8	101,5	110,9	110,6	111,9	112,5
Präzision [%]	2,4	3,9	2,7	2,4	2,3	0,9	2,1	1,0
Lagerung im Probenzufuhrsystem								
Mittelwert [pg/Probe]	1,5	14,7	151,5	1 511	1,4	16,0	158,8	1 544
Richtigkeit [%]	98,9	98,2	101,0	100,7	94,3	106,6	154,9	102,9
Präzision [%]	4,4	2,5	0,4	0,9	4,3	4,7	1,4	1,0

Tabelle A.11.: Erneute Vermessung eines Teils der Plasmaproben der Schweine mit hohen Konzentration an Doxapram bzw. Ketodoxapram zur Bestimmung der Abweichung. Hierfür mussten mindestens 10 % der ursprünglich vermessenen Proben erneut quantifiziert werden. Von den 28 getesteten Proben waren 27 (96,4 %) der Doxapram- sowie Ketodoxapram-Proben innerhalb der geforderten Grenzen von ± 20 %.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Hohe Plasmakonzentrationen	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
A250DP154A04P	2 032	2 149	5,6	18,7	20,9	11,1
A250DP154A05P	1 426	1 423	−0,2	25,8	25,9	0,4
A250DP154A06P	1 095	1 088	−0,6	30,1	30,7	2,2
A250DP154A07P	858	893	4,0	30,1	31,2	3,4
A250DP154A08P	610	619	1,5	30,5	30,9	1,4
A250DP154A09P	408	413	1,4	29,2	31,2	6,8
A250DP154A10P	310	321	3,3	30,1	30,5	1,6
A250DP154A11P	130	129	−1,1	27,6	27,5	−0,2
A250DP154A12P	59,8	61,8	3,3	21,9	21,9	−0,2
A250DP154A13P	33,8	34,9	3,2	17,3	17,4	0,8
A250DP154A14P	19,1	19,0	−0,7	13,1	13,1	−0,1
A250DP154A15P	10,5	11,0	4,1	9,39	9,42	0,3
A250DP154A16P	6,94	7,04	1,4	7,22	7,29	0,9
A250DP156A04P	1 648	1 702	3,2	29,2	30,0	2,6
A250DP156A05P	1 013	1 343	28,0	26,0	33,3	24,8
A250DP156A06P	1 026	1 052	2,5	33,9	34,3	1,2
A250DP156A07P	935	1 003	7,0	33,7	36,3	7,5
A250DP156A08P	684	784	13,6	32,8	38,7	16,6
A250DP156A09P	508	578	12,9	35,1	39,5	11,8
A250DP156A10P	363	402	10,2	34,0	38,5	12,3
A250DP156A11P	164	172	4,7	29,0	29,9	3,0
A250DP156A12P	84,8	89,9	5,8	23,2	25,7	10,2
A250DP156A13P	46,2	50,3	8,4	19,1	20,6	7,8
A250DP156A14P	29,3	30,9	5,1	14,7	15,3	4,0
A250DP156A15P	17,8	19,1	7,1	10,6	11,4	7,0
A250DP156A16P	12,2	13,7	11,6	8,17	8,73	6,6
A250DP156A17P	11,6	12,7	9,7	5,89	6,50	9,9
A250DP156A18P	9,00	10,1	11,2	4,29	4,73	9,7

Tabelle A.12.: Erneute Vermessung eines Teils der Plasmaproben von Schweinen mit niedrigen Konzentration an Doxapram bzw. Ketodoxapram zur Bestimmung der Abweichung. Hierfür mussten mindestens 10 % der ursprünglich vermessenen Proben erneut quantifiziert werden. Von den 14 getesteten Proben waren 12 (85,7 %) der Doxapram-Proben innerhalb der geforderten Grenzen von $\pm 20\%$. Nach dem Ausschluss einer Doxapram-Probe die außerhalb des kalibrierten Bereichs lag, waren 92,3 % der Proben innerhalb der Grenzen. Alle 14 Ketodoxapram-Proben waren innerhalb der Grenzen.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Niedrige Plasmakonzentrationen	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [pg/mL]	Original [pg/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [pg/mL]	Original [pg/mL]	Abweichung [%]
A250DP154A19P	192	193	0,2	86,7	83,7	-3,6
A250DP154A41P	24 608	6 830	-113,1	471	473	0,4
A250DP154A48P	640	644	0,6	365	342	-6,6
A250DP155A19P	345	340	-1,6	99,9	94,5	-5,5
A250DP155A20P	1 243	1 157	-7,2	217	195	-10,5
A250DP155A38P	260	273	5,0	174	178	2,0
A250DP155A39P	2 776	2 763	-0,5	224	211	-6,0
A250DP155A40P	8 242	8 872	7,4	313	340	8,4
A250DP155A57P	6 036	5 560	-8,2	309	283	-8,8
A250DP155A75P	102	111	8,0	271	225	-18,7
A250DP156A23P	407	437	7,2	118	106	-10,7
A250DP156A24P	8 436	8 029	-4,9	87,2	79,7	9,0
A250DP156A42P	9 978	9 128	-8,9	59,1	52,6	-11,6
A250DP156A60P	159	254	46,0	55,8	58,3	4,3

Tabelle A.13.: Erneute Vermessung eines Teils der Gehirnproben der Schweine mit anschließendem Vergleich der Konzentrationen an Doxapram und Ketodoxapram zur Bestimmung der Abweichung. Hierfür mussten mindestens 10 % der ursprünglich vermessenen Proben ein weiteres Mal quantifiziert werden. Von den zwei getesteten Proben waren alle innerhalb der geforderten Grenzen von $\pm 20\%$ für Doxapram und Ketodoxapram.

Tabelle modifiziert nach Kraft et al. (2022).

Gehirngewebe	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [pg/g]	Original [pg/g]	Abweichung [%]	Reanalyse [pg/g]	Original [pg/g]	Abweichung [%]
P154A1	11 580	10 310	-11,7	622	712	-13,6
P154B1	15 860	17 100	-7,5	625	688	-9,5

Tabelle A.14.: Validierung des Matrixeffekts und der Wiederfindungsrate der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Menschen. Der mit dem IS normalisierte Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate wurden in sechs verschiedenen Chargen von Leermatrix und bei allen vier QC-Konzentrationen bestimmt. Zusätzlich wurden der Matrixeffekt und die Wiederfindungsrate in hämolytischen und lipämischen Humanplasma bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.
IS: interner Standard; QC: Qualitätskontrolle

Humanplasma	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [ng/mL]	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Matrixeffekt [%]								
Lot #1	102,0	99,3	100,1	99,9	98,5	98,3	98,5	98,0
Lot #2	100,3	99,0	99,3	99,4	100,2	99,5	98,6	98,8
Lot #3	100,7	99,1	100,0	100,0	99,3	99,1	98,6	98,1
Lot #4	103,1	99,3	99,1	99,2	99,4	98,9	98,1	98,5
Lot #5	100,3	100,3	100,5	99,8	101,1	99,5	98,3	98,6
Lot #6	100,7	99,8	99,9	99,9	101,3	98,9	98,2	97,5
Mittelwert	101,2	99,5	99,8	99,7	100,0	99,1	98,4	98,3
Hämolytisch	102,7	99,0	100,6	100,5	99,1	99,7	98,8	98,8
Lipämisch	101,0	100,1	99,8	99,5	99,6	100,1	98,8	97,9
Wiederfindungsrate [%]								
Lot #1	104,3	101,6	100,3	99,7	100,6	99,1	99,9	100,7
Lot #2	106,1	101,9	101,1	100,3	98,9	97,9	99,8	99,9
Lot #3	105,7	101,8	100,4	99,6	99,8	98,3	99,8	100,6
Lot #4	103,3	101,6	101,3	100,5	99,6	98,5	100,3	100,1
Lot #5	106,1	100,6	99,9	99,8	98,0	97,9	100,1	100,1
Lot #6	105,7	101,1	100,4	99,8	97,8	98,5	100,2	100,1
Mittelwert	105,2	101,4	100,6	99,9	99,1	98,4	100,0	100,4
Hämolytisch	103,6	101,9	99,8	99,1	100,0	97,7	99,6	99,9
Lipämisch	105,4	100,8	100,6	100,2	99,4	97,3	99,6	100,8

Tabelle A.15.: Validierung der Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Menschen. Die Präzision und Richtigkeit wurden innerhalb jeder einzelnen Messreihe und im Vergleich dreier verschiedener Messreihen zueinander sechsfach für alle vier QC-Konzentrationen sowie der LLOQ bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$. LLOQ: untere Quantifizierungsgrenze; QC: Qualitätskontrolle

Humanplasma	Doxapram					Ketodoxapram				
	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [ng/mL]	1	3	15	150	1500	1	3	15	150	1500
Innerhalb der Messreihen										
1 Mittelwert [ng/mL]	1,0	3,0	15,0	149,8	1494	1,0	3,1	15,7	161,0	1619
Richtigkeit [%]	101,3	100,9	100,0	99,9	99,6	103,1	104,7	107,3	107,9	100,1
Präzision [%]	4,0	6,1	1,3	1,3	1,4	4,1	3,6	1,5	1,2	1,4
Korrelationskoeffizient			0,999					0,999		
2 Mittelwert [ng/mL]	1,0	3,0	14,8	150,1	1515	1,0	2,9	15,6	162,3	1627
Richtigkeit [%]	102,9	99,5	98,7	100,1	101,0	98,2	96,0	104,2	108,2	108,5
Präzision [%]	5,8	4,4	2,2	1,4	0,6	4,2	3,7	1,7	0,9	1,1
Korrelationskoeffizient			0,999					0,996		
3 Mittelwert [ng/mL]	1,0	2,8	14,8	152,6	1557	1,1	3,3	16,0	160,8	1628
Richtigkeit [%]	96,9	93,8	98,5	101,8	103,8	105,0	108,3	106,3	107,2	108,6
Präzision [%]	8,0	3,8	2,1	1,3	1,3	4,6	0,6	2,0	0,7	1,3
Korrelationskoeffizient			0,998					0,997		
Vergleich zwischen Messreihen										
Mittelwert [ng/mL]	1,0	2,9	14,9	150,8	1522	1,0	3,1	15,8	161,4	1625
Richtigkeit [%]	100,6	98,0	99,1	100,6	101,5	100,8	102,1	105,0	107,6	108,3
Präzision [%]	6,1	5,6	1,9	1,5	2,1	5,0	5,8	1,9	1,0	1,2

Tabelle A.16.: Überprüfung der Stabilitätsparameter der Methode zur Quantifizierung von Doxapram und Ketodoxapram im Lithium-Heparin-Plasma von Menschen. Die Präzision und Richtigkeit wurden nach drei Einfrier- und Auftauzirkeln, nach über Nacht Lagerung im Autosampler bei 15 °C und nach Lagerung bei –20 °C für 28 d sowie bei Raumtemperatur für 24 h bestimmt. Die Messungen erfolgten in Tripletten für alle vier QC-Konzentrationen. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Humanplasma	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [ng/mL]	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Einfrier- und Auftauzirkel								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	15,0	145,9	1 497	2,9	16,2	167,1	1 642
Richtigkeit [%]	96,1	98,3	97,9	100,1	96,0	108,1	111,4	109,5
Präzision [%]	4,4	1,8	0,6	0,5	1,4	2,1	0,4	0,7
Lagerung im Probenzufuhrsystem								
Mittelwert [ng/mL]	3,2	15,0	150,5	1 481	2,8	15,5	160,2	1 586
Richtigkeit [%]	108,1	100,0	100,3	98,7	92,7	103,2	106,8	105,7
Präzision [%]	3,7	2,4	1,1	0,9	3,6	2,3	1,9	1,0
Lagerung bei –20 °C								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,9	149,3	1 511	3,2	15,9	160,7	1 646
Richtigkeit [%]	97,8	99,0	99,5	100,7	106,7	105,7	107,1	109,7
Präzision [%]	1,7	2,1	2,5	1,0	2,0	1,7	0,8	1,2
Lagerung bei Raumtemperatur								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,9	156,3	1 569	3,3	16,4	163,3	1 637
Richtigkeit [%]	95,4	99,3	104,2	104,6	109,2	109,1	108,9	109,2
Präzision [%]	5,4	1,7	0,4	0,5	2,6	0,6	0,6	1,5

Tabelle A.17.: Erneute Vermessung humaner Plasmaproben zum Vergleich des Einflusses von Citrat- und Lithium-Heparin-Plasma auf die Quantifizierung von Doxapram bzw. Ketodoxapram. Um den Einfluss der Leermatrix zu testen, wurden ein Teil der Proben die ursprünglich mit Kalibratoren, die in Citrat-Plasma angesetzt waren, vermessen wurden (Original), noch einmal mit Kalibration, die in Lithium-Heparin-Plasma angesetzt wurden, vermessen (Reanalyse). Von den 42 getesteten Proben waren 41 (97,6 %) der Doxapram- sowie 38 (90,5 %) der Ketodoxapram-Proben innerhalb der geforderten Grenzen von $\pm 20\%$.

Humanplasma	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
K620DP101A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP101A02P	1 256	1 232	–1,9	<1	6,9	N/A
K620DP101A03P	1 014	1 016	0,2	13,1	13,2	1,0
K620DP101A04P	865	869	0,4	31,7	31,2	–1,5
K620DP101A05P	752	762	1,3	43,0	44,0	2,2
K620DP101A06P	1 644	1 644	0,0	56,3	58,5	4,3
K620DP101A07P	1 313	1 336	1,8	95,8	98,8	3,0

Tabelle A.17.: (fortgeführt)

Humanplasma	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
K620DP101A08P	712	735	3,1	148	156	4,7
K620DP101A09P	425	421	−0,9	199	201	0,9
K620DP101A10P	323	306	−5,6	231	220	−5,1
K620DP101A11P	220	240	8,5	197	218	10,5
K620DP101A12P	190	191	0,4	198	200	1,1
K620DP101A13P	166	165	−0,3	188	190	1,1
K620DP101A14P	45,1	45,8	1,5	60,9	62,1	2,0
K620DP112A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP112A02P	1 691	1 577	−7,0	2,2	1,8	−22,2
K620DP112A03P	1 378	1 290	−6,6	30,5	27,3	−11,0
K620DP112A04P	1 209	1 153	−4,8	69,4	63,5	−8,9
K620DP112A05P	1 151	1 039	−10,2	114	98,1	−15,0
K620DP112A06P	1 597	1 250	−24,4	147	120	−20,1
K620DP112A07P	1 911	1 822	−4,8	190	185	−2,8
K620DP112A08P	1 333	1 275	−4,4	283	268	−5,3
K620DP112A09P	623	600	−3,9	352	335	−5,1
K620DP112A10P	422	405	−4,1	346	322	−7,1
K620DP112A11P	323	348	7,4	202	306	0,9
K620DP112A12P	275	272	−1,1	284	267	−6,2
K620DP112A13P	216	228	5,3	234	230	−1,5
K620DP112A14P	40,7	38,7	−5,0	40,4	37,6	−7,2
K620DP116A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP116A02P	3 088	3 119	1,0	4,5	3,3	−31,7
K620DP116A03P	2 348	2 244	−4,5	42,0	38,9	−7,7
K620DP116A04P	1 868	1 826	−2,3	114	105	−8,5
K620DP116A05P	1 707	1 655	−3,1	166	163	−1,8
K620DP116A06P	2 864	2 772	−3,3	242	250	3,5
K620DP116A07P	3 086	2 892	−6,5	323	338	4,3
K620DP116A08P	1 960	1 934	−1,3	430	450	4,4
K620DP116A09P	1 449	1 433	−1,1	500	488	−2,4
K620DP116A10P	1 113	1 027	−8,0	544	486	−11,3
K620DP116A11P	918	907	−1,2	563	547	−2,9
K620DP116A12P	768	713	−7,3	526	482	−8,7
K620DP116A13P	647	637	−1,5	483	477	−1,3
K620DP116A14P	87,2	83,8	−4,0	92,2	88,2	−4,5

Tabelle A.18.: Vermessung der vier QC-Konzentrationen in humanem Citrat-Plasma mit Kalibratoren in humanem Citrat-, Lithium-Heparin- und EDTA-Plasma, sowie humanem Vollblut und Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein. Die Präzision und Richtigkeit wurden für Tripletten aller vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Humanes Citrat- Plasma Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A 3	QC B 15	QC C 150	QC D 1 500	QC A 3	QC B 15	QC C 150	QC D 1 500
Citrat-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	15,0	151,6	1 499	3,2	16,1	164,6	1 613
Richtigkeit [%]	98,2	100,1	101,1	100,0	107,8	107,6	109,7	107,6
Präzision [%]	2,3	2,0	0,9	1,2	6,2	0,8	1,9	1,7
Lithium-Heparin-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,9	151,4	1 498	3,1	16,0	164,2	1 610
Richtigkeit [%]	96,1	99,5	100,9	99,8	104,0	106,6	109,4	107,3
Präzision [%]	2,4	2,0	0,9	1,2	6,5	0,8	1,9	1,7
EDTA-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	15,1	154,0	1 524	3,2	16,1	165,1	1 619
Richtigkeit [%]	93,5	100,7	102,7	101,6	105,2	107,6	110,1	107,9
Präzision [%]	2,1	2,0	0,9	1,2	8,4	0,8	1,9	1,7
Vollblut Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	15,3	154,9	1 532	3,1	16,1	165,4	1 622
Richtigkeit [%]	97,8	102,0	103,3	102,2	104,3	107,6	110,3	108,1
Präzision [%]	2,0	2,0	0,9	1,2	8,5	0,8	1,9	1,7
Lithium-Heparin-Plasma Schwein								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	15,2	156,0	1 544	3,2	16,4	168,6	1 653
Richtigkeit [%]	91,5	101,4	104,0	103,0	105,9	109,6	112,4	110,2
Präzision [%]	2,1	2,0	0,9	1,2	8,5	0,8	1,9	1,7

Tabelle A.19.: Vermessung der vier QC-Konzentrationen in humanem Lithium-Heparin-Plasma mit Kalibratoren in humanem Citrat-, Lithium-Heparin- und EDTA-Plasma, sowie humanem Vollblut und Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein. Die Präzision und Richtigkeit wurden für Tripletten aller vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Humanes Lithium-Heparin-Plasma Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Citrat-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,1	15,0	150,8	1 514	3,3	16,1	163,7	1 627
Richtigkeit [%]	101,8	100,3	100,5	100,9	109,1	107,1	109,1	108,5
Präzision [%]	1,9	1,9	1,2	0,5	3,9	0,3	2,4	1,1
Lithium-Heparin-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	15,0	150,5	1 512	3,2	15,9	163,3	1 624
Richtigkeit [%]	99,7	99,7	100,4	100,8	105,3	106,2	108,9	108,3
Präzision [%]	1,9	1,9	1,2	0,5	4,1	0,3	2,4	1,1
EDTA-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	15,1	153,1	1 539	3,2	16,1	164,3	1 633
Richtigkeit [%]	99,4	100,9	102,1	102,6	105,5	107,2	109,5	108,9
Präzision [%]	0,4	1,9	1,2	0,5	1,4	0,3	2,4	1,1
Vollblut Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,1	15,3	154,1	1 547	3,1	16,1	164,5	1 636
Richtigkeit [%]	103,8	102,2	102,7	103,1	104,7	107,1	109,7	109,0
Präzision [%]	0,3	1,9	1,2	0,5	1,4	0,3	2,4	1,1
Lithium-Heparin-Plasma Schwein								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	15,2	155,1	1 559	3,2	16,4	167,7	1 667
Richtigkeit [%]	97,5	101,6	103,4	103,9	106,3	109,1	111,8	111,1
Präzision [%]	0,4	1,9	1,2	0,5	1,4	0,3	2,4	1,1

Tabelle A.20.: Vermessung der vier QC-Konzentrationen in humanem EDTA-Plasma mit Kalibratoren in humanem Citrat-, Lithium-Heparin- und EDTA-Plasma, sowie humanem Vollblut und Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein. Die Präzision und Richtigkeit wurden für Tripletten aller vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Humanes EDTA- Plasma Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A 3	QC B 15	QC C 150	QC D 1 500	QC A 3	QC B 15	QC C 150	QC D 1 500
Citrat-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	14,9	150,9	1 496	3,1	16,5	161,8	1 632
Richtigkeit [%]	98,4	99,1	100,6	99,8	104,8	110,2	107,8	108,8
Präzision [%]	0,4	2,0	1,4	0,9	2,5	1,4	2,7	0,8
Lithium-Heparin-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,8	150,6	1 495	3,0	16,4	161,3	1 629
Richtigkeit [%]	96,4	98,6	100,4	99,6	101,0	109,3	107,6	108,6
Präzision [%]	0,4	2,0	1,4	0,9	2,5	1,5	2,8	0,8
EDTA-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	15,0	153,2	1 521	3,1	16,5	162,3	1 638
Richtigkeit [%]	95,0	99,7	102,1	101,4	101,7	110,3	108,2	109,2
Präzision [%]	0,4	2,0	1,4	0,9	2,5	1,5	2,7	0,8
Vollblut Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	15,1	154,1	1 529	3,0	16,5	162,6	1 641
Richtigkeit [%]	99,3	101,0	102,8	101,9	100,9	110,3	108,4	109,4
Präzision [%]	0,4	2,0	1,4	0,9	2,6	1,5	2,8	0,8
Lithium-Heparin-Plasma Schwein								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	15,1	155,2	1 541	3,1	16,8	165,7	1 672
Richtigkeit [%]	93,1	100,4	103,4	102,8	102,4	112,3	110,4	111,5
Präzision [%]	0,4	2,1	1,4	0,9	2,6	1,5	2,8	0,8

Tabelle A.21.: Vermessung der vier QC-Konzentrationen in humanem Vollblut mit Kalibratoren in humanem Citrat-, Lithium-Heparin- und EDTA-Plasma, sowie humanem Vollblut und Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein. Die Präzision und Richtigkeit wurden für Tripletten aller vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Humanes Vollblut	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
Nominalwert [ng/mL]	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Citrat-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	14,7	148,5	1 475	3,1	16,3	163,8	1 619
Richtigkeit [%]	99,0	98,3	99,0	98,3	103,8	108,6	109,2	107,9
Präzision [%]	3,0	0,4	1,8	0,8	0,5	0,8	0,9	0,9
Lithium-Heparin-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,9	14,7	148,3	1 473	3,0	16,2	163,4	1 615
Richtigkeit [%]	97,0	97,8	98,9	98,2	100,1	107,7	108,9	107,7
Präzision [%]	3,1	0,4	1,8	0,8	0,5	0,8	0,9	0,9
EDTA-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	14,8	150,8	1 500	3,1	16,3	164,3	1 624
Richtigkeit [%]	94,1	98,9	100,6	100,0	102,5	108,7	109,5	108,3
Präzision [%]	2,8	0,4	1,8	0,8	0,7	0,8	0,9	0,9
Vollblut Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	15,0	151,7	1 508	3,1	16,3	164,6	1 627
Richtigkeit [%]	98,5	100,1	101,2	100,5	101,7	108,7	109,7	108,5
Präzision [%]	2,7	0,4	1,8	0,8	0,7	0,8	0,9	0,9
Lithium-Heparin-Plasma Schwein								
Mittelwert [ng/mL]	2,8	14,9	152,8	1 519	3,1	16,6	167,7	1 658
Richtigkeit [%]	92,2	99,5	101,8	101,3	103,2	110,7	111,8	110,6
Präzision [%]	2,9	0,5	1,8	0,8	0,7	0,8	0,9	0,9

Tabelle A.22.: Vermessung der vier QC-Konzentrationen in Lithium-Heparin-Plasma von Schweinen mit Kalibratoren in humanem Citrat-, Lithium-Heparin- und EDTA-Plasma, sowie humanem Vollblut und Lithium-Heparin-Plasma vom Schwein. Die Präzision und Richtigkeit wurden für Tripletten aller vier QC-Konzentrationen bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

QC: Qualitätskontrolle

Schweine Lithium-Heparin-Plasma Nominalwert [ng/mL]	Doxapram				Ketodoxapram			
	QC A	QC B	QC C	QC D	QC A	QC B	QC C	QC D
	3	15	150	1 500	3	15	150	1 500
Citrat-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,1	14,7	148,5	1 478	3,2	16,0	159,9	1 608
Richtigkeit [%]	103,4	97,7	99,0	98,5	105,8	106,7	106,6	107,2
Präzision [%]	5,7	3,6	5,0	1,3	0,7	2,6	5,4	0,4
Lithium-Heparin-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	14,6	148,3	1 476	3,1	15,9	159,5	1 604
Richtigkeit [%]	101,3	97,2	98,9	98,4	102,1	105,7	106,3	107,0
Präzision [%]	5,8	3,6	5,0	1,3	0,8	2,6	5,4	0,4
EDTA-Plasma Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,1	14,7	150,9	1 502	3,2	16,0	160,5	1 613
Richtigkeit [%]	103,3	98,3	100,6	100,1	105,1	106,7	107,0	107,6
Präzision [%]	0,9	3,6	5,0	1,3	0,2	2,6	5,4	0,4
Vollblut Human								
Mittelwert [ng/mL]	3,2	14,9	151,8	1 510	3,1	16,0	160,7	1 616
Richtigkeit [%]	107,7	99,6	101,2	100,7	104,3	106,7	107,1	107,7
Präzision [%]	0,9	3,6	5,0	1,3	0,2	2,6	5,4	0,4
Lithium-Heparin-Plasma Schwein								
Mittelwert [ng/mL]	3,0	14,8	152,8	1 522	3,2	16,3	161,1	1 647
Richtigkeit [%]	101,4	98,9	101,8	101,5	105,9	108,7	107,4	109,8
Präzision [%]	1,0	3,6	5,1	1,3	0,2	2,6	3,3	0,4

Tabelle A.23.: Erneute Vermessung eines Teils der DOCTOS-Proben zur Bestimmung der Abweichung. Hierfür mussten mindestens 10 % alle zuvor gemessenen Proben ein zweites Mal vermessen werden. Von den 65 getesteten Proben waren 61 (93,8 %) der Doxapram- sowie 54 (85,7 %) der Ketodoxapram-Proben innerhalb der geforderten Grenzen von $\pm 20\%$.

Humanplasma	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
K620DP104A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP104A02P	1 237	1 525	20,8	2,80	3,61	25,2
K620DP104A03P	824	944	13,6	30,6	35,2	13,9
K620DP104A04P	709	764	7,5	59,1	64,9	9,4
K620DP104A05P	462	522	12,2	65,4	68,8	5,1
K620DP104A06P	1 828	2 059	11,9	72,3	79,3	9,3
K620DP104A07P	989	1 150	15,0	130	150	14,2

Tabelle A.23.: (fortgeführt)

Humanplasma	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
K620DP104A08P	553	601	8,4	173	186	7,4
K620DP104A09P	374	411	9,5	211	225	6,7
K620DP104A10P	262	310	16,7	205	237	14,4
K620DP104A11P	165	179	8,0	155	168	8,3
K620DP104A12P	126	222	55,7	129	226	54,8
K620DP104A13P	171	188	9,4	187	210	11,6
K620DP104A14P	64,8	79,8	20,8	108	132	20,5
K620DP105A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP105A02P	804	904	11,8	<1	1,23	N/A
K620DP105A03P	610	666	8,8	21,0	23,0	9,0
K620DP105A04P	495	529	6,7	43,0	45,8	6,1
K620DP105A05P	405	455	11,6	52,5	62,1	16,8
K620DP105A06P	367	395	7,5	60,2	64,1	6,2
K620DP105A07P	288	319	10,4	63,3	70,9	11,4
K620DP105A08P	213	242	12,7	65,1	77,3	17,2
K620DP105A09P	140	155	10,0	79,1	89,2	12,0
K620DP105A10P	104	123	16,6	68,6	86,5	23,1
K620DP105A11P	85,7	105	20,5	64,1	77,9	19,4
K620DP105A12P	71,5	84,5	16,6	57,9	71,5	21,1
K620DP105A13P	64,5	76,5	17,0	53,7	61,9	14,1
K620DP105A14P	21,4	25,2	16,6	17,7	21,6	19,7
K620DP115A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP115A02P	283	262	-7,6	<1	<1	N/A
K620DP115A03P	1 134	1 157	2,0	6,89	5,51	-22,3
K620DP115A04P	1 087	1 061	-2,4	27,0	26,2	-2,9
K620DP115A05P	991	1 002	1,2	46,8	46,0	-1,7
K620DP115A06P	1 334	1 158	-14,1	72,2	58,8	20,6
K620DP115A07P	1 909	1 921	0,6	127	123	-3,4
K620DP115A08P	1 387	1 399	0,8	240	233	-2,8
K620DP115A09P	864	845	-2,3	350	340	-2,8
K620DP115A10P	630	664	5,2	404	389	-3,8
K620DP115A11P	499	487	-2,4	438	408	-7,1
K620DP115A12P	415	414	-0,1	420	423	0,7
K620DP115A13P	314	311	-0,9	338	327	-3,3
K620DP115A14P	105	111	5,8	143	147	2,7
K620DP120A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP120A02P	3 093	2 907	-6,2	1,94	1,22	-45,2
K620DP120A03P	4 964	4 771	-4,0	22,5	21,0	-6,8
K620DP120A04P	3 657	3 622	-1,0	83,0	81,0	-2,4
K620DP120A05P	2 517	2 436	-3,3	151	151	0,3
K620DP120A06P	3 138	2 970	-5,5	248	250	0,8
K620DP120A07P	3 581	3 594	0,4	293	299	1,9
K620DP120A08P	2 370	2 411	1,7	433	478	10,0

Tabelle A.23.: (fortgeführt)

Humanplasma	Doxapram			Ketodoxapram		
	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]	Reanalyse [ng/mL]	Original [ng/mL]	Abweichung [%]
K620DP120A09P	1 385	1 247	−10,5	555	532	−4,2
K620DP120A10P	1 013	978	−3,5	629	610	−3,1
K620DP120A11P	823	750	−9,3	629	595	−5,6
K620DP120A12P	697	651	−6,8	618	593	−4,2
K620DP120A13P	677	655	−3,3	605	607	0,4
K620DP120A14P	351	337	−4,1	386	374	−3,1
K620DP121A01P	0	0	0,0	0	0	0,0
K620DP121A02P	4 330	4 259	−1,7	3,90	2,45	−45,7
K620DP121A03P	4 599	4 785	4,0	50,6	46,9	−7,6
K620DP121A04P	3 447	3 411	−1,1	120	116	−3,3
K620DP121A05P	2 479	2 392	−3,6	212	199	−6,6
K620DP121A06P	4 054	4 008	−1,1	326	317	−2,8
K620DP121A07P	4 118	3 967	−3,7	367	379	3,3
K620DP121A08P	1 119	1 078	−3,7	296	322	8,4
K620DP121A09P	2 333	2 056	−12,6	534	561	5,0
K620DP121A10P	1 079	1 052	−2,6	537	541	0,7
K620DP121A11P	703	709	0,8	510	517	1,4
K620DP121A12P	555	504	−9,6	493	460	−6,9
K620DP121A13P	447	434	−3,0	447	441	−1,4
K620DP121A14P	126	114	−9,5	127	121	−4,7

Tabelle A.24.: Validierung der Präzision und Richtigkeit der Methode zur Quantifizierung von A293 im Schweineplasma. Die Präzision und Richtigkeit wurden innerhalb jeder einzelnen Messreihe und im Vergleich dreier verschiedener Messreihen zueinander sechsfach für alle drei QC-Konzentrationen sowie der LLOQ bestimmt. Alle Werte waren innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen von $\pm 15\%$.

LLOQ: untere Quantifizierungsgrenze; QC: Qualitätskontrolle

Schweineplasma		LLOQ	QC A	QC B	QC C
Nominalwert [ng/mL]		5,0	15	150	1 500
Innerhalb der Messreihen					
1	Mittelwert [ng/mL]	4,9	15,9	158	1 617
	Richtigkeit [%]	97,6	105,7	105,3	107,8
	Präzision [%]	5,7	3,3	4,1	4,8
	Korrelationskoeffizient	0,995			
2	Mittelwert [ng/mL]	5,1	16,0	165	1 545
	Richtigkeit [%]	102,1	106,6	109,8	103,0
	Präzision [%]	7,9	5,3	2,4	2,0
	Korrelationskoeffizient	0,992			
3	Mittelwert [ng/mL]	5,1	15,6	163	1 458
	Richtigkeit [%]	101,6	104,0	108,3	97,2
	Präzision [%]	11,8	6,5	2,1	2,3
	Korrelationskoeffizient	0,999			
Vergleich zwischen Messreihen					
	Mittelwert [ng/mL]	5,0	15,8	162	1 540
	Richtigkeit [%]	100,4	105,4	107,8	102,7
	Präzision [%]	8,4	5,0	3,3	5,4

Zusatzabbildungen

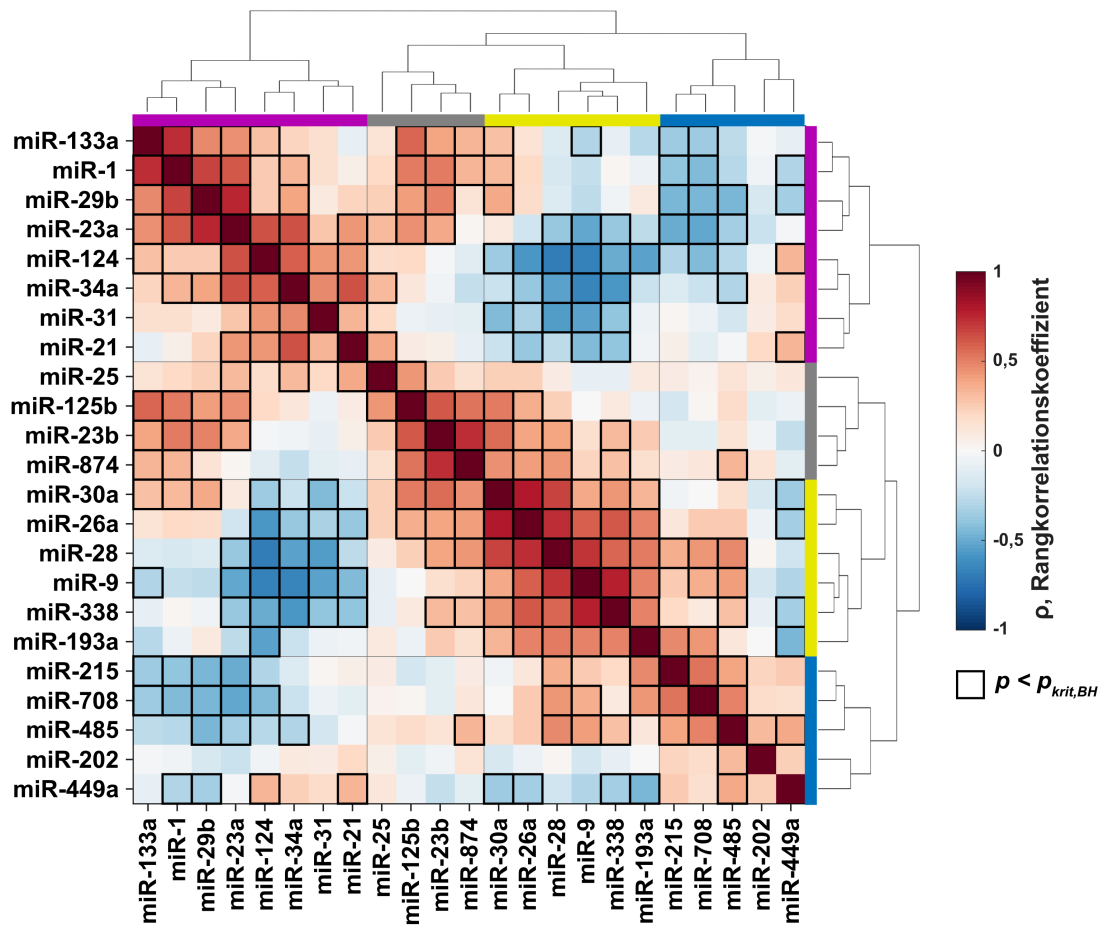


Abbildung A.1.: Cluster-Analyse der Veränderungen der miRNA-Expression. Cluster aus den Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman) der miRNA-Expression bilden Gruppen aus miRNAs mit ähnlichen Expressionscharakteristika, die durch purpurne, graue, gelbe und blaue Balken markiert sind. Schwarz markierte Quadrate stehen für $p < p_{krit,BH} = 0,022$, berechnet mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testung.

miR: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure.

Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).

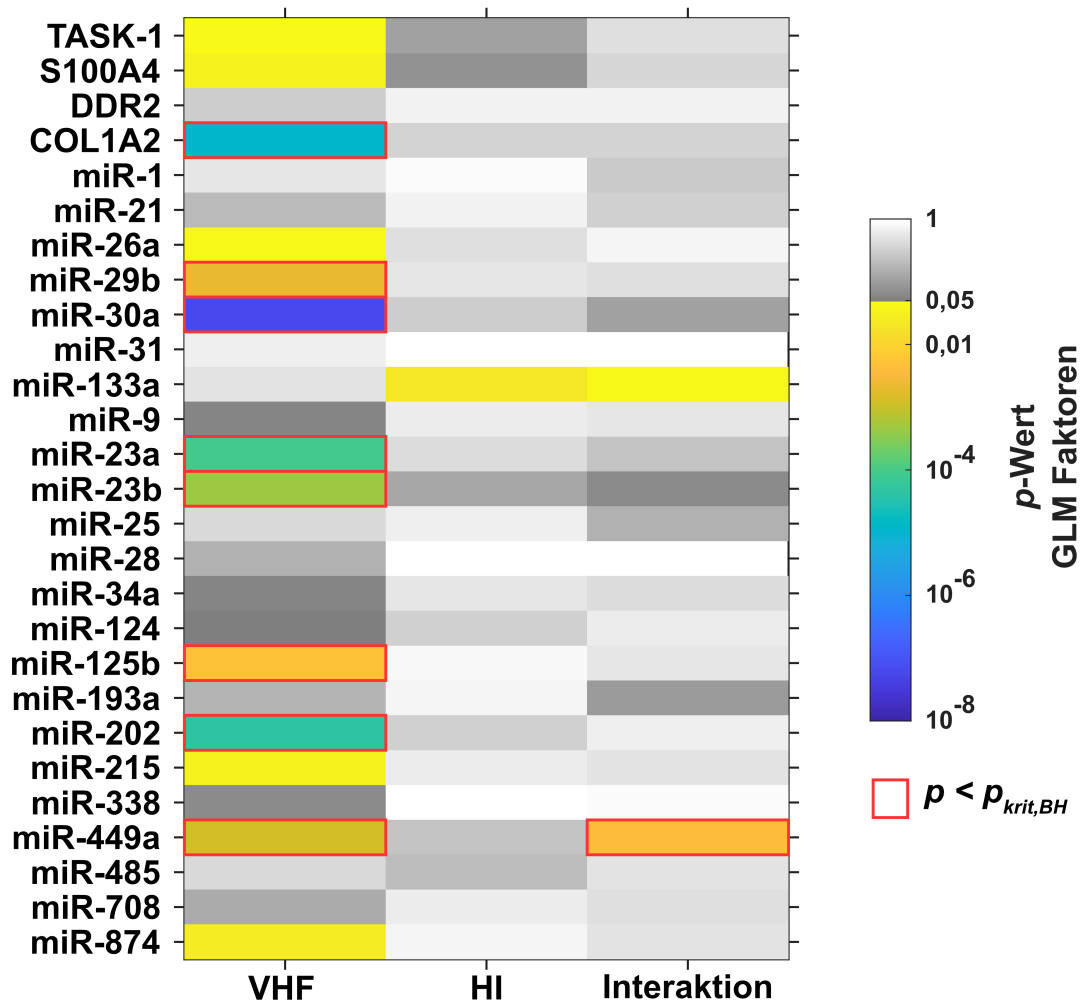
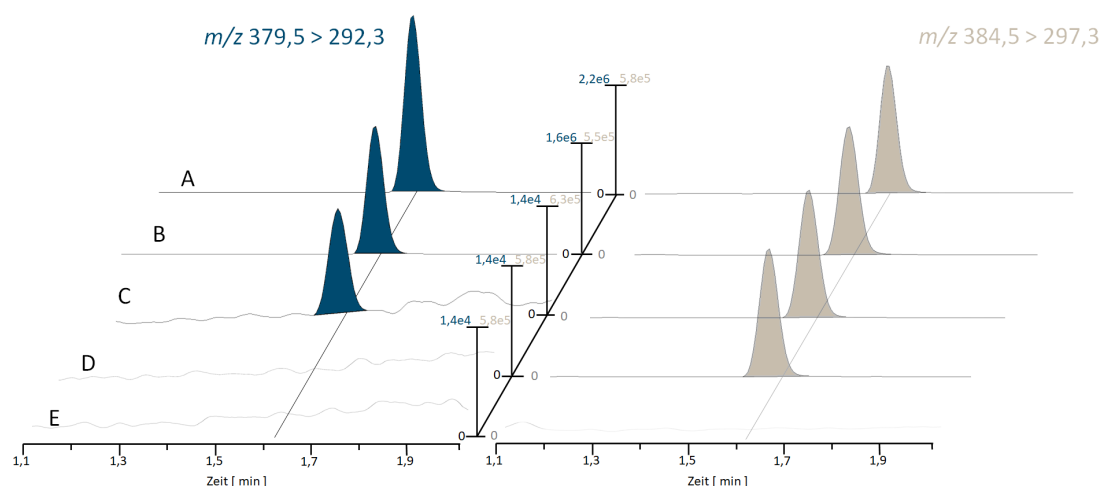
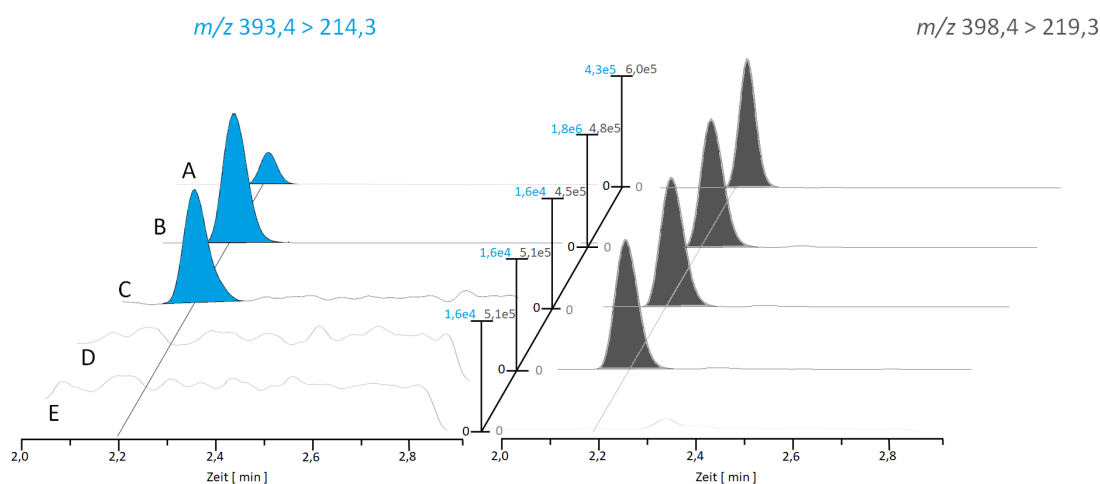


Abbildung A.2.: Assoziation von miRNA und mRNA mit VHF und HI. Für miRNA- und mRNA-Expression wurde der Effekt der Faktoren VHF und HI sowie deren Interaktion durch zweiseitige ANOVA evaluiert. Rote Boxen stehen für $p < p_{krit,BH}=0,0050$ berechnet mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testung.
 HI: Herzinsuffizienz; miR: miRNA; miRNA: micro Ribonukleinsäure; VHF: Vorhofflimmern.
 Abbildung modifiziert nach Wiedmann et al. (2022b).



a) Quantifizierung von hohen Doxapram-Plasmakonzentrationen

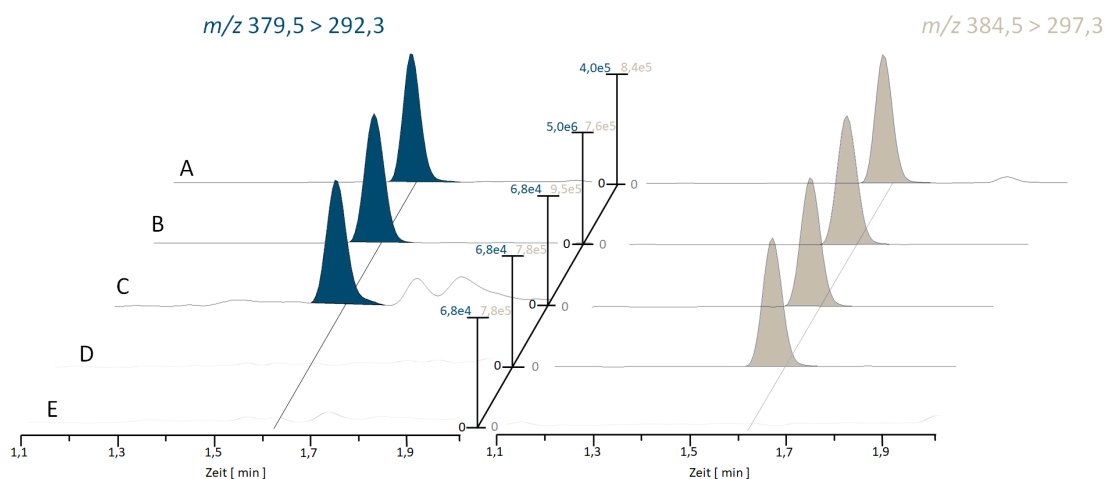


b) Quantifizierung von hohen Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen

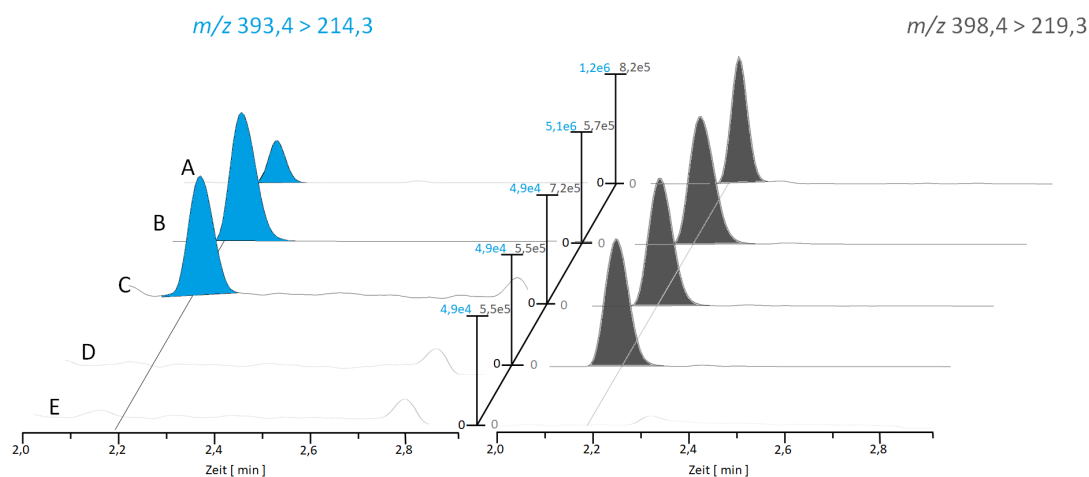
Abbildung A.3.: Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der hohen Doxapram- und Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen. Übergänge der Analyten sind auf der linken Seite in dunkelblau für Doxapram (a) und hellblaue für Ketodoxapram (b) dargestellt. Die Übergänge des IS sind auf der rechten Seite in hellbraun für Doxapram-d5 und dunkelgrau für Ketodoxapram-d5 angezeigt. Chromatogramm A: Plasmaprobe von Schwein Nr. 154, die 15 min nach *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram abgenommen wurde und eine Konzentration von 1095 ng/mL Doxapram und 30,1 ng/mL Ketodoxapram hatte; B: Probe der mittleren QC-Probe mit einer Konzentration von 150 ng/mL; C: Probe der unteren Quantifizierungsgrenze mit einer Konzentration von 1 ng/mL; D: reine IS-Probe und E: Blindwert. Die Intensität des Blindwertes wurde mit dem Wert der Probe an der unteren Bestimmungsgrenze normalisiert. Die restlichen Proben wurden zu der Intensität der QC-Probe normalisiert.

IS: interner Standard; *i.v.*: intravenös; QC: Qualitätskontrolle.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).



a) Quantifizierung von niedrigen Doxapram-Plasmakonzentrationen

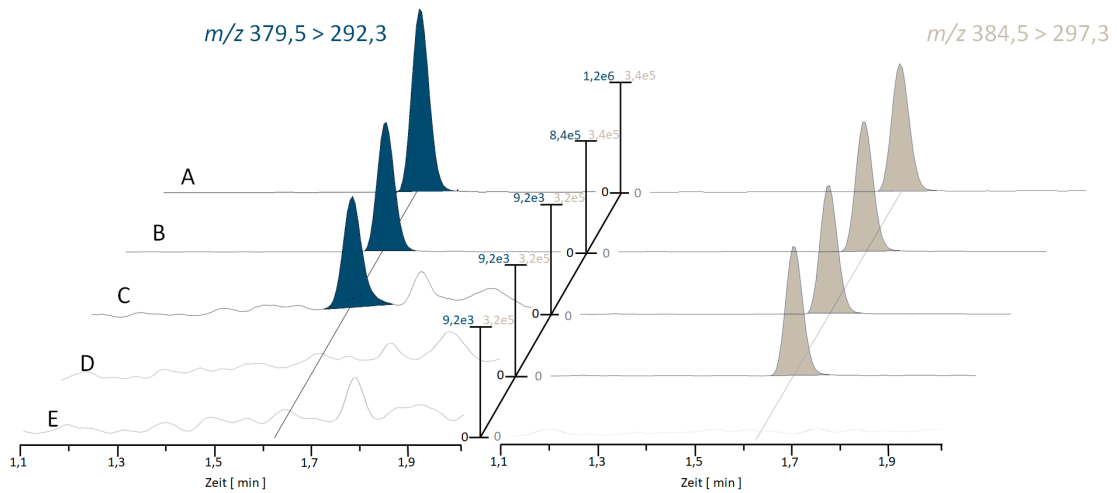


b) Quantifizierung von niedrigen Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen

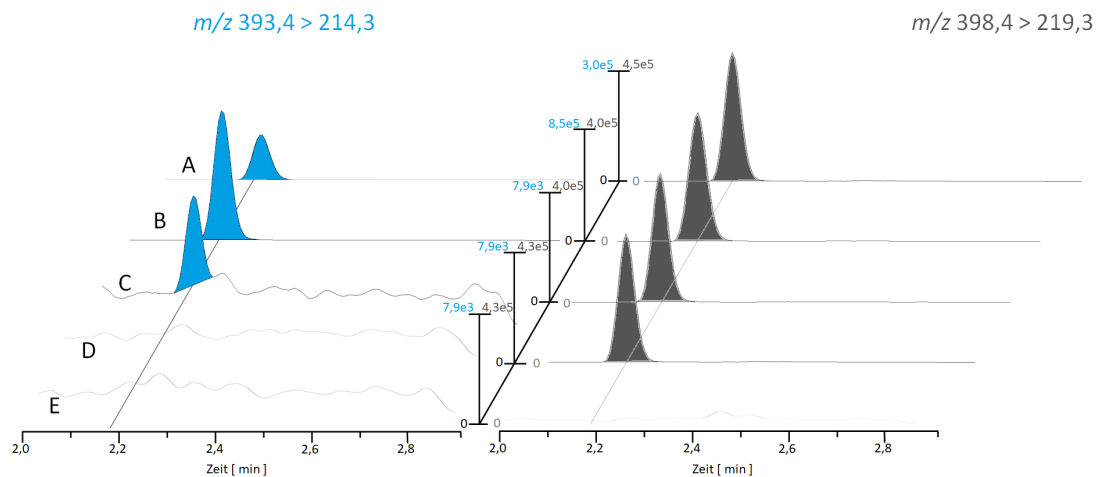
Abbildung A.4.: Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der niedrigen Doxapram- und Ketodoxapram-Plasmakonzentrationen. Übergänge der Analyten sind auf der linken Seite in dunkelblau für Doxapram (a) und hellblaue für Ketodoxapram (b) dargestellt. Die Übergänge des IS sind auf der rechten Seite in hellbraun für Doxapram-d5 und dunkelgrau für Ketodoxapram-d5 angezeigt. Chromatogramm A: Plasmaprobe von Schwein Nr. 155, die am Tag der terminalen Operation nach 14-tägiger *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram abgenommen wurde und eine Konzentration von 111 pg/mL Doxapram und 225 pg/mL Ketodoxapram hatte; B: Probe der mittleren QC-Probe mit einer Konzentration von 1 500 pg/mL; C: Probe der unteren Quantifizierungsgrenze mit einer Konzentration von 10 pg/mL; D: reine IS-Probe und E: Blindwert. Die Intensität des Blindwertes wurde mit dem Wert der Probe an der unteren Bestimmungsgrenze normalisiert. Die restlichen Proben wurden zu der Intensität der QC-Probe normalisiert.

IS: interner Standard; *i.v.*: intravenös; QC: Qualitätskontrolle.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).



a) Quantifizierung von Doxapram in Gehirngewebeproben



b) Quantifizierung von Ketodoxapram in Gehirngewebeproben

Abbildung A.5.: Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der Doxapram- und Ketodoxapram-Konzentrationen in Gehirngewebe. Übergänge der Analyten sind auf der linken Seite in dunkelblau für Doxapram (a) und hellblaue für Ketodoxapram (b) dargestellt. Die Übergänge des IS sind auf der rechten Seite in hellbraun für Doxapram-d5 und dunkelgrau für Ketodoxapram-d5 angezeigt. Chromatogramm A: Gehirngewebeprobe von Schwein Nr. 154, die am Tag der terminalen Operation nach 14-tägiger *i.v.* Gabe von 1 mg/kg Doxapram abgenommen wurde und eine Konzentration von 164 pg/Probe Doxapram und 37,3 pg/Probe Ketodoxapram hatte; B: Probe der mittleren QC-Probe mit einer Konzentration von 150 pg/Probe; C: Probe der unteren Quantifizierungsgrenze mit einer Konzentration von 1 pg/Probe; D: reine IS-Probe und E: Blindwert. Die Intensität des Blindwertes wurde mit dem Wert der Probe an der unteren Bestimmungsgrenze normalisiert. Die restlichen Proben wurden zu der Intensität der QC-Probe normalisiert.

IS: interner Standard; *i.v.*: intravenös; QC: Qualitätskontrolle.

Abbildung modifiziert nach Kraft et al. (2022).

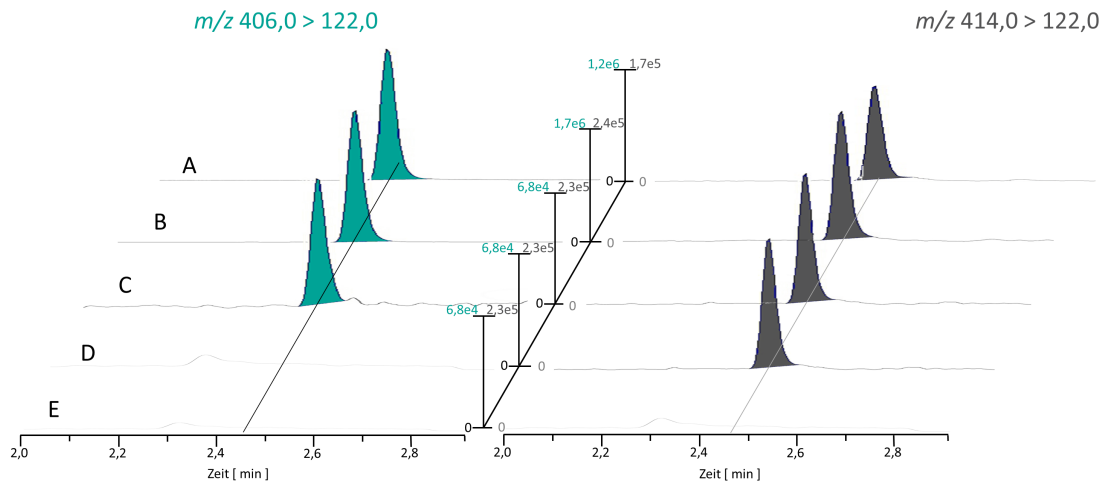


Abbildung A.6.: Ausgewählte Chromatogramme der Methode zur Bestimmung der A293 Konzentrationen in Schweineplasma. Übergänge des Analyten A293 sind auf der linken Seite in grün dargestellt. Die Übergänge des IS A293-d8 sind auf der rechten Seite in dunkelgrau angezeigt. Chromatogramm A: Schweineplasmaprobe 5 min nach *i.v.* Gabe von 0,125 mg/kg A293 mit einer Konzentration von 156,8 ng/mL A293; B: Probe der mittleren QC-Probe mit einer Konzentration von 150 ng/mL; C: Probe der unteren Quantifizierungsgrenze mit einer Konzentration von 5 ng/mL; D: reine IS-Probe und E: Blindwert. Die Intensität des Blindwertes wurde mit dem Wert der Probe an der unteren Bestimmungsgrenze normalisiert. Die restlichen Proben wurden zu der Intensität der QC-Probe normalisiert. IS: interner Standard; *i.v.*: intravenös; QC: Qualitätskontrolle

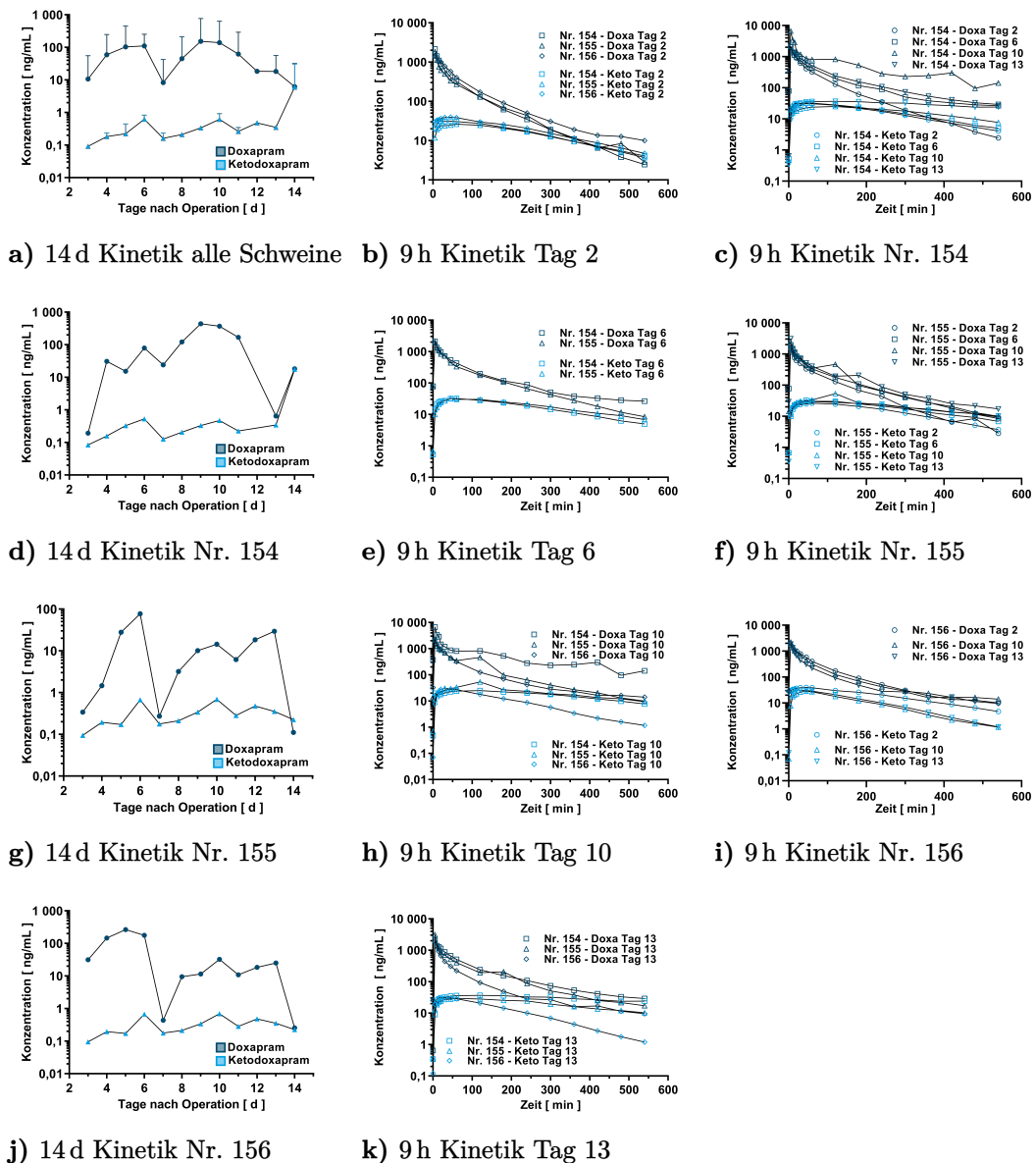


Abbildung A.7.: Detaillierte Abbildungen der Konzentrations-Zeit-Kurven in Deutschen Landrasse Schweinen nach *i.v.* Applikation von 1 mg/kg Doxapram. Übersicht der Plasmaspiegel aller Schweine ($n = 3$) über 14 d als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (a; Doxapram: dunkelblaue Kreise; Ketodoxapram: hellblaue Dreiecke). Plasmaspiegel über 14 d der einzelnen Schweinen (d: Nr. 154; g: Nr. 155; j: Nr. 156; Doxapram: dunkelblaue Kreise; Ketodoxapram: hellblaue Dreiecke). Konzentrations-Zeit-Kurve über 9 h an Tag 2 (b), Tag 6 (e), Tag 10 (h) und Tag 13 (k) stratifiziert nach Schweinen. Die Ketodoxapram-Konzentrationen sind mit hellblauen und die von Doxapram mit dunkelblauen Symbolen dargestellt. Konzentrations-Zeit-Kurven über 9 h von Schwein 154 (c), Schwein 155 (f) und Schwein 156 (i) an Tag 2, 6, 10 und 13.

i.v.: intravenös

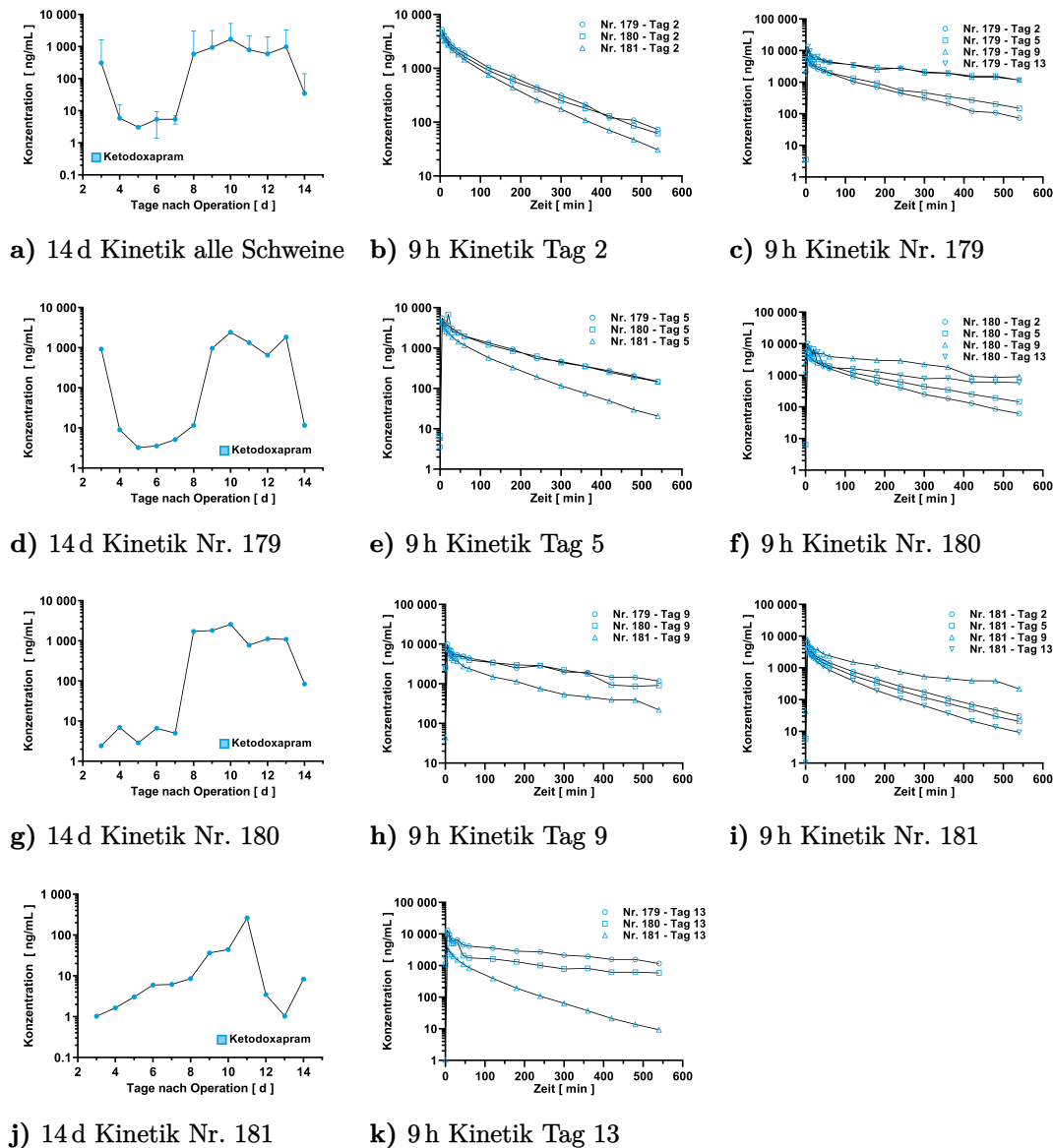


Abbildung A.8.: Detaillierte Abbildungen der Konzentrations-Zeit-Kurven in Deutschen Landrasse Schweinen nach *i.v.* Applikation von 1 mg/kg Ketodoxapram. Übersicht der Plasmaspiegel aller Schweine ($n = 3$) über 14 d als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (a; Ketodoxapram: hellblaue Kreise). Plasmaspiegel über 14 d der einzelnen Schweinen (d: Nr. 179; g: Nr. 180; j: Nr. 181; Ketodoxapram: hellblaue Kreise). Konzentrations-Zeit-Kurve über 9 h an Tag 2 (b), Tag 5 (e), Tag 9 (h) und Tag 13 (k) stratifiziert nach Schwein. Die Ketodoxapram-Konzentrationen sind mit hellblauen Symbolen dargestellt. Konzentrations-Zeit-Kurven über 9 h von Schwein 179 (c), Schwein 180 (f) und Schwein 181 (i) an Tag 2, 5, 9 und 13.

i.v.: intravenös

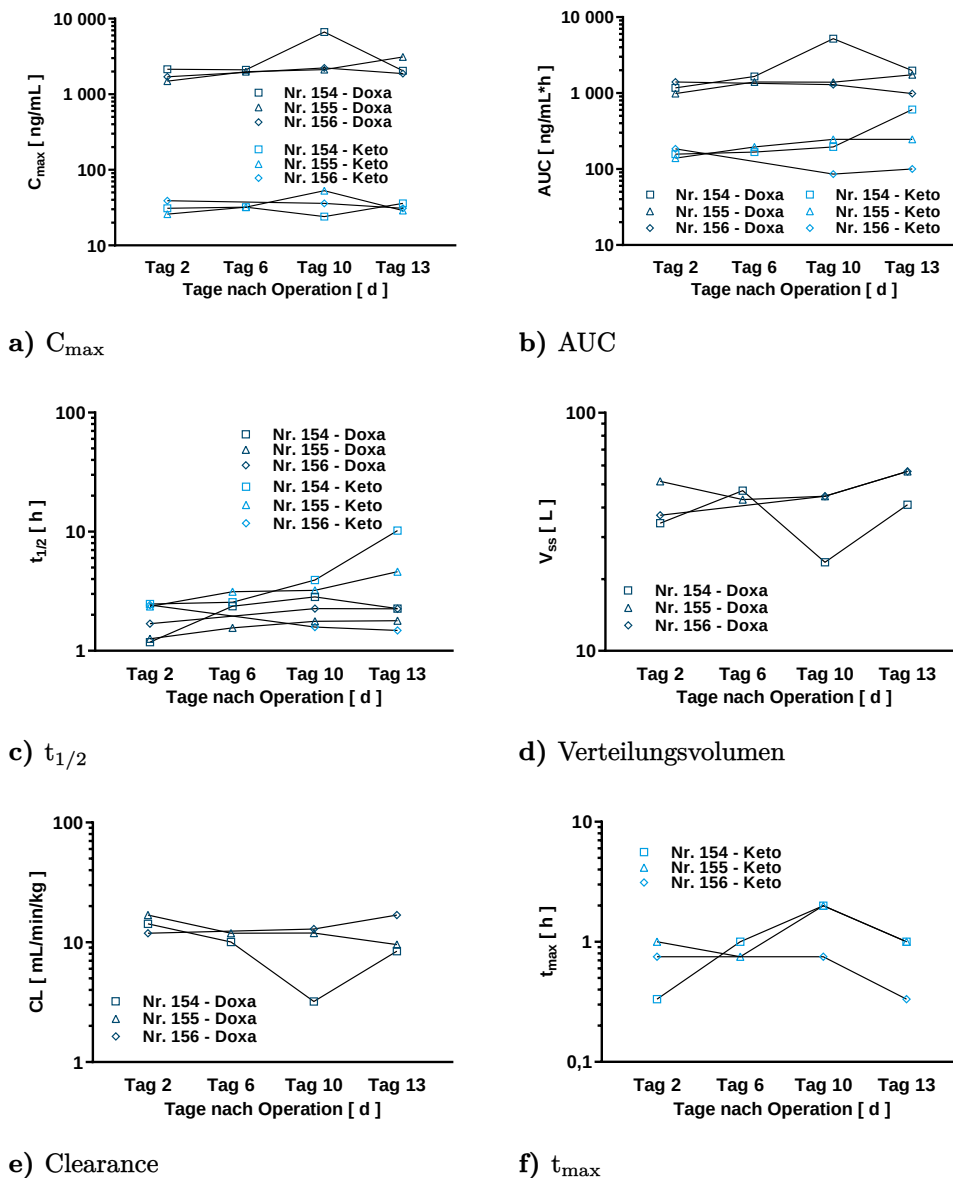
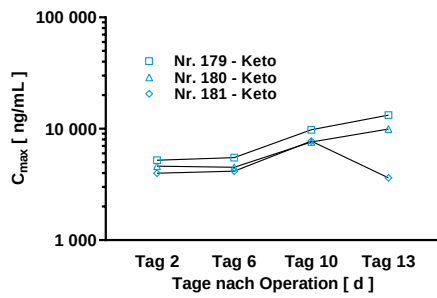
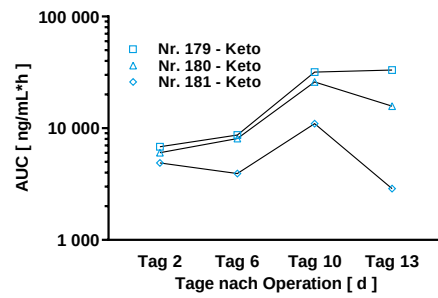


Abbildung A.9.: Zeitverlauf der pharmakokinetischen Parameter der Schweine, die über 14 d jeweils einmal täglich 1 mg/kg Doxapram *i.v.* appliziert bekommen haben. An Tag 2, 6, 10 und 13 wurden jeweils über 9 h Blutproben abgenommen um eine Kinetik mit den Parametern $C_{\max}$ (a), AUC (b), $t_{1/2}$ (c), V_{ss} (d), CL (e) sowie $t_{\max}$ (f) bestimmt und nach Schweinen getrennt aufgetragen. Der $t_{\max}$ -Wert konnte nur für Ketodoxapram als Metabolit und V_{ss} sowie CL nur für Doxapram bestimmt werden. Für Schwein 156 konnte aus experimentellen Gründen keine Blutproben an Tag 6 abgenommen werden. Die Werte für Doxapram sind in dunkelblau und die für Ketodoxapram in hellblau dargestellt.

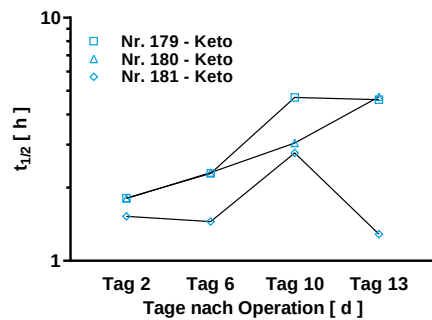
AUC: Fläche unter der Kurve; CL: Clearance; $C_{\max}$: maximale Plasmakonzentration; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; $t_{\max}$: Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration; V_{ss} : Verteilungsvolumen



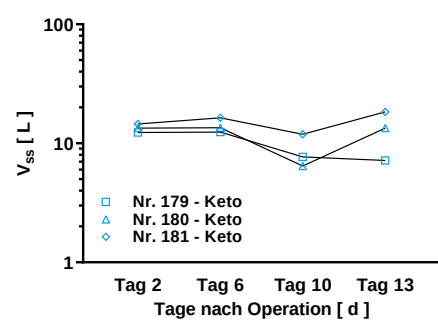
a) $C_{\max}$



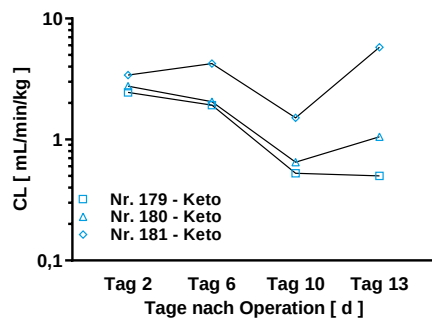
b) AUC



c) $t_{1/2}$



d) Verteilungsvolumen



e) Clearance

Abbildung A.10.: Zeitverlauf der pharmakokinetischen Parameter der Schweine, die über 14 d jeweils einmal täglich 1 mg/kg Ketodoxapram *i.v.* appliziert bekommen haben. An Tag 2, 5, 9 und 13 wurden jeweils über 9 h Blutproben abgenommen um eine Kinetik mit den Parametern $C_{\max}$ (a), AUC (b), $t_{1/2}$ (c), V_{ss} (d) sowie CL (e) bestimmt und nach Schweinen getrennt aufgetragen. Die Werte für Ketodoxapram sind in hellblau dargestellt.

AUC: Fläche unter der Kurve; CL: Clearance; $C_{\max}$: maximale Plasmakonzentration; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; V_{ss} : Verteilungsvolumen

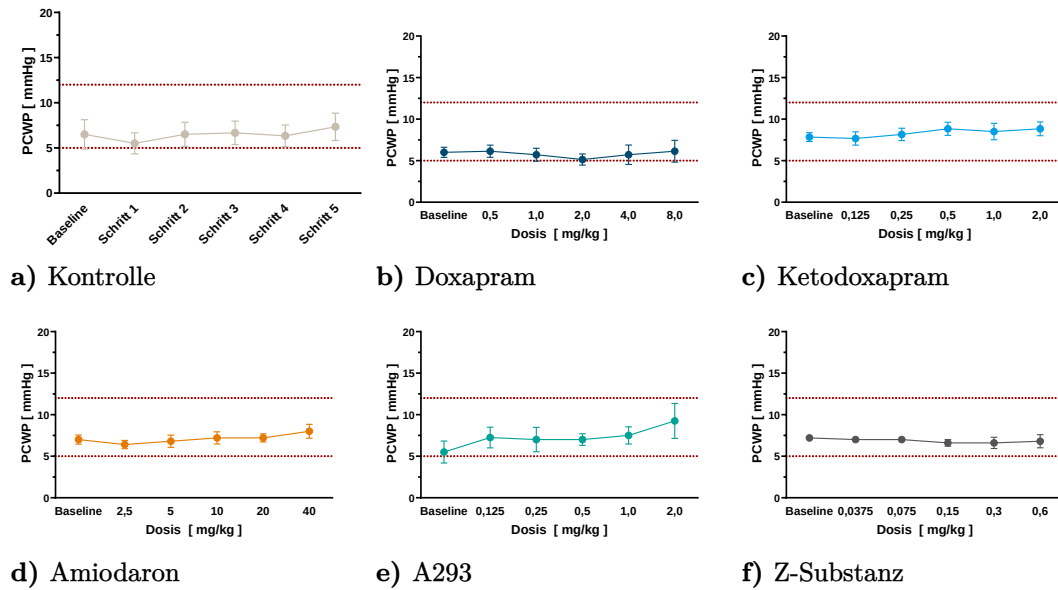


Abbildung A.11.: Veränderung des PCWP nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und der Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen und eine Kontrolle verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1–5) wurde der PCWP gemessen.

PCWP: Lungenkapillarenverschlussdruck

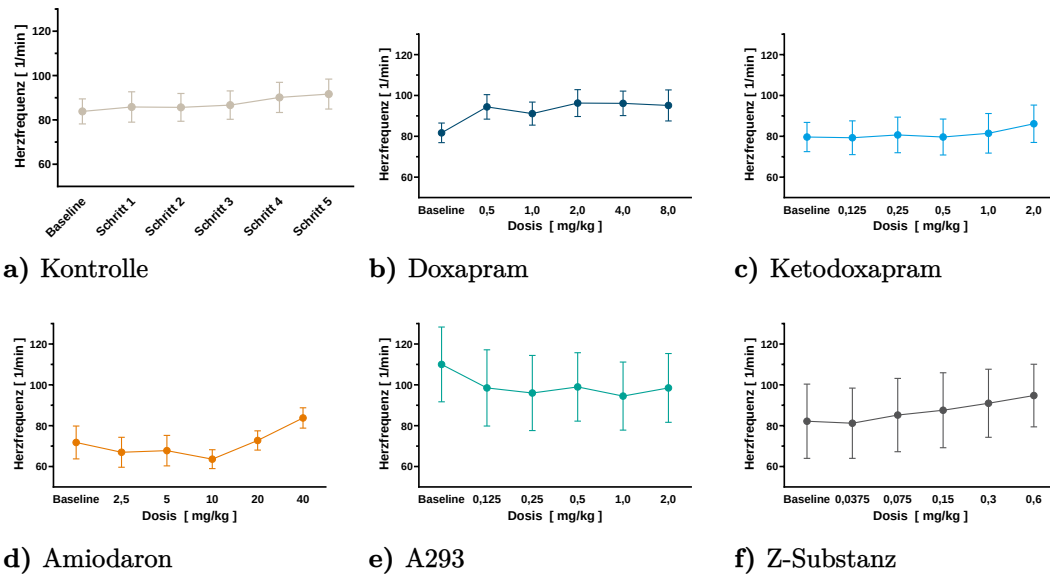


Abbildung A.12.: Veränderung der Herzfrequenz nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und einer Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen und eine Kontrolle verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1-5) wurde die Herzfrequenz gemessen.

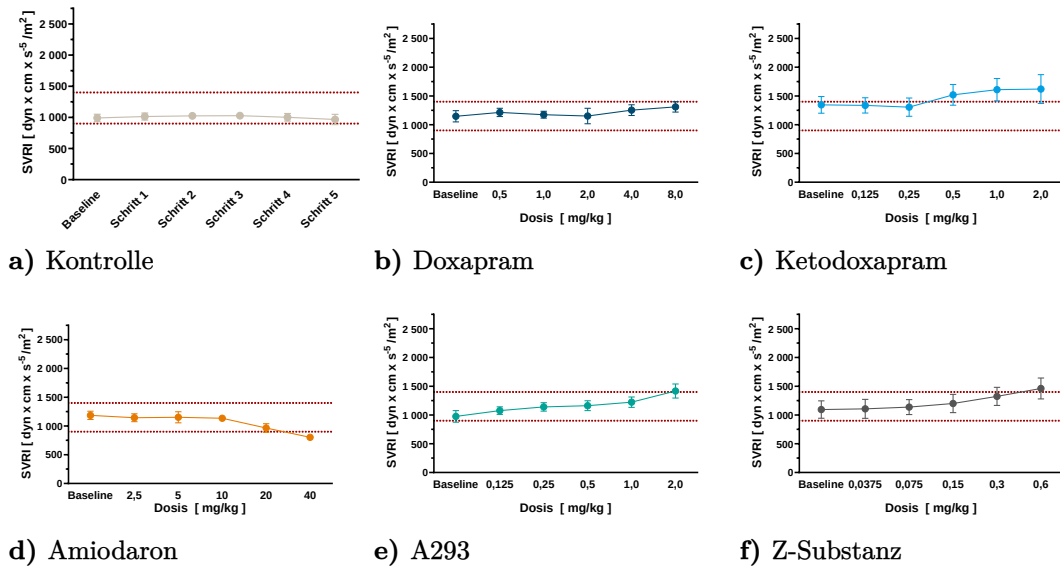


Abbildung A.13.: Veränderung des SVRI nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und einer Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen und eine Kontrolle verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1-5) wurde der SVRI bestimmt. SVRI: Index des systemischen Gefäßwiderstands

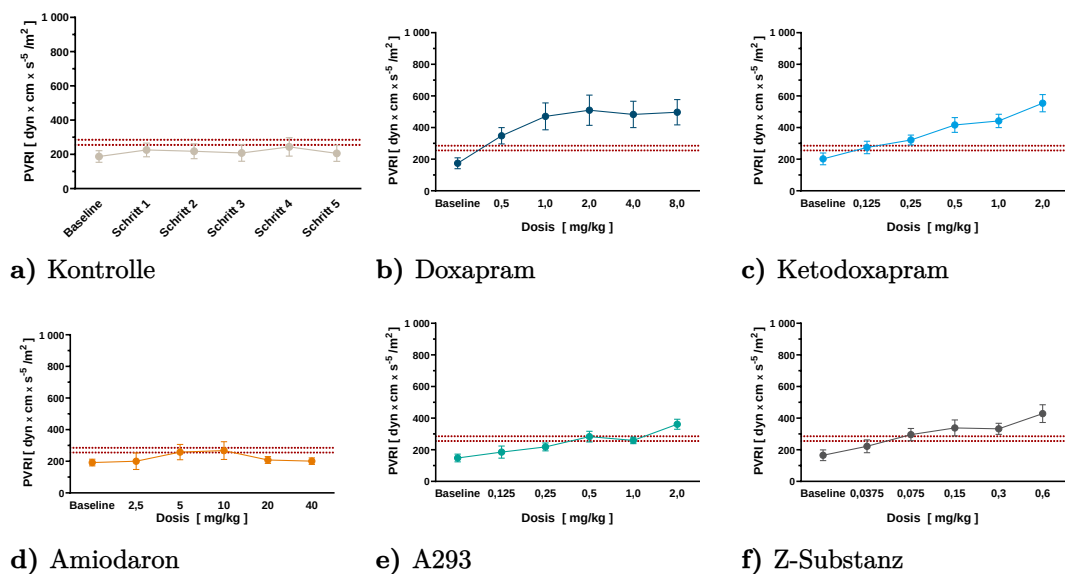
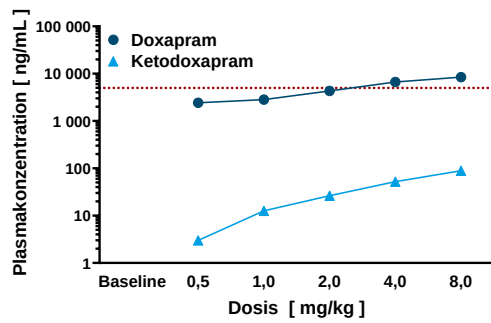
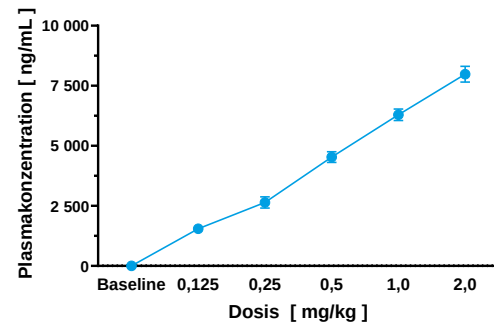


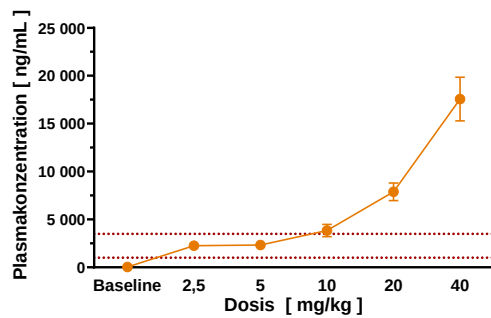
Abbildung A.14.: Veränderung des PVRI nach Verabreichung verschiedener TASK-1-Inhibitoren in unterschiedlichen Dosierungsschritten im Vergleich mit Amiodaron und einer Kontrolle. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293, Z3217409047 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen und eine Kontrolle verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1–5) wurde der PVRI bestimmt. PVRI: Index des pulmonalen Gefäßwiderstands



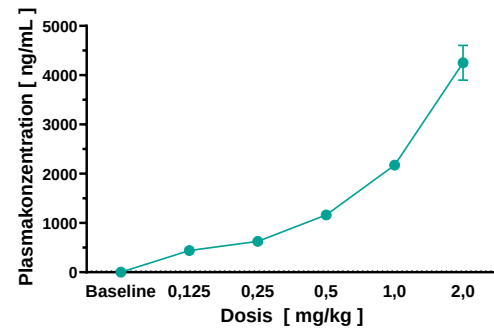
a) Doxapram



b) Ketodoxapram



c) Amiodaron



d) A293

Abbildung A.15.: Übersicht der gemessenen Plasmakonzentrationen von A293, Doxapram, Ketodoxapram und Amiodaron im Vergleich zur verabreichten Dosis. Deutschen Landrasse Schweinen ($n = 4-6$) wurden die Substanzen Doxapram, Ketodoxapram, A293 und Amiodaron in steigenden Konzentrationen verabreicht. Vor der ersten Dosis (Baseline) und nach jeder der fünf Dosen (Schritt 1–5) wurde eine Plasmaprobe abgenommen und die Konzentration bestimmt.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit ist nun der Zeitpunkt gekommen, all jenen Personen Danke zu sagen, die mich auf dem langen Weg stets unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu erst einmal geht mein herzlichster Dank an meine Doktormutter Prof. Dr. Constanze Schmidt, die es mir ermöglicht hat, in dieses äußerst spannende Themenfeld einzutauchen und mir bei der Bearbeitung des Themas immer hilfreich mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei diesem Projekt hervorragend betreut hat. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit des Besuchs der vielen nationalen und internationalen Kongressen bedanken, durch die ich über den Tellerrand der eigenen Forschung hinausschauen konnte und die stets eine Quelle für neue Denkanstöße und Experimente waren.

Als nächstes möchte ich mich sehr herzlich bei PD Dr. Felix Wiedmann für die stete Unterstützung, die hervorragende Mitbetreuung und das immer offene Ohr für alle Belange und Probleme rund um diese Arbeit bedanken. Auch für die vielen guten Ratschläge, motivierenden Worte und tatkräftige Unterstützung bei allen Experimenten und darüber hinaus, möchte ich Danke sagen.

Auch bei meinen vielen momentanen und ehemaligen Mitdoktoranden möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die gegenseitige Hilfe und nicht zuletzt die vielen interessanten, aber teilweise auch lustigen und erheiternden Gespräche bedanken. Es war immer ein beruhigendes Gefühl zu wissen, dass auch bei anderen die Experimente nicht immer so verlaufen wie geplant. Besonders möchte ich mich bei Dr. Antonius Büscher für die gute Einarbeitung in das Messen von Oozyten und die Patch-Clamp-Technik sowie die gemeinsame Bearbeitung des miRNA-Projektes bedanken. Ein großer Dank geht auch an Yannik L'hoste für die Zusammenarbeit im Rahmen der DOCTOS-Studie und die gegenseitige Unterstützung bei der Bewältigung aller damit verbundenen Aufgaben. Des Weiteren möchte ich mich bei Pablo Blochberger, Baran Yesilgöz, Valerie Herlt und Max Jamros herzlich für die Unterstützung bei den Tierexperimenten und bei Jendrik Nietfeld, Matthias Stelzle, Petar Mihaylov und Amy (Emika) Boondej für die gute Zusammenarbeit beim Vorbereiten und Messen der Oozyten bedanken. Auch Dr. Christoph Beyersdorf, Dr. Sebastian Benda, Maximilian Waibel, Moritz Beck und Leo Weirauch gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre. Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei Amelie Paasche für die jahrelange hervorragende Zusammenarbeit und die vielen zielführenden, fachlichen Diskussionen bedanken, aber auch für eine Vielzahl lustiger Erlebnisse im Labor und auf gemeinsamen Kongressreisen, die den Forschungsalltag stets bereichert haben.

Jedoch besteht ein gutes Labor nicht nur aus Wissenschaftlern, daher gilt ein großer Dank auch Katrin Kupser, Sabine Höllriegel und Lisa Künstler und für die hervorra-

gende technische und experimentelle Unterstützung sowie die große Hilfsbereitschaft bei allen Belangen rund ums Labor. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den vielen Auszubildenden bedanken, die stets mit großer Motivation alle aufgetragenen Aufgaben erledigt haben. Vielen Dank auch an Ronja Einberger, Francisco Faustino und Natasa Jávorszky für die tatkräftige Unterstützung beim Messen der Oozyten und die hunderte von Stunden, die vor dem Messstand verbracht wurden.

Einen herzlicher Dank geht auch an die momentanen und ehemaligen Kollegen und Freunde aus dem ACL, ich habe mich bei euch immer sehr willkommen gefühlt und ihr habt mir eine zweite Heimat in der Klinik geboten. Bei Dr. Kathrin I. Foerster möchte ich mich sehr für die hervorragende und gründliche Einarbeitung sowie die ununterbrochene Unterstützung bei allen Problemen in der Methodenentwicklung und Probenmessung herzlich bedanken. Bei Kevin Steimel, Andrea Deschlmayr, Magdalena Longo und Stephanie Eggers möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und große Hilfe bei der Vermessung der Proben sowie bei allen Problemen, die in Verbindung mit den Messgeräten aufgetreten sind, sehr bedanken. Einen herzlichen Dank auch an Dr. Max Sauter für die sehr guten Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen, die meine Forschungsarbeit stets voran bringen konnten und für die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Dr. Jürgen Burhenne für die sehr gute Betreuung der analytischen Methodenentwicklung und Vermessung der Proben bedanken sowie für die Möglichkeit dies im ACL durchführen zu können.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Gzona Bajraktari-Sylejmani und PD Dirk Theile vom MBL herzlichen bedanken für die große Hilfe und vielen hilfreichen Ratschläge und Diskussion zur Arbeit mit verschiedenen Zelllinien und den damit verbundenen Vor- und Nachteilen.

Vielen Dank auch an Florian Michel, Dr. Brit Rohr und PD Dr. Anje Blank vom KliPS für die Unterstützung bei der Durchführung der DOCTOS-Studie und der Hilfe bei allen damit verbundenen Fragestellungen und Problemen. Einen herzlichen Dank auch an Prof. Dr. David Czock für die Bestimmung der Pharmakokinetik in den DOCTOS-Patienten und die große Hilfsbereitschaft bei allen damit verbundenen Fragestellungen. Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter E. Haefeli für die hervorragende Zusammenarbeit, die sehr zielführende Diskussion der Ergebnisse und die vielen guten Ratschläge und Hilfestellung für die weiteren Forschungsarbeiten aber auch außerhalb dieser bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich noch bei Dr. Mara Müller, Axel Schöffel, Fiona Berger und Dr. Britta Nyboer für die sehr freundliche Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft herzlich bedanken, erst dadurch wurden viele Messungen für diese Arbeit möglich und manch frustrierender Messtag doch noch positiv abgeschlossen.

Ein großer Dank geht auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung und alle Mitglieder des CRC 1425 und CRC 1550 für die gute wissenschaftliche Kooperation. Vielen Dank auch an das Team der Pharmakologie Göttingen um Prof. Dr. Niels Voigt für die erfolgreiche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei allen meinen Freunden bedanken, die mich teilweise schon fast mein ganzes Leben begleiten und die dafür gesorgt haben, dass das

Leben nicht nur aus Arbeiten bestand. Ein besonderer Dank geht hier an Dr. Thomas Rösch für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die es mir mit ihrer endlosen Unterstützung erst ermöglicht haben, dieses Projekt durchzuführen und mir in allen Lebenslagen stets mit Rat und Tat zur Seite stehen. Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meinem Bruder Daniel und seiner Frau Anja bedanken, mit denen ich gemeinsam schon vieles erleben durfte und auf deren Rückhalt ich in allen Lebenslagen zählen kann. Besonderen Dank auch für die Durchsicht dieser Arbeit, ohne dich, Anja, wäre wahrscheinlich kaum ein Komma an der richtigen Stelle und die, die es immer noch nicht sind, gehen auf meine eigene Kappe. Natürlich möchte ich mich auch herzlich bei meiner restlichen Familie bedanken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema *Transkriptionelle Regulation und Pharmakologische Modulation des Zwei-Porendomänen Kaliumkanals TASK-1* handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritte bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtliche Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift