

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kardiologie mit Schwerpunkt Elektrophysiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Willems

Isolation und morphologische Charakterisierung des Wachstums von murinen intrakardialen Neuronen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Friederike Jonas
aus Aachen

Hamburg 2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.01.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Christian Meyer, M.A.

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Viacheslav Nikolaev

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES AUTONOMEN NERVENSYSTEMS	2
2.2	AUFBAU DES AUTONOMEN NERVENSYSTEMS	2
2.2.1	<i>Aufbau einer Nervenzelle</i>	3
2.2.2	<i>Sympathikus</i>	4
2.2.3	<i>Parasympathikus</i>	5
2.2.4	<i>Intrinsische Ganglienplexus</i>	8
2.3	AUTONOME INNERVATION DES HERZENS	8
2.3.1	<i>Intrakardiale Neurone</i>	10
2.3.1.1	Anatomische Lokalisation der ICN	11
2.3.1.2	Funktionelle Aspekte der ICN	15
2.3.1.3	Phänotypische Charakteristika	16
2.4	BEDEUTUNG DES ANS IN DER PATHOPHYSIOLOGIE DES VORHOFFLIMMERNS	16
2.5	ZIEL DER ARBEIT	18
3	MATERIAL UND METHODIK	19
3.1	ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON ICN	19
3.1.1	<i>Tiermodell</i>	19
3.1.2	<i>Vorbereitung der Isolation</i>	19
3.1.3	<i>Präparation des zelltragenden Gewebes</i>	20
3.1.4	<i>Zellisolation aus atrialem Fettgewebe</i>	22
3.1.5	<i>Kultivierung von ICN</i>	23
3.2	BESCHREIBUNG DER MORPHOLOGIE INTRAKARDIALER NEURONE	25
3.2.1	<i>Material zur Dokumentation</i>	25
3.2.2	<i>Dokumentationsprotokoll</i>	26
3.2.3	<i>Auswahl der Zellen nach morphologischen Kriterien</i>	27
3.2.4	<i>Phänotypische Einteilung der ICN</i>	27
3.3	MESSUNG DER NEURITENLÄNGEN	28
3.4	GEMEINSAME KULTIVIERUNG VON KARDIOMYOZYTEN UND ICN	29
3.4.1	<i>Etablierung einer Kokultur aus Kardiomyozyten und ICN</i>	30
3.4.2	<i>Messungen an atrialen HL-1-Kardiomyozyten mit der Patch-Clamp-Methode</i>	32
3.4.2.1	Messung von Ionenkanalströmen	36
3.4.2.2	Messung des Aktionspotentials	36
3.5	STATISTIK	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON ICN	38
4.2	MORPHOLOGISCHE BESCHREIBUNG DER PERIKARYA UND NEURITEN VON ICN	39
4.3	PHÄNOTYPISCHE KLASSIFIKATION DER ICN	43
4.4	WACHSTUM DER NEURITEN IM ZEITVERLAUF	44
4.5	ETABLIERUNG EINER KOKULTUR AUS KARDIOMYOZYTEN UND ICN	47
4.5.1	<i>Messung von Kanalströmen an HL-1-Kardiomyozyten mit der Patch-Clamp-Methode</i>	48
4.5.2	<i>Messung eines Aktionspotentials an HL-1-Kardiomyozyten mit der Patch-Clamp-Methode</i>	49

5	DISKUSSION	51
5.1	ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON ICN	51
5.1.1	<i>Lokalisation kardialer Ganglien im epikardialen atrialen Fettgewebe</i>	51
5.1.2	<i>Positive Einflüsse auf das Überleben von ICN in Kultur</i>	52
5.2	BEURTEILUNG DER MORPHOLOGIE	54
5.2.1	<i>Morphologie muriner ICN im Vergleich mit weiteren Spezies</i>	54
5.2.2	<i>Morphologische Abgrenzung von kardialen Fibroblasten in Kultur</i>	55
5.3	AUSBILDUNG VON PHÄNOTYPEN IN MURINEN ICN	56
5.4	WACHSTUMSVERHALTEN DER ICN IN-VITRO ÜBER DIE ZEIT	57
5.5	FUNKTIONELLE ZUORDNUNG DER KANALAKTIVITÄT IN ATRIALEN HL-1-KARDIOMYOZYTEN	59
5.6	KLINISCHER BEZUG UND PERSPEKTIVEN	60
5.6.1	<i>Aufschlüsselung funktioneller Charakteristika von ICN</i>	60
5.6.2	<i>Neuromodulation als Therapiekonzept des Vorhofflimmerns</i>	61
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	ABSTRACT	63
8	ANHANG	64
8.1	CHEMIKALIEN	64
8.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	65
8.3	GERÄTE	65
8.4	SOFTWARE	66
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
11	TABELLENVERZEICHNIS	73
12	LITERATURVERZEICHNIS	74
13	KONGRESSBEITRÄGE	85
14	LEBENS LAUF	86
15	DANKSAGUNG	87
16	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	88

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Herzrhythmus wird durch elektrische Erregungen aufrechterhalten und moduliert. Als lang bekannte Anteile des autonomen Nervensystems (ANS) spielen Sympathikus und Parasympathikus eine tragende Rolle in der unbewussten Kontrolle von Frequenz, Erregbarkeit und Schlagkraft des Herzens (Shen und Zipes 2014). Zentral generierte Erregungen werden über neuronale Verbindungen direkt und über spinale Schaltkreise indirekt an das Herz weitergegeben (Armour und Ardell 2004). Dabei findet eine ständige Interaktion sympathischer und parasympathischer Anteile auf verschiedenen Ebenen des zentralen und peripheren Nervensystems statt. Herznah interagieren diese Erregungen lokal in intrakardialen Neuronen (ICN) (Fukuda et al. 2015, Ng 2016). ICN dienen der Integration neuronaler Signale aus zentralen Neuronen, thorakalen und kardialen Ganglien und modulieren den genauen Zeitpunkt eines jeden Herzschlags (Armour 2008). Anatomisch sind sie in epikardialen Ganglienplexus, insbesondere im Bereich der Vorhöfe, lokalisiert, welche untereinander eng vernetzt sind (Pauza et al. 2000, Kawano et al. 2003). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine in-vitro Zellkultur anzulegen und die Morphologie und das Wachstum dieser Neurone zu charakterisieren, um die intrakardialen neuronalen Netzwerke genauer zu verstehen. Während in früheren Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen extrakardiale Neurone aus neonatalen Ratten isoliert wurden, wird in der aktuellen Arbeit das Wachstum adulter, muriner ICN in Zellkultur charakterisiert, um typische Charakteristika neonataler Neurone auszuschließen und eine Kontrollgruppe für mögliche mechanistische Untersuchungen im Vergleich zu ICN aus gentechnisch modifizierten Tieren zu beschreiben.

Auf dieser Grundlage sollten in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden, (1) welche Methode zur Isolation primär gewonnener ICN aus atrialem epikardialen Fettgewebe geeignet ist und unter welchen Voraussetzungen eine Kultur langfristig vital bleibt, (2) wie sich das Wachstum von ICN in Kultur charakteristisch verhält und (3) ob eine Kokultur mit atrialen Kardiomyozyten etabliert werden kann.

2 Einleitung

2.1 Funktionelle Bedeutung des autonomen Nervensystems

Das ANS übernimmt die unwillkürliche Steuerung aller Organe des Körpers, ausgenommen von der Skelettmuskulatur (Furness 2006). Ergänzt wird es dabei durch das somatomotorische System (Hinsey 1934). Unterteilt wird es im Wesentlichen in einen sympathischen und einen parasympathischen Anteil (Langley 1903). Das Zusammenspiel dieser Anteile ist aktuell noch nicht ausreichend verstanden (Furness 2006). Jedoch hat sich in der jüngeren Vergangenheit gezeigt, dass beide Anteile auch auf Organebene komplex miteinander verschaltet sind. Die Funktion des ANS beruht dabei auf einer ständigen Interaktion sympathischer und parasympathischer Anteile auf zentraler sowie peripherer Ebene. Dabei wird zunehmend deutlich, dass die Funktion des Herzens maßgeblich durch Neurone, welche lokal direkt mit Kardiomyozyten interagieren, gesteuert wird (Ardell et al. 2016).

2.2 Aufbau des autonomen Nervensystems

Die Grundstruktur von Sympathikus und Parasympathikus ist ähnlich (Langley 1903, Barha et al. 2016). So erfolgt der Weg zum Erfolgsorgan jeweils über zwei in Serie geschaltete Ganglien. In diesen Ganglien sind die Perikarya der Neurone lokalisiert. Das Kerngebiet des ersten Ganglions liegt im Hirnstamm oder im Rückenmark. Es wird als zentrales Ganglion bezeichnet und projiziert seine Axone zum zweiten Ganglion, welches als peripheres Ganglion bezeichnet wird. Die Axone des peripheren Ganglions verlaufen anschließend zum Erfolgsorgan. Aufgrund dieser Aufteilung spricht man von präganglionären und postganglionären Neuronen. Die Verschaltung von präganglionären Neuronen auf postganglionäre Neurone erfolgt im sympathischen System organfern und im parasympathischen System organnah (Langley 1903, Shen und Zipes 2014). Der klassische Aufbau des ANS ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

2.2.1 Aufbau einer Nervenzelle

Das Nervensystem besteht aus circa 10^{11} - 10^{12} Nervenzellen, die der Verarbeitung von Informationen und der Steuerung fast aller Vorgänge im Körper dienen (Williams und Herrup 1988, Azevedo et al. 2009). Jede Nervenzelle besitzt ein Perikaryon und mehrere Fortsätze. Das Perikaryon kann zwischen 6 und 150 μm groß sein (Addicks et al. 2013). Die Fortsätze werden als Neuriten bezeichnet und unterteilen sich in Axone und Dendriten (Meijering 2010, Bear et al. 2016). Laut histologisch-funktioneller Klassifizierung dienen Dendriten der Vergrößerung des Zellkörpers. Ihre Aufgabe ist es Informationen aus der Umgebung aufzunehmen. Das Axon setzt am Axonhügel des Perikaryons an. Seine Funktion ist die Weiterleitung von zellulär generierten Informationen zur Synapse. Postsynaptisch wird die ursprünglich elektrische Information als chemisches Signal an das Zielgewebe weitergegeben (Lodish H 2000, Addicks et al. 2013). Der Aufbau einer Nervenzelle ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

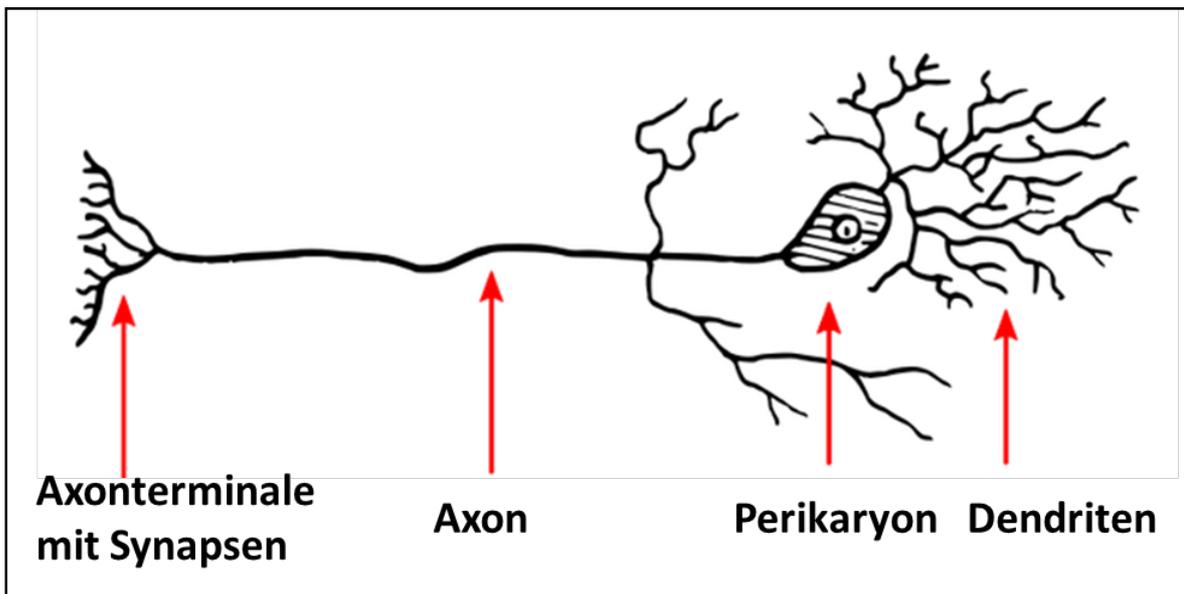


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Nervenzelle. Der Zellkörper wird als Perikaryon bezeichnet, mittig liegt der Zellkern. Dendriten ziehen vom Zellkörper in die Umgebung. Ein einzelnes langes Axon verlässt die Zelle am Axonhügel und gibt das generierte Signal an den Axonterminalen über Synapsen an das Zielgewebe weiter; (modifiziert nach (Foresman 2012), Wikimedia Commons, keine urheberrechtliche Beschränkung. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_\(PSF\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_(PSF).svg))

2.2.2 Sympathikus

Das sympathische System ist der Aktivator der „*fight and flight*“-Funktionen des Körpers. Eine Sympathikusaktivierung bereitet diverse Prozesse im Körperinneren auf eine anstehende Belastungssituation vor (Saper 2002). Dazu gehören unter anderem der Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz, das Weitstellen der Pupillen und ein Anstieg des Muskeltonus (Joyner 2016).

Der Sympathikus wird auf Grund seiner Anatomie als thorakolumbales System bezeichnet (Shields 1993). Seine präganglionären Neurone liegen in der Zona intermedia der Rückenmarksegmente C8 - L3. Die Nerven der Sympathikusganglien verlaufen meist dünn myelinisiert durch die Vorderhornwurzeln entlang der Spinalnerven. Dort werden sie über Rami communicantes albi abgelenkt, um dann an die zweiten Neurone im Grenzstrang heranzutreten (Coote und Gilbey 2016). Die postganglionären Neurone liegen im Grenzstrang und in prävertebralen Ganglien überwiegend organfern. Sie senden ihre Axone unmyelinisiert über die Rami communicantes grisei zu den unteren Hirnnerven und den Spinalnerven, mit denen sie gemeinsam das Erfolgsorgan erreichen (Hall und White 2008).

Die Anordnung der präganglionären Neurone im thorakolumbalen Rückenmark kann nach spinalen Segmenten aufgeteilt werden. Die Neurone der Segmente C8 - T1 projizieren vorrangig zum Ganglion ciliare, von dem die Innervation der Kopf- und Halsdrüsen ausgeht. Die Neurone aus den Segmenten T1 - T7 innervieren vor allem thorakale Organe wie Herz, Trachea und Bronchien. Aus den Segmenten T5 - L1 werden die abdominellen Organe und aus den Segmenten L1 - L3 die Beckenorgane gesteuert (Javier G. Castillo 2012b). Auch die Ganglienkette des sympathischen Grenzstranges weist eine segmentale Gliederung in Halsganglien, Brustganglien, Lendenganglien und Sakralganglien auf (Furness 2006).

Die Transmitter im sympathischen System sind Azetylcholin (ACh) und Noradrenalin (NA) (Jänig 2016). Präganglionäre Axone übertragen ihre Signale per Azetylcholin auf nikotinerge Rezeptoren der postganglionären Neurone. Noradrenalin überträgt als Transmitter die Signale vom postganglionären Axon auf das Zielorgan (Euler und Hillarp 1956). Am Zielorgan empfangen adrenerge

Rezeptoren die chemische Information und lösen rezeptorabhängige Signalkaskaden bis zum Zieffekt aus. (Jänig 2006).

α_1 -Rezeptoren führen zu einer Kontraktion von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und von Myozyten der quergestreiften Muskulatur im Herzen. α_2 -Rezeptoren vermitteln durch Rückkopplung an sympathischen und parasympathischen Präsynapsen eine Abnahme des Muskeltonus an glatten Muskelzellen. β_1 -Rezeptoren sind Effektoren für Herz, Niere und Fettgewebe, wobei sie im Herzen die Kontraktilität durch eine erhöhte Bereitstellung von Kalzium steigern können (Habecker et al. 2016). β_2 -Rezeptoren sind für die Relaxation der Bronchialmuskulatur verantwortlich und β_3 -Rezeptoren für die Stimulation des Fett- und Leberstoffwechsels sowie die optimierte Regulation des körpereigenen Wärmehaushalts (Ahles und Engelhardt 2014).

2.2.3 Parasympathikus

Das parasympathische System stellt die Körperfunktionen funktionell auf „*rest and digest*“-Antworten ein. Eine Aktivierung des Parasympathikus dient der Regeneration des Organismus. Beispiele sind eine Abnahme der Kontraktionskraft des Herzmuskels, eine Senkung der Herzfrequenz und eine Steigerung der Darm- und Speicheldrüsenaktivität (Javier G. Castillo 2012b, Jänig 2016).

Anatomisch wird der Parasympathikus anhand seiner präganglionären Kerngebiete in einen kranialen und einen sakralen Anteil eingeteilt. Der kraniale Part ist im Hirnstamm lokalisiert, der sakrale Anteil entspringt den spinalen Segmenten S2 - S4. Im Vergleich zum sympathischen System stellt der Verlauf des präganglionären Axons einen strukturellen Unterschied dar. Parasympathische postganglionäre Neurone sind in der Nähe der Zielorgane lokalisiert, sodass das präganglionäre Axon meist einen langen Verlauf zeigt (Shields 1993).

Im Detail gehören zum kranialen Anteil die im Hirnstamm gelegenen Kerngebiete des Nervus oculomotorius, Nervus facialis, Nervus glossopharyngeus und Nervus vagus. Die ersten drei genannten Kerngebiete steuern die autonomen Funktionen des Auges, der Drüsen und Hautgefäße des Gesichts, der Zunge und des Mundes

(Neuhuber 2009). Der Nervus vagus dient zudem als parasympathischer Hauptinnervator aller Organe von Hirnstamm bis zum sog. Cannon-Böhm-Punkt (Cannon 1902). Efferente Fasern des Nervus vagus, die für die Innervation des Herzens zuständig sind, sind im Nucleus ambiguus und im Nucleus dorsalis nervi vagi lokalisiert (Jänig 2016). Von parasympathischen Kerngebieten werden präganglionären Efferenzen in zielorgannahen Ganglien auf parasympathische postganglionäre Neurone übertragen. Die Weiterleitung von organnahen Ganglien zum Zielorgan kann sowohl von vagalen postganglionären Neuronen als auch von Interneuronen übernommen werden (Hall und White 2008, Machhada et al. 2016).

Azetylcholin agiert im parasympathischen System sowohl an den präganglionären als auch an den postganglionären Synapsen. Präganglionär wird Azetylcholin von nikotinerger Rezeptoren gebunden, welche sich als ligandengesteuerte Kationenkanäle öffnen und somit das Signal weitergeben. Im postganglionären Neuron wird Azetylcholin an muskarinerge Rezeptoren gebunden, worauf *Second-Messenger*-Kaskaden folgen. Je nach ausgelöster Kaskade unterscheidet man muskarinerge M_1 - bis M_5 -Rezeptoren. Hierbei wird die Herzfunktion vor allem durch M_2 -Rezeptoren gesteuert. Neben diesen sind jedoch auch M_1 - und M_3 -Rezeptoren im Myokard vorhanden (Gallo et al. 1993, Dhein et al. 2001). Die Aktivierung von M_2 -Rezeptoren bewirkt eine verminderte Kalziumleitfähigkeit, wodurch Herzfrequenz und Kontraktilität des Myokards sinken (Brodde und Michel 1999). M_1 -Rezeptoren konnten bisher vorrangig in vegetativen Ganglien nachgewiesen werden. M_3 -Rezeptoren befinden sich in glatter Muskulatur an Gefäßen und in enteraler Muskulatur. M_4 - und M_5 -Rezeptoren liegen hauptsächlich im zentralen Nervensystem (Caulfield und Birdsall 1998, Haga 2013).

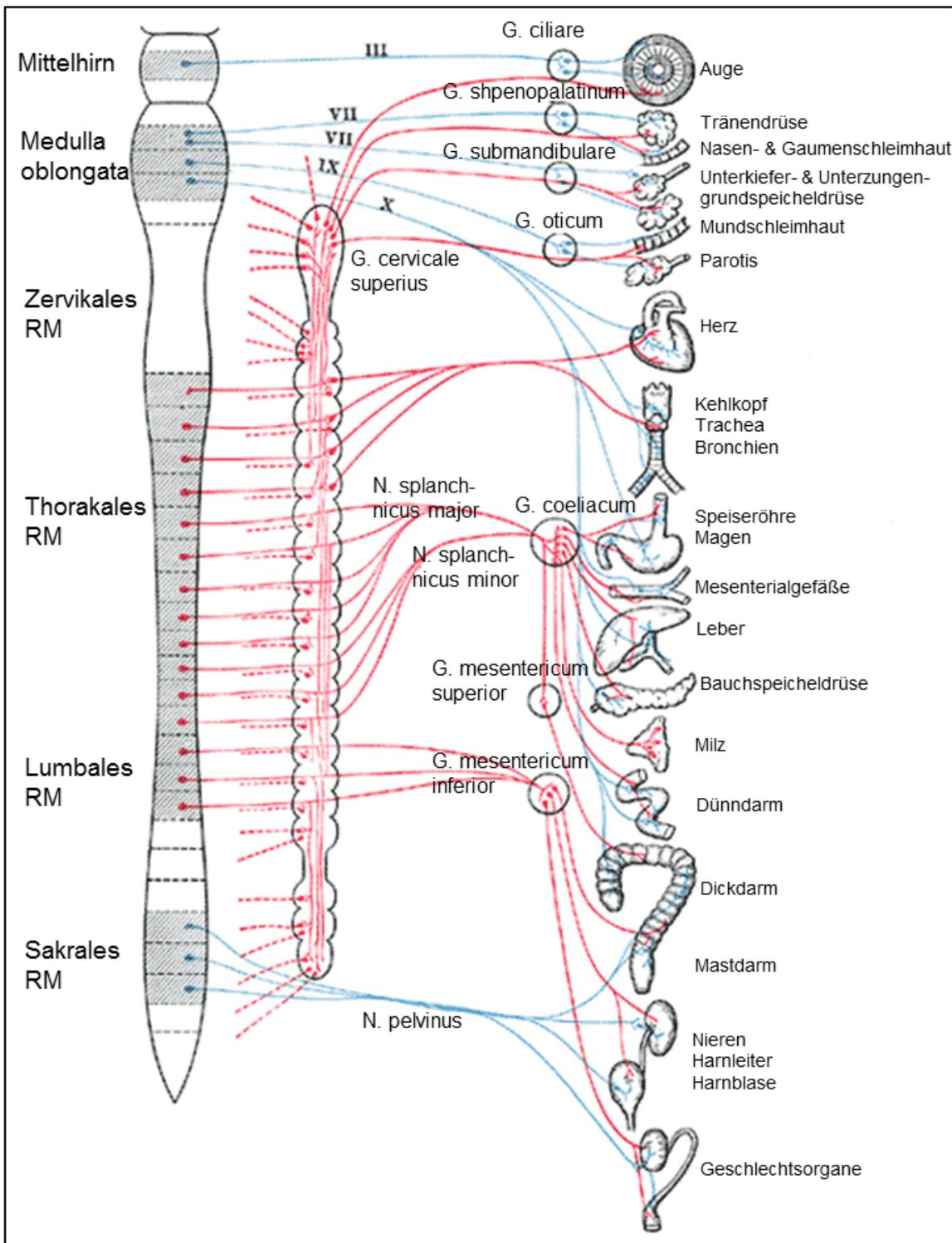


Abbildung 2: Schematische Darstellung des klassischen Aufbaus der autonomen Nervensysteme. Der sympathische Anteil ist rot dargestellt, der parasympathische Anteil blau. Die Kerngebiete des Sympathikus liegen im thorakolumbalen Anteil und werden organfern im Grenzstrang auf präganglionäre Fasern umgeschaltet. Die postganglionären Kerngebiete des Parasympathikus liegen sowohl kranial als auch sakral und ihre Verschaltung erfolgt in organnahen Ganglien; G. - Ganglion, N. - Nervus, RM - Rückenmark; (modifiziert nach „Gray’s Anatomy“, 20. Auflage 8, (Gray und Lewis 1918), Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AGray839_clean.png, keine urheberrechtliche Beschränkung.)

2.2.4 Intrinsische Ganglienplexus

Als intrinsische Ganglienplexus bezeichnet man abgrenzbare autonome Gangliengeflechte, die einem Organ zugehörig sind und meist in dessen Wandschichten lokalisiert sind. Lange bekannt ist das enterische Nervensystem, welches als Ganglienkette zwischen den Schichten der Darmwand liegt und vom Oesophagus bis zum analen Sphinkter reicht, um Motilität und Sekretion im Magen-Darm-Trakt zu steuern (Lundgren et al. 1989). Als solches System agieren die autonomen Ganglien eigenständig über eine lokale interneuronale Vernetzung. Sie stehen aber mit zentralen und präganglionären Neuronen in Verbindung, um in Abstimmung mit dem Gesamtorganismus zu agieren (Neuhuber 2009, Hao et al. 2016).

2.3 Autonome Innervation des Herzens

Zur Steuerung des Herzrhythmus wird das Herz von sympathischen und parasympathischen Fasern innerviert. Sympathische präganglionäre Neurone ziehen zu den spinalen Segmenten T1 – T6 (Coote 2013). Vom Rückenmark verlaufen sie teilweise über die Zervikalganglien und übermitteln ihre Signale dann auf postganglionäre Fasern. Diese erreichen als Nervi cardiaci das Herz und innervieren Sinus- und AV-Knoten sowie Vorhof- und Ventrikelmyokard (Brading 1999, Coote und Gilbey 2016, Jänig 2016). Neben Noradrenalin als Transmitter ist im sympathischen System als Kotransmitter das Neuropeptid Y sowie Adenosintriphosphat (ATP) beschrieben. Mittels ATP werden kurze sympathische Reize vermittelt. Zudem wirkt es synergistisch mit Noradrenalin (Burnstock 1995). Neuropeptid Y ist histochemisch in sympathischen Fasern nachgewiesen worden und verstärkt die vasokonstriktorische Wirkung von Noradrenalin an den Koronargefäßen (Nyquist-Battie et al. 1994, Nozdrachev und Masliukov 2011). Sympathisch wird am Sinusknoten ein Anstieg der Herzfrequenz (positive Chronotropie) vermittelt und am AV-Knoten eine beschleunigte Überleitung der Signale (positive Dromotropie) bewirkt (Habecker et al. 2016). Im Ventrikelmyokard werden die Ausschüttung und die Wiederaufnahme von Kalzium effektiver, sodass der Herzmuskel stärker kontrahiert (positive Inotropie) und ebenso schneller relaxiert (positive Lusitropie) (Carlsson et al. 1977, Katz 1990).

Zudem wird die Reizschwelle der Herzmuskelzellen herabgesetzt (positive Bathmotropie) (Schümann 1983).

Der parasympathische Anteil projiziert seine Fasern aus den Hirnnervenkernen Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi vorrangig zu den Vorhöfen und innerviert Sinus- und AV-Knoten. Aktuellen Studien zufolge erreichen vagale Fasern jedoch auch die Ventrikel und können einen Einfluss auf die Kontraktionskraft und kardiale Elektrophysiologie ausüben (Gourine et al. 2016, Machhada et al. 2016). Die Hirnnervenkerne des Nervus vagus in der Medulla oblongata senden präganglionäre Fasern vom Nervus vagus als Plexus cardiacus zu den herznahen Ganglien. Dort werden sie auf postganglionäre Neurone umgeschaltet, deren Fasern im Myokard per Azetylcholin M_2 -Rezeptoren aktivieren (Coote 2013). In den parasympathischen Synapsen ist neben Azetylcholin das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) lokalisiert (Gordon et al. 1993, Kuncová et al. 2003). Am Herzen wirkt VIP synergistisch zu vagal vermittelten Effekten und wird vermutlich gemeinsam mit Azetylcholin als Kotransmitter ausgeschüttet (Yang et al. 2011). Durch die Ausschüttung von VIP wird die vagal vermittelte negative Chronotropie am Sinusknoten verstärkt (Hogan und Markos 2006). Am AV-Knoten hat Azetylcholin eine negativ dromotrope Wirkung und in den Ventrikeln eine negativ bathmotrope Wirkung (Muskens 1898, Medić 2016).

Zusätzlich zu dem beschriebenen Steuerungssystem des Herzrhythmus existieren, wie in Abbildung 3 dargestellt, auf thorakaler und auf kardialer Ebene lokale Interneurone. Diese vermitteln innerhalb der lokalen Ganglien zwischen sympathischen und parasympathischen Efferenzen zum Herzen und empfangen zudem Afferenzen aus dem Herzen und aus höheren Zentren (Ardell et al. 2016).

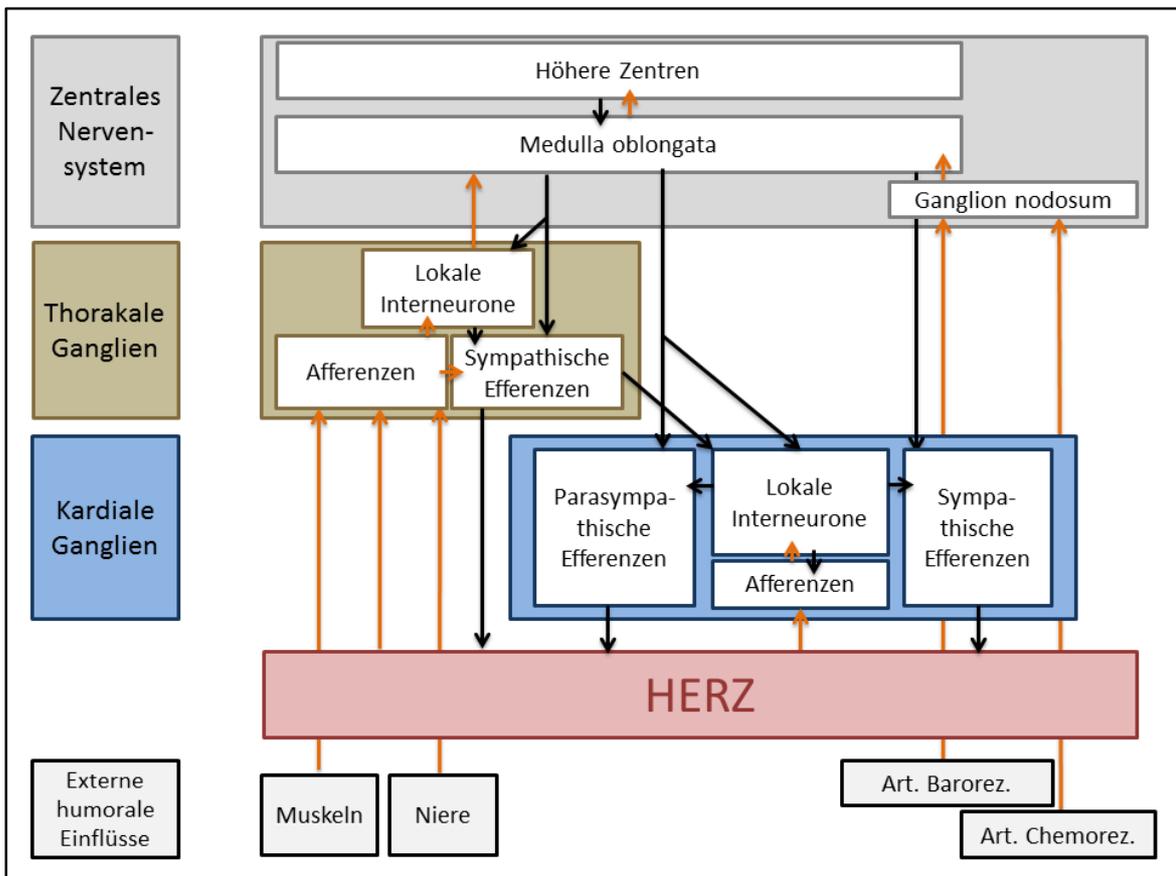


Abbildung 3: Schema der Herzinnervation und der Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Steuerstrukturen in hierarchischer Anordnung. Besonders zu beachten ist die lokal integrative Verschaltung der Afferenzen aus dem Herzen in den kardialen Ganglien mit den Einflüssen aus thorakalen Ganglien und zentralen Neuronen. Hierbei sind die Afferenzen orange dargestellt, die Efferenzen schwarz. Die kardialen und thorakalen Efferenzen unterteilen sich jeweils in sympathische und parasympathische Fasern;

Art. Barorez – Arterielle Barorezeptoren, Art. Chemorez. – Arterielle Chemorezeptoren, modifiziert nach (Ardell et al. 2016).

2.3.1 Intrakardiale Neurone

ICN gehören zum autonomen Nervensystem und haben eine Schlüsselrolle in der Abstimmung der Signale, welche an die herznahen Ganglien herangetragen werden (Parsons 2004, Armour 2008). Entgegen der langjährigen Meinung, dass ICN der einfachen Weiterleitung zentraler Signale dienen, wird heutzutage diskutiert, ob sie an Modulation, Gegenregulation und lokaler Interaktion der Signale beteiligt sein könnten (Jänig 2016). ICN liegen insbesondere in den parasympathischen Ganglienplexus im atrialen Fettgewebe, jedoch sind diese Plexus ebenso in sinoatrialer und atrioventrikulärer Region sowie in atrialem und ventrikulärem Myokard beschrieben (Verkerk et al. 2012). Ihre Axone reichen bis

in das myokardiale Gewebe. Sie senden adrenerge und cholinerge Efferenzen und empfangen Afferenzen direkt aus dem Myokard sowie aus spinalen und zerebralen Steuerungszentren (Armour 2008). Wie in Abbildung 3 gezeigt verarbeiten ICN integrativ die Signale aus lokalen kardialen, regionalen thorakalen und zentralen Steuerarealen mit den hormonellen Einflüssen ihrer Umwelt zu einer adäquaten Antwort (Fukuda et al. 2015, Ardell et al. 2016).

2.3.1.1 Anatomische Lokalisation der ICN

Die gebräuchlichste systematische Einteilung der ICN des humanen Herzens erfolgte durch Armour et al. anhand anatomischer Kriterien (Armour et al. 1997). Hierbei wurden fünf atriale und fünf ventrikuläre Ganglienplexus definiert. Wie in Abbildung 4 zu sehen sind diese nach ihrer anatomischen Lokalisation benannt. Im atrialen Gebiet (siehe Abbildung 4A) unterscheidet man den rechts-atrialen superioren und den links-atrialen superioren Ganglienplexus. Diese sind im Fettgewebe eingebettet und liegen an den Gefäßwurzeln von Aorta und Truncus pulmonalis. Zusätzlich liegen auf atrialer Ebene der links-atriale posteriolaterale Ganglienplexus sowie der rechts-atriale posteriore und der rechts-atriale posteriomediale Ganglienplexus um die Abgänge der Pulmonalvenen im Fettgewebe eingeschlossen (Armour et al. 1997). Auf ventrikulärer Ebene (siehe Abbildung 4B) findet sich als größter Ganglienplexus der Aortenwurzelplexus. Dieser liegt im Fettpolster um die Aortenwurzel. Die weiteren Plexus orientieren sich an den Koronargefäßen. So gibt es einen weiteren Plexus, der im Fettgewebe entlang des Ramus interventricularis anterior verläuft und einen Plexus der um den Ramus interventricularis posterior lokalisiert ist (Armour et al. 1997). Diese werden entsprechend als anteriorer absteigender Plexus und posteriorer absteigender Plexus bezeichnet. Zwei weitere kleinere Ganglienplexus liegen um die Rami marginales und sind demnach nach diesen benannt (Armour et al. 1997, Javier G. Castillo 2012a).

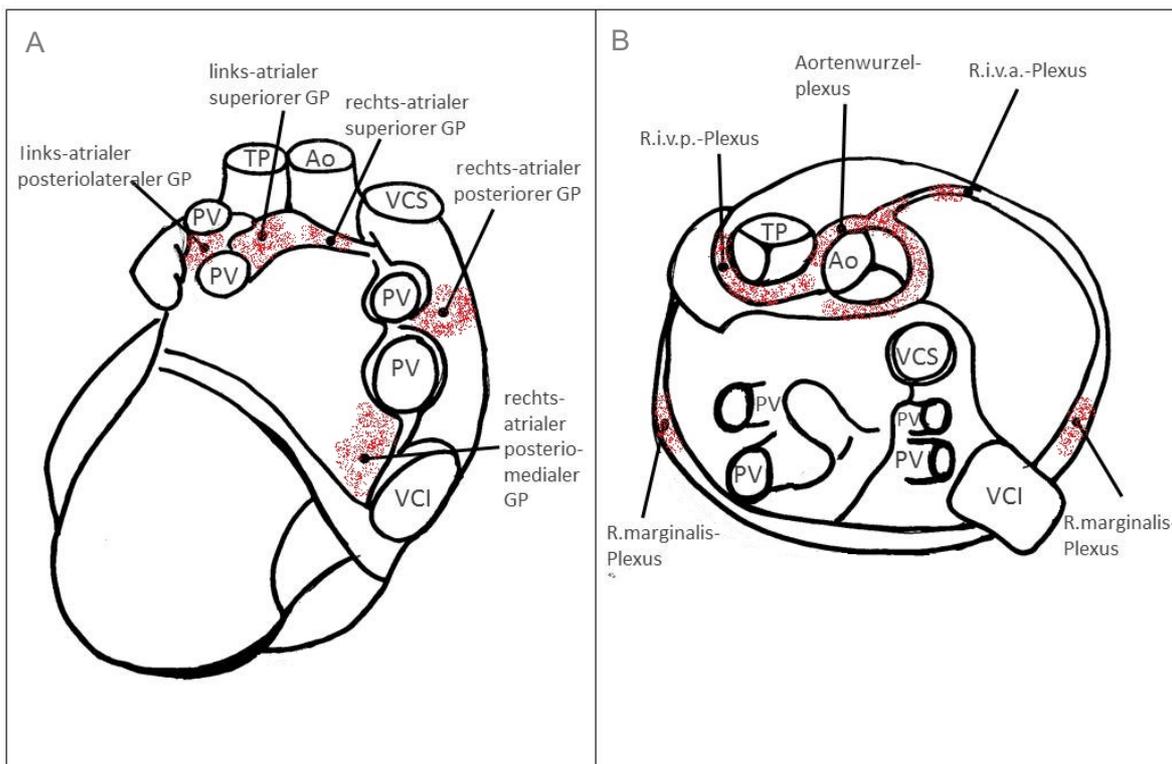


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ganglienplexus am humanen Herzen unter Berücksichtigung der Aufteilung in atriale Ganglienplexus (A) und ventrikuläre Ganglienplexus (B). Abbildung 4A zeigt eine Ansicht von dorsal auf das Herz. Es sind die fünf atrialen Ganglienplexus dargestellt. Hierbei handelt es sich um den rechts-atrialen superioren, den links-atrialen superioren Ganglienplexus, die an den Gefäßwurzeln von Aorta und Truncus pulmonalis im Fettgewebe eingebettet sind. Zusätzlich liegen der rechts-atriale postero-mediale, der links-atriale posteriolaterale und der rechts-atrialen posterioren Ganglienplexus im Fettgewebe um die Gefäßwurzeln der Pulmonalvenen. Abbildung 4B zeigt eine Ansicht von kranial. Hier sind die fünf ventrikulären Ganglienplexus zu sehen. Insbesondere ist der Aortenwurzelplexus auszumachen. Weitere Ganglienplexus verlaufen entlang der Koronararterien. So finden sich je ein Ganglienplexus entlang des Ramus interventricularis anterior und ein weiterer entlang des Ramus interventricularis posterior. Zwei weitere, jedoch kleinere Ganglienplexus, sind um jeweils einen Ramus marginalis lokalisiert.

Ao – Aorta, GP – Ganglienplexus, PV – Pulmonalvene, R.i.v.a.-Plexus – Ganglienplexus um den Ramus interventricularis anterior, R.i.v.p. Plexus - Ganglienplexus um den Ramus interventricularis posterior, R.marginalis. Plexus – Ganglienplexus um einen Ramus marginalis, TP – Truncus pulmonalis, VCI – Vena cava inferior, VCS – Vena cava superior; modifiziert nach (Armour et al. 1997, Ardell et al. 2016).

In interventionellen Prozeduren zur Ablation der Ganglienplexus wird ein vereinfachtes Schema der von Armour et al. entwickelten Einteilung genutzt (Lu et al. 2015, Sun et al. 2015). Hierbei werden die Bezeichnungen rechts-anteriorer

Ganglienplexus (RAGP), rechts-inferiorer Ganglienplexus, links-superiorer Ganglienplexus (LSGP) und links-inferiorer Ganglienplexus (LIGP) genutzt. Ein Vergleich zwischen klinischer und anatomischer Nomenklatur ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1: Vergleich der Nomenklaturen von intrakardialen atrialen Ganglienplexus im anatomischen und klinischen Kontext.

Klinische Nomenklatur (Lu et al. 2015, Sun et al. 2015)	Anatomische Nomenklatur (Armour et al. 1997)
Rechts-anteriorer Ganglienplexus	Rechts-atrialer superiorer Ganglienplexus
Rechts-inferiorer Ganglienplexus	Rechts-atrialer posteriorer Ganglienplexus
Links-superiorer Ganglienplexus	Links-atrialer superiorer Ganglienplexus
Links-inferiorer Ganglienplexus	Links-atrialer posteriolateraler Ganglienplexus

Eine weitere Untersuchung am humanen Herzen wurde durch Pauza et al. durchgeführt (Pauza et al. 2000). Hier wurde entgegen der genannten Systematik zwischen sieben atrialen und ventrikulären Ganglienplexus unterschieden und der anschließende Nervenverlauf beschrieben. Eine Verbindung der Ganglienplexus untereinander durch dünne Nervenfasern ist bekannt. Hierbei erfolgte die Einteilung am humanen Herzen anhand des Nerveneintritts in den Herzhilus. Zwei Nervenbahnen treten entlang der großen arteriellen Gefäße, Aorta und Truncus pulmonalis, ein und ziehen vorrangig zu den Ventrikeln. Fünf Nervenbahnen treten entlang der venösen Gefäße, Pulmonalvenen und Vena cava ein und ziehen vorrangig zu den Atrien (Pauza et al. 2000).

Im Detail werden die Nervenfasern vom arteriellen Anteil über den links-ventralen Koronarsulkus und über den rechts-ventralen Koronarsulkus von Herzhilus bis Herzspitze weitergeleitet. Von venösen Gefäßen ausgehend ziehen Fasern durch den anterioren interatrialen Sulkus und durch einen Sulkus, der sich auf der kranialen Herzoberfläche zwischen der Gefäßwurzel der Vena cava superior und der rechten superioren Pulmonalvene bildet. Ein weiterer Faserverlauf wird von

einer atrialen Falte zur links-lateralen Atriumoberfläche beschrieben. Auch die ventrale und dorsale Oberfläche des linken Atriums sind von Nervenfasern überzogen. Die Nervenplexus liegen in Fettpolstern am Herzhilus um Gefäßwurzeln von Venae pulmonales, Vena cava, Aorta und Truncus pulmonalis und sind entsprechend nahe der Eintrittsstellen der Nervenfasern ins Epikard lokalisiert (Pauza et al. 2000).

Im Vergleich zum menschlichen Herzen findet man im Mausmodell ähnliche anatomische Strukturen wieder (siehe Abbildung 5), obgleich im Detail speziesbedingte Unterschiede vorliegen. Auch im Mausmodell werden rechte und linke Ganglienplexus unterschieden, welche in drei Sulki an anatomischen Herzstrukturen weiterverlaufen. Dazu gehört sowohl der intraatriale Sulkus (siehe Abbildung 5B) als auch ein Sulkus, der sich auf der kranialen Herzoberfläche zwischen der Gefäßwurzel der rechten Vena cava und der rechten Pulmonalvene bildet (siehe Abbildung 5B: Sulkus der Vena cava). Weitere Fasern verlaufen im links-atrialen Sulkus, der von einer atrialen Falte zur links-lateralen Atriumoberfläche verläuft (siehe Abbildung 5B). Auch die ventrale und dorsale Oberfläche des linken Atriums sind von vernetzenden Nervenfasern überzogen (siehe Abbildung 5) (Pauza et al. 2013).

Da sich das intrinsische kardiale Nervensystem von Mensch und Maus, wie zuvor beschrieben, anatomisch sehr gut vergleichen lassen, stellt die Spezies Maus einen repräsentativen Modellorganismus insbesondere in der elektrophysiologischen Forschung dar (Bernstein et al. 2011).

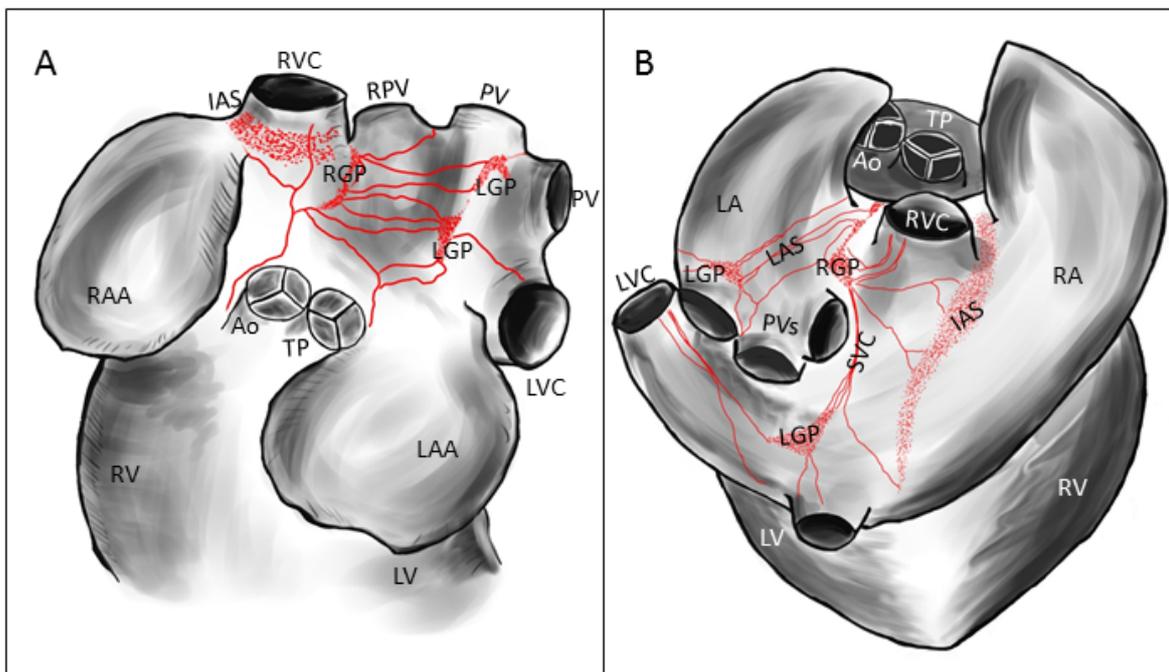


Abbildung 5: Schematische Übersicht des murinen intrakardialen Nervensystems in ventraler (A) und dorsaler (B) Ansicht. Es zeigt sich ein Netzwerk aus intrakardialen Neuronen, welches zwischen den venösen Vorhofgefäßen hinreichend ausgeprägt ist. Vereinzelt sind auch Nervenansammlungen zu Ganglienplexus dargestellt. Diese werden als linke (LGP) und rechte Ganglienplexus (RGP) bezeichnet. Auffällig sind insbesondere die drei Sulki über die die Ganglienplexus vernetzt sind (B). So findet man zwischen den beiden Atrien einen intraatrialen Sulkus (Zhang et al.), vom rechten Ganglienplexus (RGP) ausgehend einen Sulkus der um die rechte Vena cava zieht (SVC) und einen dritten Sulkus der oberflächlich auf dem linken Vorhof liegt (LAS).

Ao – Aorta, IAS – intraatrialer Sulkus, LA – linkes Atrium, LAA – links-atriales Auriculum, LAS – links-atrialer Sulkus, LGP – linker Ganglienplexus, LV – linker Ventrikel, LVC – linke Vena cava, PV – Pulmonalvene, RA – rechtes Atrium, RAA – rechts-atriales Auriculum, RGP – rechter Ganglienplexus, RPV – rechte Pulmonalvene, RV – rechter Ventrikel, RVC – rechte Vena cava, SVC – Sulkus der Vena cava, TP – Truncus pulmonalis; modifiziert nach (Pauza et al. 2013).

2.3.1.2 Funktionelle Aspekte der ICN

ICN haben einen Einfluss auf die Modulation des Herzrhythmus (Jänig 2016). Funktionell konnten bereits in allen atrialen Ganglienplexus, in denen ICN lokalisiert sind, chronotrope Effekte provoziert werden. Hierfür wirkten sowohl sympathische als auch parasympathische Mimetika an den beschriebenen Ganglienplexus (Wake und Brack 2016). Auch durch elektrische Stimulation lässt sich eine parasympathische und sympathische Reaktion der ICN in kardialen Ganglienplexus auslösen (Butler et al. 1990).

ICN können kurzzeitige Reflexe von unter 40 ms vermitteln, wodurch exakt der Abstand zwischen dem Einfall zweier Herzschläge reguliert wird. Mittellange Reflexe werden über intrathorakale Neurone geleitet, wohingegen der Ruhetonus durch längere Reflexschleifen zwischen Herz und ZNS gesteuert wird, welche bis zu 350 ms dauern können (Armour 1976). Hierbei findet eine regelmäßige Rückkopplung an ICN statt (Armour 2008).

2.3.1.3 Phänotypische Charakteristika

Immunzytochemische Färbungen ergaben bereits, dass ein größerer Anteil der ICN auf Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), einen cholinergen Marker, positiv reagierte. Eine Färbung des Protein-Gen-Produktes-9.5, ein allgemeiner neuronaler Marker, war in diesen Ganglien ebenfalls positiv (Hoover et al. 2004). Zudem waren aber auch ca. 30 % dieser Somata positiv auf Tyrosin-Hydroxylase (TH), einen adrenergen Marker. Somit ist ein Teil der ICN als biphänotypisch für adrenerge und cholinerge Proteine anzusehen. Auch sind funktionell-adrenerge Proteine wie z.B. β -Hydroxylase- und Noradrenalin-Transporter in ICN vorhanden, jedoch fehlen weitere neuronale Transportproteine, z.B. der vesikuläre Monoamintransporter VMAT2 für eine adrenerge Funktion (Nagatsu et al. 1964, Hoard et al. 2008).

In einer immunhistochemischen Studie von Pauza et al. wurden erneut phänotypische Eigenschaften von ICN untersucht (Pauza et al. 2013). Die Färbungen waren in der Sinusknoten-Region zwar stärker ausgeprägt, jedoch konnte, wie auch in der Arbeit von Hoard et al., ein großer Teil cholinerg Fasern mittels ChAT-Färbung nachgewiesen werden. TH-positive Fasern waren in 4 % zu sehen, sodass sich auch hier die biphänotypische Expression von ChAT- und TH in ca. 14 % der Fasern zeigte (Pauza et al. 2013).

2.4 Bedeutung des ANS in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Arrhythmien entstehen durch Erregungsbildungsstörungen und fehlerhafte Erregungsausbreitung. Ein Mitwirken des ANS ist vor allem bei der Bildung von supraventrikulären Arrhythmien von Bedeutung (Iwasaki et al. 2011).

Vorhofflimmern (VHF) ist eine der häufigsten tachykarden Rhythmusstörungen, dessen Erkrankungsrisiko bei einer von vier Personen über 40 Jahren liegt (Lloyd-Jones et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit in den fünf Folgejahren nach dem ersten Auftreten einen kardiovaskulären Vorfall zu erleiden liegt bei circa 60 %, selbst wenn zum Diagnosezeitpunkt keine Komorbiditäten bekannt waren (Kim et al. 2016). Bei der permanenten Form des VHF ist die Mortalität im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe verdoppelt (Neuzner und Pitschner 2007). Das ANS ist entscheidend in die Entstehung, Erhaltung und Terminierung des VHF involviert (Iwasaki et al. 2011, Yu et al. 2014). So wird zum Beispiel angenommen, dass ein paroxysmales Vorhofflimmern durch adrenerge oder vagale Trigger ausgelöst werden kann (De Vos et al. 2008).

Beim paroxysmalen VHF werden zu einem großen Teil die Pulmonalvenen als ektope Herde verantwortlich gemacht (Haissaguerre et al. 1998). Zur Entstehung von persistierendem und permanentem VHF wird die Theorie der „*multiple wavelets*“ verwendet. Zum Beispiel durch ektope Erregungen initiiert, breiten sich multiple Erregungswellen dreidimensional und chaotisch im Vorhofmyokard aus. Diese Wellen werden nicht nur diffus im Gewebe weitergeleitet, sondern können sich ihre Wege auch mittels Wellenfronten durch refraktäre Zellen im Myokard bahnen (Moe 1968). Das diffus erregte Vorhofmyokard wird als Substrat bezeichnet. Hierbei führen die ungerichteten Erregungen zu elektrischen und strukturellen Myokardveränderungen, woraus wiederum die Aufrechterhaltung des VHF resultiert (Ferrari et al. 2016). Solange Erregungswellen im Substrat fortgeleitet werden kann das VHF andauern (Schotten et al. 2011).

Als frühe Therapie des paroxysmalen VHF ist eine Isolation der Pulmonalvenen mittels Katheterablation etabliert (Haissaguerre et al. 1996). Eine zusätzliche Ablation sämtlicher gut charakterisierter ICN-haltigen Ganglienplexus im Vorhof wird aktuell diskutiert. Im Widerspruch stehen insbesondere divergierende Erfolgsraten sowie postoperative Komplikationen, z.B. eine Dysfunktion von Sinus- und AV-Knoten (Katraxis et al. 2011, De Groot 2016). Weitere Therapieansätze werden aktuell geprüft. Hierbei wäre eine Modulation der sympatho-vagalen Balance des ANS, z.B. durch eine Vagusnervstimulation oder auch eine Modulation der Karotissinusrezeptoren denkbar (Drexel et al. 2013, Ardell et al. 2016). Zudem könnte ein neurohumoraler Einfluss, z.B. durch neuronales

Stickstoffmonoxid (NO) als Stimulator an kardialen parasympathischen Ganglien, einen inhibitorischen Einfluss auf die Erregbarkeit der Zellen haben und würde somit einen weiteren Therapieansatz bilden (Habecker et al. 2016).

2.5 Ziel der Arbeit

Durch die Etablierung eines Modells zur Untersuchung der neuromyokardialen Kommunikation wird eine Grundlage für das Verständnis der neuronalen Plastizität im Rahmen kardialer Erkrankungen gegeben.

Die vorliegende Arbeit verfolgte die folgenden Ziele:

- 1) Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolation und Kultivierung muriner ICN.
- 2) Auswertung des Neuritenwachstums von ICN in-vitro.
- 3) Einführung einer Kokultur von ICN mit atrialen Kardiomyozyten.

3 Material und Methodik

3.1 Isolation und Kultivierung von ICN

3.1.1 Tiermodell

Für die Untersuchungen wurden männliche C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse gewählt. Ihr Alter variierte zwischen 8- 16 Wochen und das Körpergewicht lag bei 25-30 g. Diese Spezies wird in der kardiovaskulären Forschung häufig genutzt und ermöglicht die effiziente Gewinnung aussagekräftiger Daten an wenigen Tieren (Church et al. 2009, Kaese und Verheule 2012). Für das vorliegende Modell wurde sich bewusst für adulte Mäuse entschieden, um ausschließen zu können, dass das zu beobachtende Wachstumsverhalten der gewonnenen Zellen möglicherweise Einflüssen der embryonalen bzw. neonatalen Entwicklung unterliegt (Arimura und Kaibuchi 2007, Cheng et al. 2011).

Die zur Organentnahme und Materialgewinnung durchgeführten Versuche unterlagen der Ordnungsnummer O47-90, welche durch die Bezirksregierung der Stadt Düsseldorf genehmigt wurde sowie der Ordnungsnummer ORG_732_HCN4, ausgestellt durch das Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen Hamburg. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen für den Tierschutz durchgeführt. Die Kontrolle hierfür unterlag dem Tierschutzbeauftragten der jeweiligen Universität.

Die Versuchstierhaltung der Universität war für Beschaffung, Haltung und veterinärmedizinische Betreuung der Tiere verantwortlich.

3.1.2 Vorbereitung der Isolation

Vor Beginn der Isolationsversuche wurden ein kalziumfreier und ein kalziumhaltiger HEPES-Puffer angesetzt. Zur Herstellung des Puffers wurden 0,5 l destilliertes Wasser in einen Standzylinder gegeben und die in Tabelle 2 aufgeführten Chemikalien in den unten genannten Konzentrationen hinzugegeben. Nach Einstellen des pH-Wertes mit NaOH wurde der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.

Tabelle 2: Zusammensetzung von kalziumfreiem und kalziumhaltigem HEPES-Puffer zur Isolation von intrakardialen Neuronen.

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration	Besonderheiten
Kalziumfreier HEPES-Puffer	Glukose	11,0 mmol/l	pH 7,4 (NaOH)
	HEPES	16,8 mmol/l	
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH ₂ PO ₄	1,4 mmol/l	
	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,0 mmol/l	
	NaCl	155 mmol/l	
	NaHCO ₃	4,3 mmol/l	
Kalziumhaltiger HEPES-Puffer	Glukose	11,0 mmol/l	pH 7,4 (NaOH)
	HEPES	16,8 mmol/l	
	KCl	4,7 mmol/l	
	KH ₂ PO ₄	1,4 mmol/l	
	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,0 mmol/l	
	NaCl	155 mmol/l	
	NaHCO ₃	4,3 mmol/l	
	CaCl ₂	2,8 mmol/l	

Zur Einleitung der Narkose wurden männliche C57BL/6-Wildtyp-Mäuse intraperitoneal mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Details zu den benutzten Chemikalien und Materialien sind im Anhang (siehe 8.1) dargestellt. Durch Setzen eines Schmerzreizes wurde die ausreichende Narkosetiefe geprüft. War die Narkose ausreichend tief folgte die zervikale Dislokation.

Murine ICN wurden aus atrialen Ganglien im epikardialen Fettgewebe isoliert und nach dem anschließenden Protokoll aufbereitet. Dieses Protokoll wurde ursprünglich von der AG Veltkamp aus Amsterdam erarbeitet und in dieser Arbeit modifiziert (Verkerk et al. 2012).

3.1.3 Präparation des zelltragenden Gewebes

Für die Präparation des zelltragenden Gewebes wurde das Herz aus dem Brustkorb entnommen (Pauza et al. 2013). Zuerst wurde das Abdomen durch einen longitudinalen Schnitt in der Medianlinie geöffnet. Dazu wurde der erste Schnitt in die Bauchdecke bilateral entlang des unteren Rippenbogens gesetzt und

anschließend das Diaphragma aufgeschnitten. Die Rippen wurden jeweils nach dorsolateral, zur rechten und linken Axilla hin, durchtrennt. Dann wurde die Rippenspinne mit der Pinzette angehoben. Es folgte die Durchtrennung der Vena cava inferior und der Aorta unmittelbar oberhalb des Diaphragmas. Anschließend wurde das Herz-Lungen-Paket mitsamt dem zuvor durchtrennten Gefäßstrang mit der Pinzette gefasst und angehoben. Entlang der Wirbelsäule wurden die dorsalen Bindegewebsfaszien nach kranial durchtrennt. Abschließend folgte die Abtrennung der sich ebenfalls kranial vom Herzen befindenden Gefäße und Organe: der Vena cava superior, der Aorta, der Trachea und des Oesophagus.

Das Herz wurde inklusive der Lungen als vollständiger Herz-Lungen-Komplex mitsamt den großen Gefäßen entnommen, wobei insbesondere auf das epikardiale Fettgewebe um Vorhofstrukturen und Gefäße sorgfältig geachtet wurde. Es folgte eine Überführung in eine 4 °C kalte 0,9 % Natriumchlorid-Lösung, worin die Lungen hilusnah vom Herzen getrennt und das Herz blutfrei gespült wurde (Verkerk et al. 2012). Das noch eigenständig schlagende Herz wurde in dieser Arbeit in NaCl-Lösung gespült, wohingegen das Herz in der ursprünglichen Methode fünf Minuten im Langendorfsystem perfundiert wurde (Verkerk et al. 2012). Nach Aussetzen der kardialen Kontraktionen wurde das Herz in eine auf 4 °C vorgekühlte kalziumfreie HEPES-Lösung (siehe Tabelle 2) transferiert. Um möglichst gewebekonservierende Arbeitsbedingungen zu schaffen, wurde anschließend auf einer 4 °C Kälteplatte präpariert. Als Hilfsmittel wurden ein Stereomikroskop (Nikon, SMZ645, Japan) und als Präparierbesteck Pinzetten und Mikroscheren in verschiedenen Größen (Fine Science Tools, Deutschland) genutzt.

Die folgenden Schritte dienen dem Ziel, das atriale Fettgewebe freizulegen. Die Präparation begann mit der Dissektion von Trachea, Ösophagus und Thymus sowie der Resektion des verbliebenen Lungengewebes. Anschließend wurden die Nervi vagi entfernt. Schließlich wurden die eigentlichen Zielstrukturen: die epikardialen Fettpolster um Herzgefäße und Vorhöfe vom Herzen gelöst und in 5 ml vorgekühltem kalziumhaltigen HEPES-Puffer (siehe Tabelle 2) in einem Becherglas auf Eis gesammelt. Aufbau und Ablauf der Gewebepreparation sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

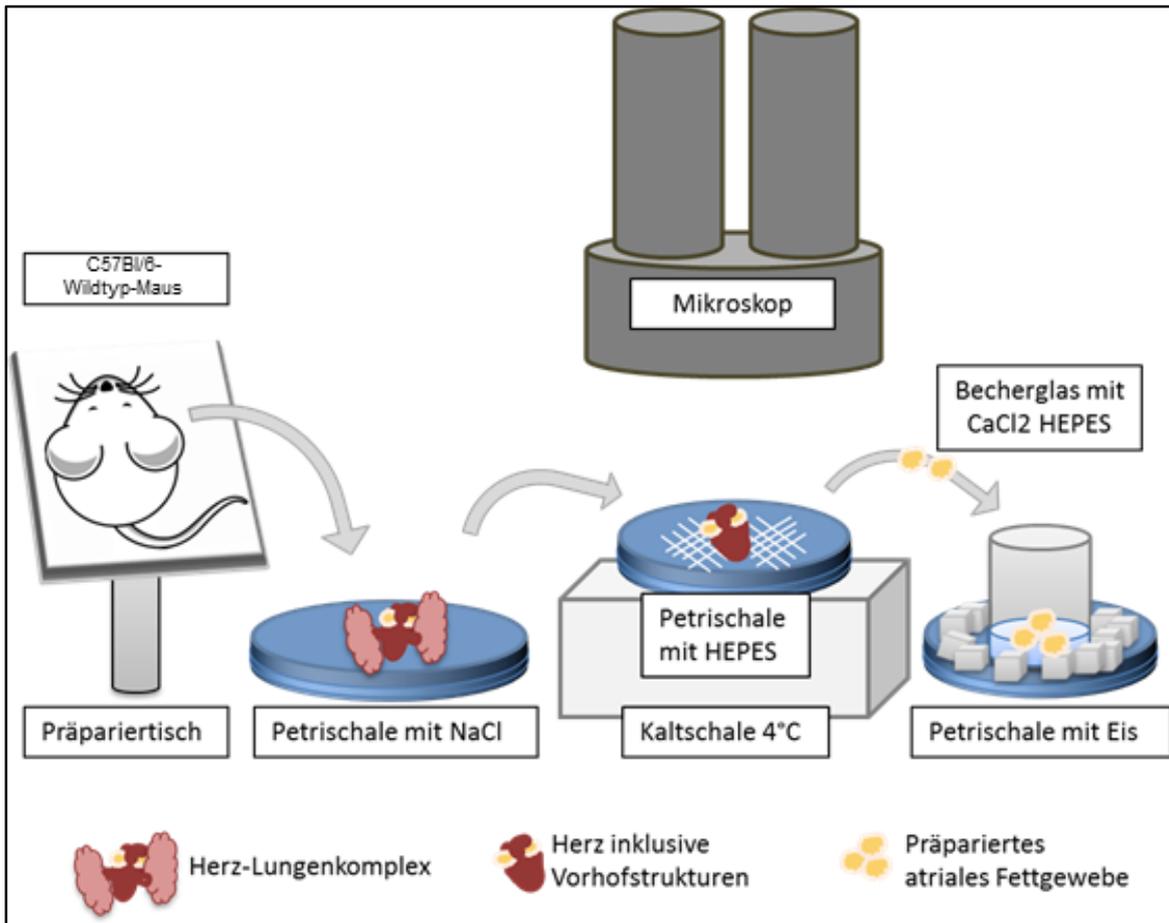


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Isolation von intrakardialen Neurozyten aus atrialem Fettgewebe. Nach der Entnahme des Herz-Lungen-Komplexes aus dem Brustkorb der Versuchsmouse wurde dieser in vorgekühlte 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung überführt. Hier wurden die Lungen abgetrennt und das Herz gespült. Anschließend wurde das Herz, inklusive Vorhofstrukturen, in 4 °C kalten kalziumfreien HEPES-Puffer transferiert und die Präparation des atrialen Fettgewebes unter dem Mikroskop durchgeführt. Ein Becherglas mit kalziumhaltigem HEPES-Puffer wurde in einem Eisbad gekühlt. Das atriale Fettgewebe konnte so vollständig vom Herzen präpariert und im kalziumhaltigen HEPES-Puffer gesammelt werden. Anschließend folgte die Dissoziation der Zellen aus dem präparierten Gewebe.

3.1.4 Zellisolation aus atrialem Fettgewebe

Nach Abschluss der Präparation folgte die mechanische und enzymatische Zersetzung des gesammelten Gewebes, um isolierte Zellkörper zu gewinnen. Das präparierte Fettgewebe wurde mit einer Mikroschere zerkleinert und in 1 ml Enzymlösung gegeben. Diese bestand aus kalziumhaltigen HEPES-Puffer, versetzt mit 0,5 mg/ml *Kollagenase Type CLSII* und 1 mg/ml *Proteinase from Aspergillus melleus*, (siehe Tabelle 3). Die verwendete Enzymlösung entsprach einer Kombination aus einer Lösung zur Proteinzerersetzung und einem Protokoll

zur primären Kardiomyozyten-Isolation, in dem Kollagenase als Enzym verwendet wurde (Verkerk et al. 2012).

Die 20-minütige enzymatische Zersetzung erfolgte in einem Thermoschüttler bei 37 °C. Um das verbliebene Gewebe mechanisch weiter zu zersetzen, wurde die Zellsuspension durch wiederholte Aufnahme in Pipetten (TipOne, Starlab, Deutschland) mit absteigender Spitzengröße gelöst. Beginnend mit einem Pipettenvolumen von 1000 µl, dann 200 µl und anschließend 10 µl wurde das Volumen sukzessive reduziert. Aus Vorarbeiten wurde angenommen, dass die Zellen eine Querschnittsfläche von bis zu 0,167 mm² haben werden (Rysevaite et al. 2011a). Entsprechend wurde die verbliebene Lösung durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert (*Cell Strainer* 100 µm, BD Falcon, USA). Die gefilterte Zellsuspension wurde 15 s in einer Mikrozentrifuge bei 10000 xg zentrifugiert, um die Zellen am Gefäßboden zu pelletieren.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Enzymlösung, die zum Gewinn von intrakardialen Neuronen aus atrialem Fettgewebe eingesetzt wurde.

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration	Besonderheiten
Enzymlösung	Kollagenase Type <i>CLSII</i>	0,5 mg	In 1 ml kalziumhaltigem HEPES-Puffer lösen
	Proteinase from <i>Aspergillus melleus</i>	1 mg	

Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, wozu der Überstand verworfen, das Pellet erneut in 1 ml Medium bei 37 °C (siehe Tabelle 4) gelöst und 15 s bei 10000 xg zentrifugiert wurde. Abschließend wurde das Zellpellet erneut in 100 µl vorgewärmtem Medium gelöst.

3.1.5 Kultivierung von ICN

Die Kultivierung der ICN erfolgte auf μ -Slide-8-Well-Platten (Ibidi, Deutschland). Um eine optimale Oberfläche zur Adhäsion der ICN zu schaffen, wurden die Kulturplatten mit 150 µl 0,01 % Poly-L-Lysin und 150 µl 0,01 % Poly-L-Ornithin vorbeschichtet und zum Einwirken 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Unmittelbar vor dem Austeilen der vorher gewonnen ICN-Zellsuspension

(siehe 3.1.4) wurde die Poly-L-Ornithin und Poly-L-Lysin Vorbeschichtung wieder abgenommen und 200 µl des in Tabelle 4 aufgeführten Zellkulturmediums in die Wells vorgelegt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für intrakardiale Neurone .

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration	Besonderheiten
Zellkultur- medium	Claycomb-Medium		
	FBS	10 %	
	Penicillin/ Streptomycin	66 µg/ml	
	L-Glutamin	4 mmol/l	

Das Verhältnis von gewonnener Zellsuspension und vorgelegtem Medium wurde an die Kulturschalen angepasst. Die 100 µl gewonnene Zellsuspension wurde auf die 200 µl vorgelegtes Kulturmedium verteilt. Die Zelldichte wurde entsprechend niedrig gewählt, um auch nach 72 h noch das Wachstum der Neuriten ungehindert beurteilen zu können.

Um zu evaluieren, in welchem Zellkulturmedium ICN am besten wachsen, wurden die drei in Tabelle 5 aufgelisteten Zellkulturmedien parallel angesetzt und isolierte ICN darin kultiviert. Das als Zellkulturmedium bezeichnete Claycomb-Medium, ein Medium, das vorrangig für atriale HL-1-Kardiomyozyten verwendet wird, ein Neuro-Basal-Medium und ein mit Insulin und mit Vitamin B27 supplementiertes Claycomb-Medium wurden in einer Versuchsreihe verglichen (Brewer et al. 1993, Lesuisse und Martin 2002).

Tabelle 5: Vergleich der Zusammensetzung der Medien für eine Kultur intrakardialer Neurone

Zellkulturmedium (100 ml)	Medium mit Insulin und B27 (100ml)	Neuro-Basal-Medium (100ml)
87 ml Claycomb-Medium	87 ml Claycomb-Medium	86,3 ml Neuro-Basal-Medium
10 ml FBS	10 ml FBS	10 ml FBS
1 ml Penicillin/ Streptomycin	1 ml Penicillin/ Streptomycin	1 ml Penicillin/ Streptomycin
1 ml L-Glutamin	1 ml L-Glutamin	1 ml L-Glutamin
	25 µl Insulin	200 µl Vitamin B27
	200 µl Vitamin B27	

Wie in den Ergebnissen im Abschnitt 4.1 ausführlich beschrieben war die Überlebensdauer der ICN in Kultur im Claycomb-Medium, welches in Tabelle 4 als „Zellkulturmedium“ bezeichnet wird mit 96 h am längsten (Claycomb et al. 1998, White et al. 2004). Folglich wurde dieses für alle weiteren Versuche verwendet. Allgemein wurde NA als Zusatz für Kardiomyozytenkulturen empfohlen, jedoch wurden Katecholamine bewusst nicht supplementiert, um einen eventuellen Einfluss auf das in-vitro-Neuronenwachstum zu verhindern (Day et al. 2014).

Ein Preplating, wie von Hoard et al. beschrieben, wurde nicht weiter durchgeführt, da die Zellzahl in diesen Versuchsreihen deutlich geringer ausfiel (Hoard et al. 2007).

3.2 Beschreibung der Morphologie intrakardialer Neurone

3.2.1 Material zur Dokumentation

Die Dokumentation des Zellwachstums erfolgte mittels Installation einer digitalen, mit fünf Megapixel-auflösenden Kamera (Leica, DFC425C, Deutschland) über dem Mikroskop (Leica, DM 4000M, Deutschland). Die Steuerung der Kamera erfolgte mittels Computersoftware (Leica Application Suite V3.7, Deutschland). In dieser konnte das am Mikroskop ausgewählte Objektiv, die Beleuchtung und die Größe der Bilder verrechnet werden. Die Übertragung der Mikroskopie erfolgt zeitgleich auf den Bildschirm.

3.2.2 Dokumentationsprotokoll

Nach gelungener Isolation von ICN erfolgte eine 48 h Ruhephase, im Anschluss hatten die Kulturen eine Überlebensdauer von insgesamt 96 h. Dementsprechend mussten die Beobachtungszeitpunkte zwischen dem 48 h und 96 h-Zeitpunkt liegen und sollten insgesamt nicht zu häufig gewählt werden um externe Einflüsse auf das Wachstum möglichst gering zu halten. Folglich wurden die Auswertungszeitpunkte gleichmäßig verteilt und auf 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation festgelegt. Sechs Kulturen wurden pro Versuchsreihe ausgesät. Zu den Auswertungszeitpunkten wurden je zwei Kulturen der insgesamt sechs Platten parallel beobachtet und ausgewertet. Die jeweiligen Kulturen wurden nach Auswertung verworfen. So wurden zum nächsten Zeitpunkt zwei andere Kulturen ausgezählt.

Zur systematischen Dokumentation der Zellkultur durch Fotos wurden jeweils sechs gleichmäßige Raster auf einer Kulturplatte ausgewählt. In jedem Rechteck wurde jeweils ein Gesichtsfeld aufgenommen und ausgewertet. Die folgenden Messungen wurden an anderen Kulturplatten durchgeführt, jedoch die sechs Messfelder auf gleiche Weise angepasst und dokumentiert. Alle ausgewerteten Bilder wurden bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

So wurden sechs Bilder pro Kultur angefertigt, sodass anschließend insgesamt zwölf Bilder zu jedem Zeitpunkt zur Analyse zur Verfügung standen. Schematisch ist das Aufnahme Protokoll in Abbildung 7 dargestellt.

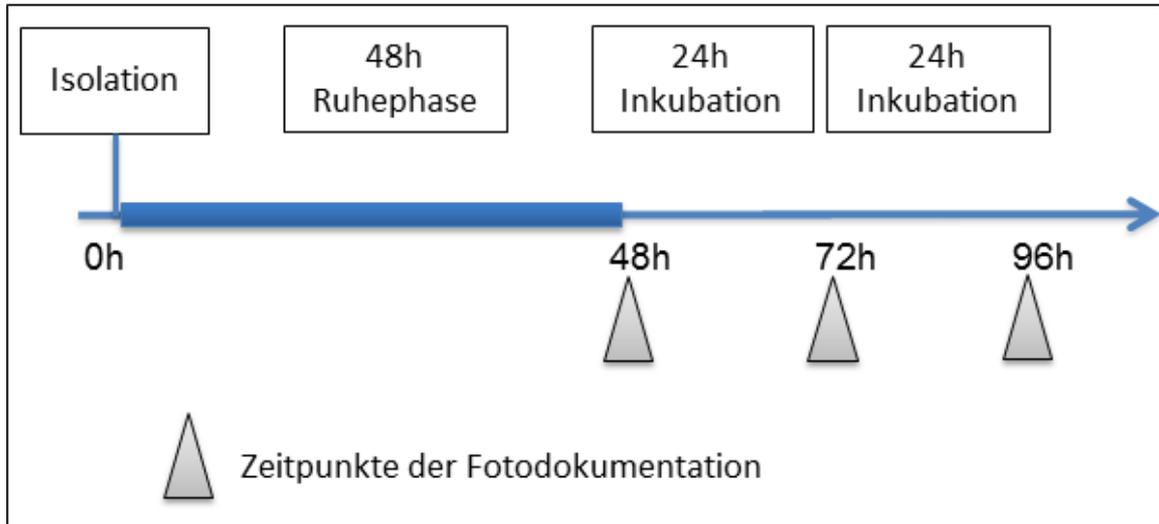


Abbildung 7: Protokoll zur Fotodokumentation und Auswertung der Neuritenlängen. Nach Isolation der intrakardialen Neurone erfolgte eine 48 h Ruhephase. Anschließend wurde die Neuritenlänge im mikroskopischen Bild dokumentiert. Zwischen den weiteren Dokumentationen zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h erfolgte jeweils eine 24 h-Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.3 Auswahl der Zellen nach morphologischen Kriterien

Um zu differenzieren welche Zellen zur Population der ICN gehören und welche Zellen anderen Zellarten entstammen, stellten wir charakteristische Kriterien zusammen, durch die ICN bereits beschrieben worden sind.

- ein länglich-ovales bis rundes Soma (Xi et al. 1991, Rysevaite et al. 2011a)
- ein scharf begrenzter Umriss (Pauza et al. 1997)
- Nukleus und Nukleoli im Soma (Her et al. 2000)
- variable Anzahl an Fortsätzen (Hoard et al. 2007)

3.2.4 Phänotypische Einteilung der ICN

Anhand der Anzahl sowie der Morphologie der Fortsätze wurden ICN in unipolare, bipolare und multipolare Zellen eingeteilt (Pauza et al. 1997, Her et al. 2000). Das Schema zur phänotypischen Klassifizierung der ICN ist in Abbildung 8 dargestellt.

Unipolare Zellen haben einen langen Neurit, der in Relation zum Zellkörper sehr schmal ist. Er verzweigt sich nicht weiter, weist aber Varikositäten auf und ändert im Verlauf des Wachstums die Richtung (Xi et al. 1991). Bipolare Zellen haben

zwei Neuriten, die an den beiden gegenüberliegenden Seiten des Perikaryons ansetzen. Multipolare Neurone haben variabel viele Ausläufer (Horackova et al. 1996).

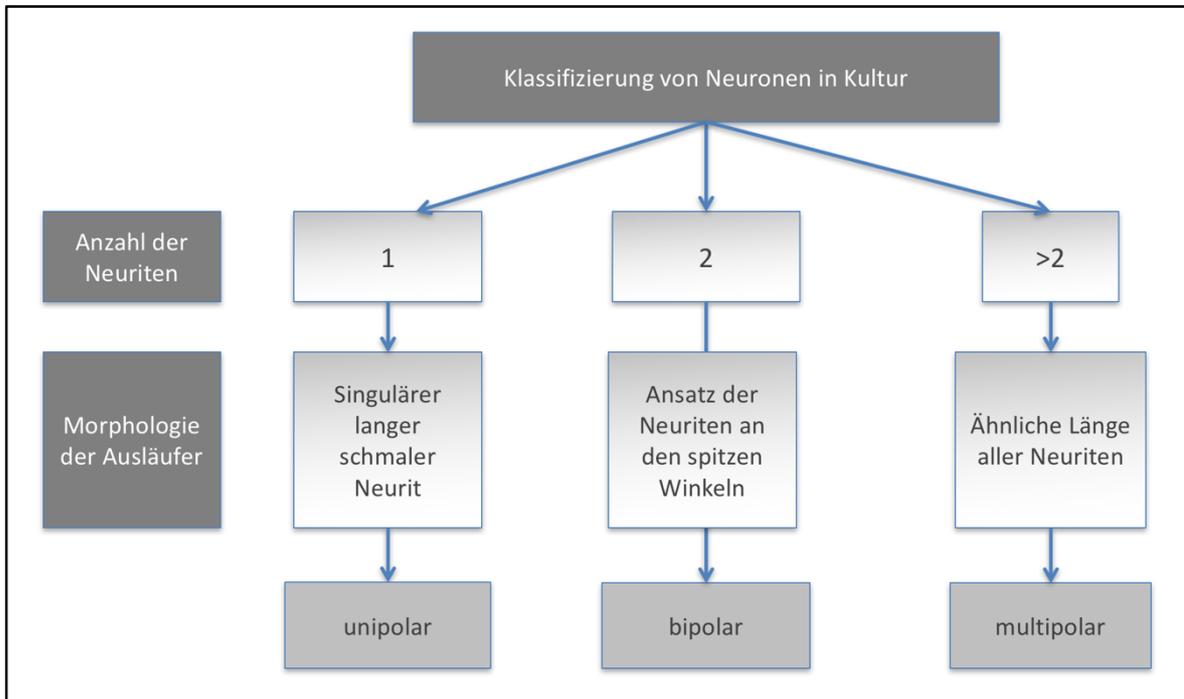


Abbildung 8: Schema der Klassifizierung von intrakardialen Neuronen in verschiedene Phänotypen. Kriterien zur Einteilung waren die Anzahl sowie die Morphologie der Neuriten. Unipolare Neurone haben einen langen schmalen Ausläufer. Bipolare Neurone weisen zwei Neuriten auf, wohingegen multipolare Neurone drei oder mehr ähnlich lange Neuriten als Ausläufer haben, die sich im späten Stadium auch weiter verzweigen können.

3.3 Messung der Neuritenlängen

Sechs Kulturen wurden pro Versuchsreihe ausgesät. Zu jedem Auswertungszeitpunkt wurden zwei Kulturen der insgesamt sechs Platten parallel beobachtet und ausgewertet. Es wurden sechs Bilder pro Kultur gemacht, sodass anschließend insgesamt zwölf Bilder zu jedem Zeitpunkt zur Analyse zur Verfügung standen.

Alle Zellen wurden in den Bildern bewertet und von zwei unabhängigen Beobachtern entsprechend der phänotypischen Klassifikation (siehe 3.2.4) den Gruppen zugeordnet. Die Neuritenlängen aller ICN wurden gemessen. Hierzu wurde die Software FIJI verwendet (Schindelin et al. 2012). Im Mikroskop wurde ein Raster der Neubauer-Zählkammer als Referenz verwendet. Hierzu wurde eine

Strecke mit einer bekannten Länge von 150 µm zur Längenkalibrierung eingestellt und dieselbe Strecke in der Software als 150 µm definiert. Anschließend erfolgte die Zählung der Neuriten sowie die Messung der Längen. Der Verlauf des Neuriten wurde im Programm mit dem Cursor nachgefahren und durch das Programm die genaue Länge bestimmt. Die Daten wurden in einer Excel-Tabelle gesammelt.

3.4 Gemeinsame Kultivierung von Kardiomyozyten und ICN

Eine gemeinsame Kultur aus ICN und Kardiomyozyten sollte die Möglichkeit bieten in zukünftigen Studien eine Interaktion zwischen Kardiomyo- und Neurozyten zu untersuchen. Für die Kokultur wurden HL-1-Kardiomyozyten ausgewählt. HL-1-Kardiomyozyten entstammen einer Zelllinie, deren Zellen sich in-vitro kontinuierlich teilen und welche regelmäßig passagiert werden können. Atriale HL-1-Kardiomyozyten haben nach Ausdifferenzierung die Fähigkeit spontan zu kontrahieren (White et al. 2004). Ursprünglich isoliert wurde diese Zelllinie aus einem Angiotensin-1-produzierenden Tumor, der im Atrium einer Maus wuchs, welche ein SV 40 Antigen, ein spezielles Onkoprotein, exprimiert. Dieses induziert eine hohe Teilungsfähigkeit der Zellen und entsprechend die Hyperplasie des Tumors, wodurch die Isolation der primären HL-1-Kardiomyozyten erst möglich wurde. Nach Aufbereitung proliferierten HL-1-Kardiomyozyten auch in-vitro, sodass sie eine zuverlässige Vergleichsgruppe für atriale Primärzellen bilden (Field 1988). Sowohl biochemische und genetische als auch elektrophysiologische Eigenschaften wurden an der einzelnen HL-1-Kardiomyozyte bereits von Claycomb et al. untersucht und eine Parallele zu nativen atrialen Kardiomyozyten beschrieben (Claycomb et al. 1998). Somit sind Kulturen aus HL-1-Kardiomyozyten mittlerweile ein geeignetes Zellmodell in der kardiologischen Grundlagenforschung.

Um mögliche Interaktionen zwischen atrialen HL-1-Kardiomyozyten und nativen murinen ICN zu beobachten wurden diese gemeinsam kultiviert. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 72 h. Das Wachstum wurde mit Hilfe einer Fotodokumentation verfolgt.

3.4.1 Etablierung einer Kokultur aus Kardiomyozyten und ICN

Um eine Kokultur aus ICN und Kardiomyozyten zu etablieren, wurden die Kulturmethode der jeweiligen Monokulturen sowohl quantitativ als auch zeitlich in folgendem Protokoll aufeinander abgestimmt.

Als erster vorbereitender Schritt wurden sterile Einsätze für die Zellkulturplatten aus Silikon auf runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 12 mm gesetzt. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 9 zu sehen. Die sogenannten *Cell Culture Inserts* hatten zwei Kammern mit einer äußeren Kantenlänge von 8,4 mm und konnten mit einer haftenden Seite auf den Deckgläsern fixiert werden. Die beiden Kammern umfassten je eine Wachstumsfläche von 0,22 cm² bei einem Volumen von 70 µl. Diese konnten unabhängig voneinander vorbereitet und behandelt werden. Um im Anschluss die zwei Zellpopulationen gemeinsam in einer Kokultur wachsen zu lassen, konnte das *Cell Culture Insert* mit einer Pinzette entfernt werden. Auf der Unterseite des Deckglases wurde eine Markierung zur Festlegung der jeweiligen Zellpopulationen für jede Kammer gesetzt, dann die für ICN vorgesehene Kammer mit 50 µl der in 3.1.5 beschriebenen Lysin-Ornithin-Lösung vorbeschichtet. Nach einer 24-stündigen Einwirkzeit im Inkubator erfolgte die Isolation der nativen ICN und die Aussaat in die vorbeschichtete Kammer. Die Neurone verweilten 48 h im Inkubator. Sämtliche Inkubationsphasen für ICN als auch HL-1-Kardiomyozyten erfolgten bei 37 °C und 5 % CO₂.

HL-1-Kardiomyozyten wurden in Kulturflaschen passagiert und vital gehalten während die ICN nativ isoliert wurden. 12 h vor dem Passagieren und Aussäen der HL-1-Kardiomyozyten zur ICN-Kultur wurde die für die HL-1-Kardiomyozyten bestimmte Seite mit 100 µl Gelatine-Fibronectin-Suspension vorbereitet. Für die Gelatine-Fibronectin-Suspension wurden 100 mg Gelatine in 500 ml Wasser autoklaviert und anschließend 1 ml Fibronectin zu 199 ml der 0,02 % Gelatine-Lösung zugegeben.

Nach Abnehmen der Vorbeschichtung wurde eine Kulturflasche mit vitalen HL-1-Kardiomyozyten bestückt, wobei ein Teil der Zellen für die Kokultur-Versuche abgenommen werden konnte. Die mit HL-1-Kardiomyozyten bewachsene Zellkulturflasche wurde mit 6 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung

(PBS) gespült und anschließend zweimal für je eine Minute in 3 ml 0,05 % Trypsin in EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der zweiten Inkubation mit Trypsin hafteten die Zellen nicht mehr am Kulturboden und konnten durch ein leichtes Klopfen gelöst werden. Die tryptische Dissoziation in der Kulturflasche wurde im direkten Anschluss mit 3 ml Claycomb-Zellkulturmedium (siehe 3.1.5) gestoppt. Das Claycomb-Medium, in dem die HL-1-Kardiomyozyten nun gelöst waren, wurde in ein 15 ml Reagenzgefäß überführt. Nach einem zweiten Waschschrift mit weiteren 5 ml Claycomb-Kulturmedium wurde entsprechend auch das mit weiteren Zellen angereicherte Kulturmedium in das 15 ml Reagenzgefäß überführt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 xg, um die HL-1-Kardiomyozyten am Gefäßboden zu pelletieren. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 3 ml frischem Claycomb-Kulturmedium gelöst. Es folgte eine Berechnung der Zellkonzentration im Medium mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Collins et al. 2010). Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt und in der Neubauer-Zählkammer ausgebracht, um die Zellanzahl unter dem Lichtmikroskop auszuzählen. Über die Anzahl der Zellen konnte die Gesamtzahl der Zellen im Medium berechnet werden. Entsprechend wurden 30000 Zellen in der für HL-1-Kardiomyozyten bestimmten Kammer ausgebracht und in Kammern getrennt weitere 24 h inkubiert. Die verbleibende HL-1-Zellsuspension konnte in einer Kulturflasche bis zum Folgeversuch kultiviert werden (Claycomb et al. 1998).

24 h nachdem die Kardiomyozyten ausgesät worden waren, waren auch diese am Kulturboden adhärirt und das *Cell Culture Insert* konnte entfernt werden. Beide Zellpopulationen wurden dann in einem *Well* in Claycomb-Medium kultiviert (siehe Tabelle 4). Nach 12 h und 24 h wurden Aufnahmen der Kokultur gemacht, um die Vitalität zu dokumentieren.

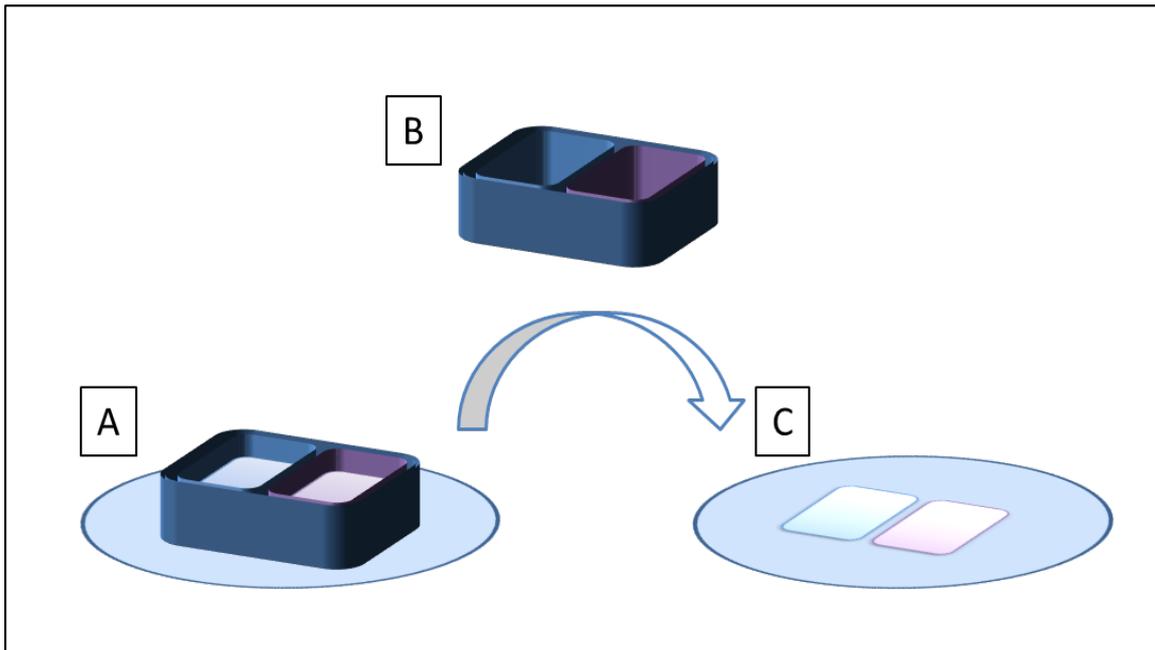


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kokultur-Methodik. Sogenannte *Cell Culture Inserts* hafteten auf Deckgläsern und bildeten zwei getrennte Kulturkammern (A). In einer Kammer wurden intrakardiale Neurone kultiviert (blau), in der zweiten Kammer HL-1-Kardiomyozyten (violett). Nach Abnehmen des *Cell Culture Insert* (B) wurden beide Kulturen nebeneinander auf dem gleichen Deckglas kultiviert und ihre Interaktion beobachtet (C).

3.4.2 Messungen an atrialen HL-1-Kardiomyozyten mit der *Patch-Clamp*-Methode

Atriale HL-1-Kardiomyozyten in Monokultur wurden mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch auf ihre Kanalaktivität geprüft. Dazu wurden diese auf 12 mm Deckgläser mit einer Dichte von circa 50000 Zellen pro Deckglas ausgesät, welche anschließend in sterile 24-Well-Platten vorgelegt wurden. Nach mehreren Messungen zu den Zeitpunkten 1 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde evaluiert, dass der optimale Zeitpunkt 24 h nach dem Passagieren lag (Sartiani et al. 2002, Goldoni et al. 2010). Zudem waren die Zellen nach 24 h vollständig am Deckglas adhären.

Vor Aufbringen der Zellen auf die Deckgläser wurden diese mit 100 ml der in 3.4.1 beschriebenen Gelatine-Fibronectin-Suspension vorbehandelt. Diese sollte 1 h bis maximal 12 h einwirken. Nach der Einwirkzeit wurde eine Passage vitaler HL-1-Kardiomyozyten, wie in 3.4.1 beschrieben, aufgeteilt und ein Teil der Zellen für die *Patch-Clamp*-Versuche abgenommen.

Als nächstes folgte die Herstellung von *Patch-Clamp*-Mikropipetten aus Glas. Dazu wurde eine Glaskapillare aus Borosilikatglas mit einem inneren Durchmesser von 1,05 mm, einem äußeren Durchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 80 mm (GB 150T-8P, Science Products) in die Halterung des vertikalen Mikropipettenziehers (Sutter Instrument P-97, Science Products GmbH) eingespannt. Darin wurde die Glaskapillare dreimal in Folge mittig für je 1 Sekunde mit Hilfe eines Glühfilaments erhitzt. Gleichzeitig wurde die Glaskapillare dosiert auseinandergezogen. Dabei entstanden zwei identische Mikropipetten. Im Mikroskop wurde geprüft, ob die Öffnung der Mikropipetten einen Durchmesser von 1,0 μm hatte. Dieser Durchmesser ist zum *Patch-Clamping* mit der *Whole-Cell*-Technik geeignet (Hamill et al. 1981).

Das Inversmikroskop (Olympus, Japan) bildete den Mittelpunkt des *Patch-Clamp*-Messstandes und befand sich auf einem vibrationsisolierenden Tisch. Es bildete eine Einheit mit dem Mikromanipulator inklusive Messelektrode und *Headstage* und dem Steuerungssystem. Die nicht gesondert aufgeführten Geräte zum *Patch-Clamping* waren von der Firma Heka, Deutschland. Da der *Patch-Clamp*-Messstand geerdet war und die zu messenden makroskopischen Ströme sich als rauscharm darstellten, wurde auf einen Faraday-Käfig verzichtet. Eine Fotodarstellung des Messstandes ist in Abbildung 10 dargestellt.

Nach dem Erstellen der Mikropipetten wurde das bedeckte Deckglas in die dafür vorgesehene Badkammer transferiert, welche mit extrazellulärer Lösung gefüllt wurde (Tabelle 6). Zusätzlich wurde die Referenzelektrode in Kontakt mit der Badkammer gebracht. Anschließend folgte die Befüllung der vorbereiteten Mikropipette mit gefilterter intrazellulärer Lösung. Dann wurde diese um die Messelektrode, welche durch einen Silberdraht gebildet wurde, in den Mikromanipulator eingespannt. Die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung ist in Tabelle 6 beschrieben (Verkerk et al. 2012).

Tabelle 6: Zusammensetzung der intra- und extrazellulären *Patch-Clamp*-Lösung im Vergleich

Extrazelluläre Lösung		Intrazelluläre Lösung	
140 mmol/l NaCl	pH 7.4 (NaOH)	10 mmol/l NaF	pH 7.3 (CsOH)
5,4 mmol/l KCl,		10 mmol/l CsCl	
1,8 mmol/l CaCl ₂		110 mmol/l CsF	
1 mmol/l MgCl ₂		11 mmol/l EGTA	
5,5 mmol/l Glukose		1 mmol/l CaCl ₂	
5 mmol/l HEPES		1 mmol/l MgCl ₂	
		2 mmol/l Na ₂ ATP	
		10 mmol/l HEPES	

Mit dem Steuerungselement des Mikromanipulators konnte dessen Position mit den drei vorhandenen Steuereinheiten in Höhe, Tiefe und Breite gesteuert werden. Am Mikromanipulator befand sich neben der Messelektrode ein *Headstage*, der der Vorverstärkung der gemessenen Ionenkanalströme dient. Die Pipette samt verschiebbarem Mikromanipulator wurde zu Versuchsbeginn über der Badkammer positioniert und das Sichtfenster im Mikroskop so angepasst, dass in diesem die zu messende Zelle und die Spitze der Mikropipette zentral zu erkennen waren.

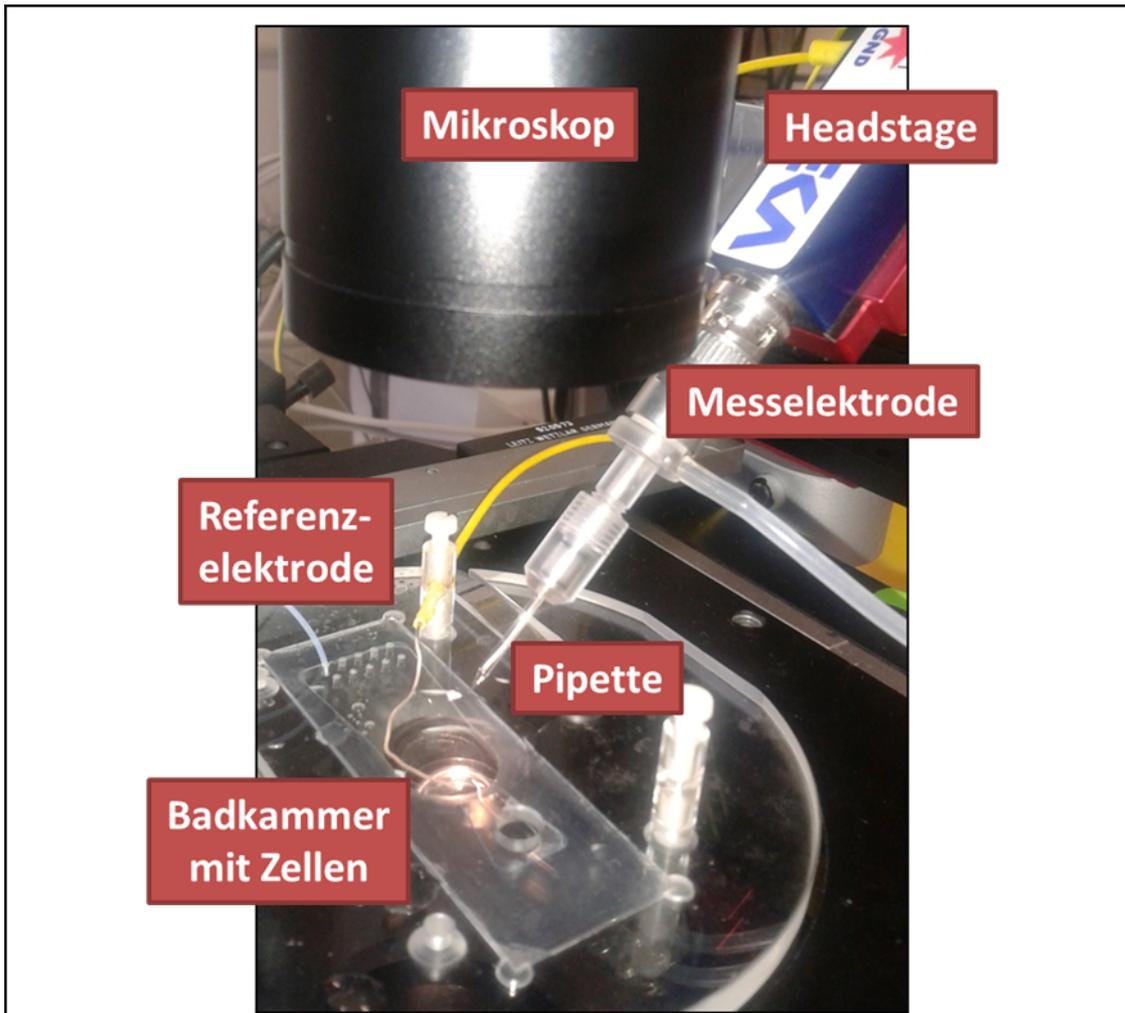


Abbildung 10: Der Aufbau des *Patch-Clamp*-Messstandes mit Fokus auf den Bereich der Messelektrode, welche sich in der Mikropipette befindet und von intrazellulärer Lösung umgeben ist und in den Mikromanipulator mit Headstage eingespannt ist. Auch ist ein Ausschnitt der Badkammer mit Zellen und Referenzelektrode sowie ein Teil des Mikroskops zu erkennen.

In der Mikropipette konnte Über- oder Unterdruck erzeugt werden. Vor dem Eintauchen der Pipette in die extrazelluläre Lösung wurde ein leichter Überdruck erzeugt, um diese frei von Mikro-Fremdkörpern zu halten. Mit der Steuerungseinheit wurde dann die Pipette der zu messenden Zelle angenähert.

Bei Annäherung der Mikropipette an die Zelle stieg der Widerstand zwischen Messelektrode und Referenzelektrode leicht an. Dieser Widerstand gab Aufschluss über die Position der Pipette. Es wurde ein Unterdruck in der Pipette erzeugt, um die Zellwand an die Pipette zu ziehen. Bei einem Widerstand von 1 G Ω zwischen Mikropipette und Zellmembran wurde im nächsten Schritt die

Zellmembran durch vorsichtiges Vergrößern der Druckdifferenz, unter einer leicht negativen Spannung von -5 mV, geöffnet.

3.4.2.1 Messung von Ionenkanalströmen

Das Ziel der Messung war die Ableitung eines Ionenkanalstroms zur Aktivitätsprüfung der atrialen HL-1-Kardiomyozyten.

Ionenkanalströme konnten mit der *Whole-Cell-Voltage-Clamp*-Methode in der Spannungsklemme gemessen werden. Im vorliegenden Versuch wurde durch das Anlegen einer definierten Spannung ein Ionenstrom über die Zellwand bestimmt (Neher und Sakmann 1992). Die Referenzelektrode befand sich im Wasserbad worin die extrazelluläre Lösung (siehe Tabelle 6) die äußere Zellmembran umspülte. Die Messelektrode befand sich in einer Mikropipette, welche durch eine minimale Öffnung der Zellwand ein geschlossenes System mit dem Intrazellularraum bildete. Somit befanden sich Referenz- und Messelektrode jeweils in Intra- und Extrazellularraum und wurden einzig durch die Zellmembran voneinander getrennt. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle in der Zellmembran wurden durch das manuelle Anlegen einer Spannung geöffnet und bereits geringe Ionenströme konnten als elektrischer Strom aufgezeichnet werden.

Im Messprotokoll wurde die Ausgangsspannung entsprechend dem Ruhemembranpotential auf -70 mV festgelegt (Hoffman 1959). Dann erfolgte ein Sprung auf -140 mV und 20 Spannungsstufen von je 10 mV bis auf +70 mV. Jede Spannungsstufe dauerte 120 ms an bis die nächste Spannungserhöhung einsetzte. Das Gesamtprotokoll dauerte 2,5 s. Zeitgleich wurden die ausgelösten Änderungen der Kanalströme mit der Software *PatchMaster Vol. 5.2* aufgezeichnet.

3.4.2.2 Messung des Aktionspotentials

Ziel der Messung war das Ableiten eines Aktionspotentials zur Vitalitätsprüfung von atrialen HL-1-Kardiomyozyten. Diese wurden dazu mit der *Whole-Cell-Current-Clamp*-Methode gemessen. Aktionspotentiale konnten bei Erreichen des Schwellenpotentials durch Strominjektion ausgelöst werden und die

Spannungsänderungen im Programm *PatchMaster Vol. 5.2.* aufgezeichnet werden (Neher und Sakmann 1992).

Für das verwendete Protokoll wurde zuerst die Spannung entsprechend dem Ruhemembranpotential auf -70 mV festgelegt und anschließend das Programm auf den Spannungsmodus gesetzt. Die angelegten Stromstärken wurden über den Zeitraum von 500 ms in 50 pA-Schritten alle 3 ms gesteigert. Das Stromstärkenminimum betrug 0 pA und das Stromstärkenmaximum 400 pA (Hoffman 1959). Die entstehenden Spannungsänderungen wurden als Aktionspotentiale in der Software *PatchMaster Vol. 5.2.* aufgezeichnet.

3.5 Statistik

Die Daten wurden mit den Programmen *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., USA) ausgewertet.

Die angegebenen Variablen beschreiben den Mittelwert \pm Standardfehler, Zähler (n) oder Prozentwerte. Zum Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen wurde der t-Test verwendet. Signifikante Änderungen der Proben zwischen den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h wurden mit einer one-way ANOVA berechnet. Bei beiden Testformen wurde das Signifikanzniveau standardisiert auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolation und Kultivierung von ICN

Durch die Analyse anatomischer Studien und die Modifizierung verschiedener Protokolle zur Zellisolation konnte eine neue Methode zur Gewinnung von neuronalen Primärzellen aus atrialem Fettgewebe etabliert werden. Diese ermöglichte uns eine Kultivierung der Zellen bis zu 96 h (siehe 3.1.5).

Es wurden die in 3.1.5 aufgelisteten Zellkulturmedien parallel angesetzt und isolierte ICN darin kultiviert. Die Überlebensdauer der ICN in Kultur war im Claycomb-Medium, welches mit 10 % Fetalem Kälberserum (FBS), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mmol/l L-Glutamin angereichert war, mit 96 h am höchsten. Folglich wurde dieses für alle weiteren Versuche verwendet (Claycomb et al. 1998, White et al. 2004). Über den Zeitraum der Kultivierung wurde das Claycomb-Medium alle 24 h durch je 300 µl pro *Well* ersetzt.

Im Verlauf der Etablierung wurde die Möglichkeit des *Preplatings* evaluiert, jedoch als nicht zielführend bewertet. Hierzu wurden wie von Hoard et al. beschrieben, die Zellen auf einer mit Poly-L-Lysin vorbeschichteten Platte eine Stunde vorkultiviert und anschließend auf Kulturplatten transferiert, welche in den vorangegangenen 24 h mit Poly-L-Ornithin inkubiert worden waren (Hoard et al. 2007). Dies hatte den Hintergrund, dass durch ein frühes Umsetzen der gewonnenen Zellsuspension fremde Zellen verlorengehen und überwiegend ICN in der Kultur wachsen sollten. Da wir jedoch in dieser Versuchsreihe nur sehr vereinzelt ICN im Mikroskop sehen konnten, wurde vermutet, dass die Zellen beim Transfer zu Grunde gehen, sodass von dieser Methode abgesehen wurde.

Frisch isolierte Zellen waren klein und kreisrund (siehe 3.1). Nach 48 h veränderten die Neurone die Morphologie von einer gleichmäßig runden Form zu adhären Zellen mit schmalen ovalen Zellkörpern und mit variabler Anzahl an Ausläufern (siehe Abbildung 11). Die Anzahl adhärerter Zellen war kleiner als die Anzahl direkt nach Isolation, da nicht alle Zellen in Kultur überlebten.

Nach den ersten 48 h in Kultur wiesen adhärterte Neurone eine stetige Veränderung der Neuritenlänge auf. Die Kultivierungsdauer betrug maximal 96 h, da dann Fremdzellen in der Kultur dominierten.

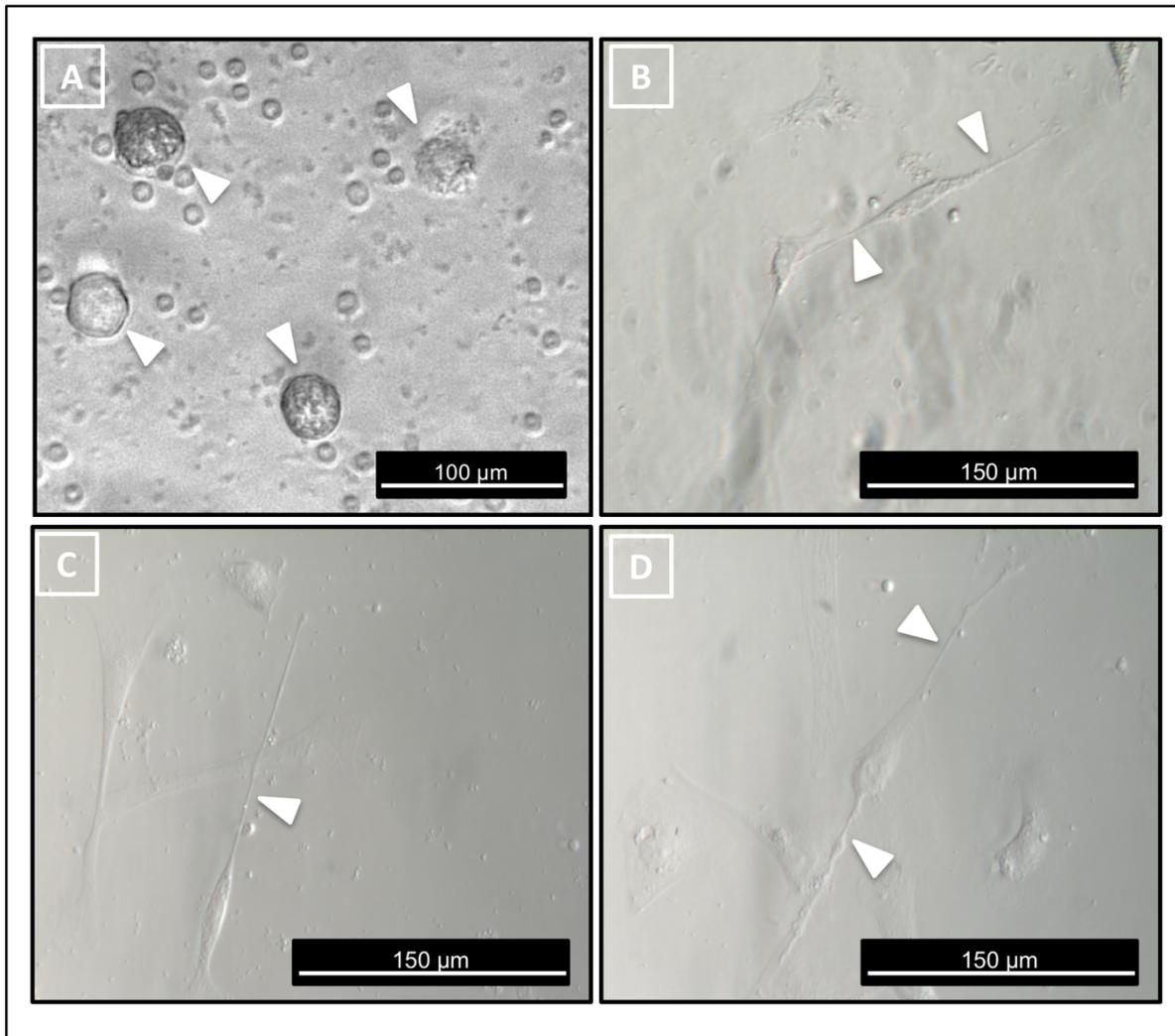


Abbildung 11: Intrakardiale Neurone (ICN) im Wachstumsverlauf zu den Zeitpunkten 0 h (A), 48 h (B), 72 h (C), und 96 h (D) nach Isolation. A) Frisch isolierte ICN zum Zeitpunkt 0 h, die sich als runde Zellen ohne Ausläufer darstellen. Sie sind von vielen kleinen Fremdzellen umgeben. B) Ausläufer eines ICN nach 48 h Ruhephase. C) ICN mit einem langen schmalen Ausläufer zum Zeitpunkt 72 h nach Isolation. D) ICN mit zwei Ausläufern nach 96 h Kultivierung. Zu sehen sind Varikositäten entlang der schmalen Neuriten.

4.2 Morphologische Beschreibung der Perikarya und Neuriten von ICN

Die Zellkörper unipolarer Neurone waren spindelförmig mit einem Verhältnis der Länge zur Breite von circa 2:1. Der Umriss war symmetrisch oval mit zwei kurzen konvexen Seiten, die spitz aufeinander zuliefen (siehe Abbildung 12A).

Darüber hinaus waren unipolare Zellen zu sehen, die ein rund-ovales Perikaryon besaßen (siehe Abbildung 12B). Auch diese hatten eine deutlich abgrenzbare Somaform. Der Unterschied zum spindelförmigen Zellumriss bestand vor allem

Ergebnisse

darin, dass der Winkel der spitz aufeinander zulaufenden Seite stumpfer war. Das Zellsoma wirkte dadurch länger als bei spindelförmigen Perikarya.

Auch einen pyramidenförmigen Zellkörperumriss konnte man in der Kultur sehen (siehe Abbildung 12C). Das Soma hatte drei unterschiedlich lange Seiten. Der Ursprungskegel des Neuriten war zwischen den zwei gleichen Seiten lokalisiert. Die Zellkörperformen entsprachen wie unter 5.2.1 diskutiert somit primären Neuronen anderer Spezies.

Die Neuriten der unipolaren ICN zeigten den folgenden Verlauf: Der Ursprungskegel eines langen, schmalen Neuriten setzte am Perikaryon an und verlief einen kurzen Abschnitt geradlinig. Dann war eine Varikosität auszumachen und im Folgenden verlief der Neurit geradlinig in eine andere Richtung (siehe Abbildung 12).

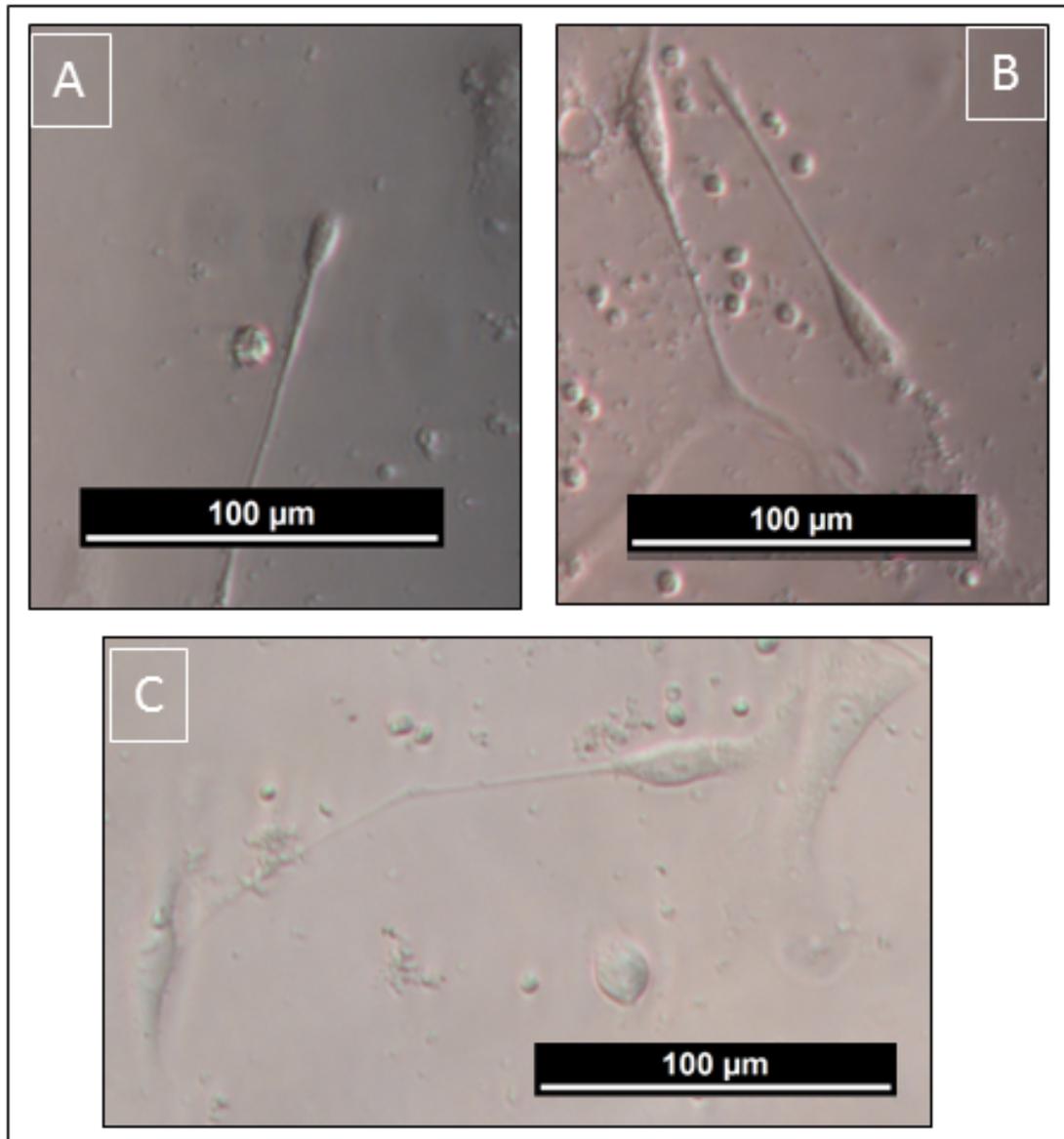


Abbildung 12: In der Gruppe der unipolaren Neurone sind drei verschiedene Formen von Perikarya vorhanden. Prädominierend sind Neurone mit spindelförmigem Zellkörper (A). Ebenfalls häufig die rund-ovale (B) und selten eine pyramidenförmige Zellkörperform (C). Ein typischer Neurit unipolarer Neurone ist in Abb. C zu sehen.

Die Somata bipolarer ICN hatten entweder einen spindelförmigen Umriss (siehe Abbildung 13A) oder einen oval-elliptischen Somaumriss (siehe Abbildung 13B). Pyramidenförmige Somata waren kaum in der Kultur vorhanden (siehe Abbildung 13C). Insgesamt war das Zellsoma bipolarer Neurone schmal und ging jeweils in einem spitzen Winkel in die zwei Neuriten über. Der Zellkern zeichnete sich im Zytoplasma, mittig des Perikaryons, ab (siehe Abbildung 13C).

Ergebnisse

Meist verliefen die Neuriten von bipolaren Zellen linear von den zwei Polen des Zellkörpers in entgegengesetzte Richtungen. Selten hatten bipolare Neurone einen fließend gebogenen Verlauf (siehe Abbildung 13).

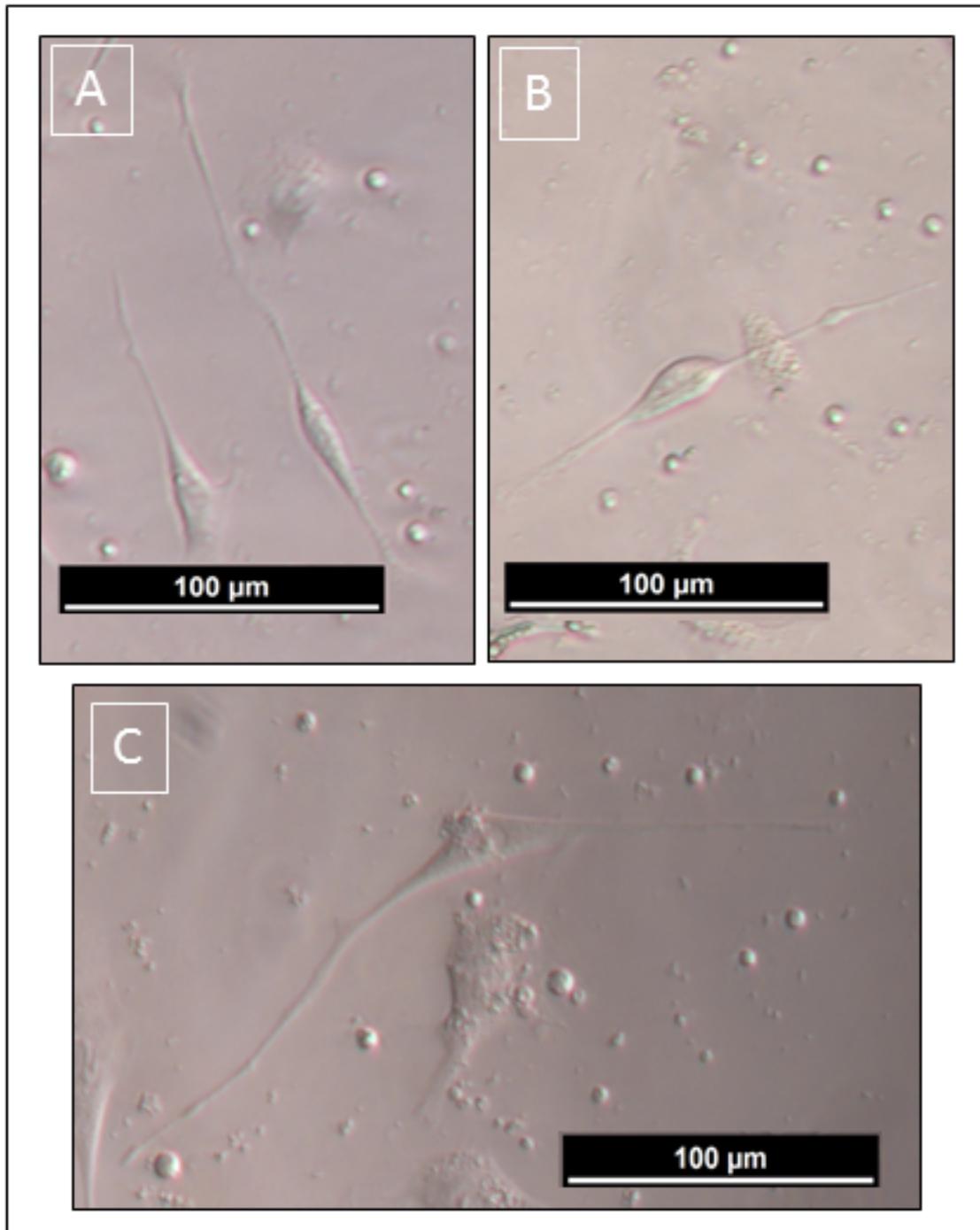


Abbildung 13: Bipolare Neurone zeigen drei Formen der Perikarya. Die Mehrzahl hat spindelförmige (A) und oval-elliptische (B) Umrisse. Selten sind auch pyramidenförmige Perikarya (C) zu sehen.

Multipolare Neurone hatten einen kleinen Zellkörper, dessen Form je nach Anzahl der Neuriten variabel war. Meist wirkten sie pyramiden- oder sternförmig (siehe Abbildung 14). Der Zellkern konnte hier nicht vom Zytoplasma abgegrenzt werden.

Der Ursprungskegel des Neuriten lag im Perikaryon und war vergleichsweise breiter als in den bi- und unipolaren Zellen. Multipolare Zellen hatten kurze Neuriten, die sich von der Zelle linear in verschiedene Richtungen ausbreiteten.

Multipolare Neurone hatten drei oder mehr Fortsätze, die sich teils wiederum verzweigten. Die Fortsätze multipolarer Zellen hatten eine ähnliche Länge.

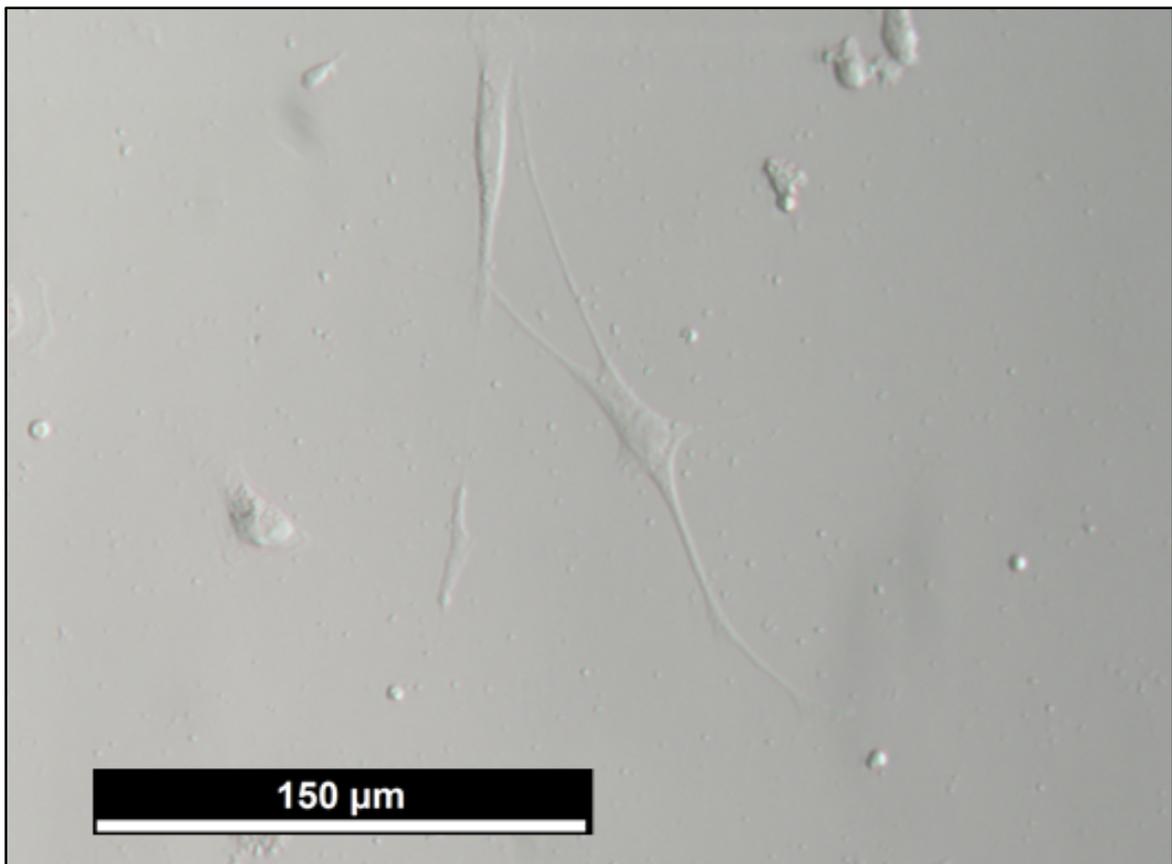


Abbildung 14: Die Perikarya der multipolaren Neurone variieren sehr in der Anzahl ihrer Neuriten. Je nach Anzahl verändert sich auch der Zellkörperumriss. Exemplarisch zu sehen ist ein multipolares Neuron mit drei Neuriten.

4.3 Phänotypische Klassifikation der ICN

Um die Zellen einheitlich klassifizieren zu können, wurden ICN anhand der Anzahl der Neuriten in die drei Zellgruppen „unipolar“, „bipolar“ und „multipolar“ eingeteilt (siehe 3.2.4). Die drei Klassen sind repräsentativ in Abbildung 15 dargestellt. Das

relative und absolute Vorkommen verschiedener Zellklassen wird in Tabelle 7 zusammengefasst.

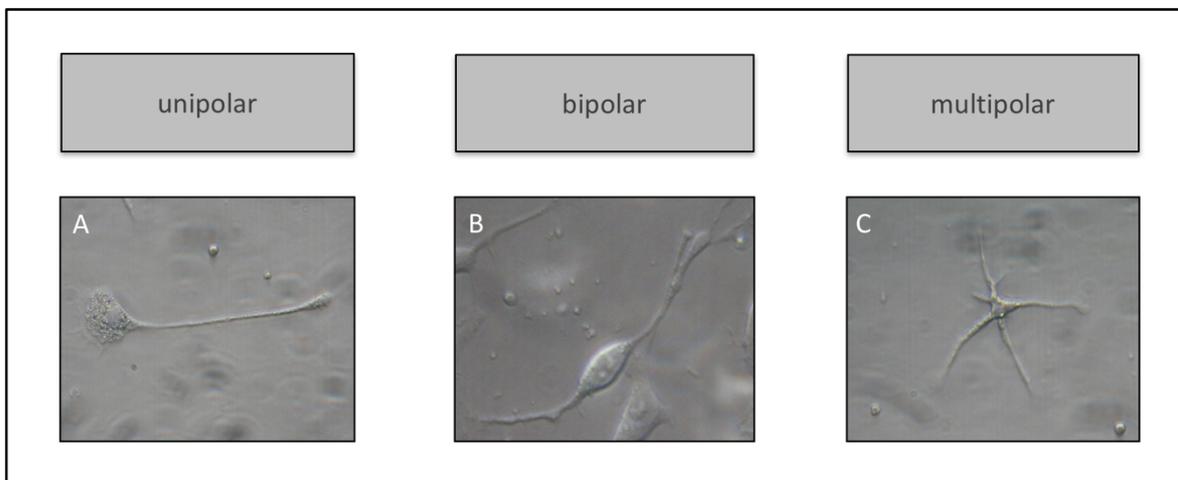


Abbildung 15: Anhand der Anzahl der Neuriten erfolgte eine phänotypische Einteilung in die drei Zellklassen unipolare (A), bipolare (B) und multipolare Neurone (C).

Tabelle 7: Relatives und absolutes Vorkommen der verschiedenen Zellklassen abhängig von der Kulturdauer. Zusätzlich ist die Gesamtzell- und Kulturzahl angegeben.

	unipolar		bipolar		multipolar		Zellen gesamt	Anzahl Kulturen
48 h	121	54,02 %	56	25,00 %	47	20,98 %	224	12
72 h	126	42,86 %	93	31,63 %	75	25,51 %	294	12
96 h	198	53,37 %	75	20,22 %	98	26,42 %	371	12

4.4 Wachstum der Neuriten im Zeitverlauf

445 unipolare Neurone wurden im Zeitverlauf ausgemessen (siehe Abbildung 16). Hierbei wurde nicht das Wachstum derselben Neurone beobachtet, sondern die durchschnittliche Länge der Neuriten in verschiedenen Kulturen ausgemessen.

Keine Zelle hatte zum Zeitpunkt 0 h Neuriten ausgebildet. Nach 48 h wurde bei 121 Neuriten im Mittel eine Länge von $59,23 \pm 2,52 \mu\text{m}$ gemessen. Zum Zeitpunkt 72 h waren die Neuriten über die Zeit gesehen am längsten. 126 Neuriten waren im Schnitt $81,94 \pm 3,401 \mu\text{m}$ lang. Die mittlere Länge der Neuriten von 198 unipolaren Neuronen lag nach 96 h Inkubation bei $73,3 \pm 2,502 \mu\text{m}$.

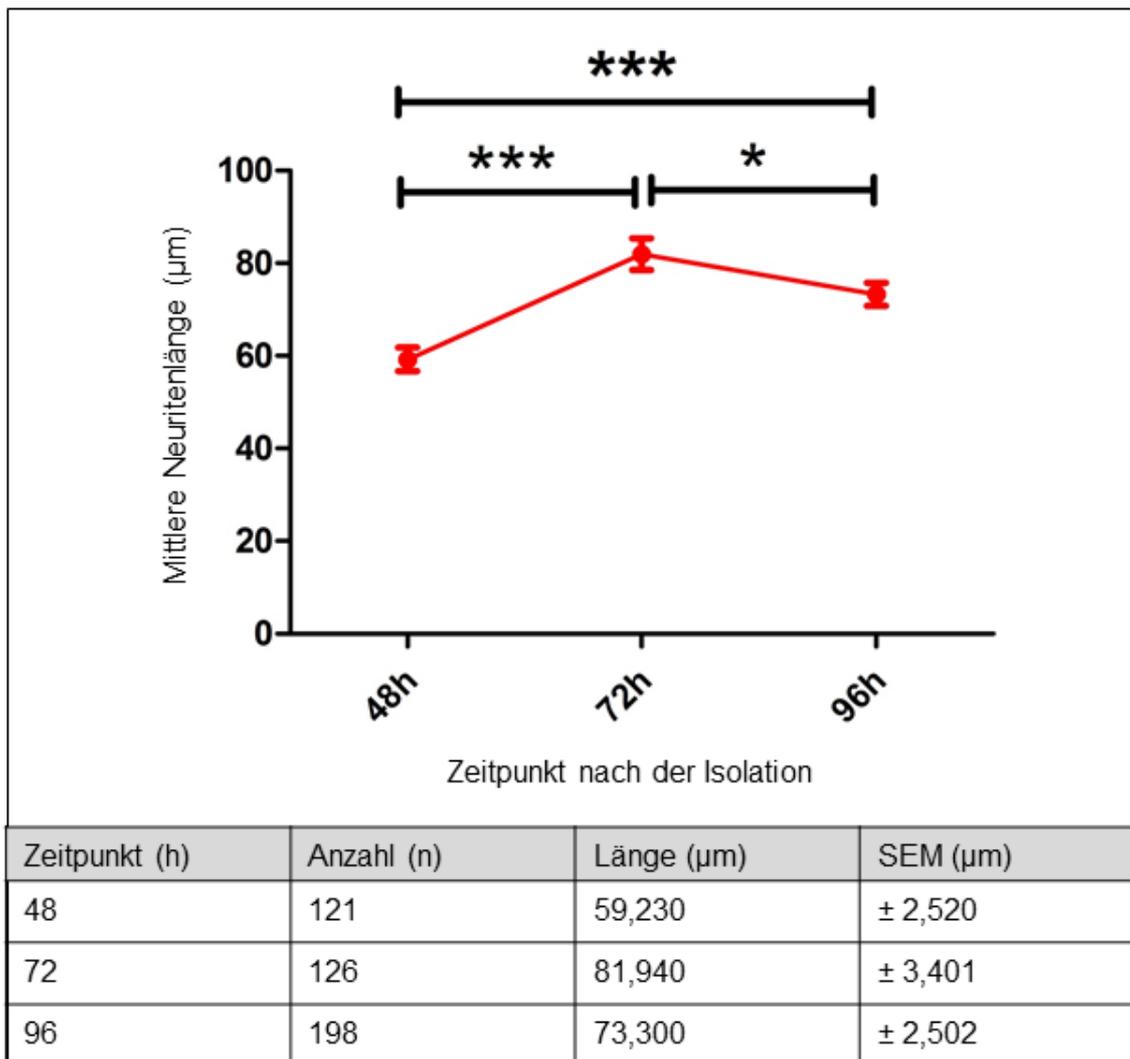


Abbildung 16: Dargestellt ist der Wachstumsverlauf der Neuriten von unipolaren Neuronen in einer Monokultur. Die Auswertung der Neuritenlängen erfolgte zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Zellen, den Mittelwert der Neuritenlängen und den Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt. Hervorzuheben ist das signifikante stetige Längenwachstum nach Isolation bis zum Zeitpunkt 72 h.

224 bipolare Neuronen wurden im Zeitverlauf ausgewertet (siehe Abbildung 17). Nach 48 h Inkubationszeit hatten 112 Neuriten von insgesamt 56 bipolaren Neuronen eine mittlere Länge von $49,97 \pm 2,074 \mu\text{m}$. Zum Zeitpunkt 72 h erreichten 186 Neuriten bipolarer Zellen ihre maximale mittlere Länge von $58,73 \pm 2,133 \mu\text{m}$. Nach weiteren 24 h, zum Zeitpunkt 96 h nach Isolation, wurde in 150 Neuriten bipolarer Neurone eine mittlere Länge von $44,49 \pm 2,068 \mu\text{m}$ ermittelt.

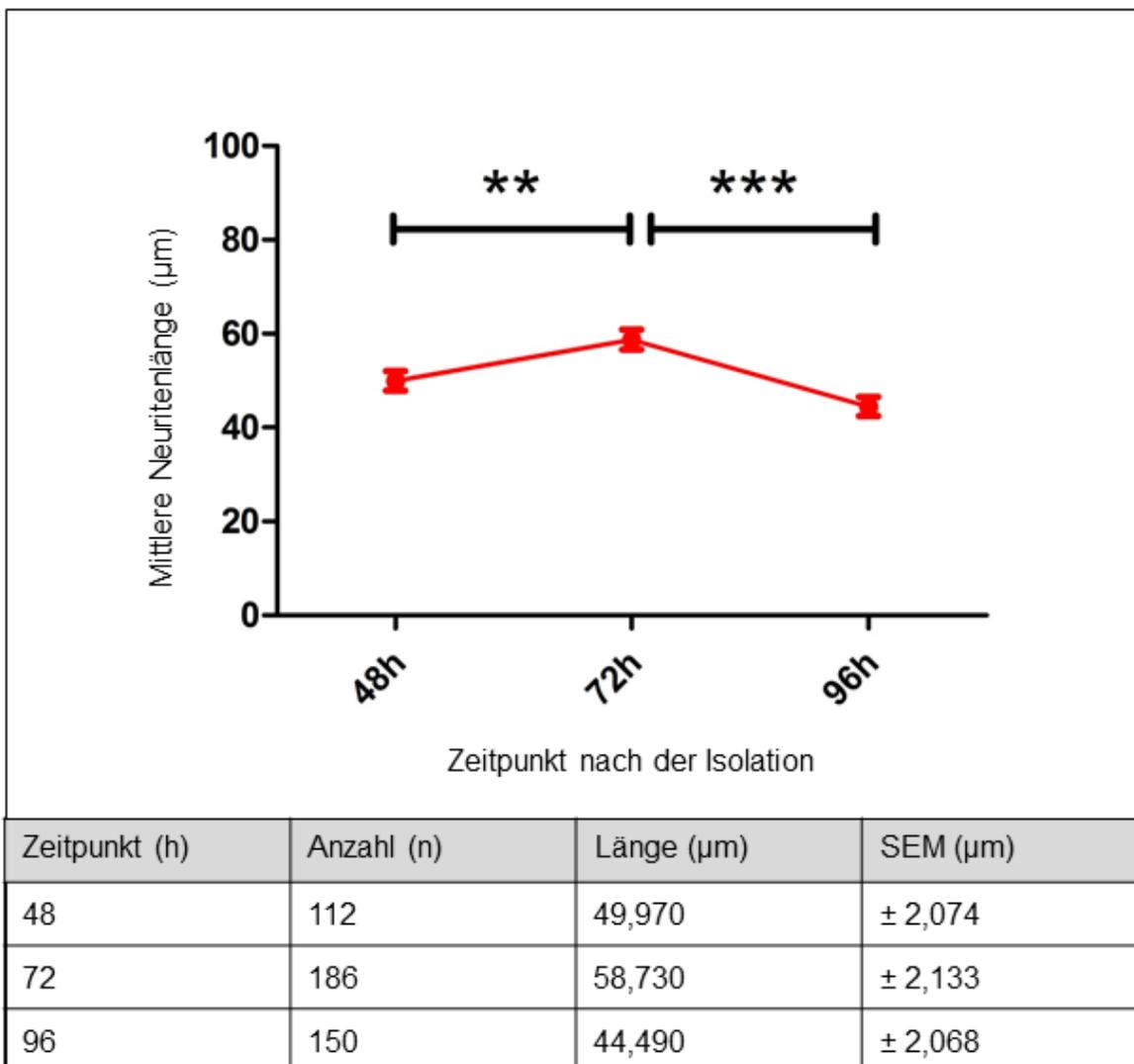


Abbildung 17: Übersichtsdarstellung des Neuritenwachstums bipolarer intrakardialer Neurone in Monokultur. Die Auswertung der Neuritenlängen erfolgte zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. Tabellarisch aufgelistet ist die Anzahl der Zellen, der Mittelwert der Neuritenlängen und der Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt. Über die ersten 72 h in Kultur ist ein signifikantes stetiges Wachstum der Neuriten zu beobachten.

Multipolare Neurone haben drei oder mehr Fortsätze, wobei insgesamt die Neuriten von 220 multipolaren Neuronen ausgewertet wurden (siehe Abbildung 18). 121 ausgemessene Neuriten hatten nach 48 h eine mittlere Länge von $36,2 \pm 1,733 \mu\text{m}$. In multipolaren Neuriten änderte sich die Länge kaum. Zum Zeitpunkt 72 h wurden 126 Neuriten auf die Länge $35,920 \pm 1,26 \mu\text{m}$ gemittelt und weitere 24 h später, zum Zeitpunkt 96 h, waren 198 Neuriten im Schnitt $32,81 \pm 1,145 \mu\text{m}$ lang.

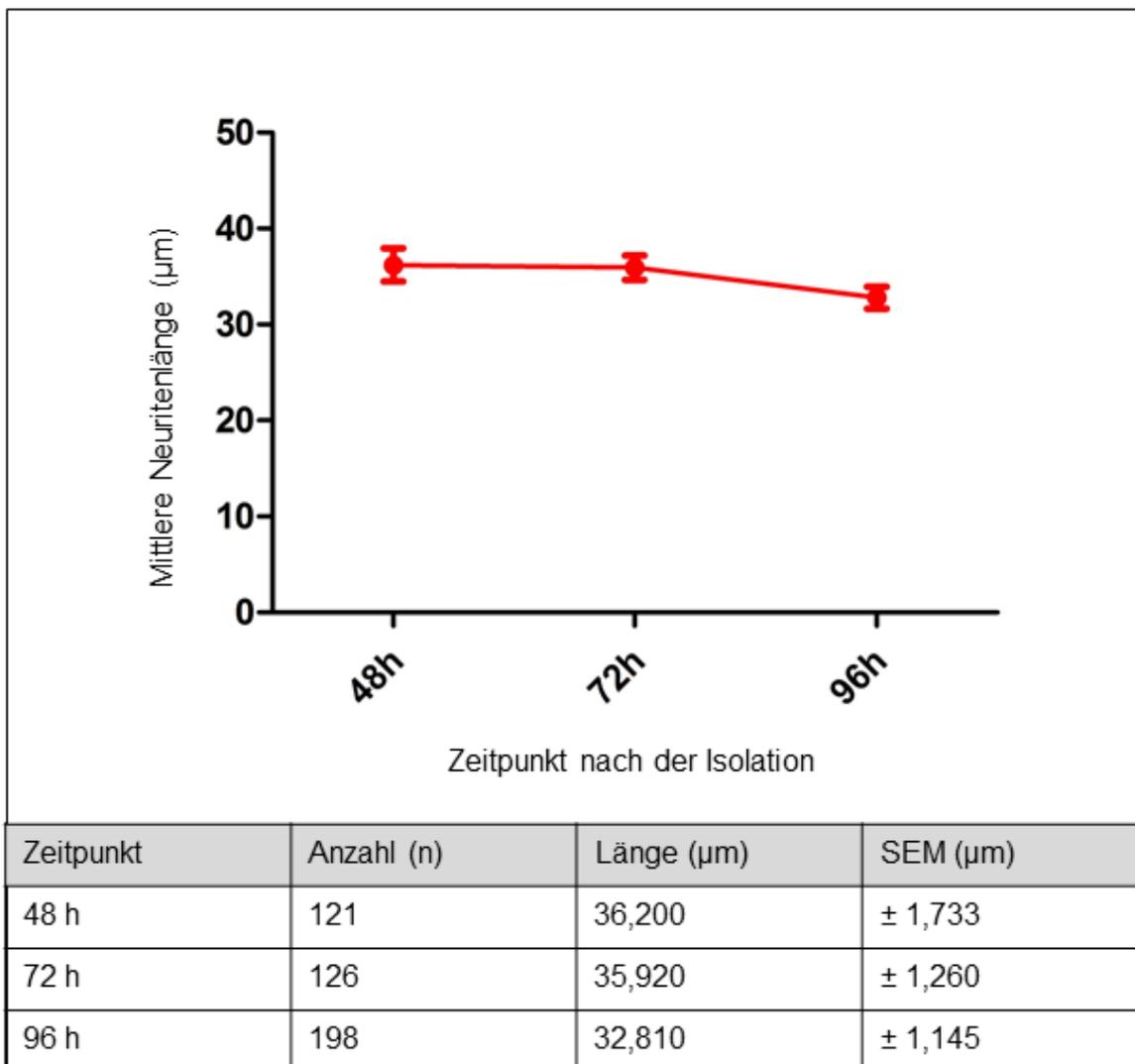


Abbildung 18: Dargestellt ist der Wachstumsverlauf der Neuriten von multipolaren intrakardialen Neuronen in Monokultur. Ausgewertet wurden die Neuritenlängen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. In der Tabelle wird die Anzahl der Zellen, der Mittelwert der Neuritenlängen und der Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt gezeigt. Bis zum Zeitpunkt 48 h wachsen die Fortsätze aus. Dann erfolgt keine signifikante Längenänderung.

4.5 Etablierung einer Kokultur aus Kardiomyozyten und ICN

Die gemeinsame Kultivierung von Kardiomyozyten und ICN wurde 48 h durchgeführt. 24 h und 48 h nach dem gemeinsamen Austeilen der beiden Kulturen wurden Fotos gemacht (siehe Abbildung 19). Beide Zellpopulationen wurden durch mikroskopische Beurteilung als vital eingeschätzt. Die atrialen HL-1-Kardiomyozyten zeigten nach 48 h eine dichte Besiedlung.

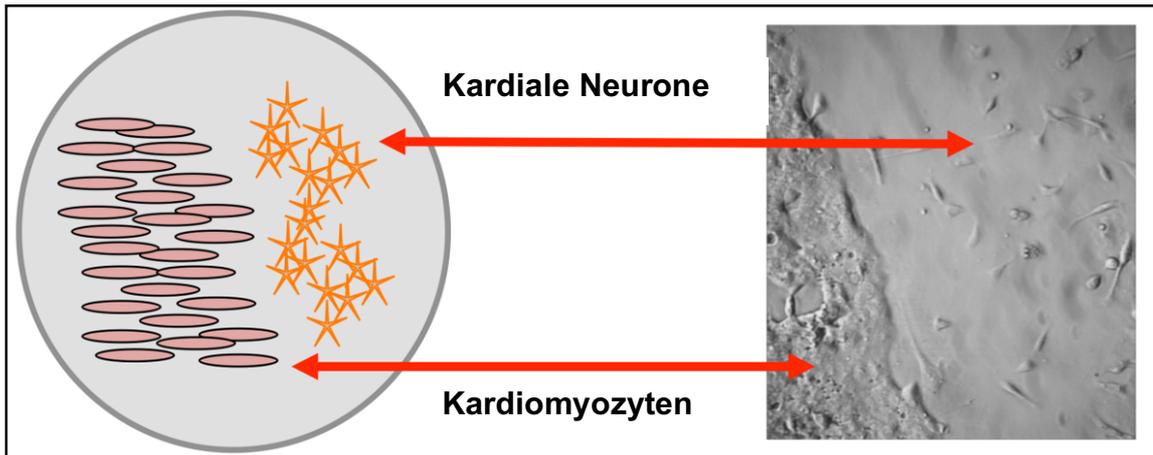


Abbildung 19: Eine Kokultivierung von atrialen HL-1-Kardiomyozyten und intrakardialen Neuronen (ICN) wurde 48 h durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen in getrennten Monokulturen vorkultiviert, damit sie anschließend in einer Kokultur wachsen konnten. Nach 48 h wurden die Kulturen mit Hilfe von Fotos dokumentiert und mikroskopisch als vital bewertet. Diese Abbildung stellt links schematisch, sowie rechts auf einem Foto dar, dass die Kultur linksseitig mit HL-1-Kardiomyozyten besiedelt war, während auf der rechten Seite ICN wuchsen.

4.5.1 Messung von Kanalströmen an HL-1-Kardiomyozyten mit der *Patch-Clamp*-Methode

Zum Nachweis der Aktivität von HL-1-Kardiomyozyten in Monokultur wurden Kanalströme mit der *Patch-Clamp*-Methode abgeleitet. Im Verlauf mehrerer Messungen konnte ein schneller spannungsabhängiger Kationen-Einstrom in die Zelle gemessen werden. Der Strom wurde bei einer Depolarisation von -140 mV auf -50 mV ausgelöst. Das Strommaximum von 2 nA wurde bei einer Spannung von -30 mV erreicht. Wie in Abschnitt 5.5 diskutiert handelt es sich hierbei am ehesten um einen Natriumkanal. In Abbildung 20 ist sowohl das gemessene Stromprofil als auch die Strom-Spannungs-Beziehung einer Ionenkanalmessung an einer HL-1-Kardiomyozyte abgebildet. Die Messkurven sind exemplarisch in Abbildung 20 dargestellt.

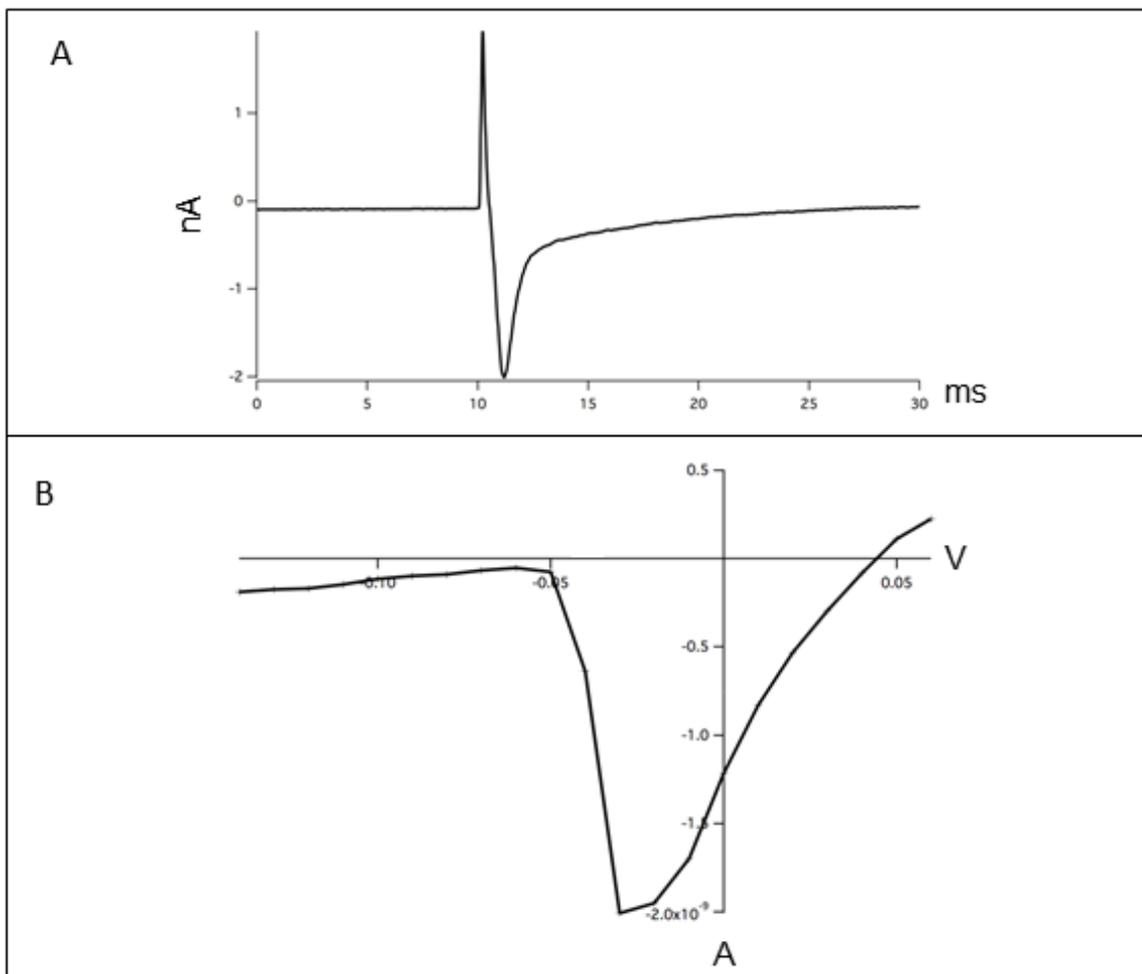


Abbildung 20: Zum Vitalitätsnachweis der HL-1-Kardiomyozyten wurden Stromänderungen über die Zellwand, mittels *Whole-Cell-Current-Clamp*-Technik gemessen. (A) Änderung des Kanalstroms über die Zeit der durch Depolarisation der Zellwand resultiert. Auf der X-Achse ist die Zeit in ms, auf der Y-Achse die Stromänderung in nA gezeigt. Nach initial schneller Stromänderung folgt eine langsame Rückbildung des Stroms zum Ausgangsniveau. (B) Strom-Spannungskurve des in A dargestellten Stroms. Auf der X-Achse ist die Spannung in V dargestellt, auf der Y-Achse wird die Änderung des Stroms in A gezeigt. Bei einer negativen Spannung von -50 mV erfolgt ein schneller Strom, der bei kontinuierlicher Hyperpolarisation ab -30 mV wieder abnimmt. Die dargestellten Messungen entstammen den eigenen Aufzeichnungen.

4.5.2 Messung eines Aktionspotentials an HL-1-Kardiomyozyten mit der *Patch-Clamp*-Methode

Ausgelöste Spannungsänderung an der Zellmembran der atrialen HL-1-Kardiomyozyten führten reproduzierbar zum Auslösen eines Aktionspotentials. Exemplarisch ist in Abbildung 21 ein gemessenes Aktionspotential dargestellt. Durch das Anlegen von Strömen zwischen 0 und 1000 pA in 50 pA-Schritten wurde gezeigt, dass sich die Spannung über die

Ergebnisse

Zellmembran charakteristisch ändert. Die Auslösbarkeit des Aktionspotentials bestätigt die Vitalität der Zelle.

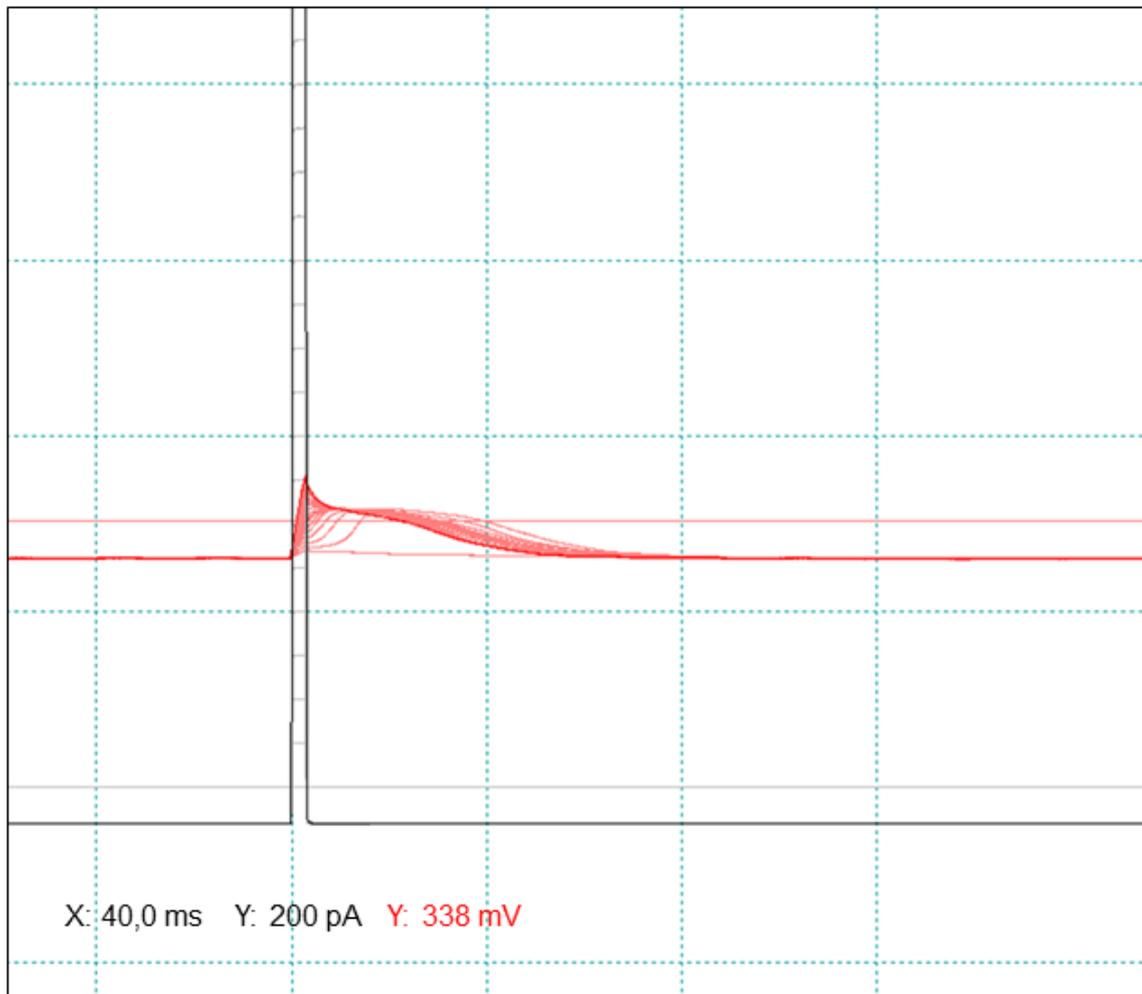


Abbildung 21: Spannungsänderung während eines Aktionspotentials, gemessen an einer atrialen HL-1-Kardiomyozyte mittels *Whole-Cell-Current-Clamp*-Technik. Der Nachweis eines Aktionspotentials beweist die Vitalität der Zelle.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass (1) ICN reproduzierbar isoliert und anschließend in Monokultur bis 96 h kultiviert werden können. (2) ICN konnten morphologisch anhand der Anzahl ihrer Ausläufer in die drei Zellklassen uni-, bi- und multipolar eingeteilt werden. Zudem hatten die Neuriten unipolarer, bipolarer und multipolarer ICN im Zeitverlauf ein charakteristisches Wachstum, welches sich folgendermaßen beschreiben lässt: Die Subgruppen unipolare ICN und bipolare ICN zeigten bis zum 72 h-Zeitpunkt ein stetiges Wachstum. Zum 96 h-Punkt war die Neuritenlänge im Mittel wieder kürzer. Multipolare Neurone zeigten bis zum 72 h-Zeitpunkt einen Neuritenauswuchs und zeigten an den nachfolgenden Zeitpunkten eine konstante Neuritenlänge. (3) Es konnte auch eine Kokultur mit atrialen Kardiomyozyten realisiert werden. Zusätzlich konnten Kanalströme und Aktionspotentiale von HL-1-Kardiomyozyten abgeleitet werden. Ob die ICN untereinander ein Netzwerk ausbildeten, konnte nicht beurteilt werden, da die Dichte der Neurone dazu nicht ausreichte. Vereinzelt mögliche Synapsenbildung konnten jedoch beobachtet werden.

5.1 Isolation und Kultivierung von ICN

5.1.1 Lokalisation kardialer Ganglien im epikardialen atrialen Fettgewebe

Auf Grund mehrerer Kriterien konnte festgelegt werden, dass es sich bei den hier isolierten Zellen um Neurone des intrinsischen kardialen Systems handelt. Zu diesen Kriterien gehörten die anatomische Lokalisation, die Morphologie der Zellen und die Isolations- und Kulturbedingungen.

Lokal vernetzende Nervenzellen bei der Maus wurden in den vergangenen Jahren als integrative Komponente der Herzinnervation genauer untersucht (Pauza et al. 2013). Jüngste Studien ergaben, dass das Netzwerk kardialer Nervenfasern weitaus komplexer organisiert ist, als zunächst angenommen (Richardson et al. 2003, Rysevaite et al. 2011b). Für die vorliegende Arbeit ist besonders die anatomische Beziehung von Bedeutung. Hierzu gehört, dass lokal vernetzte ICN einen Nervenzellkomplex zwischen dem linken Atrium und der Gefäßwurzel der

rechten Pulmonalvenen mit einem Nervenzellkomplex an der Gefäßwurzel der rechten kranialen Vena cava verbinden (Pauza et al. 2013).

Mit diesem Wissen wurden ICN bereits erfolgreich von Verkerk et al. und Hoard et al. isoliert (Hoard et al. 2007, Verkerk et al. 2012). Entsprechend wurde in der vorliegenden Studie das Protokoll modifiziert und weiterentwickelt.

5.1.2 Positive Einflüsse auf das Überleben von ICN in Kultur

Primär isolierte ICN wurden in dieser Arbeit über einen Zeitraum von 96 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen verworfen, da eine Auswertung auf Grund von Fremdzellen in der Kultur ab dann nicht mehr möglich war. Die Möglichkeit der verlängerten Kultivierung im Vergleich zu bereits bekannten Isolationsprotokollen beruhte auf verschiedenen Faktoren die im Folgenden beschrieben werden.

Das Kulturmedium in den hier beschriebenen Zellkulturversuchen war eine Modifikation des Claycomb-Mediums, welches üblicherweise für atriale HL-1-Kardiomyozyten genutzt wird (siehe 3.1.5). Da dieses Medium eine längere Überlebenszeit der Zellen ermöglichte als bereits bekannt, lässt sich ableiten, dass Neurozyten von ähnlichen Bedingungen und Supplementen profitieren wie atriale HL-1-Kardiomyozyten. Die Grundlage des hier verwendeten Claycomb-Medium ist *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, supplementiert mit Aminosäuren, Proteinen, Albumin, L-Glutamin und Ascorbinsäure sowie mit Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like growth factor* und *Epidermal growth factor* (White et al. 2004). Auch in den bereits von Hoard et al. durchgeführten Versuchen zur Kultivierung von ICN wurde ein mit HEPES supplementiertes *Eagle-Medium* als Grundlage für das Kulturmedium eingesetzt. Dieses wurde ebenfalls mit Albumin, Glutamin, und weiteren Inhaltsstoffen ergänzt (Hoard et al. 2007). Die Ähnlichkeit der Kulturmedien lässt den Schluss zu, dass das *Eagle-Medium* eine sinnvolle Grundlage für ICN-Kulturen darstellt (Schultheiss et al. 2013). Außerdem wird deutlich, dass die im Claycomb-Medium vorhandenen Zusatzstoffe einen Einfluss auf das Zellwachstum haben könnten. Hier sollten besonders die vorhandenen Wachstumsfaktoren diskutiert werden.

Neben ICN befanden sich auch nicht-neuronale Zellen in den Kulturen. Diese wurden rein morphologisch abgegrenzt. Hierbei besteht die Hypothese, dass kultivierte nicht-neuronale Zellen einen positiven Einfluss auf das Wachstum der ICN haben (Hoard et al. 2007).

Wachstumsfaktoren neuronaler Zellen werden als Neurotrophine bezeichnet. Sie regulieren Überleben, Wachstum und Apoptose von Neuronen (Shooter 2001, Khan und Smith 2015). Zur Gruppe der Neurotrophine gehören die folgenden vier strukturell und funktionell ähnlichen Proteine: *Nerve growth factor* (NGF), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3) und *Neurotrophin-4* (NT-4). In extrakardialen sympathischen und parasympathischen Neurozyten konnte gezeigt werden, dass NGF ein Zellwachstum induziert (Collins und Dawson 1983). Nicht nur die Morphologie von Perikarya und Neuriten (Ruit et al. 1990), sondern auch das Aussprosseln der Neuriten in Anzahl und Länge (Ebendal und Jacobson 1977) werden durch NGF gesteigert (Hasan 2013).

Sowohl Neurozyten als auch Kardiomyozyten könnten in Kultur NGF synthetisieren. Die Literatur zeigt, dass primäre Kardiomyozyten unter anderem durch eine Endothelin-1-Stimulation vermehrt NGF ausschütten (Ieda et al. 2004). In den hier durchgeführten Versuchen zur Kokultivierung wurden HL-1-Kardiomyozyten kultiviert. Eine Auswertung der Neuritenlängen in Kokultur hat in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht stattgefunden. Der Einfluss von Endothelin-1 auf die Neuritenlänge in einer neuro-myozytären Kokultur könnte in weiteren Studien evaluiert werden und so Informationen über eine Interaktion geben.

Es wurde zudem beschrieben, dass sich parasympathische und sympathische Neurone gegenseitig zur NGF Produktion stimulieren (Hasan und Smith 2000). Durch autokrine Neurotrophinsekretion stimulieren sich Neurone gegenseitig zum Wachstum und die Möglichkeit der Ausbildung eines Neuronennetzwerks ergibt sich schneller (McWilliams et al. 2015). Da die Zelldichte in den hier durchgeführten Versuchen noch sehr gering war, konnte keine gegenseitige Beeinflussung ermittelt werden. In weiteren Studien könnte daher evaluiert werden, ob ICN bei Erhöhung der Zellzahl in Kultur eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit ihrer Neuriten zeigen.

Für Fibroblasten ist eine Expression von NGF, NT-3, NT-4 und BDNF beschrieben. Aus der Literatur wird deutlich, dass ICN in gemeinsamer Kultur mit Fibroblasten eine deutliche Wachstumsinduktion der Neuriten erfahren (Mias et al. 2013). Da der positive Einfluss auf das Neuritenwachstum von Fibroblasten und Kardiomyozyten in der Literatur hinreichend beschrieben ist (Ieda et al. 2004, Mias et al. 2013), ist davon auszugehen, dass Fibroblasten oder Kardiomyozyten auch in den hier vorliegenden Kulturen gewachsen sind. Hierdurch könnte das, im Vergleich zu vorherigen Versuchen, verlängerte Überleben der Zellen in-vitro erklärt werden.

5.2 Beurteilung der Morphologie

Die Auswertung nach morphologischen Kriterien diente der Zuordnung der Zellen und erfolgte zu den drei Zeitpunkten nach 48 h, 72 h und 96 h in Kultur. Im Folgenden wird ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der morphologischen Charakterisierung in dieser Arbeit mit den bereits bekannten morphologischen Kriterien bei primären ICN aus Meerschweinchen und Ratten gezogen.

5.2.1 Morphologie muriner ICN im Vergleich mit weiteren Spezies

Die Perikarya der Zellen in dieser Arbeit stellten sich als spindelförmige, ovale und pyramidenförmige Zellkörper dar. Ihre Oberfläche war glatt und erhaben. Die Umrisse waren scharf abgrenzbar und meist war der Nukleus im Soma zu erkennen. Hauptkriterium war das Vorhandensein von mindestens einem Neuriten. Aus Vorarbeiten weiß man, dass diese Morphologie den ICN in Kleintieren entspricht.

In der Literatur beschriebene primär isolierte ICN des Meerschweinchens zeigen morphologisch kleine, runde Somata mit wenigen Fortsätzen (Pauza et al. 1997). Es werden Neurone mit einem, zwei oder mehr als zwei Neuriten beschrieben und dementsprechend als unipolar, bipolar und multipolar klassifiziert (Horackova et al. 1996). Im Verlauf der Neuriten zeigen sich Varikositäten. Bipolare Neurone machen den größten Anteil in der Kultur aus. Ihre Neuriten haben ihren Ursprung an den beiden Zellpolen und können mehrfach verzweigt sein (Horackova et al. 1996).

Auch bei Ratten fanden bereits intensive Studien zur Morphologie der ICN statt. Zellsomata formen einen ovalen bis runden Umriss. Der Nukleus der Zelle sowie prominente Nukleoli sind im Mikroskop sichtbar (Her et al. 2000). Vom Soma entspringen ein, zwei oder mehr als zwei Neuriten. Auch hier werden die Zellen anhand der Anzahl der Ausläufer als unipolar, bipolar und multipolar klassifiziert (Richardson et al. 2003). Unipolare Neurone machen den größten Anteil der Kultur aus und es werden unipolare ICN mit glattem oder mit rauem Soma und Einkerbungen und Furchen unterschieden (Pauza et al. 1997). Bei Neuronen von Ratten sowie von Meerschweinchen definieren sich bipolare ICN durch das Ansetzen der Neuriten an den zwei Polen des Somas. Multipolare Zellen haben eine glatte Zelloberfläche und die Neuriten verlaufen variabel in viele Richtungen (Pauza et al. 1997, Her et al. 2000).

Die vorgefundenen morphologischen Charakteristika der Primärzellen in dieser Arbeit stimmen hinreichend mit den in der Literatur beschriebenen Kriterien von bereits kultivierten ICN überein.

5.2.2 Morphologische Abgrenzung von kardialen Fibroblasten in Kultur

Die vier zellulären Hauptkomponenten des kardialen Gewebes sind Myozyten, kardiale Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Camelliti et al. 2005a, Souders et al. 2009). Die Verteilung zwischen myozytären und nicht-myozytären Zellen variiert innerhalb der Spezies. Im menschlichen Herzen ist eine Verteilung von 30 % myozytären und 70 % nicht-myozytären Zellen vorhanden. Bei der Maus sind es 55 % myozytäre und 45 % nicht-myozytäre Zellen. Der überwiegende Teil der nicht-myozytären Zellen sind die kardialen Fibroblasten (Banerjee et al. 2007).

Kardiale Fibroblasten haben verschiedene Funktionen und sind weitestgehend über ihre morphologischen Charakteristika definiert (Baudino et al. 2006). Der Zellkörper der Fibroblasten ist flach und spindelförmig. Als einzige Zellpopulation im Herzen haben Fibroblasten keine Basalmembran (Souders et al. 2009). Morphologisch bilden Fibroblasten zwei typische Formen aus. Ihre Zellkörper sind entweder langgezogen und bilden bipolar Auswüchse aus oder stellen sich als Zellkörper mit multiplen Ausläufern dar. Zusätzlich bilden Fibroblasten meistens

enge Zell-Zell-Kontakte zu weiteren Fibroblasten aus (Camelliti et al. 2005b, Baxter et al. 2008). Die physiologische Proliferationsrate der Fibroblasten ist sehr hoch (Camelliti et al. 2005a).

In der vorliegenden Arbeit konnten ICN anhand morphologischer Charakteristika von Fibroblasten abgegrenzt werden (siehe 5.2.1). Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung von Fibroblasten wäre mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbung z.B. durch Vimentin, einen Fibroblastenmarker, möglich (Xin et al. 2012).

5.3 Ausbildung von Phänotypen in murinen ICN

Die Klassifizierung in die drei Gruppen unipolar, bipolar und multipolar erfolgte anhand der Anzahl der Neuriten. Eine ausführliche Klassifizierung wurde bereits bei zentralen Neuronen der Ratte ausgearbeitet (Kriegstein und Dichter 1983). Da diese Zellen sich aber weitläufig verzweigten, vereinfachten wir das Schema und beschränkten uns auf die drei Zellklassen: unipolar, bipolar und multipolar. In der Literatur beschriebene ICN aus anderen Spezies, die über mehrere Wochen kultiviert wurden, werden jedoch in mehr als drei phänotypische Gruppen eingeteilt (Horackova et al. 1996). Somit besteht die Möglichkeit, dass sich bei längerer Kultivierung der ICN weitere Verzweigungen der Neuriten ausbilden.

Die Klassifikation der kardialen Neurone, welche von Hoard et al. beschrieben wurde, zeigt eine Verteilung, deren Schwerpunkt mit 73 % auf unipolaren Neuronen liegt (Hoard et al. 2007). Da es sich hier um eine nur 3-tägige Kultur handelt, lässt sich vermuten, dass der unterschiedliche Zeitpunkt eine Rolle spielt. Verglichen mit der von Hoard et al. beschriebenen 3-tägigen ICN-Kultur waren unipolare Zellen in den vorliegenden Versuchen nach 72 h mit einem Anteil von 42,86 % vertreten. Zusätzlich wurden hierbei nicht-neuronale Zellen mitkultiviert, sodass deren Wachstumsfaktoren ICN zum vermehrten Auswachsen von Neuriten stimuliert haben könnten. Dadurch würde sich der relative Anteil unipolarer und bipolarer ICN zu einem größeren Anteil bipolaren und multipolaren ICN verschieben (Hoyle et al. 1993).

Einen Zusammenhang zwischen Morphologie von Zellen und Neuriten mit der Funktion der Zellen darzustellen war nicht Ziel dieser Arbeit. Jedoch ist bekannt, dass die Genexpression in Neuronen bestimmt, wie sich Morphologie, Dynamik

und Vernetzung der Fortsätze ausbilden (De Arruda et al. 2015). Zusätzlich stimulieren verschiedene Proteine und Neurotrophine das weitere Wachstumsverhalten (Scott und Luo 2001). In den hier durchgeführten Versuchen wurde keine Genanalyse der Zellen gemacht. Jedoch wäre es interessant zu wissen, ob wachstumsbestimmende Gene in ICN aktiv sind bzw. Proteine synthetisiert werden, welche das Wachstumsverhalten bestimmen.

Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang auch der Wachstumsprozess der Fortsätze von Neuronen. In dieser Studie wurde bewusst von Neuriten gesprochen, da keine Differenzierung zwischen Dendriten und Axonen stattfinden konnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ausbildung der Axone zentraler Neurone in-vitro in fünf Schritte unterteilt wird. Hierbei wird durch komplexe intrinsische Prozesse in der Zelle zuerst der Auswuchs von Neuriten initiiert. Erst nach sieben bis zehn Tagen kann differenziert werden, welche Neuriten als Axone und welche als Dendriten agieren werden (Dotti et al. 1988, Takano et al. 2015). Da die vorliegenden Kulturen nur 96 h ausgewertet wurden, konnte eine genauere funktionelle Einteilung in Axone und Dendriten nicht stattfinden.

Besonders bei zentralen Neuronen besteht die Hypothese, dass im Rahmen der Ausdifferenzierung des Phänotyps das Neuron in-vitro den gleichen Subtyp entwickelt den es auch in-vivo hatte. Dieser wird in zentralen Neuronen meist bereits im Migrationsprozess der Zelle festgelegt (Barnes et al. 2008). Studien ergeben auch, dass weitere unbekannte externe Faktoren einen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps haben könnten (Barnes und Polleux 2009). Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die hier in-vitro vorgefundenen Phänotypen möglicherweise die in-vivo Situation am murinen Herzen widerspiegelt. In folgenden Studien sollte die Möglichkeit einer längeren Kultivierung in Betracht gezogen werden, um genauere Aussagen über die Einteilung zwischen Axon und Dendriten treffen zu können.

5.4 Wachstumsverhalten der ICN in-vitro über die Zeit

Ein Neuritenwachstum fand bei unipolaren und bipolaren Neuronen bis zum Zeitpunkt 72 h nach Isolation statt. Nach dem 72 h-Zeitpunkt ging die Wachstumsrate bis zum 96 h-Zeitpunkt zurück. Bei unipolaren Neuronen war die

Gesamtänderung zwischen der 48 h-Auswertung und der 96 h-Auswertung trotzdem positiv, bei bipolaren Neuronen jedoch negativ. In multipolaren Zellen wurde zu allen drei ausgewerteten Zeitpunkten eine annähernd gleiche Neuritenlänge gemessen.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass kultivierte Neurone im Zeitverlauf ihre Längen ändern und in Kultur wachsen (Hoard et al. 2007). Dies kann in der vorliegenden Studie bis zum 72 h-Zeitpunkt nachvollzogen werden. Anschließend geht das Neuritenwachstum wieder zurück. Eine eindeutige Erklärung hierfür ist bisweilen nicht gefunden worden.

Die Kulturplatte wurde vor dem Aussäen mit den Aminosäuren Lysin und Ornithin beschichtet. Insbesondere durch Lysin wird bei peripheren Neuronen eine Induktion des Neuritenwachstums beschrieben (Eagle 1959, He und Baas 2003). Da zu den Auswertungszeitpunkten auch das Medium gewechselt wurde, wird der Anteil der Vorbeschichtung stetig weniger. Hierdurch fiel möglicherweise das Neuritenwachstum nach jedem Medienwechsel etwas geringer aus. Der entstehende Aminosäuremangel könnte mit der Substitution von Lysin zum Medium behoben werden.

Es ist bekannt, dass durch absterbende Zellen in der Kultur vermehrt das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) und Radikale im Medium akkumulieren. Je älter die Kultur, desto größer wäre das Zellsterben und entsprechend der LDH-Gehalt. Sollte der Mediumwechsel alle 24 h nicht zur Entfernung der Substanzen ausreichen, könnte man annehmen, dass die LDH-Konzentration einen inhibitorischen Effekt auf das Neuritenwachstum hat (Koh und Choi 1987).

Zusätzlich ist beschrieben, dass das Wachstum der Neurone und derer Neuriten von ihrem Entwicklungsstatus zum Zeitpunkt der Isolation vom vitalen Herzen bzw. die Anzahl der zum Isolationszeitpunkt schon durchlaufenen Zellteilungen abhängt (Banker und Cowan 1977). Dies würde zwar erklären, dass das Wachstum der Neuriten bereits vorbestimmt ist, jedoch begründet es nicht den hier vorliegenden Wachstumsverlauf.

Bipolare Neurone zeigten trotz des Rückgangs der Neuritenlänge im Intervall 72 h bis 96 h über den gesamten Zeitraum jedoch eine signifikante Progression des Wachstums. Aus der Literatur ist bekannt, dass Neurone in-vitro nach

ausreichender Kulturdauer und bei entsprechender Neuritenlänge Netzwerke ausbilden (Rabejac et al. 1994, Napoli et al. 2014). Dies konnte jedoch in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachvollzogen werden, sodass der Kultivierungszeitraum in Zukunft verlängert werden sollte.

In multipolaren Neuronen blieb die Länge der Neurone annähernd gleich. Eine Vermehrung der Anzahl der Neuriten pro multipolarer Zelle wäre denkbar, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden, da es nicht möglich war die gleiche Zelle im Verlauf zu beobachten.

In der Diskussion um die Ausbildung der Phänotypen (siehe 5.3) wurde bereits erklärt, warum in dieser Studie keine Einteilung in Axone und Dendriten vorgenommen wurde. Aus der Literatur geht hervor, dass ein Unterschied im Wachstumsverhalten von Axonen und Dendriten existiert. Somit könnte bei längerer Kultivierungsdauer evaluiert werden, welcher Neurit im Organismus der Maus als Axon funktioniert und ob dieses wie beschrieben schneller ausdifferenziert als Dendriten (Jiang et al. 2005, Barnes und Polleux 2009).

5.5 Funktionelle Zuordnung der Kanalaktivität in atrialen HL-1-Kardiomyozyten

In *Patch-Clamp*-Versuchen wurde die Vitalität der HL-1-Kardiomyozyten in Monokultur geprüft. Die hierbei abgeleitete Strom-Spannungs-Kurve zeigte einen spannungsabhängigen schnellen Kationen-Einstrom beim Anstieg der Spannung auf -50 mV. Bei kontinuierlich steigender Spannung lag das Strommaximum bei -30 mV. Sowohl das Stromprofil als auch die Strom-Spannungs-Beziehung wurde in der Literatur bereits als charakteristisch für einen Natriumstrom beschrieben (Verkerk et al. 2012). Durch die Zusammensetzung von intra- und extrazellulärer Lösung entstand ein Natriumgradient von 140 mmol zu 10 mmol von extra- nach intrazellulär, welcher einen Natriumeinstrom ermöglicht. Die Expression von Natriumkanälen in atrialen HL-1-Kardiomyozyten ist bekannt (Claycomb et al. 1998), sodass geschlossen werden kann, dass es sich bei der hier vorliegenden Messung um einen schnellen Natriumeinstrom handelt. In Zukunft könnte eine elektrophysiologische Untersuchung der ICN mittels *Patch-Clamping* Auskunft über Vitalität und Kanalaktivität der Neurone geben. Hierzu

wurden bereits erste Eigenschaften zum Verhalten der Natrium- und Kaliumkanäle sowie der Charakteristik der Aktionspotentiale untersucht (Verkerk et al. 2012).

5.6 Klinischer Bezug und Perspektiven

ICN konnten über einen Zeitraum kultiviert werden, der eine Basischarakterisierung dieser Zellart zuließ. In weiteren Studien könnte zum einen eine funktionelle Charakterisierung möglicherweise mit Fokus auf die neuronale Plastizität von ICN erfolgen. Zum anderen könnte der Einfluss von physiologischen Neuromodulatoren wie z.B. NO auf das Wachstum von ICN erforscht werden.

5.6.1 Aufschlüsselung funktioneller Charakteristika von ICN

Durch immunzytochemische Färbungen könnten funktionelle Charakteristika der Zellen aufgeschlüsselt werden. Anhand einer Färbung mit TH und ChAT könnte die Zugehörigkeit der ICN zum sympathischen oder zum parasympathischen System bestimmt werden und somit auf einen funktionellen Zusammenhang schließen lassen (German et al. 1985, Nagatsu et al. 1964). Es ist bereits bekannt, dass in immunhistochemischen Organfärbungen des murinen Herzens 83 % der Neurone positiv für ChAT, 4 % positiv für TH sind und 14 % positiv für beide Phänotypen sind (Rysevaite et al. 2011b). Daher sollte auch in einer Zellkultur die Möglichkeit geprüft werden, ob eine Transdifferenzierung in Form eines sympathisch-parasympathischen Wechsels der Funktion der ICN denkbar wäre. Dieser ist bisher nur in sehr wenigen Zellpopulationen bekannt (Weihe et al. 2005).

Ursprünglich entstehen die Neurone des ANS in ihrer embryonalen Entwicklung aus der gleichen Vorläuferzelle (Howard 2005). Abhängig von Transkriptionsfaktoren und neurotrophen Faktoren entwickelt sich anschließend der jeweilige Phänotyp (Brodski et al. 2002). Von diesem hängt ab, welcher Neurotransmitter von der entsprechenden Neuronengruppe synthetisiert wird und welche neuronale Funktion die Zelle übernimmt (Brodski et al. 2002, Howard 2005). Bei ICN wurde bereits beschrieben, dass in 40 – 50 % untersuchter cholinergischer Zellen der Ratte die Koexistenz von TH- und ACh-Transportern eine

gemeinsame Ausschüttung von ACh und NA möglich macht (Weihe et al. 2005). Daher könnte auch in den vorliegenden ICN Kulturen das Medium auf cholinerge oder adrenerge Proteine, z.B. ChAT und TH, untersucht werden.

5.6.2 Neuromodulation als Therapiekonzept des Vorhofflimmerns

Als Therapiekonzept des Vorhofflimmerns wird in aktuellen Studien insbesondere die Neuromodulation als weitere Möglichkeit neben der etablierten Pulmonalvenenablation diskutiert (siehe 2.4). Dabei werden zum einen strukturelle Veränderungen in-vivo, wie z.B. die Denervierung sympathischer renaler Fasern oder die Stimulation von extrakardialen Ganglien, unter anderem dem Ganglion stellatum, untersucht (Wang et al. 2015, Shivkumar et al. 2016). Außerdem bildet die Modulation der sympatho-vagalen Balance des ANS zu Gunsten einer parasympathischen Stimulation einen viel versprechenden Therapieansatz. Beispielhaft hierfür wären der Einsatz des Valsalva-Manövers, eine Stimulation von Barorezeptoren sowie eine neurohumorale Modulation, z.B. durch neuronales NO als Stimulator kardialer Ganglien (Drexel et al. 2013, Habecker et al. 2016, Hou et al. 2016). Insbesondere die Stimulation durch NO könnte in der hier etablierten Methode in-vitro genauer untersucht werden. Auch Kotransmitter wie Neuropeptid Y, Galanin und VIP haben einen para- und autokrinen Einfluss auf kardiale Neurone (Herring 2015).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) ist sowohl in intrinsischen vagalen kardialen Neuronen als auch in postganglionären sympathischen Neuronen lokalisiert. Durch NO wird eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin und eine verminderte Freisetzung von Noradrenalin erreicht (Herring et al. 2000, Wang et al. 2007). Zudem wirkt NO auf muskarinische Rezeptoren und könnte somit als Kotransmitter für Acetylcholin bezeichnet werden (Brack et al. 2011). Eine Stimulation der nNOS resultiert in einer erhöhten NO-Produktion. Auf zellulärer Ebene wäre ein Effekt des NO auf die Wachstumscharakteristika der ICN zu erwarten und könnte als Fortsetzung dieser Studie untersucht werden. Im klinischen Kontext wird nach jüngsten in-vivo Studien zurzeit diskutiert, ob NO an der Modulation vagaler Signale und weiterführend als antiarrhythmischer Stabilisator des Kammerflimmerns gewertet werden könnte (Kalla et al. 2016, Wake und Brack 2016).

6 Zusammenfassung

Rhythmus, Erregbarkeit und Schlagkraft des Herzens werden durch neuronale Signale des autonomen Nervensystems unbewusst moduliert. Hierzu werden zentral generierte Erregungen in spinalen, thorakalen und kardialen Ganglien weiterverschaltet. Kardiale Ganglien im atrialen Fettgewebe enthalten intrakardiale Neurone (ICN), welche der Integration zentraler und lokaler Afferenzen zum Herz dienen. Aus jüngsten Studien geht hervor, dass ein unkontrolliertes Wachstum dieser ICN die Entstehung von Arrhythmien begünstigt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, das Wachstumsverhalten von ICN zu untersuchen. Hierzu erfolgte eine Beschreibung morphologischer Charakteristika von ICN in Zellkultur sowie ein Vergleich des Neuritenwachstums von unipolaren, bipolaren und multipolaren Neuronen. Weiterführend wurde geprüft, ob atriale Kardiomyozyten und ICN in einer gemeinsamen Kultur vital sind. Dazu wurden ICN aus murinen atrialen Fettpolstern isoliert und aufbereitet, sodass eine Kultivierung erfolgen konnte. Eine Auswertung von Morphologie und Neuritenlängen wurde nach 48 h, 72 h und 96 h in Kultur mit Hilfe von Fotodokumentationen durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Isolation von ICN aus atrialen Ganglienplexus ermöglicht eine reproduzierbare Kultivierung der Neurone.
- 2) Mittels Quantifizierung der Neuriten lässt sich eine Klassifizierung der ICN in unipolare, bipolare und multipolare Neurone durchführen. Die Auswertung der Neuritenlängen ergab ein charakteristisches Wachstum in unipolaren und bipolaren Neuronen. Multipolare Neurone hingegen zeigten nach initialem Aussprosseln kein weiteres Längenwachstum.
- 3) Eine gemeinsame Kultur mit atrialen Kardiomyozyten konnte etabliert werden.

Somit konnten murine ICN erstmals über einen Zeitraum kultiviert werden, der eine Basischarakterisierung dieser Zellpopulation zulässt. Dieser Ansatz lässt weitere Möglichkeiten offen, das Verhalten kardialer Neurone unter elektrischer Stimulation oder dem Einfluss chemischer Neuromodulatoren zu untersuchen. Darüber hinaus könnte in weiteren Schritten ein Fokus auf die Untersuchung der funktionellen myozytären-neurozytären Interaktion gesetzt werden.

7 Abstract

The heart rhythm is maintained by integrative coordinative mechanisms conducted by the intrinsic cardiac nervous system. This system serves as a final relay station for neuronal signals which are generated in the central nervous system but modulated by spinal, thoracic and cardiac ganglia. The intrinsic cardiac ganglia are located in epicardial fat pads around both atria. These ganglia contain intracardiac neurons (ICN) that integrate central and local afferents to take part in the beat-to-beat coordination but can also play an important role in the modulation of cardiac arrhythmias. Due to the idea that nerve sprouting of ICN may be one reason for the formation of arrhythmias the aim of the following study was to analyze the growing process of ICN. This thesis includes an investigation about the morphometric characteristics of ICN in cell culture, as well as an analysis of the growth characteristics of unipolar, bipolar and multipolar neurons. Furthermore, the vitality of cardiomyocytes and ICN in a co-culture was examined. ICN were isolated and cultivated in a way that enabled the evaluation of morphology and neurite growth length via photo documentation after 48 h, 72 h and 96 h.

Summarizing the results

- 1) Isolation of ICN out of atrial fat pads allows the cultivation of the neurons. Furthermore, a co-culture of ICN and atrial myocytes was established.
- 2) The three neuronal cell types unipolar, bipolar and multipolar were classified by quantification of neurites. The evaluation of neurite length results in a characteristic outgrowth of neurites in unipolar and bipolar neurons. Multipolar neurons initially expressed neurites but didn't show a further variation of their length.
- 3) A coculture with ICN and atrial cardiomyocytes was established.

Therefore, the isolation and cultivation of ICN leads to the knowledge of basic characteristics of this little-analyzed cell population. Future development allows further possibilities to investigate changes of ICN morphology under electronic stimulation or chemical neuromodulation, as well as the description of functional aspects of neuronal-myocyte Interaction in cell culture.

8 Anhang

8.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Firma</u>	<u>Artikelnummer</u>
CaCl ₂	Merck KGaA, Deutschland	1.02382.1000
Claycomb-Medium	Sigma Aldrich, USA	51800C
CsF	Sigma Aldrich, USA	198323
DMSO	Roth, Deutschland	A994.2
FBS	Sigma Aldrich, USA	F2442
Fibronectin (1 mg/ml)	Sigma Aldrich, USA	F1141
Gelatin	Sigma Aldrich, USA	G9391
Glukose	Sigma Aldrich, USA	G5767
HEPES	Sigma Aldrich, USA	H4034
Insulin	Gibco, Germany	12585-014
KCl	KMF Laborchemie Handels GmbH, Deutschland	KMF.08-248.1000
Ketamin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA	K2753
KH ₂ PO ₄	KMF Laborchemie Handels GmbH, Deutschland	KMF.08-407.0250
Kollagenase Type CLSII	Biochrome AG, USA	CII-22
L CaCl ₂	Merck KGaA, Deutschland	1.02382.1000
L CsCl	Sigma Aldrich, USA	289329
L EGTA	Sigma Aldrich, USA	E3889
L Glukose	Sigma Aldrich, USA	G5767
L HEPES	Sigma Aldrich, USA	H4034
L MgCl ₂	Sigma Aldrich, USA	M8266
L Na ₂ ATP	Sigma Aldrich, USA	A2383
L-Glutamin	PAA, USA	M11-004
MgCl ₂	Sigma Aldrich, USA	M8266
MgSo ₄ *7H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland	1.05886.1000
NaCl	Sigma Aldrich, USA	S5886
NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	00809138
NaF	Sigma Aldrich, USA	S7920
NaHCO ₃	VWR International, Deutschland	27775.293
Neuro-Basal-Medium	Gibco, Deutschland	21103-049
PBS	Sigma Aldrich, USA	D8537
PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei)	Sigma Aldrich, USA	T8154-100 ml
Penicillin/ Streptomycin	PAA, USA	P11-010
Poly-L-Lysin 0,01%	Sigma Aldrich, USA	P4707
Poly-L-Ornithin 0,01%	Sigma Aldrich, USA	P4957
Proteinase from Aspergillus melleus	Sigma Aldrich, USA	P4032
Xylazin (Rompun(R))	Bayer Health Care, Deutschland	
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich, USA	T3924

Trypanblau-Solution	Sigma Aldrich, USA	T8154-100 ml
Vitamin B27	Gibco, Deutschland	17504-044

8.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Firma</u>	<u>Artikelnummer</u>
µ-slide-8-well-Platte	Ibidi, Deutschland	80821
24- Well-Platten	greiner bio one cell star 655	662102
Cell Strainer	Cell Strainer 100µm, BD Falcon, USA	
Deckgläser, Glas, 12mm	Marienfeld gmbH & Co, No1, 12 mm ²	111520
Cryovials, 2 ml round bottom,	Thermo nunc 1,8 ml	375418
Culture Insert	Ibidi, Deutschland	81171
Filter für Spritzen 0,45 µm	Sigma Aldrich	USA
Freezing Container	Nalgene	7-5100-0001
Glaskapillaren	Science Products GmbH	GB 150T-8P
Kanülen	BD Eclipse Needle	305889 , 305760
Kompressen	Hartmann ES Kompressen	407835
Pasteurpipetten	Brand	747720
Petrischalen (3 cm)	VWR international	391-2072
Petrischalen, 10 cm	TPP	
Pipettenspitzen	TipOne, Starlab, Deutschland	1000 µl (S1111.6000), 100 µl (S1111-1000), 20 µl (S1110-3000)
Reagenzgefäße	Eppendorf	2 ml (0030-120094)
Reagenzgefäße	greiner cell star tubes, Deutschland	50 ml (227 261), 15 ml(188271)
Spritzen 1ml	Braun	Deutschland
Zellkulturflaschen	greiner cell star	658190

8.3 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Firma</u>	<u>Herkunftsland</u>
Badkammer	Eigenproduktion	
Becherglas, 1000 ml	Schott, Deutschland	50-1151
Becherglas, 50 ml	Schott	Deutschland
Controller	Heka	Deutschland
Glasflaschen, 1000 ml	Schott	Deutschland
Headstage	Heka	Deutschland
Inkubator	HeraCell 240	Thermo Scientific, USA
Invers-Mikroskop	Olympus	Japan
Kälteplatte	Eigenproduktion	
Kamera	Leica, DFC425C	Deutschland
Messelektrode aus Silberdraht	Eigenproduktion	

Mikromanipulator	Heka	Deutschland
Mikro-Pipetten-Zieher <i>Sutter Instrument P-97</i>	Science Products GmbH	Deutschland
Mikroskop	Leica, DM 4000M	Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	
Pinzette	Fine Science Tools	Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools	Heidelberg, Deutschland
Referenzelektrode aus Silberdraht	Eigenproduktion	
Stereomikroskop	Nikon, SMZ645	Japan
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer 5436	Deutschland
Verstärker und Stimulator Heka EPC 10	Heka	Deutschland
Zentrifuge, Rotina 380R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

8.4 Software

Software		
Fotoprogramm	FIJI	USA
Kamerasoftware	Leica Application Suite V3.7	Deutschland
<i>PatchMaster Vol. 5.2</i>	Heka	Deutschland

9 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Azetylcholin
ANS	Autonomes Nervensystem
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CaCl ₂	Kalziumchlorid
ChAT	Cholin Acetyltransferase
CsCl	Cäsiumchlorid
CsF	Cäsiumfluorid
CsOH	Cäsiumhydroxid
EGTA	Ethylenbistetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum
ICN	Intrakardiale Neurone
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
LIGP	Links-inferiorer Ganglienplexus
LSGP	Links-superiorer Ganglienplexus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NA	Noradrenalin
Na ₂ ATP	Natrium - Adenosintriphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve growth factor

Abkürzungsverzeichnis

NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	Neuronale NO-Synthase
PBS	Phosphat-gebufferte Salzsäure
RAGP	Rechts-anteriorer Ganglienplexus
PBS	Phosphat-gebufferte Salzsäure
TH	Tyrosinhydroxylase
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VHF	Vorhofflimmern

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Nervenzelle. Der Zellkörper wird als Perikaryon bezeichnet, mittig liegt der Zellkern. Dendriten ziehen vom Zellkörper in die Umgebung. Ein einzelnes langes Axon verlässt die Zelle am Axonhügel und gibt das generierte Signal an den Axonterminalen über Synapsen an das Zielgewebe weiter; (modifiziert nach (Foresman 2012), Wikimedia Commons, keine urheberrechtliche Beschränkung. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_\(PSF\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_(PSF).svg)) 3

Abbildung 2: Schematische Darstellung des klassischen Aufbaus der autonomen Nervensysteme. Der sympathische Anteil ist rot dargestellt, der parasympathische Anteil blau. Die Kerngebiete des Sympathikus liegen im thorakolumbalen Anteil und werden organfern im Grenzstrang auf präganglionäre Fasern umgeschaltet. Die postganglionären Kerngebiete des Parasympathikus liegen sowohl kranial als auch sakral und ihre Verschaltung erfolgt in organnahen Ganglien; G. - Ganglion, N. – Nervus, RM - Rückenmark; (modifiziert nach „Gray’s Anatomy“, 20. Auflage 8, (Gray und Lewis 1918), Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AGray839_clean.png, keine urheberrechtliche Beschränkung.)..... 7

Abbildung 3: Schema der Herzinnervation und der Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Steuerstrukturen in hierarchischer Anordnung. Besonders zu beachten ist die lokal integrative Verschaltung der Afferenzen aus dem Herzen in den kardialen Ganglien mit den Einflüssen aus thorakalen Ganglien und zentralen Neuronen. Hierbei sind die Afferenzen orange dargestellt, die Efferenzen schwarz. Die kardialen und thorakalen Efferenzen unterteilen sich jeweils in sympathische und parasympathische Fasern; 10

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ganglienplexus am humanen Herzen unter Berücksichtigung der Aufteilung in atriale Ganglienplexus (A) und ventrikuläre Ganglienplexus (B). Abbildung 4A zeigt eine Ansicht von dorsal auf das Herz. Es sind die fünf atrialen Ganglienplexus dargestellt. Hierbei handelt es sich um den rechts-atrialen superioren, den links-atrialen superioren Ganglienplexus, die an den Gefäßwurzeln von Aorta und Truncus pulmonalis im Fettgewebe eingebettet sind. Zusätzlich liegen der rechts-atriale posteriomediale, der links-atriale posteriolaterale und der rechts-atrialen posterioren Ganglienplexus im Fettgewebe um die Gefäßwurzeln der Pulmonalvenen. Abbildung 4B zeigt eine Ansicht von kranial. Hier sind die fünf ventrikulären Ganglienplexus zu sehen. Insbesondere ist der Aortenwurzelplexus auszumachen. Weitere Ganglienplexus verlaufen entlang der Koronararterien. So finden sich je ein Ganglienplexus entlang des Ramus interventricularis anterior und ein weiterer entlang des Ramus interventricularis posterior. Zwei weitere, jedoch kleinere Ganglienplexus, sind um jeweils einen Ramus marginalis lokalisiert. 12

Abbildung 5: Schematische Übersicht des murinen intrakardialen Nervensystems in ventraler (A) und dorsaler (B) Ansicht. Es zeigt sich ein Netzwerk aus intrakardialen Neuronen, welches zwischen den venösen Vorhofgefäßen hinreichend ausgeprägt ist.

Vereinzelt sind auch Nervenansammlungen zu Ganglienplexus dargestellt. Diese werden als linke (LGP) und rechte Ganglienplexus (RGP) bezeichnet. Auffällig sind insbesondere die drei Sulki über die die Ganglienplexus vernetzt sind (B). So findet man zwischen den beiden Atrien einen intraatrialen Sulkus (Zhang et al.), vom rechten Ganglienplexus (RGP) ausgehend einen Sulkus der um die rechte Vena cava zieht (SVC) und einen dritten Sulkus der oberflächlich auf dem linken Vorhof liegt (LAS). 15

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Isolation von intrakardialen Neurozyten aus atrialem Fettgewebe. Nach der Entnahme des Herz-Lungen-Komplexes aus dem Brustkorb der Versuchsm Maus wurde dieser in vorgekühlte 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung überführt. Hier wurden die Lungen abgetrennt und das Herz gespült. Anschließend wurde das Herz, inklusive Vorhofstrukturen, in 4 °C kalten kalziumfreien HEPES-Puffer transferiert und die Präparation des atrialen Fettgewebes unter dem Mikroskop durchgeführt. Ein Becherglas mit kalziumhaltigem HEPES-Puffer wurde in einem Eisbad gekühlt. Das atriale Fettgewebe konnte so vollständig vom Herzen präpariert und im kalziumhaltigen HEPES-Puffer gesammelt werden. Anschließend folgte die Dissoziation der Zellen aus dem präparierten Gewebe..... 22

Abbildung 7: Protokoll zur Fotodokumentation und Auswertung der Neuritenlängen. Nach Isolation der intrakardialen Neurone erfolgte eine 48 h Ruhephase. Anschließend wurde die Neuritenlänge im mikroskopischen Bild dokumentiert. Zwischen den weiteren Dokumentationen zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h erfolgte jeweils eine 24 h-Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO₂. 27

Abbildung 8: Schema der Klassifizierung von intrakardialen Neuronen in verschiedene Phänotypen. Kriterien zur Einteilung waren die Anzahl sowie die Morphologie der Neuriten. Unipolare Neurone haben einen langen schmalen Ausläufer. Bipolare Neurone weisen zwei Neuriten auf, wohingegen multipolare Neurone drei oder mehr ähnlich lange Neuriten als Ausläufer haben, die sich im späten Stadium auch weiter verzweigen können..... 28

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kokultur-Methodik. Sogenannte *Cell Culture-Inserts* hafteten auf Deckgläsern und bildeten zwei getrennte Kulturkammern (A). In einer Kammer wurden intrakardiale Neurone kultiviert (blau), in der zweiten Kammer HL-1-Kardiomyozyten (violett). Nach Abnehmen des *Cell Culture Insert* (B) wurden beide Kulturen nebeneinander auf dem gleichen Deckglas kultiviert und ihre Interaktion beobachtet (C)..... 32

Abbildung 10: Der Aufbau des *Patch-Clamp*-Messstandes mit Fokus auf den Bereich der Messelektrode, welche sich in der Mikropipette befindet und von intrazellulärer Lösung umgeben ist und in den Mikromanipulator mit Headstage eingespannt ist. Auch ist ein Ausschnitt der Badkammer mit Zellen und Referenzelektrode sowie ein Teil des Mikroskops zu erkennen. 35

Abbildung 11: Intrakardiale Neurone (ICN) im Wachstumsverlauf zu den Zeitpunkten 0 h (A), 48 h (B), 72 h (C), und 96 h (D) nach Isolation. A) Frisch isolierte ICN zum Zeitpunkt 0

h, die sich als runde Zellen ohne Ausläufer darstellen. Sie sind von vielen kleinen Fremdzellen umgeben. B) Ausläufer eines ICN nach 48 h Ruhephase. C) ICN mit einem langen schmalen Ausläufer zum Zeitpunkt 72 h nach Isolation. D) ICN mit zwei Ausläufern nach 96 h Kultivierung. Zu sehen sind Varikositäten entlang der schmalen Neuriten. 39

Abbildung 12: In der Gruppe der unipolaren Neurone sind drei verschiedene Formen von Perikarya vorhanden. Prädominierend sind Neurone mit spindelförmigem Zellkörper (A). Ebenfalls häufig die rund-ovale (B) und selten eine pyramidenförmige Zellkörperform (C). Ein typischer Neurit unipolarer Neurone ist in Abb. C zu sehen. 41

Abbildung 13: Bipolare Neurone zeigen drei Formen der Perikarya. Die Mehrzahl hat spindelförmige (A) und oval-elliptische (B) Umriss. Selten sind auch pyramidenförmige Perikarya (C) zu sehen. 42

Abbildung 14: Die Perikarya der multipolaren Neurone variieren sehr in der Anzahl ihrer Neuriten. Je nach Anzahl verändert sich auch der Zellkörperumriss. Exemplarisch zu sehen ist ein multipolares Neuron mit drei Neuriten. 43

Abbildung 15: Anhand der Anzahl der Neuriten erfolgte eine phänotypische Einteilung in die drei Zellklassen unipolare (A), bipolare (B) und multipolare Neurone (C). 44

Abbildung 16: Dargestellt ist der Wachstumsverlauf der Neuriten von unipolaren Neuronen in einer Monokultur. Die Auswertung der Neuritenlängen erfolgte zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Zellen, den Mittelwert der Neuritenlängen und den Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt. Hervorzuheben ist das signifikante stetige Längenwachstum nach Isolation bis zum Zeitpunkt 72 h. 45

Abbildung 17: Übersichtsdarstellung des Neuritenwachstums bipolarer intrakardialer Neurone in Monokultur. Die Auswertung der Neuritenlängen erfolgte zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. Tabellarisch aufgelistet ist die Anzahl der Zellen, der Mittelwert der Neuritenlängen und der Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt. Über die ersten 72 h in Kultur ist ein signifikantes stetiges Wachstum der Neuriten zu beobachten. 46

Abbildung 18: Dargestellt ist der Wachstumsverlauf der Neuriten von multipolaren intrakardialen Neuronen in Monokultur. Ausgewertet wurden die Neuritenlängen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Isolation. In der Tabelle wird die Anzahl der Zellen, der Mittelwert der Neuritenlängen und der Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Auswertungszeitpunkt gezeigt. Bis zum Zeitpunkt 48 h wachsen die Fortsätze aus. Dann erfolgt keine signifikante Längenänderung. 47

Abbildung 19: Eine Kokultivierung von atrialen HL-1-Kardiomyozyten und intrakardialen Neuronen (ICN) wurde 48 h durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen in getrennten Monokulturen vorkultiviert, damit sie anschließend in einer Kokultur wachsen konnten. Nach 48 h wurden die Kulturen mit Hilfe von Fotos dokumentiert und mikroskopisch als vital bewertet. Diese Abbildung stellt links schematisch, sowie rechts auf einem Foto dar,

dass die Kultur linksseitig mit HL-1-Kardiomyozyten besiedelt war, während auf der rechten Seite ICN wuchsen..... 48

Abbildung 20: Zum Vitalitätsnachweis der HL-1-Kardiomyozyten wurden Stromänderungen über die Zellwand, mittels *Whole-Cell-Current-Clamp*-Technik gemessen. (A) Änderung des Kanalstroms über die Zeit der durch Depolarisation der Zellwand resultiert. Auf der X-Achse ist die Zeit in ms, auf der Y-Achse die Stromänderung in nA gezeigt. Nach initial schneller Stromänderung folgt eine langsame Rückbildung des Stroms zum Ausgangsniveau. (B) Strom-Spannungs-Kurve des in A dargestellten Stroms. Auf der X-Achse ist die Spannung in V dargestellt, auf der Y-Achse wird die Änderung des Stroms in A gezeigt. Bei einer negativen Spannung von -50 mV erfolgt ein schneller Strom, der bei kontinuierlicher Hyperpolarisation ab -30 mV wieder abnimmt. Die dargestellten Messungen entstammen den eigenen Aufzeichnungen..... 49

Abbildung 21: Spannungsänderung während eines Aktionspotentials, gemessen an einer atrialen HL-1-Kardiomyozyte mittels *Whole-Cell-Current-Clamp*-Technik. Der Nachweis eines Aktionspotentials beweist die Vitalität der Zelle..... 50

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Nomenklaturen von intrakardialen atrialen Ganglienplexus im anatomischen und klinischen Kontext.	13
Tabelle 2: Zusammensetzung von kalziumfreiem und kalziumhaltigem HEPES-Puffer zur Isolation von intrakardialen Neuronen.	20
Tabelle 3: Zusammensetzung der Enzymlösung, die zum Gewinn von intrakardialen Neuronen aus atrialem Fettgewebe eingesetzt wurde.	23
Tabelle 4: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für intrakardiale Neurone	24
Tabelle 5: Vergleich der Zusammensetzung der Medien für eine Kultur intrakardialer Neurone.....	25
Tabelle 6: Zusammensetzung der intra- und extrazellulären <i>Patch-Clamp</i> -Lösung im Vergleich	34
Tabelle 7: Relatives und absolutes Vorkommen der verschiedenen Zellklassen abhängig von der Kulturdauer. Zusätzlich ist die Gesamtzell- und Kulturzahl angegeben.	44

12 Literaturverzeichnis

Addicks, K., Knoche, H., Themann, H. & Pawlowitzki, I. H. 2013. *Lehrbuch der histologie: Cytologie histologie mikroskopische anatomie*, Springer Berlin Heidelberg.

Ahles, A. & Engelhardt, S. 2014. Polymorphic variants of adrenoceptors: Pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev*, 66, 598-637.

Ardell, J. L., Andresen, M. C., Armour, J. A., Billman, G. E., Chen, P. S., Foreman, R. D., Herring, N., O'leary, D. S., Sabbah, H. N., Schultz, H. D., Sunagawa, K. & Zucker, I. H. 2016. Translational neurocardiology: Preclinical models and cardioneural integrative aspects. *The Journal of Physiology*, 594, 3877-3909.

Armour, J. A. 1976. Instant to instant reflex cardiac regulation. *Cardiology*, 61, 309-328.

Armour, J. A. 2008. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Experimental Physiology*, 93, 165-176.

Armour, J. A. & Ardell, J. L. 2004. *Basic and clinical neurocardiology*, New York, Oxford University Press.

Armour, J. A., Murphy, D. A., Yuan, B. X., Macdonald, S. & Hopkins, D. A. 1997. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec*, 247, 289-98.

Azevedo, F. a. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R. & Herculano-Houzel, S. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513, 532-541.

Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. & Baudino, T. A. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H1883-91.

Banker, G. A. & Cowan, W. M. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 126, 397-42.

Barha, C. K., Nagamatsu, L. S. & Liu-Ambrose, T. 2016. Basics of neuroanatomy and neurophysiology. *Handb Clin Neurol*, 138, 53-68.

Barnes, A. P. & Polleux, F. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, 32, 347-81.

Barnes, A. P., Solecki, D. & Polleux, F. 2008. New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 44-52.

Baudino, T. A., Carver, W., Giles, W. & Borg, T. K. 2006. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H1015-26.

Baxter, S. C., Morales, M. O. & Goldsmith, E. C. 2008. Adaptive changes in cardiac fibroblast morphology and collagen organization as a result of mechanical environment. *Cell Biochem Biophys*, 51, 33-44.

Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. 2016. *Neuroscience : Exploring the brain*, Philadelphia, Wolters Kluwer.

Bernstein, S. A., Duggirala, S., Floberg, M., Elfvendal, P., Kuznekoff, L. M., Lader, J. M., Vasquez, C. & Morley, G. E. 2011. Spatiotemporal electrophysiological changes in a murine ablation model. *Europace*, 13, 1494-500.

Brack, K. E., Coote, J. H. & Ng, G. A. 2011. Vagus nerve stimulation protects against ventricular fibrillation independent of muscarinic receptor activation. *Cardiovasc Res*, 91, 437-46.

Brading, A. 1999. *The autonomic nervous system and its effectors*, Oxford, UK, Blackwell Science Ltd.

Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. & Price, P. J. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35, 567-76.

Brodde, O.-E. & Michel, M. C. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews*, 51, 651-690.

Brodski, C., Schaubmar, A. & Dechant, G. 2002. Opposing functions of gdnf and ngf in the development of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 19, 528-38.

Burnstock, G. 1995. Noradrenaline and atp: Cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol*, 46, 365-84.

Butler, C. K., Smith, F. M., Cardinal, R., Murphy, D. A., Hopkins, D. A. & Armour, J. A. 1990. Cardiac responses to electrical stimulation of discrete loci in canine atrial and ventricular ganglionated plexi. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 259, H1365-H1373.

Camelliti, P., Borg, T. K. & Kohl, P. 2005a. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65, 40-51.

Camelliti, P., Mcculloch, A. D. & Kohl, P. 2005b. Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: A two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*, 11, 249-59.

Cannon, W. B. 1902. The movements of the intestines studied by means of the rontgen rays. *J Med Res*, 7, 72-5.

Carlsson, E., Dahlöf, C.-G., Hedberg, A., Persson, H. & Tångstrand, B. 1977. Differentiation of cardiac chronotropic and inotropic effects of β -adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 300, 101-105.

Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. M. 1998. International union of pharmacology. Xvii. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*, 50, 279-290.

Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. & Izzo, N. J., Jr. 1998. HI-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2979-84.

Collins, C. E., Young, N. A., Flaherty, D. K., Airey, D. C. & Kaas, J. H. 2010. A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: A comparison of flow cytometry and manual counting methods. *Front Neuroanat*, 4.

Collins, F. & Dawson, A. 1983. An effect of nerve growth factor on parasympathetic neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 2091-4.

Coote, J. H. 2013. Myths and realities of the cardiac vagus. *The Journal of Physiology*, 591, 4073-4085.

Coote, J. H. & Gilbey, M. P. 2016. Special issue, 'central and peripheral nerve influence on cardiac function in health and disease'. *Auton Neurosci*, 199, 1-2.

Day, J. S., O'Neill, E., Cawley, C., Aretz, N. K., Kilroy, D., Gibney, S. M., Harkin, A. & Connor, T. J. 2014. Noradrenaline acting on astrocytic beta(2)-adrenoceptors induces neurite outgrowth in primary cortical neurons. *Neuropharmacology*, 77, 234-48.

De Arruda, H. F., Comin, C. H., Miazaki, M., Viana, M. P. & Costa, L. D. 2015. A framework for analyzing the relationship between gene expression and morphological, topological, and dynamical patterns in neuronal networks. *Journal of Neuroscience Methods*, 245, 1-14.

De Groot, J. R. 2016. Thoracoscopic ganglionic plexus ablation does not improve outcome in advanced atrial fibrillation. The prospective, randomized aFACT trial. .

De Vos, C. B., Nieuwlaat, R., Crijns, H. J., Camm, A. J., Leheuzey, J. Y., Kirchhof, C. J., Capucci, A., Breithardt, G., Vardas, P. E., Pisters, R. & Tieleman, R. G. 2008. Autonomic trigger patterns and anti-arrhythmic treatment of paroxysmal atrial fibrillation: Data from the euro heart survey. *Eur Heart J*, 29, 632-9.

Dhein, S., Van Koppen, C. J. & Brodde, O.-E. 2001. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacological Research*, 44, 161-182.

Dotti, C. G., Sullivan, C. A. & Banker, G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8, 1454-68.

Drexel, T., Eickholt, C., Muhlsteff, J., Ritz, A., Siekiera, M., Kirmanoglou, K., Schulze, V., Shin, D. I., Balzer, J., Rassaf, T., Kelm, M. & Meyer, C. 2013. Vagal

heart rate control in patients with atrial fibrillation: Impact of tonic activation of peripheral chemosensory function in heart failure. *Adv Exp Med Biol*, 755, 287-97.

Eagle, H. 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432-7.

Ebendal, T. & Jacobson, C. O. 1977. Tests of possible role of ngf in neurite outgrowth stimulation exerted by glial cells and heart explants in culture. *Brain Res*, 131, 373-8.

Euler, U. S. V. & Hillarp, N. A. 1956. Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons. *Nature*, 177, 44-45.

Ferrari, R., Bertini, M., Blomstrom-Lundqvist, C., Dobrev, D., Kirchhof, P., Pappone, C., Ravens, U., Tamargo, J., Tavazzi, L. & Vicedomini, G. G. 2016. An update on atrial fibrillation in 2014: From pathophysiology to treatment. *Int J Cardiol*, 203, 22-9.

Field, L. J. 1988. Atrial natriuretic factor-sv40 t antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science*, 239, 1029-33.

Foresman, P. S. 2012. *Line art of a neuron with arrows pointing at its parts* [Online]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_\(PSF\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendrite_(PSF).svg) [Accessed].

Fukuda, K., Kanazawa, H., Aizawa, Y., Ardell, J. L. & Shivkumar, K. 2015. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ Res*, 116, 2005-19.

Furness, J. B. 2006. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton Neurosci*, 130, 1-5.

Gallo, M. P., Alloatti, G., Eva, C., Oberto, A. & Levi, R. C. 1993. M1 muscarinic receptors increase calcium current and phosphoinositide turnover in guinea-pig ventricular cardiocytes. *J Physiol*, 471, 41-60.

Goldoni, D., Zhao, Y., Green, B. D., Mcdermott, B. J. & Collins, A. 2010. Inward rectifier potassium channels in the hl-1 cardiomyocyte-derived cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 225, 751-756.

Gordon, L., Wharton, J., Gaer, J. a. R., Inglis, G. C., Taylor, K. M. & Polak, J. M. 1993. Quantitative immunohistochemical assessment of bovine myocardial innervation before and after cryosurgical cardiac denervation. *Cardiovascular Research*, 27, 318-326.

Gourine, A. V., Machhada, A., Trapp, S. & Spyer, K. M. 2016. Cardiac vagal preganglionic neurones: An update. *Auton Neurosci*, 199, 24-8.

Gray, H. & Lewis, W. H. 1918. *Anatomy of the human body*, Philadelphia and New York,, Lea & Febiger.

Habecker, B. A., Anderson, M. E., Birren, S. J., Fukuda, K., Herring, N., Hoover, D. B., Kanazawa, H., Paterson, D. J. & Ripplinger, C. M. 2016. Molecular and

cellular neurocardiology: Development, and cellular and molecular adaptations to heart disease. *J Physiol*, 594, 3853-75.

Haga, T. 2013. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 89, 226-56.

Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Gencel, L., Pradeau, V., Garrigues, S., Chouairi, S., Hocini, M., Le Métayer, P., Roudaut, R. & Clémenty, J. 1996. Right and left atrial radiofrequency catheter therapy of paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 7, 1132-1144.

Haissaguerre, M., Jais, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Metayer, P. & Clementy, J. 1998. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*, 339, 659-66.

Hall, W. C. & White, L. E. 2008. The visceral motor system. *Neuroscience*, 4th edition. Sinauer Associates, USA.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.

Hao, M. M., Foong, J. P., Bornstein, J. C., Li, Z. L., Vanden Berghe, P. & Boesmans, W. 2016. Enteric nervous system assembly: Functional integration within the developing gut. *Dev Biol*, 417, 168-81.

Hasan, W. 2013. Autonomic cardiac innervation development and adult plasticity. *Organogenesis*, 9, 176-193.

Hasan, W. & Smith, P. G. 2000. Nerve growth factor expression in parasympathetic neurons: Regulation by sympathetic innervation. *Eur J Neurosci*, 12, 4391-7.

He, Y. & Baas, P. W. 2003. Growing and working with peripheral neurons. *Methods Cell Biol*, 71, 17-35.

Her, W. Y., Fu, Y. S., Liu, T. S. & Liu, K. M. 2000. Morphological study of cultured cardiac ganglionic neurons from different postnatal stages of rats. *Auton Neurosci*, 84, 89-97.

Herring, N. 2015. Autonomic control of the heart: Going beyond the classical neurotransmitters. *Exp Physiol*, 100, 354-8.

Herring, N., Golding, S. & Paterson, D. J. 2000. Pre-synaptic no-cgmp pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria. *J Mol Cell Cardiol*, 32, 1795-804.

Hinsey, J. C. 1934. The innervation of skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 14, 514-585.

Hoard, J. L., Hoover, D. B., Mabe, A. M., Blakely, R. D., Feng, N. & Paolocci, N. 2008. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase a and p75. *Neuroscience*, 156, 129-42.

Hoard, J. L., Hoover, D. B. & Wondergem, R. 2007. Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, C1875-83.

Hoffman, B. F. 1959. Electrophysiology of single cardiac cells. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 35, 689-706.

Hogan, K. & Markos, F. 2006. Vasoactive intestinal polypeptide receptor antagonism enhances the vagally induced increase in cardiac interval of the rat atrium in vitro. *Exp Physiol*, 91, 641-6.

Hoover, D. B., Ganote, C. E., Ferguson, S. M., Blakely, R. D. & Parsons, R. L. 2004. Localization of cholinergic innervation in guinea pig heart by immunohistochemistry for high-affinity choline transporters. *Cardiovascular Research*, 62, 112-121.

Horackova, M., Croll, R. P., Hopkins, D. A., Losier, A. M. & Armour, J. A. 1996. Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons. *Tissue Cell*, 28, 411-25.

Hou, Y., Zhou, Q. & Po, S. S. 2016. Neuromodulation for cardiac arrhythmia. *Heart Rhythm*, 13, 584-92.

Howard, M. J. 2005. Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons. *Dev Biol*, 277, 271-86.

Hoyle, G. W., Mercer, E. H., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. 1993. Expression of ngf in sympathetic neurons leads to excessive axon outgrowth from ganglia but decreased terminal innervation within tissues. *Neuron*, 10, 1019-1034.

Ieda, M., Fukuda, K., Hisaka, Y., Kimura, K., Kawaguchi, H., Fujita, J., Shimoda, K., Takeshita, E., Okano, H., Kurihara, Y., Kurihara, H., Ishida, J., Fukamizu, A., Federoff, H. J. & Ogawa, S. 2004. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*, 113, 876-84.

Iwasaki, Y. K., Nishida, K., Kato, T. & Nattel, S. 2011. Atrial fibrillation pathophysiology: Implications for management. *Circulation*, 124, 2264-74.

Jänig, W. 2006. *Integrative action of the autonomic nervous system: Neurobiology of homeostasis*, Cambridge University Press.

Jänig, W. 2016. Neurocardiology: A neurobiologist's perspective. *J Physiol*, 594, 3955-62.

Javier G. Castillo, D. H. A. 2012a. Cardiac vagal ganglia. *In: BIAGGIONI, I., BURNSTOCK, G., LOW, P. A. & PATON, J. F. R. (eds.) Primer on the autonomic nervous system.* Robertson, David.

Javier G. Castillo, D. H. A. 2012b. Peripheral autonomic system *In: ROBERT W. HAMILL, ROBERT E. SHAPIRO & VIZZARD, M. A. (eds.) Primer on the autonomic nervous system* Robertson, David.

Jiang, H., Guo, W., Liang, X. & Rao, Y. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: Critical roles of gsk-3beta and its upstream regulators. *Cell*, 120, 123-35.

Joyner, M. J. 2016. Preclinical and clinical evaluation of autonomic function in humans. *J Physiol*, 594, 4009-13.

Kalla, M., Chotalia, M., Coughlan, C., Hao, G., Crabtree, M. J., Tomek, J., Bub, G., Paterson, D. J. & Herring, N. 2016. Protection against ventricular fibrillation via cholinergic receptor stimulation and the generation of nitric oxide. *J Physiol*, 594, 3981-92.

Katristsis, D. G., Giazitzoglou, E., Zografos, T., Pokushalov, E., Po, S. S. & Camm, A. J. 2011. Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: A randomized study. *Heart Rhythm*, 8, 672-8.

Katz, A. M. 1990. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation*, 82, 17-11.

Kawano, H., Okada, R. & Yano, K. 2003. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart and Vessels*, 18, 32-39.

Khan, N. & Smith, M. T. 2015. Neurotrophins and neuropathic pain: Role in pathobiology. *Molecules*, 20, 10657-88.

Kim, E.-J., Yin, X., Fontes, J. D., Magnani, J. W., Lubitz, S. A., Mcmanus, D. D., Seshadri, S., Vasan, R. S., Ellinor, P. T., Larson, M. G., Benjamin, E. J. & Rienstra, M. 2016. Atrial fibrillation without comorbidities: Prevalence, incidence and prognosis (from the framingham heart study). *American Heart Journal*, 177, 138-144.

Koh, J. Y. & Choi, D. W. 1987. Quantitative-determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell-culture by lactate-dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods*, 20, 83-90.

Kriegstein, A. R. & Dichter, M. A. 1983. Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *J Neurosci*, 3, 1634-47.

Kuncová, J., Slavíková, J. & Reischig, J. 2003. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat heart: Effect of guanethidine and capsaicin. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 185, 153-161.

Langley, J. N. 1903. The autonomic nervous system. *Brain*, 26, 1-26.

Lesuisse, C. & Martin, L. J. 2002. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol*, 51, 9-23.

Lloyd-Jones, D. M., Wang, T. J., Leip, E. P., Larson, M. G., Levy, D., Vasan, R. S., D'agostino, R. B., Massaro, J. M., Beiser, A., Wolf, P. A. & Benjamin, E. J. 2004. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: The framingham heart study. *Circulation*, 110, 1042-6.

Lodish H, B. A., Zipursky SI, Et Al. 2000. Molecular cell biology 4th edition. New York: W. H. Freeman.

Lu, Y., Sun, J., Zhou, X., Sun, Q., Sun, S. & Tang, B. 2015. Atrial fibrillation electrical remodelling via ablation of the epicardial neural networks and suprathreshold stimulation of vagosympathetic nerve. *Med Sci Monit*, 21, 82-9.

Lundgren, O., Svanvik, J. & Jivegård, L. 1989. Enteric nervous system. *Digestive Diseases and Sciences*, 34, 264-283.

Machhada, A., Marina, N., Korsak, A., Stuckey, D. J., Lythgoe, M. F. & Gourine, A. V. 2016. Origins of the vagal drive controlling left ventricular contractility. *The Journal of Physiology*, 594, 4017-4030.

McWilliams, T. G., Howard, L., Wyatt, S. & Davies, A. M. 2015. Regulation of autocrine signaling in subsets of sympathetic neurons has regional effects on tissue innervation. *Cell Rep*.

Medić, B. 2016. The role of autonomic control in cardiovascular system: Summary of basic principles. *Medicinski podmladak*, 67, 14-18.

Meijering, E. 2010. Neuron tracing in perspective. *Cytometry Part A*, 77A, 693-704.

Mias, C., Coatrieux, C., Denis, C., Genet, G., Seguelas, M. H., Laplace, N., Rouzaud-Laborde, C., Calise, D., Parini, A., Cussac, D., Pathak, A., Senard, J. M. & Gales, C. 2013. Cardiac fibroblasts regulate sympathetic nerve sprouting and neurocardiac synapse stability. *PLoS One*, 8, e79068.

Moe, G. K. 1968. A conceptual model of atrial fibrillation. *J Electrocardiol*, 1, 145-6.

Muskens, L. J. J. 1898. The analysis of the action of the vagus nerve upon the heart. Preliminary notice. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 33, 185-188.

Nagatsu, T., Levitt, M. & Udenfriend, S. 1964. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*, 239, 2910-7.

Napoli, A., Xie, J. & Obeid, I. 2014. Understanding the temporal evolution of neuronal connectivity in cultured networks using statistical analysis. *BMC Neurosci*, 15, 17.

Neher, E. & Sakmann, B. 1992. The patch clamp technique. *Sci Am*, 266, 44-51.

Neuhuber 2009. Anatomie des autonomen nervensystems. *Das autonome Nervensystem*. W. Kohlhammer Verlag.

Neuzner, J. & Pitschner, H. F. 2007. Vorhofflimmern vorhofflattern. Springer.

Ng, G. A. 2016. Neuro-cardiac interaction in malignant ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Auton Neurosci*.

Nozdrachev, A. D. & Masliukov, P. M. 2011. [neuropeptide γ and autonomic nervous system]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 47, 105-12.

Nyquist-Battie, C., Cochran, P. K., Sands, S. A. & Chronwall, B. M. 1994. Development of neuropeptide γ and tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation in postnatal rat heart. *Peptides*, 15, 1461-9.

Parsons, R. 2004. Mammalian cardiac ganglia as local integration centers: Histochemical and electrophysiological evidence. *In: DUN, N., MACHADO, B. & PILOWSKY, P. (eds.) Neural mechanisms of cardiovascular regulation*. Springer US.

Pauza, D. H., Saburkina, I., Rysevaite, K., Inokaitis, H., Jokubauskas, M., Jalife, J. & Pauziene, N. 2013. Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system: A combined stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. *Auton Neurosci*, 176, 32-47.

Pauza, D. H., Skripka, V., Pauziene, N. & Stropus, R. 2000. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. *Anat Rec*, 259, 353-82.

Pauza, D. H., Skripkiene, G., Skripka, V., Pauziene, N. & Stropus, R. 1997. Morphological study of neurons in the nerve plexus on heart base of rats and guinea pigs. *J Auton Nerv Syst*, 62, 1-12.

Rabejac, D., Raymond, J. & Dechesne, C. J. 1994. Characterization of different neuron populations in mouse statoacoustic ganglion cultures. *Brain Res*, 652, 249-56.

Richardson, R. J., Grkovic, I. & Anderson, C. R. 2003. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res*, 314, 337-50.

Ruit, K. G., Osborne, P. A., Schmidt, R. E., Johnson, E. M., Jr. & Snider, W. D. 1990. Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci*, 10, 2412-9.

Rysevaite, K., Saburkina, I., Pauziene, N., Noujaim, S. F., Jalife, J. & Pauza, D. H. 2011a. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm*, 8, 448-54.

Rysevaite, K., Saburkina, I., Pauziene, N., Vaitkevicius, R., Noujaim, S. F., Jalife, J. & Pauza, D. H. 2011b. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*, 8, 731-8.

Saper, C. B. 2002. The central autonomic nervous system: Conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 433-469.

Sartiani, L., Bochet, P., Cerbai, E., Mugelli, A. & Fischmeister, R. 2002. Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current $i(f)$ in immortalized h1-1 cardiomyocytes. *J Physiol*, 545, 81-92.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.

Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P. & Goette, A. 2011. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal. *Physiol Rev*, 91, 265-325.

Schultheiss, M., Januschowski, K., Ruschenburg, H., Schramm, C., Schnichels, S., Szurman, P., Bartz-Schmidt, K. U. & Spitzer, M. S. 2013. Dulbecco's modified eagle medium is neuroprotective when compared to standard vitrectomy irrigation solution. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 251, 1613-9.

Schümann, H. J. 1983. What role do α - and β -adrenoceptors play in the regulation of the heart? *European Heart Journal*, 4, 55-60.

Scott, E. K. & Luo, L. Q. 2001. How do dendrites take their shape? *Nature Neuroscience*, 4, 359-365.

Shen, M. J. & Zipes, D. P. 2014. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res*, 114, 1004-21.

Shields, R. W., Jr. 1993. Functional anatomy of the autonomic nervous system. *J Clin Neurophysiol*, 10, 2-13.

Shivkumar, K., Ajjola, O. A., Anand, I., Armour, J. A., Chen, P. S., Esler, M., De Ferrari, G. M., Fishbein, M. C., Goldberger, J. J., Harper, R. M., Joyner, M. J., Khalsa, S. S., Kumar, R., Lane, R., Mahajan, A., Po, S., Schwartz, P. J., Somers, V. K., Valderrabano, M., Vaseghi, M. & Zipes, D. P. 2016. Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience-based cardiovascular therapeutics. *J Physiol*, 594, 3911-54.

Shooter, E. M. 2001. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci*, 24, 601-29.

Souders, C. A., Bowers, S. L. & Baudino, T. A. 2009. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circ Res*, 105, 1164-76.

Sun, J., Lu, Y., Wugeti, N. & Aikemu, A. 2015. The influence of cardiac autonomic nerve plexus on the electrophysiological properties in canines with atrial fibrillation. *Int J Clin Exp Med*, 8, 4968-78.

- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Namba, T. & Kaibuchi, K. 2015. Neuronal polarization. *Development*, 142, 2088-93.
- Verkerk, A. O., Remme, C. A., Schumacher, C. A., Scicluna, B. P., Wolswinkel, R., De Jonge, B., Bezzina, C. R. & Veldkamp, M. W. 2012. Functional nav1.8 channels in intracardiac neurons: The link between scn10a and cardiac electrophysiology. *Circ Res*, 111, 333-43.
- Wake, E. & Brack, K. 2016. Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *Auton Neurosci*, 199, 3-16.
- Wang, L., Henrich, M., Buckler, K. J., Mcmenamin, M., Mee, C. J., Sattelle, D. B. & Paterson, D. J. 2007. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases [ca²⁺]_i in cardiac sympathetic neurons. *J Mol Cell Cardiol*, 43, 717-25.
- Wang, X., Huang, C., Zhao, Q., Huang, H., Tang, Y., Dai, Z., Wang, X., Guo, Z. & Xiao, J. 2015. Effect of renal sympathetic denervation on the progression of paroxysmal atrial fibrillation in canines with long-term intermittent atrial pacing. *Europace*, 17, 647-54.
- White, S. M., Constantin, P. E. & Claycomb, W. C. 2004. Cardiac physiology at the cellular level: Use of cultured hl-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H823-9.
- Williams, R. W. & Herrup, K. 1988. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci*, 11, 423-53.
- Xi, X., Randall, W. C. & Wurster, R. D. 1991. Morphology of intracellularly labeled canine intracardiac ganglion cells. *J Comp Neurol*, 314, 396-402.
- Xin, Y., Liu, S., Xu, X. F., Li, W. B., Huang, Y. M., Luo, Y. & Zhou, Y. J. 2012. [primary culture and biological characteristics of cardiac fibroblasts of adult mice]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 28, 1194-9.
- Yang, D., Xi, Y., Ai, T., Wu, G., Sun, J., Razavi, M., Delapasse, S., Shurail, M., Gao, L., Mathuria, N., Elayda, M. & Cheng, J. I. E. 2011. Vagal stimulation promotes atrial electrical remodeling induced by rapid atrial pacing in dogs: Evidence of a noncholinergic effect. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 34, 1092-1099.
- Yu, Y., Wei, C., Liu, L., Lian, A. L., Qu, X. F. & Yu, G. 2014. Atrial fibrillation increases sympathetic and parasympathetic neurons in the intrinsic cardiac nervous system. *Pacing Clin Electrophysiol*, 37, 1462-9.
- Zhang, Y., Scherlag, B. J., Lu, Z., Niu, G. D., Yamanashi, W. S., Hogan, C., Fields, J., Ghias, M., Lazzara, R., Jackman, W. M. & Po, S. 2009. Comparison of atrial fibrillation inducibility by electrical stimulation of either the extrinsic or the intrinsic autonomic nervous systems. *J Interv Card Electrophysiol*, 24, 5-10.

13 Kongressbeiträge

Jonas F, Eickholt C, Unland D, Bönner F, Pohl J, Lukosz M, Shin D-I, Veldkamp M W, Schrader J, Klöcker N, Rassaf T, Kelm M, Meyer C: **Morphometric Characterization of Intracardiac Neurons Modulating Atrial Cardiac Electrophysiology**, 80. Jahrestagung der DGK 2014; 23. - 26.4.2014, Mannheim

Eickholt C, **Jonas F**, Bönner F, Shin D-I, Veldkamp M W, Schrader J, Klöcker N, Rassaf T, Kelm M, Meyer C: **Morphometric Characterization of Intracardiac Neurons Modulating Atrial Cardiac Electrophysiology**, Posterbeitrag zum ESC Congress 2014; 30.08. - 03.09.2014, Barcelona

14 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Friederike Jonas
Geburtsdatum	12. Februar 1989
Geburtsort	Aachen
Nationalität	Deutsch

Schulbildung

1996 – 2000	Grundschule Martinschule, Andernach
2000 – 2008	Bertha-von-Suttner Gymnasium, Andernach
03/2008	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife, Bertha-von-Suttner Gymnasium Andernach

Studium

10/2009 – 04/2010	Studium der Humanmedizin, Johannes-von-Gutenberg-Universität Mainz
04/2010 – 04/2016	Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2012	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2016	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (schriftlich)
04/2016 – 05/2017	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
05/2017	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (mündlich-praktisch)

Berufliche Tätigkeit

Seit 07/2017	Assistenzärztin, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Leipzig
--------------	--

Kongressbeiträge

Posterbeitrag zur 80. Jahrestagung der DGK 2014;
23. - 26.4.2014, Mannheim

15 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Stephan Willems, Direktor der Klinik für Kardiologie mit Schwerpunkt Elektrophysiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg, dass ich diese Dissertation an seiner Klinik durchführen durfte.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Meyer und Dr. med. Christian Eickholt, die mir von Beginn bis zur Fertigstellung der Arbeit auf außerordentliche Weise zur Seite gestanden haben und mir das wissenschaftliche Arbeiten nähergebracht haben. Insbesondere die aufwendige Ausarbeitung der Methodik wäre ohne sie nicht möglich gewesen.

Zusätzlich danke ich Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker, Leiter des Instituts für Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Düsseldorf sowie besonders seiner Mitarbeiterin Annett Schröter, die mir die Methodik der zellulären Elektrophysiologie beigebracht und ausgiebig erklärt hat.

Allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre freundliche Unterstützung. Besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden für das gegenseitige Motivieren und Korrigieren der Arbeit.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihren liebevollen moralischen und finanziellen Rückhalt. Von ganzem Herzen möchte ich meinem Freund für seine Geduld und Motivation danken.

16 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: