

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor:

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Eigenschaften und Veränderungen von spannungsgesteuerten K^+ -Strömen und ihr Einfluss auf das Aktionspotenzial in mechanisch entlasteten Kardiomyozyten der Ratte.

Dissertation

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

vorgelegt von:

Nils Hedinger
aus Hamburg

Hamburg November 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.11.2015**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med. A.P. Schwoerer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. C. Meyer

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	EINLEITUNG	6
2.1	ÜBERBLICK UND EINLEITUNG	6
2.2	PLASTIZITÄT DES HERZENS	7
2.3	HERZINSUFFIZIENZ	8
2.3.1	ÜBERBLICK	8
2.3.2	EPIDEMIOLOGIE	9
2.3.3	ÄTIOLOGIE	9
2.3.4	MORTALITÄT UND PROGNOSE	11
2.3.5	PATHOPHYSIOLOGIE	12
2.3.6	THERAPIE	14
2.4	VENTRIKULÄRE UNTERSTÜTZUNGSSYSTEME	16
2.4.1	KARDIALE UMBAUVORGÄNGE (REMODELING) BEI VAD-THERAPIE	17
2.4.2	KOMPLIKATIONEN DER VAD-THERAPIE	18
2.4.2.1	LVAD UND VENTRIKULÄRE RHYTHMUSSTÖRUNGEN	19
2.4.3	KARDIALE UMBAUVORGÄNGE (REMODELING) BEI HYPERTROPHIE UND ATROPHIE	20
2.5	ERREGUNGSBILDUNG UND ERREGUNGSausbreitung AM HERZEN	22
2.5.1	IONENKANÄLE	23
2.5.2	DAS RUHEMEMBRANPOTENZIAL (RMP)	24
2.5.3	DAS AKTIONSPOTENZIAL (AP) IN KARDIOMYOZYTEN	24
2.5.4	SPANNUNGSGESTEUERTE K ⁺ -KANÄLE (Kv-KANÄLE, HERG, KvLQT).	28
2.5.4.1	DER TRANSIENTE K ⁺ -AUSWÄRTSSTROM I _{To}	31
2.5.4.2	NEUROHUMORALE BEEINFLUSSUNG DES I _{To}	33
2.5.5	VERZÖGERTER GLEICHRICHTERSTROM I _K (I _{Kr} , I _{Ks} , I _{Sus}).	37
	NEUROHUMORALE BEEINFLUSSUNG DER „DELAYED RECTIFIER“-K ⁺ -STRÖME	38
2.5.6	EINWÄRTSGLEICHRICHTER STROM I _{K1}	38
2.5.7	EINWÄRTSGLEICHRICHTER KANÄLE I _{Kr}	38
2.6	ZIELE UND ARBEITSHYPOTHESEN DER ARBEIT	39
2.6.1	NOTWENDIGKEIT EINES TIERMODELLS	41
2.7	ZUSAMMENFASSUNG UND FRAGESTELLUNG	43
3.	MATERIAL UND METHODEN	45
3.1	TIERMODELL	45
3.1.1	ENTNAHME DES SPENDERHERZENS	45
3.1.2	IMPLANTATION / EMPFÄNGERTIER	46
3.1.3	DAUER DER ENTLASTUNGSTHERAPIE	46
3.2	LINKSVENTRIKULÄRE MASSE UND HERZFREQUENZ	47
3.3	ZELLISOLATION	49
3.4	PATCH CLAMP TECHNIK	50
3.4.1	DIE „CELL-ATTACHED“- KONFIGURATION	50
3.4.2	GANZZELABLEITUNG (WHOLE-CELL KONFIGURATION)	51
3.4.3	DIE RUPTURED-PATCH TECHNIK	51
3.4.4	STROM- UND SPANNUNGSKLEMME	51
3.4.5	DIE GANZZELABLEITUNG UND ELEKTRISCHE STRÖME	52
3.4.5.1	KOMPENSATION DES SERIENWIDERSTANDES R _s	52
3.4.5.2	ÜBERGANGSPOTENZIALE UND DEREN KOMPENSATION	53
3.4.6	VORZEICHEN	53
3.5	DAS PATCH-CLAMP SETUP	54
3.5.1	MECHANISCHE KOMPONENTEN UND SCHUTZ GEGEN UMWELTEINFLÜSSE	54
3.5.2	VERSUCHSKAMMER	54

3.5.3	ELEKTRISCHE KOMPONENTEN	55
3.5.3.1	DER VERSTÄRKER	55
3.5.3.2	ELEKTRODEN	56
3.5.3.3	DIE PIPETTEN	57
3.5.4	DURCHFÜHRUNG DER PATCH-CLAMP EXPERIMENTE	57
3.6	DIE PULSPROTOKOLLE UND STROMMESSUNGEN	60
3.6.1	ZELLKAPAZITÄT C_M UND SERIENWIDERSTAND R_S	60
3.6.2	RUHEMEMBRANPOTENZIAL (R_M). UND AKTIONSPOTENZIALDAUER APD	60
3.6.3	I_{T0} UND I_{T0} KINETIK (I_{T0} INAKTIVIERUNG UND ERHOLUNG VON DER INAKTIVIERUNG)	60
3.6.3.1	MESSUNG DES TRANSIENTEN K^+ - AUSWÄRTSSTROMS I_{T0}	61
3.6.3.2	INAKTIVIERUNGSZEITKONSTANTE τ (I_{T0})	62
3.6.3.3	STEADY - STATE - INAKTIVIERUNG	62
3.6.3.4	ERHOLUNG VON DER INAKTIVIERUNG	64
3.6.4	I_{SUS}	65
3.6.5	DER K^+ -EINWÄRTSGLEICHRICHTER STROM I_{K1}	65
3.7	QUANTITATIVE PCR - ANALYSE	66
3.8	AUSWERTUNG DER EXPERIMENTE / STATISTIK	66
3.9	DIE LÖSUNGEN, ENZYME UND CHEMIKALIEN	67
3.10	ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF	69
3.11	EXPERIMENTELLE EIGENLEISTUNG DES DOKTORANDEN	70
4.	ERGEBNISSE	71
4.1	HERZGEWICHT UND ZELLGRÖÖE	71
4.2	HERZFREQUENZ	73
4.3	REGIONALE EIGENSCHAFTEN DER AKTIONSPOTENZIALE	73
4.4	DER TRANSIENTE K^+ - AUSWÄRTSSTROM I_{T0}	76
4.4.1	STROMKURVENVERLAUF, STROMDICHTEN	76
4.4.2	KINETIK DES I_{T0}	79
4.4.2.1	INAKTIVIERUNGSKONSTANTE τ	81
4.4.2.2	STEADY-STATE INAKTIVIERUNG	82
4.4.2.3	ERHOLUNG VON DER INAKTIVIERUNG	82
4.5	VERZÖGERTER GLEICHRICHTENDER K^+ - STROM (DELAYED RECTIFIER) I_{SUS}	85
4.6	EINWÄRTS GLEICHRICHTENDER K^+ - STROM I_{K1} (K_{IR}).	86
4.7	mRNA - EXPRESSION VON Kv4.2, Kv4.3 UND KCHIP2	88
5	DISKUSSION	90
5.1	HERZGRÖÖE UND ZELLGRÖÖE NACH hHTx - ENTLASTUNG	91
5.2	AP - LÄNGENDIFFERENZ UND DEREN BEEINFLUSSUNG DURCH DIE REPOLARISIERENDEN K^+- STRÖME NACH hHTx - ENTLASTUNG	92
5.3	VERÄNDERUNGEN DER REPOLARISIERENDEN K^+- STRÖME NACH hHTx - ENTLASTUNG	93
5.4	VERÄNDERUNGEN DER KANALSTRUKTUR UND DER KANALEXPRESSSION DES I_{T0} NACH hHTx - ENTLASTUNG	96
5.4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER VERÄNDERUNGEN AN DEN KV KANÄLEN	99
5.5	LIMITATIONEN /EINSCHRÄNKUNGEN	100
5.5.1	EXPERIMENTELLE EINFLÜSSE	101
5.5.1.1	TEMPERATUR	101
5.5.1.2	$CaCl_2$ IN DER BADLÖSUNG	101
5.5.1.3	STIMULATIONSFREQUENZEN	102
5.5.1.4	DER EINFLUSS DER VOLATILEN ANÄSTHETIKA	102
5.5.2	ENDOKRINE/PARAKRINE EINFLÜSSE AUF Kv4.2/Kv4.3- KANÄLE	103
5.5.3	EINFLUSS DER CYTOSOLISCHEN Ca^{2+} - KONZENTRATION AUF Kv4.2, Kv4.3-KANÄLE	103
5.6	hHTx -TIERMODELL UND DER VERGLEICH MIT LVAD	104
5.6.1	hHTx vs. LVAD-THERAPIE: PHÄNOTYPISCHE UNTERSCHIEDE	104
5.6.2	hHTx vs. LVAD-THERAPIE: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSCHIEDE	106

5.7	ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEM I_{T0} UND DER Ca^{2+}-CALCINEURIN SIGNALKASKADE BEI DER MYOKARDIALEN STRESSANTWORT.	108
5.8	IMPLIKATIONEN / ERKENNTNISSE FÜR DIE VAD THERAPIE	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	120
9	LITERATURVERZEICHNIS	121
10	DANKSAGUNGEN	137
11	LEBENS LAUF	138
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	140

2 Einleitung

2.1 Überblick und Einleitung

In dieser Arbeit soll experimentell an einem Tiermodell das Verhalten von spannungsgesteuerten K^+ - Strömen und ihr Einfluss auf die Aktionspotenzialdauer bei mechanischer Entlastung untersucht werden.

Die Motivation, diese Fragestellung zu bearbeiten, wird in dieser Einleitung am klinischen Thema der terminalen Herzinsuffizienz, ihrer Entstehung sowie ihrer Therapie mittels mechanischer Entlastung des Herzens durch ein ventrikuläres Unterstützungssystem (Ventricular Assist Device=VAD), hergeleitet. Die im Rahmen der VAD-Therapie häufig neu auftretenden malignen Herzrhythmusstörungen (Kirklin et al 2014) legen eine Veränderung in der kardialen Elektrophysiologie bei Entlastung nahe. Um diese möglichen elektrophysiologischen Veränderungen besser verstehen zu können, wird im Anschluss auf die elektrophysiologischen und molekularen Grundlagen kardialer Erregungsausbreitung am gesunden Myokard eingegangen. Letztlich soll der bisher bekannte Stellenwert der spannungsgesteuerten K^+ -Ströme und ihrer Kanäle sowie ihr Einfluss auf die Aktionspotenzialdauer (APD) anhand von bisherigen Daten der Herzhypertrophie im Vergleich mit der kardialen Atrophie, bei mechanisch entlasteten Herzen, aufgezeigt werden. In diesem Kontext erfolgt die Ableitung der Arbeitshypothesen und der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

2.2 Plastizität des Herzens

Die Anforderungen, die im Laufe des Lebens an das Herz gestellt werden, sind vielfältig. Somit ist es obligat, dass es als Organ eine gewisse Anpassungsfähigkeit oder auch Plastizität besitzt, welche eine Anpassung an verschiedene Leistungsanforderungen gewährleistet. Es handelt sich dabei um Anpassungen an eine veränderte Vor- oder Nachlast, wie sie bei physiologischen Veränderungen, wie beispielsweise dem Übergang vom fetalen in den adulten Kreislauf, Schwangerschaft, gesteigerter sportlicher Aktivität, körperlicher Inaktivität oder bei Krankheitszuständen wie Bluthochdruck, Hyperthyreose oder Sepsis vorkommen können. Bei diesen Anpassungen handelt es sich zunächst noch um funktionelle Anpassungen wie Steigerung der Herzfrequenz und der Kontraktilität, mündet aber bei chronischer Steigerung der Herzarbeit in einen Umbau (remodeling), der sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch nachweisen lässt (Hill und Olson 2008).

Abbildung 1 Kardiale Plastizität

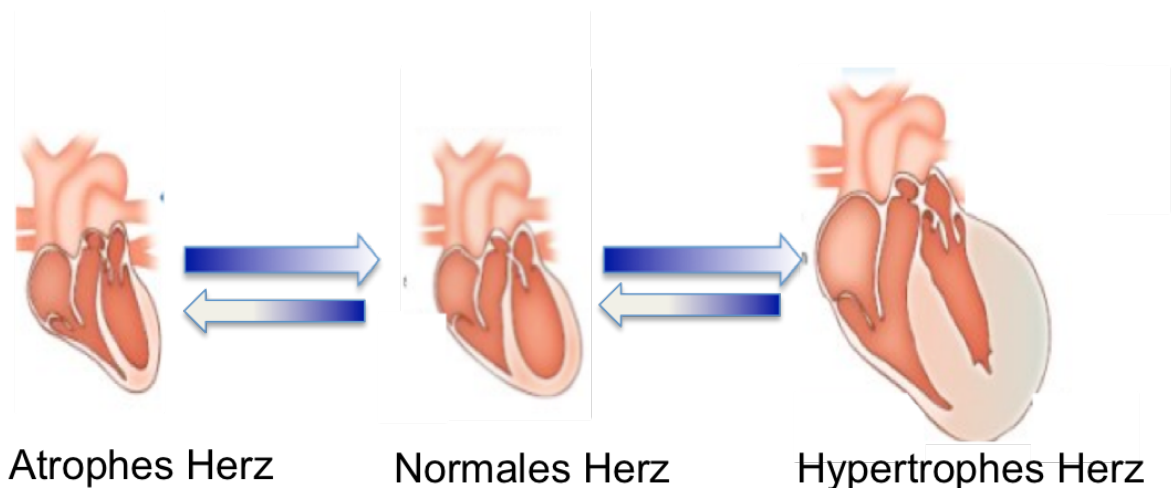


Abb 1 (modifiziert nach Hill und Olson 2008): Kardiale Anpassungsfähigkeit. Dargestellt ist die phänotypisch strukturelle Veränderung des Umbaus, welcher auf molekularer, biochemischer und struktureller Ebene abläuft.

Die Anpassung, die über mechanische Belastung oder eine neurohumorale Stimulation ausgelöst wird, führt phänotypisch zu einer Hypertrophie. Bei einer Reduktion dieser mechanischen und neurohumoralen Stimuli oder einer Denervierung kommt es hingegen zu einer Atrophie (Heineke und Molkentin 2006, Hill und Olson 2008). Die Anpassungsvorgänge sind potenziell reversibel (Dorn 2007, Hill und Olson 2008). Somit führt eine Änderung der Herzbelastung zu einer Änderung im jeweiligen Phänotyp. Diese Plastizität ist ein Kontinuum von Zuständen ohne klare Abgrenzung zwischen den einzelnen Phänotypen (Hill und Olson 2008) (Abb 1).

2.3 Herzinsuffizienz

2.3.1 Überblick

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes Krankheitsbild mit verschiedensten Ätiologien und Ausprägungen. Die WHO definierte die Herzinsuffizienz 1995 wie folgt:

Herzinsuffizienz ist charakterisiert durch die Unfähigkeit des Herzens, Blut und somit Sauerstoff in dem Maße zu den Endorganen zu transportieren, dass es den Bedürfnissen gerecht wird.

Jedoch wird mit dieser Definition nur die gemeinsame Endstrecke aller Herzinsuffizienzen beschrieben. Die Herzinsuffizienz ist aber auch das Unvermögen des Herzens, bei ausreichenden Füllungsdrücken, ein für den aktuellen Bedarf des Körpers ausreichendes Herzzeitvolumen zu fördern. Die Funktionseinschränkung kann vornehmlich die Kontraktionskraft oder die Relaxationsfähigkeit und damit die Füllung des Herzens betreffen.

Die Herzinsuffizienz wird dabei noch in zwei Unterformen eingeteilt:

1. Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF):

Bei dieser steht eine Kontraktionsstörung mit konsekutiver Reduktion der Ejektionsfraktion (EF) im Vordergrund (früher: systolische Herzinsuffizienz). Dies führt zu einer Abnahme des Herzminutenvolumens (HMV) und wird auch als Vorwärtsversagen oder „low output failure“ bezeichnet. Die HFrEF macht ca. 50% aller Herzinsuffizienzen aus. Im Falle großer Shuntvitien und einem dadurch entstehenden, hochgradig reduzierten, peripheren Widerstand kann es, trotz hohem Herzzeitvolumen, zu einer „high output failure“ kommen.

2. Herzinsuffizienz mit erhaltender Ejektionsfraktion (HFpEF):

Hier steht die eingeschränkte Relaxationsfähigkeit (vormals: diastolische Herzinsuffizienz) im Vordergrund. Hierbei kommt es bei einer gestörten Herzfüllung zu einer Insuffizienz, die im Allgemeinen auch als „Rückwärtsversagen“ bekannt ist. Es kann darüber hinaus zu einer Kombination sowie Übergangsformen der beiden kommen. Weiterhin wird darüber hinaus zwischen Rechtsherz-, Linksherz- und globaler Herzinsuffizienz unterschieden (McMurray et al 2012).

Einteilung

Nach der New York Heart Association (NYHA) gibt es eine Einteilung in unterschiedliche Schweregrade nach dem Leitsymptom der Dyspnoe.

- NYHA I: keine körperlichen Einschränkungen. Belastung verursacht keine Dyspnoe.
Der Patient ist altersgemäß belastbar.
- NYHA II: Dyspnoe bei starker körperlicher Belastung
- NYHA III: Dyspnoe bei leichter körperlicher Belastung
- NYHA IV: Dyspnoe in Ruhe

2.3.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der klinisch manifesten Herzinsuffizienz liegt in Populationsstudien bei Männern und Frauen in den USA zwischen 65 und 69 Jahren bei 0,2-0,3% und verdoppelt sich in jeder weiteren Lebensdekade. Bei über 80-Jährigen liegt sie damit bei >0,8%. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Diese Daten sind in den letzten 10 Jahren nahezu stabil geblieben (Mc Murray und Stewart 2000, Curtis et al 2008). Die Verteilung zwischen HFpEF und HFrEF liegt ungefähr bei 1:1. Epidemiologisch bestehen hier allerdings Unterschiede: So sind Patienten mit HFpEF älter, häufiger weiblich und adipös. Sie haben darüber hinaus vermehrt Bluthochdruck und Vorhofflimmern sowie ein kleineres Risiko für KHK als Patienten mit HFrEF (McMurray et al 2012). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den USA stieg von 1994 bis 2003 von 90 auf 121/1000 Einwohner und steigt auch seitdem weiterhin an (Curtis et al 2008, Go et al 2013). Die jährlichen Krankenhauseinweisungen aufgrund von Herzinsuffizienz liegen in den USA bei mehr als 1 Mio./Jahr. Einen großen Anteil daran stellen bei der Herzinsuffizienz die Wiederaufnahmen der gleichen Patienten dar (Roger 2013). Die Kosten für die Behandlung von Herzinsuffizienz in den USA werden jährlich auf mehr als 30 Mrd. US\$ geschätzt (Go et al 2013).

2.3.3 Ätiologie

Die Entstehung der Herzinsuffizienz geht häufig auf eine Erkrankung des Herzmuskels zurück. Diese Kardiomyopathien werden in primäre und sekundäre Kardiomyopathien unterteilt. Die Ätiologien der primären Kardiomyopathien sind für einen Großteil der Patienten noch unbekannt und werden nach funktionellen Gesichtspunkten beschrieben. (Tab 1, A I a-e)

Es gibt eine hypertrophe, dilatative, arrhythmogene und restriktive Form sowie eine Form bei der es zu einer Störung der Verdichtung des Herzmuskels kommt. Die sekundären Kardiomyopathien werden hingegen nach ihren Ätiologien beschrieben. So unterscheidet man hier zwischen ischämischen, toxischen, hypertensiven, endokrinen, Schwangerschafts-assoziierten oder inflammatorischen Kardiomyopathien (Tab 1, A2 a-f). Diese Einteilung deutet bereits darauf hin, wie vielfältig die Ätiologien der Kardiomyopathien sind und aufgrund welcher äußerer Einflüsse und pathophysiologischer Veränderungen es zu einer Erkrankung des Herzmuskels kommen kann. Weitere Ursachen sind in Tabelle 1 B-F aufgeführt. Die gemeinsame Endstrecke dieser Krankheitsbilder ist die Minderversorgung des Organismus mit Sauerstoff und damit die „Herzinsuffizienz“ nach WHO-Definition (McMurray et al 2012). In den Industrieländern ist die koronare Herzkrankheit der Hauptauslöser für die ischämische Kardiomyopathie, alleine oder in Kombination mit der arteriellen Hypertonie (Roger 2013, Nichols et al 2014). In den sogenannten Drittweltländern sind inflammatorische Ursachen führend bei der Entstehung von Herzinsuffizienz. Dazu gehören vor allem die rheumatische Herzerkrankung, Chagas, und Myokarditiden im Rahmen von HIV und TBC (WHO 2004, Mayosi et al 2005, Moncano und Yanine 2006). Ebenso können valvuläre Dysfunktion, kardiale Vitien, toxische Schädigungen (Ethanol, Kokain, Chemotherapie) und Diabetes mellitus an der Entstehung beteiligt sein. Auch Infektionen tragen immer häufiger zur Entstehung der Herzinsuffizienz bei. Beispiele dafür sind Herzinsuffizienz in Folge einer Myokarditis, Endokarditis oder einer septischen Kardiomyopathie (Kannel und Belanger 1991, Ho et al 1993, Cowie et al 1999). Es ist daher nicht leicht beim Vorliegen mehrerer möglicher Auslöser die ursprüngliche Ursache zu identifizieren. Auch hier ist eine multimodale Genese möglich (McMurray und Stewart 2000, McMurray et al 2012).

Tabelle 1 Ursachen der Herzinsuffizienz

Ursachen der Herzinsuffizienz		
A	Myokarderkrankungen /Kardiomyopathien (CMP)	
I	primär/familiär	
	a	hypertroph
	b	dilatativ
	c	arrythmogen
	d	restriktiv
	e	strukturell (non-compaction Kardiomyopathie)
II	sekundär/erworben	
	a	ischämisch (KHK)
	b	hypertensiv
	c	inflammatorisch/myokarditisch
	d	endokrin
	e	Schwangerschafts-assoziiert
	f	infiltrativ (Neoplasien, Amyloidose)
B	valvuläre Herzinsuffizienz	
C	perikardiale Herzinsuffizienz	
D	kongenitale Herzinsuffizienz	
E	arrythmogene Herzinsuffizienz	
F	Volumenbelastungs-Herzinsuffizienz (iatrogen,renal)	

Tab 1 (Modifiziert nach McMurray et al 2012): Ätiologien der Herzinsuffizienz.
KHK: Koronare Herzerkrankung

2.3.4 Mortalität und Prognose

In der Framingham Studie lag die Mortalitätsrate bei Patienten mit Herzinsuffizienz fünf Jahre nach Diagnosestellung noch zwischen 62-75% bei Männern und 38-42% bei Frauen (Ho et al 1993). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach neueren Daten im Mittel bei ca. 50%, die 10-Jahresüberlebensrate bei ca. 10% (Roger et al 2004, Roger 2013). Damit hat sich die Mortalität der Herzinsuffizienz leicht verbessert, erreicht aber eine ähnlich hohe Mortalitätsrate wie maligne Neoplasien (McMurray und Stewart 2000). Durch eine höhere Überlebensrate akuter Myokardinfarkte, die Zunahme von Risikofaktoren für Herzinsuffizienz, wie z.B. höheres Alter, Adipositas oder Typ-II-Diabetes sowie einer allgemeinen Verbesserung der Therapie durch vermehrten Einsatz mechanischer Unterstützungssysteme, ist mit einer Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz in den nächsten Jahren in Europa und den USA zu rechnen (Roger 2013, Nichols et al 2014).

2.3.5

Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist seit vielen Jahrzehnten Gegenstand von intensiver Forschung. Dies führte dazu, dass es heute viele Modelle gibt, die versuchen die verschiedenen Pathomechanismen, die der Herzinsuffizienz zu Grunde liegen, zu erklären und zu beschreiben (Braunwald 2013).

Abbildung 2 Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz

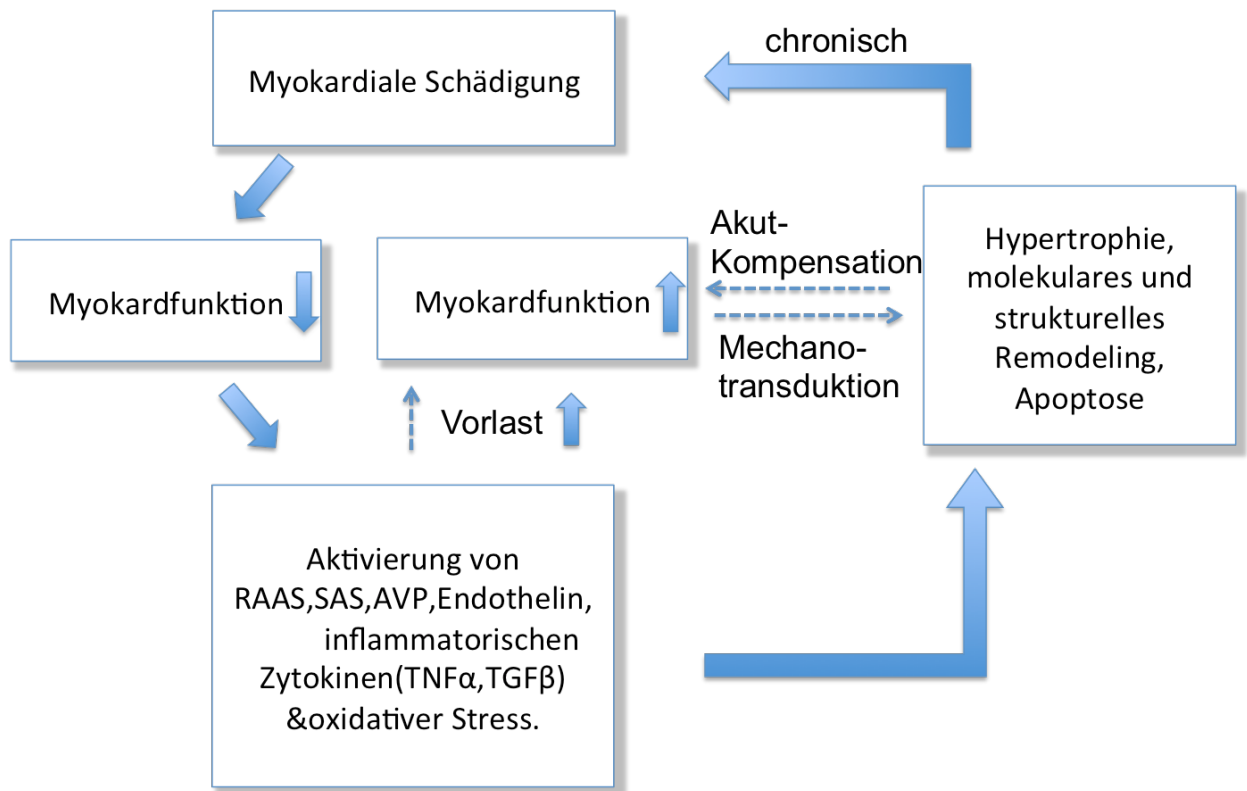


Abb 2 (Modifiziert nach Braunwald 2013): Die Möglichkeiten der Akutkompensation sind endlich und führen bei chronischer Überbelastung des Herzens, die zum Teil durch die eigenen Kompensationsmechanismen noch verstärkt werden, im Verlauf zu einer weiteren myokardialen Schädigung und Verschlechterung der kardialen Funktion.

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; SAS: Sympathiko-Adrenerges-System; AVP: Arginin Vasopressin; TNF: Tumor Nekrose Faktor TGF: Transforming Growth Faktor

Am Anfang der Herzinsuffizienz steht in den meisten Fällen eine myokardiale Schädigung, die zu einer direkten Abnahme der myokardialen Funktion führt. Ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot oder mechanischer Stress durch eine Überbelastung, aktiviert bei der Herzinsuffizienz eine Reihe von Kompensationsmechanismen (Abb 2). Unter anderem führt es zu einer Erhöhung des Sympathikotonus, einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und zu einer Ausschüttung natriuretischer Peptide (BNP, ET1) und anderer Zytokine wie beispielsweise TGF β und

TNF α (Depre et al 1998, Braunwald 2013, Lyon et al 2015). Diese Kompensationsmechanismen tragen initial zu einer Verbesserung der Herzfunktion und der allgemeinen Organperfusion bei, führen aber gleichzeitig durch verschiedene molekulare und strukturelle Umbauvorgänge („remodeling“) des Herzens zu einem Fortschreiten der Erkrankung. Die unterschiedlichen Kompensationsmechanismen haben ein gemeinsames Ziel: die Organperfusion und das Sauerstoffangebot an den Zielorganen zu verbessern. Es kommt zu einer neuroendokrinen und einer morphologischen Anpassung (Plastizität des Herzens), die beide von elektrophysiologischen Veränderungen des Herzens begleitet werden (Volk et al 2000). Diese Anpassungen und Kompensationsmechanismen können in den ersten Krankheitsstadien dazu führen, dass die Organperfusion und Versorgung des Organismus mit Sauerstoff aufrechterhalten werden kann. Jedoch sind diese Anpassungsmechanismen endlich und es gibt einen fließenden Übergang zwischen Kompensation und Dekompensation, welchen man mit medikamentösen Methoden lediglich verzögern kann. Die Aktivierung des sympathikoadrenergen Systems führt kurzfristig zu einer Zunahme der Kontraktilität des Myokards und zu einer Anhebung des peripheren Widerstandes und damit des arteriellen Blutdrucks. Damit kann zunächst eine bessere Organperfusion und O₂ - Versorgung gewährleistet werden. Der erhöhte Blutdruck hingegen bedeutet für das Herz eine erhöhte Arbeitsbelastung: Es muss nun gegen die höhere Nachlast an arbeiten (Braunwald 2013). Durch Hypertrophie versucht der Herzmuskel zunächst der höheren Arbeitsbelastung gerecht zu werden. Das Wachstum der Kardiomyozyten wird allerdings zum einen durch das Verhältnis von DNA zu Zytoplasma und zum anderen durch eine Erhöhung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff und Energieträger begrenzt. Die versorgenden Blutgefäße wachsen beim Größerwerden des Muskels nicht mit (Campbell 1991, Rakusan et al 1996). Diese chronische Hypoxie wird darüber hinaus noch durch eine Zunahme der transmuralen Wandspannung verstärkt. Die Zunahme der Wandspannung führt nach dem Mechanotransduktions-modell zu weiteren strukturellen, elektrophysiologischen und molekularen Umbauvorgängen, die unter anderem durch eine Veränderung des Ca²⁺-Haushaltes und durch Veränderung von Strukturproteinen zu einer weiteren Verschlechterung der Herzfunktion beitragen (Lyon et al 2015). Es kommt zu einem Untergang von gesundem Herzgewebe (Apoptose (Abb 2)), welches durch Narbengewebe ersetzt wird. Dieses wiederum führt zu einer weiteren Verschlechterung der Relaxations- und der Kontraktionsfähigkeit des Herzens (Klinke et al 2010, Buyandelger et al 2014, Lyon et al 2015). Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems führt durch eine Erhöhung der Vorlast und den Frank-Starling-Mechanismus zwar zu einer Erhöhung der EF und damit zu einer Steigerung der allgemeinen Organperfusion, jedoch ist dieser Mechanismus endlich und führt letztlich zu einem Rückstau des Blutes, zu einer Dilatation der Herzhöhlen und damit zu einer Verschlechterung der Organfunktion (Klinke et al 2010, Braunwald 2013). Auch die elektrophysiologischen Veränderungen übermäßig druckbelasteter Herzen, wie beispielsweise, die Verlängerung der Aktionspotenziale haben durch ihren größeren Ca²⁺-Einstrom eine verbesserte Inotropie zur Folge, jedoch kann die abnormal verlängerte Depolarisation zu einer Verlängerung der QT-Zeit im Oberflächen-EKG führen. Gerade diese QT-Zeit-Verlängerung kann ab einem gewissen Punkt das Herz für maligne Herzrhythmusstörungen

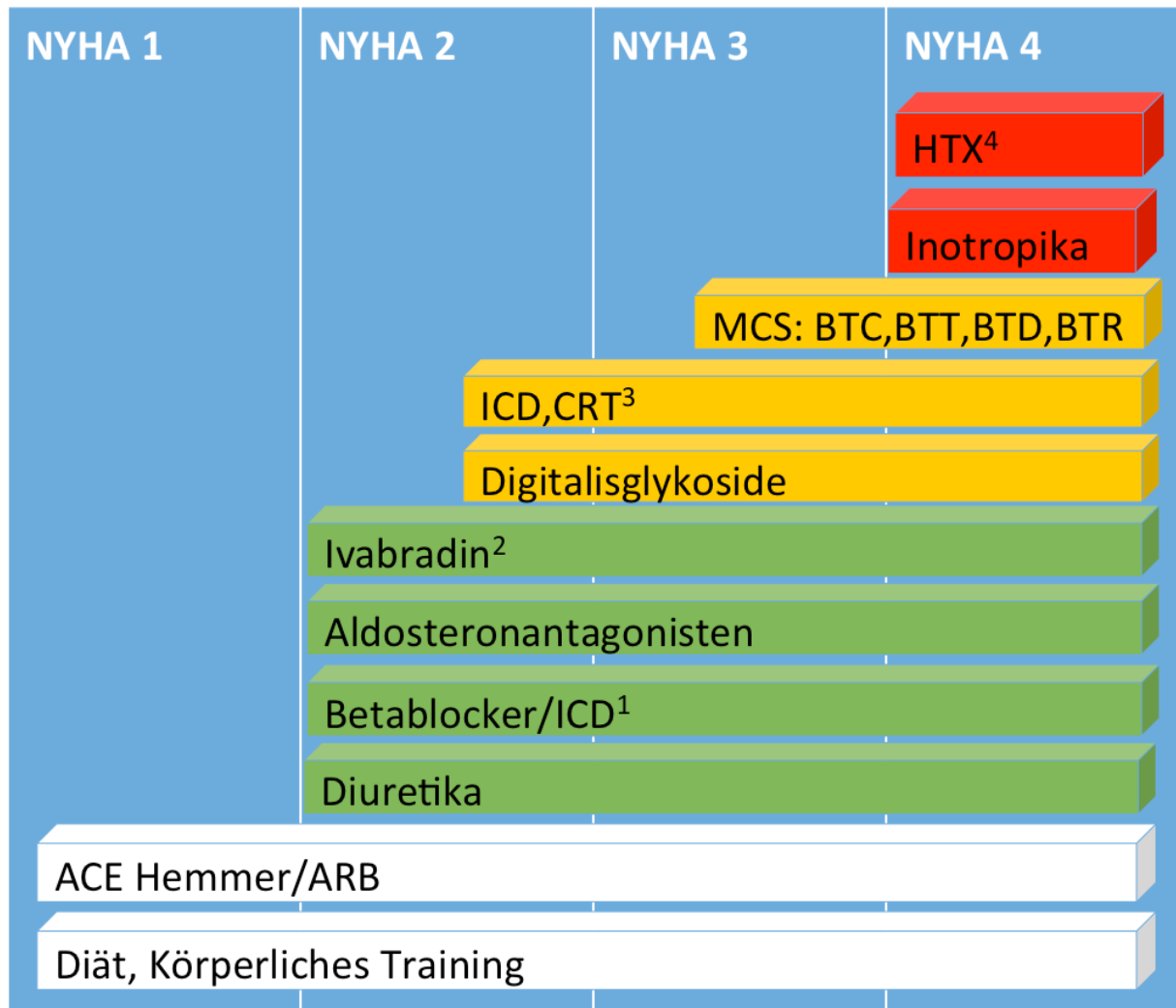
anfällig machen (Volk et al 2000). Es kommt trotz aller Umbauvorgänge zu der Ausbildung eines circulus vitiosus (Abb 2).

2.3.6 Therapie

Die Therapie der Herzinsuffizienz ist, wie in der modernen evidenzbasierten Medizin üblich, in einem ständigen Fluss. Alte Therapieregime werden immer wieder gegen neue experimentelle Ansätze auf die Probe gestellt. Darüber hinaus gibt es auch technologische Fortschritte, die Veränderungen in die Therapie der Herzinsuffizienz bringen. Es existieren aktuell zwei, zum Teil sehr unterschiedliche, Leitfäden für Therapieempfehlungen. Zum einen gibt es die Empfehlungen der European Society of Cardiology (ESC), die 2012 ihre letzten Empfehlungen veröffentlicht hat. Zum anderen stehen den europäischen Empfehlungen die Empfehlungen der American Heart Association (AHA) von 2013 gegenüber. Als Therapieziele werden eine allgemeine Reduktion der Mortalität und Morbidität und damit eine Verbesserung der messbaren Lebensqualität sowie eine Reduktion der Anzahl von Krankenhausaufnahmen der Patienten mit Herzinsuffizienz angeführt (Remme et al 2001, McMurray 2012, Yancy et al 2013). Beiden Empfehlungen gemein ist die Therapie der Herzinsuffizienz so früh wie möglich durch Präventionsmaßnahmen, wie Aufklärung und Behandlung sowie Vermeidung der Risikofaktoren bereits vor Beginn der einsetzenden Symptomatik, zu beginnen. Darüber hinaus liegt in beiden Empfehlungen der Schwerpunkt vornehmlich auf Behandlungsempfehlungen für die Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (HFrEF) (McMurray et al 2012, Yancy et al 2013). Im Folgenden sind die aktuellen europäischen Empfehlungen zusammengefasst. Präventionsmaßnahmen wie Patientenaufklärung, körperliches Training oder Diät bilden die Basis der Therapie. Darüber hinaus sollten die Ursachen der Herzinsuffizienz therapiert werden. Dazu gehören die Operationen von geschädigten Herzklappen oder Vitien genauso wie die perkutane Koronarintervention (PCI) oder die Koronarbypassoperation (CABG). Die medikamentöse Therapie wird, je nach Stadium, Symptomen sowie individueller Verträglichkeit und Vorerkrankungen, bereits in NYHA Stadium 1 begonnen und gipfelt im Einsatz von inotropen Substanzen im NYHA Stadium 4 (Abb 3). Für die Behandlung der HFpEF sind bisher nur wenige mortalitätsverbessernde Maßnahmen bekannt. Ein Schwerpunkt liegt hier auf der Therapie des arteriellen Hypertonus, einer Gewichtsreduktion und einer Diuretika Therapie zur Reduktion der Stauungssymptome. Die Prognose ist insgesamt besser als bei der HFrEF (McMurray et al 2012). Im Vergleich mit älteren Leitfäden zur Behandlung der Herzinsuffizienz rücken Maßnahmen zur nicht-medikamentösen Therapie zunehmend in frühere Stadien der Herzinsuffizienz vor (Remme et al 2001, McMurray et al 2012) (Abb 3). Dieser Trend wird sich, verschiedener Expertenmeinungen nach,

auch in näherer Zukunft fortsetzen vor allem was den zeitlich frühere Einsatz von MCS-Systemen (Mechanical circulatory support), insbesondere von linksventrikulären Unterstützungssystemen (LVAD), betrifft (Braunwald 2013, Tschöpe et al 2015).

Abbildung 3 Therapiestufen bei Herzinsuffizienz nach ESC 2012



¹ICD EF<35% und NYHA >II

²Wenn SR, HF>70 und EF<35%

³CRT LBBB, QRS>120ms oder QRS>150ms

⁴ O₂ Aufnahme VO₂max<12ml/kg/min

Abb 3 nach „ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure“ (McMurray et al 2012) sowie nach „Therapie der chronischen Herzinsuffizienz“ (Tschöpe et al 2015).

HTX: Herztransplantation; **MCS:** Mechanische Unterstützungssysteme; **BTC:** Überbrückung bis zur Listung für HTX; **BTT:** Überbrückung bis zur Transplantation; **BTD:** MCS als endgültige Therapie; **BTR:** Überbrückung bis zur Erholung **ICD:** implantierter Kardioverter/Defibrillator; **CRT:** kardiale Resynchronisationstherapie

2.4 Ventrikuläre Unterstützungssysteme

Je fortgeschrittener das Stadium der Herzinsuffizienz ist, desto höher ist das Risiko einer kardialen Dekompensation und damit eines möglichen Herz-Kreislaufversagens. Bis vor ca. 20 Jahren stand am Ende der Therapieoptionen nur das Organersatzverfahren der Herztransplantation. Da Spenderorgane knapp sind und eine sorgfältige Auswahl getroffen werden muss, kann sich die Wartezeit auf ein passendes Organ über Jahre hinziehen. Um diese Zeit zu überbrücken, werden seit Anfang der 1990er Jahre mechanische Unterstützungssysteme, so genannte „ventricular assist devices“ (VADs), entwickelt. Es handelt sich dabei um Pumpensysteme, die operativ in den erkrankten Ventrikel eingebracht werden, um diesen zu entlasten und die Pumpfunktion zu augmentieren. Diese Systeme werden hauptsächlich bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Endstadium zur Überbrückung der Wartezeit zur Transplantation eingebaut, „bridge to transplant“ (BTT) (Mancini et al 1998, Yacoub et al 2001, Dandel et al 2005, Birks et al 2006) (Abb 4). Sollte es Kontraindikationen für eine Transplantation, wie beispielsweise eine konsumierende neoplastische Erkrankung geben, kann die VAD Therapie auch als endgültige Therapie eingesetzt werden. Dies wird dann „destination therapy“ genannt (Rose et al 2001).

Abbildung 4 Ventricular Assist Devices (VADs)

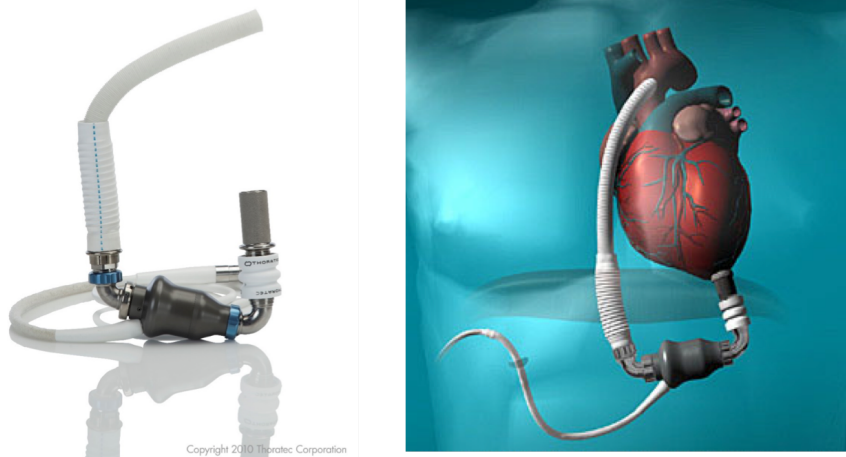


Abb 4: Bilder von Thoratec®: Heartmate II. Es handelt sich um ein LVAD der 2. Generation mit kontinuierlichem Fluss. Das System wird subdiaphragmal implantiert, saugt Blut aus der Spitze des linken Ventrikels an und pumpt mit einem Titan-ummantelten Propeller (Impeller) das Blut in die Aorta ascendens. Die Pumpe kann elektromagnetisch 6000-13000 Umdrehungen/Minute erzeugen und generiert damit einen Blutfluss von bis zu 10 Litern/Minute- je nach Differentialdruck und Blutzufuhr aus der Lunge/dem rechten Herzen. Die Steuerung und Stromversorgung erfolgt von extern.

Seit einigen Jahren hat sich die VAD-Therapie zum de-facto Goldstandard der chirurgischen Therapie der terminalen Herzinsuffizienz entwickelt (Tschöpe et al 2015). Die Gründe hierfür sind zum einen die

begrenzte Zahl von Spenderorganen, die dem wachsenden Bedarf der Patienten mit schwerster Herzinsuffizienz nicht gerecht werden kann. Zum anderen ist die Implantation eines VADs mit einer deutlich geringeren Morbidität und Mortalität verbunden als eine Herztransplantation (HTX). Mittlerweile werden in Deutschland und den USA jährlich ca dreimal so viele VADs implantiert wie Herzen transplantiert (Funkat et al 2014, Kirklin et al 2014). Mit der Einführung der zweiten Generation von Unterstützungssystemen, die anstelle eines pulsatilen Flusses einen kontinuierlichen Fluss erzeugen (wie z.B. das Heartmate II von Thoratec® (Abb 4)), konnten die Überlebensraten und -Zeiten nach VAD-Implantation gegenüber den Geräten der 1. Generation noch einmal deutlich verbessert werden. Die 1-Jahres-Überlebensrate nach der Implantation eines Herzunterstützungssystems ist mittlerweile besser als die einer Herztransplantation. Der Gewinn an Lebensqualität für die Patienten mit LVAD ist vergleichbar mit dem herztransplantierten Patienten (Kirklin et al 2014, Tschöpe et al 2015, ISHLT.org 2015). Die neueste Generation von VAD-Geräten, wie beispielsweise das Heartware® HVAD®, können mittlerweile auch ohne Sternotomie oder extrakorporale Zirkulation, also „off-pump“, implantiert werden (Riebandt et al 2014, Rojas et al 2015). Dies führt unter anderem dazu, dass der Eingriff deutlich besser toleriert wird als eine HTX.

2.4.1 Kardiale Umbauvorgänge (remodeling) bei VAD-Therapie

Bei Patienten unter VAD-Therapie beobachteten einige Autoren bereits vor etwa 10 Jahren, dass durch die Reduktion der Herzarbeit ein kardialer Umbauvorgang initiiert werden konnte, der zu einer Verbesserung der Ventrikelgeometrie, der Kontraktilität und letztlich des Herzzeitvolumens führte (Dandel et al 2005). Es konnte bei einigen Patienten eine so umfangreiche Verbesserung der myokardialen Kontraktion und Funktion erzielt werden, dass eine Explantation der Systeme möglich wurde (Birks et al 2006, Miller et al 2007). So zeigten Birks et al 2006 an einem streng selektierten Patientenkollektiv, dass nach Explantation der Pumpensysteme, lediglich bei einem der 15 untersuchten Patienten eine Herztransplantation nötig wurde. Ein weiterer Patient brauchte einen biventrikulären Schrittmacher. Die anderen Patienten zeigten während der Nachuntersuchungszeit eine konstante und ausreichende Ejektionsfraktion (Birks et al 2006). Diese Ergebnisse bleiben insbesondere aufgrund der viel schlechteren INTERMACS-Zahlen (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support 2014) umstritten, konnten aber 2011 in einer prospektiven Studie verifiziert werden (Birks et al 2011) (Abb 5).

Abbildung 5 Entwicklung der Ejektionsfraktion nach Explantation des VADs nach Birks

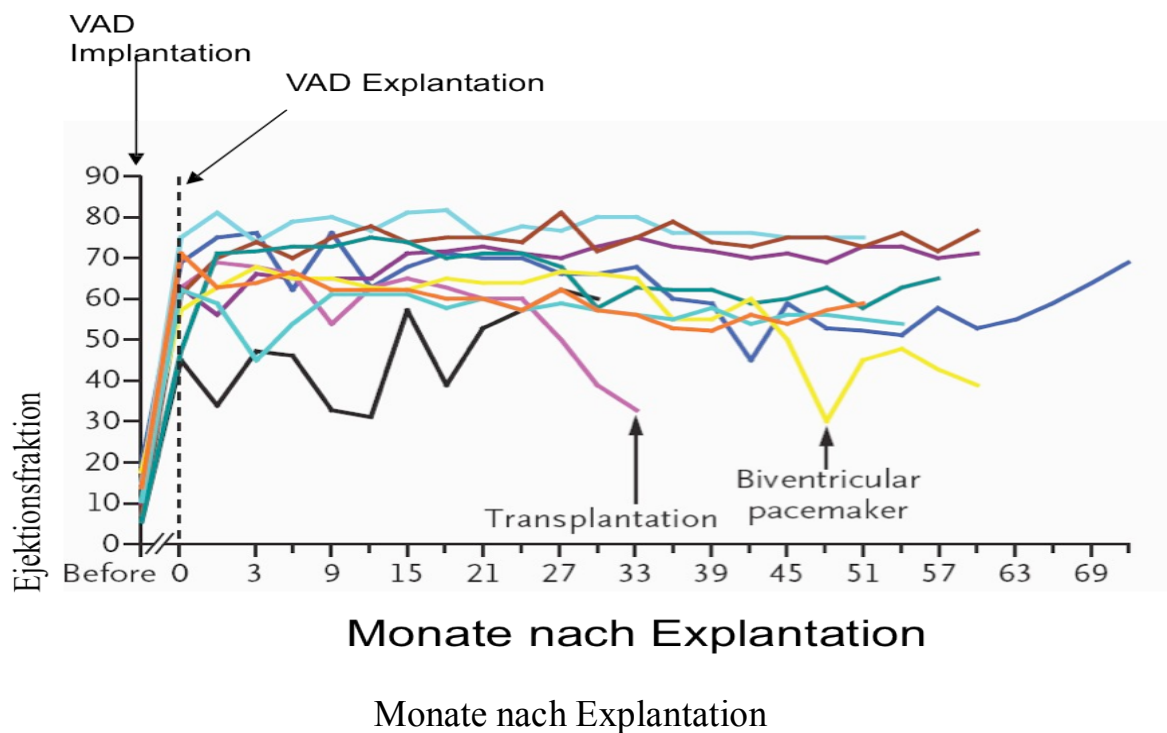


Abb 5 (Modifiziert nach Birks et al 2006): Entwicklung der Ejektionsfraktion nach Explantation der VADs

Neben den bisher berichteten funktionellen Verbesserungen gibt es mittlerweile eine große Zahl an Studien die verschiedenste Veränderungen, an den Patienten nach VAD-Implantation, auf molekularer, morphologischer, transkriptioneller, neurohumoraler und elektrophysiologischer Ebene beschreiben. So wird beschrieben, dass die linksventrikuläre Masse reduziert wurde, die EF anstieg, die Myozytenhypertrophie rückläufig war, es zu einer Veränderung im Ca^{2+} -Haushalt, zu einer Zunahme von β -adrenergen Rezeptoren und der Kontraktilität der Myozyten kam. Aufgrund des verbesserten HZV kam es außerdem zu einer Reduktion der Blutspiegel von Katecholaminen, Renin, Angiotensin II, Arginine, Vasopressin und TNF α . (Zafeiridis et al 1998, Ogletree-Hughes et al 2001, Razeghi et al 2003, Ambardekar und Buttrick 2011, Hall et al 2011, Braunwald 2013). Für ein besseres Verständnis der Auswirkungen einer VAD-Therapie, sollten die Veränderungen, die direkt am Myokard aufgrund der mechanischen Entlastung auftreten, von den Veränderungen, die auf die Verbesserung des Herzzeitvolumens zurückzuführen sind, getrennt betrachtet werden.

2.4.2 Komplikationen der VAD-Therapie

Der 2014 erschienene 6. INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support)-Report fasst verschiedenste Daten von >10000 Patienten mit VADs der letzten acht Jahre

zusammen. Es werden unter anderem Daten über die verwendeten Geräte, demographische Daten über die Patienten, Überlebensraten, Risikofaktoren für die Sterblichkeit unter der Therapie und Daten zu Komplikationen bzw. unerwünschten Ereignissen gesammelt. Demnach stellen Blutungen, Infektionen und ventrikuläre Rhythmusstörungen die häufigsten unerwünschten Ereignisse dar (Kirklin et al 2014). Ein Drittel der Patienten hat nach Implantation eines VAD signifikante, ventrikuläre Rhythmusereignisse. Dies erhöht zum einen die Mortalität und reduziert zum anderen die von der Therapie erhoffte Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten (Pedrotty et al 2013). Als Ursache werden in diesem Zusammenhang unterschiedliche Mechanismen diskutiert.

2.4.2.1 LVAD und ventrikuläre Rhythmusstörungen

Herzinsuffizienz ist häufig von ventrikulären Arrhythmien begleitet. Man geht davon aus, dass die Ursache für diese Prädisposition in den elektrophysiologischen Veränderungen, die eine kardiale Hypertrophie begleiten, zu finden ist. Harding et al (2001) und Volk et al (2000) nehmen an, dass die Ursache dafür in der Repolarisation und damit in der Verlängerung der APD liegt. Eine solche Verlängerung der APD spiegelt sich in verlängerten QT - Intervallen im Oberflächen - EKG wider.

Interessant ist die Beobachtung, dass es eine Zunahme an ventrikulären Arrhythmien nach Implantation von VADs gibt und diese auch Patienten betreffen, die vorher keine ventrikulären Rhythmusstörungen hatten (Kirklin et al 2014, Pedrotty et al 2013). Einige Autoren beschreiben auch hier eine Zunahme der QT - Intervalle im Oberflächen-EKG nach Implantation der VADs, was Parallelen bei den pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung der Rhythmusstörungen bei VAD-Therapie zu den Mechanismen der Entstehung von Rhythmusstörungen bei herzinsuffizienten, chronisch-drucküberlasteten Herzen vermuten lässt (Harding et al 2001, Harding et al 2005, Kawabata et al 2008, Shirazi et al 2013, Pedrotty et al 2013).

Es werden neben einem elektrophysiologischen remodeling außerdem fibrotische Umbauvorgänge an der Implantationsnarbe und mechanische Probleme wie so genannte „suction events“, ein Ansaugen der Ventrikelwände bei ungenügender Ventrikelfüllung, für Rhythmusstörungen verantwortlich gemacht (Shirazi et al 2013, Pedrotty et al 2013). Wie es letztlich dazu kommt, dass sich nach Wochen und Monaten die QT - Intervalle wieder normalisieren ist unklar. Jedoch scheint es, als sei diese Normalisierung auch ein wichtiger Teil des Erfolges der VAD-Therapie (Harding et al 2005).

Welche Rolle die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle bei der Entwicklung solcher Arrhythmien spielen können, zeigt sich auch bei der Betrachtung der genetischen Formen des Long-QT-Syndroms (LQTS). Mutationen in den zu Grunde liegenden Genen für die α - und β -UE (z.B. KvLQT1, minK, hERG). werden

als ursächlich für die unterschiedlichen Varianten des LQTS angesehen (Sanguinetti et al 1995, Wang et al 1996, Shieh et al 2000, Nerbonne und Guo 2002).

2.4.3 Kardiale Umbauvorgänge (remodeling) bei Hypertrophie und Atrophie

Wie es genau zu den verschiedenen bisher beschriebenen Umbauvorgängen (remodeling) am Herzmuskel kommt, ist zu großen Teilen noch unbekannt oder nicht vollständig untersucht. Es werden vor allem Vorgänge auf zellulärer Ebene dafür verantwortlich gemacht. Die molekularen Mechanismen dieses umgekehrten Umbauvorgangs sind bisher noch nicht komplett verstanden, scheinen aber eine Reaktivierung von fetalen Genmustern zu beinhalten, wie es bisher in hypertrophischen Herzen beobachtet werden konnte (Kolar et al 1995, Depre et al 1998, Doenst et al 2001, Razeghi et al 2003, Ito et al 2003). Darüber hinaus gibt es noch mehr Hinweise darauf, dass es Ähnlichkeiten in den Umbauvorgängen bei drucküberbelasteten und druckentlasteten Herzen gibt. Bereits mehrere Studien zeigten, dass die mechanische Entlastung sowie auch die Drucküberbelastung, ähnliche Einflüsse auf den kardialen Metabolismus und die Kontraktilität der Kardiomyozyten haben (Kolar et al 1995, Depre et al 1998, Doenst et al 2001, Razeghi et al 2003, Ito et al 2003, Sharma et al 2006). So konnte gezeigt werden, dass es bei mechanischem oder hypoxischen Stress, zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt, zu einer Umstellung der Energiegewinnung (ATP) der Kardiomyozyten kommt, die der Energiegewinnung im fetalen Kreislauf sehr ähnlich ist. Es werden molekulare Umbauvorgänge eingeleitet, die eine einfachere Versorgung der Zelle mit Zuckern und dadurch eine leichtere Energiegewinnung gewährleisten. Dabei ist der O₂-Bedarf deutlich geringer als bei der Oxidation von langen Fettsäuren, durch welche die Energiegewinnung im adulten Organismus normalerweise gewährleistet wird (Depre et al 1998, Ito et al 2003). Auch bei strukturellen Anpassungen auf molekularer Ebene konnten Parallelen zwischen Drucküberlastung, Druckentlastung und dem fetalen Phänotyp aufgezeigt werden. So ändert sich scheinbar die Zusammensetzung der schweren Myosinketten durch Drucküberbelastung als auch durch die Entlastungstherapie (Li et al 1998, Depre 1998, Razeghi et al 2001).

Tabelle 2 Übersicht über bisherige Datenlage

	fetaler Phänotyp	HI	HI + VAD	heterotope HTx
APD	↑ ²	↑ ^{1/7}	?	?
Ionenstrom	I _{to} : ↓ ² AP inkl. I _{CaL} ↑ ⁵ I _{CaL} : ↑ ⁵	I _{to} : ↓ ^{1/5} AP inkl. I _{CaL} : ↑ ¹ I _{CaL} : ↓ ¹	I _{to} : ? AP inkl. I _{CaL} : ? I _{CaL} : → ³	I _{to} : ? AP inkl. I _{CaL} : ? I _{CaL} : ?
Herzmasse	↓ ²	↑ ^{5/6}	↓ ⁸	?
Zellkapazität	↓ ²	↑ ⁷	↓ ⁸	?
Energiegewinnung	Oxidation von Zuckern ⁹	Oxidation von Zuckern ⁹	Oxidation von Zuckern ?	Oxidation von Zuckern ⁹

Tab 2 (Modifiziert nach Broichhausen 2009)

Eine Übersicht der bisherigen Datenlage zu Veränderungen von der Herzmasse, der Zellkapazität, der Energiegewinnung sowie der APD und einiger Ionenströme in verschiedenen Versuchspopulationen: Fetale Kardiomyozyten, Kardiomyozyten von insuffizienten Herzen (HI), Kardiomyozyten von LVAD Patienten (HI+LVAD), Kardiomyozyten nach hHTx (heterotope HTx)

HI = Herzinsuffizienz

VAD = Ventricular assist device

hHTx = heterotope Herztransplantation

¹Wickenden et al 1998 (Mensch)

³Terraciano et al 2003 (Mensch)

⁵Wiesner et al 1997 (Ratte)

⁷Swynghedauw et al 1995 (Mensch)

⁹Depre et al 1998 (Ratte)

I_{to}: transienter K⁺-Auswärtsstrom

AP: Aktionspotenzial

I_{CaL}: Ca²⁺ Strom der L-Typ Kanäle

²Kilborn et al 1990 (Ratte)

⁴Escobar et al 2003 (Ratte)

⁶Rose et al 2005 (Kaninchen)

⁸Sabbah 2004 (Hund)

Elektrophysiologische Veränderungen könnten, analog zu den Veränderungen bei der kardialen Hypertrophie, bei den chronisch druckentlasteten Herzen eine entscheidende Rolle in der Initiierung von Umbauvorgängen spielen.

Die elektrophysiologischen Effekte der mechanischen Entlastung, wie zum Beispiel die Repolarisation von atrophierten Kardiomyozyten, sind aber weitgehend unbekannt. Die elektromechanische Kopplung wird in der Kardiomyozyte durch ein Aktionspotenzial (AP) initiiert. Die Länge und der Verlauf eines solchen APs beeinflusst die Größe der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, welche die kardiale Kontraktion reguliert. Die Aktionspotenzialdauer (APD) wird wiederum stark von K⁺-Ein- und Auswärtsströmen beeinflusst. Ein großer Einfluss auf die APD konnte bisher vor allem dem transienten K⁺-Auswärtsstrom (I_{to}) in gesunden sowie hypertrophierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Keung 1989, Shipsey et al 1997, Zafeiridis et al 1998, Bryant et al 1999, Martinez und Heredia 1999,

Heerdt et al 2000, Volk et al 2001, Ogletree-Hughes et al 2001, Razeghi et al 2003, Wohlschlaeger et al 2005).

2.5 Erregungsbildung und Erregungsausbreitung am Herzen

Eine Besonderheit der Erregungsbildung am Herzen ist die dort vorhandene elektrische Autonomie. Spezialisierte Schrittmacherzellen im Sinusknoten erzeugen spontane, elektrische Spannungsänderungen, die über das kardiale Reizleitsystem in den Vorhöfen, dem AV-Bündel, an den AV- Knoten weiter gegeben werden. Dort werden sie verzögert und dann auf das Reizleitsystem der Herzkammer, von den HIS-Bündeln auf die Tawaraschenkel übertragen, bis deren Endstrecke in den Purkinjefasern mündet. Die Purkinjefasern übertragen diese elektrischen Impulse direkt an die Myokardzellen, die diese zum einen über gap junctions an benachbarten Myozyten weitergeben und sie zum anderen in mechanische Kontraktionen umsetzen. Die elektrischen Impulse bzw. Spannungsänderungen werden als Aktionspotenziale (APs) bezeichnet. Der gesamte Vorgang wird elektromechanische Kopplung genannt. Um eine synchrone, effektive Kontraktion der Herzkammern zu ermöglichen, läuft diese Erregungsausbreitung nach einem streng geregelten Prinzip ab. Das ventrikuläre Myokard lässt sich funktionell von innen (endokardial) nach außen (epikardial) in verschiedene Schichten unterteilen. Da die Fasern des Reizleitsystems endokardial lokalisiert sind, werden auch die endokardialen Kardiomyozyten bei der Erregungsausbreitung als Erstes erregt. Die Erregungsausbreitung läuft vom Vorhof zum Ventrikel und dann an jeder Stelle von innen nach außen ab. Die Dauer der Zellerregung und damit die Länge der Aktionspotenziale (AP) ist in den einzelnen Schichten unterschiedlich lang (Abb 6). Der Grund hierfür ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Ionenkanäle, die den de- und repolarisierenden Strömen zu Grunde liegen (s 2.5.3). Die epikardialen Kardiomyozyten haben kürzere APs und repolarisieren daher schneller als die endokardialen Kardiomyozyten. Dadurch kann die Repolarisation von außen nach innen ablaufen. Eine unterschiedliche Länge von APs gibt es auch für die unterschiedlichen Regionen des Myokards von der Herzbasis zur Herzspitze. Dies ist die Grundlage dafür, dass die Erregungsausbreitung und -Rückbildung in entgegengesetzten Richtungen ablaufen und damit regelmäßige und immer wieder gleiche, geordnete Kontraktionen generiert werden können. Störungen in diesem Ablauf prädisponieren für kardiale Arrhythmien und eine verminderte Auswurfleistung des Herzens. Obwohl es sich bei der Depolarisation und der Repolarisation um zwei elektrisch gegensätzliche Vorgänge handelt, existiert in der Summe ein gemeinsamer Hauptvektor im Oberflächen-EKG (Abb 6). Der Hauptvektor der Depolarisation, die „R- Zacke“ und der Hauptvektor der Repolarisation, die „T-Welle“, zeigen bei einem gesunden Herzen in die gleiche Richtung (Cohen et al 1976, Franz et al 1987).

Abbildung 6 Oberflächen-EKG und Aktionspotenziale

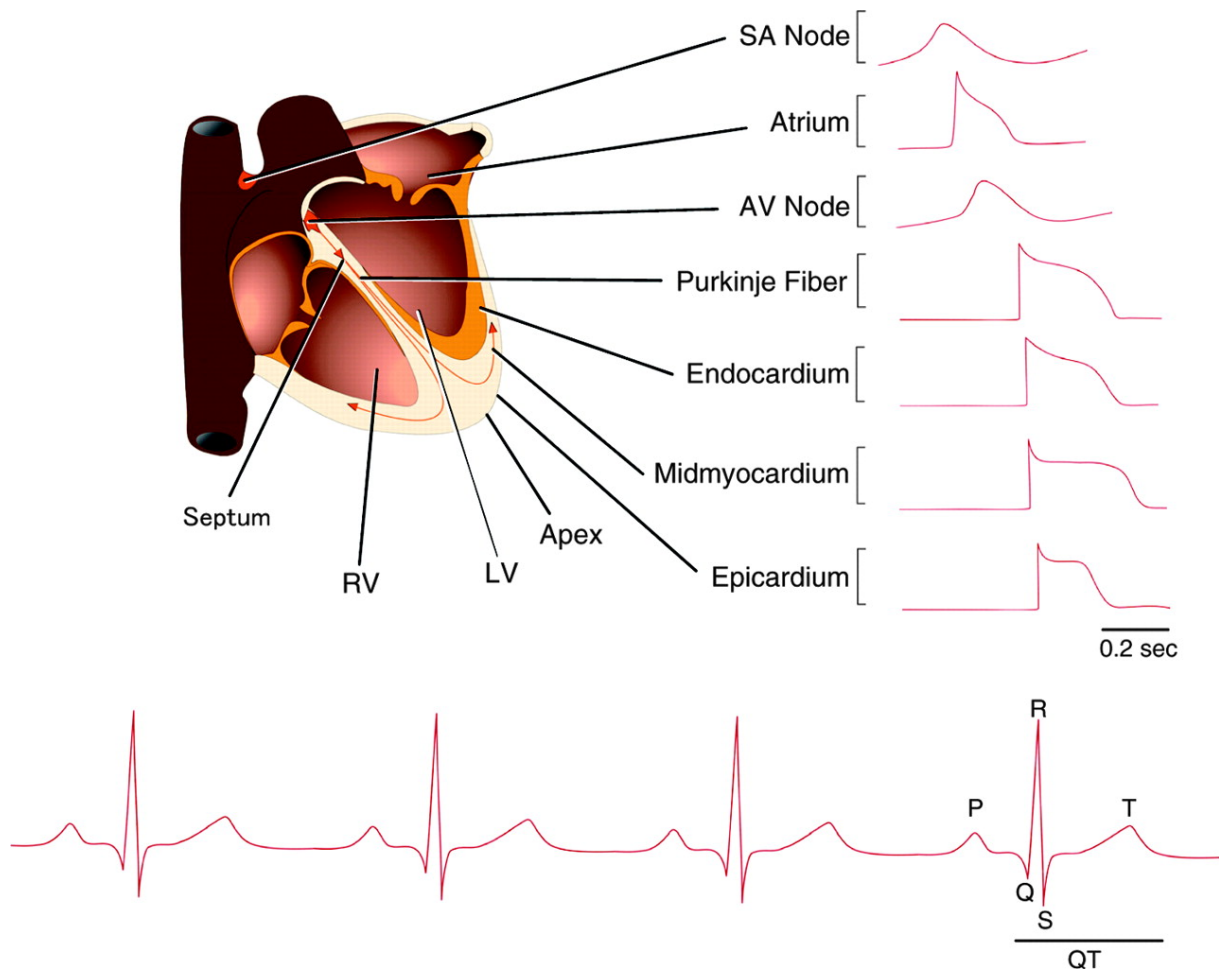


Abb 6 (Modifiziert nach Nerbonne und Kass 2005) Oben: Die transmurale Heterogenität von Aktionspotenzialen im humanen Herzmuskel- und Schrittmacherzellen des Herzens.
 Unten: Ein normales Oberflächen EKG beim Menschen.
 LV/RV: Linker und Rechter Ventrikel
 SA Node: Sinusknoten AV Node: Atrioventrikularknoten.

2.5.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Proteinkomplexe, die weitestgehend selektiv den Durchgang geladener Ionen durch die für sie sonst undurchlässige Zellmembran ermöglichen. Der Ionenfluss findet entlang eines Konzentrationsgradienten und unter dem Einfluss des Membranpotenzials statt (elektrochemischer Gradient). Somit sind sie elementar an allen zellulären Prozessen beteiligt bei denen eine elektrische Signalweitergabe, eine Skelettmuskelkontraktion oder eine Erregung des Myokards abläuft. Entsprechend ihrer Selektivität für bestimmte Ionen wird unter anderem zwischen K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Kanälen unterschieden, die jeweils verschiedene Öffnungs- und Schließmuster aufweisen. Es kann zusätzlich zwischen liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen unterschieden werden. Erstere werden durch Veränderungen in der zellulären Signaltransduktion mit Hilfe von Proteinen geöffnet. Die

spannungsgesteuerten Kanäle öffnen oder schließen sich abhängig von der zu einer bestimmten Zeit an der Zellmembran anliegenden Spannung.

2.5.2 Das Ruhemembranpotenzial (RMP)

Ventrikuläre Kardiomyozyten haben in der Regel ein Ruhemembranpotenzial. Das Ruhemembranpotenzial entsteht durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen und Leitfähigkeiten zwischen dem intra- und extrazellulären Milieu, welche durch aktive Ionenpumpen und verschiedene Ionenkanäle (hauptsächlich K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Cl^-) hergestellt werden. Mit der Constant-Field- oder der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung kann man das Membranpotenzial anhand der einzelnen Ionenleitfähigkeiten und Konzentrationsunterschiede berechnen (Klinke et al 2010). Na^+ , Cl^- und Ca^{2+} liegen dabei extrazellulär in viel höheren Konzentrationen vor als intrazellulär. Für K^+ ist dieser Gradient genau umgekehrt. Das hauptverantwortliche Kation für das Ruhemembranpotenzial ist K^+ , was daran liegt, dass im Ruhezustand hauptsächlich K^+ -Kanäle geöffnet sind. Das bedeutet, dass man die Leitfähigkeiten für Cl^- , Ca^{2+} und Na^+ bei der Betrachtung des RMPs vernachlässigen kann.

$$U_M = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na} \cdot [Na^+]_a + P_K \cdot [K^+]_a + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_K \cdot [K^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_a}$$

U_M : Membranpotenzial

R: universelle Gaskonstante

F: Faraday'sche Konstante

P: Permeabilität für das bestimmte Ion über der spezifischen Zellmembran

K^+ : Kalium-Ion, Na^+ : Natrium-Ion, Cl^- : Chlorid-Ion

2.5.3 Das Aktionspotenzial (AP) in Kardiomyozyten

Ein Aktionspotenzial ist eine Spannungsschwankung oder eine vorübergehende Abweichung des Membranpotenzials vom Ruhemembranpotenzial, die während der Erregung an einer Zelle abgeleitet werden kann. Aufgetragen werden APs als Spannungsänderungen über die Zeit (Abb 6). Aktionspotenziale setzen sich aus mehreren Ionen-Einwärts- und Auswärtsströmen zusammen. Die Ionen bewegen sich durch Ionenkanäle hindurch über die Zellmembran. In ventrikulären Kardiomyozyten entsteht eine elektromechanische Kopplung durch die Aktionspotenziale und die sich periodisch ändernden Leitfähigkeiten für verschiedene Ionen.

Es gibt bei den APs nicht nur transmurale Unterschiede (Abb 6), sondern auch speziesabhängige (Abb 7A+B) (Nerbonne und Kass 2005). Diese Unterschiede könnten sich auf eine unterschiedliche Anzahl von Kanälen (Kanaldichte) oder auf unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Zeit für Aktivierungen und Inaktivierungen (Kanalkinetik), zurückführen lassen. Hiervon leiten sich die transmuralen Unterschiede der Aktionspotenzialdauern (APD) in den unterschiedlichen Herzwesen ab (Abb 6). Erst die regionalen und transmuralen Unterschiede in der APD ermöglichen eine periodisch geordnete Erregungsausbreitung und Rückbildung (s 2.5). Die spezies-spezifischen Unterschiede in der Ionenkanalzusammensetzung und Ionenkanalkinetik ermöglichen kürzere APs in den Nagetierkardiomyozyten und damit höhere Herzfrequenzen als bei größeren Säugetieren (zB beim Menschen) (Abb 7A+B). Da die Zeitkonstanten und die Spannungsabhängigkeiten der Kanäle zwischen den verschiedenen Regionen und Spezies nur geringe Unterschiede aufweisen, führen verschiedene Autoren die Heterogenität der APs auf eine unterschiedliche Kanalexpression zurück (Delmar 1992, Antzelevitch und Dumaine 2002, Nerbonne und Guo 2002).

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Beantwortung von Fragestellungen aus der Humanmedizin unter Zuhilfenahme eines Ratten-Tiermodells (s 2.6-2.7). Aus diesem Grund sollen im Folgenden die physiologischen Abläufe während eines APs in den ventrikulären Kardiomyozyten des Menschen erläutert werden. Spezies-spezifische Unterschiede zu Abläufen bei der Ratte werden besonders hervorgehoben (Tab 2).

Abbildung 7 AP-Phasen und zugrundeliegende Ströme

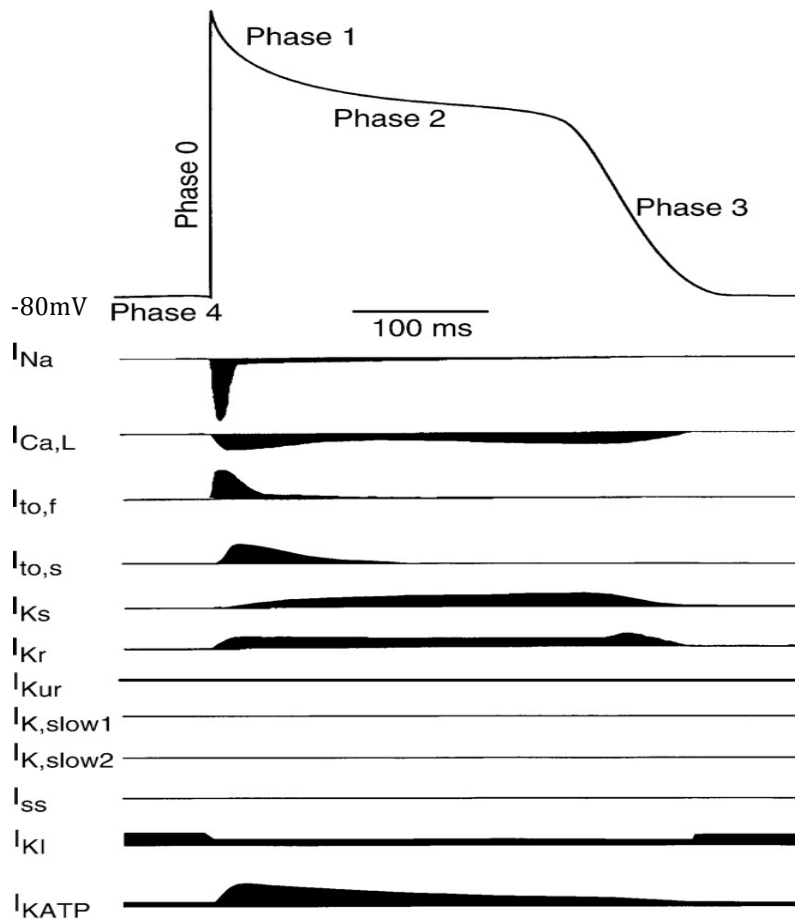


Abb 7A (Modifiziert nach Nerbonne und Kass 2005): Die Abbildung zeigt ein Aktionspotenzial von humanen ventrikulären Kardiomyozyten. Es wird in seinem Ablauf in 5 Phasen unterteilt. Phasen 0-4 (s 2.5.3). Unter den APs sind die Leitfähigkeiten von dem AP zu Grunde liegenden Ionenkanälen aufgetragen. I_{Na} : Schneller Na^+ -Einstrom. $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. $I_{to,f/s}$: transienter K^+ -Auswärtsstrom f: schnelle Komponente, s: langsame Komponente. I_{Ks} , I_{Kr} , I_{Kur} , I_{ss} (I_{sus}): delayed rectifier K^+ -Auswärtsströme. I_{K1} : K^+ Einwärtsgleichrichter Strom. I_{KATP} : ligandengesteuerter K^+ -Auswärtsstrom

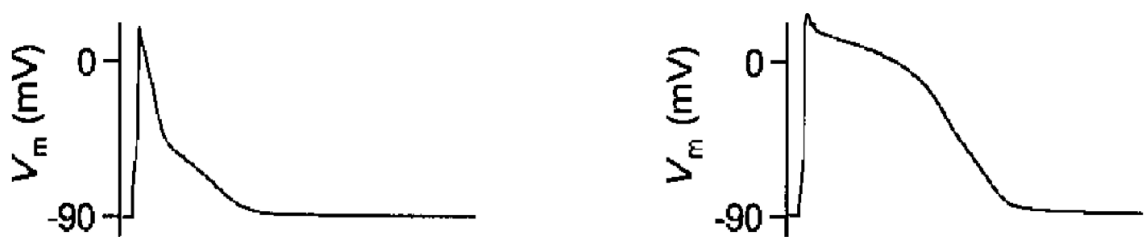


Abb 7B (Modifiziert nach Volk et al 1999): Ratten-Aktionspotenziale: links epikardiales AP , rechts endokardiales AP

Ausgehend vom Ruhemembranpotenzial von ca. -80 bis -90mV kommt es durch einen ankommenden Impuls von den Schrittmacherzellen des Herzens zu einer leichten Depolarisation auf ca. -55 mV. Damit ist das sogenannte Schwellenpotenzial erreicht. Diese Spannungsänderung reicht aus um spannungsgesteuerte Na^+ - Kanäle (Nav-Kanäle) zu öffnen und einen sehr schnellen Na^+ - Einstrom (I_{Na})

in die Zelle auszulösen. Dieser Einstrom erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten, der über der Zellmembran liegt. Dies wird auch als schnelle Depolarisation oder **Phase 0** bezeichnet (Abb 7). Das Membranpotenzial wird kurzfristig positiv. Nav-Kanäle öffnen und schließen sehr spannungsabhängig, sodass im Spannungsbereich des AP-Plateaus 99% der Na^+ -Kanäle geschlossen sind (Fozzard 2002). Direkt im Anschluss an Phase 0 schließen die Na^+ -Kanäle und es kommt in der **Phase 1** ab -30mV zu einer Öffnung von spannungsgesteuerten K^+ - Kanälen und damit einem K^+ - Auswärtsstrom, dem so genannten transienten K^+ -Auswärtsstrom I_{to} , der die schnelle Repolarisation unterstützt. Im AP erkennt man diese Phase an dem so genannten „notch“, die eine Umkehr im Spannungskurvenverlauf darstellt. Ebenso öffnen sich ab einem Membranpotenzial von positiver als -40mV die spannungsgesteuerten L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Cav-Kanäle), wodurch es zu einem langsamen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle kommt (I_{CaL}). Dieser depolarisierende Strom ist zum einen durch die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung in der Zelle für die Freisetzung von großen Mengen Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum und damit für die elektromechanische Kopplung verantwortlich und wirkt zum anderen den Spannungsänderungen entgegen, die durch den K^+ -Auswärtsstrom entstehen. In **Phase 2** kommt es zur Ausbildung der Plateauphase im Aktionspotenzial (Bers und Perez-Reyes 1999). Bei Menschen und größeren Säugetieren wird vornehmlich der Verlauf des Plateaus in Phase 2 stark durch den transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to} , s. 2.5.4) beeinflusst (Greenstein et al 2000). Bei Ratten hingegen werden *alle* Phasen der Repolarisation maßgeblich durch die Stromhöhe des I_{to} (s 2.5.4) bestimmt (Gussak et al 2000). Die Größe des Ca^{2+} -Flusses (QCa^{2+}) hängt direkt mit der Dauer der Plateauphase und damit mit der Offenheitsdauer der Ca^{2+} -Kanäle zusammen (Volk et al 1999, Volk et al 2002). Die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle inaktivieren über zwei Mechanismen: 1. spannungsabhängig über die Zeit und 2. Ca^{2+} -abhängig über die Aktivierung von Calmodulin durch den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} (Grant 2009). Nach Inaktivierung des I_{CaL} wird in **Phase 3** die Repolarisation durch die jetzt vorherrschenden K^+ -Auswärtsströme abgeschlossen. Es existieren im Gegensatz zu den Na^+ - und Ca^{2+} - Strömen eine Vielzahl verschiedener K^+ -Ströme (Abb 7) während des Aktionspotenzials in ventrikulären Kardiomyozyten. Basierend auf Zeit- und Spannungsabhängigkeit sowie pharmakologischer Beeinflussbarkeit kann man die Ströme in zwei Gruppen einteilen: In den transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}), der bereits früh, ab Potenzialen von positiver als -30mV, rasch aktiviert und inaktiviert sowie die verzögerten Gleichrichterströme I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K} und I_{sus} , die bei gleichem Membranpotenzial mit verzögerter Kinetik aktivieren und deutlich später inaktivieren. Abbildung 7 und Tabelle 3 geben einen Überblick über die verschiedenen K^+ -Gleichrichterströme von ventrikulären Kardiomyozyten und deren Vorkommen in anderen Geweben und Spezies. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass es hier einen grundlegenden Unterschied zwischen der Repolarisation in humanen Kardiomyozyten und der Repolarisation von Ratten-Kardiomyozyten gibt. Die verzögerten Gleichrichter I_{Kr} und I_{Ks} sind beim Menschen maßgeblich an der Repolarisation beteiligt. Bei Ratten hingegen sind sie nur gering (I_{Kr}) bzw. gar nicht vorhanden (I_{Ks}). Der in ventrikulären Myozyten der Ratten zu messende langsam aktivierende und langsam inaktivierende I_{K} ist wiederum beim Menschen nicht zu registrieren (Nerbonne 2005).

Es existiert über die Spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle hinaus eine weitere Gruppe an K^+ -selektiven Kanälen, die vor allem für die späte Repolarisation (**Phase 3**) wichtig sind: Die Kir-oder K^+ -Einwärtsgleichrichter Kanäle (Lopatin und Nichols 2001).

Tabelle 3 Maßgebliche Ströme des AP in ventrikulären Myozyten

Kanal	Strom	Aktivierung	Inaktivierung	Erholung	Mensch	Ratte	Andere Spezies	Gewebe
Nav	INa	sehr schnell	schnell	schnell	JA	JA	Katze,Hund,Frettchen,Maus	A,P,V,SAN,AVN
Cav	Ica(L)	schnell	mittel*	schnell	JA	JA	Katze,Hund,Frettchen,Maus	A,P,V,SAN,AVN
Kv(Ito)	Ito,f	schnell	schnell	schnell	JA	JA	Katze,Hund,Frettchen,Maus	A,P,V
	Ito,s	schnell	mittel	langsam	JA	JA	Frettchen,Maus,Kaninchen	V
Kv(Ik)	Ikr	mittel	schnell	langsam	JA	JA	Meerschweinchen,Maus,Kaninchen	A,P,V,SAN,AVN
	Iks	sehr langsam	keine	xx	JA	NEIN	Hund, Meerschwein, Kaninchen	A,P,V,SAN
	IK	langsam	langsam	langsam	NEIN	JA		V
	Isus	langsam	keine	xx	JA	JA	Kaninchen,Hund,Maus	A,V,AVN
Kir	IK1				JA	JA	Katze,Hund,Frettchen,Maus,Kaninchen	A,P,V

Tab3 (Modifiziert nach Nerbonne und Guo 2005): Ionenkanäle und die dazugehörigen Ströme mit wesentlichem Anteil am ventrikulären, myokardialen AP. Auf Ströme, die nicht bei Menschen oder Ratten in ventrikulären Myozyten nachgewiesen werden konnten, wurde verzichtet. Für die Abkürzungen der Ströme siehe Abb 7A.

A=Atrium, V=Ventrikel, SAN=Sinusknoten, AVN=AV Knoten, P=Purkinjefasern

* Inaktivierung Ca^{2+} - und Spannungsabhängig.

2.5.4 Spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle (Kv-Kanäle, HERG, KvLQT).

Das Öffnungsverhalten der spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle wird durch unterschiedliche Membranpotenziale moduliert. Die spannungsgesteuerten K^+ - Kanäle (Kv-Kanäle) sind neben den Einwärtsgleichrichter-Kanälen (Kir), den Ca^{2+} - aktivierten (KCa) und den zwei Poren- K^+ -Kanälen (K2P) die größte Gruppe K^+ -selektiver Kanäle und besitzen Untergruppen von Kv1-Kv12 (Gutman et al 2005). Die Kv4 - Familie zeichnet sich durch einen schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden transienten Auswärtsstrom aus. Es wurden bisher drei Untertypen beschrieben. Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3. Eine physiologische Relevanz dieser Kanalgruppe konnte bisher im Gehirn und im Herzen nachgewiesen werden (Pak et al 1991, Rudy et al 1992, Isbrandt et al 2000). Im Herzen sind der Kanal Kv4.2 und Kv4.3 für die schnelle Komponente des transienten K^+ -Auswärtsstroms ($I_{to,f}$) bei Mensch, Hund und Ratte verantwortlich (Brahmajothi et al 1999, Xu und Nerbonne 1999). Unterschiede in der Expression dieser

Kanäle tragen zu den regionalen und transmuralen Unterschieden beim Aktionspotenzial bei, jedoch gibt es hierbei Unterschiede zwischen Ratten, anderen Nagetieren und größeren Säugetieren wie dem Menschen. Bei Ratten führt eine stärkere Expression von Kv4.2 und Kv4.3 in epikardialen ventrikulären Myozyten zu einer Verkürzung der epikardialen Aktionspotenziale. Beim Menschen hingegen scheint vor allem die Expression von KChIP2 (Kv Channel Interacting Protein 2 s.u.) die Größe des I_{to} zu beeinflussen (Litovsky und Antzelevitch 1988, Liu et al 1993, Rosati et al 2001). Wie in vorherigen Arbeiten beschrieben (Rosati et al 2001, Goltz et al 2007), ist auch die Menge der Transkription von Kv4.2 - und Kv4.3 - mRNA bei Nagetieren signifikant niedriger in der endokardialen Region der Kontrollen als in der epikardialen.

Die spannungsgesteuerten K^+ - Kanäle sind aus vier alpha - Untereinheiten (α -UE) der Gruppen Kv1-Kv12 mit jeweils 6 transmembranösen Segmenten S1-S6 aufgebaut. Jede α -UE besitzt außerdem jeweils ein zytoplasmatisches C-terminales Ende und ein zytoplasmatisches N-terminales Ende (Abb 8A). Die Kanalpore liegt zwischen S5 und S6 und besitzt ihren Spannungssensor in Form von positiv geladenen Aminosäureresten in Segment S4. Vier dieser porenbildenden α -UE bilden ein Tetramer welches für die Funktion des Kanals wichtig ist. Einige spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle haben je nach Kanalfunktion und elektrophysiologischer Eigenschaft zusätzlich eine akzessorische beta-Untereinheit (β -UE). Die Bindungsstelle für diese zytoplasmatisch lokalisierten Proteine liegt am N-Terminus der α -UE (Shieh et al 2000). Für die verzögerten Gleichrichter K^+ -Kanäle, die den Strömen I_{Kr} , I_{Ks} , I_K und I_{sus} unterliegen sind die α -UE genauso aufgebaut wie bei den Kv-Kanälen (Abb 8A). Die zugrundeliegende Gene für die α -UE sind KvLQT1 (I_{Ks}), HERG (I_{Kr}) und Kv1.5 (I_{sus}). (Sanguinetti et al 1995, Gutmann et al 2005).

Es gibt verschiedene β -Untereinheiten (β -UE), die an den Kanälen binden:

Die transmembranösen, „minK“-verwandten Proteine bilden die Untereinheiten für den I_{Ks} (minK/KCNE1) und I_{Kr} (MiRP/KCNE2) und beeinflussen durch MiRP1 auch die Stromdichte des $I_{to,f}$. Es konnte beispielsweise bei Mäusen eine 25%-ige Reduktion des schnellen, transienten K^+ -Auswärtsstroms ($I_{to,f}$) durch eine genetische Deletion des KCNE2-Gens (MiRP) bei unveränderter Oberflächenexpression von Kv4.2 erreicht werden (Roepke et al 2008). Es ist unklar, ob diese β -UE kanalspezifisch sind oder ob die verschiedenen β -UE mit verschiedenen α -UE interagieren und dadurch unterschiedliche Kanaleigenschaften generieren (Niwa und Nerbonne 2010). Mutationen von HERG sowie den MinK-Proteinen führen zu unterschiedlichen Formen des Long-QT Syndroms, welches unter anderem für den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht wird (Shieh et al 2000). Es sind drei verschiedene Kv β -Untereinheiten mit dazugehörigen Spleissvarianten bekannt. Für unterschiedliche Gewebe ist eine Beeinflussung der Kv4.2/Kv4.3-Expression durch die Kv1 β -UE gezeigt worden (Nerbonne und Niwa 2010). Es konnte aber bisher nur für ventrikuläre Myozyten der Maus gezeigt werden, dass eine Deletion von Kv β 1 zu einer Reduktion des $I_{to,f}$ führt (Aimond et al 2005).

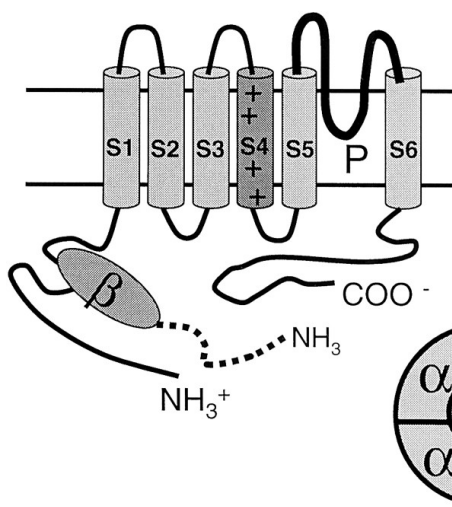
Eine weitere Gruppe dieser β -akzessorischen Untereinheiten heißen „Kv-Kanal-interagierenden Proteine“ (KChIPs). KChIPs sind Ca^{2+} -bindende, zytoplasmatisch lokalisierte Proteine. Sie gehören der Familie der „Neuronalen Calcium Sensoren (NCS)“ an (Wang et al 2008, Cui et al 2008). Für KChIP wurden einige Effekte auf die Kv-Kanäle beschrieben. KChIP2 kann die Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen erhöhen. Neben der Oberflächenexpression kann KChIP2 auch die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Kinetik der Kv4-Kanäle ändern (An et al 2000, Bähring et al 2001).

Bei großen Mengen an KChIP2 - Expression kann es zu einer Zunahme des I_{to} kommen. Die Inaktivierung vom I_{to} kann verzögert und die Erholung von der Inaktivierung kann beschleunigt werden (Bähring et al 2001).

Darüber hinaus korreliert der I_{to} -Gradient (größere I_{to} -Stromdichte im Epikard als im Endokard) nicht immer mit der Größe der Expression seiner Kv4-Untereinheit, sondern wie zB bei humanen Kardiomyozyten auch mit einer höheren Expression von KChIP2 (Rosati et al 2001).

Abbildung 8 Transmembranöser Aufbau der K^+ -Kanäle

A. Six transmembrane one-pore



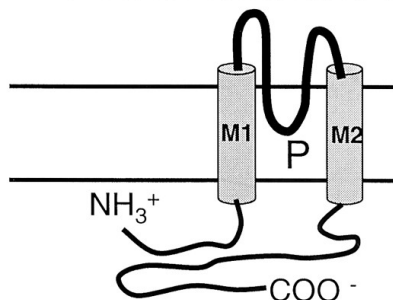
Clones

Kv1 - Kv9
HERG
KvLQT
hSlo
IK_{Ca}1

Native current

IK_{DR}, IK_{TO}, IK_{UR}
IKr
IKs
BK_{Ca}
IK_{Ca}

B. Two transmembrane one-pore



Kir1.1
Kir2.1
Kir3.1/Kir3.4
Kir6.2 / SUR

RomK
IK₁
I_{ACh}
K_{ATP}

Abb 8 (Modifiziert nach Shieh et al 2000): Transmembranöser Aufbau von K^+ Kanälen. A: Aufbau eines spannungsgesteuerten K^+ -Kanals. B: Einwärtsgerichteter K^+ -Kanal (Kir).

2.5.4.1 Der transiente K^+ -Auswärtsstrom I_{to}

Der I_{to} (transient outward current) ist ein transienter K^+ -Auswärtsstrom. Der Strom ist K^+ -abhängig und blockierbar durch 4-Aminopyridin (4-AP). Es sind bis heute zwei unterschiedliche Ströme identifiziert, die dem I_{to} zu Grunde liegen. Eine schnelle Komponente $I_{to,f}$ und eine langsame $I_{to,s}$ (Brahmajoti et al 1999, Wang et al 1999). Die beiden Ströme können hauptsächlich durch ihre Kinetik der Inaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung und die ihnen zu Grunde liegenden Gene unterschieden werden. Beide Ströme wurden bislang in verschiedenen Regionen des Herzgewebes bei unterschiedlichen Spezies nachgewiesen (Nerbonne und Guo 2005). (Tab 3)

Der Ionenkanal des $I_{to,f}$ wird durch die α -UE Kv4.2 sowie Kv4.3 gebildet und durch akzessorische β -Untereinheiten beeinflusst (Dixon und MacKinnon 1994, Nerbonne et al 2005). Der Kanal für den $I_{to,s}$ wird hingegen in Ratten (Wickenden et al 2001) und Menschen (Tamkun et al 1999) von der Kv- α -UE Kv1.4 gebildet. Relativ gut untersucht ist bisher die Beeinflussung durch die Expression von KChIP2 (s 2.5.4 und s.u.). Es gibt außerdem Hinweise in Arbeiten an Mäusen, dass auch andere akzessorische Kanaluntereinheiten neben KChIP wie z.B. MiRP1 und Kv1 β sowie KChAP die Stromdichte des $I_{to,f}$ beeinflussen können (Kuryshv et al 2000, Aimond et al 2005, Roepke et al 2008). Es wird auch eine Kopplung der Stromdichte an andere Ionen-Kanäle, wie beispielsweise den Nav-Kanal diskutiert. So konnte an neonatalen, ventrikulären, Rattenkardiomyozyten gezeigt werden, dass die Genausschaltung der Nav β 1-Untereinheit (Nav β 1-UE) zu einer gleichzeitigen Reduktion der KChIP2-Expression und der $I_{to,f}$ Stromdichte geführt hat (Dechenes et al 2008).

Der $I_{to,f}$ in ventrikulären Kardiomyozyten aktiviert ca. 20-30ms nach Beginn des Aktionspotenzials, bei Membranpotenzialen zwischen -40mV und -30mV (Abb 9). Er ist wesentlich verantwortlich für die frühe Repolarisation des Aktionspotenzials in Phase 1 sowie die Form des Plateaus des Aktionspotenzials in Phase 2. Die kinetischen Eigenschaften dieses Stroms sind: sehr schnelle Aktivierung, schnelle Inaktivierung und schnelle Erholung von der Inaktivierung (Sah et al 2003). $I_{to,s}$ aktiviert ebenfalls schnell, inaktiviert etwas langsamer und bleibt anschließend länger inaktiv. Er ist darüber hinaus von dem $I_{to,f}$ dadurch zu unterscheiden, dass er sich *nicht* mit dem Spinnengift Heteropodatoxin-2 bzw. -3 blockieren lässt (Sanguinetti et al 1997).

Wie bereits in 2.5 und 2.5.3 beschrieben, sind die unterschiedliche transmurale Expression von Ionenkanälen für die transmuralen Unterschiede in APD und AP-Form verantwortlich. Für die Größe des $I_{to,f}$ in ventrikulären Kardiomyozyten bestehen beim Menschen und bei der Ratte transmurale Unterschiede zwischen dem Epikard und dem Endokard. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Strom hauptsächlich verantwortlich für die „spike and dome“-Form der APs ventrikulärer Myozyten ist. Der I_{to}

ist bei nativen Rattenherzen im Epikard ca um den Faktor zwei größer als im Endokard ausgeprägt und hat damit einen wichtigen Anteil an der transmuralen AP-Längendifferenz zwischen endokardialen und epikardialen APs (Volk et al 1999). Beim Menschen besteht ebenfalls diese transmurale Heterogenität bei der Expression von $I_{to,f}$ in den unterschiedlichen Kardiomyozyten der verschiedenen Herzwesen. Allerdings ist die transmurale Heterogenität der APD beim Menschen im Gegensatz zur Ratte zusätzlich abhängig von der Offenheit der Na^+ -Kanäle sowie von einer heterogenen Expression der verzögerten Gleichrichterströme (Antzelevitch et al 2002). Diese unterschiedlichen Expressionen und die daraus folgenden unterschiedlichen APDs sind für den Ablauf der Erregungsausbreitung wichtig. Zunächst läuft die Erregungsausbreitung (Depolarisation) von endokardial nach epikardial ab. Die längeren APs im Endokard sorgen dafür, dass die endokardialen Zellen länger refraktär bleiben als die epikardialen. Die Erregungsrückbildung (Repolarisation) läuft daher in umgekehrter Richtung von epikardial nach endokardial ab (Nerbonne und Guo 2002). Dies ist für eine geordnete Ausbreitung der Erregung und der Herzaktion unerlässlich. Die molekularen Grundlagen für die transmurale Heterogenität der $I_{to,f}$ -Ströme sind dabei unterschiedlich zwischen Menschen und Ratten. Bei Nagetieren und Ratten konnte in verschiedenen Experimenten die Wichtigkeit von Kv4.2 sowie Kv4.3 als Kanalbildende- α -Untereinheiten belegt werden. In Zellkulturen von ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten konnte, unter Zuhilfenahme von Antisense-Oligonukleotiden (AsODNs), die Gene für Kv4.2 und Kv4.3 ausgeschaltet und der $I_{to,f}$ damit signifikant reduziert werden (Clark und Giles 1997). Auch die Expression von Mutanten-Kv4 α UE als „falsche“ Kv- α UE führte zu einer Abschwächung von $I_{to,f}$ in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Im Vorhofgewebe zeigte sich zudem ein weiterer Unterschied: Bei Ratten zeigte sich hier in weiteren Experimenten mit AsODNs, die gegen Kv4.2 und Kv4.3 gerichtet waren, dass nur das Ausschalten von Kv4.2 den $I_{to,f}$ abschwächen konnte (Xu Li und Nerbonne 1999). In menschlichen atrialen Kardiomyozyten verhielt es sich genau gegensätzlich (Wang et al 1999). Bei Ratten existieren in ventrikulären Kardiomyozyten vor allem Gradienten für Kv4.2 die für die heterogene Stromdichte des $I_{to,f}$ verantwortlich gemacht werden (Nerbonne und Guo 2005). Transmurale Gradienten in der Expression der Kanaluntereinheiten existieren beim Menschen hingegen ausschließlich für KChIP2, weshalb beim Menschen das Zusammenspiel aus der α -UE Kv4.3 und der transmurale Gradient der akzessorischen UE KChIP2 für die Heterogenität des $I_{to,f}$ verantwortlich gemacht werden (Nerbonne und Guo 2005, Nerbonne und Niwa 2010).

Abbildung 9 Stromkurvenverlauf des I_{to}

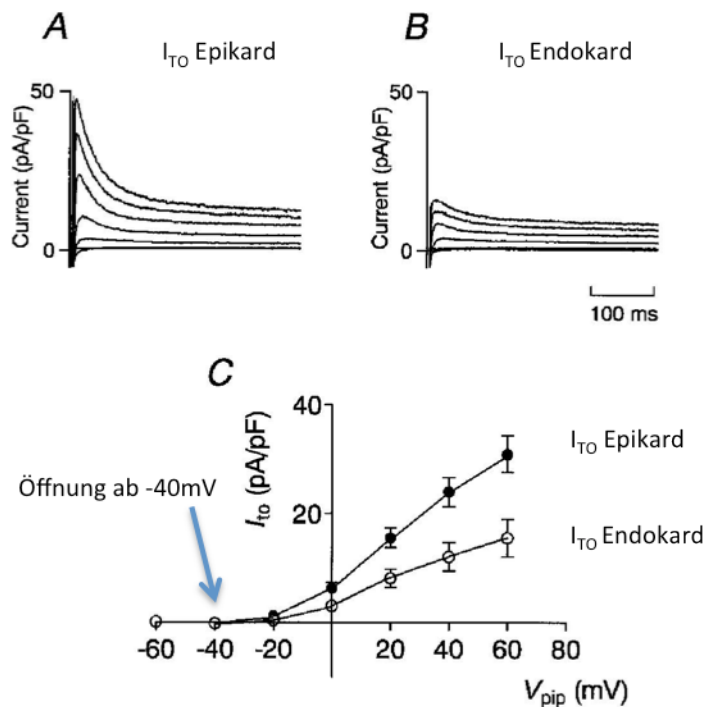


Abb 9 (Modifiziert nach Volk 1999): A&B zeigen den Stromkurvenverlauf des I_{to} , normiert auf die Zellgröße gegen die Zeit. C zeigt die Strom-Spannungs-Kurve für den I_{to} (transienter K^+ -Auswärtsstrom); V_{pip} : Kommandopotenzial

Durch die frühe Aktivierung bestimmt $I_{to,f}$ das elektrische Niveau der Plateauphase des Aktionspotenzials und hat somit großen Einfluss auf nachfolgende spannungsaktivierte repolarisierende K^+ -Ströme sowie den Ca^{2+} -Einstrom ($Q_{Ca^{2+}}$) in die kardiale Muskelzelle. Eine Verminderung dieses Stromes kann also zu einer frühen Abweichung der Aktionspotenzialkonfiguration führen und somit Einfluss auf die Aktionspotenziallänge haben. Solch eine Reduktion des $I_{to,f}$ konnte experimentell durch eine Blockade mit 4-Aminopyridin herbeigeführt werden und es zeigte sich nicht nur eine Verlängerung des APs, sondern auch ein bis um den Faktor vier erhöhten $Q_{Ca^{2+}}$ bei 90%-iger Blockade des $I_{to,f}$ in epikardialen Zellen. In endokardialen Zellen ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Für den I_{to} konnte bisher in mehreren Arbeiten eine Reduktion der Stromdichte und der Kanalexpression für Tiermodelle mit überbelastungsinduzierter Herzinsuffizienz (Wiesner et al 1997, Volk et al 2001) sowie für Menschen mit terminaler Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Näbauer et al 1996, Terraciano et al 2003). (Tab 2)

2.5.4.2 Neurohumorale Beeinflussung des I_{to}

Es existieren bisher nicht viele Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation der Kv4.x-Kanäle. Wichtig für die Ausbildung von Kv4.3 auf der Zelloberfläche scheint z.B. die Modifikation von KChIP-Spleiß-Varianten durch das Anheften von Palmitinsäure (Takimoto et al 2002). Glykosilierung trägt zur Stabilisierung der K^+ -Kanäle bei indem es die richtige Proteinfaltung intrazellulär beeinflusst (Khanna et

al 2001). Die Entfernung von Sialsäure, einem Zuckerrest, durch die Behandlung mit Neuraminidase konnte sogar eine Reduktion des I_{to} und eine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer hervorrufen (Ufret-Vincenty et al 2001). Deutlich besser untersucht ist die Phosphorylierung der Kv4.x-Kanäle:

Adrenerge Stimulation

Es gibt eine ganze Reihe von Phosphorylierungsstellen an den Kanaluntereinheiten (Abb 10). Es gilt mittlerweile als etabliert, dass die Stromdichte von $I_{to,f}$ durch adrenerge Stimulation im gesunden und erkrankten Myokard beeinflusst werden kann (von der Heyden et al 2006). α -und β -adrenerge myokardiale Stimulation führt zur Aktivierung von intrazellulären second messengern, damit zur Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen und letztendlich über diese Mechanismen zur Phosphorylierung oder Dephosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen in den Aminosäuresequenzen der Ionenkanaluntereinheiten (Abb 10).

Abbildung 10 Kv4.3 mit Phosphorylierungsstellen

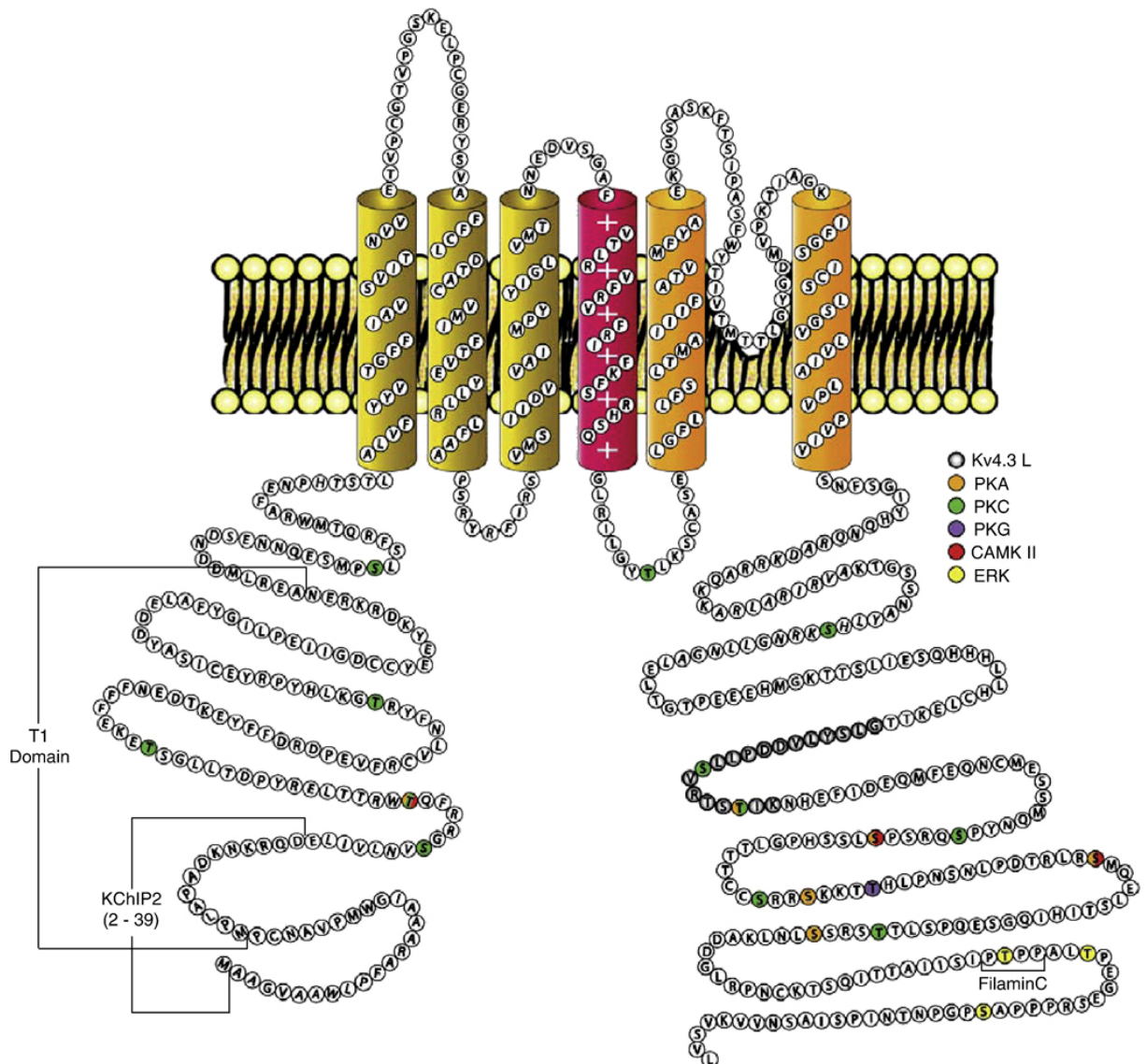


Abb 10 (Modifiziert nach Niwa und Nerbonne 2010): zeigt die Aminosäuresequenz des humanen Kv4.3L. Es sind die Bindungsdomäne für KChip2 und Filamin C markiert. Ebenso sind farblich potenzielle Stellen für eine Phosphorylierung in der AS-Sequenz markiert. PKA=Proteinkinasen A; PKC=Proteinkinasen C; PKG=Proteinkinasen G; CaMKII=Calcium-Calmodulin abhängige Kinase II; ERK= Extrazellulär regulierte Kinase

Es konnte für $\alpha 1$ -Agonisten gezeigt werden, dass die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) den $I_{to,f}$ effektiv in ventrikulären Kardiomyozyten unterdrücken kann (Apkon und Nerbonne 1988, Nakamura et al. 1997, Wang et al. 2001). Es existieren 2 bekannte Spleiß-Varianten von Kv4.3. Die längere Variante trägt eine Bindungsstelle für Phosphorylierung durch PKC und zeigt eine Reduktion des I_{to} nach Phosphorylierung. Die kürzere Spleißvariante zeigte sich unempfindlich für diese Phosphorylierung durch PKC (Po et al 2001). Jia und Takimoto konnten 2006 zeigen dass auch die Expression von KChIP2 negativ durch die aktivierte PKC beeinflusst werden kann. Für den Einfluss der PKA, der gemeinsamen

Endstrecke der β -adrenergen Stimulation gibt es bisher nur Daten für nicht kardiales Gewebe wie zB den Hippokampus (Hoffmann et Johnston 1998, Shimoni und Liu 2004, Tao et al 2005).

Hormonelle Beeinflussung

Es scheint eine geschlechtsspezifische hormonelle Beeinflussung des I_{to} zu geben. In zwei verschiedenen Studien an Ratten konnte eine Reduktion des $I_{to,f}$ durch Östrogeneinfluss über eine Steigerung von MiRP1 gezeigt werden (Eghbali et al 2005, Kundu et al 2008). Im Gegensatz dazu scheint Testosteron bei Hunden die Expression von Kv4.3 deutlich zu erhöhen und die Repolarisation zu verkürzen. Es wird darüber hinaus von anderen Autoren vermutet, dass die Geschlechtshormon-bedingte Beeinflussung des $I_{to,f}$ einer der Gründe für eine höhere Inzidenz des Brugada Syndroms bei Männern ist (Di Diego et al 2002, Eckardt 2007). Das Schilddrüsenhormon scheint ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Expression von Kv4.2 und Kv4.3 sowie Kv1.4 bei Ratten zu haben. Unter anderem wird die postnatale Zunahme des $I_{to,f}$ einem elektrophysiologischen Remodeling durch Effekte des Schilddrüsenhormons zugeschrieben. Dieses soll die Expression von Kv4.2/Kv4.3 erhöhen und gleichzeitig die Expression von Kv1.4 reduzieren (Shimoni et al 1997, Wickenden et al 1997, Guo et al 1998, Gassanov et al 2009).

Autokrine/Parakrine Beeinflussung

Angiotensin II (ATII) reduziert die $I_{to,f}$ Stromdichte in neonatalen Rattenventrikeln durch die Reduktion der Kv4.3-Expression. In diabetischen Ratten mit chronisch erhöhten ATII-Spiegeln, kam es zu einer Hemmung der Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA), zur Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase PTK und einer Reduktion der Kv4.2-Expression (Shimoni et al 2004). In ventrikulären Kardiomyozyten des Menschen scheint es einen transmuralen Gradienten für die Transkription von ATII zu geben. In ventrikulären, endokardialen Myozyten wurde im Vergleich mit epikardialen Myozyten eine deutlich erhöhte Transkription von ATII gemessen. So könnte der inhibitorische Effekt von ATII über eine Reduktion des $I_{to,f}$ ebenfalls zu der lokalen Heterogenität in der APD des Menschen beitragen (Sawa et al 1992).

Metabolische Beeinflussung

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten die sich mit metabolischen Einflüssen auf den I_{to} befassen (Magyar et al 1992, Xu et al 1996, Stanley et al 1997, Shimoni et al 2001, Qin et al 2001, Lengyel et al 2007). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es diverse metabolische Beeinflussungen des I_{to} gibt. Allerdings sind die molekularen Mechanismen bisher noch unvollständig verstanden und die Ergebnisse nicht immer einheitlich.

Eine Erhöhung von Fettsäuren im Zytoplasma sowie eine Umstellung der Energiegewinnung der Zelle auf Fettsäureoxidation führt scheinbar zu einer Reduktion des $I_{to,f}$ (Xu et al 1996, Stanley et al 1997). Eine diabetische Stoffwechsellage scheint ebenso zu einer Reduktion des I_{to} zu führen (Magyar et al 1992, Lengyel et al 2007), ein Effekt der durch eine Insulinexposition der Zellen zumindest teilweise zu verhindern oder umzukehren ist (Lengyel et al 2007, Li et al 2005).

2.5.5 Verzögerter Gleichrichterstrom I_K (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{sus}).

Die verzögerten Gleichrichterströme I_K sind K^+ -Auswärtsströme. Als Repolarisationsströme nehmen sie in Phase 2 (Abb 7) langsam zu und tragen maßgeblich zur Repolarisation in humanen ventrikulären und atrialen Myozyten bei. In Nagetieren, wie Ratten und Mäusen, sind sie hingegen schwach oder kaum nachweisbar (Xu et al 1999, Clancy und Rudy 2002) (Tab 3). Sie teilen sich in eine mittel-schnell aktivierende und schnell inaktivierende Stromkomponente I_{Kr} und eine langsam aktivierende und nicht inaktivierende Komponente I_{Ks} auf. Der I_{Kr} -Strom wird durch Depolarisation aktiviert und hat seine maximale Amplitude bei Spannungen von +0mV bis +10mV. Die I_K -Ströme sind zum einen mitverantwortlich für die Repolarisation. Aufgrund ihrer Einwärtsgleichrichter-Funktion sind sie darüber hinaus, zusammen mit dem I_{K1} (s 2.5.6), für die Stabilisierung des Membranpotenzials auf -80mV mit verantwortlich. Die Einwärtsgleichrichter-Funktion beschreibt eine Abnahme der K^+ -Leitfähigkeit bei positiven Membranpotenzialen (Smith et al 1996). Der I_{Ks} hat eine ansteigende Leitfähigkeit bei Membranpotenzialen von >-30mV. Er erreicht während der Plateauphase des AP einen Gleichgewichtszustand (steady-state). Ein dritter, ebenfalls relativ schnell aktivierender Strom, ist der I_{sus} . Dieser Strom zeichnet sich durch eine langsame Aktivierung und fast keine Inaktivierung aus. Diesen Strom gibt es neben dem Rattenmyokard auch in den Kardiomyozyten des Menschen und Hunden (Wang et al 1993, Nallet et al 1999).

Auch für die verzögerten Gleichrichterströme existieren bereits eine Reihe von Untersuchungen bezüglich deren Veränderungen unter Herzhypertrophie und -Insuffizienz, sowohl an Tiermodellen (Jiang et al 2000, Volk et al 2001) als auch humanen Geweben (Li et al 1998). Generell konnte in den Arbeiten eine Reduktion des I_K -Gesamtstromes oder der einzelnen Komponenten I_{Ks} und I_{Kr} nachgewiesen werden.

Neurohumorale Beeinflussung der „delayed rectifier“-K⁺-Ströme

Das neuroendokrine System spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Herzaktivität. Die Änderung der Herzfrequenz geht mit einer Änderung in der APD einher und somit unterliegen auch die „delayed rectifier“-K⁺-Kanäle einer Modulation durch adrenerge und cholinerge Stimulation über unterschiedliche second messenger. Über Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und der Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) konnte eine Erhöhung des I_{sus} bei Xenopus Oozyten herbeigeführt werden (Mason et al 2002). I_{Kr} unterliegt beispielsweise durch adrenerge Modulation des HERG - Kanals einer Stromsteigerung durch Erhöhung der direkten cAMP- Bindung (Cui et al 2000). Auch eine Tyrosinphosphorylierung führte bei der Ratte zur Erhöhung des K⁺-stroms (Cyabyab und Schlichter 2002).

2.5.6 Einwärtsgleichrichter Strom I_{K1}

Der I_{K1} ist zum Teil für die Form des Aktionspotenzials im späten Teil von Phase 3 des APs mitverantwortlich, indem es kleine K⁺-Ströme nach Auswärts zulässt. Eine Ausschaltung des I_{K1} in transgenen Knock-out Mäusen konnte zeigen dass es bei kompletter Blockade des I_{K1} auch zur Verlängerung von Aktionspotenzialdauern kommt. Die Hauptaufgabe des I_{K1} ist es jedoch das Ruhemembranpotenzial stabil zu halten. Dies erreicht dieser ständig geöffnete Kanal mit seiner Besonderheit als Einwärtsgleichrichter wie in 2.5.7 beschrieben. Somit werden experimentell bei Membranpotenzialen negativer als -90 mV große Einwärtsströme aufgezeichnet: Bei positiveren Kommandospannungen als dem Gleichgewichts (Nernst-) Potenzial von K⁺ sind kleine Auswärtsströme zu registrieren (Lopatin 1994, Kubo et al 1995). Physiologisch hat dies aber keine Relevanz, da es hier nicht zu Membranpotenzialen kommt die negativer als -90 mV sind.

2.5.7 Einwärtsgleichrichter Kanäle Kir

Die kardialen Kir Einwärtsgleichrichter-Kanäle werden aus 4 α -UE mit 2 Transmembranösen Segmenten M1 und M2 und einer Porenschleife gebildet (Abb 8). Da ihnen ein Spannungssensor fehlt, sind sie bei allen Spannungen geöffnet oder sie sind ligandengesteuert I_{KATP}, I_{K(ACh)}. Grundsätzlich könnten die Kanäle K⁺-Ströme in beide Richtungen zulassen. Ihre Einwärtsgleichrichter-Funktion entfalten sie indem sie K⁺-Ströme hauptsächlich nach Innen zulassen. Diese Funktion wird mit dem Verschluss der Pore für intrazelluläres K⁺ durch intrazelluläres Mg²⁺ und die Polyamine wie Spermin und Spermidin erreicht (Lopatin et al 1994; Fakler et al 1995). Dieser Effekt tritt ein, wenn das Membranpotenzial positiv wird und die elektrochemische Triebkraft für Kationen nach außen wirkt. Es kann jetzt kein K⁺ mehr von intra- nach extrazellulär austreten. Somit schließen diese Kanäle kurz nach Beginn der Depolarisation für K⁺-

Auswärtsströme, wenn der schnelle Na^+ -Einstrom dafür sorgt, dass das Membranpotenzial positiv wird. Mit zunehmender Repolarisation öffnet der Kanal und sorgt durch die jetzt fließenden Ströme für eine Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials (Kubo et al 1993, Kubo et al 2005). Physiologisch trägt der Kanal zur Repolarisation und zur Stabilisierung des Membranpotenzials vor allem durch seine K^+ -Auswärtsströme bei (Nerbonne und Kass 2005). Es werden in vivo keine negativeren Membranpotenziale als das K^+ -Gleichgewichtspotenzial von -90 mV erreicht, sodass es trotz offener Kanäle keine Triebkraft für einen K^+ -Einwärtsstrom gibt. Eine besondere Bedeutung scheint diesen Kanälen in metabolischen Stresssituationen wie Hypoxie oder Ischämie zuzukommen. In ventrikulären Myozyten wird die Öffnung von I_{KATP} Kanälen durch die Anwesenheit von intrazellulärem ATP blockiert. Das bedeutet, dass in Abwesenheit von ATP (Ischämie, Hypoxie) diese Kanäle zunehmend öffnen und damit zu einer schnelleren Repolarisation führen (Findlay 1994).

2.6 Ziele und Arbeitshypothesen der Arbeit

Motiviert von dem klinischen Kontext der Herzinsuffizienztherapie durch mechanische Unterstützungssysteme, ist es Ziel dieser vorliegenden Arbeit Umbauvorgänge bei der durch die mechanische Entlastung hervorgerufenen Atrophie besser zu verstehen. Da, wie in 2.4.3 zu lesen, die elektrophysiologischen Veränderungen bei kardialer Atrophie noch unvollständig verstanden sind, sollen in dieser Arbeit die elektrophysiologischen Eigenschaften des transienten K^+ -Auswärtsstroms I_{to} und seinen möglicher Einfluss auf die APD an druckentlasteten, ventrikulären Kardiomyozyten an einem etablierten Tiermodell untersucht werden. Aufgrund der vielen oben genannten Parallelen (s 2.4.3 und Tab 2) zwischen drucküberbelasteten und druckentlasteten Kardiomyozyten sollen die neuen Beobachtungen an den druckentlasteten Kardiomyozyten mit den bereits bekannten Veränderungen, bei hypertrophierten, chronisch drucküberbelasteten Kardiomyozyten verglichen werden um zu überprüfen, ob es sich um ein lineares Kontinuum handelt oder eine andere Beziehung zwischen den beobachteten und gemessenen Effekten existiert:

Aus den bisherigen Daten und Erkenntnissen ergeben sich drei mögliche Hypothesen:

- a) Es kommt zu elektrophysiologischen Veränderungen bei den druckentlasteten Kardiomyozyten, analog zu den phänotypisch-morphologischen, linearen Veränderungen mit Hypertrophie und Atrophie an den jeweils gegenüberliegenden Enden eines (linearen) Kontinuums (Abb 11). Damit wäre eine Reduktion der Aktionspotenzialdauer (APD) und eine Vergrößerung der repolarisierenden K^+ -Ströme: $\text{I}_{\text{to}}, \text{I}_{\text{sus}}, \text{I}_{\text{K1}}$ zu erwarten.

Abbildung 11 Hypothese a). Lineare Beziehung zwischen Atrophie und Hypertrophie

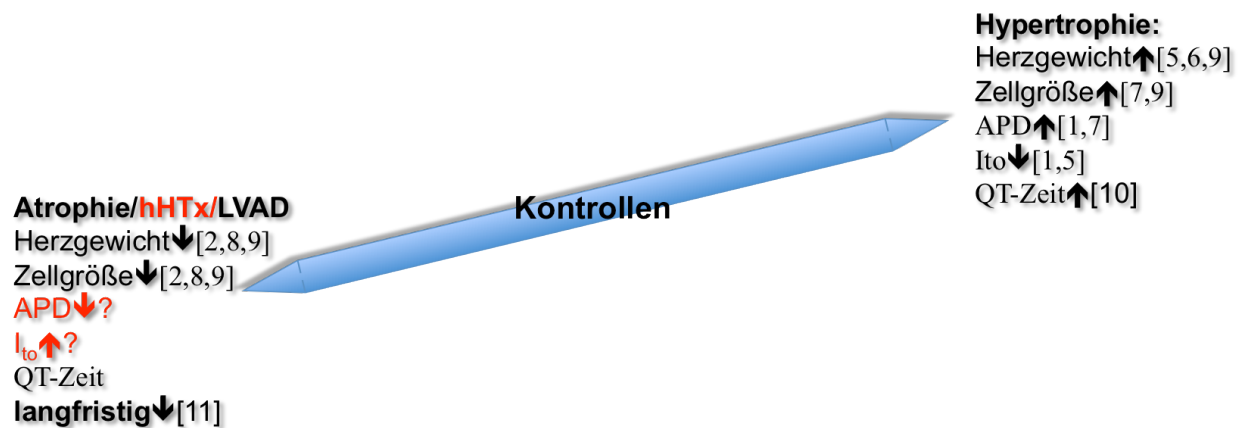


Abb 11 zeigt die hypothetische lineare Beziehung zwischen Hypertrophie und Atrophie bzw mechanischer Entlastung. *In Rot: Die mögliche Veränderungen durch mechanische Entlastung.*

APD: Aktionspotenzialdauer

I_{to}: transienter K⁺ Auswärtsstrom

¹Wickenden et al 1998 (Mensch)

²Kilborn et al 1990 (Ratte)

³Terraciano et al 2003 (Mensch)

⁴Escobar et al 2003 (Ratte)

⁵Wiesner et al 1997 (Ratte)

⁶Rose et al 2005 (Kaninchen)

⁷Swynghedauw et al 1995 (Mensch)

⁸Sabbah 2004 (Hund)

⁹Depre et al 1998 (Ratte).

¹⁰Nattel et al 2007 (Mensch)

¹¹Harding et al 2001 (Menschen,LVAD)

b) Es kommt zu keinen elektrophysiologischen Veränderungen bei den druckentlasteten Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen im Hinblick auf die Aktionspotenzialdauer (APD) und die darauf Einfluss nehmenden K⁺ - Ströme.

c) Es kommt zu ähnlichen elektrophysiologischen Veränderungen in einer nicht linearen, U-förmigen Beziehung (Abb 12), wie sie bisher bei fetalen und den chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten beobachtet wurden (Tab 2): Es kommt zu einer Rückkehr zu fetalen genetischen Expressionsmustern, einer Zunahme der APD und einer Abnahme des I_{to}.

Abbildung 12 Hypothese c). U-förmige Beziehung zwischen Hypertrophie, Atrophie und fetalen Zellen

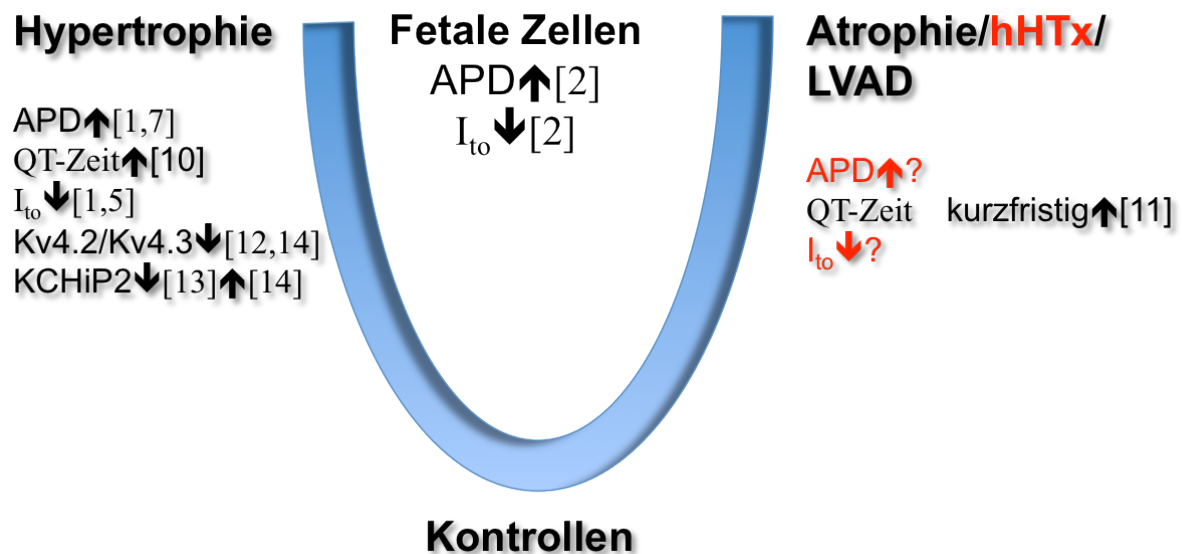


Abb 12 zeigt die hypothetische U-förmige Beziehung zwischen Hypertrophie und Atrophie bzw mechanischer Entlastung. *In Rot: Die mögliche Veränderungen durch mechanische Entlastung.*

APD: Aktionspotenzialdauer

I_{to} : transienter K^+ Auswärtsstrom

¹Wickenden et al 1998 (Mensch)

²Kilborn et al 1990 (Ratte)

³Terraciano et al 2003 (Mensch)

⁴Escobar et al 2003 (Ratte)

⁵Wiesner et al 1997 (Ratte)

⁶Rose et al 2005 (Kaninchen)

⁷Swynghedauw et al 1995 (Mensch)

⁸Sabbah (Hund)

⁹Depre et al 1998 (Ratte)

¹⁰Nattel et al 2007 (Mensch)

¹¹Harding et al 2001 (Menschen, LVAD)

2.6.1

Notwendigkeit eines Tiermodells

Es gibt eine Vielzahl von Problemen bei der systematischen Beantwortung der vielen noch offenen Fragen zu den Einflüssen der VAD-Therapie bei Herzinsuffizienz. Es ist zwar, dank der gewonnenen Gewebeproben aus der Herzspitze bei der VAD- Implantation, möglich Untersuchungen an humanen Kardiomyozyten vor und bei möglicher Transplantation oder VAD-Explantation auch nach der Entlastungstherapie durchzuführen, jedoch scheitern viele prospektiv und randomisierte Studiendesigns an offensichtlichen ethischen Problemen bei der Behandlung von Menschen. Darüber hinaus ist die Patientenpopulation sehr heterogen. Das betrifft die Ursache der Herzinsuffizienz, die Dauer der mechanischen Entlastung sowie viele nicht zu beeinflussende Kofaktoren wie Begleiterkrankungen und bestehende Medikamentenregime (Hall et al 2011). Eine mögliche Lösung dieses Problems liegt in der Verwendung von Tiermodellen. Auch hier wird kritisiert, dass es nicht möglich ist die Komplexität der humanen Herzinsuffizienz mit Tiermodellen abzubilden (Ambardekar und Buttrick 2011, Hall et al 2011). Geht es jedoch um die isolierte Untersuchung der Atrophie und der Effekte von Druckentlastung am Myokard ist das Tiermodell der heterotopen Herztransplantation (Lindsey und Ono 1969) geeignet:

Dieses Modell bedient sich einer heterotopischen Herztransplantation (hHTx) bei genetisch identischen Lewis-Ratten. Der Vorteil der Verwendung dieser Ratten ist vor allem ihre Isogenität, die zum einen die Vergleichbarkeit zwischen den entlasteten Tieren und den Kontrollen erhöht und zum anderen eine Immunsuppression überflüssig macht. Dies ist besonders wichtig, weil Immunsuppressiva wie CyclosporinA oder FK506 zusätzlich zur Immunsuppression auch eine Blockade von Calcineurin verursachen und dadurch auch andere intrinsische Effekte auf das kardiale Remodeling haben könnten (Wang et al 2001).

Dieses hier angewandte Tiermodell gilt in weiten Kreisen als etabliert und akzeptiert um die molekularen und zellulären Veränderungen der Entlastung zu untersuchen (Kolar et al 1995, Depre et al 1998, Razeghi et al 2003, Ito et al 2003, Doenst et al 2001, Takaseya et al 2004, Doenst et al 2006, Razeghi et al 2007, Oriyanhan et al 2007). Das gewählte Modell induziert eine mechanische und durch die Denervierung neurohumorale Entlastung, die dem des HeartMate® (Thoratec®) Systems gleicht (Radovancevic et al 1992). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden dafür die Begriffe „entlastete Kardiomyozyten“ oder „entlastete Herzen“ verwendet.

Bezüglich der Elektrophysiologie ist zu beachten, dass es eine große Ähnlichkeit zwischen den dem AP zu Grunde liegenden Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ - Strömen und ihren molekularen Mechanismen bei Menschen und Ratten gibt. Ein wichtiger Unterschied ist allerdings, dass bei Ratten und den meisten anderen Nagetieren der I_{to} einer der wesentlichsten Ströme für die Repolarisation ist, beim Menschen allerdings die verzögerten K^+ -Gleichrichterströme I_{Kr} , I_{Ks} und der K^+ -Einwärtsgleichrichterstrom (K_{ir}) einen größeren Anteil an der Repolarisation und damit der Formung des APs haben (Nerbonne et al 2005).

2.7 Zusammenfassung und Fragestellung

Die Anpassungsfähigkeit des Herzens an wechselnden Belastungen kann in beide Richtungen als ein *lineares*, offenes Kontinuum ohne eine Abgrenzung zwischen den einzelnen Phänotypen beschrieben werden (Abb 11 & 2.6 Hypothese a).

„Die Epidemie der Herzinsuffizienz“ (Yancy et al 2013) nimmt jährlich an Prävalenz und Inzidenz in den westlichen Industrienationen zu. Die Ätiologie ist vielfältig, das Krankheitsbild heterogen und die Reduktion der Lebensqualität sowie die Sterblichkeit unverändert hoch. Bis vor 15 Jahren galt die Herztransplantation in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz als alternativlos. Mittlerweile haben sich mechanische Unterstützungssysteme, sogenannten VADs (ventricular assist devices), als de-facto-Goldstandard der chirurgischen Therapie der Herzinsuffizienz etabliert. VADs sind gut verfügbar, verbessern die kardiale Funktion und damit die Lebensqualität. Die 1-Jahres-Mortalität ist günstiger als bei Patienten nach Herztransplantation. Sie erreichen dies durch die mechanische Unterstützung und Stabilisierung des HZVs und durch eine Umkehr des phänotypisch pathologischen, kardialen Genexpressionsmusters. Auch wenn noch keiner dieser Abläufe vollständig verstanden ist, konnten bisher einige Gemeinsamkeiten bei Veränderungen auf den Ebenen Metabolismus und Kontraktilität in über- und entlasteten Herzmuskelzellen beobachtet werden. Eine Besonderheit ist, dass die Implantation von VADs bei den Patienten vermehrt zu ventrikulären Rhythmusstörungen und EKG-Veränderungen wie QT-Verlängerungen führen. Diese können ebenfalls bei kardialer Hypertrophie auftreten. Diese Gemeinsamkeiten würden dem Modell der kardialen Anpassungsfähigkeit als lineares Kontinuum (s 2.6 Hypothese a) direkt widersprechen. Basierend auf diesen Beobachtungen kann die Hypothese c (s 2.6) dieser vorliegenden Arbeit begründet werden, dass die Veränderungen der entlasteten Kardiomyozyten im Aktionspotenzial (AP)-Verlauf, den Repolarisationsströmen, insbesondere dem I_{to} , den bisher beobachteten Veränderungen der druckbelasteten, hypertrophierten Herzmuskelzellen gleichen werden.

Die Fragestellungen lauten konkret:

1. Welche Veränderungen gibt es bei den druckentlasteten Herzen bezüglich des Herzgewichts und der Zellgröße als Zeichen einer Atrophie?
Gibt es dabei transmurale Unterschiede zwischen endokardialen und epikardialen Kardiomyozyten?
2. Wie verändert sich das ventrikuläre Aktionspotenzial (AP) bei entlasteten Herzen? Gibt es darüber hinaus auch hier transmurale Unterschiede zwischen Endokard und Epikard? Ähneln die beobachteten Veränderungen denen von hypertrophierten Herzmuskelzellen, entsprechend einer

U-förmigen Beziehung? Gibt es keine Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen oder liegen die Veränderungen auf gegenüberliegenden Enden eines linearen Kontinuums?

3. Welche Veränderungen sind bei den druckentlasteten Kardiomyozyten in Bezug auf die repolarisierenden K^+ -Ströme I_{to} , I_{sus} , I_{K1} im Hinblick auf die Größe ihrer Ströme und der ihnen zu Grunde liegenden Kinetik zu beobachten? Gibt es transmurale Unterschiede zwischen Endokard und Epikard?
4. Sollte es zu Veränderungen bei der APD oder dem größten der repolarisierenden Ionenströme aus Frage 3, dem I_{to} , kommen: Basieren diese Veränderungen auf einer Veränderung der Kanalstruktur oder auf einer Änderung der Anzahl der Kanäle aufgrund einer veränderten Proteinexpression?

Aufgrund der ethischen und technischen Schwierigkeiten an humanen Kardiomyozyten eine solche Studie prospektiv und randomisiert durchzuführen, wurde das mit der isolierten Druckentlastung von Herzen durch VADs vergleichbare Tiermodell der heterotopen Herztransplantation (hHTx) gewählt, um diese Fragen zu beantworten (s 2.6.1). Das Tiermodell (s 3.1) basiert auf einer 2-wöchigen Entlastung von Herzen männlicher Lewis Ratten durch eine hHTx. Im Anschluss an diesen Zeitraum wurde zunächst eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt, um am darauffolgenden Tag die entlasteten Herzen sowie die nativen Herzen als Kontrollen zu explantieren. Darauf folgten eine enzymatische Zellisolation aus den explantierten Herzen sowie schließlich Patch-Clamp Versuche an den isolierten endokardialen und epikardialen Kardiomyozyten. Teile der Herzen wurden einer anderen Arbeitsgruppe, randomisiert für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung gestellt (s 3.2-3.7).

Die Antworten auf diese Fragen sollen zum einen in den bestehenden Vergleich zwischen chronischer Druckentlastung und Druckbelastung eingebracht werden, zum anderen soll ein Ausblick auf mögliche Konsequenzen der VAD-Therapie und auf zukünftig notwendige Untersuchungen gegeben werden.

3. Material und Methoden

3.1 Tiermodell

Linksventrikuläre Entlastung wurde in 26 männlichen Lewis Ratten (247±8g, Charles River, Sulzfeld, Germany) mit Hilfe einer heterotopen abdominalen Herztransplantation (hHTx) erreicht. Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Ono und Lindsey aus dem Jahr 1969.

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (BSG) und nach institutionellen Leitlinien des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie der Universität Hamburg durchgeführt.

3.1.1 Entnahme des Spenderherzens

Die Spenderratte wurde mit 4,5-5% Isofluran in eine tiefe Allgemeinanästhesie versetzt. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Anästhesietiefe wurde das Spendertier in Rückenlage fixiert, das Abdomen mit einem Längsschnitt eröffnet und die abdominale Aorta sowie die V. Cava inferior präpariert. Es wurden 100.000 IE Heparin in die V. Cava inferior injiziert um thrombembolische Komplikationen zu vermeiden. Durch die Eröffnung der Aorta abdominalis wurde das Herz entlastet. Es wurden 10ml, 4°C kalte, kardioplege Lösung (L-01) über die V. Cava inferior injiziert, welche das Herz durch die induzierte Hypothermie und einen sehr hohen K⁺-Anteil zum Stillstand brachte.

Es erfolgte eine Sternotomie und das Freipräparieren des Herzens. Dazu wurden die folgenden zu- und abführenden Gefäße des Herzens ligiert:

Vv. cavae inferior und superior sowie die Vv. pulmonales. Anschließend wurde das Herz von der Lunge, den Hohlvenen sowie der Aorta abgesetzt und in die 4°C kalte, kardioplege Lösung zur Verwahrung bis zur Implantation gelegt. Es wurde die kalte Ischämiezeit notiert.

3.1.2 Implantation / Empfängertier

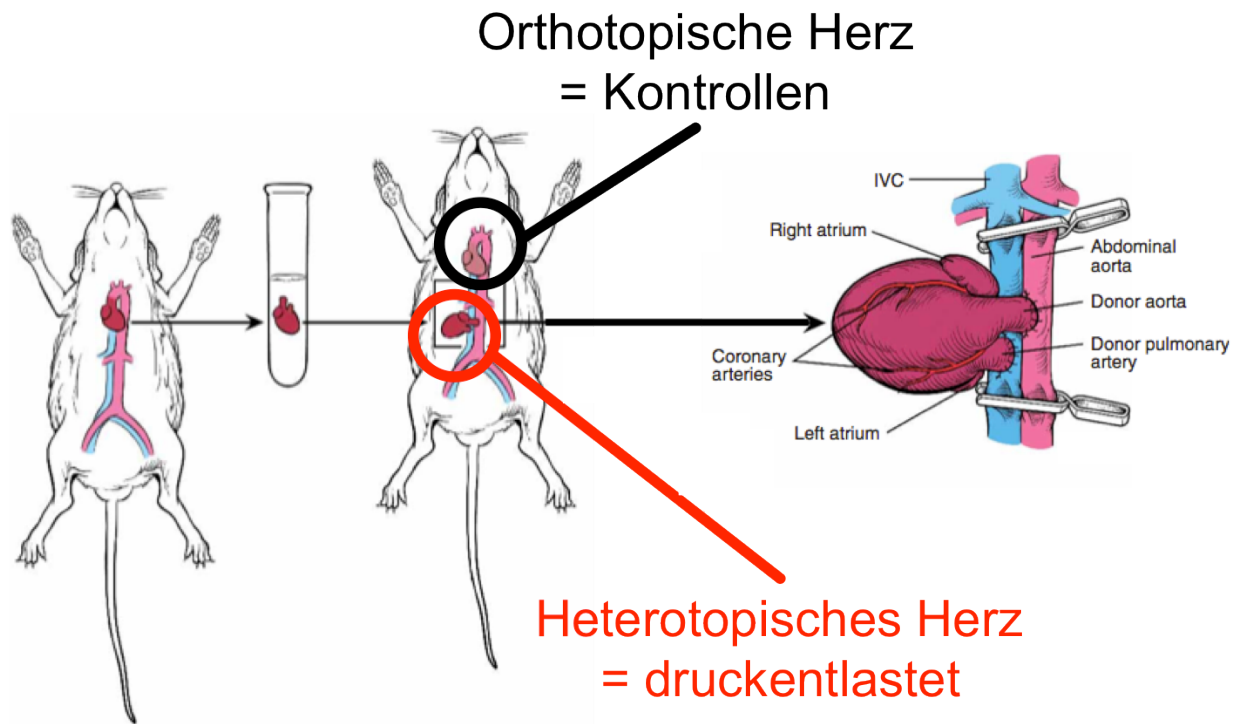
Das Empfängertier wurde mit einer volatilen 1,5-2Vol% Isofluran Monoanästhesie anästhesiert, intubiert und mechanisch ventiliert. Das Tier wurde in Rückenlage fixiert und mit einem Längsschnitt eröffnet. Die Aorta abdominalis und die V. cava inferior wurden infrarenal freipräpariert. Es erfolgte das Abklemmen der beiden freipräparierten Gefäße und eine anschließende zwei mm lange, longitudinale Inzision in beiden Gefäßen. Das Herz wurde anterior zum Operateur positioniert, sodass der superiore und anteriore Anteil der Aorten Anastomose genäht werden konnte. Nach einer Wendung des Herzens nach posterior konnte auch die Rückseite der aortalen Anastomose genäht werden sowie die venöse Anastomose zwischen V. Cava inferior des Empfängers und dem Truncus Pulmonalis des Spenderherzens (Abb 13). Anschließend wurden die Klemmen wieder geöffnet und das Ende der kalten Ischämiezeit vermerkt. Diese betrug bei unseren Versuchen zwischen 35 und 50 Minuten. Die Herzkranzgefäße wurden wieder anterograd durchblutet und das Herz begann erneut zu schlagen. Nach ca ein bis zwei Minuten Reperfusion stellte sich erneut ein Sinusrhythmus ein. Der Situs wurde schichtweise verschlossen.

Jedes Tier erhielt perioperativ eine subkutane Schmerztherapie mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,04mg/kg KG s.c. 30 Minuten vor Narkoseeinleitung sowie Caprofen intraoperativ in einer Dosierung von 5mg/kg KG s.c.

Folgender Blutfluss wurde mit der hHTx etabliert: Von der Aorta retrograd in die Koronararterien, Koronarvenen, Koronarsinus, rechter Vorhof, rechter Ventrikel, Truncus Pulmonalis, V. Cava inferior. Dies führte, bei erhaltener funktioneller Perfusion des Herzens, zu einer nahezu vollständigen Druck- und Volumenentlastung des linken Ventrikels.

3.1.3 Dauer der Entlastungstherapie

Die Dauer der Entlastung wurde bewusst auf 14 Tage festgelegt. Vorarbeiten wie von Depre et al 1998 und Doenst et al 2006 konnten zeigen, dass nach 2-wöchiger Entlastungstherapie sich ein steady-state der kardialen Atrophie einstellt.



IVC: Vena cava inferior.

Abb 13 (Modifiziert nach Hasegawa et al 2007): Das Spenderherz wird mit seiner Aorta ascendens an die Aorta abdominalis des Empfängertiers end-zu-seit anastomosiert. Ebenfalls vorne im Bild der linke Vorhof mit seinen ligierten Vv. Pulmonales. Danach wird im nächsten Schritt das Spenderherz nach rechts geklappt und der in diesem Moment noch unten liegende Truncus pulmonalis an die V. cava inferior des Empfängertiers End-zu-Seit anastomosiert.

3.2 Linksventrikuläre Masse und Herzfrequenz

Um das Ausmaß der Atrophie und eine Reduktion der linksventrikulären Masse sowie der Herzfrequenz zu bestimmen, wurde eine echokardiographische Untersuchung der Ratten in Sedierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Empfängertiere 14 Tage postoperativ 2D - echokardiografisch untersucht (Vevo 600, VisualSonics). Die Untersuchung wurde in einer 1% Isofluran-Sedierung durchgeführt. Es wurde der ventrikuläre Durchmesser längs, quer, die Wanddicke und der Durchmesser des linken Ventrikels inklusive muskulärer Wand echokardiographisch ausgemessen. Dies wurde jeweils für die Systole und die Diastole durchgeführt. Die Werte wurden gemittelt. Nach Collins et al (2001) wurde die linksventrikuläre Masse (LVM) aus folgender Formel und den gewonnen Daten ermittelt (Abb 14).

Abbildung 14 Echokardiographische Ermittlung der linksventrikulären Masse (LVM)

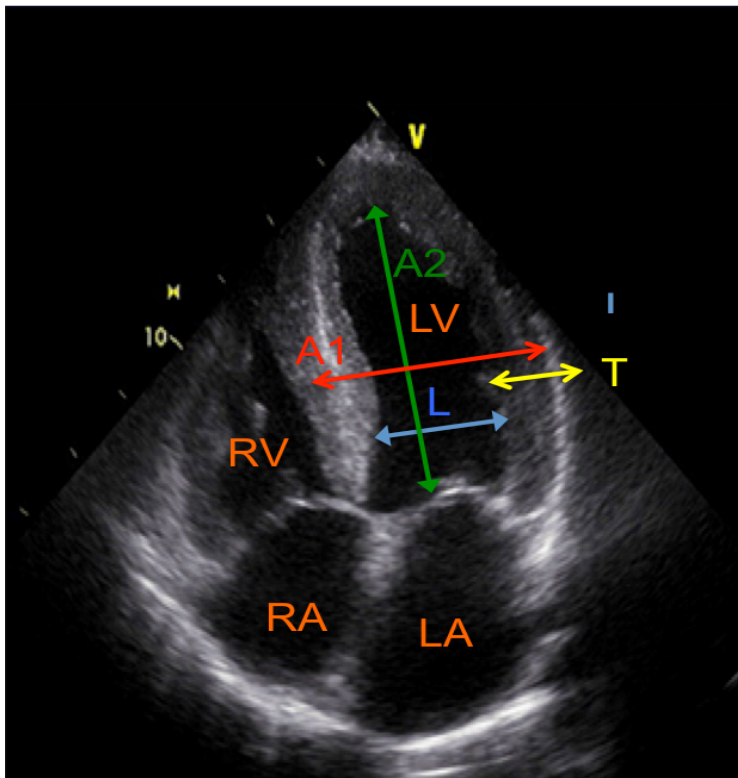


Abb 14: Echokardiographischer, apikaler, 4-Kammerblick (beim Menschen) zur exemplarischen Verdeutlichung der echokardiographischen Bestimmung der Ventrikelmasse.

$$\text{LVM (mg)} = 1.05 [5/6 A1 \times (L+T) - (5/6 A2 \times L)] \text{ (Collins et al 2001).}$$

- LA Linker Vorhof
- RA Rechter Vorhof
- RV Rechter Ventrikel
- LV Linker Ventrikel
- L Innendurchmesser quer zum Ventrikel
- A1 Innendurchmesser quer zum Ventrikel + muskulärer Wand
- A2 Innendurchmesser längs zum Ventrikel
- T Wanddicke

Die Herzfrequenz wurde aus den Daten der Echokardiografie in 1,5-2Vol%-Isofluran-Inhalationsnarkose abgeleitet

3.3 Zellisolation

Einen Tag nach der echokardiographischen Untersuchung, am 15. postoperativen Tag, wurden die Empfängertiere erneut mit einer 1,5-2Vol% Isofluran-Narkose anästhesiert. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Abdomen eröffnet und das implantierte Herz freipräpariert. Nach Abklemmung der abdominalen Aorta und der V. Cava inferior des Empfängers wurde das implantierte Herz an den Gefäßen abgetrennt, entnommen und sofort in 4° kalte, kardioplege Lösung (L-01) gelegt, woraufhin das Herz nach ca. vier bis fünf Schlägen erneut zum Stillstand gebracht wurde. Außerdem wurde im Anschluss eine Thorakotomie durchgeführt und als Kontrolle das native Herz ebenfalls explantiert und in 4° kalte, kardioplege Lösung gelegt. Die Zellisolation wurde leicht modifiziert nach einer Methode von Isenberg und Klöckner von 1982 mit einer Langendorff Apparatur durchgeführt (Isenberg und Klöckner 1982).

Die Aorta wurde hierzu mit einem Glasröhrchen kanüliert und freihängend, anterograd, mit einem konstanten Druck von ca. 75mmg Hg von verschiedenen Lösungen, die mit 100% - O₂ bei 37° C aufgesättigt wurden, perfundiert. Es wurde fünf Minuten mit einer Ca²⁺ - freien Tyrode - Lösung (L-02) gespült um Blutreste aus dem Herzen zu entfernen. Im zweiten Schritt wurde das Herz von einer Enzymlösung, die das kardiale Bindegewebe auflösen sollte, für 15 Minuten rezirkulierend perfundiert. Diese Enzymlösung bestand aus Kollagenase (Typ CLS2, 200U/ml, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Protease (Typ 14, 0,7 U/ml; Sigma, München, Deutschland) sowie Ca²⁺ - freier Tyrode - Lösung (L-02). Anschließend wurde, um die Enzymreste zu entfernen, das Herz nochmal mit einer einem mmol Ca²⁺ - enthaltenden Tyrode - Lösung (L-03) für fünf Minuten gespült.

Nach der enzymatischen Behandlung wurde das Herz längs, entlang des Septum intraventrikuläre aufgeschnitten. Somit erhielten wir die freie Wand des linken Ventrikels. Aus dieser entnahmen wir je zwei endokardiale und epikardiale Proben. Der eine Teil der entnommen Proben wurden in 1mmol Ca²⁺ - haltiger Tyrode - Lösung gegeben, daraufhin für einige Minuten in einem 41° warmen Wasserbad geschwenkt und anschließend gezupft. Dies erzeugte eine trübe Zellsuspension. Nach der Sedimentierung dieser Suspension konnte mit den elektrophysiologischen Untersuchungen begonnen werden. Der zweite Teil der Proben wurde kryokonserviert um zu einem späteren Zeitpunkt die molekulargenetischen Untersuchungen vornehmen zu können.

3.4 Patch Clamp Technik

1976 wurde von Neher und Sakmann aus Göttingen die Patch-Clamp Technik beschrieben (Patch=Membranflicken, clamp=Klemme). Bei diesem Verfahren wird eine saubere polierte Mikropipette aus Glas (Patch-Pipette) mit einer Elektrolytlösung (Pipettenlösung L-04) gefüllt und vorsichtig auf die Zellmembran gesetzt. Nun wird an der Pipette ein Unterdruck angelegt, wodurch sich die Pipette an der Zellmembran festsaugt. Der sich unter der Spitze der Pipette befindliche Teil der Zellmembran (Patch) wird so elektrisch von seiner Umgebung isoliert. Diese Abdichtung wird auch Seal genannt und der Seal-Widerstand in Ω gemessen. Seal-Widerstände im Bereich von mehreren $G\Omega$ werden auch Giga-Seals genannt. Diese Giga-Seals erlauben die Registrierung von so kleinen Stromsprüngen (im pA Bereich), wie sie durch einzelne Schaltvorgänge von Ionenkanälen verursacht werden. Die Mechanismen, die zu einem solchen Seal führen können, sind dabei noch weitgehend ungeklärt. Erstaunlich ist auch die mechanische Belastbarkeit eines einmal erreichten Seals. Messungen konnten über eine halbe Stunde hinweg vorgenommen werden. Die Badlösungen konnten ebenfalls während des Experimentes getauscht werden. Die Verbindung, die direkt nach einer Sealbildung vorliegt, wird auch als cell-attached Konfiguration bezeichnet. Dies stellt die Ausgangsposition für weitere Ableitungsmöglichkeiten (whole-cell, outside-out, inside-out) dar. Die Versuche in dieser Arbeit sind alle in der whole-cell - Ableitung durchgeführt worden, es wird daher an dieser Stelle auf einer Vertiefung der anderen Möglichkeiten verzichtet. Im Folgenden sollen die Herstellung und die Eigenschaften einer whole-cell - Ableitung erklärt werden.

3.4.1 Die „cell-attached“- Konfiguration

Nach Erreichen eines $G\Omega$ -Seals befindet sich die Zelle in der cell-attached Konfiguration. Es können nun Ströme gemessen werden, die durch den Membranfleck unter der Pipettenspitze fließen.

Durch Modifikation der extrazellulären Badlösung (L-05 – L07) können nur Ionenströme unter Wahrung des physiologischen Zellzustandes gemessen werden. An dieser Stelle ist aber weder das genaue Zellmembranpotenzial noch die cytosolische Ionenkonzentration bekannt, was eine genaue Definition unmöglich macht. Es ist die Ausgangsstelle für die Ganzzellaufleitung (whole-cell Konfiguration).

3.4.2 Ganzzelleableitung (whole-cell Konfiguration)

Bei der whole-cell Konfiguration korrespondiert das Zellinnere mit dem Pipetteninnenraum. Damit können elektrische Ströme über der gesamten Zellmembran gemessen werden. Außerdem erlaubt es eine Bestimmung und Veränderung des Gesamtmembranpotenzials. Da hier nur ein Summenstrom, also alle Ionenkanäle gleichzeitig gemessen werden, wird nur ein sehr grobes Bild des Strommusters der Zelle aufgezeichnet. Dies gibt dieser Ableitungsform den Namen Ganzzelleableitung. Der Anteil der einzelnen Kanalgruppen an dem Gesamtstrom variiert.

3.4.3 Die ruptured-patch Technik

Der Weg von der cell-attached Konfiguration zur whole-cell - Ableitung geht über die hierfür übliche ruptured-patch Technik. Es muss ein Zugang durch die Zellmembran geschaffen werden. Dafür wird ein kurzer Strompuls auf die Zellmembran gegeben (z.B. 900mV für 0,1s). Damit destabilisiert man die Zellmembran an dem zuvor geschaffenen Patch, so dass man sie hinterher mit der vorsichtigen Verwendung von Über- und Unterdruckimpulsen an dieser isolierten Stelle mechanisch zerstören kann. Dies führt zu einem korrespondierenden Raum zwischen Pipetteninnenraum und Zelle. Die cytosolische Ionenkonzentration entspricht, durch Verdünnung und Auswaschen mit dem viel größeren Lösungsvolumen der Pipette, nun der des Pipetteninnenraums.

3.4.4 Strom- und Spannungsklemme

Ist der elektrische Zugang wie oben beschrieben etabliert, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten die Ströme der Zelle zu registrieren. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen der Spannungsklemme (voltage-clamp) und der Stromklemme (current-clamp). Bei der Spannungsklemme wird das Membranpotenzial fest angelegt („geklammt“) und die Ströme registriert, die zur Aufrechterhaltung dieses Potenzials nötig sind. Bei der Stromklemme wird hingegen der gesamte Stromfluss über der Zelle vorgegeben und das sich daraus ergebene Membranpotenzial registriert. Um das Ruhemembranpotenzial zu erfassen, wird die „Nullstromklemme“ als Sonderkonfiguration der Stromklemme angelegt. Dabei wird der Gesamtstrom auf 0pA „geklammt“. Das jetzt registrierte Membranpotenzial entspricht weitgehend dem Ruhemembranpotenzial der Zelle.

Das elektrische Potenzial in der voltage-clamp der Ganzzelleableitung wird durch eine festgelegte Kommandospannung V_{pip} festgelegt. V_{pip} entspricht nicht genau dem an der Zellmembran anliegenden Potenzial V_m . Zwischen Mess- und der Referenzelektrode liegen zwei in Serie geschaltete Widerstände. R_s , der Serienwiderstand und R_m der Membranwiderstand. Im Idealfall ist R_s , der Widerstand zwischen der Silber-Messelektrode und dem Zytosol der Zelle genauso groß wie der Pipettenwiderstand R_{pip} . Sollten jedoch beim Rupturieren der Zelle Verunreinigungen wie Membranbestandteile und Zellorganellen in den Bereich der Pipettenspitze geraten, erhöht sich der R_s unter Umständen auf ein Vielfaches. Dieser Wert ist stets zu kontrollieren. Es ist möglich durch vorsichtige Überdruckpulse die Pipettenspitze wieder von Verunreinigungen zu befreien und den R_s zu senken. Der R_s lag bei allen Versuchen üblicher Weise $<10 \text{ M}\Omega$. Wie bereits erwähnt, liegt in Reihe zum R_s zusätzlich noch der Membranwiderstand R_m , sodass sich folgende Gesamtsituation ergibt.

$$R_{ges} = R_s + R_m \quad \text{dementsprechend gilt auch} \quad V_m = V_{pip} - V_s$$

Wobei V_s die am Serienwiderstand R_s abfallende Spannung ist.

Aus dieser Beziehung erkennt man, dass V_m nur dann annähernd V_{pip} gleicht, wenn R_s sehr viel kleiner als R_m ist und damit V_s sehr klein wird. So fällt die Kommandospannung zum größten Teil an der Zellmembran ab und man kann V_m annähernd mit V_{pip} gleichsetzen, also mit dem tatsächlichen Zellmembranpotenzial. Um also Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur Zellen mit sehr niedrigen R_s für die Messungen ausgewählt.

3.4.5.1 Kompensation des Serienwiderstandes R_s

Wie bereits erwähnt, fällt bei der Spannungsklemme immer ein Teil der Kommandospannung V_{pip} am Serienwiderstand R_s ab. Das führt, wie ebenfalls unter 3.4.5 beschrieben, zu einer niedrigeren Spannung an der Zellmembran als im Versuchsprotokoll vorgesehen ist. Zur Kompensation dieses Verlustes addiert die Software des Verstärkers einen zusätzlichen Strom hinzu. R_s wird zu diesem Zweck ständig mit einem Testpuls überprüft und der zu erwartende Verlust berechnet. Die Kompensation wurde auf 85 % begrenzt.

3.4.5.2 Übergangspotenziale und deren Kompensation

Ein Übergangspotenzial ist ein elektrisches Potenzial was an Grenzflächen zwischen unterschiedlichen Lösungen oder einem Leiter und einer Lösung entsteht. Es sind Ionenverschiebungen aufgrund von Konzentrationsunterschieden die diese Potenziale erzeugen.

In unserem Versuchsaufbau gibt es folgende Übergänge auf dem Weg von der Referenz zur Messelektrode.

1. Ag/AgCl-Messelektrode im Referenzbad und der Pipettenlösung.
2. Zwischen der Pipettenlösung in der Agar-Brücke und der Badlösung
3. Zwischen der Badlösung und der Pipettenlösung in der Pipettenspitze
4. Zwischen der Pipettenlösung und der Ag/AgCl Referenzelektrode des Verstärkers

Potenzial 1+4 sind gleich groß und heben sich gegenseitig auf. Potenzial 2+3 sind ebenfalls gleich groß und heben sich so lange gegenseitig auf, so lange die Pipettenspitze frei in der Lösung liegt. Kommt es zu einem Seal mit einer Zelle, gibt es keine Grenzfläche mehr zwischen Bad- und Pipettenlösung. Und damit auch keine Grenzfläche 3. Die Grenzfläche in 2 bleibt bestehen, ihr Übergangspotenzial wurde für alle Lösungen bestimmt und wird automatisch von der Software des Verstärkers berücksichtigt. Bei der Standard Pipettenlösung liegt das Übergangspotenzial (K-Glutamat)-Lösung bei ca. 12mV mit der Tyrode - Lösung.

3.4.6 Vorzeichen

Die Richtung des Stromflusses und das angelegte Potenzial werden aus Sicht der Zelle benannt. Ein Einwärtsstrom bedeutet, positive Ladungsträger fließen in die Zelle hinein bzw. negative Ladungsträger fließen hinaus. Ein solcher Einwärtsstrom wird mit einem negativen Vorzeichen (-) versehen.

Auswärtsströme bedeuten analog dazu, dass entweder positive Ladungsträger aus der Zelle hinausfließen bzw. negative Ladungsträger in die Zelle hineinfließen. Damit erhalten Auswärtsströme ein positives Vorzeichen (+). Einwärtsströme sind somit in Grafiken unterhalb der X-Achse (Nulllinie) zu finden, Auswärtsströme werden oberhalb aufgetragen. Negativere Klemmpotenziale als -80mV (Ruhemembranpotenzial) entsprechen einer Hyperpolarisation der Membran (das Zellinnere ist negativer als der Extrazellulärraum), positivere Klemmpotenziale entsprechen einer Membrandepolarisation.

3.5 Das Patch-Clamp Setup

3.5.1 Mechanische Komponenten und Schutz gegen Umwelteinflüsse

Bereits kleinste Bewegungen zwischen der Pipette und der Zelle (Größe im μm Bereich) können Patch-Clamp-Versuche stören oder gar die zu untersuchende Zelle zerstören. Daher wurden einige Vorkehrungen getroffen um den Versuchsstand gegen auch kleinste mechanische Erschütterungen abzusichern. Der Versuchsstand wurde auf einem Luftkissen gelagert und zusätzlich auf einem schwingungsgedämpften Steintisch aufgebaut:

Ein Faradayscher Käfig aus Eisen schützte den Versuchsstand vor elektromagnetischen Feldern in der Umgebung. Vorverstärker und Pipettenhalterung wurden an einem motorgetriebenen Mikromanipulator (HS6/3 Märhäuser) montiert. Das Mikroskop war ein inverses Auflichtmikroskop (Zeiss Axiovert 25). Die Versuchskammer wurde hierbei von oben beleuchtet und die Objektive von unten an die Kammer herangeführt, sodass oben genug Platz für die anderen Versuchsaapparaturen, wie z.B. die Pipettenhalterung, blieb.

Das Mikroskop erreichte 100 - bzw. 400 - fache Vergrößerung. Eine an das Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera (Sony) erlaubte ein zusätzliches Beobachten der Zelle über einen Monitor. Die Pipettenhalterung war mit einem Schlauch verbunden über den per Glasspritze oder mit einem Mundstück Über - und Unterdrücke in der Pipette erzeugt werden konnten.

3.5.2 Versuchskammer

Die Versuchskammer war eine Eigenkonstruktion der Werkstatt aus Plexiglas 6x7 cm in Länge und Breite sowie 7 mm Dicke. Es wurden ein Versuchs- und ein damit verbundener Absaugkanal hineingefräst. Zusätzlich gab es eine getrennte Kammer für die Referenzelektrode. Badlösungen wurden über einen separaten Einlaufstutzen direkt in die Versuchskammer injiziert.

Der Absaugkanal, der sich parallel zum Versuchskanal befand und mit ihm durch einen Tunnel verbunden war, konnte über eine Absaugpipette abgesaugt werden. So ließ sich der Flüssigkeitspegel in der Versuchskammer regulieren.

Links vom Absaugkanal befand sich zudem die Kammer für die Referenzelektrode, die mit der Versuchskammer über eine Agarbrücke, die in Pipettenlösung getränkt war, verbunden wurde. Unter Versuchsbedingungen befanden sich ca. 0,5ml Flüssigkeit in der Versuchskammer.

Der Einlaufstutzen wurde über Perfusor®-Leitungen der Firma Braun-Melsungen AG, Deutschland, mit den Reservoirbehältnissen der Versuchslösungen verbunden. Bei den Reservoirbehältnissen handelte es sich um 50ml-Perfusorspritzen. Die Regulation des Zuflusses geschah über Absperrhähne. Ein kompletter Lösungsaustausch konnte in ca. drei Sekunden erfolgen.

3.5.3 Elektrische Komponenten

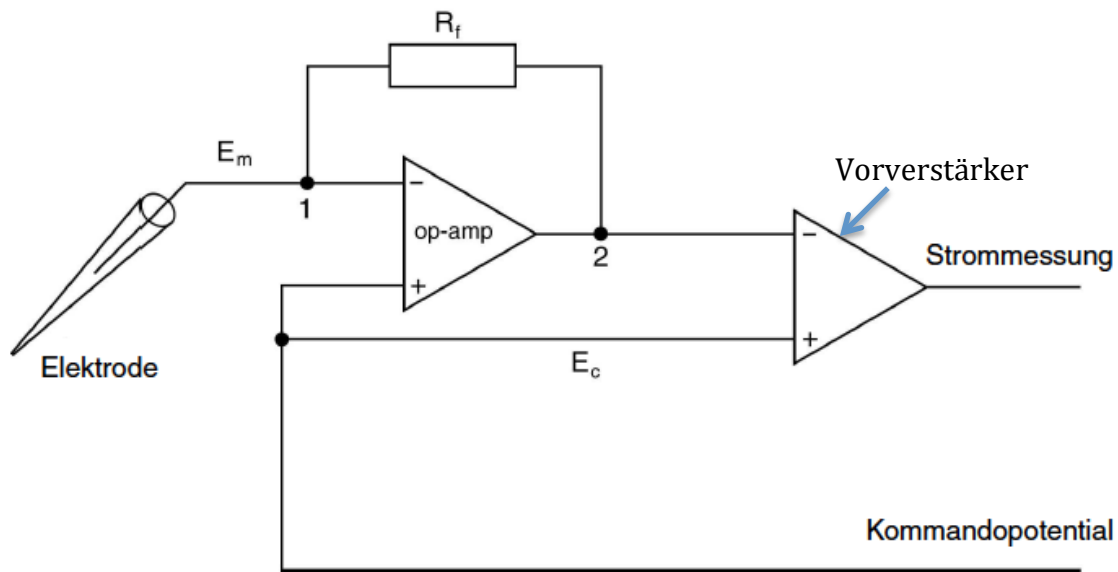
3.5.3.1 Der Verstärker

Der Patch-Clamp-Verstärker besteht aus zwei Komponenten. Einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker.

Der Vorverstärker misst das Stromsignal und wandelt es in die Messspannung um. Der Hauptverstärker amplifiziert dieses Messsignal noch weiter und kann es zusätzlich filtern. Er dient außerdem als Steuereinheit. Das Prinzip des Schaltkreises wird in Abbildung 15 verdeutlicht:

Der Differentialverstärker registriert an seinen beiden Eingängen – und + eine mögliche Differenz zwischen dem tatsächlichen Membranpotenzial E_m und der Kommandospannung E_c . Daraufhin gibt er an seinem Ausgang einen proportionalen Strom ab, der die Differenz zwischen E_c und E_m kompensieren soll. Es existiert nun eine Potenzialdifferenz zwischen 2 und 1 (Abb 15). Da der Verstärker einen Eingangswiderstand in der Größenordnung von $10^{12} \Omega$ besitzt kann der Strom nicht wieder in den Verstärker zurückfließen, sondern fließt über den Rückkopplungswiderstand R_f bis $E_m = E_c$. Die Differenz zwischen Ausgangsspannung des ersten Verstärkers und der Kommandospannung kann letztendlich vom Vorverstärker gemessen und an ein Oszilloskop bzw. an einen Computer ausgegeben werden.

Abbildung 15 Verstärker Schaltkreis



Dies ist eine vereinfachte Darstellung des Patch-Clamp-Verstärkers. Er enthält einen Vorverstärker sowie einen Differentialverstärker (OP-AMP). E_c =Kommandospannung (V_{pip}). R_f =Rückkopplungswiderstand. E_m =Membranpotenzial. Modifiziert nach Feigenspan Praktikum Neurophysiologie, Patch clamp Skript WS05, Neuroscience Universität Oldenburg 2005

Es wurde der Verstärker EPC9 der Fa. HEKA, Lambrecht, Deutschland, verwendet. Die Steuerung und Sicherung der Daten erfolgte über die Software „Pulse“ der Firma HEKA auf einem Power Macintosh 9500/200.

3.5.3.2 Elektroden

Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid Pellet und wurde in das Referenzbad getaucht. Die Messelektrode des Verstärkers bestand aus einem Silberdraht, der in einer 100 mmol/l KCl-Lösung zuvor chloriert wurde. Über diesen Draht wurde für jeden Versuch eine neue Pipette, gefüllt mit Pipettenlösung, aus Borosilikat-Glas gestülpt. Die elektrische Verbindung zwischen Mess- und Referenzelektrode (Versuchskammer und Kammer der Referenzelektrode) wurde durch eine Agar-Brücke hergestellt, ein U-förmiges Glasröhrchen, welches mit der jeweiligen Pipettenlösung, geliert mit 2% Agar-Agar, gefüllt wurde.

3.5.3.3 Die Pipetten

Die von uns verwendeten Pipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät, Modell Flaming/Brown P-97 (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA) aus 7,5cm langen Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Innendurchmesser von 0,86mm gezogen (GC 150-15, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd., England).

Das Ziehgerät war über die Parameter: Temperatur, Ziehgeschwindigkeit, Zugkraft und Anzahl der Zyklen programmierbar. Die Borosilikatröhrchen wurden horizontal eingespannt und durch einen Platinheizdraht in der Mitte erhitzt. Die so erweichten Glasröhrchen wurden nun in sieben Stufen gezogen bis sie auseinanderrissen. Es entstanden so zwei ca. vier Zentimeter, an der Spitze dünn auslaufende, Patchpipetten. Die Pipettenspitzen wurden anschließend an ihren Spitzen mit Hitze „poliert“ um eventuelle Unebenheiten nach dem Abrissvorgang zu beseitigen und eine gute Sealbildung mit den Versuchszellen zu erleichtern. Ein durchschnittlicher Pipettenwiderstand (R_{pip}) lag bei Pipettenlösung $4 \pm 0.1 M\Omega$ (K-Glutamat Lösung) ($n=73$).

3.5.4 Durchführung der Patch-Clamp Experimente

Von der zuvor hergestellten Zellsuspension (wie in 3.3 beschrieben) wurden 100 μ l in die Badlösung (L05-L07) hinein pipettiert. Nach einer kurzen Wartezeit von 3-5 Minuten hatten sich alle Zellen auf dem Boden der Versuchskammer abgelagert. In 100-facher Vergrößerung wird die gesamte Versuchskammer nach geeigneten Versuchszellen durchmustert. Solche Zellen sind nicht spontan kontrahierende, „intakte“ Zellen mit der typischen Querstreifen (Abb 16).

Abbildung 16 Ventrikuläre Myozyte im Auflichtmikroskop

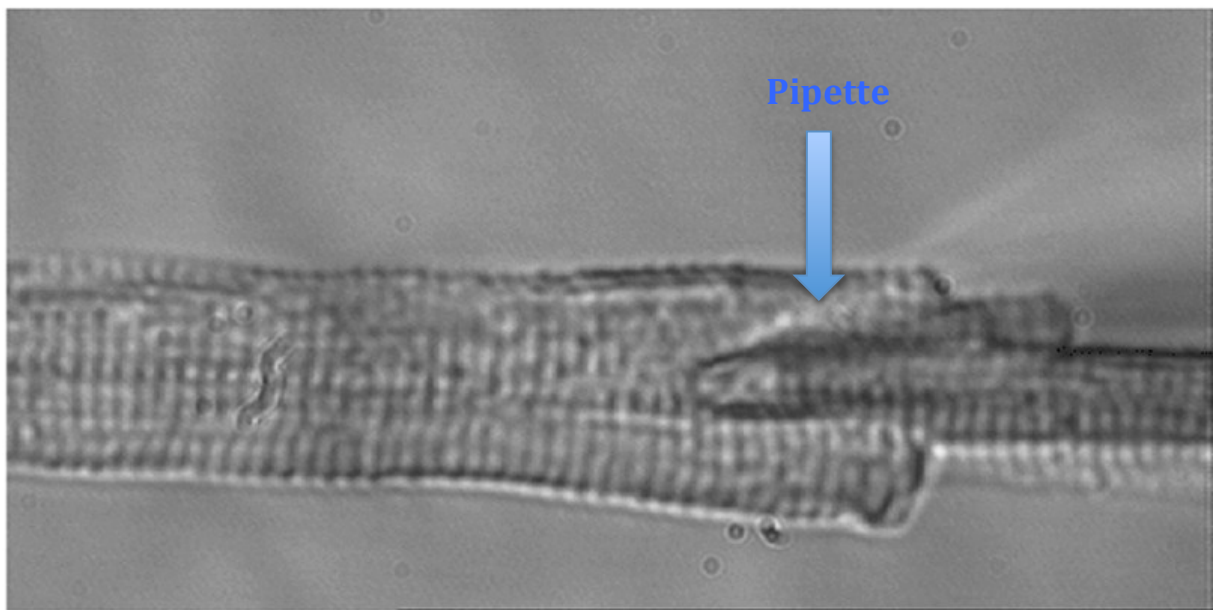


Abb 16 zeigt eine ventrikuläre Kardiomyozyte mit der typischen Querstreifung sowie die Patch-Clamp-Pipette (Modifiziert nach Verkerk et al, Europace 2007).

Daraufhin wird die „Patch-Pipette“ mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt. Durch Erzeugung eines Unterdrucks mittels einer Einwegspritze wurde zunächst die Pipettenspitze und anschließend der Rest der Pipette mit einer 26 G Spinalkanüle gefüllt. Luftblasen wurden nicht toleriert und vorsichtig herausgeklopft. Nachdem die Pipette mit der Pipettenlösung (L-04) gefüllt wurde, wurde sie vorsichtig auf die Silber/Silberchlorid Messelektrode gesetzt, so dass die Messelektrode ca. vier Millimeter in die Pipettenlösung hineinragte. Die Pipette wurde vorsichtig mit dem Mikromanipulator in die Versuchslösung hineingefahren. An dieser Stelle musste dafür gesorgt werden, dass bereits vor dem Eintauchen in die Badlösung ein leichter Überdruck in der Pipette anliegt um Verunreinigungen durch die Badlösung/Zellsuspension zu vermeiden. Nach dem Eintauchen wurde automatisch vom EPC-9-Verstärker das dort gemessene Potenzial als Nullpunkt festgelegt. Jegliche Grenzschichtenpotenziale wurden an dieser Stelle mitkompensiert. In 400-facher Vergrößerung wurde die Pipette vorsichtig auf die Zelle aufgesetzt. Die Annäherung an die Zelle wurde über die Kamera sowie ein akustisches Signal mitverfolgt, was den Membranwiderstand in unterschiedliche Tonhöhen umwandelte. Nun wurde der Überdruck in einen Unterdruck umgewandelt. Dies führte in über 50 % der Zellen zu einer $G\Omega$ -Seal-Bildung, also einer kompletten Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran. Dies stellte die in 3.4.1 beschriebene cell-attached Konfiguration dar. Von hier wurde anschließend in die Ganzzelleableitung („whole-cell Modus“ 3.4.2; Abb 17) gewechselt. Mit den im EPC-9 implementierten Routinen konnte nun die Zellkapazität (C_m) sowie der Zugangs- bzw. Serienwiderstand (R_s) bestimmt werden. Die Samplefrequenz lag bei 5 kHz. Die Ganzzellströme wurden bei 1 kHz gefiltert.

R_s lag bei den hier durchgeführten Versuchen im Mittel in der K-Glutamatlösung bei $6.1 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ ($n=57$) und wurde wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben zu 85 % kompensiert. Außerdem wurden die Kardiomyozyten anschließend auf ihr zu erwartendes Ruhemembranpotenzial von $V_{\text{pip}} = -80 \text{ mV}$ geklemmt um Kontraktionen zu verhindern. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur zwischen 21° und 24° C durchgeführt.

Abbildung 17 Ganzzellaufleitung

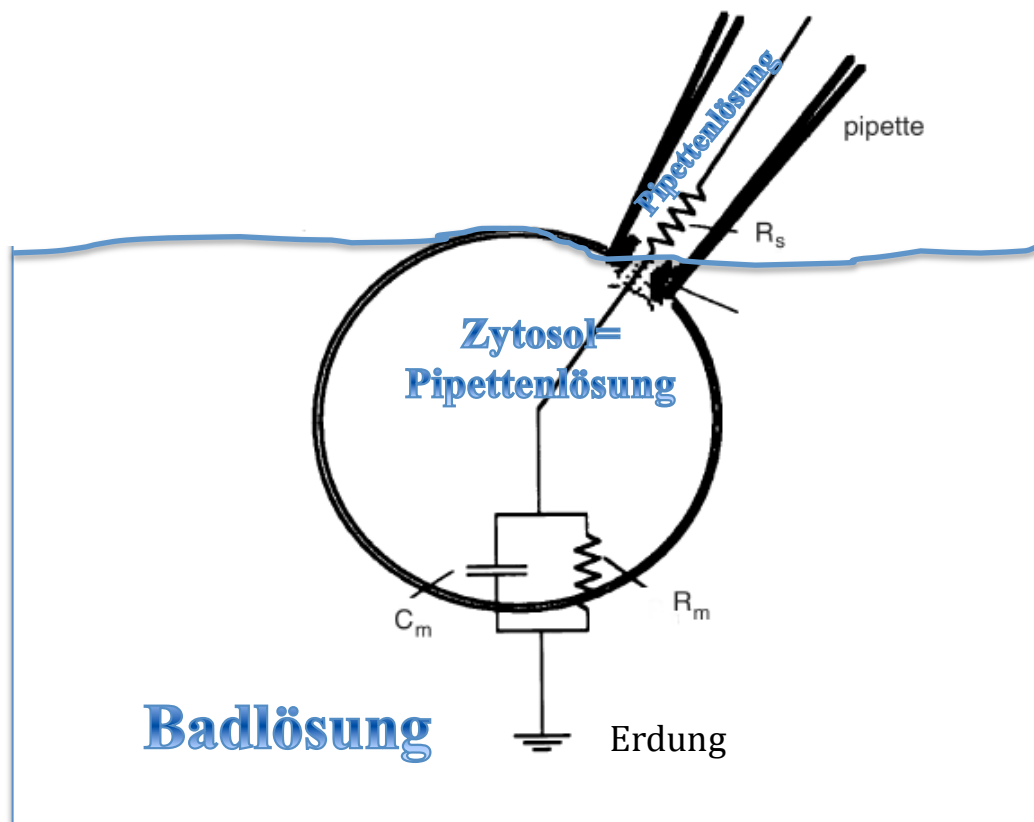


Abb 17 zeigt vereinfacht die Schaltungsskizze einer Ganzzellaufleitung mit einer Zelle in der Badlösung. C_m =Membrankapazität; R_m =Membranwiderstand; R_s =Serienwiderstand. Modifiziert nach Feigenspan, Praktikum Neurophysiologie, Patch clamp Skript WS05, Neuroscience Universität Oldenburg 2005

3.6 Die Pulsprotokolle und Strommessungen

Um die unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle zu messen, mussten verschiedene Pulsroutinen über den Verstärker in den beiden Modi Stromklemme und Spannungsklemme durchlaufen werden. Für einige Messungen war zusätzlich eine Veränderung der Badlösungen notwendig.

3.6.1 Zellkapazität C_m und Serienwiderstand R_s

Nach der Etablierung eines $G\Omega$ -Seals und dem Wechsel in die Ganzzellableitung (s 3.4.2 und 3.5.4) konnte die Zellkapazität bestimmt werden. Dafür musste die Zelle in den Spannungsklemmmodus. Eine Zelle an die eine Spannung angelegt wird, verhält sich wie ein Kondensator der elektrisch aufgeladen werden kann. Diese Kapazität C_m konnte jetzt wie der Serienwiderstand R_s über den EPC-9 Verstärker gemessen werden. Die Größe der Kapazität korrelierte mit der Zellgröße.

3.6.2 Ruhemembranpotenzial (R_m). und Aktionspotenzialdauer APD

Nach der Messung der Zellkapazität wurde der Verstärker in den Stromklemmmodus umgeschaltet. Die Zelle wurde nun auf einen festen Strom von 0pA geklemmt. Dieser Modus wird „Nullstromklemme2“ genannt. Die jetzt über der Membran anliegende Spannung entsprach dem Ruhemembranpotenzial (R_m). Die Zellen wurden anschließend mit rechteckigen in der Stromgröße zunehmenden Pulsen von 5 ms Dauer in einer Frequenz von 0.3Hz bis zur Auslösung des APs depolarisiert und die folgenden Aktionspotenziale (AP) registriert und ausgewertet.

3.6.3 I_{to} und I_{to} Kinetik (I_{to} Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung)

Um alle Eigenschaften des transienten K^+ -Auswärtsstroms zu erfassen, wurde nicht nur der Strom selbst (s 3.6.3.1), sondern auch die Kinetiken der ihm zu Grunde liegenden Kanäle gemessen und errechnet (s 3.6.3.2- 3.6.3.4).

3.6.3.1 Messung des transienten K^+ - Auswärtsstroms I_{to}

Im Anschluss an die APD-Registrierungen wurde der Verstärker für die Messungen der Ionenströme in den Spannungsklemmmodus umgeschaltet (s 3.4.4). Das bedeutet, an die Zelle wurde eine vorgegebene Spannung V_{pip} , die bei einem zu vernachlässigbar kleinem R_s dem Membranpotenzial V_m entspricht, angelegt, sodass anschließend die zur Aufrechterhaltung des angelegten Membranpotenzials nötigen Ionenströme (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) registriert werden konnten.

Um ausschließlich K^+ -Ströme zu registrieren, mussten die spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} - Kanäle vor unseren Messungen blockiert und inaktiviert werden. Zum einen wurde die Badlösung hierfür durch eine $CdCl_2$ 0.03 mmol/L - haltige Lösung ersetzt. Das Cd^{2+} ist in der Lage konzentrationsabhängig die L-Typ- Ca^{2+} - Kanäle zu blockieren. Zur Ausschaltung der Na^+ -Kanäle wurde die Zelle kurz vor der Messung über 20 ms auf $V_{pip}=-50$ mV vordepolarisiert. Diese wurden dadurch für den Zeitraum unserer Messung refraktär.

Abbildung 18 Pulsprotokoll des I_{to}

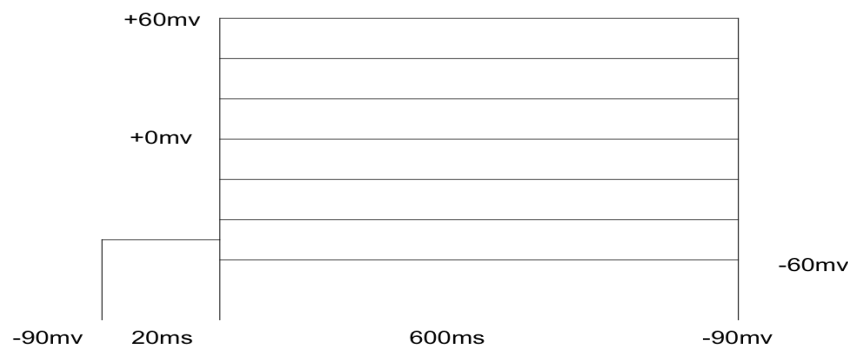


Abb 18 zeigt das Pulsprotokoll des I_{to} ; Ein 20ms langer Vorpuls von -90mV auf -50mV und anschließend jeweils 600ms lange Depolarisationen von -90mV auf -60 bis +60mV in 20mV – Schritten

Zur Registrierung des I_{to} wurde die Zelle nun in einer Frequenz von 0.3Hz mit 600ms andauernden Pulsen, ausgehend jeweils von ihrem Ruhemembranpotenzial von $V_{pip} = -90$ mV auf -60mV bis +60mV in 20mV-Schritten depolarisiert. Um die I_{to} -Größe zu quantifizieren, wurde der transiente Anteil des fließenden Stromes errechnet, in dem man den Ruhestrom am Ende des 600ms Spannungspulsintervalls von dem gemessenen Spitzenstrom abzog. Die fließenden Ströme wurden auf die Zellgröße (Zellkapazität) normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abb 18).

3.6.3.2 Inaktivierungszeitkonstante τ (I_{to})

Bei der Betrachtung des Stromkurvenverlaufs wird deutlich, dass der gemessene Strom bei einer definierten Klemmspannung V_{pip} über die Zeit abfällt (Abb 9 und Abb 25). Dieser Abfall folgt einer monoexponentiellen Funktion. Aus der Geschwindigkeit des Abfalls lässt sich die Inaktivierungszeitkonstante für den I_{to} $\tau_{(Ito)}$ (ms) berechnen:

$$f(t) = I_{max} * e^{\frac{-t}{\tau}}$$

I_{max} : Ausgangswert (Maximaler I_{to})

t : Zeit

τ : Inaktivierungszeitkonstante „Tau“ τ

Dies wurde unter Zuhilfenahme der Auswertungssoftware Pulsefit (HEKA Elektronik) für die unterschiedlichen Klemmspannungen V_{pip} durchgeführt. Anschließend wurden die errechneten Zeitkonstanten gegen die Klemmspannung V_{pip} mit Hilfe der Software PRISM (Graphpad Software) aufgetragen.

3.6.3.3 Steady - State - Inaktivierung

Die Steady-State-Inaktivierung zeigte den Strom des I_{to} bei seiner maximalen Aktivierung bei +60mV nach unterschiedlichen, im Protokoll definierten, Konditionierungs-Vorpulsen. Hierfür war ein zweischnittiges Pulsprotokoll nötig (Abb 19).

Abbildung 19 Steady-State Inaktivierungsprotokoll I_{to}

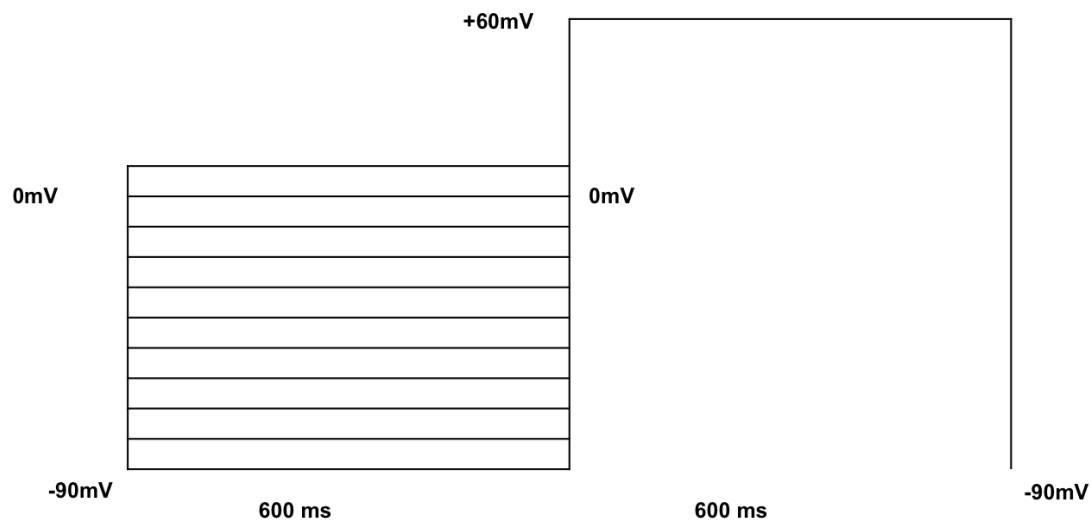


Abb 19: Steady-State-Inaktivierungs-Protokoll: Ein 600ms langer variabler (V_{pip} -90 bis +10mV) Konditionierungspuls, gefolgt von einem 2. Puls für 600ms auf $V_{pip}=+60mV$ (bei dem der I_{to} seine maximale Aktivierung zeigt).

Der erste Puls war der Konditionierungspuls für eine Dauer von 600ms, der in 10mV - Schritten von -90mV bis +10mV gesteigert wurde. Anschließend folgte ein zweiter Puls auf +60mV für weitere 600 ms. Die maximal gemessene Größe des I_{to} beim 2. Puls wurde mit der maximalen Größe des I_{to} beim Konditionierungspuls von -90mV in Annahme einer Maxwell-Boltzmann Verteilung korreliert.

$$f = \frac{I_{xmV}}{I_{-90mV}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{\left(V_{\frac{1}{2}} - V_{pip}\right)}{k}}}$$

I_x : Maximaler I_{to} beim 2. Puls nach dem Konditionierungspuls von $V_{pip}=x$ mV

I_{-90mV} : Maximaler I_{to} beim 2. Puls nach dem Konditionierungspuls von -90mV

V_{pip} : Konditionierungspotenzial

$V_{1/2}$: V_{pip} bei dem die halbmaximale Inaktivierung vorliegt

k : gibt die (negative) Steigung der Boltzmannkurve (=slope) an

Der relativ gemessene Strom wird im Ergebnisteil für jedes Konditionierungs-Membranpotenzial (V_{pip}) aufgetragen. Bestimmt wird daraus $V_{1/2}$, das Konditionierungspotenzial bei dem 50 % des I_{to} in der Steady-State-Inaktivierung vorliegen (relativer Strom 0.5) sowie die (negative) Steigung der Boltzmannkurve (Slope) k .

Die Einpassung in die Boltzmann Kurve erfolgte mit der Software Pulsefit (HEKA Elektronik). Die graphische Auftragung mit der Software PRISM (Graphpad Software).

3.6.3.4 Erholung von der Inaktivierung

Um die Erholung von der Inaktivierung zu messen, wurde folgendes Pulsprotokoll zu Grunde gelegt:

Abbildung 20 I_{to}: Messprotokoll der Recovery (Erholung von der Inaktivierung)

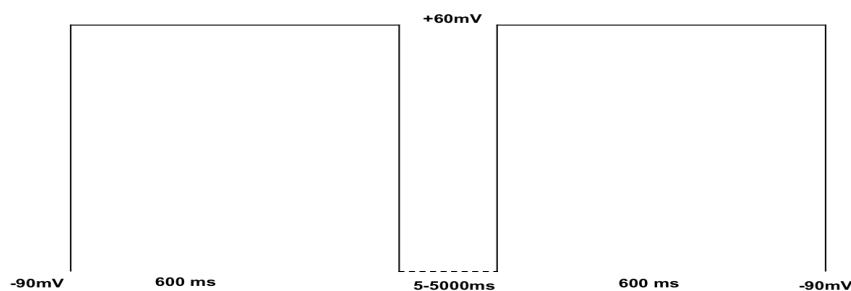


Abb 20: Zwei aufeinanderfolgende, 600ms-andauernde Pulse von $V_{pip} = -90mV$ auf $+60mV$. Das Zeitintervall zwischen den Pulsen wird exponentiell ($x^{1.5}$) gesteigert.

Es wurden zwei depolarisierende Pulse von -90 mV auf +60 mV abgegeben. Beide hatten eine Dauer von 600ms. Das Intervall zwischen beiden Pulsen wurde von 5ms auf 5000ms exponentiell ($x^{1.5}$) gesteigert und die fließenden Ströme registriert. Der maximale Strom des I_{to} beim zweiten Puls wurde mit dem Strom des ersten Pulses korreliert. Diese Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und exponentiell mit Hilfe von Pulsefit (HEKA Elektronik) eingepasst. Zur besseren Auflösung des Kurvenverlaufs wurde die relative Stromstärke (2. Puls normiert auf den 1. Puls) linear, die Zeit hingegen halblogarithmisch aufgetragen. Die Kurven (Abb 26C) wurden mit Hilfe einer biexponentiellen Funktion eingepasst.

$$f(t) = \frac{I_2}{I_1} = 1 - ((I_{max\tau 1} * e^{\frac{-t1}{\tau 1}}) + (I_{max\tau 2} * e^{\frac{-t2}{\tau 2}}))$$

I₁: Strom beim 1. Puls= maximaler Strom

I₂ Strom beim 2. Puls

τ₁ τ₂: Zeitkonstanten

e: eulersche Zahl

I_{max} maximaler erreichter Strom beim 2. Puls zum Zeitpunkt t₁+t₂

3.6.4 I_{sus}

Der I_{sus} , der verzögerte Gleichrichtungsstrom (delayed rectifier) ist ein langsam aktivierender und fast gar nicht inaktivierender Strom. Dieser erreicht daher gerade bei prolongierter Depolarisation einen steady-state (Apkon et al 1991). Zur Registrierung des I_{sus} wurde das gleiche Protokoll wie für den I_{to} verwendet, jedoch wurden hierbei die verbleibenden Ströme nach jeweils 600ms registriert. Am Ende des 600 ms dauernden Spannungspulses zur Registrierung des I_{to} war dieser bereits inaktiviert (Bryant et al 1999, Volk et al 2001) und es blieb nur der steady-state - K^+ -Auswärtsstrom I_{sus} zu registrieren.

3.6.5 Der K^+ -Einwärtsgleichrichter Strom I_{K1}

Der Einwärtsgleichrichterstrom ist ein wichtiger Strom zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials und trägt außerdem zum späten Anteil der Repolarisation bei. Das Pulsprotokoll für diesen Strom ist in Abbildung 21 dargestellt.

Die Zelle wurde für jeweils 600 ms, schrittweise in Stufen von 10mV, von $V_{\text{pip}} = -120\text{mV}$ bis $V_{\text{pip}} = +20\text{mV}$ geklemmt.

Abbildung 21 IK1 Einwärtsgleichrichterstrom-Pulsprotokoll

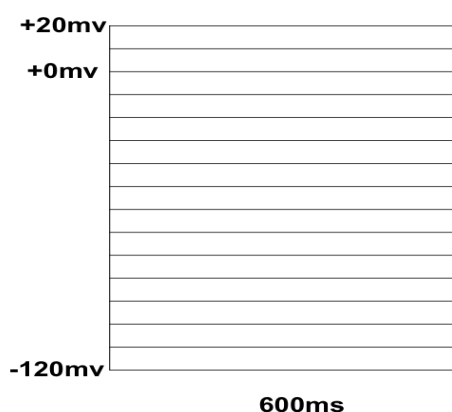


Abb 21: Die Zelle wurde für jeweils 600ms, schrittweise auf Membranpotenziale von $V_{\text{pip}} = -120\text{mV}$ bis $+20\text{mV}$ in Schritten von 10mV geklemmt.

Um den BaCl_2 sensiblen K^+ - Strom zu messen, wurde unserer Badlösung 1mmol/l BaCl_2 nach dem ersten Durchlauf des Protokolls beigemischt. Die dann registrierten Ströme wurden am Ende von den zuerst gemessenen (ohne BaCl_2) abgezogen.

3.7 Quantitative PCR - Analyse

Die im Rahmen der Zellisolierung gewonnenen und mit flüssigen Stickstoff eingefrorenen Gewebeproben der epikardialen und endokardialen Schichten der freien Wand des linken Ventrikels bildeten die Grundlage für die später von Dr. med. D. Goltz aus dem Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie der Universität Hamburg durchgeführte quantitative PCR - Analyse. Es wurde eine quantitative real time-PCR nach Standardmethoden der Molekularbiologie durchgeführt (Goltz et al 2007).

3.8 Auswertung der Experimente / Statistik

Alle aufgeführten Werte sind die arithmetischen Mittelwerte mit ihren entsprechenden Standardfehlern des Mittelwertes (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden je nach Indikation mit Hilfe von ein- oder zweifaktorieller univariater Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Newman-Keuls posthoc tests, oder unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten Student t-tests berechnet. Dazu wurde die Software PRISM (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) zur Hilfe genommen. Signifikant sind Unterschiede mit $p < 0.05$. Für p , die Irrtumswahrscheinlichkeit, gilt dabei $*=p < 0.05$; $**=p < 0.01$; $***=p < 0.001$; $****=p < 0.0001$

Die Steuerung des EPC-9 –Verstärkers sowie die Aufzeichnung der gemessenen Daten wurde von der Software „PULSE“ (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) übernommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit „PULSEFIT“ sowie IGOR (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). Die Statistik bzw. statistische Analysen wurden mit PRISM (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt

3.9 Die Lösungen, Enzyme und Chemikalien

Tabelle 4 Lösungen

	Bezeichnung	Inhaltsstoffe (in mmol)	Titriert mit
L-01	Kardioplege Lösung	NaCl 15; KCl 9; MgCl ₂ 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; CaCl ₂ 0,015; Glukose 10; Mannitol 238	NaOH
L-02	Tyrode Lösung (Ca ²⁺ - frei)	NaCl 138; KCl 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; MgCl ₂ 1; HEPES 10; Glukose 10	NaOH
L-03	Tyrode Lösung (Ca ²⁺ - haltig)	NaCl 138; KCl 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; CaCl ₂ 1; HEPES 10; Glukose 10	NaOH

	Bezeichnung	Inhaltsstoffe (in mmol/l)	Titriert mit
L-04	Pipettenlösung	K-glutamate 120, KCl 10, MgCl ₂ 2, EGTA 10, HEPES 10, Na ₂ -ATP 2	KOH

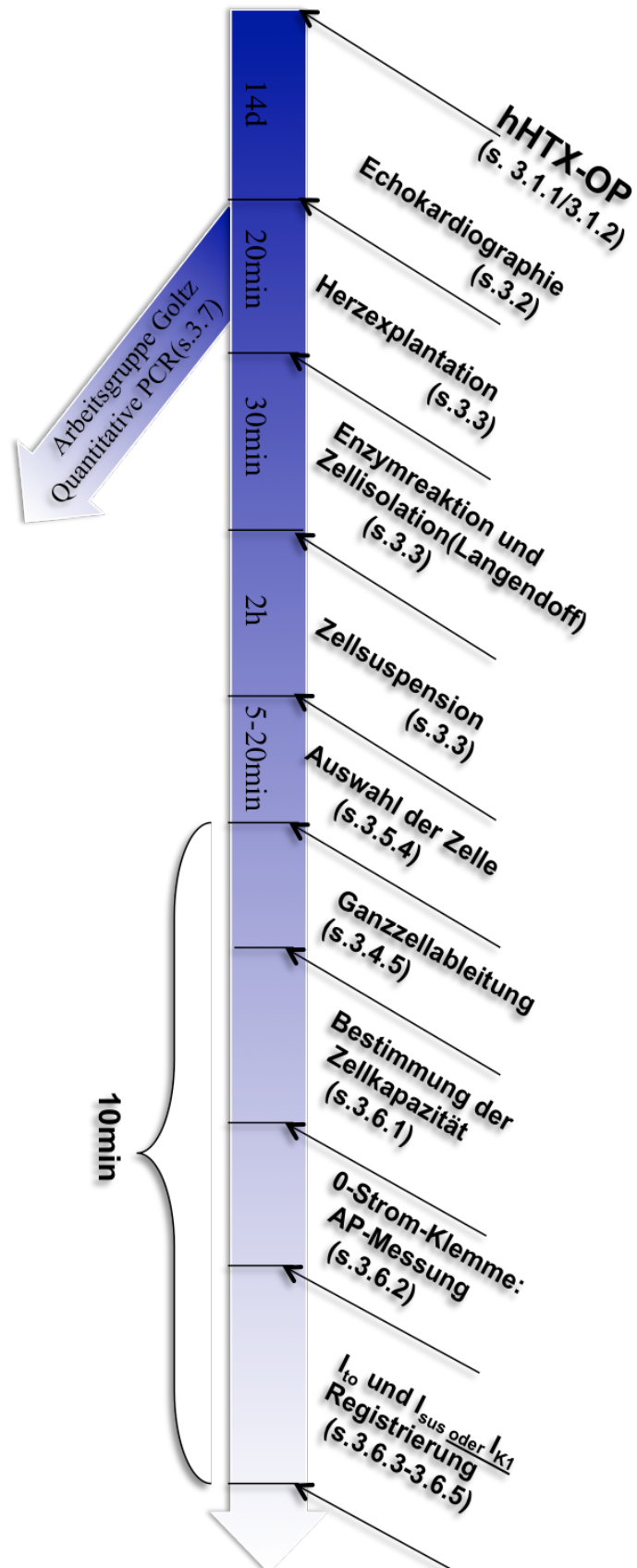
	Bezeichnung	Inhaltsstoffe (in mmol/l)	Titriert mit
L-05	Standard Badlösung	NaCl 138; KCl 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; MgCl ₂ 1; CaCl ₂ 2; HEPES 10, Glukose 10	NaOH
L-06	Zweite Badlösung	NaCl 138; KCl 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; MgCl ₂ 1; CaCl ₂ 2; HEPES 10, Glukose 10, CdCl ₂ 0,03	NaOH
L-07	Badlösung zur Messung des I _{K1}	NaCl 138; KCl 4; NaH ₂ PO ₄ 0,33; MgCl ₂ 1; CaCl ₂ 2; BaCl ₂ 1; HEPES 10, Glukose 10;	NaOH

Die Titration erfolgte für alle Lösungen mit den angegebenen Substanzen auf einen pH von 7,30.

Tabelle 5 Chemikalien und ihre Herkunft

Substanz	Hersteller
Kollagenase	Biochrome AG
ATP (Na ⁺ - Salz).	SIGMA-ALDRICH GmbH (A-2383).
D-Mannitol	SIGMA-ALDRICH GmbH (M-9546).
EGTA	Roth GmbH&Co KG
Glukose	Fluka Chemie GmbH
Glutamat	SIGMA-ALDRICH GmbH (H-3375).
HEPES	SIGMA (P-5147).
Protease	SIGMA-ALDRICH GmbH

Die Chemikalien wurden von Merck (CdCl₂, HCl, KCl, KOH, NaOH, CaCl₂, MgCl₂) und J.T. Baker (NaCl) bezogen.



3.11 Experimentelle Eigenleistung des Doktoranden

Die hier vorliegende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit verschiedenen Wissenschaftlern aus mehreren Instituten durchgeführt. Daher soll im Folgenden die Eigenleistung während der experimentellen Phase beschrieben werden.

Die operativen Eingriffe wurden in Kooperation mit Dr. Ivan Melnychenko (Institut für Pharmakologie und Toxikologie) und nach Erlernen und Abnahme einer Prüfung durch den zuständigen Veterinär selbstständig unter Aufsicht (PD Dr. A. Schwoerer, Dr. I. Melnychenko) durchgeführt.

Zellisolation, Zellaufbereitung, Patch-Clamp Versuche sowie deren Auswertung wurden nach einer ausführlichen Einarbeitung und Teilnahme an anderen Forschungsprojekten während einer vorausgegangenen Beschäftigung im Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie (jetzt Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie) für diese Experimente selbstständig durchgeführt.

Die Gewebesicherung und Konservierung für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden ebenfalls selbstständig durchgeführt. Anschließende molekularbiologischen Untersuchungen wurden von Dr. Diane Goltz durchgeführt.

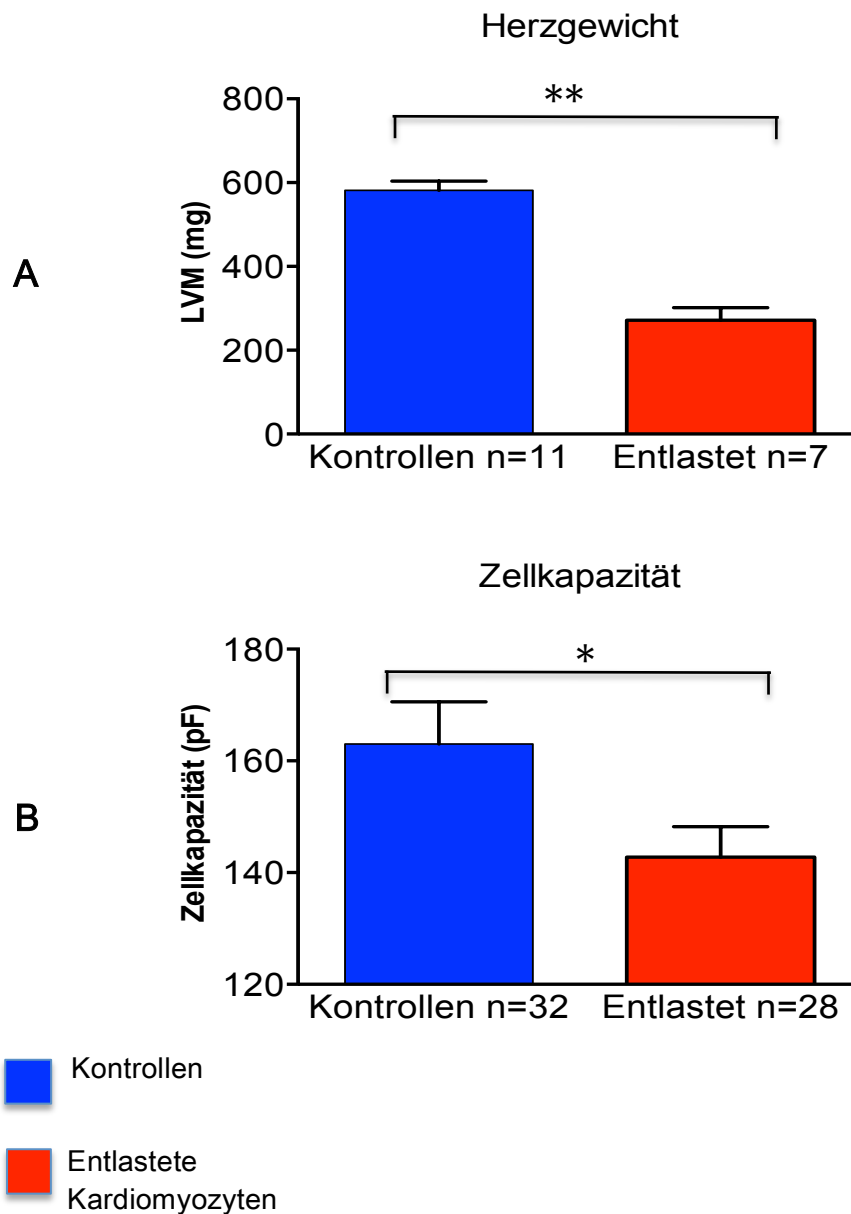
Die echokardiographischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. I. Melnychenko durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Herzgewicht und Zellgröße

Zwei Wochen nach der Transplantation wurde die Entlastung, die sich durch die Ausbildung einer Atrophie des transplantierten Herzens zeigte, mit Hilfe der Echokardiografie, wie in 3.2 beschrieben, überprüft.

Abbildung 22 Herzgewicht und Zellkapazität



LVM= Linksventrikuläre Masse

Abb 22: Graphische Darstellung der Veränderungen des echokardiographisch bestimmten Herzgewichts (LVM) und der elektrophysiologisch gemessenen Zellkapazität. ***= $p < 0.001$; *= $p < 0.05$. mg=Milligramm. pF=Pikofarad

Es zeigte sich ein statistisch signifikant geringeres Gewicht der linken Ventrikel (LVM) der entlasteten Herzen von $271 \pm 30 \text{ mg}$ ($n=7$) im Gegensatz zu $582 \pm 22 \text{ mg}$ ($n=11$), in den Kontrollen ($p < 0.001$) (Abb 22A). Als Kontrollen wurden die nativen Empfängerherzen verwendet. Daraus lässt sich ableiten, dass es durch Entlastung des linken Herzens für eine Zeitperiode von 2 Wochen durch eine heterotopie Herztransplantation zu einer Verringerung der Masse des linksventrikulären Herzmuskels kommt. Die ca. 50%-ige Reduktion der LVM könnte durch Apoptose oder Atrophie bedingt sein.

Dies wird auch durch die Untersuchung der Zellkapazität (Abb 22B) deutlich, die zu Beginn eines jeden Patch-Clamp Versuches (s 3.6.1) gemessen wurde und als Parameter der Zellgröße herangezogen wird. Hier zeigt sich eine signifikante Größenabnahme der einzelnen Zellen der entlasteten Herzen im Vergleich zu den Kontrollen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es durch die 14-tägige Druckentlastung nicht nur zu einem Verlust der LVM, sondern tatsächlich zu einer Atrophie der Zellen gekommen ist. Bei einer Subgruppenanalyse zeigte sich, dass es zwar transmural zu einer Reduktion der Zellkapazität kam, welche jedoch nur in den endokardialen, nicht aber in den epikardialen Kardiomyozyten statistisch signifikant war.

4.2 Herzfrequenz

Um die Folgen der Denervierung auf die Herzfrequenz abschätzen zu können, wurde diese aus den volumetrischen, echokardiographischen Untersuchungen abgeleitet (s 3.2 und Abb 23).

Abbildung 23 Herzfrequenz

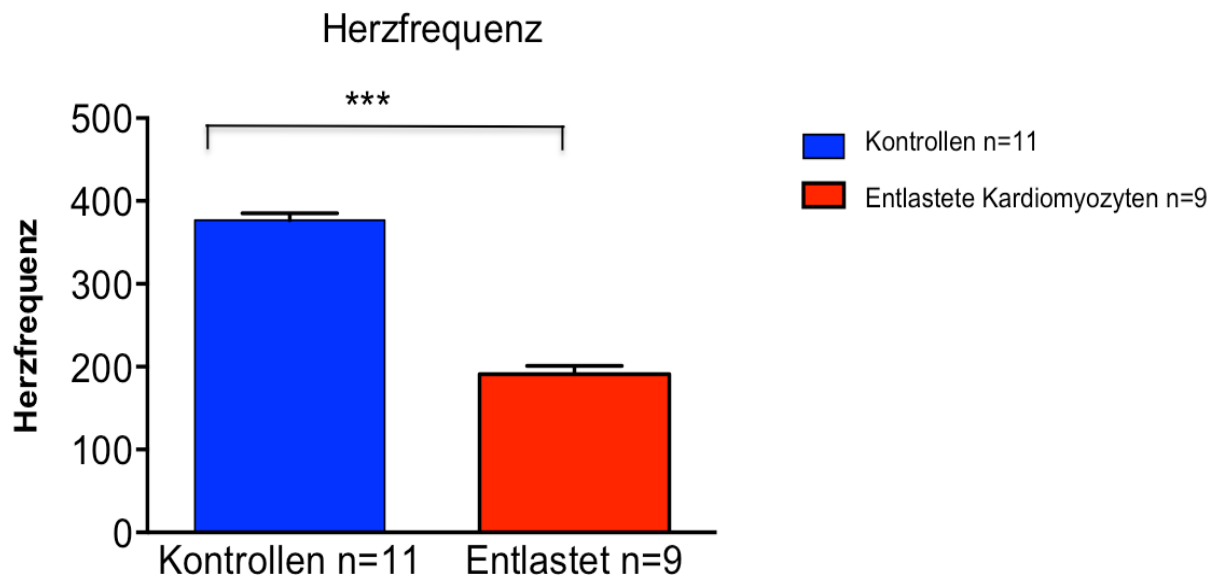


Abb 23: Graphische Darstellung der Veränderungen der echokardiographisch bestimmten Herzfrequenz der mechanisch entlasteten, heterotop transplantierten Herzen im Vergleich zu nativen Herzen der Empfängertiere als Kontrollen. ***= $p < 0.0001$

Bei dieser Bestimmung in Narkose zeigte sich eine signifikant niedrigere Herzfrequenz bei den transplantierten Herzen als bei den orthotopen Herzen (Abb 23). Neben der Denervierung muss hierbei jedoch auch der Einfluss der Narkose berücksichtigt werden.

4.3 Regionale Eigenschaften der Aktionspotenziale

Nach enzymatischer Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten wurde zu Beginn jedes Patch-Clamp Experiments, nachdem die Ganzzelleableitung durch Eröffnen der Zellmembran unter dem GΩ-Seal etabliert wurde, das Membranpotenzial V_m aufgezeichnet. Dazu wurde die Zelle auf einen Strom von 0pA „geklemmt“ wie in 3.4.4 beschrieben. Bei einem Strom von 0pA entspricht V_m dem Ruhemembranpotenzial.

Das Ruhemembranpotenzial V_m verhielt sich in endo- und epikardialen Zellen gleich, sodass wir diese Daten zusammenfassen konnten. Das Ruhemembranpotenzial betrug hier im Durchschnitt $V_m = -84.6 \pm 3.3 \text{ mV}$ ($n=32$) bei den Kontrollen und $V_m = -84.6 \pm 3.0 \text{ mV}$ ($n=21$) bei den entlasteten Herzen.

Eine Depolarisation wurde mit Pulsen von 5ms-Dauer in einer Frequenz von 0.3Hz ausgelöst. Dadurch konnten Aktionspotenziale ausgelöst und aufgezeichnet werden. Untersucht wurden die maximale Höhe (Aufstrich) des Aktionspotenzials (AP) sowie die Dauer der Aktionspotenziale (APD). Der durchschnittliche Aufstrich erreichte $30.9 \pm 2.3 \text{ mV}$ ($n=32$) bei den Kontrollen und $36.9 \pm 2.6 \text{ mV}$ ($n=21$) bei den entlasteten Myozyten. Der Unterschied war nach statistischer Analyse nicht signifikant.

Es wurden folgende Aktionspotenzialszeiten (APD) registriert:

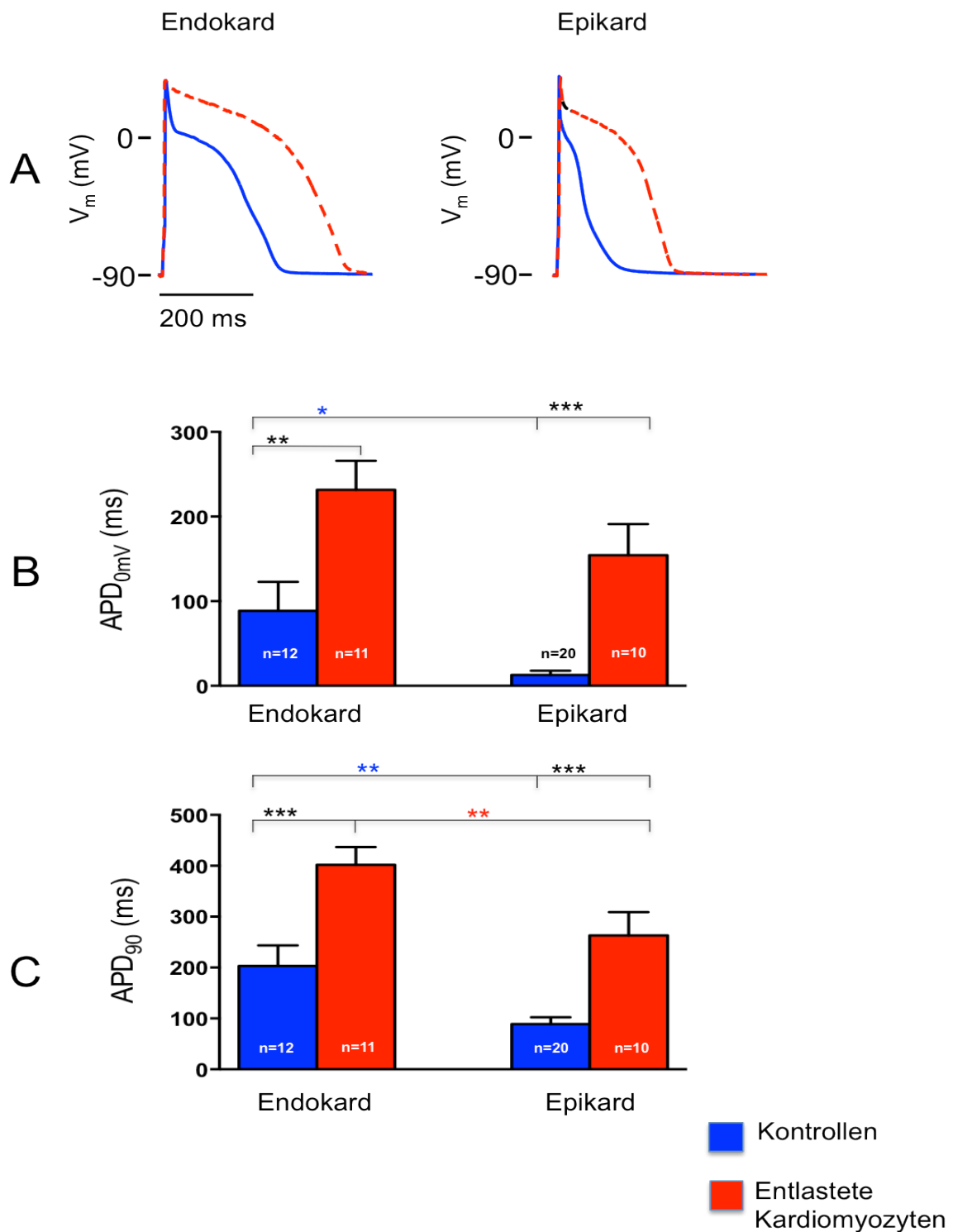
APD_{0mV}: Die Zeit bis das Membranpotenzial 0mV erreicht hat (Abb 24 B)

APD₉₀: Die Zeit bis 90% des Aktionspotenzials erreicht worden sind (Abb 24 C)

Die Aktionspotenzialdauer (APD) bei Repolarisation zu einem Membranpotenzial von 0mV (Abb 24B) und zum Zeitpunkt von 90% Repolarisation (Abb 24C) wurden als Marker für die Früh- sowie die Spätphase der Repolarisation herangezogen. Die Anzahl n für endokardiale Zellen betrug 23 (Kontrollen $n=12$; Entlastet $n=11$). Die Anzahl der gemessenen epikardialen Zellen betrug 30 (Kontrollen $n=20$; Entlastet $n=10$).

Es zeigte sich in beiden Gruppen ein transmuraler Gradient und damit kürzere APs in den epikardialen als in den endokardialen Zellen. Dieser transmurale Gradient blieb auch bei den druckentlasteten Zellen erhalten, ist jedoch nur für die APD₉₀ signifikant (Abb 24B * 24C **, **). Darüber hinaus zeigten sich für endokardiale und epikardiale Zellen in der Gruppe der entlasteten Herzen deutlich verlängerte APs mit einer viel ausgeprägteren Plateauphase als bei den Kontrollen (Abb 24A). Die APD_{0mV} und APD₉₀ werden bei epikardialen und endokardialen Myozyten in den entlasteten Myozyten signifikant später erreicht als in den Kontrollen (Abb 24B **, ***, 24C **, ***, **). $*=p<0.05$; $**=p<0.01$; $***=p<0.001$

Abbildung 24 Aktionspotenziale



V_m : Membranpotential APD_{0mV}: Zeit des APs bis zum zweiten Durchschreiten von 0mV APD₉₀: Zeit bis 90% des APs erreicht sind

Abb 24A zeigt repräsentative Aktionspotenziale (APs) in endo- und epikardialen Myozyten der Kontrollen respektive der entlasteten Herzen (gestrichelte Linie). Die Messung der APs erfolgte in einem Patch-Clamp-Versuch nach Etablierung eines GΩ-Seals in der Ganzzellableitung. Abb 20B,C zeigen die Zeiten bis zum Erreichen von APD_{0mV} und APD₉₀ *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Um die Gründe und Mechanismen für die Verlängerung in der Aktionspotenzialdauer genauer zu untersuchen, wurden wie im folgenden beschrieben, zugrundeliegende repolarisierenden K^+ - Ströme gemessen.

Das Patch-Clamp-Setup wurde jetzt so geändert, dass von der Stromklemme (current-clamp) in die Spannungsklemme (voltage-clamp) gewechselt wurde. Mit Hilfe des Differentialverstärkers wurden in diesem Modus nach individuellen Protokollen unterschiedliche Spannungen an die Zellmembran der Kardiomyozyte angelegt und die dann fließenden Ganzzellströme gemessen (s 3.5.3-3.6.5). Es folgen die Messungen des I_{to} , I_{sus} und I_{K1} .

4.4 Der transiente K^+ - Auswärtsstrom I_{to}

4.4.1 Stromkurvenverlauf, Stromdichte

Zur Messung des I_{to} wurde wie in 3.4.2 beschrieben zunächst eine Ganzzellableitung etabliert, um dann nach dem in 3.6.3.1 beschriebenen Protokoll die Messungen durchzuführen. Der fließende Strom wurde auf die Zellkapazität, als Marker für die Zellgröße, normalisiert ($pA pF^{-1}$). Dieser auf die Zellgröße genormte Strom wurde zum einen gegen die Zeit (Abb 25 A,B) und in einer Strom - Spannungsbeziehung (Abb 25C) aufgetragen. Die gemessenen Ströme und errechneten Zeitkonstanten bei $V_{pip}=40mV$ sowie die Anzahl der Experimente kann man der Abb 25 sowie Tabelle 6 entnehmen.

Der fließende Strom wurde auf die Zellkapazität als Marker für die Zellgröße normalisiert ($pA pF^{-1}$). Dieser auf die Zellgröße genormte Strom wurde zum einen gegen die Zeit (Abb 25 A, B) und in einer Stromspannungsbeziehung (Abb 25C) aufgetragen. Die gemessenen Ströme bei $V_{pip}= 40mV$ sowie die Anzahl der Experimente kann aus der Abbildung 25, sowie der Tabelle 6 entnommen werden.

Bei den entlasteten Kardiomyozyten war die mittlere I_{to} Stromdichte in den Stromspannungskurven z.B. bei $V_{pip}=40 mV$ in den endokardialen Zellen ungefähr 80% kleiner und in den epikardialen Zellen ca. 60% kleiner im Vergleich zu den Kontrollen (Abb 25C). Diese Reduktion passt gut zu den in 4.3 gemessenen APs. Die Unterschiede zwischen den endokardialen und epikardialen I_{to} -Stromdichten war in beiden Gruppen statistisch signifikant.

Tabelle 6: I_{to} Stromdichte bei $V_{pip} = 40 \text{ mV}$

		ENDOKARD	EPIKARD
$I_{to} (40\text{mV}) (\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1})$	KONTROLLE	8.9 ± 2.9	$20.8 \pm 1.6^{***}$
	ENTLASTET	$1.8 \pm 0.3^{**}$	$7.4 \pm 1.9^{***, **}$
N	KONTROLLE	11	22
	ENTLASTET	16	11

- $**P < 0.01$, $*** P < 0.001$ Entlastete vs. Kontrollen
- $**P < 0.01$, $*** P < 0.001$ Epikard vs. Endokard

N gibt die Anzahl der untersuchten Zellen an. *pA*:Pikoampère *pF*:Pikofarad. *mV*:Millivolt
 Die Daten sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen

Abbildung 25 Stromkurvenverläufe des I_{to}

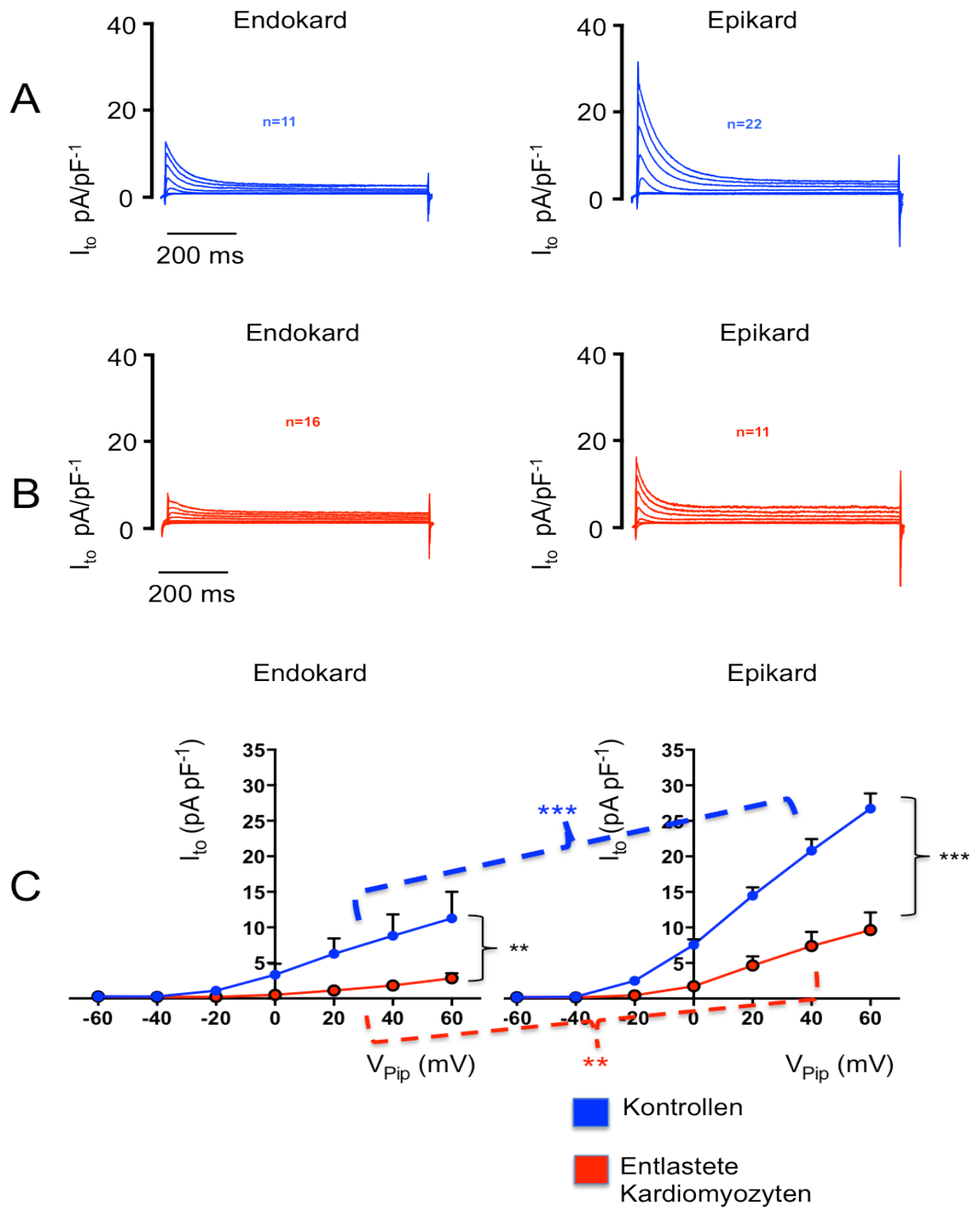


Abb 25 zeigt repräsentative Stromkurvenverläufe des I_{to} von Myozyten die aus dem Endokard und dem Epikard der untersuchten entlasteten Herzen (B) sowie den Kontrollen (A) isoliert wurden. C zeigt die dazugehörigen Strom-Spannungskurven. In allen Zellen wurde der schnell aktivierende und inaktivierende transiente Auswärtsstrom (I_{to}) beobachtet, wenn die Zelle positiver als auf $V_{pip}=-20$ mV depolarisiert wurde (A+B). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ entlastet vs. Kontrollen und ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ Epikard vs. Endokard. V_{pip} =Kommandopotenzial; I_{to} =transienter K^+ -Auswärtsstrom. pA:Pikoampère. pF: Pikofarad. mV:Millivolt.

Da eine gemessene reduzierte Stromgröße zum einen weniger Kanäle mit unveränderter Zusammensetzung, aber auch eine unveränderte Kanalanzahl mit veränderten Öffnungs- und Schließeigenschaften (Kanalkinetik) bedeuten kann, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Kanalkinetik des I_{to} untersucht.

Die Kinetik eines spannungsgesteuerten Kanals beschreibt den zeitlichen Verlauf für die Aktivierung und die Inaktivierung der Kanäle sowie die Dauer ihrer Refraktärität. Veränderungen in der Kanalkinetik können eine Veränderung der Konfiguration der den Kanälen zu Grunde liegenden Proteine und ihrer Struktur bedeuten. Untersucht wurden dazu die Inaktivierungszeitkonstante τ als Marker dafür wie transient der Strom ist, also dafür wie schnell die Kanäle nach der Öffnung wieder schließen. Als Zweites wurde die Gleichgewichtsstadium („Steady-state“-Inaktivierung bestimmt und damit die (Konditionierungs-)Spannung $V_{1/2}$ (mV) bei der 50% der I_{to} - Kanäle inaktiviert vorliegen. Als Maß für die Refraktärität wurde mit dem in 3.6.3.4 beschriebenen Protokoll die Erholung von der Inaktivierung (Recovery from Inactivation-REC) mit 2 Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 bestimmt. Einen Überblick über die kinetischen Eigenschaften des I_{to} - Kanals sollen Tabelle 7 und Abbildung 26 verschaffen.

Tabelle 7 Zeitkonstanten und Kinetik des I_{to}

		Endokard	Epikard
Inaktivierung			
τ (40mV). (ms).	Kontrolle	41.6±5.1	45.8±1.9
	Entlastet	50.8±4.4	38.0±4.6
N	Kontrolle	9	21
	Entlastet	11	9
"Steady-state" Inaktivierung			
$V_{1/2}$ (mV).	Kontrolle	-54.9±1.4	-52.8±1.0
	Entlastet	-53.1±2.9	-53.9±1.0
Slope (mV).	Kontrolle	-5.9±0.6	-4.1±0.1
	Entlastet	-5.1±0.9	-4.7±1.1
N	Kontrolle	7	19
	Entlastet	7	7
Erholung von der Inaktivierung			
τ_1 (ms)	Kontrolle	67.6±7.9	47.9±3.2*
	Entlastet	64.2±7.2	42.2±4.9
τ_2 (ms)	Kontrolle	3433±700	3171±631
	Entlastet	2195±591	2063±495
%τ_1	Kontrolle	75.5±6.7	92.0±2.9
	Entlastet	63.3±11.1	85.6±8.0*
%τ_2	Kontrolle	27.6±6.8	11.6±3.8
	Entlastet	44.0±10.2	25.3±11.5
N	Kontrolle	9	16
	Entlastet	7	7

Tab 7 zeigt die kinetischen Eigenschaften des I_{to} . τ ist die Inaktivierungszeitkonstante. $V_{1/2}$ ist die Spannung an der die Hälfte der Steady-State-Inaktivierung gemessen wurde. Die Slope ist die Steilheit der Boltzmann-Verteilung (s Abb 26B). τ_1 und τ_2 sind die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung. % τ_1 und % τ_2 stehen für die jeweiligen Anteile der Zeitkonstanten an der Erholung. * $P < 0,05$ N: Die Anzahl der untersuchten Zellen.

4.4.2.1 Inaktivierungskonstante τ

Die durchschnittliche Zeitkonstante für die Inaktivierung τ wurde mit den Stromverlaufskurven des I_{to} (Abb 25A+B), die nach dem in 3.6.3.1 beschriebenen Protokoll aufgezeichnet wurden, bestimmt. Dazu wurden die Datenpunkte für jedes Kommandopotenzial V_{pip} aus Abbildung 25A+B mit Hilfe der Software Pulsefit in eine Exponentialfunktion 1. Ordnung eingepasst.

$$f(t) = I_{max} * e^{\frac{-t}{\tau}}$$

I_{max} : Ausgangswert (Maximaler I_{to}) (in Stromkurve) =1

t: Zeit

τ : Inaktivierungszeitkonstante

e: eulersche Zahl.

Wenn man für $t = 1\tau$ annimmt ist nach dieser Zeit nur noch ca. 36% des Ausgangsströms vorhanden. Nach $t = 5\tau$ ist weniger als 1% des Ausgangsströms vorhanden. Die numerischen Ergebnisse für τ für die jeweilige Kommandospannung V_{pip} wurde in Abbildung 26A aufgetragen. Tabelle 7 zeigt exemplarisch den Wert für τ bei V_{pip} von 40 mV. Dieser lag für endokardiale Zellen der Kontrollen bei 41.6 ± 5.1 ms, für epikardiale Zellen der Kontrollen bei 45.8 ± 1.9 ms. Für die hHTx entlasteten Zellen lag der Wert bei 50.8 ± 4.4 ms im Endokard und bei 38.0 ± 4.6 im Epikard.

Die Ergebnisse (Abb 26 A und Tab 7) der Untersuchung von insgesamt (n=50) Zellen zeigen, dass die Inaktivierung des I_{to} zum einen einfach exponentiell erfolgt, die Inaktivierung spannungsunabhängig gleich schnell verläuft und keine signifikanten transmuralen Unterschiede zwischen Endokard und Epikard sowie keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den druckentlasteten Zellen bestehen. Die Kinetik für die Inaktivierung der Kanäle bleibt demnach bei Entlastung unverändert.

4.4.2.2 Steady-state Inaktivierung

Bei der Gleichgewichtsstadium-Inaktivierung wurde mit dem Protokoll aus 3.6.3.2 die Größenordnung der Inaktivierung nach einem variierenden Konditionierungsvorpuls untersucht. Ziel war es herauszufinden bei welcher konditionierenden Vordepolarisation $V(1/2)$ über eine Zeit von 600ms nur noch 50% des I_{to} -Stroms fließen und ob es Unterschiede zwischen den untersuchten Zellgruppen gibt. Wie aus der Tabelle 7 zu entnehmen ist, wurden insgesamt 40 Zellen untersucht. Bei den Kontrollen war Endokard $n=7$ sowie Epikard $n=19$ und bei den druckentlasteten Zellen war Endokard $n=7$ und Epikard $n=7$.

Die Ergebnisse zeigen, wie es in Abbildung 26B zu sehen ist, eine Spannungsabhängigkeit für die Steady-State-Inaktivierung. Die Ergebnisse sind nach dem Maxwell-Boltzmann Gleichgewicht verteilt und zeigen den dafür typischen sigmoiden Kurvenverlauf. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse für die halbmaximale Inaktivierung zusammen:

$V_{1/2}$ lag für endokardiale Zellen der Kontrollen bei -54.9 ± 1.4 mV und für epikardiale Zellen der Kontrollen bei -52.8 ± 1.0 mV. Demgegenüber stehen bei den endokardialen Zellen der hHTx, druckentlasteten Herzen -53.1 ± 2.9 mV sowie -53.9 ± 1.0 mV für die epikardialen Zellen der gleichen Gruppe.

Demnach gibt es keine signifikanten Unterschiede bei der Steady-State-Inaktivierung zwischen den untersuchten Zellen. Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung bleibt durch die Entlastung unverändert.

4.4.2.3 Erholung von der Inaktivierung

Bei dem Messprotokoll für die Erholung von der Inaktivierung (s 3.6.3.3) sollte die Refraktärität des I_{to} -Kanals untersucht und zwischen Endokard und Epikard sowie zwischen den Kontrollen und den hHTx, entlasteten Zellen verglichen werden. Die Zeit ist hier halblogarithmisch gegen den linearen relativen Stromfluss nach vorausgegangener maximalen Aktivierung des Ito aufgetragen. Es zeigte sich ein biexponentieller Verlauf der Kurve, sodass sich für diese Funktion 2 verschiedene Zeitkonstanten ergeben. Eine schnelle τ_1 und eine langsame τ_2 . Tabelle 7 und Abbildung 26C zeigen diese Ergebnisse.

Es wurden 40 Zellen untersucht, die sich auf die folgenden Gruppen verteilen: Kontrollen endokardial n=9, Kontrollen epikardial n=16. HHTx, druckentlasteten Zellen epikardial und endokardial jeweils n=7.

Bei den Kontrollen zeigte sich ein transmuraler Gradient bei der kurzen Zeitkonstante τ_1 . Epikardiale Zellen hatten mit 47.9 ± 3.2 ms eine signifikant kürzere τ_1 als die endokardialen Zellen mit 67.6 ± 7.9 ms* (Tab 7). Bei den entlasteten Herzen hingegen war zwar ebenfalls ein transmuraler Unterschied zwischen einer τ_1 von 42.2 ± 4.9 ms in epikardialen Zellen und 64.2 ± 7.2 ms bei endokardialen Zellen auszumachen, dieser war rechnerisch allerdings nicht signifikant. Es gab des weiteren für τ_1 keinen Unterschied zwischen hHTx, entlasteten Zellen und den Kontrollen. Für die langsame Zeitkonstante τ_2 war weder bei den Kontrollen noch bei den hHTx, druckentlasteten Zellen ein transmuraler Gradient festzustellen. Die Werte waren für epikardiale und endokardiale Zellen in beiden Gruppen nahezu identisch (Tab 7). Eine in der Gruppe der endokardialen Zellen mit 2195 ± 591 ms kürzere τ_2 bei entlasteten Zellen im Gegensatz zu 3433 ± 700 ms bei den Kontrollzellen war ebenso wenig signifikant wie der Unterschied für τ_2 in der Gruppe der epikardialen Zellen: 2063 ± 495 ms bei den druckentlasteten Zellen vs. 3171 ± 631 ms bei den Kontrollen. In der Gruppe der hHTx, druckentlasteten Zellen hatten die endokardialen Zellen mit einem Anteil von $63.3 \pm 11.1\%$ τ_1 einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an der Gesamterholung von der Inaktivierung als die epikardialen Zellen mit einem Anteil von $85.6 \pm 8.0\%$ τ_1 . Es gab keine weiteren Unterschiede zwischen den anderen Gruppen und Zellen. Demnach ist auch hier kein Effekt der Entlastung zu beobachten. Zusammenfassend betrachtet lassen sich bei keinem der betrachteten kinetischen Eigenschaften des I_{to} Veränderungen der entlasteten Kardiomyozyten im Vergleich mit den Kontrollen feststellen.

Abbildung 26 I_{to} -Kinetik

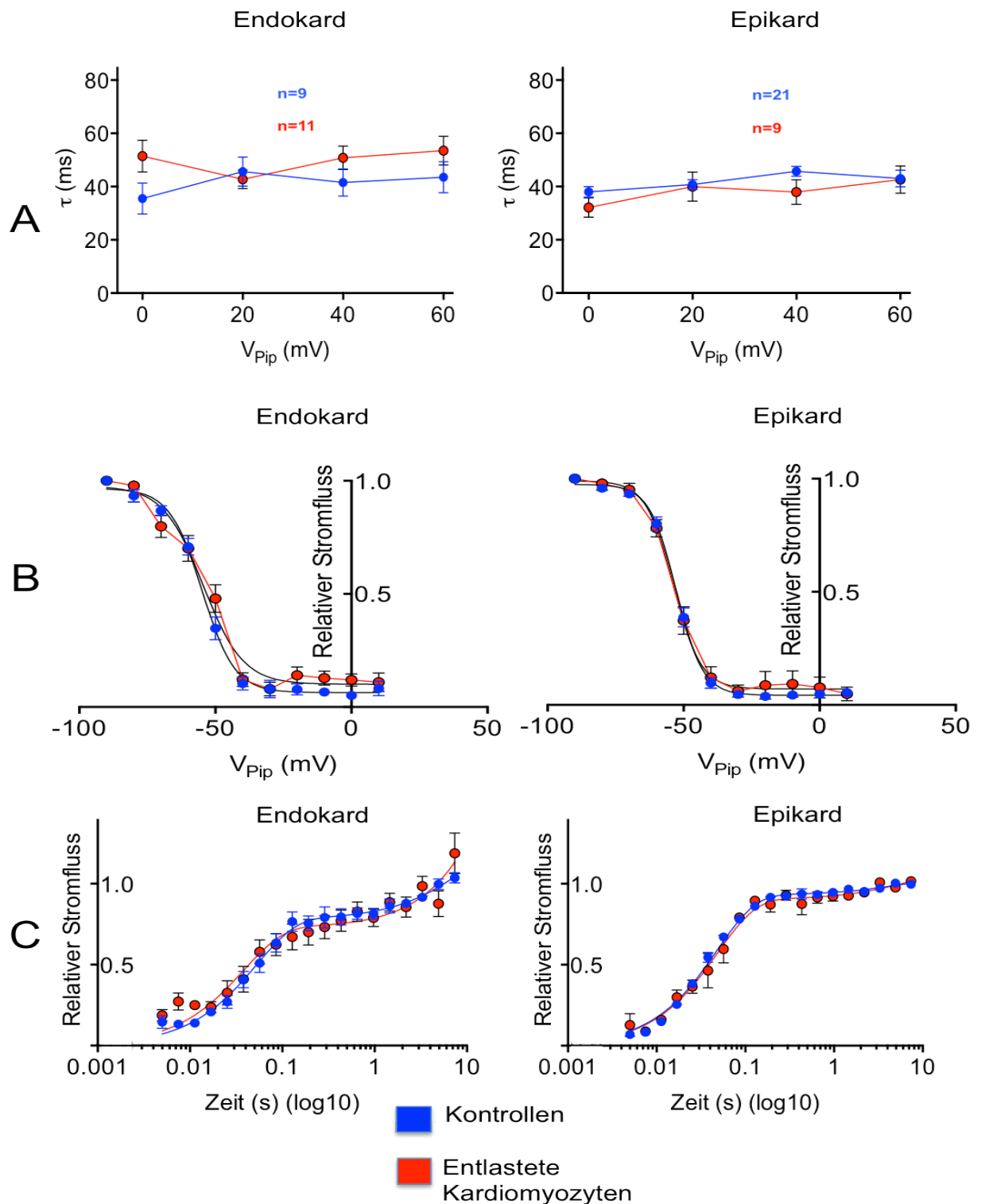


Abb 26 gibt einen Überblick über die I_{to} -Kinetik. A: Inaktivierungszeitkonstante des I_{to} . B: Steady-state Inaktivierung des I_{to} . C: Recovery from Inactivation des I_{to} . Die Zeitkonstanten der Inaktivierung (A) und auch die steady-state-Inaktivierungen (B) waren gleich in allen Kardiomyozyten und Gruppen. Die Erholung von der Inaktivierung (C) hat einen biexponentiellen Kurvenverlauf. Diese zeigt zwei Zeitkonstanten: eine kurze Zeitkonstante τ_1 und eine lange Zeitkonstante τ_2 im nicht linearen Verlauf bei halblogarithmischer Auftragung. τ : Inaktivierungszeitkonstante (ms). V_{pip} : Kommandopotenzial. s: Sekunde. mV: Millivolt. ms: Millisekunde

4.5

Verzögerter gleichrichtender K^+ - Strom (delayed rectifier) I_{sus}

Der I_{sus} (s 2.5.3 und 2.5.5) aktiviert langsam und inaktiviert fast gar nicht und trägt damit zur späten Phase der Repolarisation bei. Der Strom aktiviert bei Kommandospannungspotenzialen, die positiver als -40mV sind und erreicht dann ein Gleichgewicht. Der Strom inaktiviert deutlich später als der I_{to} , sodass nach 600ms der I_{sus} aus der Stromkurve des I_{to} bestimmt werden kann, der zu diesem Zeitpunkt bereits inaktiviert ist. Der I_{sus} wurde wie auch der I_{to} auf die Zellgröße normiert. Die hieraus resultierenden Strom-Spannungsbeziehungen können in Abbildung 27 betrachtet werden.

Abbildung 27 I_{sus} Strom-Spannungsbeziehungen

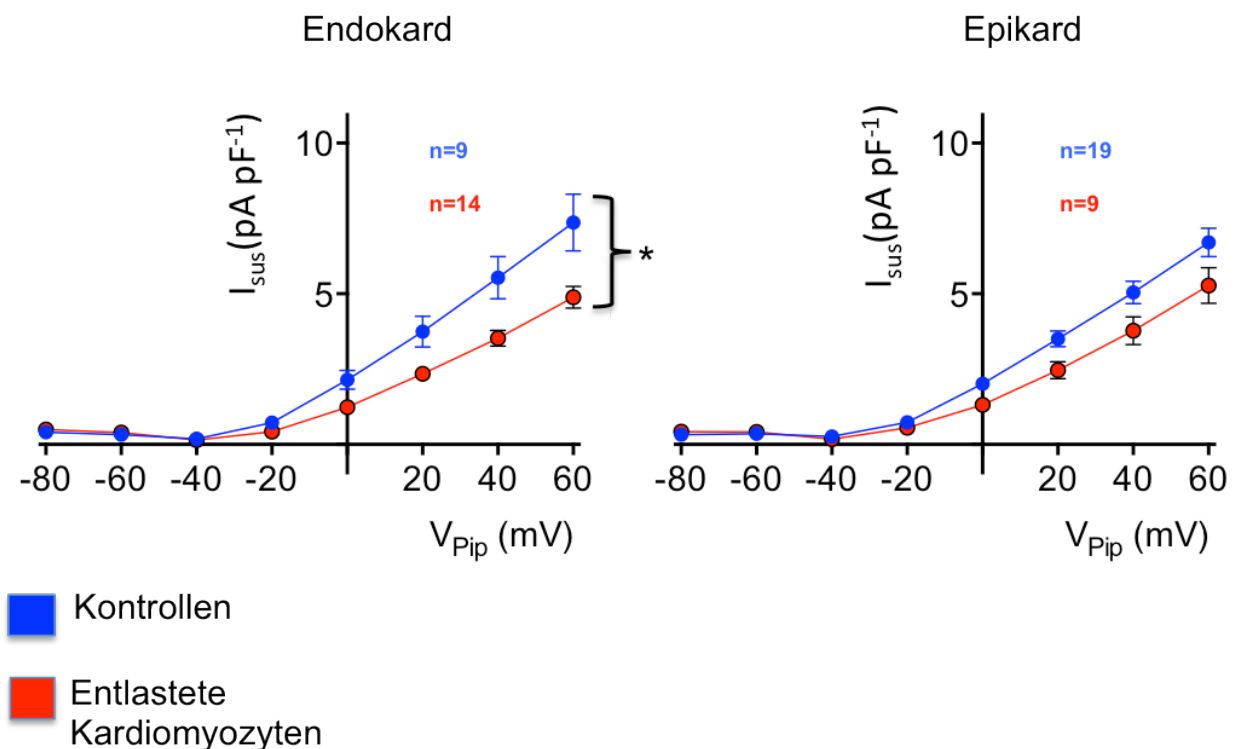


Abb 27 zeigt die Strom-Spannungsbeziehungen des I_{sus} . $*p < 0,05$ V_{pip} =Kommandospannung I_{sus} =delayed rectifier K^+ Strom. pA: Pikoampère. pF: Pikofarad.

Die Stromdichte des I_{sus} verhält sich nahezu gleich in endokardialen und epikardialen Myozyten. Vergleicht man die entlasteten Herzen mit den Kontrollen zeigt sich bei den entlasteten Herzen eine geringere Stromdichte in den korrespondierenden Myokardregionen (Abb 27). Statistisch signifikant war dies jedoch nur für die endokardialen Zellen mit $p < 0,05$.

4.6 Einwärts gleichrichtender K^+ - Strom I_{K1} (Kir).

Der einwärtsgleichrichtende K-Strom (Kir). I_{K1} ist der Haupt- K^+ -Strom für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials. Darüber hinaus trägt er zur späten Phase der Repolarisation bei. Um die Größe des I_{K1} zu messen, wurde das Protokoll wie in 3.6.5 beschrieben, angewandt. Die Stromkurven sind in Abbildung 28 A+B zu sehen. Der I_{K1} Strom wurde auf die Zellkapazität normiert. Abbildung 28 C zeigt die Strom- Spannungsbeziehung.

Es handelt sich um einen am Ende des 600-ms-Spannungspulses gemessenen Strom. Es wurden insgesamt 39 Zellen untersucht. Davon waren n=19 endokardiale Zellen (Kontrollen, n=8; druckentlastete Myozyten n=11) und n=20 epikardiale (Kontrollen, n=12; druckentlastete Myozyten n=8) ventrikuläre Myozyten. Bei unphysiologischen Kommandopotenzialen ($V_{pip} < -90$ mV) waren große Einwärtsströme, bei Membranpotenzialen ($V_{pip} > -90$ mV) kleine Auswärtsströme messbar. Die absolute Stromdichte bei einem Potenzial von -120 mV sowie die Verläufe der Strom-Spannungskurven zwischen -90 und -120 mV waren gleich in allen untersuchten Myozyten.

Es scheint also keinen transmuralen Gradienten zwischen endokardialen und epikardialen ventrikulären Kardiomyozyten für den I_{K1} zu geben. Darüber hinaus scheint auch die chronische Druckentlastung keinen Einfluss auf die Stromdichte des I_{K1} und damit auf diesen K^+ -Einwärtsgleichrichter zu haben.

Abbildung 28 I_{K1} Stromkurvenverläufe

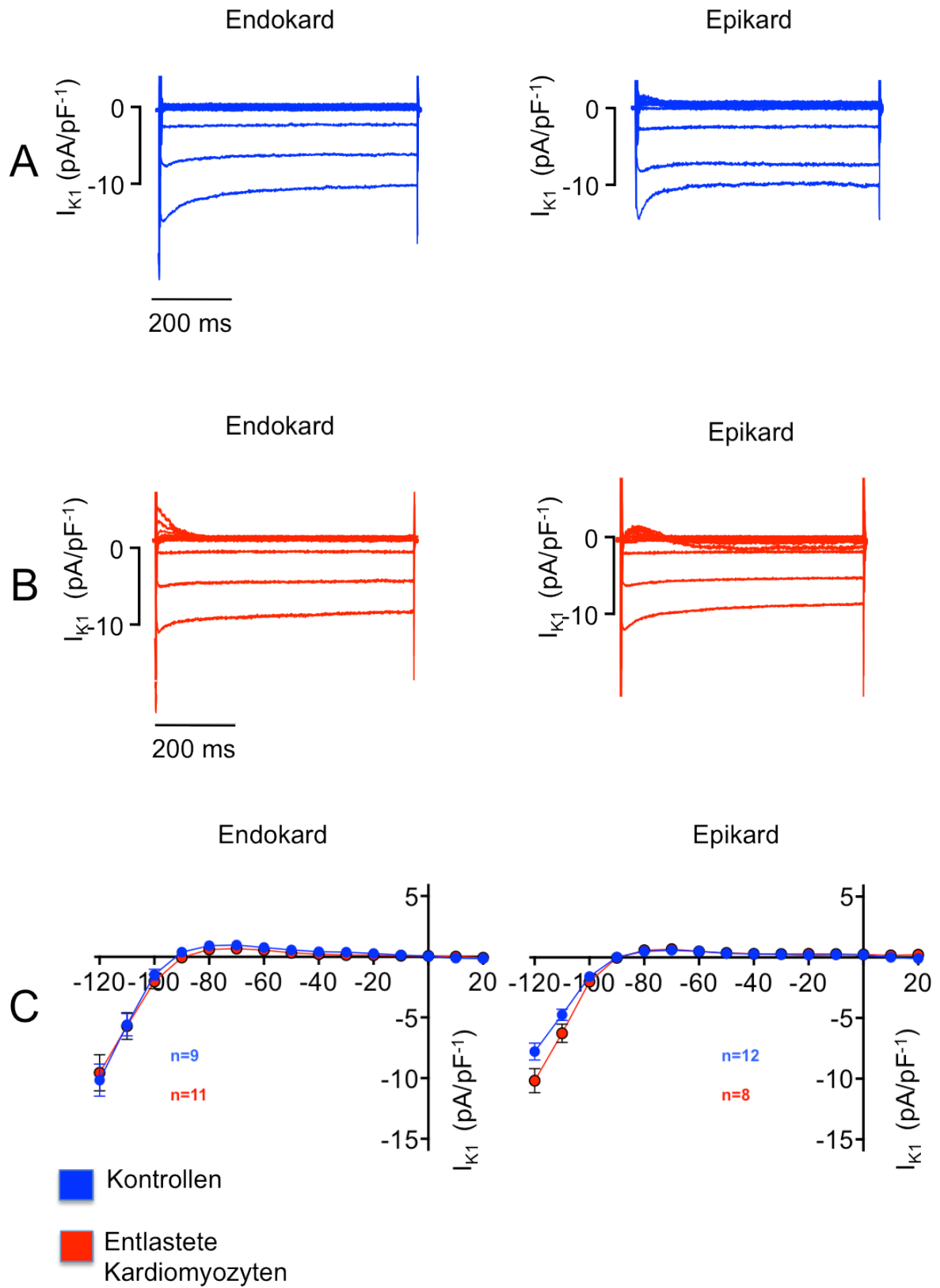


Abb 28 zeigt $BaCl_2$ -sensitive Einwärtsströme in epi- und endokardialen Myozyten. " I_{K1} " A Kardiomyozyten der Kontrollgruppe. B Druckentlastete Kardiomyozyten. C Zeigt die Strom-Spannungsbeziehungen des I_{K1} . pA: Pikoampere. pF: Pikofarad

Die Arbeitsgruppe von Dr. Diane Goltz und PD Dr. Alexander Schwoerer im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie bestimmten mit Hilfe einer RT-PCR die Mengen an Kv4.2-, Kv4.3- und KChIP2-mRNA aus Gewebeproben von den in dieser Arbeit untersuchten hHTx-druckentlasteten Herzen sowie aus Gewebeproben der Kontrollherzen. Die Menge der Expression von KChIP2-mRNA (Abb 29C) wurde mit speziellen Primern untersucht, die dazu designt wurden, die drei üblichen Varianten von KChip2 in Rattenherzen zu verstärken (Takimo et al 2002).

In den Kontrollen besteht ein großer transmuraler Gradient für die Menge der Transkription von Kv4.2 (Abb 29A) und Kv4.3 (Abb 29B)-mRNA. Diese war signifikant niedriger in der endokardialen Region als in der epikardialen (Abb 29A **,B***).

Bei den entlasteten Herzen hingegen kommt es zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Mengen von Kv4.2 und Kv4.3 in der epikardialen Region im Vergleich zu den Kontrollen (Abb 29A***,B***). Ein transmuraler Gradient ist bei den entlasteten Zellen nicht vorhanden.

Für die Menge von KChIP2-mRNA besteht in den Zellen der Kontrollen ebenfalls ein transmuraler Gradient. Jedoch ist dieser zu dem Gradient von Kv4.2 und Kv4.3 genau invers. KChIP2-mRNA ist im endokardialen Gewebe signifikant stärker exprimiert als im epikardialen Gewebe (Abb 29C*). Hier führt die chronische Druckentlastung der Herzen zu einer deutlichen Reduktion der KChIP2-mRNA-Menge in den endokardialen Zellen im Vergleich mit den Kontrollen (Abb 29C*). Auch hier ist der transmurale Gradient aus den Kontrollen nach der Entlastung aufgehoben.

Abbildung 29 mRNA Expression v Kv4.2,Kv4.3 und KChIP

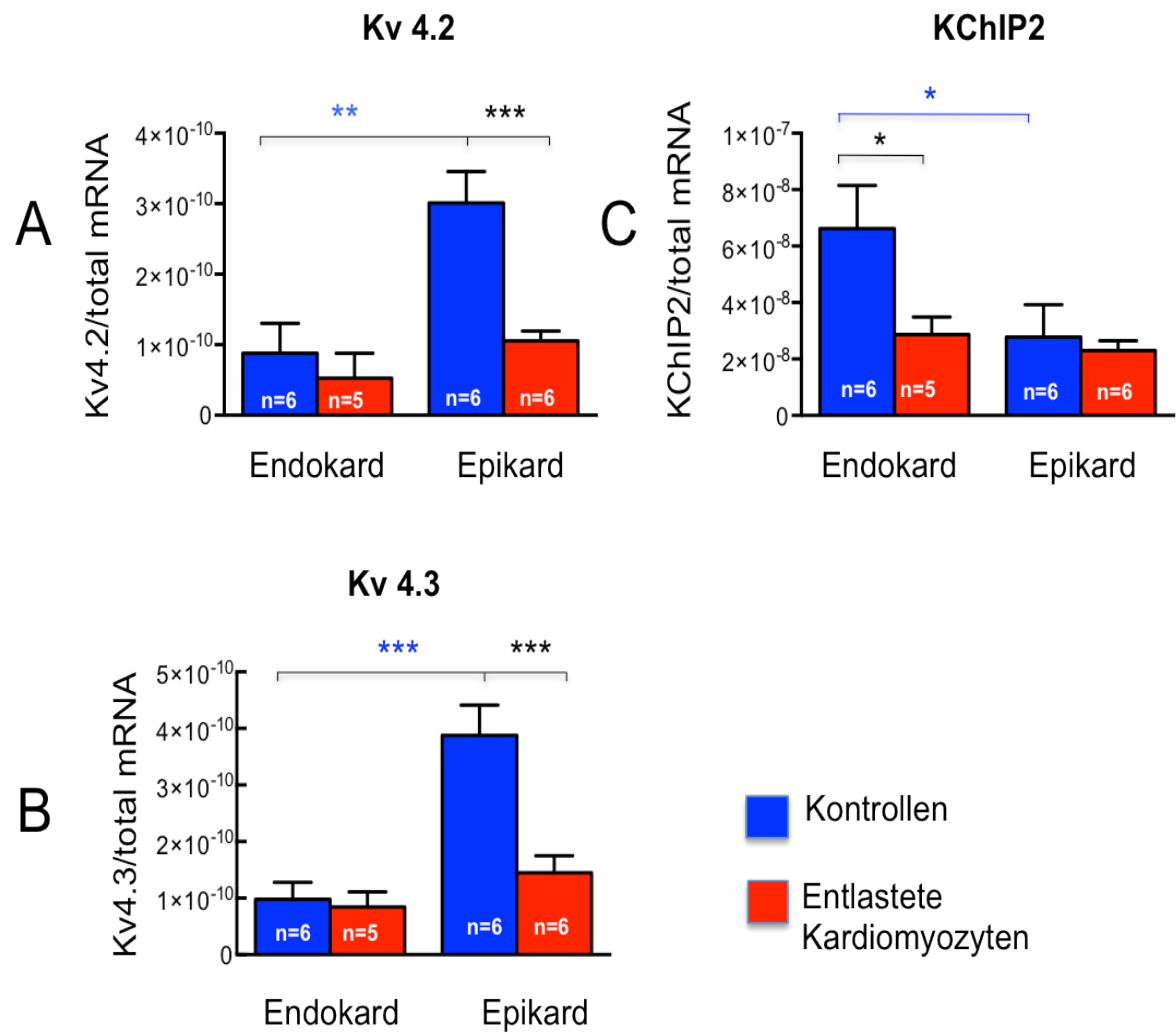


Abb 29: Expression von Kv4.2-, Kv4.3- und KChIP2-mRNA, normiert auf die Gesamt-mRNA. Gemessen mit einer RT-PCA. Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Alexander Schwoerer und Dr. Diane Goltz.

Im folgenden Teil sollen nun die in 2.7 gestellten Fragen zu Veränderungen bei Atrophie durch mechanische Druckentlastung der Reihe nach beantwortet und die Ergebnisse der Versuche diskutiert werden. Zum besseren Verständnis sollen an dieser Stelle die vier Fragen aus Kapitel 2.7 kurz wiederholt werden:

1. Welche Veränderungen gibt es bei den druckentlasteten Herzen bezüglich des Herzgewichts und der Zellgröße als Zeichen einer Atrophie?
Gibt es dabei transmurale Unterschiede zwischen endokardialen und epikardialen Kardiomyozyten?
2. Wie verändert sich das ventrikuläre Aktionspotenzial (AP) bei entlasteten Herzen? Gibt es darüber hinaus auch hier transmurale Unterschiede zwischen Endokard und Epikard? Ähneln die beobachteten Veränderungen denen von hypertrophierten Herzmuskelzellen, entsprechend einer U-förmigen Beziehung? Gibt es keine Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen oder liegen die Veränderungen auf gegenüberliegenden Enden eines linearen Kontinuums?
3. Welche Veränderungen sind bei den druckentlasteten Kardiomyozyten in Bezug auf die repolarisierenden K^+ -Ströme I_{to} , I_{sus} , I_{K1} im Hinblick auf die Größe ihrer Ströme und der ihnen zu Grunde liegenden Kinetik zu beobachten? Gibt es transmurale Unterschiede zwischen Endokard und Epikard?
4. Sollte es zu Veränderungen bei der APD oder dem größten der repolarisierenden Ionenströme aus Frage 3, dem I_{to} , kommen: Basieren diese Veränderungen auf einer Veränderung der Kanalstruktur oder auf einer Änderung der Anzahl der Kanäle aufgrund einer veränderten Proteinexpression?

Im Anschluss an die Beantwortung dieser Fragen sollen mögliche Ursachen diskutiert werden (s 5.1-5.4). In 5.5 werden die experimentellen Limitationen der Arbeit aufgezeigt. In Abschnitt 5.6 wird das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell in Bezug zu Erkenntnissen aus klinischen Beobachtungen bei der VAD-Therapie gesetzt. Anschließend wird in Abschnitt 5.7 ein möglicher Zusammenhang zu intrazellulären Signalkaskaden dargestellt. Abschließend werden in 5.8 Implikationen und mögliche Erkenntnisse für die mechanische Entlastungstherapie der Herzinsuffizienz erörtert.

5.1 Herzgröße und Zellgröße nach hHTx - Entlastung

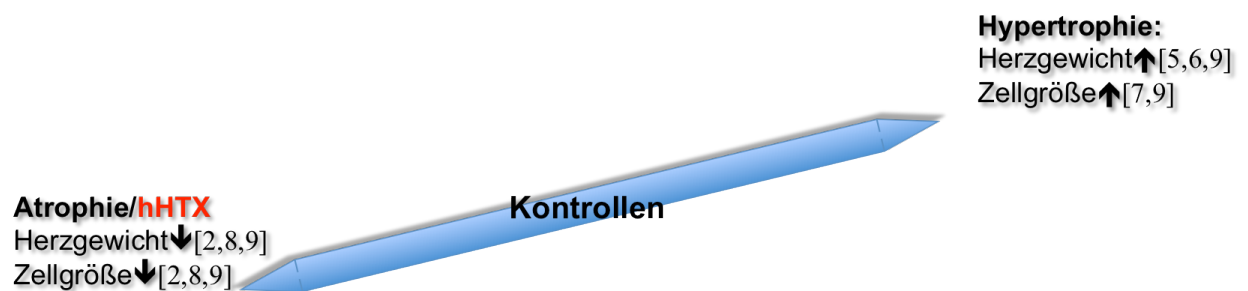
Die durchgeführte Studie zeigt, dass zwei Wochen in vivo druckentlastete Rattenherzen ausgeprägte Umbauvorgänge durchlaufen.

Nach einer zweiwöchigen Entlastung haben sich das Herzgewicht und das Volumen des linken Ventrikels um ~50%, die Zellgröße um ~25% signifikant reduziert. Dies steht im Einklang mit den erwarteten Veränderungen bei einer Druckentlastung (Korecky et al 1983, Frenzel et al 1987, Klein et al 1990, Campbell et al 1991). Interessant ist, dass diese Änderungen nicht gleichmäßig über alle Wandschichten verteilt gemessen werden können. Lediglich bei endokardialen Zellen war die Reduktion der Zellgröße signifikant. Diese asymmetrische Reduktion ist ein bereits bekanntes Phänomen (Campbell et al 1991). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die größte Arbeitslast der Kardiomyozyten in der endokardialen Schicht liegt. Damit würden diese Zellen bei einer Entlastung auch am deutlichsten druckentlastet werden. Die Größe der Veränderung des mechanischen Stresses scheint hier proportionale Auswirkungen auf die molekularen und morphologischen Umbauvorgänge zu haben (Campbell et al 1991).

Die chronisch druckentlasteten Zellen zeigen damit einige phänotypische Veränderungen einer Atrophie. Chronische Druckbelastung, wie bei spontan hypertensiven Ratten oder nach einem operativen Abbinden der abdominalen Aorta, führt hingegen zu einer Herzmuskelhypertrophie sowie zu einer Zunahme der Zellgröße (Depre et al 1998, Volk et al 1999, Volk et al 2001, Rose et al 2005).

Betrachtet man diese Veränderungen im Hinblick auf die Eingangsfragestellung (s 2.7) und die zu Beginn aufgestellten Hypothesen (s 2.6.1) handelt es bei diesen phänotypischen Änderungen nach chronischer Druckentlastung der Herzen durch eine hHTx, um Veränderungen, die verglichen mit drucküberbelasteten Kardiomyozyten am gegenüberliegenden Ende eines linearen Kontinuums stehen. Diese Erkenntnisse sprechen für Hypothese a) mit linearen Veränderungen zwischen Drucküberbelastung/Hypertrophie und Druckentlastung (Abb 11a und Abb 30).

Abbildung 30 Phänotypische Veränderungen nach hHTx



hHTx: heterotope Herztransplantation

Abb 30 zeigt, dass hHTx - entlastete Herzen phänotypisch bezüglich des Herzgewichts und der Veränderung der Zellgröße atrophien Herzen ähneln. Für die Zitierungen siehe Abb 11a.

5.2 AP - Längendifferenz und deren Beeinflussung durch die repolarisierenden K^+ - Ströme nach hHTx - Entlastung

Die gemessenen Ergebnisse für die Aktionspotenzialdauern (APD) zeigen, dass es bei den gesunden Kontrollherzen erwartungsgemäß (s 2.2.3ff) einen physiologischen transmuralen Gradienten für die Aktionspotenzialdauern APD_{0mV} und APD_{90} gibt. Endokardiale und epikardiale Myozyten von hHTx-entlasteten Herzen zeigen nach zwei Wochen eine deutliche Verlängerung in der Aktionspotenzialdauer im Vergleich zu den Zellen aus den Kontrollherzen. Die vorbestehende physiologische, transmurale Längendifferenz bleibt dabei erhalten. Sie ist allerdings nur noch für die APD_{90} , als Marker für die Gesamtlänge des APs, signifikant.

Verschiedene Veränderungen auf Basis der Ionenkanäle können die Ursache der verlängerten Aktionspotenziale sein. Zum einen könnte es zu einer Änderung der Kanalzusammensetzung auf der Zellmembran für die repolarisierenden Ströme kommen, zum anderen wäre eine Veränderung der kinetischen Kanaleigenschaften denkbar.

Die beobachtete Reduktion des I_{to} im Endo- und Epikard der entlasteten Myozyten hat wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf die Aktionspotenzialdauer, denn bisherige Studien zeigten ebenfalls eine starke Abhängigkeit der Aktionspotenzialdauer von der Stromstärke des I_{to} in Myozyten der Ratte (Neher et al 1976, Kaprielian et al 1999, Volk et al 1999, Volk et al 2001) (s 2.2.3 und 2.2.4). Außerdem trägt wahrscheinlich auch die Reduktion des I_{sus} in den entlasteten endokardialen Myozyten zu der Verlängerung der Repolarisationszeit und damit zu einer weiteren Verlängerung der Aktionspotenzialdauer bei (Shieh et al 2000).

Der einwärtsgerichtete Gleichrichterstrom I_{K1} zeigt keinen transmuralen Gradienten und ist auch bei den entlasteten Kardiomyozyten nicht verändert.

Um die Ausgangshypothesen aus Kapitel 2.6.1 mit den Ergebnissen der Messungen der Aktionspotenzialdauer zu überprüfen, ist auch hier ein Vergleich mit chronisch drucküberbelasteten Zellen notwendig. Dieser wird im folgenden Kapitel zusammen mit den Veränderungen der repolarisierenden K^+ -Strömen behandelt.

5.3 Veränderungen der repolarisierenden K^+ -Ströme nach hHTx - Entlastung

Entsprechend der aktuellen Literatur (s 2.2.3, 2.2.4) konnte auch in dieser Arbeit bei allen Zellen (Kontrollen & hHTx-entlasteten Zellen) ein transmuraler Gradient mit einem größeren I_{to} in epikardialen als in endokardialen Zellen, und einem entsprechenden Unterschied in der Aktionspotenzialdauer (Endokard>Epikard), gemessen werden (Clark et al 1993, Casis et al 1998). Dieser transmurale Gradient blieb auch bei den hHTx - druckentlasteten Kardiomyozyten erhalten (s 4.3), die darüber hinaus eine signifikante Reduktion des I_{to} im Vergleich mit den Kontrollen zeigten.

Die Stromdichte des I_{sus} verhielt sich nahezu gleich in endokardialen und epikardialen Myozyten. Vergleicht man die entlasteten Herzen mit den Kontrollen zeigte sich bei den entlasteten Herzen eine geringere Stromdichte in den korrespondierenden Myokardregionen. Statistisch signifikant war dies jedoch nur für die endokardialen Zellen. Der einwärtsgerichtete Gleichrichterstrom I_{K1} zeigte keinen transmuralen Gradienten und war auch bei den entlasteten Kardiomyozyten nicht verändert.

Verschiedene Faktoren können zu einer Abnahme der Stromdichte führen. Die Untersuchung der Kanalkinetik kann zusammen mit der Untersuchung der Proteinexpression der Kanäle wertvolle Hinweise darüber liefern, ob die Unterschiede in den Strömen auf eine veränderte Funktion oder veränderte Anzahl der zu Grunde liegenden Kanäle zurückzuführen ist. Verändert sich die totale Stromgröße eines Stroms, der über der Zellmembran messbar ist, gibt es folgende mögliche Ursachen dafür: Zum einen ist es denkbar, dass die totale Anzahl der dem Strom zu Grunde liegenden Kanäle zu- bzw abgenommen hat. Auf der anderen Seite wäre es auch möglich, dass sich die Öffnungs- und Schließgeschwindigkeit bzw die Offenwahrscheinlichkeit der zu Grunde liegenden Kanäle, also die Kanalkinetik, bei unveränderter Kanalanzahl geändert hat. Mischformen sind ebenfalls denkbar (Patel et al 2002).

Eine Änderung der Kanalanzahl bedeutet, dass es zu einer veränderten Menge der dem Kanal zu Grunde liegenden α - oder β -UE in der Zellmembran gekommen sein muss. Eine Möglichkeit die Menge der α -

und β -UE abzuschätzen ist das Bestimmen der Menge der mRNA der zu Grunde liegenden Proteine. Jedoch kann man durch die bloße Betrachtung der mRNA - Mengen keine sicheren Aussagen über die Anzahl der auf der Zellmembran ausgebildeten funktionierenden Kanäle oder die Menge der entsprechenden Proteine treffen. So fanden Foeger et al 2013 heraus, dass es bei KChIP2^{-/-} transgenen Mäusen zu einem kompletten Verlust an Kv4.2 Protein ohne eine Veränderung der Transkription des Gens Kcnd2 (Kv4.2) kam. Die Autoren leiteten daraus ab, dass KChIP2 eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Kv4.2 Proteinkomplexes zukommt. Wichtig für die Ausbildung von Kv4.3 auf der Zelloberfläche scheint zB auch die Modifikation von KChIP-Spleiß-Varianten durch das Anheften von Palmitinsäure (Takimoto et al 2002) zu sein. Glykosilierung trägt zur Stabilisierung der K⁺- Kanäle bei, indem es die richtige Proteinfaltung intrazellulär beeinflusst (Khanna et al 2001). Die Entfernung von Sialsäure, einem Zuckerrest, durch die Behandlung mit Neuraminidase konnte sogar eine Reduktion des I_{to} und eine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer hervorrufen (Ufret-Vincenty et al 2001). Solche posttranskriptionellen Einflüsse oder auch hormonelle Einflüsse wie in 5.3.2 sowie 2.2.4.2 beschrieben, können Einflüsse auf die Kanalkinetik und auch die Kanalanzahl nehmen.

Eine Änderung der Kinetik könnte hingegen zum einen auf posttranslationalen Modifikationen wie zB das Spleißen und die Phosphorylierung bestimmter Bindungsstellen der Kanalproteine und damit auf eine veränderte Proteinkonfiguration zurückgehen. Alternativ denkbar wäre aber auch eine Veränderung des Verhältnisses von α - zu β -UE. Denn Patel et al berichten, dass es durch eine erhöhte Expression von KChIP zu einer langsameren Inaktivierung und zu einer schnelleren Erholung des I_{to} kam (Patel et al 2004). Andere β -UE haben wiederum keinen Einfluss auf die Kanalkinetik. Die Coexpression von Kv1 β , Kv2 β und Kv3 β (Yang et al 2001) sowie von KChAP (Wang et al 2003) erhöhen MiRP2 und Mink, aber erniedrigen den I_{to}-Strom ohne dessen Kinetik zu beeinflussen (Lundby et al 2006).

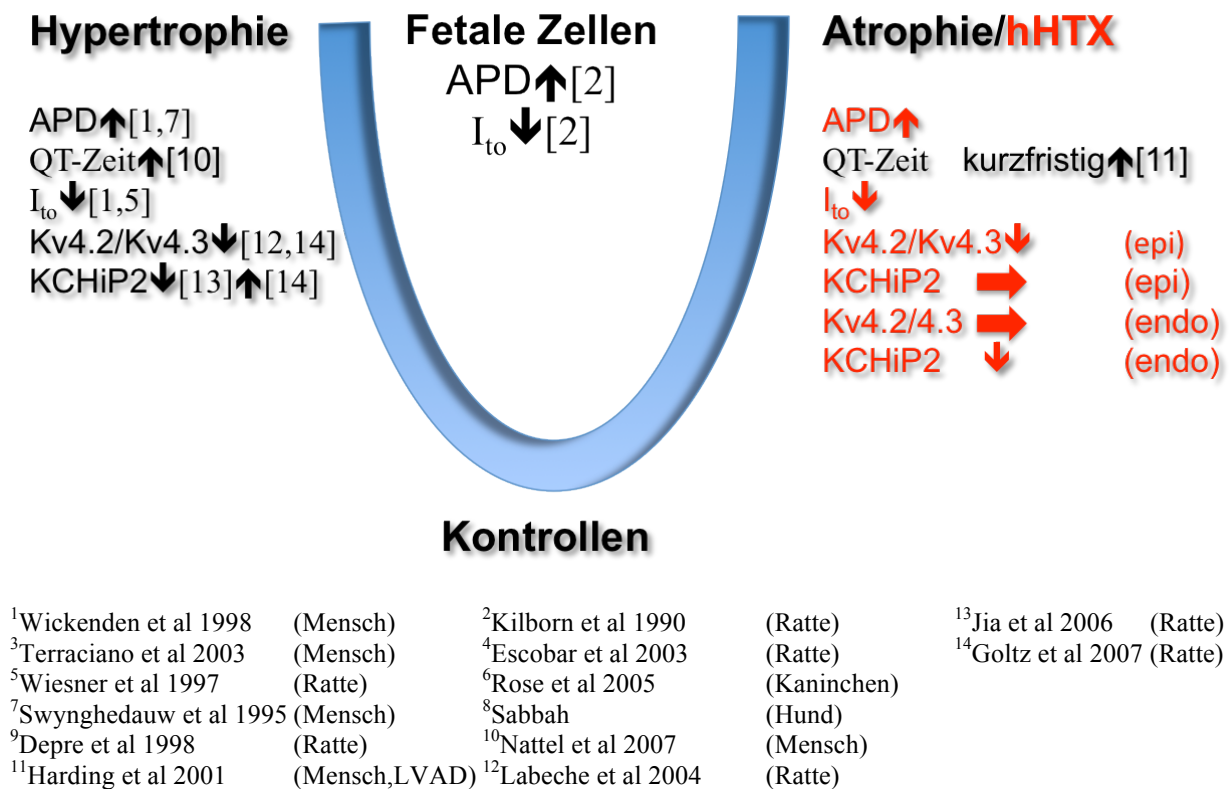
Für die Kanalkinetik wurden die Inaktivierungszeitkonstante des I_{to}, die Steady-state Inaktivierung sowie die Erholung von der Inaktivierung untersucht. Die durch hHTx druckentlasteten Kardiomyozyten zeigten keinerlei Veränderung in der Kanalkinetik im Vergleich zu den Kontrollen (s 4.4.2).

Bei dem Vergleich mit Daten von chronisch drucküberbelasteten Kardiomyozyten zeigen sich auch dort verlängerte Aktionspotenzialdauern und reduzierte Amplituden der repolarisierenden K⁺-Ströme. Es wurden von mehreren Autoren reduzierte I_{to}-Ströme in epikardialen Myozyten und reduzierte I_{sus}-Ströme in endokardialen Myozyten beschrieben (Cerbai et al 1994, Tomita et al 1994, Tomaselli et al 1999, Volk et al 2001, Lebeche et al 2004). Auch die verzögerten Gleichrichterströme I_{K1} der Ratte waren unverändert bei chronisch drucküberbelasteten Kardiomyozyten der Ratte. Lediglich bei unphysiologischen Klemmströmen von negativer als -100mV wurden Veränderungen des I_{K1} beschrieben (Volk et al 2001).

Diese beobachteten Veränderungen anderer Autoren zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Unterschiede in den Aktionspotenzialdauern von Rattenherzen vor allem auf die Änderungen des frühen transienten K^+ -Stroms I_{to} und nicht auf andere repolarisierende K^+ -Ströme zurückgehen. Darüber hinaus scheinen damit die Veränderungen an den K^+ -Kanälen eine spezifische und keine willkürliche Antwortreaktion zu sein.

Zusammenfassend betrachtet, sind die beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen, nämlich die Verlängerung der APD einhergehend mit einer Reduktion des I_{to} bei unveränderter Kanalkinetik in atrophierten, chronisch entlasteten Kardiomyozyten, denen von hypertrophierten, chronisch druckbelasteten Zellen sehr ähnlich. Sie stellen damit möglicher Weise eine gemeinsame Endstrecke einer molekularen und funktionalen Antwortreaktion auf mechanischen Stress dar, auch wenn ihnen gegensätzliche Stimulationsreize zu Grunde liegen. Ein weiterer Hinweis hierfür könnte sein, dass auch fetale Kardiomyozyten in Bezug auf APD und I_{to} , den drucküberbelasteten und den druckentlasteten Zellen ähneln. Verschiedene Autoren, die bisher kardiales Remodeling bei hypertrophierten Herzen untersucht haben, berichten von einer Reaktivierung von fetalen Genexpressionsmustern (Kolar et al 1995, Depre et al 1998, Doenst et al 2001, Razeghi et al 2003, Ito et al 2003, Sharma et al 2006) und einer Regression zu fetaler Energiegewinnung (Depre et al 1998, Ito et al 2003). Diese Veränderungen entsprechen der Hypothese c), die eine U-förmige Beziehung postuliert (s 2.5.3, Abb 11b und Abb 31) (Kilborn et al 1990, Depre 1998, Terraciano et al 2003).

Abbildung 31 U-Beziehung Hypertrophie/hHTx



I_{to} : transienter K^+ -Auswärtsstrom; APD: Aktionspotenzialdauer

Abb 31: U-förmige Beziehung der elektrophysiologischen und molekulargenetischen Veränderungen zwischen chronisch druckbelasteten und hHTx-entlasteten und fetalen Herzzellen. Rot markiert sind die neuen Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit und aus den molekulargenetischen Untersuchungen von PD Dr. Alexander Schwoerer und Dr. Goltz.

5.4 Veränderungen der Kanalstruktur und der Kanalexpression des I_{to} nach hHTx - Entlastung

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (s 4.4, 4.6, 5.2, 5.3), dass es nach einer 2-wöchigen Entlastungstherapie nicht nur zu einer Verlängerung der APD sondern auch zu einer Reduktion von zwei repolarisierenden Strömen dem I_{to} und dem I_{sus} , im Vergleich zu den Kontrollen, gekommen ist. Es bleibt nun offen, inwieweit diese beobachteten Veränderungen auf eine Änderung der Kanalanzahl oder der Kanaleigenschaften zurückzuführen sein könnte.

Die kinetischen Eigenschaften eines spannungsabhängigen Kanals werden unter anderem durch seine Proteinzusammensetzung aus verschiedenen α - und β -UE geregelt (s 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6). Durch eine Veränderung dieser Zusammensetzung können transmurale Unterschiede im Verhalten der Kanäle erreicht werden. So können aus einer RNA, durch posttranskriptionelles Verarbeiten, funktionell

verschiedene Proteine gebildet werden (alternatives Spleißen) (Rosati et al 2001, Patel et al 2002). Wie bereits in 5.3 diskutiert, wurden bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen keine Unterschiede in der Kanalkinetik beobachtet. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den in dieser Arbeit gemessenen Veränderungen der K^+ -Ströme um eine unterschiedliche Expression der Kanalanzahl handeln muss.

Es gibt für die Regulation des I_{to} und seine transmurale Differenz unterschiedliche Daten bezüglich den zu Grunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen. Rosati et al (2001) fanden keinerlei Unterschiede bei der Expression von Kv4.3 oder KChIP2 zwischen epikardialen und endokardialen Schichten in ventrikulären Kardiomyozyten von Hunden und Menschen, sondern lediglich einen Gradienten für Kv4.2 und folgerten daraus, dass vor allem Kv4.2 für die Expression des Gradienten verantwortlich ist. Es konnte in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass die Coexpression von β -UE, wie KChIP2, dazu führen, dass mehr Kanäle in der Zellmembran ausgebildet werden sowie die Inaktivierungskinetiken verlangsamt und die Aktivierungskinetiken beschleunigt werden (An et al 2000, Bähring et al 2001, Beck et al 2002, Patel et al 2002).

Andere Arbeiten (Goltz et al 2007) sowie die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Messungen der unterschiedlichen Proteinexpressionen zeigen Gradienten für Kv4.2, Kv4.3 und KChIP2 zwischen epikardialen und endokardialen Zellen der Kontrollen und lassen damit vermuten, dass auch Kv4.3 und KChIP2 die Kanalexpression in Ratten - Kardiomyozyten beeinflussen.

Die in dieser Arbeit gemessene, geringere I_{to} - Stromdichte in der epikardialen Schicht der entlasteten Zellen ist auf molekulargenetischer Ebene mit einer geringeren Ausbildung von α -UE des K^+ - Kanals Kv 4.2 sowie Kv 4.3 verbunden. Die Menge an β -UE KChIP2 - mRNA ist hier nicht verändert (s 4.7 und Abb 29).

Eine reduzierte Menge an Kv4.2-mRNA ist eine typische Beobachtung bei der Untersuchung dieser Kanaluntereinheiten bei Pathologien, die mit einer reduzierten I_{to} -Amplitude in Rattenherzen einhergehen. Dazu gehören kardiale Hypertrophie (bedingt durch Hyperkortisolismus, Abbinden der Aorta, renalen Hypertonus oder auch spontanen Hypertonus der Ratten) (Takimoto et al 1997, Capuano et al 2002, Lebeche et al 2004, Goltz et al 2007), Myokardinfarkt (Huang et al 2001, Kaprielian et al 2002) oder Diabetes mellitus (Qin et al 2001, Nishiyama et al 2001). Bei diesen Experimenten und Tiermodellen war auch die Reduktion von Kv4.3 eine häufige Beobachtung (Lebeche et al 2004, Goltz et al 2007, Capuano et al 2002, Takimoto et al 1997, Huang et al 2001, Qin et al 2001).

Diese Daten machen es sehr wahrscheinlich, dass die Reduktion des I_{to} in epikardialen Myozyten der entlasteten Rattenherzen zumindest zu einem Teil auf eine Veränderung der Genexpressionsmuster der

K⁺-Kanal- α -Untereinheiten Kv4.2 und Kv4.3, jedoch nicht der β -Untereinheiten (KChIP2), zurückzuführen ist.

Auf der anderen Seite sieht es bei den endokardialen Zellen der Kontrollen und auch der entlasteten Herzen anders aus. Obwohl der I_{to} auch in den endokardialen Zellen zu einem vergleichbaren Maße reduziert ist, gibt es keine signifikanten Unterschiede der Mengen von mRNA von Kv 4.2 oder Kv 4.3. (s 4.1, Abb 29). Da die Menge an mRNA dieser Kanäle in den endokardialen Zellen von vorne herein sehr gering ist, könnte es sein, dass der Unterschied zwischen den Kontrollen sowie den entlasteten Myozyten unterhalb der Detektionsgrenze geblieben ist. Es könnte allerdings auch sein, dass die signifikante Reduktion von KChIP2-mRNA in den endokardialen Zellen hauptsächlich für die Veränderungen des I_{to} verantwortlich ist. Interessanterweise könnte nach Rosati et al (2001) der physiologische I_{to} -Gradient zwischen endo- und epikardialen Zellen bei humanen Kardiomyozyten ebenfalls mehr einer unterschiedlichen Expression von KChIP2 zuzuordnen sein, da es dort einen sehr ähnlichen transmuralen Gradienten der Kv4-Kanal- α -UE Kv4.3 und ihrer akzessorischen β -UE KChIP2 gibt. Es wird an dieser Stelle ein regulativer Effekt von KChIP2 vermutet (Rosati et al 2001). Nur sehr wenige Studien haben bisher in pathophysiologischen Tiermodellen die Veränderungen von KChIP2 in Hinblick auf den I_{to} untersucht und sind bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Während das Abbinden der abdominalen Aorta (Jia et al 2006) zu einer starken Reduktion der KChIP2 - mRNA führte, konnte man bei diabetischen Hunden sowie spontan hypertensiven Ratten eine Hochregulierung der mRNA von KChIP2 bei gleichzeitig reduziertem I_{to} vorfinden (Goltz et al 2007; Lengyel et al 2007).

Es gibt außerdem Hinweise durch Arbeiten an Mäusen, dass auch andere akzessorische Kanaluntereinheiten neben KChIP wie zB MiRP1 und Kv1 β sowie KChAP die Stromdichte des $I_{to,f}$ beeinflussen können (Kuryshv et al 2000, Aimond et al 2005, Roepke et al 2008). Die transmembranösen, „minK“-verwandten Proteine bilden die Untereinheiten für den I_{Ks} (minK/KCNE1) und I_{Kr} (MiRP/KCNE2) und beeinflussen durch MiRP1 die Stromdichte des $I_{to,f}$. Es konnte beispielsweise bei Mäusen eine 25%-ige Reduktion des schnellen transienten K⁺-Auswärtsstroms ($I_{to,f}$) durch eine genetische Deletion des KCNE2 Gens (MiRP) bei unveränderter Oberflächenexpression von Kv4.2 erreicht werden (Roepke et al 2008). Es wird auch eine Kopplung der Stromdichte an andere Ionen-Kanäle wie z.B. an den Nav- Kanal diskutiert. So konnte an neonatalen ventrikulären Rattenmyozyten gezeigt werden, dass die Genausschaltung der Nav β 1-Untereinheit (Nav β 1-UE) zu einer gleichzeitigen Reduktion von KChIP2 Expression und $I_{to,f}$ Stromdichte geführt hat (Dechenes et al 2008).

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten:

Auch unter molekulargenetischen Aspekten existieren auffällige Parallelen zwischen den hHTx entlasteten Herzen dieser Arbeit und Pathologien, die durch eine Drucküberbelastung induziert wurden. Nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften der I_{to} -Ströme, sondern auch die

molekulargenetischen Mechanismen, die den I_{to} -Veränderungen zu Grunde liegen verhalten sich sehr ähnlich. Die Kanal α -UE Kv4.2/Kv4.3 sowie die β -UE KChIP2 spielen eine große, reproduzierbare Rolle bei der Veränderung des I_{to} in hypertrophierten und hHTx entlasteten Herzen. Es scheint jedoch noch weitere zu geben, die ebenfalls darauf Einfluss nehmen.

Auch die in der Molekulargenetik gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese einer U-förmigen Beziehung zwischen kardialer Pathologie/Hypertrophie und kardialer Druckentlastung mittels hHTx (s 2.6.1 und 5.3).

5.4.1 Zusammenfassung der Veränderungen an den Kv Kanälen

Zusammengenommen kann man feststellen, dass bei entlasteten Herzen, genau wie auch bei hypertrophierten Herzen, die Veränderungen auf der Transkriptionsebene ihrer molekularen Komponenten zu der Erniedrigung des I_{to} führen, wobei es aber Unterschiede bei den involvierten Transkriptionsmechanismen zwischen epikardialen und endokardialen Zellen und Spezies zu geben scheint. Dass es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um einen unspezifischen Proteinabbau in der Zellmembran handelt, kann man zum einen aus einem nicht veränderten I_{K1} in allen Zellgruppen und zum anderen aus der Reduktion der mRNA - Transkription für die Proteine der I_{to} -Kanaluntereinheiten Kv 4.2, Kv 4.3 in epikardialen Zellen und KChIP2 in endokardialen Zellen ableiten.

Die, in dieser Arbeit festgestellte, völlig unveränderte Kinetik der Aktivierung und der Inaktivierung des I_{to} - Stroms, sowie eine völlig unveränderte Erholung von der Inaktivierung in allen gemessenen Zellgruppen (s 4.4.2, 5.3), bei gleichzeitig reduzierten Strömen des I_{to} und I_{sus} deuten hingegen eher auf eine reduzierte Anzahl von Kanälen, als auf eine Veränderungen der Kanaleigenschaften durch eine veränderte Proteinstruktur hin.

Wann und weshalb eine Veränderung der Stromdichte mehr auf die Veränderungen in der Transkription der α -Untereinheit und wann die Veränderungen mehr auf eine veränderte Expression der β -Untereinheiten zurückzuführen ist, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Man könnte aber vermuten, dass unterschiedliche Stimuli, wie sie z.B. eine Druckentlastung mit einer hHTx oder ein induzierter Hypertonus durch ein Abbinden der abdominalen Aorta, unterschiedliche Signalkaskaden in Gang setzen, die nur die Endstrecke der Veränderungen in der I_{to} - Stromdichte und den Veränderungen der Aktionspotenziale gemeinsam haben. Es werden noch mehr Studien zur Erörterung dieser Frage nötig sein.

5.5 Limitationen /Einschränkungen

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Auswirkungen von kardialer Entlastung eines gesunden Herzens auf die Repolarisation untersucht, ohne die anderen Faktoren, die normalerweise zu einem Herzversagen führen, zu berücksichtigen. In der klinischen Situation werden LVADs implantiert, um zuvor versagenden Herzen zu entlasten. Daher werden noch weiterführende Studien notwendig sein, um zu bestätigen, ob die Effekte, die wir beim Entlasten der gesunden Herzen gemessen haben auch bei Herzen zu beobachten sind, welche sich zunächst im Versagen befanden. Erst dann lässt sich beurteilen ob es, abhängig von dem zugrunde liegenden Krankheitsbild Unterschiede und Veränderungen bezüglich unserer Messungen gibt.

Allerdings sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass mechanische Entlastung von gesunden Rattenherzen erstaunlich ähnliche Ergebnisse hervorbringt, wie die mechanische Entlastung von menschlichen versagenden Herzen. Hier scheint es auf den ersten Blick also sowohl wenige Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies als auch einer zugrunde liegenden Erkrankung zu geben (Doenst et al 2006, Razeghi et al 2006, Razeghi et al 2007). Eine andere wichtige Einschränkung ist, dass es grundlegende Unterschiede bei der kardialen Repolarisation zwischen Ratten- und Menschenherzen gibt. Beim Menschen haben neben dem I_{to} und dem I_{sus} noch andere Kanäle großen Einfluss auf die Länge der APD. Die transmurale Heterogenität der APD beim Menschen ist im Gegensatz zur Ratte zB zusätzlich abhängig von der Offenheit der Na^+ -Kanäle sowie von einer heterogenen Expression der verzögerten Gleichrichterströme I_{Ks} und I_{Kr} (Antzelevitch et al 2002).

Auch wenn diese Einschränkungen keinen Einfluss auf die Hauptfeststellungen und Rückschlüsse haben, die wir aus unserer Studie ziehen, müssen in Zukunft mehr Studien an menschlichen Herzzellen vorgenommen werden, welche die besonderen Veränderungen und Einflüsse einer Entlastung auf die Elektrophysiologie einer menschlichen Herzzelle berücksichtigen, wie z.B. die verzögerten Gleichrichterströme.

Es gibt einige Einschränkungen, die bei der Betrachtung und Interpretation der vorliegenden Ergebnisse mit einbezogen werden müssen. In Abschnitt 5.5.1 werden mögliche experimentelle Einflüsse aufgeführt und diskutiert um im Anschluss in Abschnitt 5.5.2 und 5.5.3 mögliche, aus der Literatur bisher bekannte, physiologische Einflüsse auf die in dieser Arbeit untersuchten Parameter zu diskutieren. In Abschnitt 5.5.4 werden die Unterschiede und Gemeinsamkeiten des in dieser Arbeit verwendeten Tiermodells mit den, bei der Therapie der Herzinsuffizienz genutzten, VADs verglichen.

5.5.1 Experimentelle Einflüsse

In diesen durchgeführten Experimenten sind einige Kompromisse bezüglich der Versuchsumgebung eingegangen worden, die Auswirkungen auf die Messergebnisse haben könnten.

5.5.1.1 Temperatur

Die Versuche sind bei Raumtemperatur zwischen 22° und 25° C durchgeführt worden. Die Nernst-Gleichung bestimmt die Triebkraft der Ionen über die Zellmembran. Diese ist temperaturabhängig. Außerdem sind die Kanäle auch in ihrer Funktion temperaturabhängig. Bei Versuchen bei 37° C haben sich Kardiomyozyten sehr vulnerabel gezeigt und die Ströme waren teilweise zu groß und zu schnell um vernünftige reproduzierbare Messungen zu erhalten. Da es sich hier um einen Vergleich zwischen zwei Zellgruppen handelt, die beide bei der gleichen (geringeren) Temperatur gemessen wurden, gilt es als ein akzeptierter Kompromiss die Messungen bei Raumtemperatur durchzuführen.

5.5.1.2 CdCl₂ in der Badlösung

Cd²⁺ blockiert den L-Typ Ca²⁺-Kanal (Fox et al 1987). Eine wie in diesem Experiment verwendete Konzentration von 300 µM Cd²⁺ führt zu einer effektiven Blockade aller L-Typ Ca²⁺-Kanäle. Dies ist jedoch kein ausschließlich für diesen Kanal spezifischer Blocker. In der vorliegenden Konzentration werden wahrscheinlich auch die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des transienten K⁺ - Auswärtsstroms I_{to} beeinträchtigt (Agus et al 1991). Damit wird bei den voltage-clamp Experimenten wahrscheinlich ein anderer I_{to} gemessen als zum Zeitpunkt der AP- Bestimmung geflossen ist, da dabei kein CdCl₂ verwendet wurde. Außerdem wird der I_{to} in den beiden Versuchsgruppen unterschiedlich stark exprimiert, sodass man davon ausgehen muss, dass es bei druckentlasteten Kardiomyozyten, die den Kanal weniger stark exprimieren, zu einer geringeren relativen Beeinflussung der Messwerte durch das CdCl₂ kommt. Eine mögliche Schlussfolgerung könnte sein, dass es sobald in einer der beiden zu vergleichenden Kardiomyozyten weniger Kv-Kanäle vorliegen relativ zu einer geringeren Blockade dieser Kv-Kanäle kommt. Dadurch könnte der I_{to} in den Kontrollen in Wirklichkeit noch größer sein als gemessen und in den entlasteten Kardiomyozyten noch kleiner oder gleichgeblieben. In diesem Fall wäre der beobachtete Unterschied im I_{to} sogar noch unterschätzt.

5.5.1.3 Stimmulationsfrequenzen

Die APs wurden mit einer Frequenz von 0,3Hz ausgelöst. Dies stellt im Vergleich zu der physiologischen Herzfrequenz der Ratte von ca. 300 Herzaktionen/min einen sehr kleinen Wert dar. Wie bereits zuvor gezeigt werden konnte, hat der I_{to} eine frequenzabhängige Kinetik. Je höher die Frequenz, desto kleiner werden die Zeitkonstanten der Inaktivierung (Shimoni et al 1995), sodass insgesamt ein kleinerer Repolarisationsstrom fließen würde. Dies ist in den endokardialen Schichten ausgeprägter als in den epikardialen. So kommt es, dass die Längen der APs bei höheren Herzfrequenzen (Stimmulationsraten) in den endokardialen Schichten schneller wachsen als in den epikardialen, da hier der I_{to} schneller inaktiviert wird (Shimoni et al 1995, Kocic et al 2003). Aller Wahrscheinlichkeit nach wurden somit die Aktionspotenzialdifferenzen zwischen Epikard und Endokard aufgrund der niedrigeren Stimmulationsfrequenz in diesem Experiment unterschätzt. Die druckentlasteten Kardiomyozyten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, entstammten der gleichen Herzregion wie ihre Kontrollen, sodass die oben beschriebene, transmurale Verfälschung, in dieser Arbeit bei den intramuralen Vergleichen keinen Effekt hätte.

5.5.1.4 Der Einfluss der volatilen Anästhetika

Die Anästhesie für die bei den Versuchen operierten und untersuchten Tiere wurde als Inhalationsnarkose mit volatilen Anästhetika durchgeführt. Volatile Anästhetika haben ausgeprägte Effekte auf das kardiovaskuläre System. Eine solche Anästhesie ist negativ inotrop und negativ chrono- bzw. dromotrop. Daraus resultieren eine Reduktion der Herzfrequenz und zum Teil starke Blutdruckabfälle (Hanley et al 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die negativ inotropen Eigenschaften der Anästhetika vor allem auf eine geringere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und zum anderen auf eine geringere Empfindlichkeit der kontraktilen Elemente auf Ca^{2+} zurückzuführen ist (Hanley et al 1998). Eine Auswirkung auf die K^+ - Kanäle und Ströme ist außerdem wahrscheinlich. Für fast alle volatilen Anästhetika konnte eine dosisabhängige Verlängerung des QT- Intervalls (Michaloudis et al 1996, Michaloudis et al 1998, Güler et al 2001, Karagöz et al 2005) nachgewiesen werden. Außerdem konnte für Kardiomyozyten des Meerschweinchens und des Hundes gezeigt werden, dass diese Veränderungen auf eine Inhibition des I_K - Stroms zurückzuführen ist (Suzuki et al 2000). In ventrikulären Myozyten des Menschen konnte ebenfalls eine Reduktion des I_{to} bei unverändertem I_{sus} unter dem Einfluss von Isofluran

nachgewiesen werden. Diese Effekte waren nach dem Auswaschen der Anästhetika komplett reversibel (Hüneke et al 2001).

Alle, durch volatile Anästhetika verursachten Effekte auf das kardiovaskuläre System, beginnen akut und sistieren nach dem Ende der Zufuhr der Anästhetika schnell wieder. Durch die ausführlichen Waschungen der Herzen in kardiopleger Lösung, sowie vor Beginn der Zellisolation im Langendorf-Apparat ist ein fortbestehender Effekt der Anästhetika auf die Kardiomyozyten unwahrscheinlich.

5.5.2 Endokrine/Parakrine Einflüsse auf Kv4.2/Kv4.3- Kanäle

Es existieren, wie bereits in der Einleitung in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, verschiedene hormonelle Einflüsse auf den I_{to} . So existiert eine Beeinflussung durch Testosteron und Östrogen, durch das Schilddrüsenhormon, durch Angiotensin II, durch eine sympathikoadrenerge Aktivierung von PKC und PKA sowie durch Insulin.

Zusammenfassend betrachtet ist davon auszugehen, dass es wie bei allen Vorgängen in der Zelle eine Vielzahl von beeinflussenden Signalkaskaden und Einflussfaktoren gibt. In dieser Arbeit ging es jedoch darum, Effekte auf Zellgröße und die der Repolarisation zugrunde liegenden Ströme zu identifizieren, die primär durch eine hämodynamische Entlastung bedingt sind. Das kann unabhängig von der genauen Kenntnis dieser Signalkaskaden geschehen, da alle endokrin- vermittelten Einflüsse, sich immer auf beide Herzen, die entlasteten und die nativen Empfängerherzen als Kontrollen, ausgewirkt haben.

5.5.3 Einfluss der cytosolischen Ca^{2+} - Konzentration auf Kv4.2, Kv4.3-Kanäle

Patel et al (2002, 2004). konnten zeigen, dass bestimmte Anteile der Kanalkinetik des Kv4.3- Kanals in Gegenwart von KChIP2 β -UE Ca^{2+} -abhängig sind. Ca^{2+} bindet an die EF-Hand- Abschnitte des KChIP2 und führt an diesen zu einer strukturellen Veränderung, die wahrscheinlich Einfluss auf die Positionierung der β -UE im Kanalkonstrukt hat. Es kann sich hierbei um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln: Stark erhöhtes zytosolisches Ca^{2+} führt demnach zu einer Aktivierung von KChIP2 und darüber zu einer Erhöhung des I_{to} . Ein erhöhter I_{to} trägt wiederum zu einer Verkürzung der APD und damit zu einer Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration bei.

5.6 hHTx -Tiermodell und der Vergleich mit LVAD

Die vorliegende Arbeit versucht mit Hilfe eines Tiermodells und elektrophysiologischen Methoden die Zusammenhänge zwischen den Umbauvorgängen bei kardialer Hypertrophie und druckentlasteten Kardiomyozyten wie z.B. bei Patienten mit LVAD-Therapie besser zu verstehen. Diese Arbeit geht davon aus, dass die Entlastung mittels hHTx ein gutes Modell für die Entlastung von Kardiomyozyten ist. Wie gut sich im Tiermodell gewonnene Ergebnisse auf die LVAD-Therapie übertragen lassen, wird allerdings kontrovers diskutiert.

Kritiker bemängeln bei der hHTx von gesunden Herzen, dass durch die unterschiedlichen Ausgangssituationen vor der Entlastung, bei hypertrophierten, kranken Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen andere Mechanismen und Signalwege aktiviert werden könnten. Außerdem könnten Herzen unterschiedlicher Spezies ebenso verschieden auf die Entlastung reagieren. Dennoch scheint es Umbauvorgänge am Herzen zu geben, die durch mechanische Druckentlastung initiiert werden, die unabhängig von der Ausgangssituation sind (Doenst et al 2006). Es war ein Ziel der Arbeit vor allem die, durch hämodynamische Entlastung eines gesunden Herzens hervorgerufenen Veränderungen, zu identifizieren. Dafür war es unerlässlich gesunde Rattenherzen zu entlasten um mögliche Einflüsse durch eine Grunderkrankung bzw die auslösenden Faktoren einer vorangegangenen Hypertrophie zu vermeiden. Es wird nun der Vergleich zu Studien über VAD-entlastete Herzen getätigt um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse, die primären Veränderungen bei hämodynamischer Druckentlastung widerspiegeln.

5.6.1 hHTx vs. LVAD-Therapie: Phänotypische Unterschiede

Bei der Therapie von hypertrophierten, insuffizienten Herzen mittels LVADs kommt es zu einer Reduktion der Herzmasse und der zellulären Hypertrophie, woraufhin wieder nahezu physiologische Ausmaße erreicht werden (Zeiferidis et al 1998, Terracciano et al 2003). Auch bei einem Tiermodell kommt es zur Reduktion der Herzmasse und Zellgröße (Nourani et al 2001, Oriyanhan et al 2007). Allerdings kommt es hier durch eine andere Ausgangssituation (normales, gesundes Herz) letztendlich zu einer Atrophie. Zusammen genommen lässt sich behaupten, dass die Reduktion von Vor- und Nachlast zu einer Abnahme der kardialen Masse führt.

Wie in 2.4.5 bereits beschrieben, hypertrophierten Herzen durch eine erhöhte Arbeitsanforderung. Unterschiedliche Faktoren machen die Herzarbeit aus. Dazu gehören die Vor- und Nachlast, die Herzfrequenz und die Kontraktilität.

Alle diese Faktoren hängen eng mit neuroendokrinen Stimuli und der vegetativen Innervation zusammen. Katecholamine steigern als Effektoren des vegetativen Nervensystems die Nachlast, die Kontraktionskraft und die Herzfrequenz. Daher führt eine chronische Steigerung von Katecholaminen auch zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten (Simpson et al 1985). Auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) hat einen Einfluss auf die Herzarbeit und die Hypertrophie. Zum einen führt eine Aktivierung des Systems zu einer Erhöhung der Vor- und Nachlast, aber auch eine gesteigerte Menge an Angiotensin II verursacht, über einen direkten Mechanismus, eine Hypertrophie der Kardiomyozyten (Lee und Lindpaintner 1993). Interessanterweise konnte an spontan hypertensiven Ratten gezeigt werden, dass durch eine pharmakologische Intervention mit Captopril, einem ACE - Hemmer und damit einem Antagonisten des RAAS, zum einen der Bluthochdruck und die Herzhypertrophie gesenkt, zum anderen aber auch die Reduktion von Kv4.2 und Kv4.3 verhindert wird. Auch an dieser Stelle zeigt sich eine interessante Verbindung zwischen Hypertrophie und der dem I_{to} zu Grunde liegenden α -UE (Takimoto et al 1997).

Betrachtet man nun das hHTx Modell der Entlastungstherapie stellt sich die Frage inwiefern die Denervierung durch die Transplantation und die daraus folgende Reduktion der *parakrinen* Effekte des vegetativen Nervensystems einen Einfluss auf die Reduktion der Zellgröße und Herzmasse haben. Die Herzfrequenz der transplantierten Herzen sank in den in Narkose durchgeführten Versuchen um beinahe 50 % (4.2). Es könnte also argumentiert werden, dass diese Reduktion der Herzfrequenz hauptsächlich durch die fehlende Innervation des Transplantat-Herzens zu Stande gekommen ist und dass die damit reduzierte Herzarbeit einen großen Einfluss auf die Reduktion der Zellgröße hat. Dagegen sprechen zwei Dinge:

Zum einen konnte gezeigt werden, dass bei hHTx transplantierten Herzen eine gesteigerte *endokrine* Sympathikusaktivität, durch erhöhte Katecholaminspiegel im Blut, keinen Einfluss auf die Reduktion der Zellgröße des transplantierten Herzens haben, jedoch eine Hypertrophie des nativen Empfängerherzens bewirken. Die Hypertrophie des nativen Herzens wird in diesem Modell wahrscheinlich durch den mechanischen Stress einer katecholamininduzierten Erhöhung der kardialen Nachlast bewirkt, die sich durch die Entlastung nicht auf das transplantierte Herz auswirken würde (Petrie et al 1994). Zum anderen zeigt sich bei einer besonderen Form der hHTx bei der weiterhin eine gewisse Vor- und Nachlast erhalten bleibt, dass es trotz Denervierung zu nahezu keiner Atrophie kommt. Beide Beobachtungen deuten demnach mehr auf eine mechanische als auf eine parakrine Induktion der Hypertrophie bzw. Atrophie hin (Galinares et al 1994). Außerdem handelte es sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Herzfrequenz um echokardiographische Untersuchungen in Inhalationsnarkose. In bisher unveröffentlichten Telemetriemessungen des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zeigte sich, dass der Unterschied der Herzfrequenzen zwischen nativem Herz und Transplantat beim nicht narkotisierten Tier deutlich geringer ausfällt. Die reine Denervierung ohne Entlastung hat also nur einen geringen Einfluss auf die Größe der

Kardiomyozyten. Daher ist damit zu rechnen, dass der ausbleibende parakrine Einfluss nicht den Hauptteil zur Reduktion der Zellgröße beiträgt.

Bei der Implantation eines LVADs kommt es zu keiner Denervierung des Herzens. Die verbesserte Durchblutung führt außerdem zu einer Reduktion des RAAS und zu einer Senkung der Sympathikusaktivität (Dipla et al 1998). Darüber hinaus sind einige der herzinsuffizienten Patienten mit einer medikamentösen β -Blockade gegenüber sympathischen Einflüssen geschützt. Wie groß der Einfluss der reduzierten Sympathikusaktivität auf die Zellgröße ist, kann also nicht sicher gesagt werden. Dass es sich hierbei um einen alleinstehenden Effekt handelt, ist aber ebenso unwahrscheinlich (s.o.) (Klein et al 1991, Petrie et al 1994).

5.6.2 hHTx vs. LVAD-Therapie: Elektrophysiologische Unterschiede

Herzinsuffizienz ist häufig von ventrikulären Arrhythmien begleitet. Man geht davon aus, dass die Ursache für diese Prädisposition in den elektrophysiologischen Veränderungen, die eine kardiale Hypertrophie begleiten, zu finden ist. Harding et al (2001) und Volk et al (2000) gehen davon aus, dass die Ursache dafür bei Patienten mit LVAD (Harding et al 2001) und im Tiermodell (Volk et al 2000) in der Verlängerung der APD liegt. Eine solche Verlängerung der APs spiegelt sich in verlängerten QT-Intervallen im Oberflächen - EKG wider. Die APD ist wiederum stark abhängig von den Repolarisationsströmen und damit auch vom I_{to} (s 2.3.7, 2.4).

Welche Rolle die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle bei der Entwicklung solcher Arrhythmien spielen können, zeigt sich bei der Betrachtung der genetischen Formen des Long-QT-Syndroms (LQTS). Mutationen in den zugrunde liegenden Genen für die α - und β -UE (z.B. KvLQT1, minK, hERG) werden als ursächlich für die unterschiedlichen Varianten des LQTS angesehen (Sanguinetti et al 1995, Wang et al 1996, Shieh et al 2000, Nerbonne und Guo 2002). Die transmuralen Längenunterschiede der APs bilden zum einen die Grundlage für den komplizierten Ablauf der Depolarisation und Repolarisation des Myokards, zum anderen kann jede Verstärkung dieses Unterschieds die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass Extrasystolen wieder auf erregbares Myokard treffen und damit eine Reentry-Tachykardie auslösen. Vielleicht ist es aber auch die transmurale Heterogenität der APD, die durch die Veränderungen bei Belastung und Entlastung noch verstärkt wird und die dadurch die Prädisposition für ventrikuläre (Reentry-)Arrhythmien erklären kann (Wettwer et al 1994, Nabauer et al 1996, Bryant et al 1999, Nerbonne und Weinong 2002). Dass dieser Effekt nicht nur auf druckbelastete Kardiomyozyten zutrifft, zeigen neben den Daten dieser Arbeit auch Arbeiten, die eine Zunahme der QT - Intervalle im Oberflächen-EKG nach Implantation der LVADs und damit auch eine Zunahme der arrhythmischen Komplikationen beschreiben (Harding et al 2001, Harding et al 2005, Kawabata et al 2008).

Die Daten der 6. INTERMACS Studie (Kirklin et al 2014) zeigen, dass es im 1. Monat nach VAD-Implantation ein ca. 10-fach erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien gibt. Diskutiert werden als Ursachen dafür neben einer kardialen Fibrosierung auch mechanische Probleme wie ein Ansaugen der intrakardialen Kanüle und ein elektrophysiologisches Remodeling mit Verlängerung der QT-Intervalle (Pedrotty et al 2013). Wie es dazu kommt, dass sich nach Wochen und Monaten die QT - Intervalle wieder normalisieren ist unklar. Jedoch scheint es, als sei diese Normalisierung ein wichtiger Teil des Erfolges der VAD-Therapie (Harding et al 2005). Ob es bei den hHTx entlasteten Zellen, die zunächst auch eine Verlängerung der APD zeigen, im Verlauf auch zu einer Normalisierung kommen würde, ist nicht untersucht worden.

Dass es in beiden Fällen zu ähnlichen elektrophysiologischen Veränderungen kommt, könnte ein Hinweis dafür sein, dass APD - Verlängerungen, unabhängig von der Spezies und der kardialen Vorgeschichte zu den primären, durch hämodynamische Entlastung herbeigeführten, Veränderungen zählen. Die Veränderungen des I_{to} sind bisher nicht an Kardiomyozyten nach LVAD - Implantation untersucht worden. Somit lässt sich über Parallelen nur mutmaßen. Dass dem Unterschied in der APD eine Reduktion des I_{to} zu Grunde liegt, kann also bisher nur sicher für hHTx entlastete Herzen behauptet werden.

5.7 Zusammenhänge zwischen dem I_{to} und der Ca^{2+} -Calcineurin Signalkaskade bei der myokardialen Stressantwort.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stärken unter anderem die Hypothese, dass die Reduktion des I_{to} und die Verlängerung der APD Teil einer gemeinsamen Endstrecke einer Antwortreaktion der Kardiomyozyte auf mechanischen Stress darstellt, auch wenn diesen Prozessen gegensätzliche Stimuli vorausgehen (s 5.3). Im folgenden Abschnitt sollen diese neuen Erkenntnisse und die mögliche Rolle des I_{to} bzw. die Veränderung der APD in den intrazellulären Signalkaskaden bei der Entstehung der Atrophie bzw. Hypertrophie diskutiert werden.

Die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von kardialen Pathologien und bei deren Kompensation. Die Stärke der Kontraktilität hängt z.B. eng mit der intrazellulären Menge an Ca^{2+} zusammen (Klinke et al 2010), was unter dem Aspekt eines erhöhten Bedarfs an Inotropie bei erhöhter Herzarbeit sinnvoll erscheint. Es konnte im Rattentiermodell für die Größe und Länge von Aktionspotenzialen an kardialen Myozyten ein direkter Zusammenhang zu größeren transmembranösen Ca^{2+} -Strömen gezeigt werden. In ventrikulären, kardialen Myozyten der Ratte hat die Dauer und Form des Aktionspotenzials einen wichtigen Einfluss auf die Größe des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Volk et al 2004).

Bisherige Untersuchungen, die den L-Typ Ca^{2+} -Kanal betreffen, haben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Veränderung des Kanals bei Hypertrophie durch chronische Belastung hervorgebracht. Linksventrikuläre Hypertrophie durch ein Abschnüren der thorakalen Aorta mit einem Band (Wang et al 2001), durch renovaskulären Hypertonus (Keung 1989) oder rechtsventrikuläre Hypertrophie aufgrund eines erhöhten pulmonal-vaskulären Widerstandes (Lee et al 1997) werden mit einer Erhöhung der Stromdichte von $I_{Ca,L}$ assoziiert. Allerdings haben weder die erhöhte Zufuhr von Katecholaminen (Bryant et al 1999) noch die Aorta- ascendens-Stenose (Volk et al 2002) einen messbaren Einfluss auf die Ca^{2+} -Ströme. Schwere Hypertrophie und Herzversagen haben dagegen eher verringerte Ca^{2+} -Ströme in den Myozyten zur Folge (Tomaselli und Marban 1999).

Viele Autoren bringen die Entwicklung der kardialen Hypertrophie eng mit einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von Calcineurin in Verbindung (Gong et al 2006, Liu et al 2010, Bernado et al 2010, Dong et al 2010). Dass die Gabe eines Calcineurin-Inhibitors (Cyclosporin A) dazu geführt hat, die Hypertrophie zu vermeiden, lässt vermuten dass Calcineurin eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der kardialen Hypertrophie einnimmt (Wang et al 2001). Wahrscheinlicher ist, im Hinblick auf die Masse an Daten, die einen Einfluss auf den I_{to} belegt, der Erklärungsansatz von Kassiri et al (2003), der zwar Calcineurin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Hypertrophie zuschreibt, jedoch die Aktivierung der Calcineurin-Kaskade auf eine Reduktion des I_{to} zurückführt. Durch die Reduktion der repolarisierenden Ströme

kommt es zu einer Verlängerung der APD und damit einer Erhöhung des Ca^{2+} Einstroms. Einen Überblick über einen möglichen Zusammenhang gibt Abbildung 32. Ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme könnte sein, dass ein Kv4.2 negatives, transgenes Mausmodell dazu geführt hat, dass der I_{to} nicht nur komplett ausgeschaltet wurde, sondern es zusätzlich zu einer Zunahme der APD und zur Ausbildung von phänotypischen Hypertrophie- und Herzinsuffizienzzeichen, wie Zunahme der Zellgröße, Dilatation der Herzhöhlen und interstitieller Fibrose kam.

Abbildung 32 Calcineurin und Hypertrophie

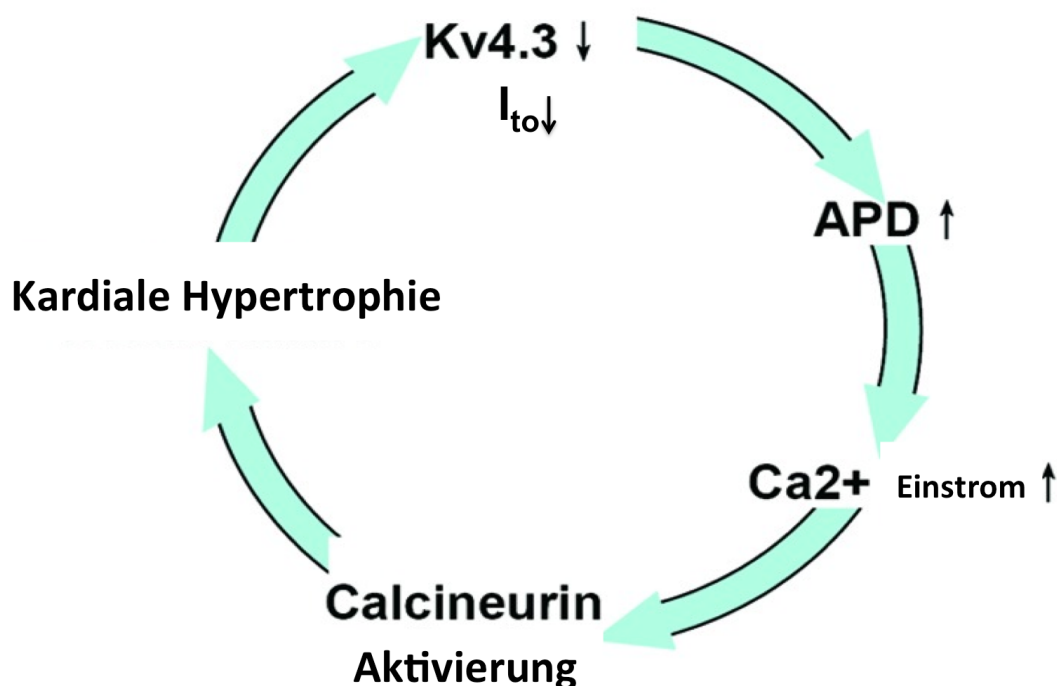


Abb 32 (Modifiziert nach Huo et al 2014): Dieser Kreislauf zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Reduktion des I_{to} , einer Verlängerung der APD und einer vermehrten Calcineurin-Aktivierung durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom welche zur einer kardialen Hypertrophie führen.

Die Einflüsse auf den Ca^{2+} -Haushalt der entlasteten Zellen sind hingegen größtenteils noch unbekannt. Erste Hinweise könnten erhöht gemessene I_{Ca} -Ströme bei Patienten mit LVAD-Unterstützung sein (Terracciano et al 2003). Die in dieser Arbeit gemessenen, verlängerten Aktionspotenziale stützen diese Beobachtungen, da man bei einer vergrößerten APD von einem vergrößerten und verlängerten Ca^{2+} -Strom ausgehen würde. Das wiederum wirft die Frage auf wozu eine druckentlastete, ventrikuläre Myozyte diese erhöhten Ca^{2+} -Einstrome braucht. Ein Erklärungsansatz könnte die Rolle von Calcineurin bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie und möglicherweise auch Atrophie sein.

Eine der Hypothesen dieser Arbeit ist es, dass die Reduktion des I_{to} und die Verlängerung der APD, genauso wie die metabolischen Veränderungen im Sinne einer U-förmigen Beziehung die gemeinsame Endstrecke eines kardialen Kompensations- bzw. Antwortmechanismus auf Stress darstellt. Die meisten Studien zeigen eine Verlängerung des APD sowie eine Reduktion des I_{to} in Folge einer kardialen Hypertrophie (Cerbai et al 1994, Tomita et al 1994, Tomaselli et al 1999, Volk et al 2001, Lebeche et al 2004). Es gibt allerdings auch hier widersprüchliche Daten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es bei kardialer Hypertrophie neben der Reduktion des I_{to} auch zu einer Steigerung der L-Typ Ca^{2+} - Ströme kommen kann (Wang et al 2001, Bodi et al 2003).

Darüber hinaus muss einschränkend erwähnt werden, dass bei ventrikulären Kardiomyozyten von Menschen eine Reduktion des I_{to} über die Reduktion von Kv4.3 nur einen geringen Einfluss auf die Länge der APD und damit wahrscheinlich auch nur einen geringen Einfluss auf die Menge des intrazellulären Ca^{2+} hat. In neueren Arbeiten wurde nun ein Zusammenhang zwischen der Expression von Kv4.3 und einer Hemmung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMkII) sowie der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz postuliert. Die CaMkII ist bei einer Reihe von kardialen Pathologien beteiligt und ist auf der einen Seite an der Induktion von Apoptose und auf der anderen Seite über die Aktivierung von Calcineurin an der Entstehung von Hypertrophie beteiligt (Dong et al 2010, Li et al 2012, Huo et al 2014). Huo et al fanden heraus, dass Kv4.3 einen inhibierenden Einfluss auf die CaMkII hat, was einen potenziellen kardioprotektiven Effekt darstellen würde (Huo et al 2014).

Es sind also weiterführende Untersuchungen und Messungen der transmembranösen Ca^{2+} -Ströme über z.B. L-Typ Ca^{2+} - Kanäle und vor allem auch der wirklichen intrazellulären Ca^{2+} - Konzentrationen sowie Untersuchungen des Calcineurins in kardialer Hypertrophie und Atrophie notwendig, um mehr Einblicke in den Ca^{2+} - Haushalt von druckentlasteten Kardiomyozyten zu erhalten. Dass Veränderungen des I_{to} bei den Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden eine wichtige Rolle spielen könnten, ist in Anbetracht der in dieser Arbeit erhobenen Daten und der hier aufgeführten Quellen als wahrscheinlich anzusehen.

5.8 Implikationen / Erkenntnisse für die VAD Therapie

In dieser Arbeit und auch in Arbeiten anderer Autoren wurde gezeigt, dass die gegensätzlichen Belastungen eines Herzens bei Hypertrophie und kardialer Entlastungstherapie mit ähnlichen zellulären Umbauprozessen einhergehen könnte (Kolar et al 1995, Depre et al 1998, Doenst et al 2001, Razeghi et al 2003, Ito et al 2003). Kardiale Atrophie und auch kardiale Hypertrophie induzieren sowohl ein fetales Genmuster (Depre et al 1998) und eine Verschiebung hin zu einem fetalem Energieverbrauch (Kolar et al

1995, Ito et al 2003), als auch sehr ähnliche Veränderungen für die kardiale Repolarisation. Letzteres konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden.

Wie in 5.6.2 zu lesen ist, prädisponiert die Implantation eines VAD häufig für ventrikuläre Arrhythmien. Daher kann man vermuten, dass obwohl die Reexpression von fetalen Genmustern die kardiale Funktion verbessern und das Herz vor einem programmierten Zelltod schützen kann (Rajabi et al 2007), es möglicherweise auch einen gefährlichen Nachteil dieser Umbauvorgänge gibt, nämlich die Entwicklung von potenziell tödlichen Rhythmusstörungen. Möglicherweise lassen sich diese potenziellen Nebenwirkungen effektiv pharmakologisch antagonisieren. Die Heterogenität der Kanalverteilung in allen Schichten des Myokards macht es zumindest theoretisch möglich, durch gezielte Blockade bestimmter K^+ -Kanäle, die im Epikard, Endokard oder den Schichten dazwischen (M-Zellen) vorrangig für die Repolarisation verantwortlich sind, eine Reduktion der Aktionspotenzialdifferenzen über alle Wandschichten zu erreichen. Damit ließe sich unter Umständen die Anfälligkeit für Arrhythmien reduzieren. Allerdings gelten pharmakologische K^+ -Kanalblockaden therapeutisch als problematisch, da sie auf der einen Seite bestimmte Arrhythmien therapieren gleichzeitig jedoch neue induzieren (Nerbonne und Guo 2002).

Ein weiterer pharmakologischer Therapieansatz könnte die Behandlung mit Schilddrüsenhormonanaloge sein. Ratten, die nach einem Infarkt mit dem Schilddrüsenanalogon DITPA (3,5-Dijodothyropropionsäure) behandelt wurden, zeigten eine nahezu komplette Wiederherstellung der I_{to} - Stromdichten und eine Erhöhung der Expression von Kv4.2 (Wickenden et al 2000). Und auch eine Therapie mit Cyclosporin A, einem Antagonisten von Calcineurin zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Umkehrung einer vorherigen I_{to} - Reduktion im Tiermodell (Deng et al 2001). Diese Erkenntnisse sind auch im Hinblick auf die von Huo et al aufgestellte Theorie interessant, dass eine Erhöhung der Expression von Kv4.3 einen protektiven Effekt auf das Myokard durch Inaktivierung von der CaMKII haben könnte (Huo et al 2014).

Auch die Dauer der Entlastung scheint nicht irrelevant zu sein. Am hHTx-Tiermodell mit bereits insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass sich positive Auswirkungen auf das Myokard vor allem in den ersten 2-3 Wochen manifestieren. Bei einer hämodynamischen Entlastung über diesen Zeitraum hinaus, kam es auch hier zu einer erneuten Verschlechterung der Kardiomyozytenfunktion, vor allem der diastolischen Parameter, aufgrund der Zunahme von Fibrosierung (Oriyanhan et al 2007).

In neueren Arbeiten wie von Pedrotty et al (2013) werden vor allem 3 Dinge für die Entstehung von Arrhythmien nach Implantation von VADs verantwortlich gemacht. Mechanische Probleme wie das Ansaugen der intrakardialen Kanüle, sogenannte „Suction-Events“, ein fibrotischer Umbau des kardialen

Gewebes sowie ein elektrisches Remodeling welches sich klinisch vor allem durch eine Verlängerung der QT-Intervalle zeigt.

Die Daten dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Entlastung *per se* eine Verlängerung der APD verursachen kann (s 5.2). APD-Verlängerungen prädisponieren wiederum für ventrikuläre Arrhythmien und zeigen sich klinisch am Patienten und experimentell im Tierversuch durch QT-Zeit-Verlängerungen (Harding et al 2001, Volk et al 2002). Man kann anhand dieser Erkenntnisse die Hypothese aufstellen, dass es eine Abhängigkeit geben könnte zwischen der Größe der APD-Verlängerung und dem Grad der mechanischen Entlastung, die man mit einem LVAD erzeugt. Auch im Hinblick auf die „Suction-Events“, die durch eine relativ zu hohe Förderleistung der Pumpe begünstigt werden, könnten eine relative Reduktion und genaue Anpassung der mechanischen Entlastung helfen, die Arrhythmien bei den LVAD Patienten zu reduzieren. Um diese Hypothese zu bestätigen oder zu falsifizieren sind weitere Studien nötig, die unterschiedliche Grade der mechanischen Entlastung im Hinblick auf Veränderungen in der APD und den QT-Intervallen untersuchen. In einigen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Implantation von VADs auch zur langfristigen Therapie und Wiederherstellung der eigenen Pumpfunktion genutzt werden können (Birks et al 2003, Birks et al 2011). Dies könnte ein neuer Ansatz der VAD - Therapie sein: „bridge to recovery“- eine Überbrückung bis zur Erholung. In Ergänzung zu „bridge to transplant“ und „bridge to destination“ (s.o.). Auch wenn diese Ergebnisse nicht unumstritten sind, könnte eine elektive, frühere Implantation eines solchen Unterstützungssystems in Zukunft fester Bestandteil einer Herzinsuffizienztherapie werden. Schon heute ist aufgrund der guten Überlebenszahlen, des relativ niedrigen perioperativen Risikos und der ausgezeichneten Verfügbarkeit die Implantation solcher mechanischen Unterstützungssysteme der de-facto Goldstandard der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz. Aktuelle Daten aus dem Jahr 2014 zeigen, dass sich, gemessen am gesamten Patientenkollektiv, ca. 1% aller VAD - Patienten im Verlauf der ersten 24 Monate erholen, wobei ca. 22% verstarben und 3% eine Transplantation erhielten (Kirklin et al 2014). Mit der Einführung der 2. Generation von Unterstützungssystemen, die anstelle eines pulsatilen Flusses einen kontinuierlichen Fluss erzeugen (wie z.B. das Heartmate II von Thoratec® (Abb 5)), konnten die Überlebensraten und Zeiten nach VAD-Implantation gegenüber den Geräten der 1. Generation noch einmal deutlich verbessert werden. Die 1-Jahres-Überlebensrate nach der Implantation eines Herzunterstützungssystems ist mittlerweile besser als die einer Herztransplantation. Der Gewinn an Lebensqualität für die Patienten mit LVAD ist mit der von herztransplantierten Patienten zu vergleichen (Kirklin et al 2014; Tschöpe et al 2015; ISHLT.org 2015). Die neueste Generation von VAD-Geräten, wie z.B. das Heartware® HVAD®, können mittlerweile auch ohne Sternotomie und extrakorporaler Zirkulation - „off-pump“ - implantiert werden (Riebandt et al 2014, Rojas et al 2015). Dies führt unter anderem dazu, dass der Eingriff deutlich besser toleriert wird als beispielsweise eine HTX.

Sollte es in Zukunft gelingen die Patienten von vornherein ausreichend zu evaluieren und perioperative Risiken, wie die hohe Anfälligkeit für ventrikuläre Arrhythmien, in den ersten Wochen nach Implantation z.B. durch eine bessere Kontrolle der Pumpenleistung zu kontrollieren oder gar zu eliminieren, könnte vielen Patienten mit Herzinsuffizienz zu mehr Lebensqualität und einem längeren Überleben verholfen werden. Diskutiert wurden bisher operative Maßnahmen zur Verminderung des Ansaugens der intrakardialen Kanüle sowie prophylaktische ICD-Implantationen (Shirazi et al 2013, Pedrotty et al 2013).

Die Anpassungsfähigkeit des Herzens ist ebenso beeindruckend wie wichtig. Sie ermöglicht ein Überleben des Organismus unter den unterschiedlichsten Anforderungen. Viele Herzerkrankungen führen im Rahmen dieser Anpassungsfähigkeit zu einer Herzhypertrophie, zu elektrophysiologischen Veränderungen der Repolarisation sowie einer Genexpression, die einem fetalen Muster ähnelt. Diese Veränderungen werden in der Literatur häufig als kardiales Remodeling zusammengefasst. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Remodeling trotz initialer Verbesserungen langfristig zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führt und maligne Herzrhythmusstörungen (HRST) begünstigen kann. Die Therapie der terminalen Herzinsuffizienz durch eine mechanische, kardiale Entlastung mit ventrikulären Unterstützungssystemen (VADs) gewinnt zunehmend an Bedeutung. Eine deutlich bessere Verfügbarkeit der Systeme als Spenderorgane und eine Verbesserung der Lebensqualität führen zu einer stetigen Zunahme der implantierten Systeme. Auch die kardiale Entlastung durch VADs führt zu einem kardialen Remodeling. Dieses scheint in der fetalen Genexpression und in der Umstellung des Metabolismus dem Remodeling von Herzinsuffizienz/Herzhypertrophie zu ähneln, obwohl gegensätzliche mechanische Stimuli vorliegen. Über die elektrophysiologischen Folgen einer solchen Entlastung ist bisher noch wenig bekannt. Eine der am häufigsten auftretenden Komplikationen im Verlauf der VAD-Therapie stellt das Auftreten von malignen HRST dar. Ein vermehrtes Auftreten von HRST mit QT-Zeit-Verlängerungen legt eine Verlängerung der Aktionspotenzialdauern (APD) und eine Reduktion der zur kardialen Repolarisation beitragenden K^+ -Ströme, wie dem I_{to} nahe. Dieser Zusammenhang ist bereits bei drucküberbelasteten, hypertrophierten Herzen bekannt. Daraus begründet sich die Hypothese dieser Arbeit, dass eine Druckentlastung die gleichen elektrophysiologischen Veränderungen der Aktionspotenzialdauern und der ihr zugrunde liegenden repolarisierenden Ionenströme induziert, wie eine Drucküberbelastung. Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe einer Ganzzellaufzeichnung, der Patch-Clamp-Technik, Änderungen der ventrikulären Aktionspotenziale und deren zugrunde liegender K^+ -Ströme, bei Druckentlastung an einem Tiermodell. Herzen von männlichen Lewis Ratten wurden einer zweiwöchigen Entlastungstherapie mittels heterotoper Herztransplantation (hHTx) ausgesetzt und anschließend mit den nativen Herzen der Empfängertiere verglichen. Die Ausbildung einer kardialen Atrophie wurde zunächst durch eine echokardiographische in vivo Untersuchung und anschließend durch die Messung der Zellkapazität im Patch-Clamp-Versuch verifiziert. Nach einer enzymatischen Zellisolation wurden linksventrikuläre Kardiomyozyten in eine endokardiale und eine epikardiale Gruppe, jeweils für die hHTx-entlasteten Zellen sowie für die Kontrollen, unterteilt. Es konnte mit der Patch-Clamp-Technik gezeigt werden, dass es nach der zweiwöchigen Entlastung bei epikardialen und endokardialen Zellen zu einer Abnahme der Zellgröße, zu einer Verlängerung der APD und zu einer Reduktion der repolarisierenden Ströme I_{to} und I_{sus} bei unveränderter Kanalkinetik kommt. Die unveränderte Kinetik sowie die von einer assoziierten Arbeitsgruppe gemessene Reduktion der Expression der Ionenkanalproteine des I_{to} deuten auf eine reduzierte Kanalanzahl als Ursache für die

Reduktion der Ströme hin. Im Gegensatz hierzu fanden sich keine Änderungen im I_{K1} . Zusammengefasst spiegeln diese Ergebnisse die Untersuchungen von Tiermodellen mit kardialer Hypertrophie sowie Untersuchungen von humanen, insuffizienten Herzen wider. Die Hypothese dieser Arbeit, dass eine Entlastung der Herzen das gleiche elektrophysiologische Remodeling induziert wie es in hypertrophierten Herzen zu finden ist, konnte damit bestätigt werden. Die beobachteten Änderungen in der zellulären Elektrophysiologie könnten ursächlich für die bei LVAD Patienten vermehrt auftretenden HRST sein.

A	Ampère
A.	Arterie
Aa.	Arteriae
Abb	Abbildung
Abkürzung	Bedeutung
Ag	Argentum (Silber).
AHA	American Heart Association
AP	Aktionspotenzial
APD	Aktionspotenzialdauer
AsODN	Antisense- Oligonukleotide
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosin-Triphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikulärer Knoten
AVP	Arginin-Vasopressin
Ba²⁺	Barium-Ion
BaCl₂	Bariumchlorid
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute).
BTC	Bridge to Candidacy
BTD	Bridge to Destination
BTR	Bridge to Recovery
BTT	Bridge to Transplantation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca²⁺	Calcium-Ion
CABG	Koronarbypassoperation
CaCl₂	Calciumchlorid
CaMkII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CCD	charged coupled device
Cd²⁺	Cadmium-Ion
CdCl₂	Cadmiumchlorid
Cl⁻	Chlorid-Ion
C_m	Zellkapazität
cm	Zentimeter
CMP	Kardiomyopathie
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie
d	Tag
DIPTA	3,5-Dijodothyropropionsäure
Dr.	Doktor
e	Eulersche Zahl
E_c	Kommandospannung
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether). - N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm

E_m	Membranpotenzial
ESC	European Society of Cardiology
et al	Lat.: et alii (m) et aliae(f)= und andere
F	Farad
G	Gauge
G	Gray
GΩ	gigaOhm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) - ethansulfonsäure
HERG	human Ether-a-go-go Related Gene (α-Untereinheit des Ikr)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
hHTx	heterotopische Herztransplantation
HI	Herzinsuffizienz
HIV	human immunodeficiency virus
HMV	Herzminutenvolumen
HTx	Herztransplantation
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
I_{Ca,L}	Langsamer Ca ²⁺ -Einwärtsstrom
I_{K1}	K ⁺ -Einwärtsgleichrichterstrom
I_{Na+}	Schneller Na ⁺ -Einwärtsstrom
I_{SUS}	verzögerter K ⁺ -Auswärtsstrom
I_{to}	Transienter K ⁺ -Auswärtsstrom
ICD	implantierter Kardioverter/Defibrillator
IE	Internationale Einheiten
I_K	Verzögerter K ⁺ Gleichrichterstrom
INTERMACS	Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support
K⁺	Kalium-Ion
K2P	2-Poren-K ⁺ -Kanäle
K_{Ca}-Kanäle	Ca ²⁺ -aktivierte K ⁺ -Kanäle
KChIPs	Kv-Kanal-interagierende Proteine
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
kHz	kiloHertz
Kir-Kanäle	einwärtsgleichrichter K ⁺ -Kanäle
KOH	Kaliumhydroxid
Kv-Kanäle	spannungsgesteuerte K ⁺ kanäle
KvLQT	α- Untereinheit des IKs
l	Liter
LA	linker Vorhof
LQTS	Long-QT-Syndrom
LV	linke Ventrikel
LVAD	Left Ventricular Assist Device

LVM	linksventrikuläre Masse
m	Meter
MCS	Mechanical circulatory support
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesium-Ion
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MHC	schwere Myosinketten
min	Minuten
minK	minimal Potassium-channel β -Untereinheit des Iks
Mio.	Million
MiRP	Mink-related Peptide; β -Untereinheit des IKr
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mrd.	Milliarden
mRNA	messenger Ribonukleinsäuren
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
Na⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Nariumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	Neuronale Calcium Sensoren
NYHA	New York Heart Association
o.g.	oben genannt
O₂	Sauerstoff
OP-AMP	Differentialverstärker
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pA	PikoAmpère
PCI	Perkutane Koronarintervention
PD	Privatdozent
pF	PikoFarad
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
QCa²⁺	Größe des Ca ²⁺ -Einstroms
RA	rechter Vorhof
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REC	recovery from inactivation
R_f	Rückkopplungswiderstand
R_{ges}	Gesamtwiderstand
R_m	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotenzial
R_{Pip}	Pipettenwiderstand
R_s	Serienwiderstand
RT-PCR	real time- polymerase Kettenreaktion

RV	rechte Ventrikel
s	Sekunden
s.	siehe
SAS	Sympathiko-Adrenerges-System
SEM	Standard error of the mean
Tab	Tabelle
TBC	Tuberkulose
TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UE	Untereinheit
USA	United States of America
V	Volt
V.	Vena
VAD	Ventricular Assist Device
V_m	Membranpotenzial
V_{Pip}	Kommandospannung
V_s	die an R _s abfallende Spannung
Vv.	Venae
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
τ	Inaktivierungskonstante Tau
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
2D	2-Dimensional

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kardiale Plastizität.....	7
Abbildung 2 Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz	12
Abbildung 3 Therapiestufen bei Herzinsuffizienz nach ESC 2012.....	15
Abbildung 4 Ventricular Assist Devices (VADs)	16
Abbildung 5 Entwicklung der Ejektionsfraktion nach Explantation des VADs nach Birks	18
Abbildung 6 Oberflächen-EKG und Aktionspotenziale.....	23
Abbildung 7 AP-Phasen und zugrundeliegende Ströme	26
Abbildung 8 Transmembranöser Aufbau der K^+ -Kanäle	30
Abbildung 9 Stromkurvenverlauf des I_{to}	33
Abbildung 10 Kv4.3 mit Phosphorylierungsstellen	35
Abbildung 11 Hypothese a). Lineare Beziehung zwischen Atrophie und Hypertrophie	40
Abbildung 12 Hypothese c). U-förmige Beziehung zwischen Hypertrophie, Atrophie und fetalen Zellen.....	41
Abbildung 13 Heterotope HTX	47
Abbildung 14 Echokardiographische Ermittlung der linksventrikulären Masse (LVM).....	48
Abbildung 15 Verstärker Schaltkreis	56
Abbildung 16 Ventrikuläre Myozyte im Auflichtmikroskop	58
Abbildung 17 Ganzzellaufleitung	59
Abbildung 18 Pulsprotokoll des I_{to}	61
Abbildung 19 Steady-State Inaktivierungsprotokoll I_{to}	63
Abbildung 20 I_{to} : Messprotokoll der Recovery (Erholung von der Inaktivierung).....	64
Abbildung 21 IK1 Einwärtsgleichrichterstrom-Pulsprotokoll	65
Abbildung 22 Herzgewicht und Zellkapazität.....	71
Abbildung 23 Herzfrequenz	73
Abbildung 24 Aktionspotenziale	75
Abbildung 25 Stromkurvenverläufe des I_{to}	78
Abbildung 26 I_{to} -Kinetik	84
Abbildung 27 I_{SUS} Strom-Spannungsbeziehungen	85
Abbildung 28 I_{K1} Stromkurvenverläufe.....	87
Abbildung 29 mRNA Expression v Kv4.2,Kv4.3 und KChIP	89
Abbildung 30 Phänotypische Veränderungen nach hHTx	92
Abbildung 31 U-Beziehung Hypertrophie/hHTx	96
Abbildung 32 Calcineurin und Hypertrophie	109

9 Literaturverzeichnis

- Agus ZS, Dukes ID, Morad M (1991) Divalent kations modulate the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Am. J Phys.* 261:310-318.
- Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM (2005) Accessory Kv β 1-subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K $^{+}$ -channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res.* 96(4):451-8.
- Alvarez R (2003) Developmental changes of intracellular Ca $^{2+}$ -transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:971-978.
- Ambardekar AV, Buttrick PM (2011) Reverse remodelling with left ventricular assist devices: a review of clinical, cellular and molecular effects. *Circ Heart Fail.* 4(2):224-33
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS and Rhodes KJ (2000) Modulation of A-type potassium channel by a family of calcium sensors. *Nature.* 403(6769):553-6.
- Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR (2002) Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res.* 91(12):1114-8
- Antzelevitch C, Dumaine R (2008) Electrical heterogeneity in the heart: physiological, pharmacological and clinical implications. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart.* Am. Physiol. Soc. 2002, sect. 2, vol. I, p 654–692. *Arch Intern Med.* 168:418–424.
- Apkon M, Nerbonne JM (1991) Characterization of two distinct depolarization- activated K $^{+}$ -currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 97:973–1011.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O and Isbrandt D (2001) Conserved Kv4 N- terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem.* 276 (26):23888-94.
- Beck EJ, Bowlby M, An WF, Rhodes KJ, Covarrubias M (2002) Remodeling inactivation gating of Kv4-channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J Physiol.* 538:691–706.
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, et al (2010) Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 128:191–227.
- Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M et al (2006) Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N Engl J Med.* 355(18):1873-1884.

- Boukens B, Christoffels VM, Coronel R, Moorman AFM (2009) Developmental Basis for Electrophysiological Heterogeneity in the Ventricular and Outflow Tract Myocardium As a Substrate for Life-Threatening Ventricular Arrhythmias. *Circulation Research*. 104:19-31.
- Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM and Strauss HC (1999) Distinct transient outward potassium current (Ito) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 113(4):581-600.
- Braunwald E (2013) Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 1(1):1-20
- Bruckner BA, Razeghi P, Stetson S, Thompson L, Lafuente J, Entman M, et al (2004) Degree of cardiac fibrosis and hypertrophy at time of implantation predicts myocardial improvement during left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant.* 23:36–42.
- Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G (1999) Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 42:391–401.
- Broichhausen HI (2009) Der Einfluss chronischer Druckentlastung auf die Ca^{2+} -permeablen Kanäle und den Ca^{2+} -Einstrom ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte. Med Dissertation. Universität Hamburg.
- Buyandelger B, Mansfield C, Knöll R (2014) Mechano-signaling in heart failure. *Pflugers Arch.* 466:1093–1099.
- Campbell SE, Korecky B, Rakusan K (1991) Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic Rat Hearts. *Circ Res.* 68:984-996.
- Capuano V, Ruchon Y, Antoine S, Sant MC, Renaud JF (2002) Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac K^{+} channels in the rat. *Mol Cell Biochem.* 237:1–10.
- Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A (1994) Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res.* 28:1180–7.
- Clancy CE and Rudy Y (2002) Na^{+} channel mutation that causes both Brugada and long QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation.* 105:1208–1213.
- Cohen I, Giles W, Noble D (1976) Cellular basis for the T-wave of the electrocardiogram. *Nature.* 262:657-661.
- Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM (2001) Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:1954-1962.
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V and Sutton GC (1999) Incidence and aetiology of heart failure. A population-based study. *Eur Heart J.* 20:421-428.
- Cui YY, Liang P, Wang KW (2008) Enhanced trafficking of tetrameric Kv4.3 channels by KCHIP1 clamping.

Neurochem Res. 33(10):2078-84.

Curtis LH, Whellan DJ, Hammill BG, et al (2008) Incidence and prevalence of heart failure in elderly persons, 1994–2003. *Arch Intern Med.* 168(4):418-24.

Cayabyab FS, Schlichter LC (2002) Regulation of an ERG K⁺ current by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 277(16):13673-81

Dandel M, Weng Y, Siniawski H, Potapov E, Lehmkühl HB, Hetzer R (2005) Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices. *Circulation.* 112(9):37-45.

Delmar M (1992) Role of potassium currents on cell excitability in cardiac ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 3:474–486.

Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore ML, et al (1998) Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 4:1269–75.

DeRose Jr JJ, Umana JP, Argenziano M, Catanese KA, Gardocki MT, Flannery M, et al (1997) Implantable left ventricular assist devices provide an excellent outpatient bridge to transplantation and recovery. *J Am Coll Cardiol.* 30:1773–7.

Deschênes I, Armondas AA, Jones SP, Tomaselli GF, Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen (2008) Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents. *J Mol Cell Cardiol.* 45(3):336-46.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, et al (2008) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 10:933–989.

Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C (2002) Ionic and Cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation.* 106(15):2004-11.

Dipla K, Mattiello JA, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB (1998) Myocyte Recovery after Mechanical Circulatory Support in Humans with end-stage Heart failure. *Circulation* 97:2316-2322

Doenst T, Bugger H, Leippert S, Barleon B, Marme D, Beyersdorf F (2006) Differential gene expression in response to ventricular unloading in rat and human myocardium. *Thorac Cardiovasc Surg.* 54:381–7.

Doenst T, Goodwin GW, Cedars AM, Wang M, Stepkowski S, Taegtmeier H (2001) Load-induced changes in vivo

- alter substrate fluxes and insulin responsiveness of rat heart in vitro. *Metabolism*. 50:1083-90.
- Dong DL, Chen C, Huo R, et al (2010) Reciprocal repression between microRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy: a novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 55:946–952.
- Dorn GW (2007) The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 49(5):962-970.
- Dumaine R, Antzelevitch C (2002) Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 17(1):36-42
- Escobar AL, Ribeiro-Costa R, Villalba-Galea C, Zoghbi ME, Perez CG, Mejia-Alvarez R (2004) Developmental changes of intracellular Ca^{2+} transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 56(1):H433.
- Eckardt L (2007) Gender differences in Brugada Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 18(4):422-4
- Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP (1995) Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K^{+} channels is caused by intracellular spermine. *Cell*. 80(1):149–154.
- Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2002) Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol*. 34:533–46.
- Findlay I (1994) The ATP sensitive potassium channel of cardiac muscle and action potential shortening during metabolic stress. *Cardiovasc Res*. 28:760–761.
- Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR (1997) Shal-type channels contribute to the Ca^{2+} -independent transient outward K^{+} current in rat ventricle. *J Phys*. 500(1):51-64.
- Foeger NC, Wang W, Mellor RL, Nerbonne JM (2013) Stabilization of Kv4 protein by the accessory K^{+} channel interacting protein 2 (KChIP2) subunit is required for the generation of native myocardial fast transient outward K^{+} currents. *J Physiol*. 591(17):4149-66
- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J Phys*. 394:149-172.
- Fozzard HA (2002) Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res*. 55:1–8.
- Franz MR, Bargheer K, Rafflenbeul W, Haverich A, Lichtlen PR (1987) Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardio- grams: direct evidence from the genesis of the T-wave. *Circulation* 75: 379-386.
- Frazier OH, Myers TJ (1999) Left ventricular assist system as a bridge to myocardial recovery. *Ann Thorac Surg*. 68(2):734-741.
- Frenzel H, Schwartzkopff B, Rettig B, Vogelsang H (1987) Morphologic criteria of progression and regression of

cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 10(6):20-8.

Funkat A, Beckmann A, Lewandowski J et al (2014) Cardiac surgery in Germany during 2013: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 62:380-92.

Galinanes M, Zhai X, Hearse DJ (1995) The Effect of Load on Atrophy, Myosin Isoform Shifts and Contractile Function: Studies in a Novel Rat Heart Transplant Preparation. *Cardio Vasc Res.* 27:407-417.

Gassanov N, Er F, Michels G, Zagidullin N, Brandt MC, Hoppe UC (2009) Divergent regulation of cardiac KCND3 potassium channel expression by the thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$. *J Physiol.* 587(6):1319-29.

Go A.S., Mozzafarian D., Roger VL, et al (2013) Heart disease and stroke statistics–2013 update: a report from the American Heart Association *Circulation.* 127:6–245.

Goltz D, Schultz JH, Stucke C, Wagner M, Bassalay P, Schwoerer AP, et al (2007) Diminished Kv4.2/3 but not KChIP2 levels reduce the cardiac transient outward K^+ current in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 74:85–95.

Grant AO (2009) Basic Science for the Clinical Electrophysiologist: Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2:185-194.

Greenstein JL, Wu R, Po S, Tomaselli GF, Winslow RL (2000) Role of the calcium-independent transient outward current I_{to1} in shaping action potential morphology and duration. *Circ Res.* 87(11):1026-33.

Güler N, Kati I, Demirel CB, Bilge M, Eryonucu B, Topal C (2001) The effects of volatile anesthetics on the QTc interval. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 15:188–91.

Gussak I, Chaitman BR, Kopecky SL, Nerbonne JM (2000) Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. *J Electrocardiol.* 33(2):159-70.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X (2005) Review International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):473-508.

Haldeman GA, Croft JB, Giles WH and Rashidee A (1999) Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995. *Am Heart J.* 137:352-360.

Hall JL, Fermin DR, Birks EJ, Barton PJ, Slaughter M, Eckman P, Baba HA, Wohlschlaeger J, Miller LW (2011) Clinical, molecular, and genomic changes in response to a left ventricular assist device. *J Am Coll Cardiol.* 57(6):641-52

Hanley JP, Loiselle DS (1998) Mechanism of force inhibition by halothane and isoflurane in intact rat cardiac

muscle. *J Phys.* 506(1):231-244.

Harding JD, Piacentino III V, Gaughan JP, Houser SR, Margulies KB (2001) Electrophysiological alterations after mechanical circulatory support in patients with advanced cardiac failure. *Circulation.*104:1241–7.

Harding JD, Piacentino III V, Rothman S, Chambers S, Jessup M, Margulies KB (2005) Prolonged repolarization after ventricular assist device support is associated with arrhythmias in humans with congestive heart failure. *J Card Fail.*11:227–32.

Heerdt PM, Holmes JW, Cai B, Barbone A, Madigan JD, Reiken S, et al (2000) Chronic unloading by left ventricular assist device reverses contractile dysfunction and alters gene expression in end-stage heart failure. *Circulation.* 102:2713–9.

Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(8):589-600.

Hetzer R., Muller J, Weng Y, Wallukat G, Spiegelsberger S, Loebe M (1999) Cardiac recovery in dilated cardiomyopathy by unloading with a left ventricular assist device. *Ann Thorac Surg.* 68(2):742-749.

Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 358(13):1370-1380.

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993) Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation.* 88:107-115.

Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 22:6-13.

Hoffman DA, Johnston D (1998) Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 18:3521–3528.

Huang B, Qin D, El Sherif N (2001) Spatial alterations of Kv channels expression and K^+ -currents in post-MI remodeled rat heart. *Cardiovasc Res.*52:246–54.

Huo R, Sheng Y, Guo WT, Dong DL (2014) The potential role of Kv4.3 K^+ channel in heart hypertrophy. *Channels.* 8(3):203–209

Hüneke R (2001) Effects of the anesthetic gases xenon, halothane, and isoflurane on calcium and potassium currents in human atrial cardiomyocytes, *Anesthesiology.* 95(4):999-1006.

Isbrandt D, Leicher T, Waldschütz R, Zhu X, Luhmann U, Michel U, Sauter K and Pongs O (2000) Genes structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA} . *Genomics.* 64(2):144-54.

- Isenberg G, Klockner U (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a KB medium. *J Physiol.* 519(1):11-21.
- Ito K, Nakayama M, Hasan F, Yan X, Schneider MD, Lorell BH (2003) Contractile reserve and calcium regulation are depressed in myocytes from chronically unloaded hearts. *Circulation.* 107:1176–82.
- Jia Y, Takimoto K (2006) Mitogen-activated protein kinases control cardiac KChIP2 gene expression. *Circ Res.* 98:386–93.
- Johns DC, Nuss HB, Marban E (1997) Suppression of neuronal and cardiac transient outward currents by viral gene transfer of dominant-negative Kv4.2 constructs. *J Biol Chem.* 272(50):31598-603.
- Kannel WB and Belanger AJ (1991) Epidemiology of heart failure. *Am Heart J.* 121:951-957.
- Kaprielian R, Sah R, Nguyen T, Wickenden AD, Backx PH (2002) Myocardial infarction in rat eliminates regional heterogeneity of AP profiles, I_{to} K^+ currents, and Ca^{2+}_i transients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:1157–68.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH (1999) Relationship between K^+ channel down-regulation and Ca^{2+}_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol.* 517:229–45.
- Karagöz AH, Basgul E, Celiker V, Aypar U (2005) The effect of inhalational anaesthetics on QTc interval. *Eur J Anaesthesiol.* 22:171–74.
- Kassiri Z, Zobel C, Nguyen TT, Molkentin JD, and Backx PH (2002) Reduction of I_{to} causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 90:578–585.
- Kawabata M, Hirao K, Takeshi S, Sakurai K, Inagaki H, Hachiya H, Isobe M (2008) Torsades de pointes related to transient marked QT prolongation following successful emergent percutaneous coronary intervention for acute coronary syndrome. *J Electrocardiol.* 41(2):117-22.
- Kein I, Hong C, Schreiber SS (1990) Cardiac atrophy in the heterotopically transplanted rat heart: in vitro protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol.* 22(4):461-8.
- Keung EC (1989) Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res.* 64:753–763.
- Khanna R, Myers MP, Laine M, and Papazian DM (2001) Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 276:34028–34034.
- Kilborn MJ, Fedida D (1990) A study of the developmental changes in outward currents in rat ventricular myocytes. *J Phys.* 430:37-60.
- Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD et al (2014) Sixth INTERMACS annual report – a 10, 000 patients database. *J*

Heart Lung Transplant.33:555-564.

Kirklin, JK, Naftel DC, Kormos RL, Stevenson LW, Pagani FD, Miller MA et al (2012) The Fourth INTERMACS Annual Report: 4,000 implants and counting. J Heart Lung Transplant. 31(2):117-126.

Klinke R, Pape H-C., Kurtz A., Silbernagel S., Baumann R., Brenner B., Gay R., Rothenburger A (2010) Physiologie. 6. Auflage. Thieme ISBN: 978-3-13-796006-5.

Kocic I, Hirano Y, Kawano S, Hiraoka M (2003) Regional and frequency-dependent changes in action potentials and transient outward K^+ - currents in ventricular myocytes from J-2-K cardiomyopathic hamsters. Basic Res Cardiol. 98(6):367-79.

Kolar F, MacNaughton C, Papousek F, Korecky B, Rakusan K (1995) Changes in calcium handling in atrophic heterotopically isografted rat hearts. Basic Res Cardiol. 90:475–81.

Korecky B, Rakusan K (1983) Morphological and physiological aspects of cardiac atrophy. in Alpert NR (ed): Perspectives in cardiovascular research: Myocardial Hypertrophy and failure. New York, Raven Press, Publishers. 7:293-309.

Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. Nature. 364(6440):802–806.

Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. Pharmacol Rev. 57(4):509–526.

Kuryshv YA, Gudzi TI, Brown AM, Wible BA (2000) KChAP as a chaperone for specific K^+ channels. Am J Physiol Cell Physiol. May. 278(5):931-41.

Lebeche D, Kaprielian R, del Monte F, Tomaselli G, Gwathmey JK, Schwartz A et al (2004) In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis. Circulation. 110:3435–43.

Lee JK, Kodama I, Honjo H, Anno T, Kamiya K, Toyama J (1997) Stage- dependent changes in membrane currents in rats with monocrotaline- induced right ventricular hypertrophy. Am J Physiol. 272:2833–42.

Lee YA, Lindpaintner K (1993) Role of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive cardiac hypertrophy. Eur Heart J. 11:42-8.

Lengyel C, Virag L, Biro T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, et al (2007) Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. Cardiovasc Res. 73:512–20.

Li GR and Dong MQ (2010) Pharmacology of cardiac potassium channels. Adv Pharmacol. 59:93-134.

- Li Q, Zhang Y, Sheng Y, Huo R, Sun B, Teng X, Li N, Zhu JX, Yang BF, Dong DL (2012) Large T-antigen up-regulates Kv4.3 K⁺ channels through Sp1, and Kv4.3 K⁺ channels contribute to cell apoptosis and necrosis through activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 441(3):859-67.
- Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S (2000) Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation.* 101:2631-2638.
- Litovsky SH, Antzelevitch C (1988) Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res.* 62(1):116-26.
- Liu DW, Gintant GA and Antzelevitch C (1993) Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res.* 72(3):671-87.
- Liu HB, Yang BF, Dong DL (2010) Calcineurin and electrical remodeling in pathologic cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med.* 20(5):148-53.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature.* 372(6504):366–369.
- Lopatin AN and Nichols CG (2001) Inward rectifiers in heart: an update on IK1. *J Mol Cell Cardiol.* 33:625–638.
- Lundby A, Olesen SP (2006) KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 346(3):958-67.
- Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F (2015) Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 116(8):1462-76.
- Mancini, DM, Beniaminovitz A, Levin H, Catanese K, Flannery M, DiTullio M et al (1998) Low incidence of myocardial recovery after left ventricular assist device implantation in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 98(22):2383- 2389.
- Martínez ML, Heredia MP, Delgado C (1999) Expression of T-type Ca²⁺ channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 31:1617–1625.
- Mason HS, Latten MJ, Godoy LD, Horowitz B, Kenyon JL (2002) Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol.* 61(2):285-93.
- Mayosi BM, Burgess LJ, Doubell AF (2005) Tuberculous pericarditis. *Circulation.* 112(23):3608–3616.
- McMurray JJ and Stewart S (2000) Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart.* 83:596-602.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD et al (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure

2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 33:1787-1847.

McMurray JJ, Petrie MC, Murdoch DR and Davie AP (1998) Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur Heart J.* 19:9-16.

Michaloudis D, Fraidakis O, Lefaki T, et al (1996) Anaesthesia and the QT interval in humans. The effects of isoflurane and halothane. *Anaesthesia.* 51:219–24.

Michaloudis D, Fraidakis O, Lefaki T, Kanakoudis F, Askitopoulou H (1998) Anaesthesia and the QT interval in humans: effects of halothane and isoflurane in premedicated children. *Eur J Anaesthesiol.* 15:623–8.

Michaloudis D, Fraidakis O, Petrou A, Gigourtsi C, Parthenakis F (1998) Anaesthesia and the QT interval. Effects of isoflurane and halothane in unpremedicated children. *Anaesthesia.* 53:435–9.

Miller LW, Pagani FD, Russell SD, John R, Boyle AJ, Aaronson KD et al (2007) Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation. *N Engl J Med.* 357(9):885-896.

Moncayo A, Yanine MIO (2006) An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 100(8):663–677.

Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation.* 93:168–177.

Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz De Miera E, Artman M, and Rudy B (1997) Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K⁺ current, by PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 273: 1775–1786.

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH (2007) Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev.* 87:425–456.

Nattel S, Yue L, Wang, Z (1999) Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell. Physiol. Biochem.* 9:217-226.

Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260:799-802.

Nerbonne JM and Guo W (2002) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 13:406–409.

Nerbonne JM (2005) Molecular analysis of voltage-gated K⁺ channel diversity and functioning in the mammalian heart. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart.* Am. Physiol Soc. 2(1):568–594.

- Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev.* 85:1205–1253.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M (2014) Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 35:2929.
- Nishiyama A, Ishii DN, Backx PH, Pulford BE, Birks BR, Tamkun MM (2001) Altered K⁺ channel gene expression in diabetic rat ventricle: isoform switching between Kv4.2 and Kv1.4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:1800–7.
- Niwa N, Nerbonne JM (2010) Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 48:12–25.
- Nuss HB, Houser SR (1993) T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res.* 73:777–82.
- Ogletree-Hughes ML, Stull LB, Sweet WE, Smedira NG, McCarthy PM, Moravec CS (2001) Mechanical unloading restores beta-adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in the failing human heart. *Circulation.* 104:881–6.
- Ono K, Lindsey ES (1969) Improved technique of heart transplantations in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 57: 225–229.
- Oriyahan W, Tsuneyoshi H, Nishina T, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M (2007) Determination of optimal duration of mechanical unloading for failing hearts to achieve bridge to recovery in a rat heterotopic heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* 26:16–23.
- Pak MD, Baker K, Covarrubias M, Butler, Ratcliffe A and Salkoff L (1991) mShal, a subfamily of A-type channel cloned from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(10):4386–9
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC (2002) Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol.* 545. 1:5–11.
- Patel SP, Campbell DL (2005) Transient outward potassium current, "I_{to}", phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol.* 569:7–39.
- Patel SP, Parai R, Parai R, Campbell DL (2004) Regulation of Kv4.3 voltage-dependent gating kinetics by KChIP2 isoforms. *J Physiol.* 557:19–41.
- Petrie J, Ojamaa K, Hong C, Smilari T, Klein I (1994) Effects of adrenergic agonists on the growth and gene expression of the transplanted heart. *JLCM.* 124:789–795.
- Pedrotty DM, Rame JE, Margulies KB (2013) Management of ventricular arrhythmias in patients with ventricular assist devices. *Curr Opin Cardiol.* 28(3):360–368

- Po SS, Wu RC, Juang GJ, Kong W, Tomaselli GF (2001) Mechanism of alpha-adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:2518–2527.
- Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I (2001) AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/I_{Ks} channel complex. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 280:2038-2045.
- Qin D, Huang B, Deng L, El Adawi H, Ganguly K, Sowers JR, et al (2001) Downregulation of K⁺ channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 283:549–53.
- Radovancevic B, Frazier OH, Duncan JM (1992) Implantation technique for the HeartMate left ventricular assist device. *J Card Surg.* 7:203–7.
- Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeier H (2007) Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev.* 12:331–43.
- Razeghi P, Buksinska-Lisik M, Palanichamy N, Stepkowski S, Frazier OH, Taegtmeier H (2006) Transcriptional regulators of ribosomal biogenesis are increased in the unloaded heart. *FASEB J.* 20:1090–6.
- Razeghi P, Sharma S, Ying J, Li YP, Stepkowski S, Reid MB, et al (2003) Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation.* 108:2536–41.
- Razeghi P, Volpini KC, Wang ME, Youker KA, Stepkowski S, Taegtmeier H (2007) Mechanical unloading of the heart activates the calpain system. *J Mol Cell Cardiol.* 42:449–52.
- Remme WJ Swedberg K (2001) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J.* 22:1527-1560.
- Riebandt J, Haberl T, Mahr S et al (2014) Off-pump HeartWare ventricular assist device implantation with outflow graft anastomosis to the left subclavian artery. *Ann Thorac Surg.* 97:2214-2216.
- Roepke TK, Kontogeorgis A, Ovanez C, Xu X, Young JB, Purtell K, Goldstein PA, Christini DJ, Peters NS, Akar FG, Gutstein DE, Lerner DJ, Abbott GW (2008) Targeted deletion of *kcne2* impairs ventricular repolarization via disruption of I_{K,slow1} and I_{to,f}. *FASEB J.* 22(10):3648-60.
- Roger VL (2013) Epidemiology of heart failure. *Circ Res.* 113:646–659.
- Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al (2004) Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA.* 292:344–350.
- Rojas SV, Avsar M, Uribarri A et al (2015) A new era of ventricular assist device surgery: less invasive procedures. *Minerva Chir.* 70: 63-68.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE and McKinnon D (2001) Regulation of KCHIP2 potassium

channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* 533(1):119-25.

Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, et al (2001) Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 345:1435–43.

Rose J, Armondas AA, Tian Y, Di Silvestre D, Burysek M, Halperin V, O'Rourke B, Kass DA, Marbán E, Tomaselli GF (2005) Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ.* 288. H2077-H2087.

Rudy B, Kentros C, Weiser M, Fruhling D, Serodio P, Vega-Saenz de Miera E, Ellisman MH, Pollock JA, Baker H (1992) Region-specific expression of a K^+ channel gene in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(10):4603-7.

Sabbah HN (2004) Effects of cardiac support device on reverse remodeling: molecular, biochemical, and structural mechanisms. *J Card Fail.* 10:207-214.

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IK_r potassium channel. *Cell.* 81:299–307.

Sanguinetti MC, Johnson JH, Hammerland LG, Kelbaugh PR, Volkmann RA, Saccomano NA, Mueller AL (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block $K_v4.2$ potassium channels. *Mol Pharmacol.* 51:491–498.

Schrader LA, Anderson AE, Mayne A, Pfaffinger PJ, Sweatt JD (2002) PKA modulation of $K_v4.2$ -encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J Neurosci.* 22(23):10123-33.

Sharma S, Ying J, Razeghi P, Stepkowski S, Taegtmeier H (2006) Atrophic remodeling of the transplanted rat heart. *Cardiology.* 105:128–36.

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium Channels: Molecular Defects. Diseases and Therapeutic Opportunities. *Pharmacological Reviews.* 52(4):557-594.

Shimoni Y, Severson D, Giles W (1995) Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium current in rat ventricle. *J Phys.* 488:673-688.

Shipsey SJ, Bryant SM, Hart G (1997) Effects of hypertrophy on regional action potential characteristics in the rat left ventricle: a cellular basis for T-wave inversion? *Circulation.* 96:2061–2068.

Shirazi JT, Lopshire JC, Gradus-Pizlo I, Hadi MH, Wozniak TC, Malik AS (2013) Ventricular arrhythmias in patients with implanted ventricular assist devices: a contemporary review. *Europace.* 15:11-17

Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature.* 379:833-836.

- Suzuki A, Bosnjak ZJ, Kwok WM (2003) The effects of isoflurane on the cardiac slowly activating delayed-rectifier potassium channel in guinea pig ventricular myocytes. *Anesth Analg*. 96: 1308 – 15.
- Swynghedauw B, Chevalier B (1995) Biological characteristics of the myocardium during the regression of cardiac hypertrophy due to mechanical overload. *J Heart Valve Dis*. 4 Suppl 2:154-9.
- Takaseya T, Ishimatsu M, Tayama E, Nishi A, Akasu T, Aoyagi S (2004) Mechanical unloading improves intracellular Ca^{2+} regulation in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 44:2239–46.
- Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, Levitan ES (1997) Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K^+ channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res*. 81:533–9.
- Takimoto K, Yang EK, Conforti L (2002) Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J Biol Chem*. 277:26904–11.
- Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM (1991) Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K^+ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J*. 5(3):331-7.
- Tao Y, Zeng R, Shen B, Jia J, Wang Y (2005) Neuronal transmission stimulates the phosphorylation of Kv1.4 channel at Ser229 through protein kinase A1. *J Neurochem*. 94(6):1512-22.
- Terracciano CM, Harding SE, Adamson D, Koban M, Tansley P, Birks EJ, et al.(2003) Changes in sarcolemmal Ca^{2+} entry and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in ventricular myocytes from patients with end-stage heart failure following myocardial recovery after combined pharmacological and ventricular assist device therapy. *Eur Heart J*. 24:1329–39.
- The International Society for Heart and Lung Transplantation (2015) Heart / Lung registries: Quarterly Data Report.URL:<http://www.ishlt.org/registries/quarterlyDataReportResults.asp?organ=HR&rptType=all&continent=3>(letzter Zugriff 27.02.2015)
- Tomaselli GF, Marban E (1999) Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 42:270–83.
- Tomita F, Bassett AL, Myerburg RJ, Kimura S (1994) Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res*. 75:296–303.
- Tschöpe C, Messroghli D, Schönrrath F et al (2015) Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Dtsch med Wochenschr*. 140(06):406-412.
- Ufret-Vincenty CA, Baro DJ, and Santana LF (2001) Differential contribution of sialic acid to the function of repolarizing K^+ currents in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281:464–474.
- Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK and Levy D (1999) Congestive heart failure in subjects

with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 33:1948-1955.

Verkerk AO, Ginneken ACG van, Veen TAB van, Tan HL (2007) Effects of heart failure on brain-type Na⁺ channels in rabbit ventricular myocyte. *Europace*. 121:571-577.

Volk T, Nguyen THD, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H (2001) Regional alterations of repolarizing K⁺ currents among the left ventricular wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol*. 530:443-455.

Volk T, Ehmke H (2002) Conservation of L-type Ca²⁺ current characteristics in endo- and epicardial myocytes from rat left ventricle with pressure-induced hypertrophy. *Eur J Phys*. 443:399-404.

Volk T, Nguyen THD, Schultz JH, Ehmke H (1999) Relationship between transient outward K⁺ current and Ca²⁺ influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Phys*. 519(3):841-850.

Volk T, Noble PJ, Wagner M, Noble D, Ehmke H (2004) Ascending aortic stenosis selectively increases action potential-induced Ca²⁺ influx in epicardial myocytes of rat left ventricle. *Exp. Physiol*. 90(1):111-121.

Wang K (2008) Modulation by clamping: Kv4 and KChIP interactions. *Neurochem Res*. 33(10):1964-9.

Wang L, Takimoto K, Levitan ES (2003) Differential association of the auxiliary subunit Kvbeta2 with Kv1.4 and Kv4.3 K⁺ channels. *FEBS Lett*. 547(1-3):162-4.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*. 12:17-23.

Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S (1999) Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K⁺ current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res*. 84(5):551-61.

Wang Z, Fermini B, Nattel S (1993) Sustained depolarization induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circulation Research*. 73(6):1061-76.

Wang Z, Kutschke W, Richardson KE, Karimi M, Hill JA (2001) Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin. *Circulation*. 104:1657-63.

Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U (1994) Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res*. 75:473-482

WHO Study Group on Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease and WHO (2004) World Health Organization technical report series. Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Report of a WHO expert consultation. Geneva. 20 October-1 November 2001. World Health Organization.

- Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI, Backx PH (1998) Review: The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37:312-323.
- Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R, Backx PH (1999) Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K^+ current in rat ventricle. *Am J Physiol.* 276:H1599–H1607.
- Wickenden AD, Kaprielian R, You XM, and Backx PH (2000) The thyroid hormone analog DITPA restores I_{to} in rats after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1105–H1116.
- Wiesner RJ, Ehmke H, Faulhaber J, Zak R, Rügge JC (1997) Dissociation of left ventricular hypertrophy, beta-myosin heavy chain gene expression, and myosin isoform switch in rats after ascending aortic stenosis. *Circulation.* 95:1253-1259.
- Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Schmid C, Schmid KW, Keul P, Takeda A, et al (2005) Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): a review of the morphological and molecular changes. *Cardiovasc Res.* 68:376–86.
- Xu H, Guo W and Nerbonne JM (1999) Four kinetically distinct depolarization-activated K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 113(5):116-26.
- Xu H, Li H, Nerbonne JM (1999) Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit. *J Physiol.* 519(1):11-21.
- Yacoub MH (2001) A novel strategy to maximize the efficacy of left ventricular assist devices as a bridge to recovery. *Eur Heart J.* 22(7):534-540.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al (2013) ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *JACC.* 16:147 -239.
- Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K (2001) Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem.* 276(7):4839-44.
- Yazawa K, Kameyama M (1990) Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J.Physiol.* 421:135-150.
- Zafeiridis A, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB (1998) Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation.* 98:656–62.

10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben

Prof. Dr. Heimo Ehmke und Prof. Dr. Tilmann Volk danke ich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen in meine Person und die stets freundliche Betreuung.

PD Dr. Alexander Schwoerer danke ich für die herausragende fachliche Betreuung während meiner gesamten Zeit als Doktorand. Er hatte stets ein offenes Ohr, präzise konstruktive Kritik sowie die richtige Portion Humor um die Fertigstellung dieser Arbeit möglich zu machen.

Dr. Ivan Melnychenko (†) danke ich für seine Hilfe bei den Operationen und den Echokardiographischen Untersuchungen

Prof. Dr. Tilmann Volk und PD Dr. Michael Wagner danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik.

Dr. Diane Goltz danke ich für die freundliche Überlassung der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen.

Dipl.-Ing. Peter Bassalay danke ich für die tolle Unterstützung bei technischen Problemen aller Art.

Ich möchte mich darüber hinaus bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie (vormals Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie) für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit bedanken. Ich werde die Zeit dort immer in guter Erinnerung behalten.

Meinen Freunden Dr. Corinna Bläute, Dr. Mustafa Fahimi, Marco Ney, Dr. Abdullah Sinirlioglu und Gülay Yildirim danke ich für die besondere Freundschaft, die uns verbindet und die motivierenden Worte und Unterstützung während dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung meines Werdegangs und ihr Interesse an meinem stetigen Vorankommen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Lisa Wagner für ihre motivierenden Worte, das unerschütterliche Vertrauen in meine Person und die größte Liebe, die man sich vorstellen kann.

11 Lebenslauf

Nils Hedinger
Lindenplatz 1a
D-20099 Hamburg
Mobil: +49 151 226 4929 7
Email: nilhed@googlemail.com
nhedinger@uke.de

PERSÖNLICHE ANGABEN

- | | |
|-----------------------|---------------|
| ▪ Name | Nils Hedinger |
| ▪ Geburtsdatum | 05.04.1979 |
| ▪ Geburtsort | Hamburg |
| ▪ Familienstand | ledig |
| ▪ Staatsangehörigkeit | deutsch |

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- | | |
|-------------|---|
| 1999 | Allgemeine Hochschulreife |
| 1997 – 1999 | Wichern Schule Abt. Gymnasium, Hamburg |
| 1996 – 1997 | Choctawhatchee IB Highschool, Ft Walton Bch, FL USA |
| 1989 – 1996 | Wichern Schule Abt. Gymnasium, Hamburg |
| 1985 – 1989 | Grundschule Oststeinbek |

ZIVILDIENTST

- | | |
|-------------|---|
| 1999 – 2000 | Rettungssanitäter beim DRK Walddörfer/Mediservice Hamburg |
|-------------|---|

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

- | | |
|-------------|---|
| 12'2006 | Approbation als Arzt |
| 12'2006 | 3. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung |
| 9'2005 | 2. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung |
| 9'2003 | 1. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung |
| 9'2002 | Ärztliche Vorprüfung |
| 2000 – 2006 | Studium der Humanmedizin: Universität Hamburg |

KLINISCHE AUSBILDUNG

- | | |
|-------------------|---|
| 06'2006 – 09'2006 | 3. Tertial Praktisches Jahr, Innere Medizin, Schwerpunkte Nephrologie und Endokrinologie, Istanbul Universitesi, Cerrahpasa Tıp Fakültesi, Istanbul, Türkei |
| 02'2006 – 06'2006 | 2. Tertial Praktisches Jahr, Chirurgie, Schwerpunkt Herz und Thoraxchirurgie, Christiaan Barnard Div. of Cardiothoracic Surgery, Groote Schuur Hospital, Cape Town, Südafrika |
| 10'2005 – 01'2006 | 1. Tertial Praktisches Jahr, Anästhesie und Intensivmedizin
Kantonsspital Bruderholz, Basel, Schweiz |

KLINISCHE WEITERBILDUNGSZEIT

Seit 02'2012	Facharzt für Anästhesie und Intensivmedizin im Zentrum für Anästhesie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. E. Goetz. Martinistraße 52, 20246 Hamburg
01'2010 – 02'2012	Assistenzarzt im Zentrum für Anästhesie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. E. Goetz. Martinistraße 52, 20246 Hamburg
1'2007 – 12'2009	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie im St. Josefs Hospital. CA PD Dr. med. Christian Weilbach. Krankenhausstrasse 13, 49661 Cloppenburg

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

11'2002- 09'2003	Elektrophysiologisches Arbeiten und Kleintier-OPs als Studentischer Mitarbeiter im Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, UKE Hamburg, Prof. Dr. Heimo Ehmke
------------------	---

VERÖFFENTLICHUNG

Schwoerer AP, Melynchenko I, Goltz D, Hedinger N, Broichhausen I, El-Armouche A, Eschenhagen T, Volk T, Ehmke H (2008) Unloaded rat hearts in vivo express a hypertrophic phenotype of cardiac repolarization. J Mol Cell Cardiol. 45(5):633-641.

12 Eidesstattliche Versicherung

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:

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Schwoerer AP, Melynchenko I, Goltz D, Hedinger N, Broichhausen I, El-Armouche A, Eschenhagen T, Volk T, Ehmke H (2008) Unloaded rat hearts in vivo express a hypertrophic phenotype of cardiac repolarization. J Mol Cell Cardiol. 45(5):633-641.