

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie**

Prof. Dr. H. Ehmke

**Der Einfluss von Phospholamban auf die Feldpotentialdauer in  
entlasteten Mäuseherzen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:

**Leonie Dreher**

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2021

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.09.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Torsten Christ**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Alexander Schwoerer**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.3	Therapie	2
1.2	Unterstützungssysteme	4
1.2.1	Indikationen	5
1.2.2	Komplikationen bei der Therapie mit Unterstützungssystemen	7
1.2.3	Wissenschaftlicher Kenntnisstand der Arrhythmieentstehung	8
1.3	Zelluläre Grundlagen	10
1.3.1	Das ventrikuläre Aktionspotential	10
1.3.2	Das Ca <sup>2+</sup> -Handling	12
1.4	Kardiale Plastizität	13
1.5	Herleitung der Fragestellung	16
1.5.1	Hypothese	17
1.6	Experimentelles Vorgehen	17
1.6.1	Grundlagen der heterotopen Herztransplantation	18
1.6.2	Elektrophysiologische Messungen von Herzschnitten	19
1.6.3	Grundlagen der MEA System Messungen	20
1.6.4	Planung der Versuchstiergruppen	22
1.7	Arbeitsplan	22
1.7.1	Methodenetablierung	23
1.7.2	MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuseherzschnitten	23
2	Materialien und Methoden	24
2.1	Versuchslösungen	24
2.2	Zeitlicher Ablauf der experimentellen Arbeit	26
2.3	Versuchstiere	27

2.3.1	Zucht und Haltung der Versuchstiere	27
2.3.2	Knockout und Genotypisierung	28
2.4	Heterotope Herztransplantation nach Ono und Lindsey	28
2.4.1	Narkose	28
2.4.2	Entnahme des Spenderherzens	28
2.4.3	Vorbereitung des Empfängertieres und Implantation des Spenderherzens	29
2.4.4	Postoperatives Schmerzmanagement und Nachsorge der operierten Tiere	29
2.5	Explantation der heterotopen Herzen	30
2.6	Schneiden von Herzgewebe	30
2.7	MTT Vitalitätstest	32
2.7.1	Durchführung der MTT Färbung	32
2.7.2	Bradford Proteinbestimmung	33
2.8	Elektrophysiologie	33
2.8.1	Setup des MEA2100	33
2.8.2	Vorbereitung der Messungen	35
2.8.3	Durchführung der Messungen mit dem MEA2100	37
2.8.4	Datengewinnung	37
2.9	Datenauswertung	38
2.10	Genehmigungen	38
2.11	Eigenleistungen und Fremdleistungen	38
3	Ergebnisse: Methodenetablierung	39
3.1	MTT Vitalitätsfärbung	39
3.2	Optische Kontrolle der Kontraktilität	40
3.3	MEA System Messung von Feldpotentialen	40
3.4	Definition von Einschlusskriterien zur Auswertung der Feldpotentialdauer	41
3.5	Bestimmung der Feldpotentialdauer adulter Mäuseherzschnitte	44
4	Ergebnisse: MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuseherzschnitten	45
4.1	Herzgewichte	45
4.2	Übersicht über die MEA System Messungen in den Versuchstiergruppen	46

4.3	Feldpotentialdauern der orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuse	47
4.4	Frequenzabhängigkeit	49
5	Diskussion	52
5.1	Vitalität und Spontanaktivität der Herzschnitte	53
5.2	Einschlusskriterien zur Bestimmung der Feldpotentialdauer	55
5.3	Messbarkeit und Stabilität der Feldpotentiale	59
5.4	Translation vom Rattenmodell zum Mausmodell	59
5.5	Einfluss des Genotyps auf die Feldpotentialdauer bei Entlastung	60
5.6	Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer	62
5.7	Das experimentelle Arbeiten	63
5.7.1	Stichprobenumfang in den Versuchstiergruppen	63
5.7.2	MEA System Messungen als elektrophysiologische Methode	64
5.8	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand	65
5.9	Translation der Ergebnisse auf den Menschen und in die Klinik	68
5.10	Schlussfolgerung	71
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	73
8	Abkürzungsverzeichnis	74
9	Literaturverzeichnis	77
10	Abbildungsverzeichnis	85
11	Tabellenverzeichnis	86
12	Danksagung	87
13	Lebenslauf	88
14	Eidesstattliche Erklärung	89

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

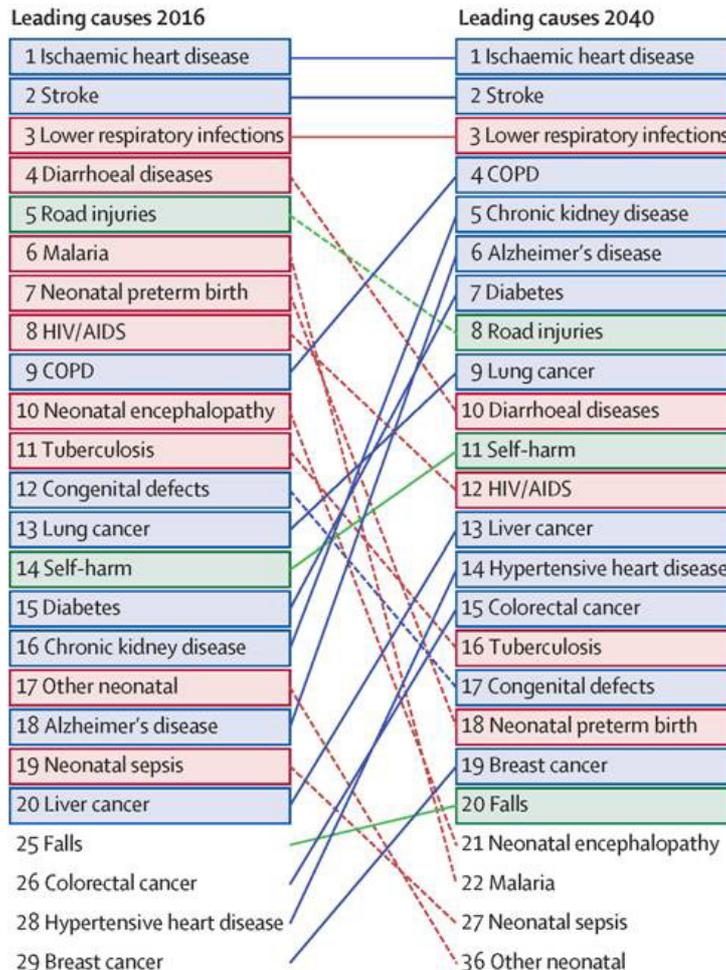
### 1.1.1 Definition

Herzinsuffizienz ist definiert als die Unfähigkeit des Herzens die Organe mit Sauerstoff zu versorgen. Es handelt sich um ein klinisches Syndrom, welches als Folge verschiedener kardialer Grunderkrankungen auftritt (Ponikowski et al., 2016). Der häufigste Grund für eine Herzinsuffizienz in westlichen Ländern ist die koronare Herzkrankheit, häufig begleitet von arterieller Hypertonie (Remme und Swedberg, 2001).

Die klinische Definition setzt das Vorhandensein von typischen Symptomen, wie Atemnot, Leistungsminderung und Flüssigkeitsretention, voraus (Remme und Swedberg, 2001, Hoppe et al., 2001).

### 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Laut Statistiken sind ischämische Herzerkrankungen, welche vielfach ursächlich für eine Herzinsuffizienz sind, die häufigste Todesursache in Industrieländern 2016 und perspektivisch auch noch im Jahr 2040 (siehe Abbildung 1) (Foreman et al., 2018). In Deutschland zählt die Herzinsuffizienz zur dritthäufigsten Todesursache (Destatis, 2021b). Des Weiteren ist die Herzinsuffizienz einer der häufigsten Gründe für eine Hospitalisierung in Westeuropa und den USA sowie eine Erkrankung, die im Krankenhaus häufig zum Tode führt (Destatis, 2021a, McDermott et al., 2017).



**Abbildung 1: Todesursachenstatistik 2016 und 2040**

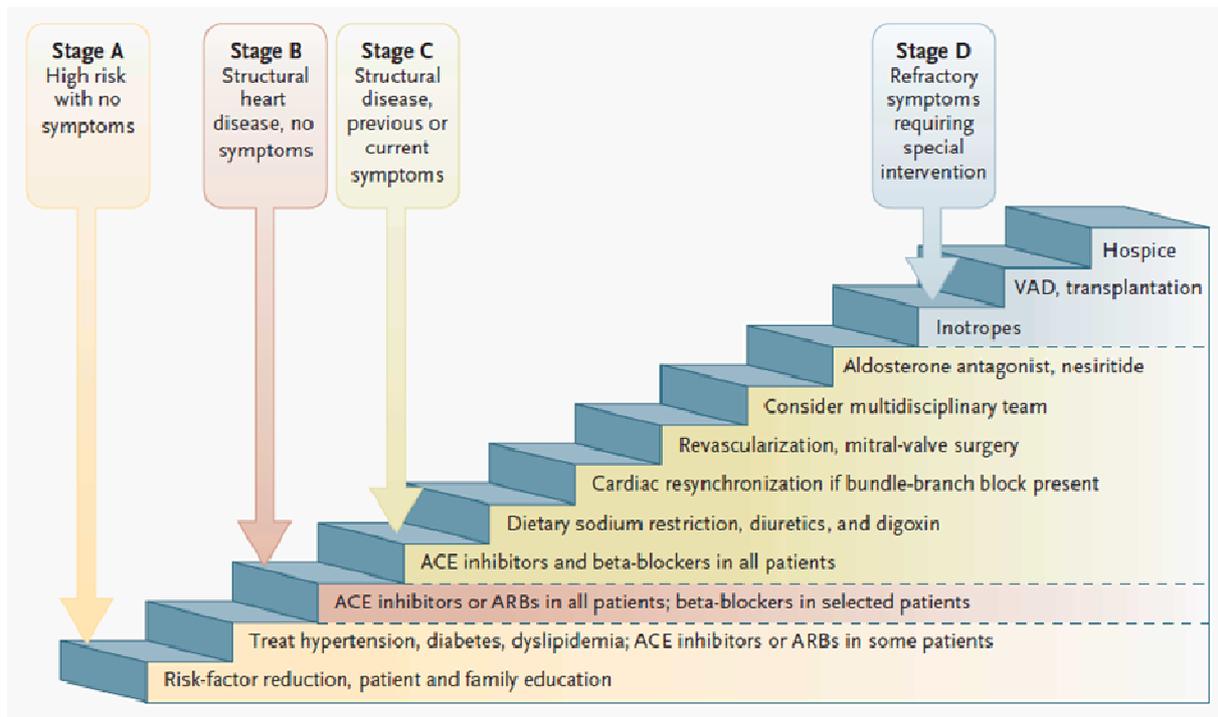
Dargestellt sind die 20 global häufigsten Todesursachen im Jahr 2016 und im Jahr 2040. Linien verbinden die Krankheiten, die sowohl 2016 also auch 2040 auftauchen und zeigen die etwaige Veränderung auf.

rot: ansteckend, mütterlich, neonatal und aufgrund von Ernährung; blau: nicht ansteckend; grün: Verletzungen. (modifiziert nach Foreman et al. 2018)

### 1.1.3 Therapie

Die Therapie der Herzinsuffizienz richtet sich nach dem Schweregrad sowie der Grunderkrankung. Trotz der hohen Prävalenz und Mortalität der Erkrankung gibt es bis auf die Herztransplantation keine kurative Therapie (Yacoub, 2001). Abbildung 2 zeigt die Therapieoptionen je nach Stadium (A bis D). Das erste Therapieziel liegt in der Minimierung von Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht und Bluthochdruck. Wenn sich die Herzinsuffizienz verschlimmert erfolgt, eine medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern und  $\beta$ -Blockern (Jessup und Brozena, 2003). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium wird die medikamentöse Therapie mit Diuretika und Herzglykosiden ergänzt. Das medikamentöse Spektrum ist bei Bedarf noch erweiterbar. Außerdem kann eine kardiale Resynchronisation erwogen werden. Ab dem Stadium D sind inotropen Substanzen häufig notwendig.

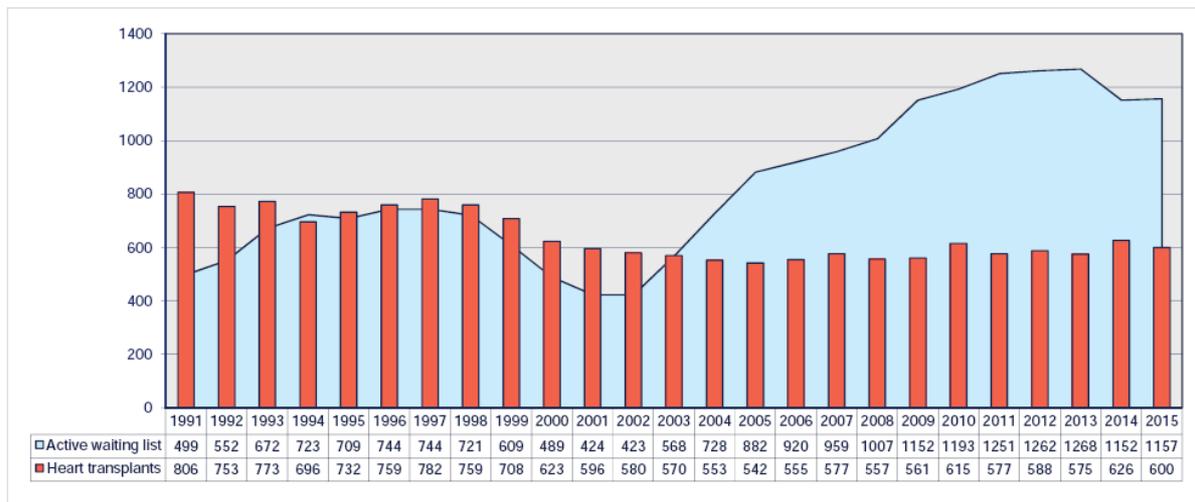
Außerdem festigt sich in diesem Stadium die Indikation zur Herztransplantation. Eine weitere Therapieoption, die ab Stadium D genutzt werden kann, ist die Implantation eines kardialen Unterstützungssystems (Jessup und Brozena, 2003).



**Abbildung 2: Übersicht über die stadienabhängige Therapie der Herzinsuffizienz**

Die Stadien entsprechen der ABCD Klassifikation der Herzinsuffizienz der American Heart Association. Schweregrad der Herzinsuffizienz und Intensivierung der Therapie von Stadium A (keine Symptome) bis Stadium D (refraktäre Symptome). (Jessup und Brozena, 2003)

Ein problematischer Aspekt in der Therapie der Herzinsuffizienz ist, dass sich in den letzten Jahren das Ungleichgewicht zwischen dem Bedarf an Herztransplantationen und den verfügbaren Herzen drastisch verstärkt hat (siehe Abbildung 3) (Eurotransplant Annual Report, 2015). So standen im Jahr 2015 den 1157 Patientinnen und Patienten, die auf der Transplantationsliste standen, nur 600 verfügbare Herztransplantate gegenüber (Eurotransplant Annual Report, 2015).



**Abbildung 3: Verhältnis der verfügbaren Herztransplantate im Vergleich zu den Wartelistenplätzen**

Dargestellt sind mit roten Balken die Anzahl der verfügbaren Herztransplantate, ein hellblaues Feld bildet die Patientinnen und Patienten auf der aktiven Warteliste ab. Gezeigt sind die Zahlen zwischen 1991 und 2015. (Eurotransplant Annual Report, 2015)

## 1.2 Unterstützungssysteme

Es gibt verschiedenen Formen kardialer Kreislaufunterstützungssysteme, von denen das am häufigsten genutzte System das „Left Ventricular Assist Device“ (LVAD) ist. LVADs unterstützen das Herz, in dem sie das Blut mittels einer Pumpe, aus dem linken Ventrikel ansaugen und über eine Kunststoffprothese direkt in die Aorta ascendens befördern (Willemsen et al., 2016). Dies geschieht je nach Art des „Ventricular Assist Devices“ (VAD) kontinuierlich oder pulsatil (Wilson et al., 2009, Willemsen et al., 2016). Mittels eines chirurgischen Eingriffes wird die Pumpe des VAD in das insuffiziente Herz implantiert. Die VAD Pumpe ist über ein dünnes Kabel mit einer externen Steuereinheit verbunden (siehe Abbildung 4) (Willemsen et al., 2016).



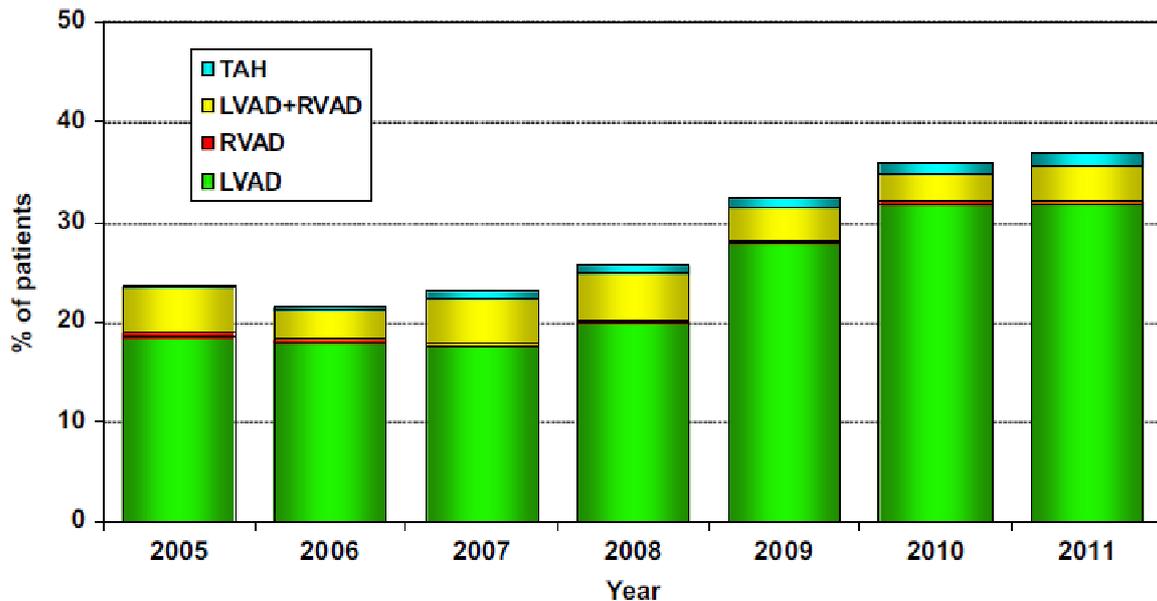
**Abbildung 4: Herz mit implantiertem „Left Ventricular Assist Devices“**

Zu sehen ist ein Herz, bei dem der linken Ventrikel über eine Prothese mit der Aorta ascendens verbunden ist. Ein Kabel verbindet die Pumpe mit einer externen Steuereinheit. (Heart Ware, 2019)

Ein erheblich geringerer Anteil der Patientinnen und Patienten erhält alleinig oder zusätzlich zu dem LVAD einen „Right Ventricular Assist Device“ (RVAD), um das Blut aus dem rechten Ventrikel direkt in den Truncus pulmonalis zu pumpen (Willemsen et al., 2016). Sehr selten wird die Indikation zu einem „Total Artificial Heart“ gestellt. Hierbei wird das orthotope Herz komplett entfernt und durch ein Kunstherz ersetzt (Willemsen et al., 2016).

### 1.2.1 Indikationen

Unterstützungssysteme können bei verschiedenen Indikationen therapeutisch eingesetzt werden. Häufig werden Unterstützungssysteme als „bridge to transplant“ eingesetzt (Yacoub, 2001, Wohlschlaeger et al., 2005, Wilson et al., 2009, Willemsen et al., 2016). Hierbei ist das Ziel, die Wartezeit bis zu einer Herztransplantation zu überbrücken und so die Überlebenschance bis zur Operation zu erhöhen (Yacoub, 2001, Wilson et al., 2009, Willemsen et al., 2016). In den letzten Jahren kam es zu einem Anstieg des Einsatzes von mechanischen Kreislaufunterstützungssystemen vor Durchführung einer Herztransplantation (siehe Abbildung 5), was unter anderem durch den oben beschriebenen Mangel an Herztransplantaten und die daraus folgende verlängerte Wartezeit zu erklären ist (Lund et al., 2013).



**Abbildung 5: Einsatz von Unterstützungssystemen vor Herztransplantation pro Jahr**

Gezeigt sind die Prozent (%) der Patientinnen und Patienten die pro Jahr, zwischen 2005 und 2011, ein Unterstützungssystem zur Überbrückung der Wartezeit bis zu einer Herztransplantation erhielten. 2011 ist der höchste Einsatz zu beobachten.

Abkürzungen: LVAD: Left Ventricular Assist Device; RVAD: Right Ventricular Assist Device; TAH: Total Artificial Heart. (modifiziert nach Lund et al. 2013)

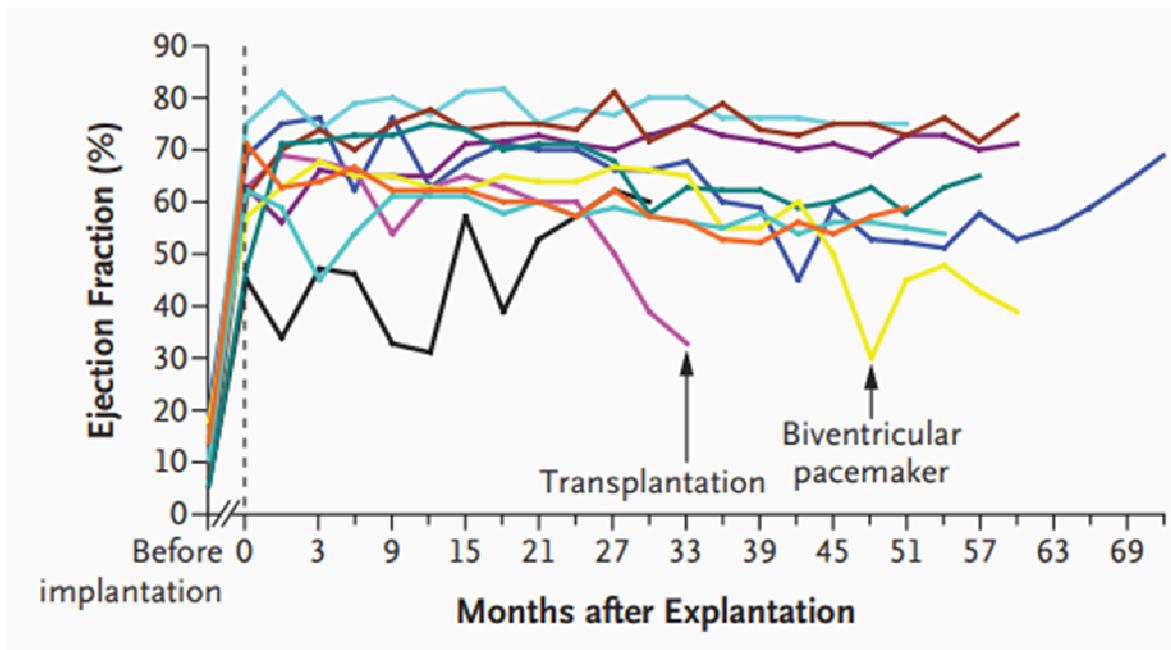
Als „destination therapy“ wird die Nutzung eines Unterstützungssystems in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz bezeichnet (Willemsen et al., 2016, Wilson et al., 2009). Hier kann durch den Einsatz eines VADs die Lebenserwartung gesteigert werden, wenn keine kurative Therapie mehr angestrebt wird. Dies kann unter anderem der Fall sein, wenn Kontraindikationen für eine Herztransplantation bestehen (Lietz et al., 2007, Willemsen et al., 2016).

Bei Patientinnen und Patienten, die aufgrund einer Erkrankung, beispielsweise einer Kardiomyokarditis oder einer dilatativen Kardiomyopathie, vorübergehend eine Unterstützung des Kreislaufes benötigen, können Unterstützungssysteme als „bridge to recovery“ eingesetzt werden. In solchen Fällen kann das Unterstützungssystem bestenfalls nach Erholung wieder entfernt werden (Frazier und Myers, 1999, Kumpati et al., 2001, Wilson et al., 2009).

Die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit einem LVAD führt in einigen Fällen zur Erholung der Pumpfunktion des Herzens und einem Rückgang der pathologischen Hypertrophie (Kirklin et al., 2015, Bruckner et al., 2001, Wohlschlaeger et al., 2005). So ist zu sehen, dass es signifikant häufig zu einer Abnahme des end-diastolischen Volumen (EDV) und einer Verbesserung der Ejektionsfraktion (EF) kommt (Frazier et al., 1996, Frazier und Myers, 1999, Birks et al., 2006). Die Therapie mit einem LVAD kann derart durchschlagend

sein, dass trotz einem vormaligen „bridge to transplant“-Einsatz, keine Herztransplantation mehr notwendig ist (Wohlschlaeger et al., 2005). Außerdem ist es zum Teil auch möglich, nach einer Therapie mit einem LVAD im Sinne einer „destination therapy“, eine Herztransplantation durchzuführen, da bestehende Kontraindikationen unter dieser verschwinden können (Lietz et al., 2007).

Wie Abbildung 6 zeigt, konnte auch nach Explantation der LVADs eine anhaltende Verbesserung der Herzfunktion beobachtet werden. So bleibt die EF auf einem stabil höheren Niveau als vor der LVAD Implantation (Birks et al., 2006).



**Abbildung 6: Die Ejektionsfraktion nach Implantation eines „Left Ventricular Assist Devices“**

Die Ejektionsfraktion (EF) (in %) von farblich markierten Fällen wird dargestellt vor der Implantation und nach der Explantation eines „Left Ventricular Assist Devices“ (LVAD) (0 bis 69 Monate). In allen Fällen ist ein Anstieg der EF zu sehen. In einem Fall (lila) wurde 33 Monate nach LVAD Implantation herztransplantiert, in einem anderen Fall (gelb) wurde nach 45 Monaten ein biventrikulärer Schrittmacher eingesetzt. (Birks et al. 2006)

### 1.2.2 Komplikationen bei der Therapie mit Unterstützungssystemen

Trotz der positiven Auswirkungen die der Einsatz eines Unterstützungssystems auf die Herzfunktion haben kann, gibt es auch Komplikationen, die zum Teil schwerwiegend sind. Häufige Komplikationen sind beispielsweise Infektionen. Diese werden unter anderem durch die permanente Fistel zwischen dem Bauchraum und der Außenwelt durch das Verbindungskabel gefördert (Hannan et al., 2011, Wilson et al., 2009). Außerdem sind Blutungen durch die notwendige Antikoagulation und embolische Ereignisse, ausgelöst durch das Fremdmaterial, möglich (Wilson et al., 2009). Des Weiteren entwickeln etwa 33% aller Patientinnen und Patienten nach der Implantation eines Unterstützungssystems ventrikuläre Arrhythmien (Pedrotty et al., 2013). Die meisten dieser ventrikulären

Arrhythmien treten kurz nach der Implantation auf, wobei das größte Risiko zwischen dem 1. und dem 14. postoperativen Tag liegt (Garan et al., 2015). Diese Herzrhythmusstörungen können zu Rechtsherzversagen führen und sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Pedrotty et al., 2013). Die LVAD assoziierten Arrhythmien gehören zu den häufigsten Todesursachen unter der Therapie mit Unterstützungssystemen (Hill und Olson, 2008, Kirklin et al., 2015).

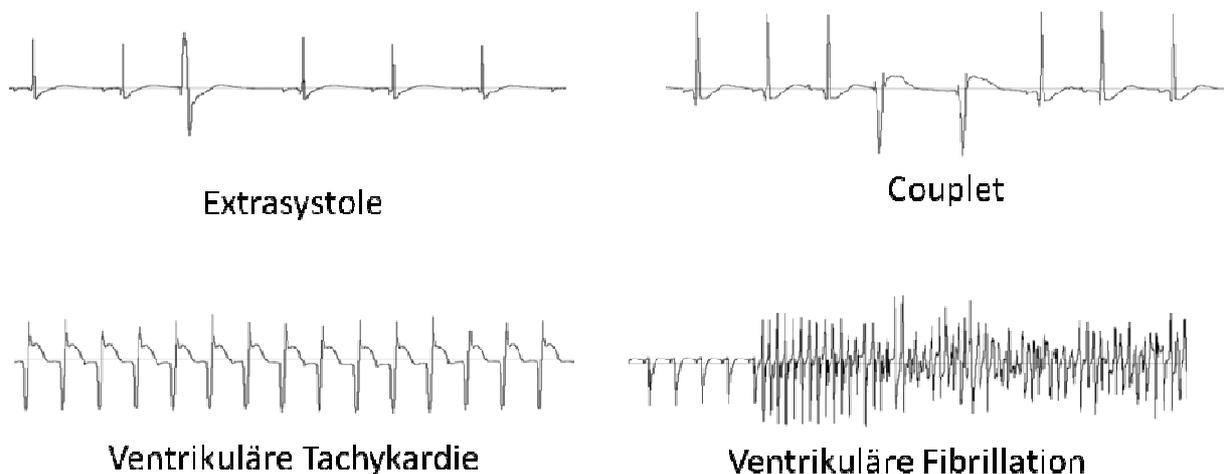
### 1.2.3 Wissenschaftlicher Kenntnisstand der Arrhythmieentstehung

Trotz der klinischen Relevanz der auftretenden Arrhythmien unter LVAD Therapie, entstehend durch die Assoziation mit erhöhter Morbidität und Mortalität (Pedrotty et al., 2013), ist der Pathomechanismus der Arrhythmieentstehung nicht gänzlich bekannt.

In einem Review von Pedrotty et al. (2013) werden 3 Hauptklärungsansätze vorgestellt. Eine Theorie ist, dass durch die Operation und das Einbringen von Fremdmaterial fibrosierende Umbaumaßnahmen stattfinden, die zu Arrhythmien führen könnten. Ebenfalls diskutiert wird, ob die Arrhythmieentstehung direkt mit der Funktionsweise der LVADs zusammenhängt. Bei sogenannten „suction events“, wo es zu gestörten Druckverhältnissen beim Ansaugen des Blutes kommt, kann der Ventrikel in Kontakt mit der Ansaugkanüle kommen und so mechanisch gereizt werden. Aber auch die Entlastung selber und die daraus resultierenden Veränderungen in der Elektrophysiologie könnten ursächlich für die Entstehung von Arrhythmien sein (Pedrotty et al., 2013, Harding et al., 2005).

Um die etwaigen zugrundeliegenden Veränderungen der Elektrophysiologie bei der Therapie mit einem LVAD zu detektieren, betrachteten Harding et al. (2001) sofortige und verspätete Auffälligkeiten im Elektrokardiogramm (EKG) sowie Aktionspotentialveränderungen mittels Patch Clamp Messungen (Harding et al., 2001). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlängerung der korrigierte QT-Zeit (QTc) direkt nach Implantation des LVADs. Interessanterweise veränderten sich diese Werte in die entgegengesetzte Richtung nach ungefähr 1 Woche Entlastungszeit (Harding et al., 2001). Ebenfalls durchgeführte Messungen der Aktionspotentialdauer (APD) in isolierten Kardiomyozyten ergaben eine Verlängerung dieser unter LVAD Therapie (Harding et al., 2001). In einer Folgearbeit von Harding et al. (2005) wurde gezeigt, dass Arrhythmien in LVAD Patientinnen und Patienten vor allem in der frühen Phase nach der LVAD Implantation, also in der Phase der verlängerten Aktionspotentiale und der verlängerten QTc-Zeit, auftraten (Harding et al., 2005). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich beim Fehlen von verlängerten QTc-Zeiten weniger häufig ventrikuläre Arrhythmien entwickelten (Harding et al., 2005). Ein Zusammenhang zwischen einer verlängerten APD und dem Auftreten von Arrhythmien in entlasteten Herzen ist also denkbar.

Des Weiteren hat die Arbeitsgruppe Schwoerer et al. Arrhythmien in Nagern mit atrophischen Herzen nachweisen können (Schwoerer et al., 2017). Die Herzen der Tiere wurden mittels heterotoper Herztransplantation (hHTX) entlastet und EKG Daten durch implantierte EKG Elektroden gemessen. Die Ergebnisse zeigten ein deutlich verlängertes QT-Intervall im EKG der entlasteten Herzen (Schwoerer et al., 2017). Zusätzlich wurden bei diesen Tieren signifikant häufiger Arrhythmien beobachtet als in der Sham operierten Gruppe (siehe Abbildung 7) (Schwoerer et al., 2017). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Arrhythmien eine direkte Folge der Entlastung sein könnten. In dem angewandten Tiermodell sind andere Mechanismen, zum Beispiel Einfluss der Operationsnarbe oder des Fremdmaterial unwahrscheinlich, da auch die Sham Gruppe einer Operation unterzogen wurde und beide Gruppen EKG Elektroden erhielten (Schwoerer et al., 2017).



**Abbildung 7: EKG Beispiele von entlasteten Rattenherzen**

Dargestellt sind eine Extrasystole (oben links), ein Couplet (oben rechts), eine ventrikuläre Tachykardie (unten links) und ventrikuläre Fibrillationen (unten rechts) aus EKG Daten entlasteter Rattenherzen. (unveröffentlichte Daten von Schwoerer et al.)

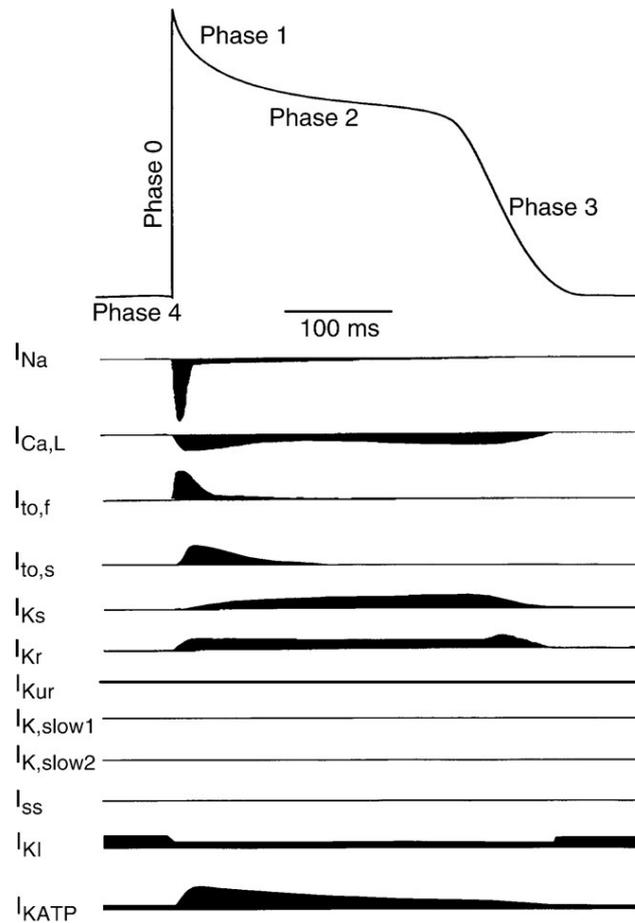
## 1.3 Zelluläre Grundlagen

Veränderungen auf zellulärer Ebene des Herzens können zu Herzrhythmusstörungen führen. So können verlängerte Aktionspotentiale über die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen und auch Veränderungen im Calcium Ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Handling über die Begünstigung von späten Nachdepolarisationen zu Arrhythmien führen (Bers und Despa, 2006, Harding et al., 2001). Wie oben gezeigt, ist es denkbar, dass ein elektrisches Remodeling zur Entstehung der LVAD assoziierten Arrhythmien führt (Pedrotty et al., 2013, Harding et al., 2001, Harding et al., 2005, Schwoerer et al., 2017). Daher werden im folgenden Abschnitt dieser Arbeit die Grundlagen des Aktionspotentials und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling beleuchtet.

### 1.3.1 Das ventrikuläre Aktionspotential

Grundlage für das kardiale Aktionspotential im Ventrikel sind verschiedene Ionenkanäle in der Zellmembran der Kardiomyozyten, die eine selektive Permeabilität für Ionen schaffen (Nerbonne und Kass, 2005, Schram et al., 2002, Fozzard, 2002). Die treibende Kraft für die Bewegung der Ionen über die Zellmembran besteht zum einen aus dem elektrischen und zum anderen aus dem chemischen Gradienten, welche zwischen dem intrazellulären und extrazellulären Raum herrschen (Fozzard, 2002). Der chemische Gradient kommt durch unterschiedliche Konzentrationen der Ionen intrazellulär und extrazellulär zustande. Der elektrische Gradient entsteht durch Potentialunterschiede zwischen dem intrazellulären und extrazellulären Raum. Grundlage hierfür sind die Ladungen der Ionen (Fozzard, 2002).

Da die für das kardiale Aktionspotential relevanten Ionenkanäle in der Zellmembran spannungsabhängig sind, sind diese nicht permanent geöffnet, sondern nur, wenn die zur Aktivierung notwendige Spannung erreicht ist (Fozzard, 2002). Durch die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Ionenkanäle entsteht die typische Form des kardialen ventrikulären Aktionspotentials (siehe Abbildung 8) (Nerbonne und Kass, 2005, Fozzard, 2002). Typischerweise dauert ein kardiales Aktionspotential 100 bis 500ms (Fozzard, 2002). Zwar gibt es Unterschiede zwischen endokardialen und epikardialen Myokardzellen, diese werden aber übersichtshalber außer Acht gelassen (Schram et al., 2002). In Abbildung 8 sind die verschiedenen Phasen des Aktionspotentials mit den zugehörigen Strömen über die Ionenkanäle dargestellt.



**Abbildung 8: Phasen des ventrikulären Aktionspotentials mit den zugehörigen Leitfähigkeiten der Ionenkanäle**

Phase 0 (Depolarisation): Öffnung der spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle mit schnellem Na<sup>+</sup>-Einstrom ( $I_{Na}$ ) nach intrazellulär. Es kommt zum steilen Anstieg des Membranpotentials. Es folgt eine schnelle Inaktivierung der Kanäle.

Phase 1 (initiale Repolarisation): Öffnung der spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle. Transienter K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom ( $I_{to,f/s}$ ) und so initiale Repolarisation. Es folgt eine schnelle Inaktivierung der Kanäle.

Phase 2 (Plateauphase): Öffnung der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mit Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ( $I_{Ca,L}$ ). Gleichzeitiger Beginn des verzögerten K<sup>+</sup>-Ausstroms ( $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$ ) durch Aktivierung der spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle. Das Membranpotential bleibt durch die entgegengesetzten Ströme stabil.

Phase 3 (Repolarisation): Die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle inaktivieren, während die K<sup>+</sup>-Kanäle weiter aktiv sind. Durch den anhaltenden Ausstrom über diese K<sup>+</sup>-Kanäle nähert sich das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential von K<sup>+</sup> an.

Phase 4 (Ruhemembranpotential): Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials durch Ausstrom von K<sup>+</sup> über die Einwärtsgleichrichter ( $I_{K1}$ ). Bei negativem Membranpotential ist dieser geöffnet.

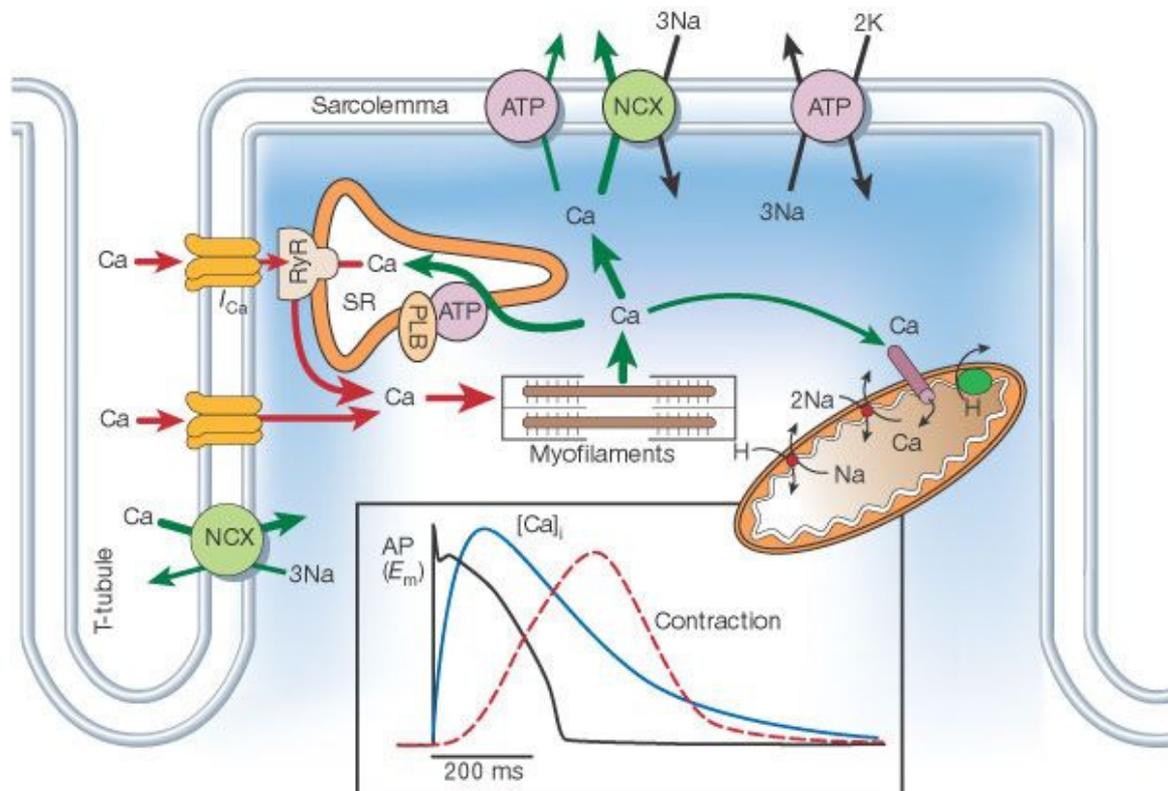
Weitere Abkürzungen:  $I_{Ca,L}$ : Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, L: L-Typ;  $I_{to,f/s}$ : transienter K<sup>+</sup>-Ausstrom, f: schnelle Komponente, s: langsame Komponente;  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{ss}$ : verzögerter K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom, s: langsame Komponente, r: schnelle Komponente, ur: ultra rapid;  $I_{K1}$ : Einwärtsgleichrichter;  $I_{KATP}$ : ATP abhängiger K<sup>+</sup>-Ausstrom. (modifiziert nach Nerbonne und Kass 2005)

### 1.3.2 Das Ca<sup>2+</sup>-Handling

Die Grundlage der Kontraktion der Kardiomyozyten ist die elektromechanische Kopplung (Fozzard, 2002). Den elektrischen Anteil hierbei stellt das Aktionspotential dar. Ca<sup>2+</sup> ist der entscheidende Vermittler der mechanischen Komponente, in dem es an das Troponin C bindet und die so die Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht (Bers, 2008). Eine Übersicht über das Ca<sup>2+</sup>-Handling ist in Abbildung 9 dargestellt (Bers, 2002). Ca<sup>2+</sup> gelangt hauptsächlich über 2 Wege in das Zytosol der Kardiomyozyten. Zum einem von extrazellulär, über den L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal (LTCC) und zum anderen in größeren Mengen, bis zu 90-95% in Mäuseventrikeln, aus dem zytosolischen sarkoplasmatische Retikulum (SR) (Bers, 2008). Die T-Tubuli, in denen die Kanalproteine des LTCC sitzen, bilden mit dem SR eine funktionelle Einheit, das sogenannte Couplon (Bers, 2002). Durch Öffnung der LTCC während der Plateauphase des Aktionspotentials (siehe Abbildung 8) kommt es zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup> von extrazellulär, ihrem elektrochemischen Gradienten folgend, in das Innere der Zelle (Bers, 2002, Nerbonne und Kass, 2005). Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kommt es zur Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Ryanodinrezeptoren (RyR), die in der Membran des SR sitzen (Bers, 2002). Das SR ist der Hauptspeicherort für Ca<sup>2+</sup> in der Zelle. Durch die Öffnung der RyR kommt es zu einem Ausstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem SR in das Zytosol. Die weiter steigende Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Inneren der Zelle führt im Sinne eines Ca<sup>2+</sup>-Sparks zur Öffnung von weiteren RyR (Bers, 2002). Letztlich bindet das ins Zytosol geströmte Ca<sup>2+</sup> an Troponin C, wodurch der Kontraktionszyklus ausgelöst wird (Bers, 2008).

Damit es zur anschließenden Relaxation des Herzens kommt, muss der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom gestoppt und das Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol entfernt werden. Die Inaktivierung des LTCC erfolgt Ca<sup>2+</sup>-abhängig durch die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR (Bers, 2008). Wodurch die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR gestoppt wird, bevor dieses leer ist, ist nicht gänzlich bekannt. Eine Theorie ist, dass die Inaktivierung der RyR abhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SR ist, ein andere, dass auch hier die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration inaktivierend wirkt (Bers, 2008). Der Hauptmechanismus zur Senkung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach der Systole ist der Transport des Ca<sup>2+</sup> zurück in das SR über die Sarcoplasmatic Reticulum Calcium Adenosintriphosphatasen (SERCA). Moduliert wird die Aktivität der SERCA durch das Protein Phospholamban (PLB), welches im dephosphoryliertem Zustand an sie bindet und so ihre Affinität für Ca<sup>2+</sup> senkt (Bers und Despa, 2006). Ist PLB durch die Proteinkinase A (PKA) oder die Calcium/Calmodulin abhängige Kinase (CaMKII) phosphoryliert, so kann es nicht an die SERCA binden und diese ist weniger gehemmt (Bers, 2002, Bers und Despa, 2006). Die Dephosphorylierung von PLB erfolgt durch die Phosphatasen 1 (PP1) und 2A (PP2A). Die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen wird im physiologischen Zustand vor

allein über  $\beta$ -adrenerge Signalwege beeinflusst (Bers, 2002). Zusätzlich zur SERCA sind noch mitochondriale Puffer und die Natrium-Calcium-Austauscher an der Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol beteiligt (Bers, 2002).



**Abbildung 9: Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling im ventrikulären Kardiomyozyt**

Dargestellt ist der T-Tubulus mit den dort sitzenden L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (LTCC), über die es zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom ( $I_{\text{Ca}}$ ) nach intrazellulär kommt. Die LTCC bilden ein Couplon mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), in dessen Membran die Ryanodinrezeptoren (RyR) sitzen. Außerdem ist dort die Sarcoplasmatic Reticulum Calcium Adenosintriphosphatasen (SERCA) lokalisiert, die über Phospholamban (PLB) reguliert wird. Gezeigt wird der Weg von Calcium Ionen ( $\text{Ca}$ ) von extrazellulär, beziehungsweise dem SR, nach intrazellulär, wo es zur Interaktion mit den Myofilamenten kommt. Aus dem Intrazellulärraum entfernt wird das  $\text{Ca}$  unter anderem über die SERCA, das Mitochondrium (Mito) und den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX).

Im unteren Teil der Abbildung ist ein Aktionspotential (AP), die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen intrazellulär ( $[\text{Ca}]_i$ ) und die Kontraktionsstärke zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

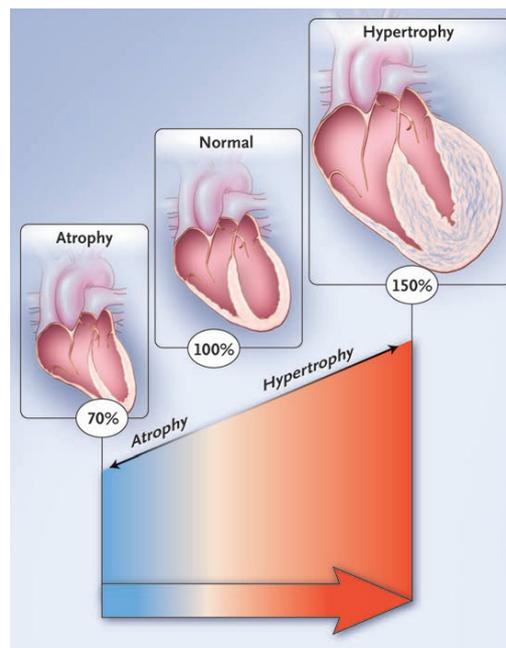
Weitere Abkürzungen: ATP: Adenosintriphosphat; Na: Natrium Ion; H: Wasserstoff; K: Kalium Ion;  $E_m$ : Membranpotential. (Bers 2002)

## 1.4 Kardiale Plastizität

Das Herz ist in der Lage sich an auftretende Veränderungen im Laufe des Lebens anzupassen. Die Reaktion des Herzens auf verschiedene Stimuli, wird als kardiale Plastizität bezeichnet (Hill und Olson, 2008). Wird das Herz belastet, kommt es zu einer Hypertrophie, wird es hingegen entlastet, entsteht eine Atrophie (siehe Abbildung 10) (Hill und Olson, 2008). Da sowohl Hypertrophie, als auch Atrophie kardiale Stresssituationen darstellen, ist es sinnvoll die zellulären Anpassungen beider pathophysiologischen Zustände zu betrachten.

Die kardiale Plastizität ist eine Voraussetzung für die Veränderungen, welche die Herzen unter der Therapie mit LVADs erfahren. Durch die verminderte Arbeit die der linke Ventrikel leisten muss, kommt es zu einer Entlastung. Derartige atrophische Veränderungen können nicht nur durch LVADs entstehen, sondern auch durch lange Bettruhe oder einen Aufenthalt im Weltall (Hill und Olson, 2008).

Auf der anderen Seite kann es durch sportliche Aktivität, Schwangerschaft oder postnatales Wachstum im Herzen zu einer physiologischen Hypertrophie, also einer Vergrößerung der Herzmasse ohne Krankheitswert kommen (Hill und Olson, 2008). Diese Vergrößerung der Muskelmasse ist, wenn der Stimulus wegfällt, reversibel (Dorn, 2007). Als Folge von pathophysiologischen Situationen, wie zum Beispiel neurohumeraler Aktivierung, einem Myokardinfarkt oder einer Hypertonie, kann es am Herzen zu einem Remodeling im Sinne einer pathologischen Hypertrophie kommen (Hill und Olson, 2008). Wenn das Herz dauerhaft diesem pathologischen Stress ausgesetzt bleibt, kann sich aus der Hypertrophie eine Herzinsuffizienz entwickeln (Hill und Olson, 2008).



**Abbildung 10 Die kardiale Plastizität**

Die Muskelmasse im normalen Herzen wird mit 100% dargestellt. Veränderung der Muskelmasse um  $-30\%$  bei Atrophie und  $+50\%$  bei Hypertrophie sind gezeigt. (Hill und Olson 2008)

Die Grundlage der phänotypischen Anpassung an die jeweilige Belastung wird über die Kardiomyozyten vermittelt. Bei Hypertrophie verändert sich der Phänotyp des Herzens durch eine verstärkte Proteinbiosynthese und einer Vergrößerung der Kardiomyozyten (Hill und Olson, 2008). Im Gegenzug dazu verringern sich die Proteinmenge und die Größe der Kardiomyozyten im atrophischen Herzen (Baskin und Taegtmeier, 2011). Der Phänotyp bei Hypertrophie und Atrophie entwickelt sich dementsprechend in unterschiedliche Richtungen.

Ausgehend von dem Prinzip der sich in gegensätzliche Richtungen entwickelnden Phänotypen, wäre auch im Hinblick auf die zellulären Mechanismen eine derartiges Auseinanderdivergieren zu erwarten. Gezeigt wurde allerdings, dass es im Gegensatz zu den sich unterscheidenden Veränderungen des Phänotyps, bei Hypertrophie und Atrophie zu einer identischen Anpassung der Genexpression, mit Ähnlichkeiten zu der im fetalen Herzen, kommt (Depre et al., 1998).

Des Weiteren kommt es bei Belastungssituationen des Herzens zu einem elektrophysiologischen Remodeling und Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Handlings. Bei der kardialen Hypertrophie kommt es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials mit einem 2 bis 4fach vergrößertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die LTCC ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) (Keung, 1989, Wang et al., 2001) sowie einer Abnahme des transienten Kalium Ion ( $\text{K}^+$ ) Ausstroms ( $I_{\text{to}}$ ) (Tomita et al., 1994). Außerdem kann eine vermehrte Füllung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden (Osadchii, 2007). Letzteres resultiert vermutlich aus einer Zunahme der SERCA2A Aktivität durch eine verringerte Inhibition durch das Protein PLB in hypertrophen Kardiomyozyten (Bito et al., 2008, Bokník et al., 2000). Da sowohl der  $I_{\text{Ca,L}}$ , als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR erhöht sind, kommt es zu einer Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Toischer et al., 2010).

Interessanterweise kommt es auch bei der Atrophie des Herzens zu einer Verlängerung des Aktionspotentials. Es konnte gezeigt werden, dass in atrophischen Kardiomyozyten eine vermehrte Expression der LTCC mit vermehrtem  $I_{\text{Ca,L}}$  und eine verringerte Expression der  $\text{K}^+$ -Kanäle mit vermindertem  $I_{\text{to}}$  und  $I_{\text{sus}}$  vorliegt (Schwoerer et al., 2008a, Schwoerer et al., 2013). Die Füllung des SRs mit  $\text{Ca}^{2+}$  war um circa 55% niedriger als in nicht atrophierten Kardiomyozyten (Schwoerer et al., 2013, Schwoerer et al., 2008b). Diese Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Füllung ist vermutlich das Resultat einer gesteigerten PLB Aktivität (Schwoerer et al., 2008b, Ito et al., 2003). Der genaue Mechanismus, der hinter dieser vermehrten Aktivität von PLB steckt, ist nicht bekannt. Postuliert wird eine komplexe Veränderung der Aktivitäten von Kinasen und Phosphatasen mit einer letztlich verminderten Phosphorylierung von PLB (Schwoerer et al., 2008b). Als Folge der geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Füllung sinkt im atrophischen Kardiomyozyten auch die freigesetzte Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR während der Systole (Schwoerer et al., 2013). Diese gegensätzlichen Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes in Atrophie, also die der membranständigen und der intrazellulären Anteile, scheinen jedoch derart gut ausgeglichen zu sein, dass es bei einem gleichbleibenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Vergleich mit nicht atrophierten Kardiomyozyten bleibt (Schwoerer et al., 2013, Baskin und Taegtmeier, 2011).

Zusammenfassend weisen die belastungsabhängigen Veränderungen von Hypertrophie und Atrophie demnach sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Die übereinstimmenden Veränderungen zeigen sich beispielsweise in der Verlängerung der

Aktionspotentiale mit Abnahme des  $I_{to}$  und Zunahme des  $I_{Ca,L}$ . Außerdem konnte eine Wiederkehr zu einem gemeinsamen fetalen Muster der Genexpression in kardialen Stresssituationen gezeigt werden (Depre et al., 1998, Taegtmeyer et al., 2010). Dies führt zu der Überlegung, ob Stresssituationen des Herzens einen identischen Schutzvorgang als Antwort auf die Belastung auslösen (Depre et al., 1998, Taegtmeyer et al., 2010). Unterschiede in der Anpassung sind neben der gegensätzlichen Veränderung des Phänotyps, unter anderem bei den  $Ca^{2+}$ -Transienten zu sehen. So steigt dieser bei Hypertrophie an, bleibt bei Atrophie jedoch unverändert zur Normalsituation (Toischer et al., 2010, Schwoerer et al., 2013).

## 1.5 Herleitung der Fragestellung

Die Herzinsuffizienz gehört aktuell und wird auch in Zukunft zu den häufigsten Todesursachen der Welt zählen (Foreman et al., 2018). Durch die eingeschränkten Möglichkeiten zur Therapie der Herzinsuffizienz und die steigende Diskrepanz zwischen verfügbaren und benötigten Herztransplantaten gewinnt die Therapie mit LVADs an Stellenwert (Lund et al., 2013, Eurotransplant Annual Report, 2015). Die Arrhythmien, die bei etwa 33% der Patientinnen und Patienten unter dieser Therapie entstehen, sind von klinischer Relevanz, da sie mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergehen (Pedrotty et al., 2013). Deswegen ist es von Bedeutung, diese Komplikation besser zu verstehen, um in Zukunft einen Ansatz zur Vermeidung oder zur Behandlung zu finden.

Ein Erklärungsansatz ist, dass es durch die Entlastung selber zu proarrhythmischen Veränderungen der Elektrophysiologie kommt (Pedrotty et al., 2013). Unterstützend zu dieser Theorie konnten verlängerte Aktionspotentiale und QT-Intervalle, sowohl in der klinischen Forschung, als auch in Untersuchungen am Tiermodell gezeigt werden (Harding et al., 2005, Schwoerer et al., 2008a). Ursächlich für die verlängerten Aktionspotentiale könnten verschiedene Veränderungen des  $Ca^{2+}$ -Haushaltes im atrophischen Herzen sein, wie Vorarbeiten von Schwoerer et al. zeigen konnten (Schwoerer et al., 2008a, Schwoerer et al., 2013). So ist ein verstärkter  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die LTCC sowie eine verminderte  $Ca^{2+}$ -Füllung des SR beobachtet worden (Schwoerer et al., 2008a). Zum aktuellen Zeitpunkt ist jedoch noch nicht geklärt, wie die Veränderungen des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Handlings und die Ionenkanalmodulation gekoppelt sind. Da PLB, das Regulationsprotein der SERCA, in entlasteten Herzen deutlich aktiver ist (Schwoerer et al., 2008b), ist es wahrscheinlich, dass PLB eine entscheidende Rolle in den beobachteten Veränderungen spielt.

Daraus folgend stellt sich die Frage, inwieweit PLB an den funktionellen Veränderungen des  $Ca^{2+}$ -Handlings beteiligt ist und so eine Rolle in der Arrhythmieentstehung im entlasteten Herzen spielt. Erkenntnisse zu dieser Frage könnten dabei helfen die Entwicklung von

Therapieoptionen voranzutreiben. Vor dem Hintergrund der oben erläuterten elektrophysiologischen Veränderungen wäre es vorstellbar, dass eine Suppression von PLB ein Behandlungsansatz der Arrhythmien unter LVAD Therapie darstellen könnte.

### 1.5.1 Hypothese

Aus der Fragestellung lässt sich die Hypothese dieser Arbeit formulieren, dass durch die Wegnahme von PLB das mit der Entlastung assoziierte ventrikuläre Remodeling verhindert werden kann.

## 1.6 Experimentelles Vorgehen

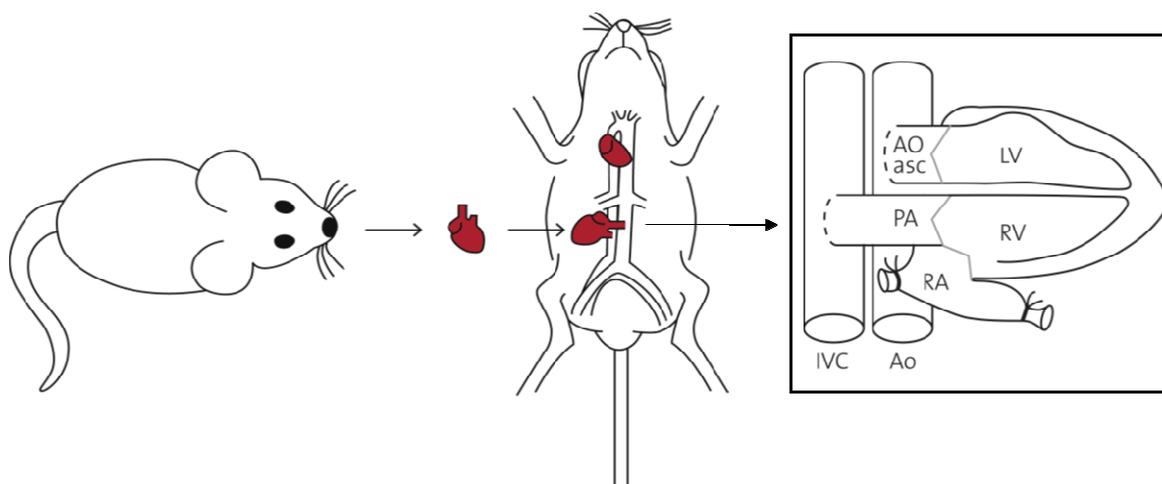
Um die Fragestellung dieser Arbeit beantworten zu können, ist es notwendig, ein geeignetes Tiermodell zu nutzen. Die Nutzung menschlichen Herzgewebes wird durch eine Reihe von Faktoren erschwert. Es ist zwar möglich, nach der Explantation eines LVADs oder des ganzen Herzens, eine Probe des entlasteten Gewebes zu entnehmen, problematisch ist dabei jedoch, dass die Versuchsbedingungen nur unzureichend kontrollierbar sind. Das liegt unter anderem daran, dass die Indikationen für die Implantation eines Unterstützungssystems stark variieren, und dass die Dauer der Entlastung je nach Situation unterschiedlich ist (Willemsen et al., 2016, Wilson et al., 2009). Auch die begleitende medikamentöse Therapie, das Alter, Geschlecht und äußere Faktoren können stark divergieren. Ein weiterer wichtiger Punkt, der die Untersuchung der Fragestellung am Menschen erschwert, sind ethische Aspekte. Bei einem Tiermodell können Parameter wie Alter, Gewicht, Geschlecht und umgebende Faktoren, wie beispielsweise Futter standardisiert werden. Die Maus als Versuchstier hat zusätzlich den großen Vorteil, dass ihr genetischer Code verändert werden kann. So ist es möglich, durch einen Knockout das Protein PLB auszuschalten (Zhao et al., 2003) und dadurch dessen Bedeutung in der Elektrophysiologie im entlasteten Herzen zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die Entlastung von Mäuseherzen mit der hHTX, einer international anerkannten Methode, erreicht (Ito et al., 2003, Schwoerer et al., 2008a, Schwoerer et al., 2008b, Westhofen et al., 2019, Baskin und Taegtmeyer, 2011). Für die Messung elektrophysiologischer Parameter wurde die Microelectrode Array (MEA) System Methode gewählt, mit der aktive Herzschnitte untersucht werden können. Die Methoden wurden sowohl an PLB Wildtyp (PLB<sup>+/+</sup>), als auch an Phospholamban Knockout (PLB<sup>-/-</sup>) Mäusen durchgeführt. Die Grundlagen der genutzten Methoden sowie die Zusammensetzung der Versuchstiergruppen werden im Folgenden kurz erläutert.

### 1.6.1 Grundlagen der heterotopen Herztransplantation

Die hHTX ist die Methode der Wahl zur Entlastung von Herzen im Kleintiermodell (Depre et al., 1998, Ito et al., 2003, Schworer et al., 2008a, Schworer et al., 2008b). Die erste Veröffentlichung dieser Technik erfolgte durch Abbott et al., 1964 in Ratten (Abbott et al., 1964). Weiterentwickelt wurde die Methode von Ono und Lindsey (Ono und Lindsey, 1969). In der Maus wurde die Methode zuerst von Corry und Russell 1973 vorgestellt (Corry et al., 1973).

Das Prinzip dieser Methode, in Abbildung 11 dargestellt, ist, dass das Herz einer Spendermaus an die großen abdominalen Gefäße einer Empfängermaus anastomosiert wird (Westhofen et al., 2019). Durch den veränderten Blutfluss im Spenderherz, im Sinne einer retrograden Perfusion, wird dieses entlastet (Ono und Lindsey, 1969, Corry et al., 1973, Abbott et al., 1964). Da die Transplantation zwischen isogenen Nagern erfolgt, ist keine Immunsuppression notwendig (Abbott et al., 1964).



**Abbildung 11: Die heterotope Herztransplantation**

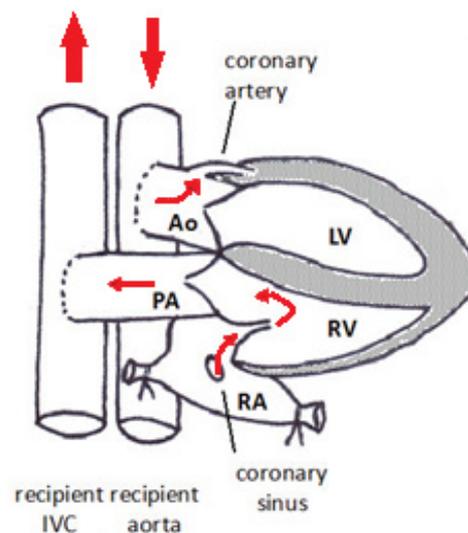
Dargestellt ist eine Spendermaus (links), eine Empfängermaus (mittig) und ein vergrößertes, implantiertes Spenderherz (rechts).

Die Anastomosen werden zwischen der Aorta abdominalis (Ao) der Empfängermaus und der Aorta ascendens (AO asc) des Spenderherzens sowie zwischen der Vena cava inferior (IVC) der Empfängermaus und dem Truncus pulmonalis (PA) des Spenderherzens angelegt.

Weitere Abkürzungen: LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; RA: rechtes Atrium. (modifiziert nach Westhofen et al. 2019)

Im Detail betrachtet werden die Anastomosen, die das Spenderherz mit dem Kreislauf des Empfängertieres verbinden, zwischen der Aorta ascendens des Spenderherzens und der Aorta abdominalis des Empfängertieres sowie dem Truncus pulmonalis des Spenderherzens und der Vena cava inferior des Empfängertieres angelegt (Ono und Lindsey, 1969). Sobald die Zirkulation durch Eröffnung der Operationsklemmen wieder ermöglicht wird, fließt das

Blut durch die Aorta abdominalis des Empfängertieres über die Aorta ascendens in das Spenderherz. Auf Grund der Aortenklappe ist das Blut nicht in der Lage in den linken Ventrikel zu gelangen und fließt daher direkt durch die Koronargefäße über den Koronarsinus in das rechte Atrium des Spenderherzens. Von hier fließt es über den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis zurück in die Blutzirkulation des Empfängertieres (siehe Abbildung 12) (Carr et al., 2014). Als Folge dieser retrograden Perfusion bleibt der linke Ventrikel des Spenderherzens nahezu blutleer und muss kaum mechanische Arbeit leisten.



**Abbildung 12: Der Blutfluss im Spenderherz nach heterotoper Herztransplantation**

Das Blut fließt (rote Pfeile) über die Aorta des Empfängertieres in die Aorta ascendens (Ao) des Spenderherzens, von dort direkt in die Koronargefäße und über den Koronarsinus in das rechte Atrium (RA). Von dort fließt es über den rechten Ventrikel (RV) in den Truncus pulmonalis (PA) und wieder zurück in die Vena cava inferior (IVC) des Empfängertieres.

weitere Abkürzung: LV: linker Ventrikel (modifiziert nach Carr et al. 2014)

## 1.6.2 Elektrophysiologische Messungen von Herzschnitten

Elektrophysiologische Messungen werden seit der Erstetablierung durch Hodgkin und Huxley 1952 in vielen Bereichen der Medizin sowie in der Grundlagenforschung oder auch der Medikamententestung genutzt (Hodgkin und Huxley, 1952). Für kardiologische elektrophysiologische Messungen stehen verschiedenen Zellpräparationen, wie Einzelzellen, Herzschnitte oder Kardiomyozytenkulturen, zur Verfügung (Sallam et al., 2015).

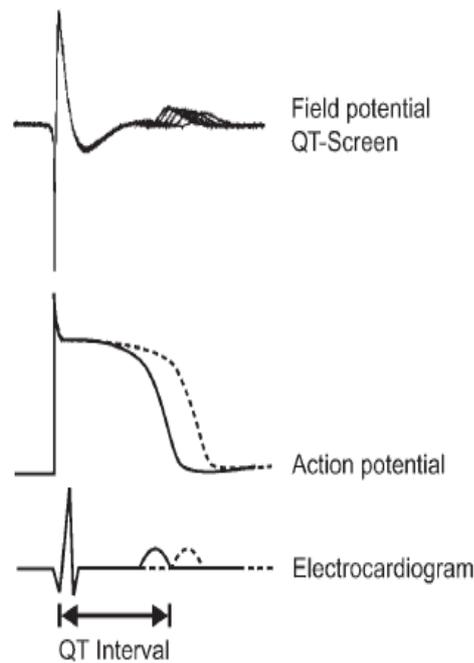
Die erste Zusammenfassung, in Form eines Minireviews der Anwendungen von Herzschnitten wurde 1995 von Parrish et al. publiziert (Parrish et al., 1995). Die weitere Standardisierung der Nutzung von Mausherzschnitten erfolgte unter anderem durch die Arbeitsgruppe Pillekamp et al. (Pillekamp et al., 2005). Sie untersuchte die Herzschnitte mittels Histologie, Immunfärbung und intrazellulären elektrophysiologischen Messungen

(Pillekamp et al., 2005). 2011 veröffentlichten Brandenburger et al. eine Arbeit, in der sie Herzschnitte aus menschlichem Gewebe erfolgreich auf Vitalität prüften (Brandenburger et al., 2012). An Herzschnitten können sowohl intrazelluläre, mittels „Sharp electrode“, als auch extrazelluläre elektrophysiologische Untersuchungen, mittels MEA System, durchgeführt werden (Pillekamp et al., 2005).

### 1.6.3 Grundlagen der MEA System Messungen

Die Methode zur Messung von elektrischer Aktivität mit MEAs wurde im Jahr 1972 von Thomas et al. vorgestellt und in den letzten Jahrzehnten immer weiter vorangetrieben (Thomas et al., 1972). Die nicht-invasive Methode misst elektrische Signale von beispielsweise kardialen Zellen mit Hilfe von extrazellulären Elektroden (Thomas et al., 1972, Sallam et al., 2015). Ausgenutzt wird dabei die Tatsache, dass bei jeder elektrischen Aktivität der Kardiomyozyten ein Stromfluss in der leitenden extrazellulären Flüssigkeit entsteht. Jeder Stromfluss ist begleitet von einem Spannungsgradienten, der über die extrazellulären Elektroden des MEAs detektiert werden kann (Stett et al., 2003). Anders als bei intrazellulären Messmethoden erfolgt also kein Durchstechen der Zellmembran.

Die extrazellulären Signale die mit dem MEA System gemessen werden, sind sogenannte Feldpotentiale (Meyer et al., 2004). Diese Feldpotentiale entsprechen der ersten Ableitung von Aktionspotentialen (Halbach et al., 2003). Optisch erinnern Feldpotentiale an EKG Kurven. Dies wird dadurch verständlich, dass EKG Messungen, genau wie MEA System Messungen, extrazellulär erfolgen und beide sich so in ihren Eigenschaften ähneln (Sallam et al., 2015). Frühere Publikationen haben gezeigt, dass Feldpotentiale in Bezug auf Form, Dauer und Antwort auf pharmakologische Applikationen ein vergleichbares Verhalten wie Aktionspotentiale zeigen (siehe Abbildung 13) (Meyer et al., 2004). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Veränderungen der Aktionspotentiale in Veränderungen der Feldpotentiale wiedergespiegelt werden (Meyer et al., 2004, Tertoolen et al., 2018, Bussek et al., 2009).



**Abbildung 13: Zusammenhang von Feldpotential, Aktionspotential und QT-Intervall**

Dargestellt ist der Vergleich der gemessenen Potentiale, Feldpotentials (oben), Aktionspotential (mittig), QT-Intervall (unten), jeweils ohne und mit (gestrichelt) Kaliumionkanalblocker HMR1098. (modifiziert nach Meyer et al. 2004)

Ferner entspricht das QT-Intervall im EKG der ventrikulären Repolarisation und somit der APD (Pedrotty et al., 2013, Harding et al., 2005). Daraus folgt, dass Veränderungen des einen Parameters durch Messung des anderen detektiert werden können (Pedrotty et al., 2013, Tertoolen et al., 2018) und auch Feldpotentiale die Charakteristiken von QT-Intervallen widerspiegeln (Navarrete et al., 2013, Sallam et al., 2015, Caspi et al., 2009). Diese Zusammenhänge sind bei der Betrachtung von Arrhythmien nützlich, da verlängerte QT-Intervalle als proarrhythmisch gelten (Meyer et al., 2004, Nattel et al., 2007). Des Weiteren zeigen Vorarbeiten mit Verwendung von MEA Systemen die Möglichkeit auf proarrhythmische Komponenten und tatsächliche Arrhythmien, zum Beispiel durch pharmazeutische Einflüsse, zu detektieren (Sallam et al., 2015, Stett et al., 2003, Navarrete et al., 2013).

Insgesamt ist zu sagen, dass Feldpotentiale und etwaige Veränderungen dieser geeignet sind, das zelluläre Remodeling bei Atrophie abzubilden.

#### 1.6.4 Planung der Versuchstiergruppen

In dieser Arbeit sollte sowohl der Einfluss der Entlastung als auch der des Knockouts von PLB betrachtet werden. Daher ergaben sich 4 Versuchstiergruppen bestehend aus: orthotope PLB<sup>+/+</sup>, heterotope PLB<sup>+/-</sup>, orthotope PLB<sup>-/-</sup> und heterotope PLB<sup>-/-</sup> Tieren.

Aus früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe Schwoerer et al. geht hervor, dass sich sowohl Aktionspotentiale als auch QT-Intervalle, im entlasteten Zustand verlängern (Schwoerer et al., 2017, Schwoerer et al., 2008a). Aktionspotentiale von entlasteten Rattenkardiomyozyten zeigten eine Verlängerung von mehr als 50%, in Versuchstiergruppen mit 4 entlasteten Herzen und 3 Kontrollherzen (Schwoerer et al., 2017, Schwoerer et al., 2008a). In EKG Daten von 8 entlasteten Rattenherzen zeigte sich zusätzlich eine QT-Intervall Verlängerung von ungefähr 65% im Vergleich zu 8 Kontrollherzen (Schwoerer et al., 2017). Da die Länge von Feldpotentialen weitestgehend der von Aktionspotentialen und daher auch der von QT-Intervallen entspricht (siehe Abbildung 13), ist in dieser Arbeit eine ähnlich starke Veränderung zu erwarten. Diese sollte schon bei einer Versuchstiergruppengröße von jeweils 5 Tieren zu beobachten sein. Eine höhere Anzahl, wie beispielsweise bei den EKG Daten (Schwoerer et al., 2017), ist auf Grund der starken Signifikanz der APD Verlängerung in den Vorarbeiten in dieser Arbeit und in Hinblick auf die Invasivität der Versuche nicht notwendig.

Geplante Gruppengröße:

1. orthotope PLB<sup>+/+</sup> Tiere, Anzahl (n)=5
2. orthotope PLB<sup>-/-</sup> Tiere, n=5
3. heterotope PLB<sup>+/-</sup> Tiere, n=5
4. heterotope PLB<sup>-/-</sup> Tiere, n=5

#### 1.7 Arbeitsplan

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Rolle des intrazellulären Proteins PLB bei den beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen entlasteter Herzen.

Zur Testung der oben formulierten Hypothese wurde diese Arbeit in 2 Teile gegliedert. Zuerst sollte die Methodenetablierung erfolgen und anschließend die MEA System Messungen an entlasteten PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup> Herzschnitten durchgeführt werden. Die Untersuchung der Auswirkung eines Knockouts von PLB auf das Remodeling bei Entlastung scheint sinnvoll, da Vorarbeiten deutliche Veränderungen des Ca<sup>2+</sup>-Handlings und der Aktivität von PLB

zeigen (Schwoerer et al., 2008b). PLB ist ein wichtiges Regulatorprotein der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, sodass es vorstellbar ist, dass in  $\text{PLB}^{-/-}$  Mäuseherzen veränderte Feldpotentialdauern (FPD) zu sehen sind. Die FPD wird in dieser Arbeit als übergeordneter Parameter für ein stattgefundenes Remodeling gewertet.

### 1.7.1 Methodenetablierung

Das 1. Ziel dieser Arbeit war die Methodenetablierung. Darunter zählen die Organpräparation und das Präparieren von adulten Mäuseherzschnitten sowie die MEA System Messungen. Die elektrophysiologische Messmethode mit dem MEA System ist insbesondere an adulten Mäuseherzschnitten noch nicht weit verbreitet, was eine Etablierungsphase notwendig machte.

Fragestellungen:

- Überleben die adulten Ventrikel die Organentnahme und die Schneideprozedur?
- Zeigen die adulten Mäuseherzschnitte eine Spontanaktivität?
- Lassen sich Feldpotentiale an adulten Mäuseherzschnitten mit dem MEA System messen?
- Lassen sich allgemeingültige Einschlusskriterien für die Auswertung der FPD formulieren?
- Sind die Feldpotentiale reproduzierbar und stabil messbar?

### 1.7.2 MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuseherzschnitten

Das 2. Ziel dieser Arbeit war es MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen  $\text{PLB}^{+/+}$  sowie  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzschnitten durchzuführen. MEA System Messungen an heterotopen Herzschnitten sowie Mäuseherzen einer Knockout-Linie wurden zum aktuellen Stand der Forschung noch nicht veröffentlicht. Zum ersten Mal sollte zudem die entlastungsabhängige Verlängerung der elektrischen Potentiale in Mäuseherzen gezeigt werden.

Fragestellungen:

- Funktioniert die Translation des Tiermodells von der Ratte auf die Maus?
- Zeigt sich in entlasteten Mäuseherzen eine verlängerte FPD?
- Unterscheiden sich die FPD zwischen den Genotypen  $\text{PLB}^{+/+}$  und  $\text{PLB}^{-/-}$  im orthotopen und entlasteten Zustand?
- Gibt es eine Frequenzabhängigkeit der FPD und bestehen Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchslösungen

	Zielkonzentration	Molmasse	Herstellfirma	Bestellnummer
	mmol/l	g/mol		
<b>Natriumchlorid</b>	<b>155</b>	58,44	J.T.Baker	10284640
<b>Kaliumchlorid</b>	<b>5,4</b>	74,56	Merck	104936
<b>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</b>	<b>1</b>	203,30	Merck	105833
<b>Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat</b>	<b>0,33</b>	137,99	Merck	106346
<b>Glucose</b>	<b>10</b>	180,16	Merck	108337
<b>HEPES</b>	<b>10</b>	238,30	Sigma	H3375
<b>Calciumchlorid</b>	<b>0 - 0,9</b>	110,89	Merck	102391
<b>2,3-Butanedione-Monoxim</b>	<b>30</b>	101,10	Sigma	B0753

Tabelle 1: Schneidepuffer

Dargestellt sind die Chemikalien mit zugehöriger Zielkonzentrationen, Molmasse, Herstellfirma und der jeweilige Bestellnummer.

	Zielkonzentration	Molmasse	Herstellfirma	Bestellnummer
	mmol/l	g/mol		
<b>Natriumchlorid</b>	<b>155</b>	58,44	J.T.Baker	10284640
<b>Kaliumchlorid</b>	<b>5,4</b>	74,56	Merck	104936
<b>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</b>	<b>1</b>	203,30	Merck	105833
<b>Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat</b>	<b>0,33</b>	137,99	Merck	106346
<b>Glucose</b>	<b>10</b>	180,16	Merck	108337
<b>HEPES</b>	<b>10</b>	238,30	Sigma	H3375
<b>Calciumchlorid</b>	<b>0,9</b>	110,89	Merck	102391
<b>2,3-Butanedione-Monoxim</b>	<b>30</b>	101,10	Sigma	B0753

Tabelle 2: Ruhepuffer

Dargestellt sind die Chemikalien mit zugehöriger Zielkonzentrationen, Molmasse, Herstellfirma und der jeweilige Bestellnummer.

	Zielkonzentration	Molmasse	Herstellfirma	Bestellnummer
	mmol/l	g/mol		
<b>Natriumchlorid</b>	<b>155</b>	58,44	J.T.Baker	10284640
<b>Kaliumchlorid</b>	<b>5,4</b>	74,56	Merck	104936
<b>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</b>	<b>1</b>	203,30	Merck	105833
<b>Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat</b>	<b>0,33</b>	137,99	Merck	106346
<b>Glucose</b>	<b>10</b>	180,16	Merck	108337
<b>HEPES</b>	<b>10</b>	238,30	Sigma	H3375
<b>Calciumchlorid</b>	<b>1,8</b>	110,89	Merck	102391
<b>2,3-Butanedione-Monoxim</b>	<b>30</b>	101,10	Sigma	B0753

**Tabelle 3: Färbepuffer**

Dargestellt sind die Chemikalien mit zugehöriger Zielkonzentrationen, Molmasse, Herstellfirma und der jeweilige Bestellnummer.

	Zielkonzentration	Molmasse	Herstellfirma	Bestellnummer
	mmol/l	g/mol		
<b>Natriumchlorid</b>	<b>110</b>	58,44	J.T.Baker	10284640
<b>Kaliumchlorid</b>	<b>5,3</b>	74,56	Merck	104936
<b>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</b>	<b>0,8</b>	246,48	Merck	105886
<b>Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat</b>	<b>0,9</b>	137,99	Merck	106346
<b>Calciumchlorid</b>	<b>1,8</b>	110,98	Merck	102391
<b>Natriumhydrogen-carbonat</b>	<b>44</b>	84,01	Merck	106329

**Tabelle 4: Messpuffer (DMEM ohne Serum)**

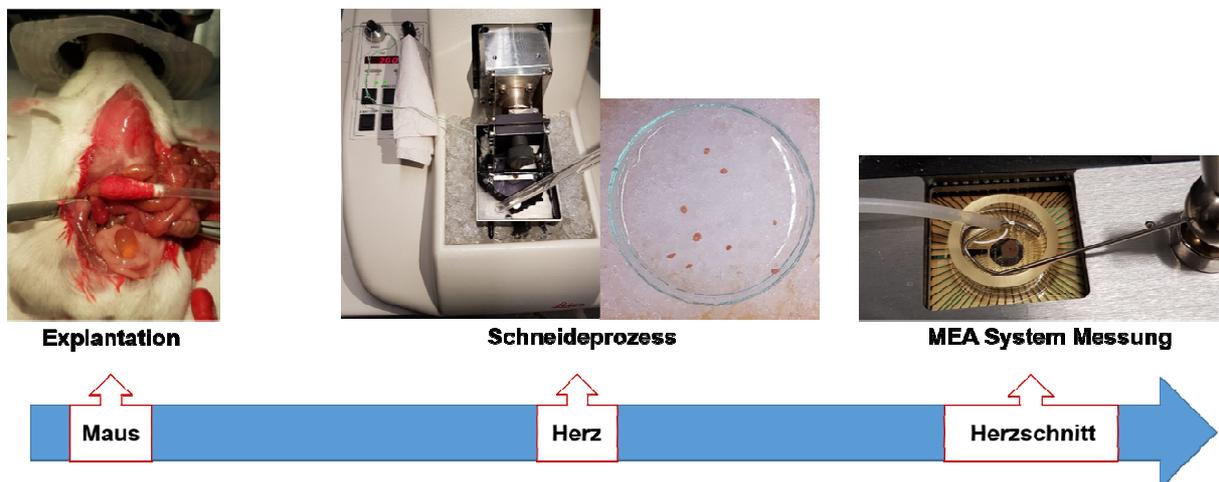
Dargestellt sind die Chemikalien mit zugehöriger Zielkonzentrationen, Molmasse, Herstellfirma und der jeweilige Bestellnummer.

Sowohl der *Schneidepuffer* (siehe Tabelle 1) als auch der *Ruhepuffer* (siehe Tabelle 2) wurden nach dem Ansetzen für 15 Minuten mit O<sub>2</sub> begast. Die beiden Puffer sind in der Zusammensetzung der Chemikalien identisch. Allerdings folgte die pH-Wert Einstellung, auf pH=7,4, bei unterschiedlichen Temperaturen, da die Lösungen unter verschiedenen Bedingungen genutzt wurden. Der *Schneidepuffer* wurde vor der pH-Wert Einstellung auf

4°C gekühlt, der *Ruhepuffer* bei Raumtemperatur eingestellt. Der *Messpuffer* (siehe Tabelle 4) wurde vor Gebrauch für 15 Minuten mit einem Gasgemisch aus 80% O<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> begast. Der *Färbepuffer* (siehe Tabelle 3) wurde ohne zusätzliche Begasung verwendet.

## 2.2 Zeitlicher Ablauf der experimentellen Arbeit

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, um sich der übergeordneten Fragestellung zu nähern. Übersichtshalber ist der grobe Ablauf der Reihenfolgen der Versuche in Abbildung 14 dargestellt. Die Herzen, an welchen die FPD mittels MEA System Messung bestimmt werden sollte, wurden der Maus zunächst entnommen, anschließend mittels Vibratom geschnitten und schlussendlich der elektrophysiologischen Messung unterzogen (siehe Abbildung 14). Im Rahmen der Methodenetablierung wurde zu Beginn dieser Arbeit nach der Schneidprozedur anstelle der MEA System Messungen zunächst eine Vitalitätsfärbung durchgeführt.



**Abbildung 14: Übersicht über die Schritte der Versuchsdurchführung dieser Arbeit**

Dargestellt ist ein Zeitstrahl mit den einzelnen Abschnitten der Versuche, darüber Beispielfotos.

Links auf dem Zeitstrahl steht die Maus, der ein Herz explantiert wird. Darüber ist ein Foto der eröffneten Maus während der Explantation abgebildet.

Auf dem Zeitstrahl folgt das Herz, welches dem Schneidprozess unterzogen wird. Darüber ist zum einen ein Foto des Schneidegeräts (Leica VT 1000s) abgebildet, zum anderen ein Foto einer Petrischale mit mehreren Herzstücken abgebildet.

Im letzten Schritt werden Microelectrode Array (MEA) System Messungen an dem Herzschnitt durchgeführt. Es ist ein Foto der Headstage mit einem im MEA platzierten Herzschnitt abgebildet. (eigene Fotos)

Bei Verwendung von heterotopen Herzen wurde der Tag, an dem die hHTX durchgeführt wurde als Tag 0 definiert. Nach einem anschließenden 14tägigen Entlastungszeitraum wurden die Herzen entnommen und die weiteren Versuche durchgeführt (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Der Versuchszeitplan**

Dargestellt sind 2 Zeitstrahlen mit heterotoper Herztransplantation (hHTX) an Tag 0 und Herzentnahme mit Microelectrode Array (MEA) System Messungen Tag 14. Der obere Zeitstrahl zeigt das Vorgehen bei Phospholamban Wildtyp (PLB<sup>+/+</sup>), der untere bei Phospholamban Knockout (PLB<sup>-/-</sup>) Tieren.

Die orthotopen Kontrollherzen wurden für die Versuche entnommen, sobald die Tiere sich im selben Alter wie die Tiere der entlasteten Herzen befanden. Ein gleichzeitiges Messen des orthotopen und heterotopen Herzens des Empfängertieres war logistisch nicht möglich, da lediglich ein MEA System mit einer Headstage für ein MEA zur Verfügung stand. Es gibt aber keine Hinweise darauf, dass ein orthotopes Herz von einem Tier im selben Alter weniger gut als Kontrolle geeignet ist.

## 2.3 Versuchstiere

### 2.3.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche und männliche Mäuse, gezüchtet in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf, ab einem Alter von 7 Wochen verwendet. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor ihrem Operationstermin aus der Forschungstierhaltung abgeholt, um eine Gewöhnung an die neue Umgebung zu erreichen. Vor der Operation wurden die Tiere in Gruppen bis zu 4 Tieren, danach einzeln in Standardkäfigen (Typ II long, Euronorm) gehalten. Die Käfige waren ausgestattet mit Holzgranulasteinstreu, Nestbaumaterial und einem Häuschen und wurden wöchentlich gewechselt. Futter (ROD 16-R LASQCdiar®) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung und es erfolgte eine tägliche Kontrolle zur Sicherstellung der Versorgung. Die Temperatur des Raumes lag immer zwischen 20 und 24°C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 45 und

65%. Zusätzlich unterlag der Raum einem 12 stündigem Tag-/Nacht-Rhythmus. Vor der Operation wurden die Tiere mindestens einmal in der Woche gewogen, postoperativ täglich.

### 2.3.2 Knockout und Genotypisierung

Es wurden Tiere der Linie FVB.129S2-Pln<sup>tm1Egk</sup>/Mmmh genutzt. Erstmals wurde dieser Knockout durch Luo et al. beschrieben (Luo 1994). Bestellt wurden männliche Spermien von der Firma „Mutant Mouse Regional Resource Centers“, USA. Dieses Genmaterial wurde mittels Embryotransfer in FVB Mäuse, gezüchtet in der Forschungstierhaltung, eingebracht. Alle Tiere wurden einmal nach der Geburt und ein weiteres Mal direkt vor den Versuchen genotypisiert, was standardmäßig mittels Westernblot erfolgte. Diese doppelte Kontrolle wurde durchgeführt, um sicherzugehen, dass die Gruppeneinteilung korrekt war. Als Material wurden Ohrproben verwendet.

## 2.4 Heterotope Herztransplantation nach Ono und Lindsey

### 2.4.1 Narkose

Vor Beginn des operativen Eingriffes wurde das Tier gewogen und die notwendige Dosis der Medikamente unter Berücksichtigung des entsprechenden Körpergewichts ermittelt. 30 Minuten vor Operationsbeginn erhielt das Tier eine Schmerzbehandlung mit Buprenorphin (Temgesic, 0,1mg/kg KG subcutan) zur Analgesie sowie eine Blutverdünnung mit Heparin (500 IE intraperitoneal). Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung in einer Narkosebox aus Plexiglas mit Isofluran (4-5%ig). Nachdem die Narkoseeinleitung abgeschlossen war, wurde das Tier mittels Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Die Narkose wurde mit Isofluran (1,5-3%ig) über eine Atemmaske aufrechtgehalten. Vor dem ersten Schnitt erfolgte standardmäßig eine Reflextestung, um sicherzustellen, dass sich das Tier im chirurgischen Toleranzstadium befand. Das Empfängertier, das nach der Operation wieder aufwachen sollte, erhielt zusätzlich zum Buprenorphin noch eine Carprofenanalgesie (5mg/kg KG subcutan) ebenfalls 30 Minuten vor Operationsbeginn sowie eine einmalige antibiotische Abdeckung mit Baytril (2,5%ig 0,3ml/kg KG subcutan). Zum Schutz der Augen vor Austrocknung während der Narkose wurde eine Augensalbe (Bepanthen) appliziert.

### 2.4.2 Entnahme des Spenderherzens

Mit Hilfe von Enthaarungscreme (Veet) wurden die Haare des Tieres im Thoraxbereich entfernt und die enthaarte Haut anschließend desinfiziert (Octenisept, Schülke). Danach erfolgte ein Hautschnitt median über dem Sternum vom Processus xyphoideus bis zum Hals. Die Thoraxeröffnung erfolgte mittels medianer Sternotomie. Die Rippenbögen wurden seitlich durchtrennt und beidseits aufgeklappt, wodurch das Herz freigelegt wurde. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Herz regelmäßig durch sterile eiskalte Natriumchloridlösung gekühlt.

Die Vena cavae inferiores und superiores wurden ligiert und abgesetzt. Die Aorta ascendens wurde unterhalb des Truncus brachiocephalicus und die Arteria pulmonalis unterhalb der Pulmonalisgabel abgesetzt. Zum Schluss wurden die Vena pulmonales ligiert und abgesetzt. Anschließend wurde das Herz entnommen, mit eiskalter Natriumchloridlösung gespült und in dieser bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Spenderherzen wurden alle vor der Implantation mit einer Feinwaage gewogen.

Die Entnahme der orthotopen Kontrollherzen erfolgte analog zur Entnahme des Spenderherzens. Auch die orthotopen Herzen wurden mit einer Feinwaage gewogen.

#### 2.4.3 Vorbereitung des Empfängertieres und Implantation des Spenderherzens

Mit einer Enthaarungscreme (Veet) wurden die Haare des Tieres diesmal im Bauchbereich entfernt und die Haut dort anschließend desinfiziert (Octenisept, Schülke). Es erfolgte ein Hautschnitt median abdominell vom Os pubis bis zum Processus xyphoideus des Sternums. Nach Reinigung des Operationsbesteckes von Haarresten wurde das Peritoneum eröffnet. Mittels Wundspreizern wurden Hautschicht und Muskelschicht seitlich fixiert. Anschließend wurde mit Wattestäbchen der Darm aus dem Abdomen luxiert und in feuchte Kompressen gehüllt. Während der gesamten Dauer der Operation erfolgte eine regelmäßige Befeuchtung des luxierten Darmes mit kalter Natriumchloridlösung (J.T. Baker). Nach Eröffnung der Faszie oberhalb der infrarenalen Aorta abdominalis und der Vena cava inferior wurden die beiden Gefäße vorsichtig freipräpariert. In einigen Fällen wurden die Abgänge der Gefäße mit einem Elektrokauter verödet. Die Aorta abdominalis und Vena cava inferior wurden nacheinander mit einer feinen Schere eröffnet und die Anastomosen zu den Gefäßen des Spenderherzens wurden genäht (10-0 Nylon Schwarz). Anschließend wurden die Klemmen gelöst, woraufhin die Koronarperfusion des Spenderherzens wieder einsetzte. Am Ende wurde der Darm zurück ins Abdomen positioniert und die Muskelschicht und Hautschicht vernäht. Das operierte Tier erhielt anschließend eine Volumensubstitution von 0,5ml erwärmter Natriumchloridlösung (J.T. Baker) subcutan, wurde auf eine Wärmeplatte gesetzt und mit Rotlicht bestrahlt.

#### 2.4.4 Postoperatives Schmerzmanagement und Nachsorge der operierten Tiere

Nach der Operation wurde der Zustand des Tieres täglich mit Hilfe eines Scoringbogens kontrolliert. Dabei wurde Fokus auf das Gewicht, das Allgemeinbefinden und die operationsspezifischen Nebenwirkungen gelegt. Die Handlungsmaßnahmen zu dem jeweiligen Scoringwerten sind auf dem Bogen aufgeführt. Zur Schmerztherapie erhielten die Tiere in den ersten 3 Tagen postoperativ Buprenorphin (Temgesic 0,1mg/kg KG subcutan, alle 8 Stunden) sowie in den ersten 7 Tagen zusätzlich Metamizol oral (300mg/kg KG) über mit Süßstoff angereichertes Trinkwasser.

## 2.5 Explantation der heterotopen Herzen

Die heterotopen Herzen wurden nach einem Entlastungszeitraum von 14 Tagen explantiert. Jedes Tier wurde vor der Operation gewogen und bekam an sein Gewicht angepasst 30 Minuten vor Operationsbeginn Buprenorphin (Temgesic; 0,1mg/kg KG subcutan) zur Analgesie sowie Heparin (500 IE intraperitoneal) zur Antikoagulation, injiziert. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Narkosebox aus Plexiglas mit Isofluran (4-5%ig) und wurde anschließend bei 5-7% aufrechtgehalten, um eine tiefe Narkose, bei Opferung des Tieres, zu gewährleisten. Vor dem ersten Schnitt erfolgt die Reflextestung, um das Erreichen der chirurgischen Toleranz sicherzustellen. Zur Lokalisation des Spenderherzens wurde vor dem ersten Schnitt das Abdomen des Tieres palpirt, um Verletzungen durch chirurgisches Besteck zu verhindern. Anschließend erfolgte die Desinfektion der Haut. Der Hautschnitt erfolgte longitudinal vom Os pubis bis zum Processus xyphoideus des Sternums. Es folgte ein longitudinaler Muskelschnitt mit Eröffnung des Peritoneums. Die Hautschicht und Muskelschicht wurden mittels Klemmen fixiert. Das heterotope Herz wurde aufgesucht, dazu wurde der Darm vorsichtig aus der Bauchhöhle präpariert. Die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior des Empfängertieres mussten aufgesucht und abgeklemmt werden. Das heterotope Herz wurde dann herznah abgesetzt und im eiskalten *Schneidepuffer* blutleer gedrückt. Anschließend wurde es vorsichtig trocken getupft und mit einer Feinwaage gewogen.

Es erfolgte keine Wiederherstellung der Lebensfunktion.

## 2.6 Schneiden von Herzgewebe

Die Vorbereitung der Herzen wurde gleichermaßen für heterotope und orthotope Herzen vorgenommen. Das Schneiden des Herzgewebes erfolgt mit einem Leica VT 1000s Vibratom (siehe Abbildung 16).

Nach der Entnahme des Herzens wurden mittels eines Skalpells die Atrien von den Ventrikeln getrennt. Die Atrien wurden verworfen. Die Ventrikel wurden in einer selbstentwickelten Halterung befestigt und mit 37°C warmer 4%iger low-melt Agarose (Roth) übergossen. Um die Erhärtung der Agarose zu beschleunigen, wurde die Halterung inklusive des Herzens auf Eis gelagert. Nach abgeschlossener Erhärtung der Agarose wurde das Herz in dem Agaroseblock auf der vorgekühlten Plattform des Vibratoms mit Cyanoacrylat Kleber (3M™) befestigt. Als Schneidmesser wurde eine handelsübliche Rasierklinge (Wilkinson) verwendet, die vor jeder Anwendung mit 70%igem Ethanol entfettet und nach jeder Anwendung ausgetauscht wurde.

Während des Schneidens war das Herz ständig mit eiskaltem *Schneidepuffer* bedeckt, welcher dauerhaft mit O<sub>2</sub> begast wurde. Durch den Kontraktionsblocker, 2,3-Butanedione Monoxim (BDM), der Bestandteil des *Schneidepuffers* war, wurden für das Gewebe schädliche Kontraktionen verhindert (Bussek et al., 2009). Analog zu anderen Arbeitsgruppen wurde zunächst ein *Schneidepuffer* mit 0mM Ca<sup>2+</sup> verwendet (Pillekamp et al., 2005, Halbach et al., 2006). Bei ausbleibendem Erfolg der MEA System Messungen wurde im Verlauf auf einen *Schneidepuffer* mit einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,9mM gewechselt, welcher bei allen dargestellten Ergebnissen verwendet wurde (Brandenburger et al., 2012).

Das Herz wurde in der transversal Ebene in 300µm dicke Schnitte geschnitten. Das Schneiden erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,07mm/s und 81Hz Vibration (Brandenburger et al., 2012).



**Abbildung 16: Das Vibratom (Leica VT 1000s)**

Das linke Foto zeigt das Vibratom während der Schneideprodukt. Rechts ist die Vergrößerung des in Agarose fixierten Herz auf der Vibratomplattform im *Schneidepuffer* zu sehen. (eigene Fotos)

Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit Hilfe einer Glaspipette (Pasteur) in den bei Raumtemperatur gelagerten, ebenfalls mit O<sub>2</sub> begasten, *Ruhepuffer* überführt (siehe Abbildung 17). Vor der weiteren Nutzung mussten die Schnitte mindestens 30 Minuten in dem *Ruhepuffer* inkubieren.



**Abbildung 17: Ein Herzschnitt im Ruhepuffer**

Abgebildet ist ein mit *Ruhepuffer* gefülltes Becherglas mit eingehängtem O<sub>2</sub> Begasungsschlauch. In dem Becherglas sind die Herzschnitte vor den Microelectrode Array System Messungen gelagert. In einer Pinzette ist ein Herzschnitt zur besseren Darstellung angehoben. (eigenes Foto)

## 2.7 MTT Vitalitätstest

Der MTT Vitalitätstest ist ein etabliertes Verfahren, welches bereits in Vorarbeiten für die Testung der Vitalität von Herzschnitten genutzt wurde (Brandenburger et al., 2012).

Mit Hilfe des Vitalitätstests sollte geprüft werden, ob die Herzen die Prozeduren der Explantation und des Schneidens mit dem Vibratom überleben. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid, kurz MTT, welcher in lebenden Zellen von der mitochondrialen Dehydrogenase umgewandelt wird und so einen Farbumschlag von gelb zu lila vollzieht (Mosmann, 1983). Die Vitalität wurde als  $\Delta E/mg$  Protein definiert.

### 2.7.1 Durchführung der MTT Färbung

Nach dem Schneiden wurden die Schnitte zunächst 2mal für 15 Minuten bei 37°C mit dem *Färbepuffer* gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit je 0,5mg MTT (Sigma) pro ml *Färbepuffer* für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Auswaschen des MTTs erfolgte danach für 5 Minuten bei 37°C erneut mit dem *Färbepuffer*. Um den Farbstoff aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Schnitte dann 30 Minuten mit reinem DMSO (Sigma) bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand in 96 well plates pipettiert. Die Extinktion wurde in einem ELISA Reader (Sigma) bei 555nm Wellenlänge gemessen.

Bis zur Durchführung der Bradford Proteinbestimmung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert.

## 2.7.2 Bradford Proteinbestimmung

Um die Ergebnisse der Vitalitätsfärbung auf die Größe der Schnitte zu normieren, wurde die Menge an Protein pro Schnitt mit der Bradford Methode gemessen (Bradford). Dafür wurden die Schnitte mit Natriumhydroxid (95%, J.T.Baker) bei 95°C für 30 Minuten inkubiert und dabei zersetzt. Anschließend erfolgte eine Neutralisation der basischen Flüssigkeit mit 85%iger Ortho-Phosphorsäure (Sigma) mittels einer 1:1 Verdünnung. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben in eine 96 well plate pipettiert und der Farbstoff Coomassie Blue (Sigma) hinzugefügt. Dieser Farbstoff verändert sein Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von der Proteinmenge von 465nm nach 595nm (Bradford, 1976). Mit Hilfe einer Standardreihe wurde anschließend die Proteinmenge in mg/ml bestimmt.

## 2.8 Elektrophysiologie

### 2.8.1 Setup des MEA2100

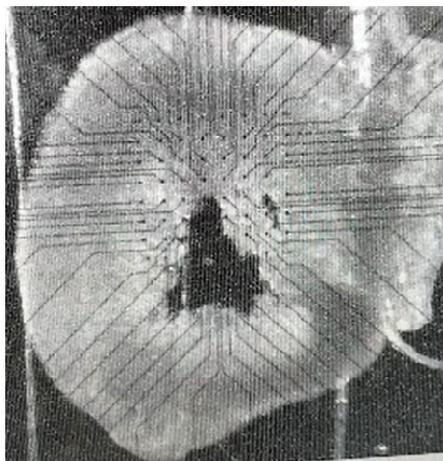
Für die Messungen der Feldpotentiale wurde ein Microelectrodesystem von Multi Channel Systems (MCS), Reutlingen, Deutschland genutzt (siehe Abbildung 18). Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Anteile des Microelectrode Array System Setups von MCS verwendet. Das hier verwendete MEA2100 ist die aktuellste Version der Microelectrodesysteme von MCS. Die MEAs, in denen die MEA System Messungen erfolgen, sind Arrays aus Glasplättchen mit 60 Elektroden aus Titannitrat zur Messung von elektrischer Aktivität. In der Mitte des Plättchens befindet sich eine Kammer, in der die Herzschnitte, mit *Messpuffer* bedeckt, platziert werden. Zur Messung werden die MEAs in die Headstage eingespannt. Die verwendete Headstage (MEA2100-HS60) besteht aus einem Verstärker und 3 internen Stimulusgeneratoren, die über jede der 60 Elektroden Stimuli abgeben können. Zusätzlich erfolgt in der Headstage die Datengewinnung. Ein Interfaceboard verbindet diese mit einem Computer. Zusätzlich ist es über das Interfaceboard möglich, Transistor-Transistor-Logik (TTL) Outputs und Inputs zu generieren. Auf dem angeschlossenen Computer befindet sich die notwendige Software (MC\_Rack) zum Darstellen und Auswerten der Daten.



**Abbildung 18: Das Microelectrode Array System Setup**

Dargestellt sind die Headstage, die Perfusionsapparaturen, der externe Stimulator, das Temperaturkontrollgerät und das Interfaceboard. (eigenes Foto)

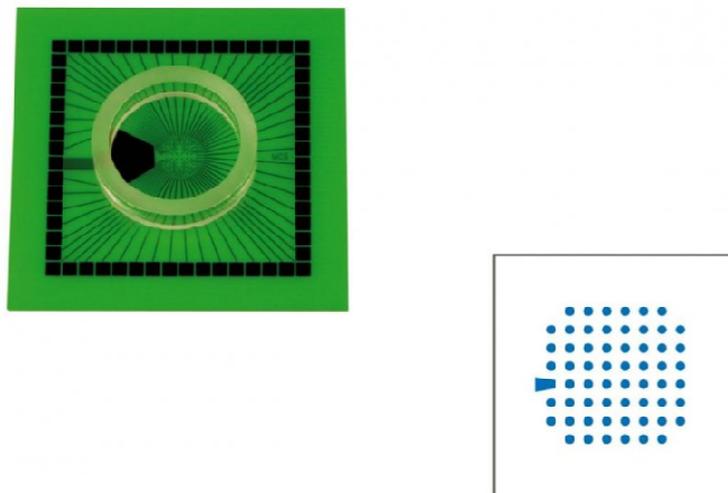
Um die Messbedingungen zu optimieren war in dem Setup zusätzlich ein Peristaltik-Perfusionssystem (PPS2) integriert, um eine gleichmäßige kontrollierbare Perfusion der Herzschnitte sicherzustellen. Zusätzlich war es mit einer beheizbaren Perfusionskanüle (PH01) sowie einem integrierten Heizelement in der Headstage möglich, die Temperatur des *Messpuffers* in der Kammer des MEAs zu regulieren. Beides wurde über ein Temperaturkontrollgerät (TC01) gesteuert. Die Headstage fand Platz auf einem Video-Mikroskoptisch (VMTC-1). Durch diesen Aufbau war es möglich, das Elektrodenfeld während der Messungen, über eine invertierte Kamera auf dem Computerbildschirm abzubilden (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: Ein Herzschnitt auf einem Microelectrode Array**

Die Darstellung des Herzschnittes auf dem Microelectrode Array erfolgt über die invertierte Kamera. (eigenes Foto)

Für die Messungen wurden in dieser Arbeit 2 verschiedene MEAs genutzt. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden 60MEA200/30iR-Ti, welche einen Interelektrodenabstand von  $200\mu\text{m}$  und einen Elektrodendurchmesser von  $30\mu\text{m}$  haben, verwendet. Die Elektroden bestanden aus Zinn. Im Verlauf wurde auf ein 60ecoMEA mit Pedot Beschichtung gewechselt, welches einen Interelektrodenabstand von  $700\mu\text{m}$  und einen Elektrodendurchmesser von  $100\mu\text{m}$  hat (siehe Abbildung 20). Durch den größeren Elektrodendurchmesser sowie die Behandlung des MEAs mit Pedot, konnte eine Impedanzreduktion erreicht werden, wodurch Stimulationsartefakte und das Rauschen der Baseline reduziert werden konnten (Hempel et al., 2017). Beide Arten der verwendeten MEAs verfügen über eine interne Referenzelektrode, die automatisch mit dem System geerdet wird, sobald sie in die Headstage eingespannt werden.



**Abbildung 20: Ein 60EcoMicroelectrode Arrays mit Skizze des Elektrodenfeldes**

Links ist ein Foto des 60EcoMEAs, rechts eine Skizze des Elektrodenfeldes mit den 60 Elektroden, auf dem der Herzschnitt zu liegen kommt, zu sehen. (Multichannelsystems, 2021)

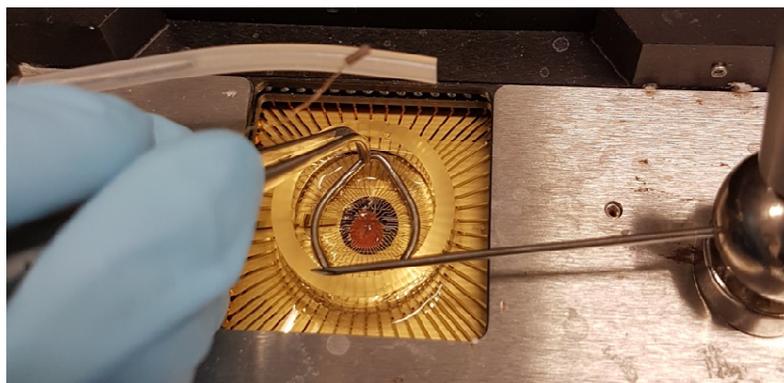
Zusätzlich wurde eine externe Referenzelektrode, in Form eines Ag/AgCl Drahtes, in der Kammer des MEAs platziert und über eine Steckverbindung in der Headstage mit dem Erdungssystem verbunden. Zur Abschirmung von äußeren Störgeräuschen wurde das gesamte Setup in einem Faraday'schen Käfig platziert.

### 2.8.2 Vorbereitung der Messungen

Das MEAs wurden vor der Benutzung getrocknet und die Elektroden mit 70%igem Ethanol gereinigt, um etwaige Verunreinigungen durch beispielsweise Fingerabdrücke zu entfernen. Vor Beginn der Messungen wurde das MEA ohne Herzschnitt in die Headstage eingespannt, um die Perfusion zu testen und das Rauschen der Baseline zu kontrollieren. Auftretende

Probleme konnten so vor Beginn der eigentlichen Messungen behoben werden. Zusätzlich wurde mit der Begasung des *Messpuffers* mit einem Gasgemisch (80% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>) begonnen, welche während der gesamten Versuchsdauer aufrechterhalten wurde. Die in der Headstage integrierte Heizplatte und die beheizbare Perfusionskanüle wurden eingeschaltet. Mit einem Thermometer wurde vor Beginn der Messungen die Temperatur des *Messpuffers* in der Kammer des MEA kontrolliert, wobei der Zielwert bei 37°C lag. Das Sicherstellen einer konstanten Temperatur war wichtig, da die Aktivität von Kardiomyozyten stark abhängig von der Umgebungstemperatur ist und schon Temperaturschwankungen von 1°C zu Veränderungen in der Kontraktionsfrequenz bis hin zum gänzlichen Fehlen von Kontraktion führen können (Egert und Meyer, 2005). Der Ziel pH-Wert von 7,4 wurde durch die Kombination von Natriumhydrogencarbonat in dem *Messpuffer* und der ständigen Begasung mit dem CO<sub>2</sub> enthaltenden Gasgemisch erreicht.

In die Kammer des MEAs wurde vor Einlegen des Herzschnittes ein Tropfen *Messpuffer* gegeben und anschließend der Herzschnitt mittels einer Glaspipette (Pasteur) in den Messbereich platziert. Dabei durfte das Messfeld, zur Schonung der Elektroden, nicht mit der Pipette in Berührung kommen. Mit einem Gewebeschnitthalter (Slice Anchor, Warnerinstruments) wurde der Schnitt am Boden des MEAs fixiert (siehe Abbildung 21). Dadurch konnte der Schnitt mit dem *Messpuffer* bedeckt werden, ohne dass er sich von den Elektroden des MEAs abhob. Diese Fixierung war notwendig für ein gutes Signal, da so der Herzschnitt mit den Elektroden in engem Kontakt gehalten wurde. Es ist beschrieben, dass ein enger Kontakt zwischen dem Gewebe und den Elektroden notwendig für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ist (Stett et al., 2003).



**Abbildung 21: Vorbereitung der Microelectrode Array System Messung**

Dargestellt ist der Prozess der Platzierung des Gewebeschnitthalters auf einem Herzschnitt, welcher im Microelectrode Array liegt. (eigenes Foto)

### 2.8.3 Durchführung der Messungen mit dem MEA2100

Nach der 30 minütigen Erholungsphase des Gewebes von der Schneideprozedur wurde jeweils ein Herzschnitt auf dem Elektrodenfeld des MEA platziert und in die Headstage eingespannt. Danach wurde die Perfusion mit dem *Messpuffer* gestartet. Die Perfusionsrate betrug 5ml/min, um einen Austausch der Flüssigkeit von 3 bis 4mal pro Minute zu erreichen. Sobald das MEA in der Headstage eingespannt war, wurde die Position des Schnittes auf den Messelektroden mit Hilfe der integrierten Kamera kontrolliert und gegebenenfalls adjustiert. Ziel war es, dass der linke Ventrikel des Herzschnittes in seiner transmuralen Breite, sowohl endokardiale als auch epikardiale Anteile, auf den Messelektroden zu liegen kam. Die gestartete Perfusion mit dem *Messpuffer* sorgte für ein Auswaschen des BDMs und erwärmte gleichzeitig den Herzschnitt. Nach kurzer Zeit begann dieser unter diesen Bedingungen spontan zu kontrahieren, ein Phänomen, welches auch durch andere Arbeitsgruppe beschrieben wurde (Halbach et al., 2006).

Jeder Herzschnitt wurde über einen maximalen Zeitraum von 30 Minuten gemessen und anschließend verworfen. Der Zeitpunkt 0 wurde definiert als der Moment, in dem die ersten Feldpotentiale gemessen wurden. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten Aufnahmen der Feldpotentiale von 1 Minute Dauer, alle 1 bis 5 Minuten. Die sampling rate lag zwischen 5000 und 10000Hz. Schlagen die Herzschnitte spontan und regelmäßig, so wurde auf eine elektrische Stimulation verzichtet. Fehlte diese Spontanaktivität, so wurden die Herzschnitte mit Stimulationspulsen, über den internen Stimulusgenerator der Headstage, getriggert. Dabei wurden verschiedene bipolare Pulse verwendet:

Stimulusfrequenz (Hz): 1 bis 6Hz

Stimulushöhe (V): +/- 2 bis 3

Stimulusdauer: 400µs

Kam es trotz der Stimulation zu keiner suffizienten elektrischen Aktivitäten, wurde der Herzschnitt verworfen.

### 2.8.4 Datengewinnung

Die Datengewinnung der MEA System Messungen erfolgte über das Softwareprogramm MC\_Rack der Firma MCS. Bei den gewonnenen Daten handelte es sich, wie oben beschrieben, um Feldpotentiale. Von diesen Feldpotentialen wurde unter anderem die Dauer ausgewertet und in den vier Gruppen verglichen. Außerdem erfolgte die Auswertung der Frequenz.

## 2.9 Datenauswertung

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm PRISM, Version 5 (GraphPad Software, USA) angefertigt und die Signifikanzen mit Column Statistics, t-Test und 2way ANOVA erstellt. Dabei wurde  $p < 0,05$  (=\*) als signifikant definiert. Mit G\*Power, Version 3.1.9.7 (Franz Paul, Universität Kiel), wurde eine Poweranalyse durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte mit Microsoft Excel.

## 2.10 Genehmigungen

Die Genehmigung zur Nutzung der Tiere für die Versuche erfolgte durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz unter der Nummer 110/16 sowie zusätzlich für das Töten von Tieren zur Organentnahme unter ORG836. Für alle an den Versuchen und der Tierpflege beteiligten Personen lagen die notwendigen Genehmigungen vor.

## 2.11 Eigenleistungen und Fremdleistungen

Die Entwicklung der Fragestellung wurde von Prof. A.P. Schwoerer, Doktorvater, erbracht. Die heterotopen Herztransplantationen wurden in kardiochirurgischer Kooperation von Dr. S. Westhofen durchgeführt. Die Genotypisierung erfolgte im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie durch die Medizintechnische Assistenz.

Die Tierpflege und das Scoring der operierten Tiere waren eine Eigenleistung. Dies gilt ebenfalls für die Organentnahmen, sowohl der orthotopen, als auch der heterotopen Herzen. Die Etablierung der MEA System Messungen der adulten Herzschnitte, inklusive des Schneideprozesses, waren ebenfalls Eigenleistungen. Alle elektrophysiologischen Messungen und deren Auswertung wurden selbstständig durchgeführt, ebenso wie die statistischen Analysen. Alle Eigenleistungen erfolgten unter Supervision von Prof. A.P. Schwoerer.

### 3 Ergebnisse: Methodenetablierung

#### 3.1 MTT Vitalitätsfärbung

Bei dem Prozess des Schneidens der Herzen ist es möglich, dass diese durch verschiedene Faktoren, wie den mechanischen Stress, die fehlende vaskuläre O<sub>2</sub> Versorgung sowie Temperaturschwankungen, Schaden nehmen und im Anschluss nicht mehr vital sind. Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wurde die Methode der MTT Vitalitätsfärbung eingesetzt. Es wurden insgesamt 6 Herzen genutzt, von denen jeweils 6 bis 9 Schnitte gefärbt wurden. Die Schneideprozedur erfolgte in einem *Schneidepuffer* mit einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0mM. Die Herzen stammen von weiblichen und männlichen Mäusen mit einem Alter von mindestens 7 Wochen.

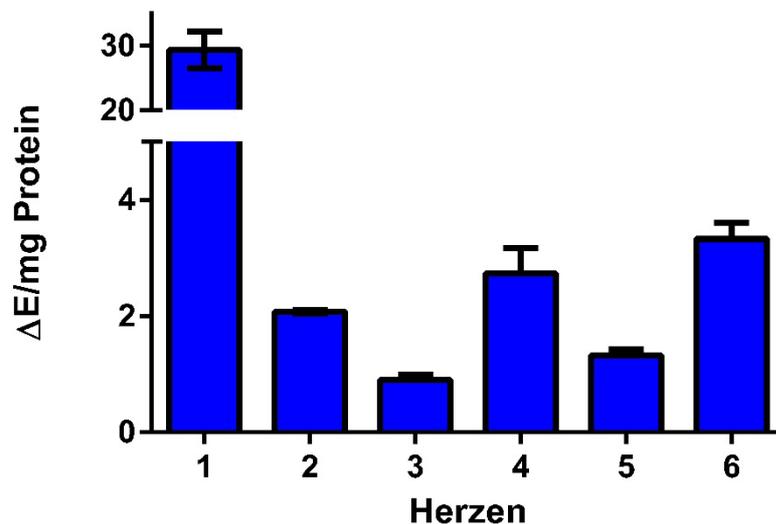


Abbildung 22: MTT Vitalitätsfärbung der Herzschnitte

Die Vitalität ist angegeben in  $\Delta E/mg$  Protein von 6 Herzen mit jeweils 6-9 Herzschnitten.

Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler in Form eines Balkendiagrammes.

Die Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Vitalitätsfärbung in der Einheit  $\Delta E/mg$  Protein. Die Extinktionswerte sind das Ergebnis der Färbung der Herzschnitte mit MTT und die Proteinmenge (in mg) ergibt sich aus der Bradfordmessung. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Die Mittelwerte liegen zwischen minimal 0,90 $\Delta E/mg$  und maximal 29,34 $\Delta E/mg$ . Der Mittelwert des ersten Herzens ist auffallend höher als die restlichen Werte. Da dieses Herz das erste war, welches gefärbt und gemessen wurde, liegt es nahe, dass es sich um einen Fehler in der Methodendurchführung handelt. Diese These wird dadurch unterstützt, dass dieser sehr hohe  $\Delta E/mg$  Wert eigentlich für eine sehr gute

Vitalität sprechen würde. Derart hohe Werte wurden bei keiner der folgenden Messungen erneut erreicht, obwohl die Erfahrung mit der Methode gestiegen ist.

Im Allgemeinen sind die gemessenen Werte vergleichbar mit Werten von vitalen Herzschnitten die von Brandenburger et al. (2011) publiziert wurden. Es ist also davon auszugehen, dass die Herzschnitte nach der Explantation und dem Schneideprozess vital waren.

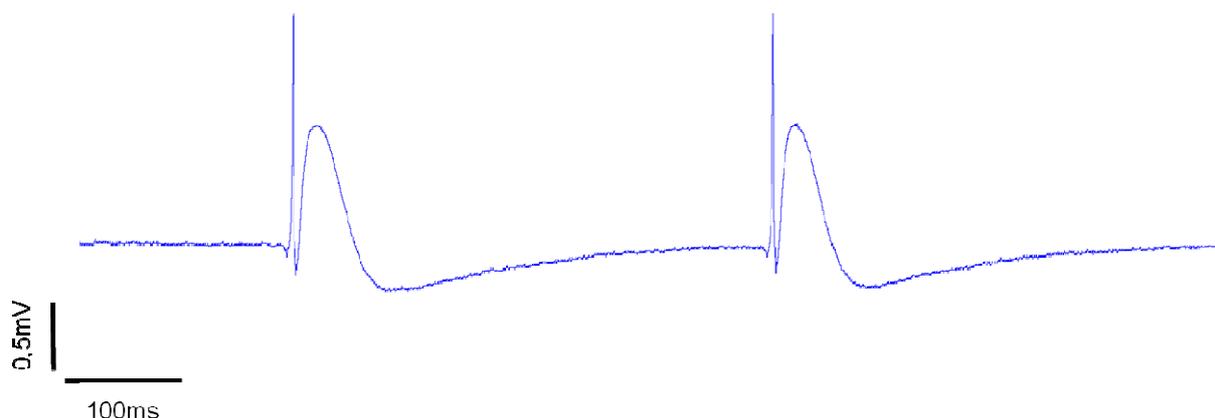
### 3.2 Optische Kontrolle der Kontraktilität

Unter mikroskopischer Sicht, nach Wechsel des Puffers von dem *Schneidepuffer* ( $0,9\text{mM Ca}^{2+}$ ), welcher BDM enthielt, zu dem *Messpuffer* ohne diesen Kontraktilitätsblocker, konnte eine spontane Kontraktilität der Herzschnitte beobachtet werden. Dies war sowohl bei orthotopen als auch bei heterotopen Herzschnitten möglich. Die kontinuierliche Perfusion mit frischem, erwärmtem *Messpuffer* war über das Perfusionssystem des MEA Setups gewährleistet.

Diese spontane Kontraktilität spricht dafür, dass die Herzschnitte nach Wechsel von dem *Schneidepuffer* auf den *Messpuffer* vital und fähig zur elektrischen Erregung waren.

### 3.3 MEA System Messung von Feldpotentialen

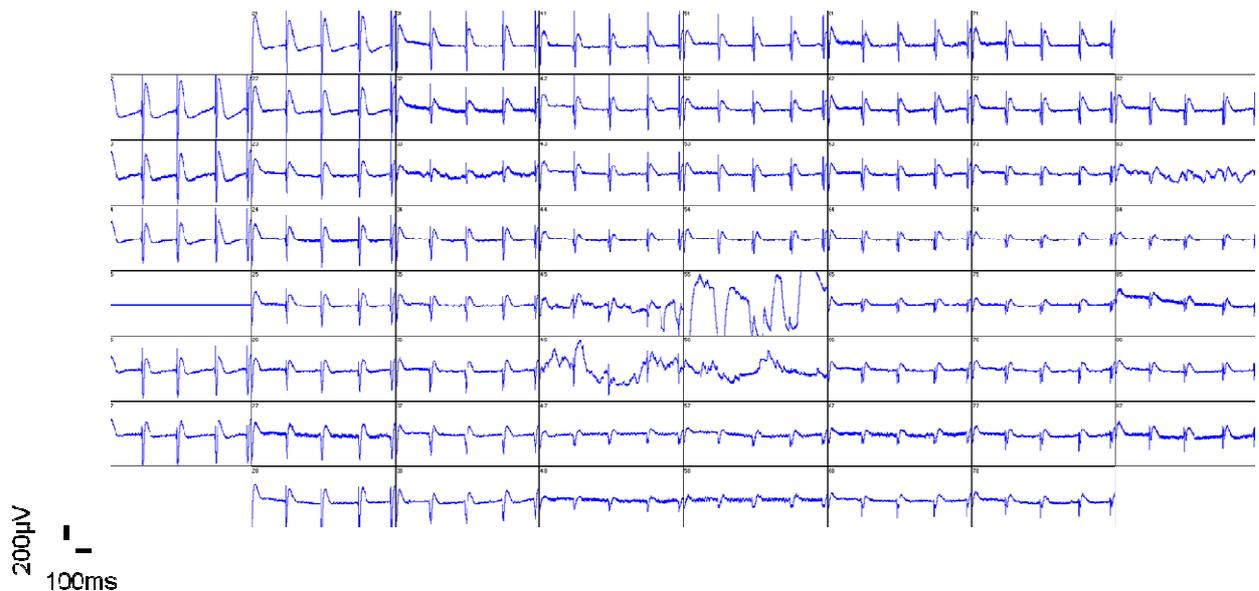
Im Rahmen der Etablierung der MEA System Messungen von adulten Herzschnitten wurden orthotope Herzen von Mäusen im Alter von mehr als 7 Wochen verwendet. In Abbildung 23 sind 2 Feldpotentialen dargestellt, die als Beispiel für eine gelungene Messung dienen.



**Abbildung 23: Repräsentative Feldpotentiale**

Gezeigt sind 2 Feldpotentiale eines orthotopen Herzschnittes, gemessen mit dem Microelectrode Array System.

Die 60 Elektroden des MEAs messen zeitgleich die elektrische Aktivität des Herzschnittes. In Abbildung 24 ist beispielhaft ein Überblick aller Elektroden bei der Messung eines Herzschnittes dargestellt. Wie zu sehen ist, variiert die Qualität der gemessenen Feldpotentiale zwischen den Elektroden. Das kann unter anderem an der Kontraktion des Herzschnittes oder dem Kontakt zwischen Gewebe und Elektrode liegen. Elektroden mit artefaktreichen Messungen wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen.



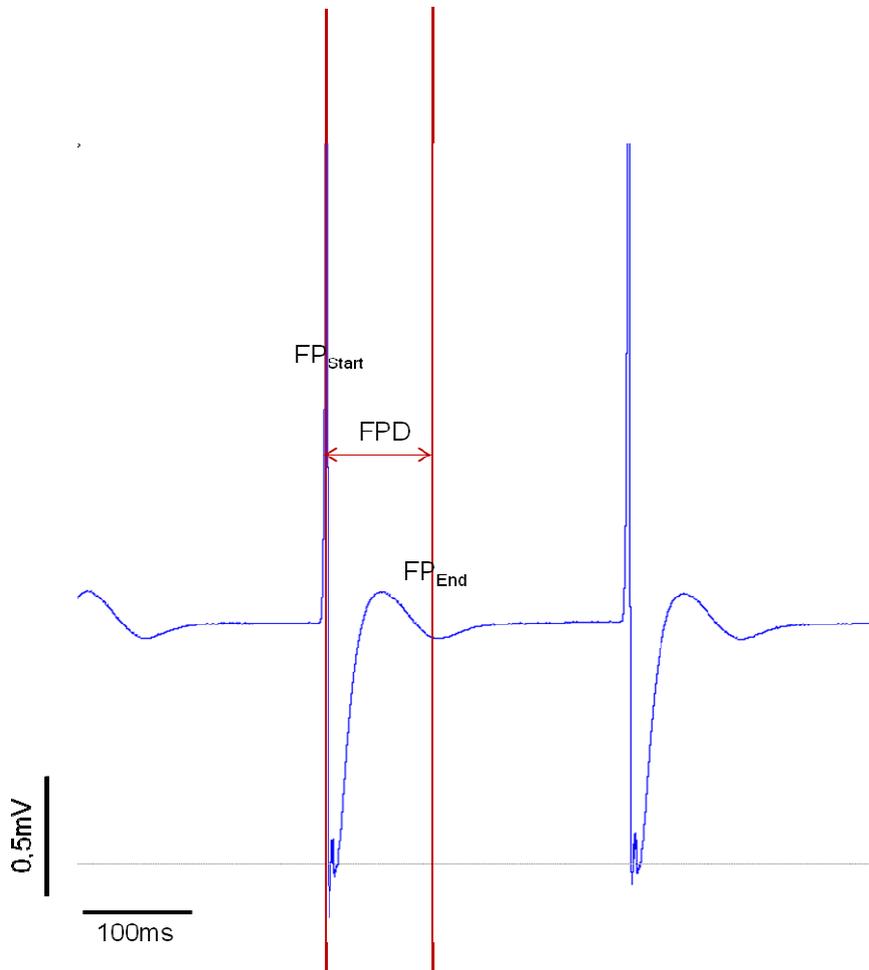
**Abbildung 24: Beispiel einer Microelectrode Array System Messung**

Dargestellt sind beispielhafte Feldpotentiale, die mit den 60 Elektroden des Microelectrode Arrays gemessen wurden. Zu sehen sind deutliche Qualitätsunterschiede zwischen den Elektroden.

### 3.4 Definition von Einschlusskriterien zur Auswertung der Feldpotentialdauer

Vor der Auswertung der FPD der gemessenen Feldpotentiale wurden diese auf zuvor festgelegte Kriterien geprüft. Die Definition dieser Kriterien erfolgte in der Etablierungsphase, indem viele Feldpotentiale ausgewertet und verglichen wurden. Außerdem wurde mit Hilfe von Literaturrecherche (Navarrete et al., 2013) und in Rücksprache mit dem Gerätehersteller MCS, insbesondere mit dem Mitarbeiter T. Meyer, die Auswertung der Feldpotentiale modifiziert. Da sich die Fragestellung insbesondere auf etwaige Veränderungen der FPD bezieht, war die korrekte und standardisierte Auswertung dieser von besonderer Bedeutung. Um die FPD bestimmen zu können, waren ein definierter Startpunkt ( $FP_{Start}$ ) und Endpunkt der Feldpotentiale ( $FP_{End}$ ) notwendig.

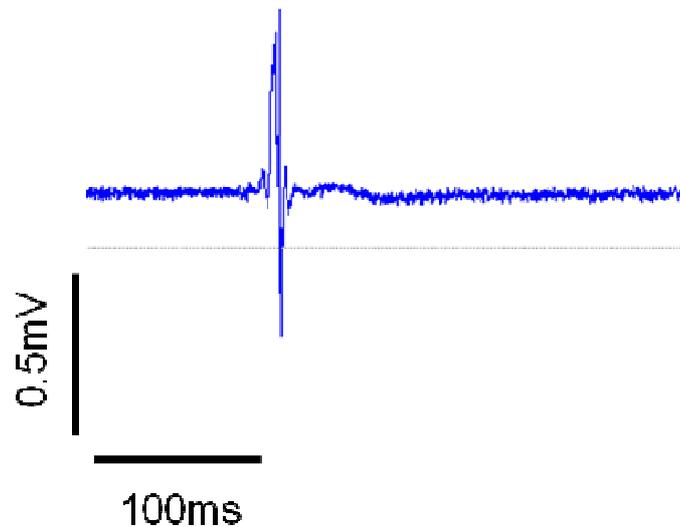
Jedes Feldpotential, welches nicht durch Artefakte oder Messstörungen beeinflusst wurde, begann mit einem steilen Aufstrich,  $FP_{\text{Start}}$ , und endete mit einem weniger steilen Aufschwung, bevor es zur Rückkehr zur Baseline kam,  $FP_{\text{End}}$ . Daraus ergaben sich die notwendigen Kriterien, dass diese beiden Charakteristika deutlich abgrenzbar sein mussten, um die Länge eines Feldpotentials bestimmen zu können (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Startpunkt und Endpunkt der Feldpotentiale**

Dargestellt sind Feldpotentiale die mittels Microelectrode Array System Messung erhalten wurden. Mittels eines horizontalen roten Doppelpfeils ist der Startpunkt und der Endpunkt des Feldpotentials und somit die Feldpotentialdauer (FPD) markiert.

Der steile Beginn des Feldpotentials war nahezu immer eindeutig zu sehen, während der Endpunkt zum Teil nicht bestimmbar war. Beispielsweise konnte  $FP_{\text{End}}$  durch eine zu langsame Rückkehr zur Baseline nicht deutlich abgrenzbar sein und auch starkes Rauschen der Baseline oder Artefaktbildung konnten Einfluss auf  $FP_{\text{End}}$  haben. Diese Feldpotentiale wurden dann nicht in die Auswertung eingeschlossen.



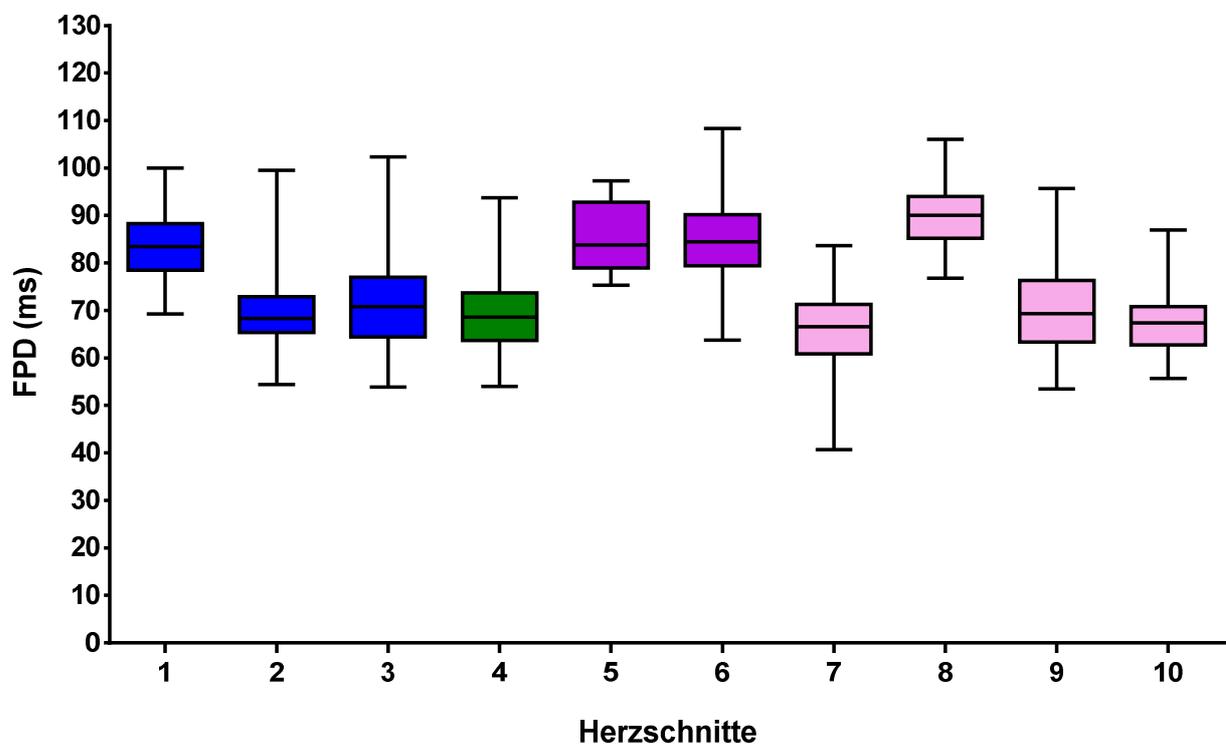
**Abbildung 26: Aus der Auswertung ausgeschlossenes exemplarisches Feldpotential**

Gezeigt ist ein Feldpotential gemessen mit dem Microelectrode Array System, welches durch Rauschen der Baseline keinen exakten Endpunkt aufweist und daher nicht in die Auswertung eingeschlossen wurde.

In Abbildung 26 ist ein Beispiel für ein nicht eingeschlossenes Feldpotential dargestellt. Zu sehen ist ein Rauschen der Baseline, welches die Bestimmung  $FP_{\text{End}}$  unzuverlässig macht.

### 3.5 Bestimmung der Feldpotentialdauer adulter Mäuseherzschnitte

Im nächsten Schritt der Etablierung, nach erfolgreicher Messung der ersten Feldpotentiale und Definition der Einschlusskriterien, lag der Fokus auf der Bestimmung der FPD und der Frage nach Reproduzierbarkeit dieser. Abbildung 27 zeigt die FPD von insgesamt 4 Herzen mit je 1 bis 4 gemessenen Herzschnitten. Die Mediane der FPD bewegen sich zwischen 66,56ms und 90,04ms, die kürzeste gemessene FPD liegt bei 40,73ms, die längste bei 108,30ms. Es ist zu sehen, dass sich die FPD mit gewissen Schwankungen in einem stabilen Bereich bewegen, obwohl sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten und nicht örtlich normiert gemessen wurden.



**Abbildung 27: Feldpotentialdauer von orthotopen Herzschnitten**

Dargestellt sind Einzelwerte der Feldpotentialdauer (FPD) von Herzschnitten (n=10) von 4 verschiedenen Tieren (blau, grün, lila, rosa).

Die Darstellung erfolgt mittels „Box and Whiskers“, wobei das Median mittels horizontaler Markierung dargestellt ist, die Whiskers markieren das Minimum und Maximum.

Die Etablierung von MEA System Messungen an orthotopen Herzschnitten ist demnach gelungen und es ist möglich, stabile und reproduzierbare Messdaten zu erheben.

## 4 Ergebnisse: MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuseherzschnitten

### 4.1 Herzgewichte

Um die Entlastung der Herzen durch die heterotope Herztransplantation zu überprüfen, wurden die Gewichte der Herzen als Marker verwendet. Ergänzend zu dem Gewichtsvergleich wurde auch eine optische Kontrolle der Herzgröße angestellt, die eine deutliche Größenabnahme des entlasteten Herzens zeigte (siehe Abbildung 28).



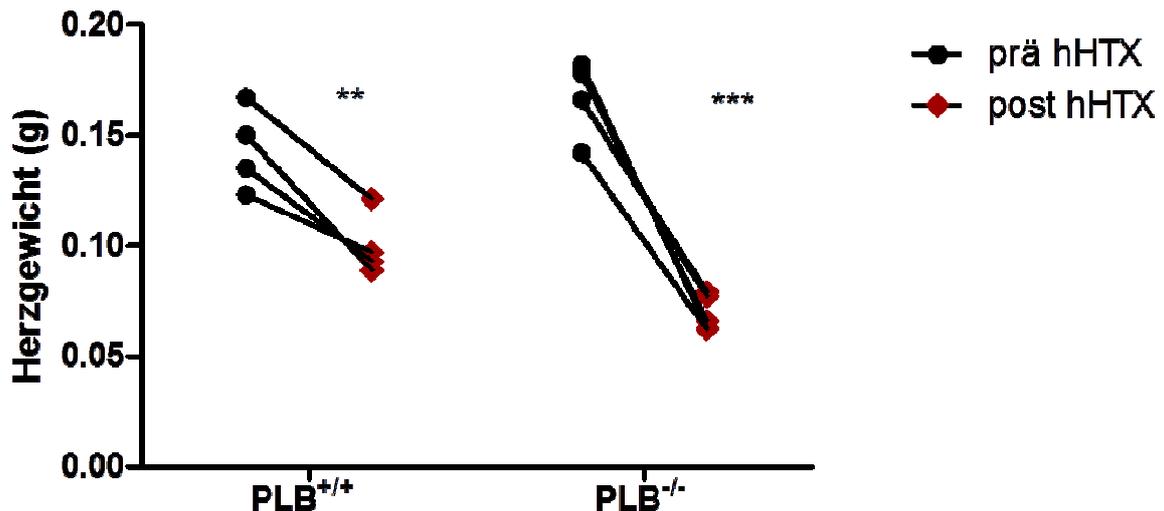
**Abbildung 28: Vergleich eines orthotopen und heterotopen Herzens**

Abgebildet ist ein orthotopes (links) und ein heterotopes (rechts) Herz nach Explantation. Bei beiden Herzen wurden die Atrien abgetrennt. (eigenes Foto)

Bei dem Vergleich der Herzgewichte wurden auch Herzen mit eingeschlossen, die nicht in den Ergebnissen der MEA System Messungen erscheinen. Dies liegt darin begründet, dass nicht alle heterotopen Herzen die Einschlusskriterien für die Auswertung der Feldpotentiale erfüllt haben (siehe Seite 41), der Gewichtsverlauf dieser Herzen aber dennoch eine relevante Aussage bezüglich des Erfolges der hHTX hat.

Alle Spenderherzen wurden sowohl vor der Implantation als auch nach der Explantation an Tag 14, gewogen, um die Gewichtsveränderung innerhalb eines Herzens zu dokumentieren. Da davon ausgegangen werden kann, dass bei den ausgewachsenen Versuchstieren die Spenderherzen unter physiologischen Bedingungen ihr Gewicht nicht verändert hätten, ist es

wahrscheinlich das auftretende Abweichungen auf die hHTX und die damit einhergehende Entlastung zurückzuführen sind. Bei dem Vergleich der Gewichte vor und nach 14 Tagen Entlastung wurden die Herzen nach Genotypen, also in  $PLB^{+/+}$  und  $PLB^{-/-}$  aufgeteilt, um zu schauen, ob die Entlastung genotypabhängig ist. Wie in Abbildung 29 zu sehen, liegt in beiden Gruppen eine signifikante Gewichtsreduktion von ungefähr 30% bei den  $PLB^{+/+}$  und ungefähr 60% bei den  $PLB^{-/-}$  Tieren, vor.



**Abbildung 29: Effekt der Entlastung der Spenderherzen**

Dargestellt sind die Gewichte (g) der Spenderherzen sowohl vor vollzogener heterotopen Herztransplantation (prä hHTX), als auch nach einem 14tägigen Entlastungszeitraum (post hHTX). Links ist die Gewichtsentwicklung der Phospholamban Wildtyp ( $PLB^{+/+}$ ) (n=4), rechts die der Phospholamban Knockout ( $PLB^{-/-}$ ) Herzen (n=4) zu sehen.

Gezeigt sind die Mittelwerte, \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$  (2way ANOVA), beide signifikant.

Alles in allem kann darauf geschlossen werden, dass die hHTX zu einer Gewichtsreduktion und demnach zu einer Atrophie der Herzen, sowohl in den  $PLB^{+/+}$  als auch in den  $PLB^{-/-}$  Tieren führt.

## 4.2 Übersicht über die MEA System Messungen in den Versuchstiergruppen

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse aus der Knockout Linie FVB.129S2- $Pln^{tm1Egk}/Mmmh$  im Alter zwischen 7 und 21 Wochen verwendet. Verglichen wurden orthotope und heterotope Herzschnitte von  $PLB^{+/+}$  (litter mates) und  $PLB^{-/-}$  Mäusen. Pro Genotyp und Entlastungszustand wurde eine bestimmte Anzahl an Herzen eingeschlossen. Von diesen Herzen wurde jeweils eine bestimmte Anzahl an Herzschnitten gemessen. Bei jedem dieser Herzschnitte wurden Feldpotentiale über eine oder mehrere Elektroden gemessen (siehe Tabelle 5). Die Messungen dauerten zwischen 0 und 28 Minuten.

	orthotop PLB <sup>+/+</sup>	orthotop PLB <sup>-/-</sup>	heterotop PLB <sup>+/+</sup>	heterotop PLB <sup>-/-</sup>
<b>Herzen</b>	5	7	3	4
<b>Herzschnitte</b>	30	49	15	18
<b>minimale Elektrodenanzahl</b>	2	1	2	1
<b>maximale Elektrodenanzahl</b>	25	13	13	12

**Tabelle 5: Übersicht der Messungen**

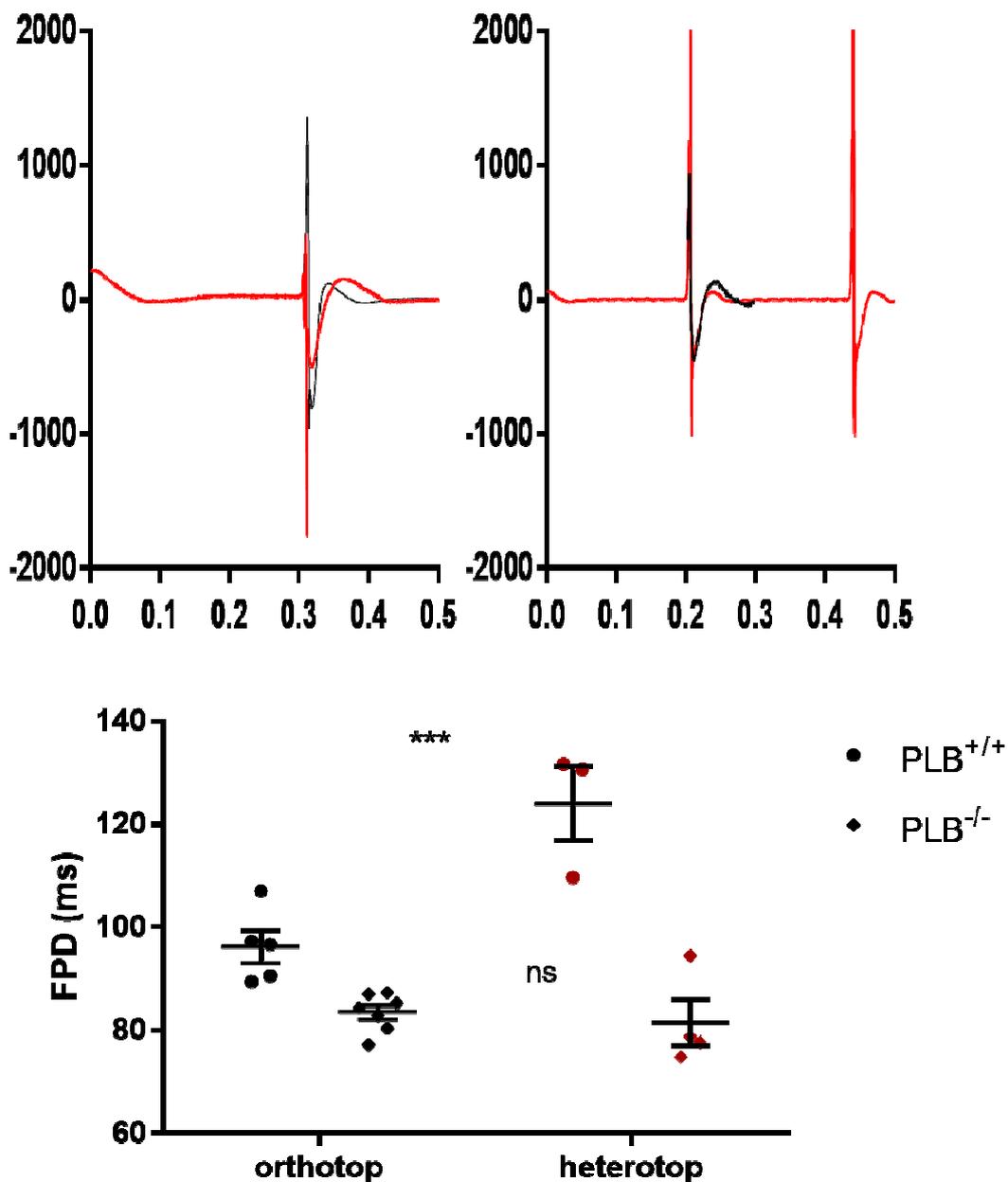
Dargestellt ist die Anzahl der Herzen, Herzschnitte sowie die minimale und maximale Elektrodenanzahl für die orthotope und heterotope Phospholamban Wildtyp (PLB<sup>+/+</sup>) Gruppe und die orthotope und heterotope Phospholamban Knockout (PLB<sup>-/-</sup>) Gruppe.

### 4.3 Feldpotentialdauern der orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp und Knockout Mäuse

Die Auswertung der FPD erfolgte mit Hilfe des Programmes MC\_Rack (MCS). Wie oben erläutert, wurden die Feldpotentiale zuvor auf das Vorliegen der notwendigen Einschlusskriterien überprüft. Die FPD wurde definiert als Dauer von FP<sub>Start</sub> bis FP<sub>End</sub>. Es wurden die FPD von orthotopen und heterotopen PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup> Herzschnitten, sprich allen 4 Versuchstiergruppe, verglichen.

Der Mittelwert der FPD der orthotopen PLB<sup>+/+</sup> Gruppe liegt bei 96,19ms. Bei den heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Herzschnitten liegt die mittlere FPD bei 124,00ms. Die gemessenen FPD der orthotopen PLB<sup>+/+</sup> und den heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Herzen unterscheiden sich demnach signifikant und es ist eine mittlere Verlängerung der FPD der entlasteten Herzen von 26,61ms, was ungefähr 27% entspricht, zu sehen (orthotop 96,19 ± 3,13ms, n=5 vs. heterotop 124,00 ± 7,17ms, n=3, p<0,001) (siehe Abbildung 30).

Bei den orthotopen PLB<sup>-/-</sup> Herzschnitten liegt der Mittelwert der FPD bei 83,47ms. Die heterotope PLB<sup>-/-</sup> Gruppe weist einen Mittelwert von 81,43ms auf. Bei dem Vergleich der FPD der orthotopen PLB<sup>-/-</sup> und der heterotopen PLB<sup>-/-</sup> Herzen ergibt sich daher keine signifikante Verlängerung der FPD der entlasteten Herzen (orthotop 83,47 ± 1,39, n=7 vs. heterotop 81,43 ± 4,44, n=4, nicht signifikant) (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30: Feldpotentialdauer der 4 Versuchstiergruppen**

Oben links sind 2 repräsentative Feldpotentiale der Phospholamban Wildtyp (PLB<sup>+/+</sup>) Gruppe, orthotop (schwarz) und heterotop (rot), abgebildet.

Oben rechts sind 2 repräsentative Feldpotentiale der Phospholamban Knockout (PLB<sup>-/-</sup>) Gruppe, orthotop (schwarz) und heterotop (rot), abgebildet.

Unten ist der Vergleich der Feldpotentialdauer (FPD) (ms) der 4 Versuchstiergruppen, orthotop PLB<sup>+/+</sup> (n=5), heterotop PLB<sup>+/+</sup> (n=3), orthotop PLB<sup>-/-</sup> (n=7), heterotop PLB<sup>-/-</sup> (n=4), dargestellt.

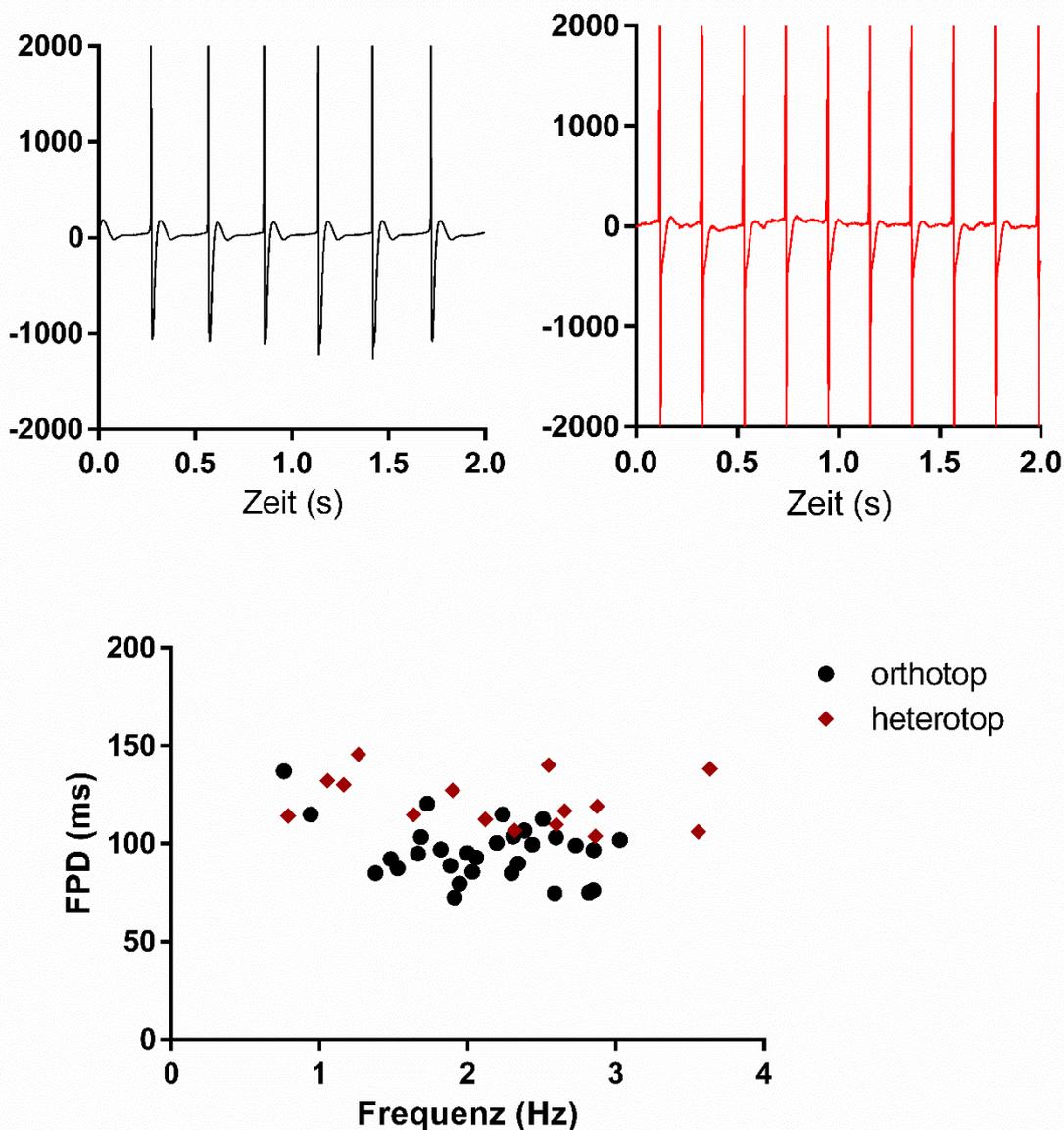
Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler pro Tier. \*\*\* = p<0,001, signifikant (2-way ANOVA).

Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Entlastung der Herzen bei dem PLB<sup>+/+</sup> Genotyp zu einer Verlängerung der FPD führt, bei den Tieren mit PLB<sup>-/-</sup> Genotyp die Entlastung hingegen keinen Einfluss auf die FPD hat.

#### 4.4 Frequenzabhängigkeit

Die meisten MEA System Messungen erfolgten an spontan kontrahierenden Herzschnitten. Da aus diesem Grund keine Kontrolle über die Kontraktionsfrequenz erfolgte, stellte sich die Frage, in welchem Frequenzbereich die Herzschnitte schlagen und in wie weit die Frequenz einen Einfluss auf die Länge der Feldpotentiale hat. Die Frequenz der elektrischen Aktivität wurde bestimmt, indem mit Hilfe des Programmes MC\_Rack (MCS) die schnellen Komponenten der Feldpotentiale pro Minuten gemessen wurden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt getrennt nach Genotyp, PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup>. Die mittlere Frequenz der PLB<sup>+/+</sup> Herzen lag bei 2,13 Hz (0,76 bis 3,64 Hz). Bei den PLB<sup>-/-</sup> Herzen lag die mittlere Frequenz bei 2,89Hz (1,42 bis 5,15Hz).

Wie die Abbildung 31 zeigt, sind die mittleren FPD der heterotopen PLB<sup>+/+</sup> in nahezu allen Frequenzbereichen länger als die der orthotopen PLB<sup>+/+</sup>. Daraus kann geschlossen werden, dass die Verlängerung der FPD in der heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Gruppe ein Effekt der Entlastung ist und nicht durch einen Einfluss der Frequenz zustande kommt. Des Weiteren ist zu sehen, dass in dem gemessenen Frequenzbereich der beiden PLB<sup>+/+</sup> Gruppen keine signifikante Frequenzabhängigkeit zu beobachten ist.



**Abbildung 31: Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer von orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp Herzschnitten**

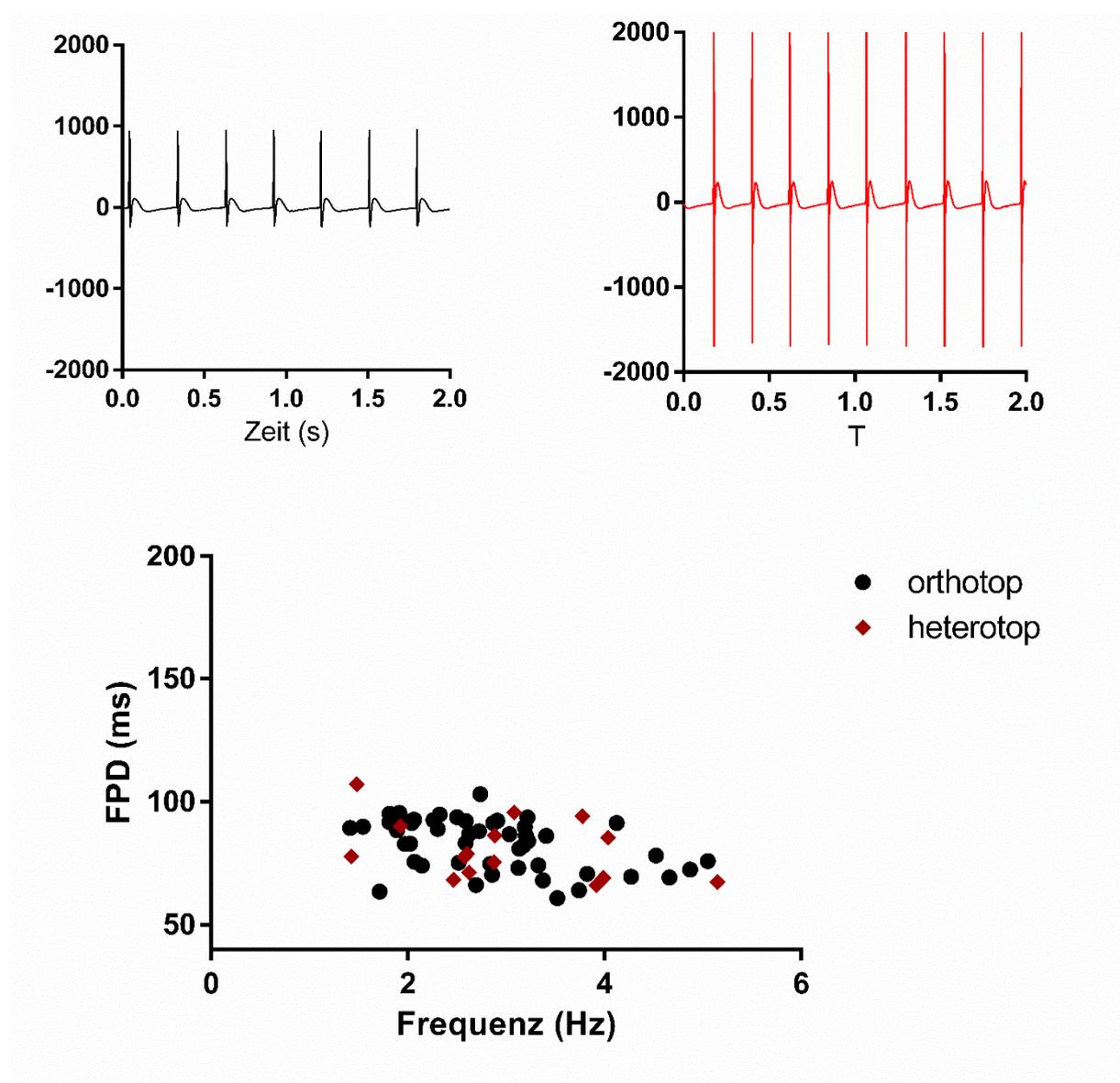
Oben links sind repräsentative Feldpotentiale von einem orthotopen Phospholamban Wildtyp (PLB<sup>+/+</sup>), oben rechts von heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Herzschnitt dargestellt.

Unten ist die Feldpotentialdauer (FPD) (ms) von orthotopen (n=30) und heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Herzschnitten (n=15) in Abhängigkeit der Frequenz (Hz) abgebildet.

Dargestellt sind die Mittelwerte, orthotope PLB<sup>+/+</sup>:  $R^2=0,1153$  (lineare Regression), nicht signifikant; heterotope PLB<sup>+/+</sup>:  $R^2=0,06577$  (lineare Regression), nicht signifikant.

Wird die FPD der orthotopen PLB<sup>-/-</sup> und heterotopen PLB<sup>-/-</sup> Herzschnitte in Abhängigkeit der Frequenz dargestellt, so ist zu sehen, dass eine gleichmäßige Verteilung der FPD über den gesamten Frequenzbereich in beiden Gruppen vorliegt (siehe Abbildung 32). Es ist also unwahrscheinlich, dass die fehlende FPD Verlängerung in der heterotopen PLB<sup>-/-</sup> Gruppe

durch einen Einfluss der Frequenz zustande kommt. Interessanterweise zeigt sich bei den orthotopen  $PLB^{-/-}$  Herzschnitten eine signifikante Abhängigkeit der FPD in dem dargestellten Frequenzbereich, bei den heterotopen  $PLB^{-/-}$  Herzschnitten hingegen nicht.



**Abbildung 32: Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer von orthotopen und heterotopen Phospholamban Knockout Herzschnitten**

Oben links sind Feldpotentiale von einem orthotopen Phospholamban Knockout ( $PLB^{-/-}$ ), oben rechts von heterotopen  $PLB^{-/-}$  Herzschnitt dargestellt.

Unten ist die Feldpotentialdauer (FPD) (ms) von orthotopen ( $n=49$ ) und heterotopen  $PLB^{+/+}$  Herzschnitten ( $n=15$ ) in Abhängigkeit der Frequenz (Hz) abgebildet.

Dargestellt sind die Mittelwerte, orthotope  $PLB^{-/-}$ :  $R^2=0,1894$  (lineare Regression), signifikant; heterotope  $PLB^{-/-}$ :  $R^2=0,1618$  (lineare Regression), nicht signifikant.

Wie gezeigt worden ist, kann bei dem Vergleich der FPD zwischen den Versuchstiergruppen, die Frequenz als Einflussfaktor als nebensächlich eingestuft werden.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Proteins PLB auf das entlastungsabhängige Remodeling zu untersuchen. Die Hypothese, die adressiert werden sollte, lautete, dass durch die Wegnahme von PLB das entlastungsabhängige ventrikuläre Remodeling verhindert werden kann. In Gesamtschau konnte gezeigt werden, dass es in den heterotopen PLB<sup>-/-</sup> Herzen, nach einer 14tägigen Entlastungsdauer, im Gegensatz zu den heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Herzen, zu keiner signifikanten Verlängerung der FPD kam.

Insgesamt lässt sich diese Arbeit in zwei Abschnitte aufteilen. Zu Beginn erfolgte die Methodenetablierung, in welcher generell geprüft werden sollte, ob die Durchführung der geplanten Anteile der Versuche möglich war. Hierfür wurden orthotope PLB<sup>+/+</sup> Mäuseherzen verwendet. Im Einzelnen sollten während der Methodenetablierungsphase folgende Fragen beantwortet werden:

Überleben die adulten Ventrikel die Organentnahme und die Schneideprozedur? Zeigen die adulten Mäuseherzschnitte eine Spontanaktivität? Lassen sich Feldpotentiale an adulten Mäuseherzschnitten mit dem MEA System messen? Lassen sich allgemeingültige Einschlusskriterien für die Auswertung der FPD formulieren? Sind die Feldpotentiale reproduzierbar und stabil messbar?

Nach abgeschlossener Etablierung folgte der 2. Anteil dieser Arbeit, die MEA System Messungen an orthotopen und heterotopen PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup> Mäuseherzschnitten. Es galt die übergeordnete Frage zu beantworten, ob es Unterschiede in der FPD zwischen den entlasteten PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup> Tieren gab. Zur Adressierung dieser, wurden Tiere der FVB.129S2-Pln<sup>tm1Egk</sup>/Mmmh Mauslinie mit PLB<sup>-/-</sup> sowie Kontrolltiere (litter mates) mit PLB<sup>+/+</sup> Genotyp verwendet. Als zentraler Parameter für das Remodeling galt die Verlängerung der FPD, welche mit Hilfe des MEA Systems gemessen wurde. Um die Entlastung der Mäuseherzen zu erreichen, wurde die für diesen Zweck international anerkannte Methode der hHTX angewandt. Übereinstimmend mit Vorversuchen des Labors betrug die Entlastungszeitspanne dabei 14 Tage. Zur Annäherung an die übergeordnete Fragestellung wurden folgende weitere Fragen gestellt:

Funktioniert die Translation des Tiermodells von der Ratte auf die Maus? Zeigt sich in entlasteten Mäuseherzen eine verlängerte FPD? Unterscheiden sich die FPD zwischen den Genotypen PLB<sup>+/+</sup> und PLB<sup>-/-</sup> im orthotopen und entlasteten Zustand? Gibt es eine Frequenzabhängigkeit der FPD und bestehen Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen?

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in Hinblick auf die übergeordnete Fragestellung sowie wichtige Punkte des experimentellen Arbeiten diskutiert. Im Anschluss erfolgt eine Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand sowie die Diskussion der Translation der an Mäusen gewonnenen Daten auf den Menschen und die Bedeutung für die Klinik.

## 5.1 Vitalität und Spontanaktivität der Herzschnitte

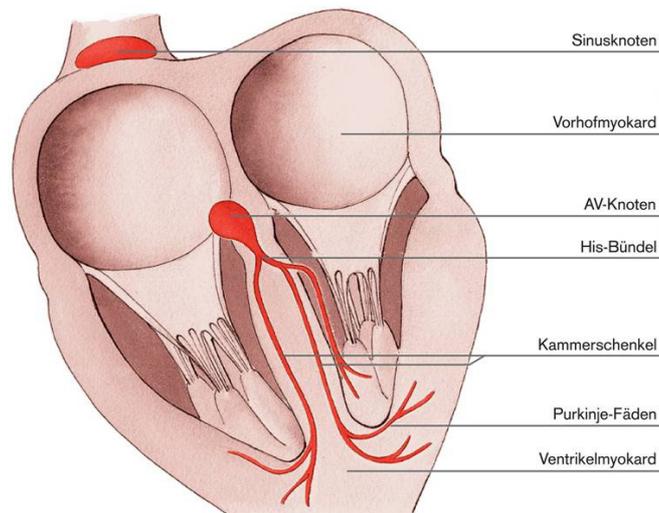
Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwei Marker für die Vitalität der Herzschnitte eingesetzt. In der Etablierungsphase wurde die MTT Vitalitätsfärbung eingesetzt (siehe Seite 39). Dies war ein wichtiger Schritt, um den Erfolg der Herzentnahme und der Schneideprozedur zu überprüfen. Diese Methode später nicht mehr verwendbar, wenn die Herzschnitte noch mit dem MEA System gemessen werden sollten, da die Herzschnitte im Rahmen der Färbung und Proteinbestimmung zersetzt wurden. Daher wurden nach Abschluss der Etablierungsphase die Spontanaktivität über die Messung von Feldpotentialen, und die optische Kontraktionskontrolle als Marker für die Vitalität der Herzschnitte definiert. Weitere mögliche Methoden zum Nachweis der Vitalität, welche in dieser Arbeit nicht zum Einsatz kamen, wären Enzymaktivitätstests, Kraftmessungen sowie die Bestimmung von Aktionspotentialen (Brandenburger). Die Messungen von Feldpotentialen mit dem MEA System ist dem Nachweis von intrazellulär gemessenen Aktionspotentialen gleichzusetzen (Tertoolen et al., 2018, Bussek et al., 2009, Meyer et al., 2004).

Nach erfolgreichem Nachweis vitaler Herzschnitte mittels Vitalitätsfärbung folgte die Durchführung der MEA System Messungen. Hier konnte zunächst keine Vitalität in Form von Kontraktilität und Spontanaktivität nachgewiesen werden. In Rücksprache mit der Arbeitsgruppe um Brandenburger et al. erfolgte eine empirische Methodenoptimierung mit Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im *Schneidepuffers* von 0mM, wie sie in einigen Vorarbeiten verwendet wurde (Halbach et al., 2006, Pillekamp et al., 2005), auf 0,9mM (Brandenburger et al., 2012, Wenzel, 2011). Nach der Modifikation des *Schneidepuffers* konnten die MEA System Messungen erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigten sich in allen 4 Versuchstiergruppen eine transmurale, zirkumferente Kontraktion, sowie eine elektrische Spontanaktivität. Ursächlich für die Schwierigkeiten bei der Verwendung des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien *Schneidepuffers* könnten letale Schäden der Kardiomyozyten durch eine zu geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder durch die anschließende Wiedererhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, bei dem Wechsel auf den *Messpuffer* (1,8mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), gewesen sein (Brandenburger et al., 2012, Piper, 2000). Da die Herzschnitte im MTT Vitalitätstest trotz Schneiden in dem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien *Schneidepuffer* vital waren, liegt die Vermutung näher, dass der Wechsel von einem Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  zu dem Puffer mit 1,8mM  $\text{Ca}^{2+}$  zu dem

Nichtgelingen geführt hat. Ein Phänomen, welches an Langendorff Herzen in der Literatur vorbeschrieben ist (Piper, 2000). Aufgrund der schließlich erfolgreichen Durchführung von MEA System Messungen wurden keine weiteren MTT Vitalitätsfärbungen von Herzschnitten, die in dem optimierten *Schneidepuffer* geschnitten wurden, durchgeführt. Im späteren Stadium der Arbeit, nach Etablierung eines erfolgreichen Protokolls, stellte die stabile Spontanaktivität in Kombination mit einer sichtbaren rindförmigen Kontraktion, ein guter Marker für die Vitalität der Herzschnitte war.

Die in dieser Arbeit beobachtete rhythmische Spontanaktivität in adulten Herzschnitten ist eher überraschend. Zu erwarten wäre eine spontane elektrische Aktivität beispielsweise in embryonalem Herzgewebe, welches von einigen Arbeitsgruppen auch für MEA System Messungen verwendet wird (Pillekamp et al., 2006, Pillekamp et al., 2005, Halbach et al., 2003, Caspi et al., 2009, Meyer et al., 2004). Auch in verletztem oder sterbendem Herzgewebe würde eine Freisetzung von Ionen aus dem Zytosol zu einer Veränderung des Milieus der extrazellulären Flüssigkeit und so zu spontanen Kontraktionen führen. In dieser Arbeit wurde die Mehrzahl der Herzschnitte über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Bei einem sterbenden Herzschnitt wäre zu erwarten, dass dieser bereits nach wenigen Minuten die Kontraktion einstellen würde. Außerdem erfolgten die Kontraktionen in einem sehr regelmäßigen Rhythmus, sodass es schwer vorstellbar ist, dass ein Absterben der Kardiomyozyten dafür verantwortlich sein kann. In der Tat wurde die in dieser Arbeit beobachtete Spontanaktivität bereits in der Arbeitsgruppe Halbach et al. (2006) in ventrikulären adulten Mäuseherzschnitten beschrieben und zudem in diesen mittels Patch Clamp Technik ein stabiles Ruhemembranpotential, als Vitalitätsparameter, nachgewiesen (Halbach et al., 2006).

Eine wahrscheinliche Erklärung für die Spontanaktivität in adultem, ventrikulärem Herzgewebe ist das Einsetzen des Kammerersatzrhythmus. Unter physiologischen Bedingungen wirkt der Sinusknoten als primärer Schrittmacher im Herzen. Fällt dieser aus, übernimmt der AV-Knoten, als sekundärer Schrittmacher, die Erregungsbildung (Gödecke et al., 2010). Fällt die Stimulation des Ventrikelgewebes durch die beiden oben genannten Schrittmacher weg, kommt es zum Einsatz des tertiären Schrittmachers, welcher durch die Purkinjefasern gebildet wird (siehe Abbildung 33) (Gödecke et al., 2010). In dem hier verwendeten Setup ist somit gut vorstellbar, dass es zur Spontanaktivität der adulten Herzschnitte kommt, wenn in jedem Schnitt ein Teil der Purkinjefasern oder eines anderen Anteils des Erregungsleitungssystems enthalten ist. Da die Herzen in der Horizontalebene geschnitten wurden, ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, dass in den meisten Fällen ein Teil des Erregungsleitungssystems in dem Herzschnitt vorhanden war.



**Abbildung 33: Das Erregungsleitungssystem des Herzens**

Dargestellt ist eine Skizze eines Herzens mit dem Erregungsleitungssystem. Die roten Markierungen stellen den Sinusknoten (oben) und den AV-Knoten (mittig) sowie darunter das His-Bündel, die Kammerchenkel und die Purkinjefasern dar. (modifiziert nach Gödecke et al. 2010)

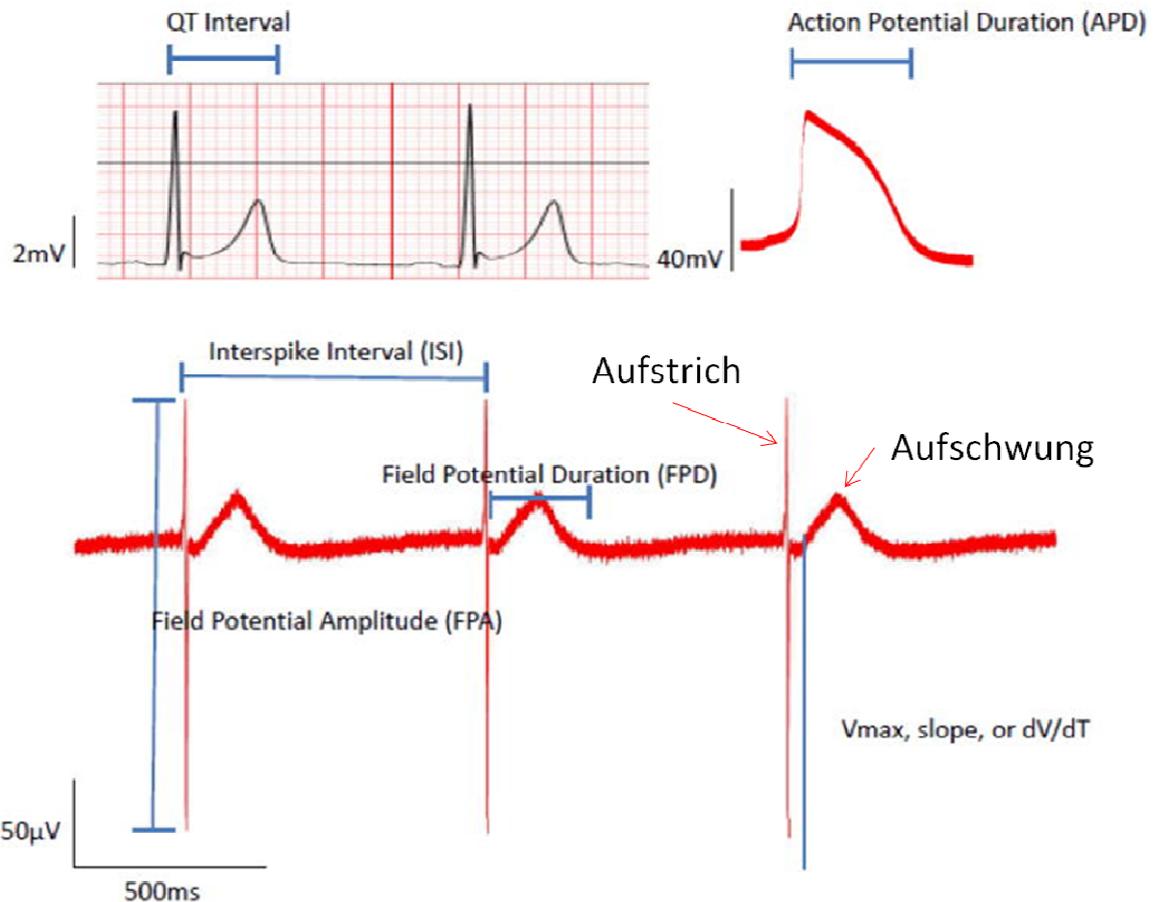
Herzschnitte, die keine Spontanaktivität aufwiesen, waren daher vermutlich entweder nicht vital oder enthielten keinen Schrittmacher, der die Erregung generierte. Diese Schnitte wurden dann, sofern sie vital waren, mittels interner Stimulation aktiviert oder verworfen.

Da sich in den Versuchen kein Hinweis auf eine andere Ursache für die Eigenaktivität fand, ist davon auszugehen, dass die stabile und reproduzierbare Spontanaktivität in einem Kammerersatzrhythmus begründet liegt. Somit ist die rhythmische und robuste Ausbildung eines Eigenrhythmus in den Schnitten ein Hinweis auf eine hohe Präparationsqualität, bei der die intrinsischen Schrittmacherzellen im Gewebeverband überlebten und somit in vitro stabil aktiv sein konnten.

## 5.2 Einschlusskriterien zur Bestimmung der Feldpotentialdauer

Feldpotentiale sind Signale, die bei elektrophysiologischen, extrazellulären Messungen, wie mit dem MEA System, detektiert werden können (Meyer et al., 2004). Sie korrelieren unter anderem in ihrer Dauer und Form mit Aktionspotentialen (Meyer et al., 2004, Tertoolen et al., 2018, Bussek et al., 2009). Das Feldpotential setzt sich zusammen aus einem schnellen Aufstrich, gefolgt von einem langsameren Aufschwung. Die erste, schnelle, Komponente des Feldpotentials entspricht dem Natrium Ion ( $\text{Na}^+$ ) Einstrom in die Zelle und somit der Depolarisation (Meyer et al., 2004). Die Repolarisation entspricht dem langsameren zweiten Anteil (Meyer et al., 2004). Diese Korrelation zwischen den Anteilen der Feldpotentiale und den jeweils aktivierten Ionenkanälen konnten Vorarbeiten zeigen, indem verschiedene Ionenkanalblocker eingesetzt wurden und deren jeweiliger Einfluss auf die Feldpotentiale gezeigt werden konnte (Meyer et al., 2004, Bussek et al., 2009, Halbach et al., 2006). Der

Zusammenhang zwischen Feldpotential und Aktionspotential sowie der QT-Zeit, welche das Aktionspotential widerspiegelt, ist in Abbildung 34 dargestellt (Navarrete et al., 2013).



**Abbildung 34 Zusammenhang zwischen dem QT-Intervall, der Aktionspotentialdauer und der Feldpotentialdauer**

Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen der Länge des QT-Intervall, der Aktionspotentialdauer (APD) und der Feldpotentialdauer (FPD). Die Messung des Aktionspotentials und des Feldpotentials erfolgte an human induzierten pluripotenten Stammzellen.

Oben links ist ein Ausschnitt des EKGs zu sehen, auf dem das QT-Intervall markiert ist.

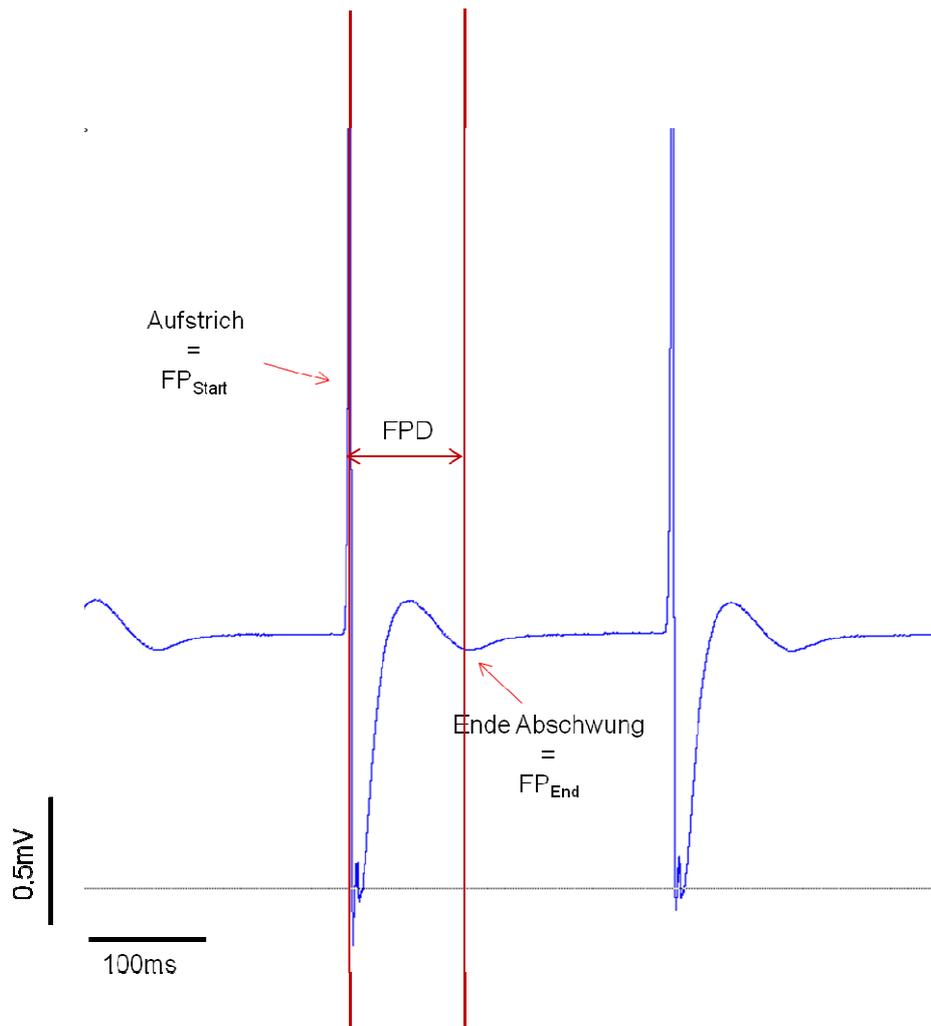
Oben rechts ist ein Aktionspotential mit eingezeichneter APD abgebildet.

Unten sind mehrere Feldpotentiale dargestellt, an denen die FPD dargestellt wird und der Aufstrich und Aufschwung mit Pfeilen markiert ist. (modifiziert nach Navarrete et al. 2013)

Für eine standardisierte Auswertung der FPD war die Definition von  $FP_{Start}$  und  $FP_{End}$  notwendig. Auch hier wurde die vorhandene Literatur zur Recherche des Vorgehens anderer Arbeitsgruppen genutzt. Zum Zeitpunkt der Promotion war die Verwendung von adulten Mäuseherzschnitten bei MEA System Messungen nicht weit verbreitet, so dass nur wenige Informationen aus der Literatur gewonnen werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Halbach et al. (2006) hat die FPD als Zeitabstand zwischen dem ersten Abstrich und dem letzten Maximum des Feldpotentials definiert (Halbach et al., 2006). Was jedoch auffällt ist, dass keine konkreten Werte der FPD aufgeführt, sondern nur repräsentative Darstellungen der Messungen gezeigt werden. Insgesamt herrscht in der Literatur ein Mangel an konkreten

Werten der FPD von adulten Mäuseherzschnitten, was darauf hinweisen kann, dass die Auswertung dieser FPD nicht trivial ist. In anderen Gewebepräparationen hingegen wurden Normwerte der FPD publiziert. So ist die Auswertung der FPD in embryonalen Zellkulturen von Hühnerherzen etabliert (Meyer et al., 2004). Auch in einer Arbeit in der MEA System Messungen an humanem und caninem Herzgewebe durchgeführt wurden, konnte die FPD bestimmt werden (Camelliti et al., 2011). Die Arbeitsgruppe Bussek et al. führte MEA System Messungen sowohl an Meerschweinchenherzen, als auch Rattenherzen durch. Hier fiel auf, dass die durchschnittliche FPD in den Meerschweinchen bestimmt werden konnte, dies bei den Rattenherzen hingegen durch einen langsamen Abschwung der Feldpotentiale zur Baseline, der die Bestimmung eines Endpunktes stark erschwerte, nicht möglich war (Bussek et al., 2009).

Eine Schwierigkeit in der Messung von murinen elektrischen Potentialen ergibt sich aus der Kürze dieser, was zu einer großen Anfälligkeit für Störungen führt. Eine wichtige Etappe in der Etablierung der MEA System Messungen war also die Herstellung optimaler Messbedingungen, um möglichst artefaktfreie Feldpotentiale zu erhalten. Im nächsten Schritt mussten die gemessenen Feldpotentiale auf verlässliche  $FP_{\text{End}}$  geprüft werden. Da bei der Fragestellung dieser Arbeit die Veränderung der FPD unter verschiedenen Bedingungen, orthotop und heterotop sowie  $PLB^{+/+}$  und  $PLB^{-/-}$  betrachtet wurde, war musste eine Definition für  $FP_{\text{End}}$  gefunden werden, die unter allen Bedingungen anwendbar war. In dieser Arbeit wurde kongruent zu dem Vorgehen der Arbeitsgruppe Navarrete et al., die MEA System Messungen an human induzierten pluripotenten Stammzellen durchführten, vorgegangen. Dementsprechend wurde  $FP_{\text{End}}$  am Ende des langsameren Aufschwungs und somit der Rückkehr zur Baseline definiert (siehe Abbildung 35) (Navarrete et al., 2013).



**Abbildung 35 Start- und Endpunkt der Feldpotentialdauer**

Dargestellt ist ein beispielhaftes Feldpotential. Pfeile markieren den steilen Aufstrich, welcher dem Feldpotentialstartpunkt ( $FP_{Start}$ ) entspricht sowie den langsamere Aufschwung, welcher dem Feldpotentialendpunkt ( $FP_{End}$ ) entspricht. Mittels eines horizontalen roten Doppelpfeils ist die Feldpotentialdauer (FPD) markiert.

Diese Definition unterscheidet sich von jener der Arbeitsgruppe Halbach et al., die, wie oben erwähnt, das Maximum des letzten positiven Aufschwungs als  $FP_{End}$  deutete (Halbach et al., 2006). Die Abbildung 34 verdeutlicht, dass der letzte positive Aufschwung des Feldpotentials dem Maximum der T-Welle entspricht (Navarrete et al., 2013). Wird davon ausgegangen, dass die FPD mit der APD und dem QT-Intervall korreliert, wie bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Meyer et al., 2004, Bussek et al., 2009), erscheint es schlüssig,  $FP_{End}$  übereinstimmend mit dem allgemein anerkannten Endpunkt von Aktionspotentialen, nämlich Rückkehr zum Membranpotential nach der Repolarisation (Nerbonne und Kass, 2005), und dem des QT-Intervall nach Enden der T-Welle zu definieren.

War dieser definierte  $FP_{End}$  nicht eindeutig zu bestimmen, so wurden die entsprechenden Messungen aus der Auswertung ausgeschlossen.

### 5.3 Messbarkeit und Stabilität der Feldpotentiale

Unter Verwendung des MEA Systems konnten die Feldpotentiale der spontan schlagenden ventrikulären adulten Mäuseherzschnitte gemessen werden. Eine zeitliche Stabilität der FPD über die Gesamtdauer der Messungen, bis zu einem Maximum von 30 Minuten, war eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit, da die FPD den Marker für die Veränderungen bei Entlastung zwischen den 4 Versuchstiergruppe darstellte. Diese zeitliche Stabilität der FPD konnte indirekt über die Betrachtung der Einzelwerte und ihrer Schwankungen nachgewiesen werden. So konnte zuerst im Etablierungsteil und später auch in den Folgeversuchen gezeigt werden, dass die Einzelwerte der FPD nur mit einer geringen Streuung um den Mittelwert schwanken. Zudem ist eine Stärke dieser Arbeit, dass pro Herzschnitt über die 60 Elektroden des MEA Systems sehr viele Einzelwerte der FPD bestimmt wurden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass einzelne Ausreißer statistisch raus gerechnet wurden. Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass zeitabhängige Veränderungen der FPD, wenn überhaupt, nur eine zu vernachlässigende Rolle in den Ergebnissen dieser Arbeit spielen.

### 5.4 Translation vom Rattenmodell zum Mausmodell

Der Großteil der Vorarbeiten auf denen diese Arbeit beruht, wurde an Rattenmodellen durchgeführt. Daher war ein wichtiger Schritt dieser Arbeit zu prüfen, ob wichtige Ergebnisse, die an der Ratte erzielt wurden, auf die Maus übertragbar waren. Die schloss neben dem Gelingen der hHTX in der Maus, auch die Reproduzierbarkeit der Verlängerung von elektrischen Potentialen im entlasteten Herzen, die in den Vorarbeiten von Schwoerer et al. (Schwoerer et al., 2008b, Schwoerer et al., 2013, Schwoerer et al., 2008a) an Ratten nachgewiesen wurden, ein.

Der Erfolg der hHTX, sprich die Entlastung des Spenderherzens, wurde indirekt über die Abnahme des Herzgewichtes gemessen. An Rattenherzen konnte eine Reduktion des Herzgewichtes von ungefähr 50% nach 14tägiger Entlastungszeit gezeigt werden (Schwoerer et al., 2008b, Schwoerer et al., 2008a, Ito et al., 2003, Depre et al., 1998). Die Ergebnisse des Gewichtsvergleiches der Mäuseherzen vor und nach 14tägiger Entlastung zeigten in dieser Arbeit eine entsprechende Gewichtsreduktion von 30 bis 60% (siehe Abbildung 29).

Im nächsten Schritt war die Überprüfung der elektrophysiologischen Auswirkungen der Entlastung entscheidend. Messungen an Kardiomyozyten von entlasteten Rattenherzen zeigten in Vorarbeiten eine signifikante Verlängerung der APD und auch EKG Messungen solcher Herzen wiesen eine deutliche QT Verlängerung auf (Schwoerer et al., 2008a, Schwoerer et al., 2017). Erstmals konnte in dieser Arbeit eine signifikante Verlängerung der

elektrischen Potentiale, in Form einer Verlängerung der FPD, in entlasteten Mäuseherzen gezeigt werden (siehe Abbildung 30). Somit ist es wahrscheinlich, dass in Mäuseherzen grundsätzlich ähnliche Prozesse bei Entlastung ablaufen wie in Rattenherzen und die zugrundeliegenden Mechanismen, wie der Zunahme des  $I_{Ca,L}$  ähnlich sein könnten.

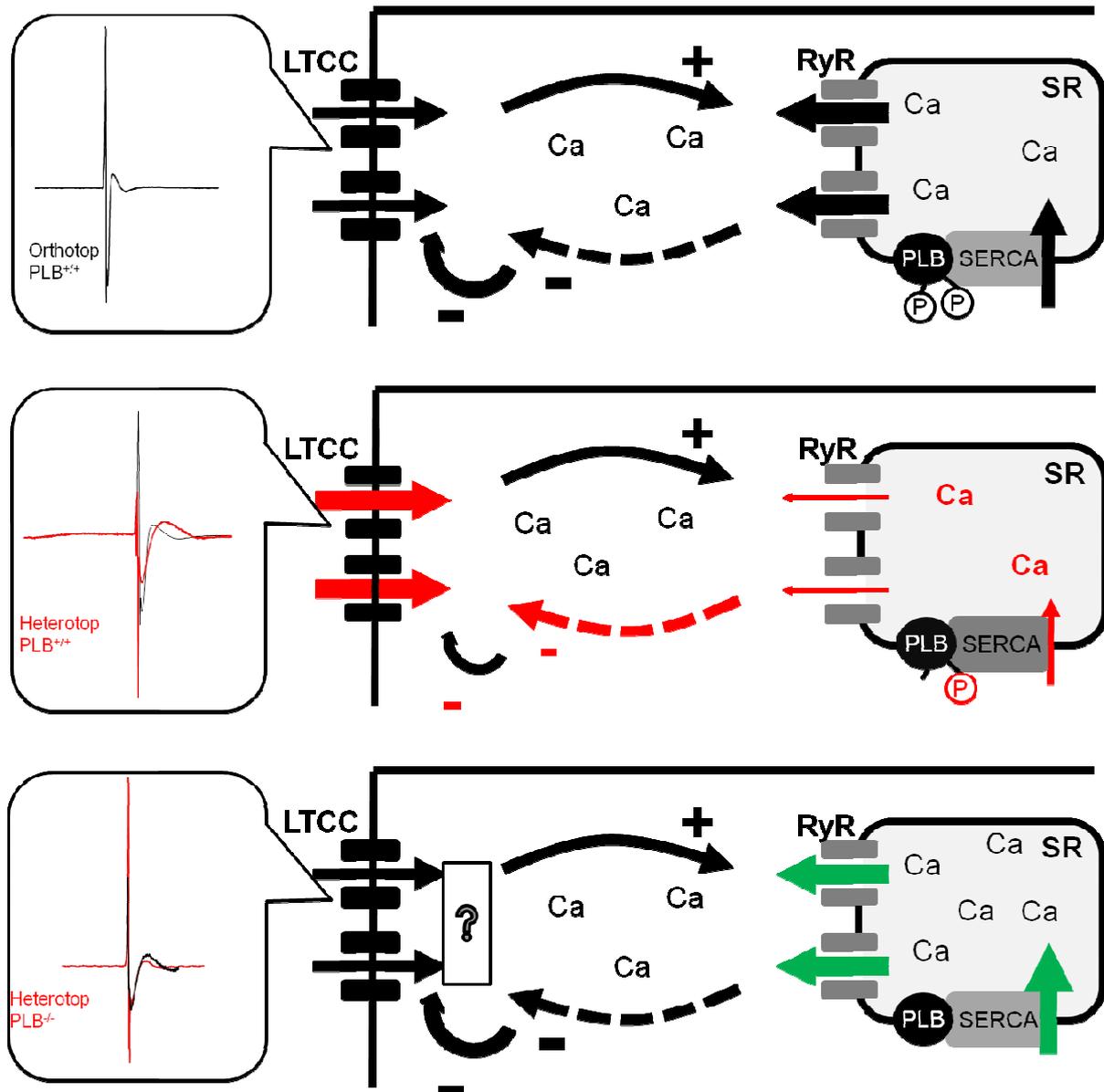
Somit sprechen sowohl der phänotypische Entlastungseffekt als auch das Remodeling auf elektrophysiologischer Ebene dafür, dass das Modell der kardialen Entlastung über hHTX erfolgreich von der Ratte in die Maus übertragbar ist,

## 5.5 Einfluss des Genotyps auf die Feldpotentialdauer bei Entlastung

Wie bereits erwähnt, konnte in Vorarbeiten ein entlastungsabhängiges Remodeling auf zellulärer und elektrophysiologischer Ebene in Nagerherzen gezeigt werden (Schwoerer et al., 2013, Schwoerer et al., 2008a). Übereinstimmend damit konnte auch in dieser Arbeit zum ersten Mal in Mäusen eine signifikante Verlängerung der FPD in der heterotopen  $PLB^{+/+}$  Gruppe von ungefähr 27%, beobachtet werden. Die Rolle die PLB bei Entlastung spielt, liegt vermutlich in einem veränderten  $Ca^{2+}$ -Handling begründet. Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt, kommt es bei Herzentlastung zu einer verminderten Phosphorylierung von PLB, mit einer daraus folgenden verstärkten Hemmung der SERCA (Schwoerer et al., 2013). In Abbildung 36 (mittig) ist das  $Ca^{2+}$ -Handling auf zellulärer Ebene im atrophischen Herzen gezeigt. Die aus der verminderten Aktivität der SERCA resultierende verminderte  $Ca^{2+}$ -Füllung des SR wird dargestellt. Vorstellbar ist, dass durch die geringere  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, die LTCC weniger stark  $Ca^{2+}$ -abhängig gehemmt werden und dadurch der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die LTCC zunimmt (Schwoerer et al., 2013). Passend dazu wurde eine verstärkte Expression der LTCC in entlasteten Rattenherzen detektiert (Schwoerer et al., 2013). Als Folge des verstärkten  $I_{Ca,L}$  wird der  $Ca^{2+}$ -Transient aufrechterhalten und es kommt zu einer Verlängerung der Aktionspotentiale beziehungsweise Feldpotentiale.

Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass ein Knockout von PLB das ventrikuläre Remodeling im entlasteten Herzen verhindert. Um dies zu adressieren, wurden  $PLB^{-/-}$  Mäuse der hHTX unterzogen und die Feldpotentiale der entlasteten Herzen mit dem MEA System gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die  $PLB^{-/-}$  Herzen nach 14 Tagen Entlastung signifikant leichter als die orthotopen  $PLB^{-/-}$  Herzen waren. Eine Verlängerung der FPD hingegen trat nicht auf. Daraus kann geschlossen werden, dass es zwar zum selben phänotypischen Remodeling wie bei den  $PLB^{+/+}$  Herzen kommt, die Veränderungen der Elektrophysiologie aber abweichen. Zu erklären könnte dies durch die fehlende Inhibition der SERCA durch PLB in den  $PLB^{-/-}$  Herzen sein. Eine denkbare Folge einer aktiveren SERCA ist, dass im Vergleich zu Kardiomyozyten mit  $PLB^{+/+}$ , deutlich mehr von dem intrazellulären  $Ca^{2+}$  zurück in das SR gepumpt wird und so die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im SR steigt. Dadurch

erhöht sich auch die Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ , die während der Systole aus dem SR strömt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inhibition der LTCC würde so auf ein weitestgehend normales Niveau ansteigen und der  $I_{\text{Ca,L}}$  wieder auf den Zustand im physiologischen Zustand sinken (siehe Abbildung 36 unten). Da der  $I_{\text{Ca,L}}$  großen Einfluss auf die APD hat, könnte so die fehlende FPD Verlängerung bei  $\text{PLB}^{-/}$  Herzen erklärt werden. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen in der heterotopen  $\text{PLB}^{-/}$  Gruppe bestätigen die vermutete Bedeutung von PLB im entlasteten Herzen und unterstützen die Hypothese dieser Arbeit.



**Abbildung 36: Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling im physiologischen, im atrophischen und im atrophischen Zustand mit Phospholamban Knockout**

Oben in der rechten Spalte ist das  $\text{Ca}^{2+}$  Handling im physiologischen Zustand dargestellt.  $\text{Ca}^{2+}$  strömt von extrazellulär über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (LTCC) in die Zelle. Dadurch wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die Ryanodinrezeptoren (RyR) aus dem sarkoplasmatisches Retikulum (SR) gestartet. In der Membran des SR sitzen die Sarcoplasmatic Reticulum Calcium Adenosintri-phosphatasen (SERCA), die durch Phospholamban (PLB) inhibiert wird, welches selber wiederum durch Phosphorylierung (P) gehemmt wird. Das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR führt

zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Hemmung der LTCC.

In der linken Spalte ist ein repräsentatives Feldpotential eines orthotopen Phospholamban Wildtyp ( $\text{PLB}^{+/+}$ ) Herzens dargestellt.

In der Mitte auf der rechten Seite ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling im atrophischen Zustand dargestellt. Durch eine verminderte P von PLB ist die SERCA weniger aktiv und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Füllung des SR vermindert. Dadurch wird weniger  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt und die LTCC weniger stark gehemmt. Es kommt zu einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär über die LTCC.

In der mittleren linken Spalte ist vergleichend ein repräsentatives Feldpotential eines heterotopen  $\text{PLB}^{+/-}$  Herzens (rot) und ein Feldpotential eines orthotopen  $\text{PLB}^{+/+}$  Herzens (schwarz) dargestellt.

Unten auf der rechten Seite ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling im atrophischen Zustand mit Phospholamban Knockout ( $\text{PLB}^{-/-}$ ) dargestellt. Durch fehlende Hemmung der SERCA durch PLB ist das SR mit mehr  $\text{Ca}^{2+}$  gefüllt als im atrophischen  $\text{PLB}^{+/+}$  Zustand.

Unten in der linken Spalte ist ein Feldpotential eines heterotopen  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzens (rot), im Vergleich mit einem orthotopen Phospholamban Wildtyp ( $\text{PLB}^{+/+}$ ) Herzen (schwarz) abgebildet.

## 5.6 Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer

Da vor allem spontan schlagende Herzschnitte mit dem MEA System gemessen wurden, musste die Betrachtung einer etwaigen Frequenzabhängigkeit der FPD erfolgen. Die Frequenzabhängigkeit der FPD beziehungsweise der APD ist ein vielfach beschriebenes Phänomen in der Literatur (Eisner et al., 2009, Antoons et al., 2002). Unter anderem haben Halbach et al. (2006) Feldpotentiale an Mäuseherzschnitten sowohl bei 2Hz als auch bei 10Hz gemessen und eine Verkürzung dieser bei der höheren Frequenz festgestellt (Halbach et al., 2006). Wird von einer vorliegenden Frequenzabhängigkeit der FPD ausgegangen, wäre diese in niedrigeren Frequenzbereichen länger und in höheren kürzer. Daraus folgend stellt sich die Frage, ob die Frequenz einen Einfluss auf die FPD und so auf die Ergebnisse dieser Arbeit gehabt haben könnte.

Die Betrachtung der Frequenzabhängigkeit erfolgte getrennt nach Genotyp und Entlastungszustand. Die Frequenzbereiche lagen zwischen 0,8 bis 3,6Hz in der  $\text{PLB}^{+/+}$  Gruppe (siehe Abbildung 31), beziehungsweise zwischen 1,4 bis 5,2Hz in der  $\text{PLB}^{-/-}$  Gruppe (siehe Abbildung 32). Es fiel auf, dass lediglich in der orthotopen  $\text{PLB}^{-/-}$  Gruppe eine signifikante Frequenzabhängigkeit, also eine Abnahme der FPD in den höheren Frequenzen, zu sehen war. Der fehlende Nachweis der Frequenzabhängigkeit in den anderen Gruppen könnte durch die Unterschiede in der Gruppengröße zustanden kommen. Bei den orthotopen  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzschnitten handelt es sich um die größte betrachtete Gruppe (n=49). Daher ist es möglich, dass in dieser Arbeit bei den anderen Gruppen die Frequenzabhängigkeit bei kleinerer Gruppengröße übersehen wurde. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die normale Herzfrequenz der Maus bei ungefähr 300 bis 840Schlägen/min (John Hopkins University, 2021) liegt, was 5 bis 14Hz entspricht. Im Durchschnitt wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen bei einer Frequenz von 2,1Hz bei  $\text{PLB}^{+/+}$  Herzen beziehungsweise 2,9Hz bei  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzen, also in einem für die Maus niedrigen Frequenzbereich gemessen. Auch die Unterschiede in der Frequenz innerhalb eines

Herzschrittes von maximal 3,8Hz sind im Vergleich mit dem normalen Frequenzbereich der Maus eher gering. Diese bradykarden Frequenzen in allen vier Versuchstiergruppen können durch den fehlenden Einfluss des vegetativen Nervensystems erklärt werden.

Bedeutender als der Nachweis oder das Fehlen einer Frequenzabhängigkeit war in dieser Arbeit die Frage nach einem etwaigen Einfluss der Frequenz auf die Ergebnisse. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die FPD der heterotopen  $PLB^{+/+}$  in allen Frequenzbereichen höher waren als die FPD der orthotopen  $PLB^{+/+}$  Herzschritte mit vergleichbaren Frequenzen (siehe Abbildung 31). Dies unterstützt die Annahme, dass die Verlängerung der FPD in Zusammenhang mit der Herzentlastung steht und unbeeinflusst von der Frequenz auftritt. Zudem zeigte die  $PLB^{-/-}$  Gruppe eine gleichmäßige Verteilung der FPD der orthotopen und heterotopen Herzschritte in dem gemessenen Frequenzbereich (siehe Abbildung 32). Ein Einfluss der Frequenz könnte angenommen werden, wenn es zu einer Häufung der heterotopen  $PLB^{-/-}$  Messungen in höheren Frequenzbereichen gekommen wäre, in dem bei einer relevanten Frequenzabhängigkeit kürzere FPD zu finden wären (Eisner et al., 2009, Antoons et al., 2002, Halbach et al., 2006). Dies ist hier nicht der Fall.

Somit spricht die Verteilung der FPD in dem gemessenen Frequenzbereich dieser Arbeit dafür, dass sowohl die Verlängerung der FPD in der heterotopen  $PLB^{+/+}$  Gruppe, als auch das Fehlen dieser in der heterotopen  $PLB^{-/-}$  Gruppe eine echte Beobachtung und kein frequenzabhängiges Artefakt ist. Schlussfolgernd scheint die Frequenz der Feldpotentiale demnach in dem gemessenen Frequenzbereich zwischen ungefähr 0,8 und 5,2Hz keinen relevanten Einfluss auf die Interpretation der FPD in dieser Arbeit zu haben.

## 5.7 Das experimentelle Arbeiten

### 5.7.1 Stichprobenumfang in den Versuchstiergruppen

Zu Beginn der Arbeit wurden pro Versuchstiergruppe 5 Herzen geplant. Die Planung erfolgte mit Hilfe von Literaturrecherche und unter Einschätzung der Komplexität der Methoden (siehe Seite 22). Das Erreichen dieser Gruppengröße war erfolgreich bei den orthotopen  $PLB^{+/+}$  sowie den orthotopen  $PLB^{-/-}$  Tieren. Bei den heterotopen Tieren konnten die erwünschten Zahlen nicht erzielt werden. Die Nichterfüllung der geplanten Zahlen in den heterotopen Versuchstiergruppen ist erklärbar durch die niedrigen Fehlertoleranzen der angewendeten Methoden, insbesondere der hHTX und der Schneideprozedur. Bei der hHTX konnten beispielsweise Anastomosenblutungen oder Thrombosebildung im Spenderherz zu Versagen der Technik führen (Westhofen et al., 2019). Die Überlebensrate der Operation betrug ungefähr 60% (Westhofen et al., 2019).

Probleme beim Schneiden der Herzen ergaben sich vor allem durch ein zuweilen auftretendes komplettes Herauslösen des Herzens aus dem Agaroseblock. Trat dies auf, so waren bei den anschließenden MEA System Messungen meist keine elektrischen Aktivitäten zu sehen. Das ist damit zu erklären, dass wenn sich das Herz aus dem Agaroseblock löst, der Prozess der Einbettung in Agarose, die Erhärtung und das Kleben auf die Vibratoplattform erneut erfolgen müssen. Während dieser Zeit ist das Herz nicht mit O<sub>2</sub> versorgt und es ist wahrscheinlich, dass die Ischämiezeit einen kritischen Punkt erreicht. Derartige Schwierigkeiten bei der Schneideprozedur konnten nach häufigerem Durchführen und korrektem Handling weitestgehend vermieden werden. Insgesamt wurde das Herauslösen aus der Agarose vermehrt bei den heterotopen Herzen betrachtet, was durch das phänotypisches Remodeling und Narbenbildung erklärbar wäre. Die oben geschilderten Zwischenfälle waren zudem in den heterotopen Versuchstiergruppen gravierender für die Zeitplanung, da diese, anders als orthotopen Herzen, nicht so leicht ersetzt werden konnten.

In der Gruppe der heterotopen PLB<sup>+/+</sup> konnte so eine Anzahl von 3 Tieren, bei den heterotopen PLB<sup>-/-</sup> Herzen von 4 Tieren erreicht werden. Da in Vergleichsarbeiten mit ähnlichen Tierzahlen, beispielsweise 3 Kontrollherzen und 4 heterotopen Herzen, signifikant große Unterschiede in der APD von Rattenkardiomyozyten gezeigt wurden (Schwoerer et al., 2013, Schwoerer et al., 2008a), kann davon ausgegangen werden, dass auch die in dieser Arbeit erreichten Zahlen für eine Interpretation ausreichend sind. Des Weiteren sind die Ergebnisse derart hoch signifikant, dass es zu erwarten ist, dass auch bei einer größeren Versuchstiergruppe ähnliche Ergebnisse erzielt worden wären. Eine Analyse der Teststärke erbrachte eine Power von 0,99 für den Unterschied der FPD der orthotopen und heterotopen PLB<sup>+/+</sup> Tiere. Daraus kann geschlossen werden, dass die erreichten Fallzahlen ausreichend sind, um signifikante Unterschiede in der FPD nachzuweisen, wie in der PLB<sup>+/+</sup> Gruppe, oder auszuschließen, wie in der PLB<sup>-/-</sup> Gruppe.

### 5.7.2 MEA System Messungen als elektrophysiologische Methode

In dieser Arbeit wurden mit dem MEA System extrazelluläre Messungen von Feldpotentialen an Herzschnitten erhoben. Die Entscheidung für MEA System Messungen als elektrophysiologische Methode wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Wie oben aufgeführt, können bei den MEA System Messungen Herzschnitte verwendet werden. Sie stellen eine Alternative zu der weitverbreiteten Nutzung von Einzelzellen in der Elektrophysiologie dar. Die Gewinnung von Einzelzellen ist im Vergleich mit der Schneideprozedur, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ein komplexeres Verfahren mit höherer Fehleranfälligkeit (Dreher, 2018). Zudem besteht ein Vorteil bei der Messung von Herzschnitten mit dem MEA System darin, dass die Messbedingungen relativ leicht und

stabil hergestellt werden können, da lediglich ein Platzieren der Herzschnitte auf dem Elektrodenfeld erfolgen muss (Stett et al., 2003, Sallam et al., 2015). In Anbetracht der aufwendigen Operation zur Herstellung entlasteter Mäuseherzen, ist die Wahl einer weniger komplexen Probengewinnung für die elektrophysiologischen Messungen sinnvoll.

Neben dem einfacheren Handling der Messproben bietet das MEA System die Möglichkeit in kurzer Messzeit eine große Datenmenge zu ermitteln. Dies gelingt über die 60 Elektroden der Arrays, die zeitgleich an verschiedenen Stellen des Herzschnittes elektrophysiologische Aktivität messen (Stett et al., 2003, Meyer et al., 2004, Egert und Meyer, 2005). Zudem zeichnen sich Herzschnitte unter anderem durch erhaltene Zell-Zell-Kontakte und eine intakte extrazelluläre Matrix aus, wodurch die umgebenden Bedingungen der Kardiomyozyten deutlich mehr Ähnlichkeiten mit dem Zustand *in vivo* aufweisen (Camelliti et al., 2011, Bussek et al., 2009, Brandenburger et al., 2012). Beim Einsatz von Herzschnitten kann demnach die elektrische Aktivität von Kardiomyozyten in erhaltenem Gewebeverband ermittelt werden (Sallam et al., 2015).

Die Fragestellung dieser Arbeit, inwieweit das entlastungsabhängige Remodeling durch fehlendes PLB verhindert wird, kann über Veränderungen der Länge der elektrischen Potentiale in verschiedenen Versuchstiergruppen adressiert werden. Die mit dem MEA System gemessenen Feldpotentiale sind wie bereits diskutiert geeignet, um diese Veränderungen aufzeigen (siehe Seite 20). Feldpotentiale integrieren die elektrischen Signale von Zellverbänden und spiegeln so die Situation im Organ wieder (Stett et al., 2003, Meyer et al., 2004).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nicht nur bei Einsatz von fehleranfälligen Methoden, wie in dieser Arbeit, das MEA System die Methode der Wahl darstellt. Die oben diskutierten Eigenschaften der MEA System Messungen, wie die stabilen Messbedingungen, einer hohen Datenmenge pro Herzschnitt und den Messungen der elektrischen Aktivität im Zellverband bieten insgesamt entscheidende Vorteile gegenüber anderen elektrophysiologischen Methoden.

## 5.8 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen Forschungsstand, in Hinblick auf den Einfluss von PLB in Herzatrophie, eingeordnet.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass es in Atrophie zu verlängerten QT-Intervallen beziehungsweise verlängerten APD kommt, welche ein Risiko für die Entstehung von Arrhythmien darstellen (Schwoerer et al., 2008a, Nattel et al., 2007). Ergänzend dazu konnten in dieser Arbeit erstmalig auch verlängerte elektrische Potentiale, Feldpotentiale, in

entlasteten Mäuseherzen nachgewiesen werden.

Um die Verlängerung der elektrischen Potentiale bei kardialer Atrophie besser zu verstehen, wurden in den Vorarbeiten zusätzlich die Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Handlings betrachtet. Der  $I_{\text{Ca,L}}$  und die Funktionsweise des SR sind über die elektromechanische Kopplung eng verknüpft. Es zeigten sich eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Füllung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR in atrophischen Herzen (Schwoerer et al., 2013). Da PLB das Hauptregulationsprotein für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling des SR ist, waren seine Expression und der Phosphorylierungsgrad von Interesse. Schwoerer et al. (2008b) konnten zeigen dass der Expressionsgrad, sowohl des PLB als auch der SERCA, in Atrophie unverändert zum normalen Herzen waren (Schwoerer et al., 2008b). Dies ließ vermuten, dass das Remodeling des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes bei Entlastung auf Ebene der Phosphorylierung von PLB liegt. Die Phosphorylierung und Desphosphorylierung von PLB findet über ein komplexes Kinase-Phosphatase System statt (Rapundalo, 1998). Tatsächlich war die Phosphorylierung, sprich die Inhibition von PLB, im entlasteten Zustand des Herzens deutlich erniedrigt (Schwoerer et al., 2008b). Dies galt sowohl für die PKA als auch für die CaMKII Phosphorylierungsstelle. Interessanterweise war jedoch nur die Aktivität der PKA reduziert, die der CaMKII zeigte sich sogar erhöht (Schwoerer et al., 2008b). Dass es trotzdem auch an CaMKII Phosphorylierungsstelle zu einer reduzierten Phosphorylierung kam, könnte an den Gegenspielern der Kinasen, der Phosphatasen, liegen. Bei Betrachtung von PP1 und PP2a konnten eine deutlich verstärkte Aktivität und Expression gezeigt werden (Schwoerer et al., 2008b). Zusammenfassend ist die verminderte Phosphorylierung von PLB und die damit einhergehende verstärkte Hemmung der SERCA in Atrophie höchstwahrscheinlich über ein Remodeling der Kinasen und Phosphatasen hin zu einer netto verminderten Phosphorylierung vermittelt.

Trotz dieser Veränderungen des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling im atrophischen Herzen, im Sinne einer verminderten Füllung und Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR aufgrund der verstärkten Hemmung der SERCA, bleibt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient im Vergleich mit Herzen ohne Belastung auf einem stabilen Niveau (Schwoerer et al., 2013). Diese Aufrechterhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wird vermutlich über den verstärkten  $I_{\text{Ca,L}}$  erreicht. Dies ist aus energetischer Sicht ungünstig für die Kardiomyozyten, da die Effizienz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die LTCC schlechter ist, als die der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Eisner et al., 2009). Vorstellbare wäre eine Regulation im Sinne eines Regelkreises mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als Sollwert und den Parametern der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den LTCC als Variablen (Schwoerer, 2012). Diese unbedingte Aufrechthaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten könnte dadurch bedingt sein, dass dieser schon im Normalzustand am unteren Limit ist und ein weiteres Absinken nicht mit einer suffizienten Kontraktion vereinbar ist (Schwoerer, 2012).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wodurch es in der kardialen Stresssituation der Atrophie überhaupt erst zu einer verstärkten Hemmung der SERCA durch PLB kommt. Eine Theorie ist, dass die Runterregulation der SERCA ein Prozess zur Energieeinsparung ist (Taegtmeier et al., 2010). Wird von diesem Modell ausgegangen, so muss geschlussfolgert werden, dass der Energieverbrauch der SERCA, den des verstärkten  $I_{Ca,L}$  übersteigt. Alles in allem ist zu sagen, dass die Belastungsreaktionen des Herzens auf Entlastung nicht in ihrer Gänze verstanden sind.

Aufbauend auf den Vorarbeiten, in denen ausschließlich Herzen mit  $PLB^{+/+}$  Genotyp verwendet wurden, wurden die entlastungsabhängigen Veränderungen in dieser Arbeit zusätzlich an  $PLB^{-/-}$  Herzen betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Entlastung von  $PLB^{-/-}$  Herzen, im Gegensatz zu  $PLB^{+/+}$  Herzen, zu keiner Verlängerung der FPD kam. Ohne Anwesenheit von PLB entfällt die Hemmung der SERCA. Dies führt zu einer vermehrten  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in das SR, woraus folgend von einer verstärkten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung des SRs während der Systole ausgegangen werden kann. In Bezug auf die oben präsentierte Theorie des  $Ca^{2+}$ -Transienten mit gegebenem Sollwert ist davon auszugehen, dass in den entlasteten  $PLB^{-/-}$  Herzen kein verstärkter  $I_{Ca,L}$  vorliegt, da es nicht zu einer Abweichung des Istwertes vom Sollwert kommt. Der energetisch ungünstigere Weg, den  $Ca^{2+}$ -Transienten über einen verstärkten  $I_{Ca,L}$  aufrechtzuhalten, muss demnach nicht aktiviert werden und es entfällt die Verlängerung der FPD. Die Hypothese dieser Arbeit, dass durch die Wegnahme von PLB das ventrikuläre Remodeling der Elektrophysiologie, welches mit der Entlastung der Herzen einhergeht, verhindert werden kann, konnte durch die erzielten Ergebnisse gestützt werden.

Für ein tieferes Verständnis der zellulären Vorgänge müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Die Nutzung des in dieser Arbeit verwendeten Tiermodells mit Mäusen ohne exprimiertes PLB eignet sich um weiterführende Fragestellungen zu den oben beschriebenen Veränderungen bei Atrophie zu adressieren. Interessant wäre es, die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR in den entlasteten  $PLB^{-/-}$  Herzen zu betrachten, um zu schauen, ob diese, wie bei fehlender Hemmung der SERCA zu erwarten wäre, im Vergleich zu den entlasteten  $PLB^{+/+}$  Herzen, gesteigert ist. Um die oben genannte Theorie zu unterstützen, sollten zudem in Folgeprojekten die  $Ca^{2+}$ -Transienten in entlasteten  $PLB^{-/-}$  Kardiomyozyten betrachtet werden, um zu schauen, ob dieser auch bei gleichbleibender FPD aufrechtgehalten wird oder ob er vermindert beziehungsweise verstärkt ist. Zu bedenken ist, dass zur Adressierung dieser Fragestellungen weitere aufwendige Methoden an entlasteten Mäuseherzen etabliert werden müssen. In Vorarbeiten an Rattenherzen wurde sowohl die SR  $Ca^{2+}$ -Freisetzung als auch die Bestimmung des  $Ca^{2+}$ -Transienten an isolierten Einzelzellen durchgeführt (Schwoerer et al., 2013). Diese ist wie oben aufgeführt nicht trivial

und erfordert vermutlich einen langen Etablierungszeitraum (Dreher, 2018). Weiterhin sollte die Expression und die Aktivität der LTCC adressiert werden, um die Theorie zu prüfen, ob bei entlasteten PLB<sup>-/-</sup> im Gegensatz zu entlasteten PLB<sup>+/+</sup> Herzen, keine Verstärkung dieser vorliegt. Diese Informationen könnten weitere Hinweise darauf liefern, warum die FPD bei den entlasteten PLB<sup>-/-</sup> Herzen nicht verlängert vorliegt.

## 5.9 Translation der Ergebnisse auf den Menschen und in die Klinik

Experimentelle Forschung am Mausmodell ist in der Grundlagenforschung in den meisten Fachrichtungen weit verbreitet. Zu den offensichtlichen Vorteilen von Mausmodellen gehören unter anderem die unkomplizierte Haltung der Tiere sowie die Möglichkeit der Standardisierung nahezu aller Umgebungsparameter wie Nahrung, Alter und dem genetischem Erbgut. Hinzu kommt, dass operative oder medikamentöse Interventionen unter maximal reduziertem Leid der Tiere durchgeführt werden können. Dies ist am Menschen ethisch in diesem Umfang nicht vertretbar. Zusätzlich ist es durch die Verwendung von Knockout Mäusen möglich, den Einfluss einzelner Proteine auf eine pathophysiologische Situation zu überprüfen, indem die jeweiligen adressierten Parameter in Wildtyp und Knock-out Mäusen verglichen werden.

Allerdings ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die an Mäusen erzielt werden, auf den Menschen zum Teil eingeschränkt. Eine etwaige Limitation der Übertragbarkeit ergibt sich aus den Unterschieden zwischen bestimmten Eigenschaften der Elektrophysiologie. So ist beispielsweise die Herzfrequenz von Mäusen ungefähr um ein 10faches höher als die des Menschen (Sallam et al., 2015, Haghghi et al., 2003). Ein weiterer großer Unterschied zwischen den Spezies ist bei den Ionenkanäle zu finden, die für das Aktionspotential zuständig sind (Sallam et al., 2015). Bei den K<sup>+</sup>-Kanälen, die bei der Repolarisation aktiv sind, spielt bei Nagern vor allem der I<sub>to</sub> eine wichtige Rolle, während beim Menschen I<sub>Kr</sub>, I<sub>Ks</sub>, welche als verzögerte Gleichrichterstrom agieren und der I<sub>Kir</sub>, ein Einwärtsgleichrichterstrom, für die Repolarisation sorgen (Nerbonne und Kass, 2005). Unterschiede im Ca<sup>2+</sup>-Handling, welches auch in dieser Arbeit von großem Interesse ist, betreffen unter anderem die Entfernung des Ca<sup>2+</sup> aus dem interzellulären Raum. In der Maus geschieht dies zu 92%, also fast ausschließlich über die SERCA, während in menschlichen Kardiomyozyten die SERCA nur für etwa 60% der Senkung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verantwortlich ist (Haghghi et al., 2003).

Insgesamt ist zu sagen, dass trotz der hier aufgeführten Differenzen, die grundlegenden Prinzipien der Elektrophysiologie, wie die Entstehung des Aktionspotentials, die Weiterleitung der elektrischen Aktivität und der Erregungsrückbildung, in der Maus und dem Menschen dieselben sind. So müssen bei der Interpretation von Ergebnissen aus

Kleintiermodellen zwar die oben genannten Unterschiede beachtet werden, aber grundsätzliche Mechanismen können verstanden werden und zu wichtigen Erkenntnissen führen. Zudem birgt das Mausmodell zurzeit alternative Vorteile wie die Veränderung der Genexpression, der Interventionsmöglichkeit sowie der Standardisierung der Forschungsbedingungen.

In dieser Arbeit wurde sich die Möglichkeit der genetischen Modellierung von Mäusen zu Nutze gemacht, und das Wissen über die Funktion sowie die Bedeutung des Proteins PLB in Herzatrophie mit Hilfe von PLB<sup>-/-</sup> Mäusen weiter vorangetrieben. Anreiz zur Adressierung der Fragestellung dieser Arbeit, ob durch die Wegnahme von PLB das mit der Entlastung assoziierte Remodeling verhindert werden kann, ist das Erlangen eines besseren Verständnisses des Entstehungsmechanismus der assoziierten Arrhythmien unter LVAD Therapie. Wie Vorarbeiten zeigen konnten, führt die Entlastung von kritisch kranken Herzen mittels LVADs signifikant häufig zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Kirklin et al., 2015, Bruckner et al., 2001, Wohlschlaeger et al., 2005, Birks et al., 2006, Frazier et al., 1996). Problematisch sind die beobachteten Arrhythmien, welche in 33% der mit LVAD behandelten Patientinnen und Patienten auftreten (Pedrotty et al., 2013). Diese sind weder gänzlich verstanden, noch gibt es aktuell therapeutische Optionen das Auftreten dieser Arrhythmien zu verhindern oder kausal zu behandeln. In Vorarbeiten konnten sowohl bei LVAD Patientinnen und Patienten, als auch in entlasteten Rattenherzen verlängerte QT-Intervalle beziehungsweise Aktionspotentiale, gefunden werden, welche jeweils mit einem erhöhten Arrhythmierisiko einhergingen (Harding et al., 2005, Harding et al., 2001, Schwoerer et al., 2017). In Zusammenhang mit der ebenfalls gezeigten erhöhten Aktivität von PLB in entlasteten Herzen (Schwoerer et al., 2008b), wurde in dieser Arbeit der Einfluss von PLB auf FPD in entlasteten Mäuseherzschnitten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei entlasteten PLB<sup>+/+</sup> Herzen eine Verlängerung der FPD auftrat, diese bei einem Knockout von PLB jedoch ausblieb. Die fehlende Verlängerung der FPD in den entlasteten PLB<sup>-/-</sup> Herzen spricht dafür, dass PLB einen entscheidenden Faktor in dem proarrhythmischen Remodeling bei Herzentlastung darstellt. Ausgehend von dieser Theorie könnte ein therapeutischer Ansatz in der Beeinflussung von PLB in LVAD Patientinnen und Patienten liegen. Vorarbeiten zum Thema der Suppression von PLB oder auch der verstärkten Aktivität der SERCA, was indirekt denselben Effekt wie ein Ausschalten von PLB haben könnte, sind vor allem im Bereich der Herzinsuffizienz zu finden. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PLB bei Herzinsuffizienz die Herzfunktion verbessern konnte (Kaneko et al., 2016, Kranias und Hajjar, 2012). Ein anderer Ansatzpunkt liegt in der Verstärkung der SERCA-Aktivität, beispielsweise über das Einbringen von SERCA-Genom mittels Virustransfer (Kranias und Hajjar, 2012). In der Anwendung des SERCA-Genotransfers konnte gezeigt werden, dass die Arrhythmiehäufigkeit in Herzinsuffizienz herabgesetzt

werden konnte (Lipskaia et al., 2010). Dies wird vermutlich durch die schnellere Inhibition des LTCC bei vermehrter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR erreicht (Lipskaia et al., 2010). Wie oben aufgeführt ist es denkbar, dass auch die LVAD assoziierten Arrhythmien durch Verhinderung eines zu großen Anteils des LTCC an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und einer daraus folgenden Verlängerung des Aktionspotentials, beeinflusst werden könnten. Das therapeutische Targeting des PLB-SERCA-Komplexes scheint in Herzinsuffizienz vielversprechend und es kann in Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit vermutet werden, dass es auch bei LVAD induzierten Arrhythmien erfolgreich sein kann.

Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass das Fehlen von PLB unterschiedliche Effekte auf Maus und Mensch haben könnte. So postulieren Haghghi et al., dass Menschen mit angeborenem Defekt im PLB Gen, welches zu einer Nichtexpression desselbigen führt, eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln (Haghghi et al., 2003).  $\text{PLB}^{-/-}$  Mäuse hingegen zeigen keinen derartigen Phänotyp, sondern präsentieren sich eher mit einer verbesserten Kontraktilität des Herzens (Haghghi et al., 2003, Hoit et al., 1995, Slack et al., 2001). Dieses Phänomen zeigte sich in Arbeiten von Slack et. al bis ins hohe Alter der  $\text{PLB}^{-/-}$  Mäuse (Slack et al., 2001). Diese Ergebnisse suggerieren eventuell wichtige Unterschiede zwischen dem Einfluss von fehlendem PLB in Maus und Mensch. Es wäre also möglich, dass die Behandlung mit PLB Suppressoren zu negativen Nebeneffekten führen könnte. Unter anderem kann es durch eine aktivere SERCA zu einer verstärkten Ionotropie und Lusitropie kommen (Haghghi et al., 2003). Diese verstärkte Herzarbeit könnte also, trotz des erhofften Effektes der Verhütung von LVAD assoziierten Arrhythmien, zu einem schlechteren Outcome unter PLB Suppressoren führen, da die Entlastung des Herzens weniger effektiv wäre. Auf der anderen Seite wäre es allerdings auch vorstellbar, dass gerade durch den Einsatz des LVADs der inotrope und lusitrope Effekt abgefedert wird und der mögliche positive Effekt der Verhinderung von Arrhythmien bestehen bleibt. Insgesamt ist anzumerken, dass in der Arbeit von Haghghi et al. (2003) lediglich zwei Menschen mit homozygotem Fehlen von PLB eingeschlossen waren (Haghghi et al., 2003), was die Übertragbarkeit auf den generellen Effekt einer PLB Suppression beim Menschen einschränkt.

Alles in allem erscheint die therapeutische Option mit Suppression von PLB, beziehungsweise im weitesten Sinne Aktivierung der SERCA, in LVAD Patientinnen und Patienten vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit interessant. Weiterführende Arbeiten mit Fokus auf die Arrhythmiedetektierung in  $\text{PLB}^{-/-}$  Mäusen und der Einsatz von beispielsweise PLB Suppressoren anstelle des Knockouts sind notwendig, um weitere wichtige Erkenntnisse für den Einsatz in der Klinik zu gewinnen. In den nächsten Schritten der Translation des Mausmodelles auf den Menschen und in die Klinik wäre zudem die Verwendung von EKG Messungen sinnvoll. Auftretende Arrhythmien entlasteter Herzen

konnten bereits im Rattenmodell im Rahmen von Langzeit-EKG Messungen gezeigt werden und waren wie bereits beschrieben mit verlängerten QT-Zeiten assoziiert (Schwoerer et al., 2017). In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant, solche Langzeit EKG Messungen an entlasteten PLB<sup>-/-</sup> Herzen durchzuführen und diese mit Messungen an entlasteten PLB<sup>+/+</sup> Herzen in Hinblick auf die Häufigkeit von proarrhythmischen Potentialen und Arrhythmien zu vergleichen.

## 5.10 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von PLB bei Entlastung von Mäuseherzen, im Gegensatz zu entlasteten PLB<sup>+/+</sup> Herzen, nicht zu einer Verlängerung der FPD kommt. Dies deutet daraufhin, dass PLB eine wichtige Rolle in dem Remodeling, welches unter Herzentlastung auftritt, spielt.

## 6 Zusammenfassung

Der Einsatz von LVADs in der Therapie der Herzinsuffizienz steigt stetig an. Unter LVAD Therapie muss der linke Ventrikel weniger mechanische Arbeit leisten und wird entlastet. Bei vielen insuffizienten Herzen konnte eine gravierende Verbesserung der Pumpfunktion unter Therapie mit LVADs beobachtet werden. Allerdings gibt es auch schwerwiegende Nebenwirkungen. Darunter zählen Herzrhythmusstörungen, die einer der Hauptrisikofaktoren für Morbidität und Mortalität unter dem Einsatz von LVADs darstellen und bei ungefähr 30% der Behandelten auftreten. Wodurch diese Arrhythmien entstehen, ist aktuell noch unklar. Eine Theorie ist, dass die Entlastung selbst proarrhythmische Veränderungen induziert. Um die Ursachen der Arrhythmieentstehung besser zu verstehen, wurden in Vorarbeiten unter anderem Versuche, an mittels hHTX entlasteten, Nagerherzen durchgeführt. Es wurde eine Verlängerung der Aktionspotentiale beobachtet, die mit einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die LTCC einherging. Zudem war das SR weniger stark mit  $\text{Ca}^{2+}$  gefüllt und die systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung war vermindert. Begründet werden könnten diese Veränderungen durch die beobachtete verstärkte Inhibition der SERCA durch PLB. Dies legt die Vermutung nahe, dass PLB eine wichtige Rolle in den Anpassungen der Elektrophysiologie in entlasteten Herzen spielt.

Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass die Wegnahme von PLB, das ventrikuläre Remodeling, welches mit der Entlastung assoziiert ist, verhindert. Der Arbeitsplan sah vor, Herzen von  $\text{PLB}^{+/+}$  und  $\text{PLB}^{-/-}$  Mäusen mit Hilfe der hHTX zu entlasten und an Herzschnitten elektrophysiologische Messungen mit dem MEA System durchzuführen. Dabei wurde die FPD als übergeordneter Parameter zur Darstellung des Remodelings verwendet. Zunächst erfolgte die Methodenetablierung der Gewinnung von vitalen Herzschnitten und der MEA System Messungen. Anschließend wurden die FPD der orthotopen und heterotopen  $\text{PLB}^{+/+}$  beziehungsweise  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzschnitte verglichen. Es konnte, kongruent zu den Vorarbeiten an Rattenherzen erstmals auch eine signifikante Verlängerung der FPD in heterotopen  $\text{PLB}^{+/+}$  Mäuseherzen im Vergleich zum orthotopen Zustand gezeigt werden. Bei den heterotopen  $\text{PLB}^{-/-}$  Herzschnitten hingegen konnte keine Verlängerung der FPD beobachtet werden. Eine zusätzliche Untersuchung der Frequenzabhängigkeit der FPD schloss einen Einfluss der Frequenz auf die Ergebnisse aus.

Diese Arbeit zeigt somit, dass es bei einer Deletion von PLB zu keiner FPD Verlängerung unter Entlastung kommt. Dies unterstützt die oben genannte Hypothese und macht die Bedeutung von PLB in der Arrhythmieentstehung wahrscheinlich. Weiterführende Untersuchungen sind anzustellen, um den Einfluss von PLB noch besser zu verstehen. Es scheint aber möglich, dass die Suppression von PLB unter LVAD Therapie eine Therapieoption zur Verhinderung der auftretenden Arrhythmien sein könnte.

## 7 Summary

The use of LVADs in failing hearts is rising constantly. During LVAD therapy the strain on the left ventricle is relieved due to a decreased need of mechanical work. Many failing hearts showed a great improvement in pumping function during LVAD use. However, some harmful side effects were seen. Those side effects included arrhythmias which were shown to be one of the main reasons for morbidity and mortality under therapy with LVADs. It is currently unknown why these arrhythmias occur. One theory is that the unloading itself causes proarrhythmic changes. For a better understanding of the origin of the arrhythmias previous studies were conducted using heterotopic and therefore unloaded rodent hearts. Hereby prolonged action potentials were observed. These prolonged action potentials were accompanied by an increased calcium influx via the LTCC. In addition, the SR was less filled with calcium ions and the systolic calcium efflux was decreased. Those changes could be based on the also observed increased inhibition of the SERCA by PLB. Therefore, it is most likely that PLB plays an important role in the changes of the electrophysiology in the unloaded heart.

The hypothesis of this thesis is that the lack of PLB will prevent the ventricular remodeling which is associated with unloading of the heart. The plan was to unload PLB<sup>+/+</sup> and PLB<sup>-/-</sup> hearts with use of the heterotopic heart transplantation and to use heart slices for electrophysiological measurements with the MEA system. The FPD was defined as the overall parameter of the remodeling. First the methods of slicing the hearts and using the MEA system for electrophysiological measurements were established. Afterwards the FPD of the orthotopic and heterotopic PLB<sup>+/+</sup> and PLB<sup>-/-</sup> hearts were compared. In line with the previous results a significant prolongation of the FPD in heterotopic PLB<sup>+/+</sup> hearts compared to the orthotopic PLB<sup>+/+</sup> hearts could be shown. In contrast there was no prolongation in the FPD of the heterotopic PLB<sup>-/-</sup> hearts. Additionally, the effect of the frequency was targeted and showed no significant impact of the frequency on the results. Therefore this work shows that with a deletion of PLB no prolongation of the FPD in unloaded hearts occurs. This supports the hypothesis of this work that PLB plays an important role in the origin of the arrhythmias. Additional experiments should be carried out to achieve more knowledge about the influence of PLB. In conclusion it might be possible that a suppression of PLB in LVAD therapy could be a possible treatment to prevent arrhythmias.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
Ao	Aorta
AO asz	Aorta ascendens
BDM	2,3-Butanedione Monoxim
$Ca^{2+}$	Calcium Ion
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige Kinase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Membranpotential
EDV	end-diastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
FP <sub>End</sub>	Feldpotentialendpunkt
FP <sub>Start</sub>	Feldpotentialstartpunkt
g	Gramm
Hz	Hertz
$I_{Ca, L}$	$Ca^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanal
IE	internationale Einheiten
$I_{K1}$	$K^+$ Einwärtsgleichrichter
$I_{KATP}$	ATP abhängiger $K^+$ -Ausstrom
$I_{Kr}$	schneller verzögerter $K^+$ Gleichrichterstrom
$I_{Ks}$	langsamer verzögerter $K^+$ Gleichrichterstrom
$I_{to}$	transienter $K^+$ -Ausstrom
IVC	Vena cava inferior
$K^+$	Kalium Ion
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter

LTCC	L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal
LV	linker Ventrikel
LVAD	Left Ventricular Assist Device
MCS	MultiChannelSystems
MEA	Microelectrode Array
mg	Miligramm
mM	milimolar
mmol	Milimol
mol	Mol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mV	Milivolt
n	Anzahl
$\text{Na}^+$	Natrium Ion
nm	Nanometer
$\text{O}_2$	Sauerstoff
PA	Arteria pulmonalis
PH01	erhitzbare Perfusionskanüle
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
$\text{PLB}^{-/-}$	Phospholamban Knockout
$\text{PLB}^{+/+}$	Phospholamban Wildtyp
PP1	Phosphatase 1
PP2A	Phosphatase 2A
PPS2	Peristaltik-Perfusionsystem
QTc-Zeit	korrigierte QT-Zeit
RA	rechtes Atrium
RV	rechter Ventrikel
RVAD	Right Ventricular Assist Device
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SERCA	Sarcoplasmatic Reticulum Calcium Adenosintriphosphatasen
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAH	Total Artificial Heart

TC01	Temperaturkontrollsystem
TTL	Transistor-Transistor-Logik
VAD	Ventricular Assist Device
VMTC-1	Video-Mikroskopisch
$\beta$	beta
$\Delta E$	Farbabstand

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbott, C. P., Lindsey, E. S., Creech, O., Jr. und Dewitt, C. W. (1964). A Technique for heart transplantazion in the rat. *Arch Surg*, 89, 645-52.
- Antoons, G., Mubagwa, K., Nevelsteen, I. und Sipido, K. R. (2002). Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and  $[Ca^{2+}]_i$  transients in mouse ventricular myocytes. *J Physiol*, 543, 889-98.
- Baskin, K. K. und Taegtmeier, H. (2011). Taking pressure off the heart: the ins and outs of atrophic remodelling. *Cardiovasc Res*, 90, 243-50.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415, 198-205.
- Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70, 23-49.
- Bers, D. M. und Despa, S. (2006). Cardiac myocytes  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$  regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci*, 100, 315-22.
- Birks, E. J., Tansley, P. D., Hardy, J., George, R. S., Bowles, C. T., Burke, M., Banner, N. R., Khaghani, A. und Yacoub, M. H. (2006). Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N Engl J Med*, 355, 1873-84.
- Bito, V., Heinzl, F. R., Biesmans, L., Antoons, G. und Sipido, K. R. (2008). Crosstalk between L-type  $Ca^{2+}$  channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. *Cardiovasc Res*, 77, 315-24.
- Bokník, P., Fockenbrock, M., Herzig, S., Knapp, J., Linck, B., Lüss, H., Müller, F. U., Müller, T., Schmitz, W., Schröder, F. und Neumann, J. (2000). Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362, 222-31.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Brandenburger, M., Wenzel, J., Bogdan, R., Richardt, D., Nguemo, F., Reppel, M., Hescheler, J., Terlau, H. und Dendorfer, A. (2012). Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*, 93, 50-9.
- Bruckner, B. A., Stetson, S. J., Perez-Verdia, A., Youker, K. A., Radovancevic, B., Connelly, J. H., Koerner, M. M., Entman, M. E., Frazier, O. H., Noon, G. P. und Torre-Amione, G. (2001). Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant*, 20, 457-64.

- Bussek, A., Wettwer, E., Christ, T., Lohmann, H., Camelliti, P. und Ravens, U. (2009). Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cell Physiol Biochem*, 24, 527-36.
- Camelliti, P., Al-Saud, S. A., Smolenski, R. T., Al-Ayoubi, S., Bussek, A., Wettwer, E., Banner, N. R., Bowles, C. T., Yacoub, M. H. und Terracciano, C. M. (2011). Adult human heart slices are a multicellular system suitable for electrophysiological and pharmacological studies. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 390-8.
- Carr, C. A., Ball, D., Tyler, D. J., Bushell, A., Sykes, A., Clarke, K. und Evans, R. D. (2014). Varying degrees of ventricular unloading in the heterotopic rat heart transplant model demonstrated by magnetic resonance imaging. *Int J Biomed Sci*, 10, 223-8.
- Caspi, O., Itzhaki, I., Kehat, I., Gepstein, A., Arbel, G., Huber, I., Satin, J. und Gepstein, L. (2009). In vitro electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev*, 18, 161-72.
- Corry, R. J., Winn, H. J. und Russell, P. S. (1973). Heart transplantation in congenic strains of mice. *Transplant Proc*, 5, 733-5.
- Depre, C., Shipley, G. L., Chen, W., Han, Q., Doenst, T., Moore, M. L., Stepkowski, S., Davies, P. J. und Taegtmeyer, H. (1998). Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 4, 1269-75.
- Destatis. (2021a). Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) - Fachserie 12 Reihe 6.2.1 - 2016 [Online]. Available: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/diagnosedaten-krankenhaus-2120621167004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/diagnosedaten-krankenhaus-2120621167004.pdf?__blob=publicationFile) [Accessed 08.01.2021, 14:00].
- Destatis. (2021b). Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015 [Online]. Available: <file:///C:/Users/Leonie/AppData/Local/Temp/todesursachen-2120400157004.pdf> [Accessed 08.01.2021, 14:00].
- Dorn, G. W., 2nd (2007). The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 49, 962-70.
- Dreher, L. (2018). Elektrophysiologische Untersuchung von Herzschnitten mit dem MEA System – Methode, aktueller Stellenwert und Vergleich mit der Patch Clamp Technik. Studienarbeit, Universität Hamburg.
- Egert, U. und Meyer, T. (2005). Heart on a Chip — Extracellular Multielectrode Recordings from Cardiac Myocytes in Vitro. In: Dhein, S., Mohr, F. W. & Delmar, M. (eds.) *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Eisner, D. A., Dibb, K. M. und Trafford, A. W. (2009). The mechanism and significance of the slow changes of ventricular action potential duration following a change of heart rate. *Exp Physiol*, 94, 520-8.

Eurotransplant Annual Report. (2015). Eurotransplant Annual Report 2015 [Online]. Available: <http://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2019/12/AR2015.pdf> [Accessed 08.01.2021, 14:00].

Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M., Pletcher, M. A., Smith, A. E., Tang, K., Yuan, C. W., Brown, J. C., Friedman, J., He, J., Heuton, K. R., Holmberg, M., Patel, D. J., Reidy, P., Carter, A., Cercy, K., Chapin, A., Douwes-Schultz, D., Frank, T., Goettsch, F., Liu, P. Y., Nandakumar, V., Reitsma, M. B., Reuter, V., Sadat, N., Sorensen, R. J. D., Srinivasan, V., Updike, R. L., York, H., Lopez, A. D., Lozano, R., Lim, S. S., Mokdad, A. H., Vollset, S. E. und Murray, C. J. L. (2018). Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet*, 392, 2052-2090.

Fozzard, H. A. (2002). Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res*, 55, 1-8.

Frazier, O. H., Benedict, C. R., Radovancevic, B., Bick, R. J., Capek, P., Springer, W. E., Macris, M. P., Delgado, R. und Buja, L. M. (1996). Improved left ventricular function after chronic left ventricular unloading. *Ann Thorac Surg*, 62, 675-81; discussion 681-2.

Frazier, O. H. und Myers, T. J. (1999). Left ventricular assist system as a bridge to myocardial recovery. *Ann Thorac Surg*, 68, 734-41.

Garan, A. R., Levin, A. P., Topkara, V., Thomas, S. S., Yuzefpolskaya, M., Colombo, P. C., Takeda, K., Takayama, H., Naka, Y., Whang, W., Jorde, U. P. und Uriel, N. (2015). Early post-operative ventricular arrhythmias in patients with continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant*, 34, 1611-6.

Gödecke, A., Schrader, J. und Kelm, M. (2010). 5.9 Erregungsausbreitung am Herzen. In: Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. (eds.) *Physiologie*. 6. Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

Haghighi, K., Kolokathis, F., Pater, L., Lynch, R. A., Asahi, M., Gramolini, A. O., Fan, G. C., Tsiapras, D., Hahn, H. S., Adamopoulos, S., Liggett, S. B., Dorn, G. W., 2nd, MacLennan, D. H., Kremastinos, D. T. und Kranias, E. G. (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*, 111, 869-76.

Halbach, M., Egert, U., Hescheler, J. und Banach, K. (2003). Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures. *Cell Physiol Biochem*, 13, 271-84.

- Halbach, M., Pillekamp, F., Brockmeier, K., Hescheler, J., Müller-Ehmsen, J. und Reppel, M. (2006). Ventricular slices of adult mouse hearts--a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies. *Cell Physiol Biochem*, 18, 1-8.
- Hannan, M. M., Husain, S., Mattner, F., Danziger-Isakov, L., Drew, R. J., Corey, G. R., Schueler, S., Holman, W. L., Lawler, L. P., Gordon, S. M., Mahon, N. G., Herre, J. M., Gould, K., Montoya, J. G., Padera, R. F., Kormos, R. L., Conte, J. V. und Mooney, M. L. (2011). Working formulation for the standardization of definitions of infections in patients using ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant*, 30, 375-84.
- Harding, J. D., Piacentino, V., 3rd, Gaughan, J. P., Houser, S. R. und Margulies, K. B. (2001). Electrophysiological alterations after mechanical circulatory support in patients with advanced cardiac failure. *Circulation*, 104, 1241-7.
- Harding, J. D., Piacentino, V., 3rd, Rothman, S., Chambers, S., Jessup, M. und Margulies, K. B. (2005). Prolonged repolarization after ventricular assist device support is associated with arrhythmias in humans with congestive heart failure. *J Card Fail*, 11, 227-32.
- Heart Ware. (2019). Left Ventricular Assist Device [Online]. Available: <https://www.medtronic.com/de-de/fachkreise/produkte/mechanische-herzunterstuetzung-hvad/heartware-hvad-system.html> [Accessed 07.07.2019, 11:00].
- Hempel, F., Law, J. K., Nguyen, T. C., Munief, W., Lu, X., Pachauri, V., Susloparova, A., Vu, X. T. und Ingebrandt, S. (2017). PEDOT:PSS organic electrochemical transistor arrays for extracellular electrophysiological sensing of cardiac cells. *Biosens Bioelectron*, 93, 132-138.
- Hill, J. A. und Olson, E. N. (2008). Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 358, 1370-80.
- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117, 500-44.
- Hoit, B. D., Khoury, S. F., Kranias, E. G., Ball, N. und Walsh, R. A. (1995). In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res*, 77, 632-7.
- Hoppe, U. C., Böhrn, M., Dietz, R., Hanrath, P., Kroemer, H. K., Osterspey, A., Schmaltz, A. A. und Erdmann, E. (2001). Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinzuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie*, 90, 218-237.
- Ito, K., Nakayama, M., Hasan, F., Yan, X., Schneider, M. D. und Lorell, B. H. (2003). Contractile reserve and calcium regulation are depressed in myocytes from chronically unloaded hearts. *Circulation*, 107, 1176-82.
- Jessup, M. und Brozena, S. (2003). Heart failure. *N Engl J Med*, 348, 2007-18.

- John Hopkins University. (2021). Available:  
<http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html#additional> [Accessed 08.01.2021, 14:30].
- Kaneko, M., Hashikami, K., Yamamoto, S., Matsumoto, H. und Nishimoto, T. (2016). Phospholamban Ablation Using CRISPR/Cas9 System Improves Mortality in a Murine Heart Failure Model. *PLoS One*, 11, e0168486.
- Keung, E. C. (1989). Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res*, 64, 753-63.
- Kirklin, J. K., Naftel, D. C., Pagani, F. D., Kormos, R. L., Stevenson, L. W., Blume, E. D., Myers, S. L., Miller, M. A., Baldwin, J. T. und Young, J. B. (2015). Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant*, 34, 1495-504.
- Kranias, E. G. und Hajjar, R. J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*, 110, 1646-60.
- Kumpati, G. S., McCarthy, P. M. und Hoercher, K. J. (2001). Left ventricular assist device as a bridge to recovery: present status. *J Card Surg*, 16, 294-301.
- Lietz, K., Long, J. W., Kfoury, A. G., Slaughter, M. S., Silver, M. A., Milano, C. A., Rogers, J. G., Naka, Y., Mancini, D. und Miller, L. W. (2007). Outcomes of left ventricular assist device implantation as destination therapy in the post-REMATCH era: implications for patient selection. *Circulation*, 116, 497-505.
- Lipskaia, L., Chemaly, E. R., Hadri, L., Lompre, A. M. und Hajjar, R. J. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*, 10, 29-41.
- Lund, L. H., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Dipchand, A. I., Benden, C., Christie, J. D., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A. O., Yusen, R. D. und Stehlik, J. (2013). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant*, 32, 951-64.
- McDermott, K. W., Elixhauser, A. und Sun, R. (2017). Trends in Hospital Inpatient Stays in the United States, 2005-2014. [Online]. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. Available: [www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb225-Inpatient-US-Stays-Trends.pdf](http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb225-Inpatient-US-Stays-Trends.pdf) [Accessed 08.01.2021, 14:30].
- Meyer, T., Leisgen, C., Gonser, B. und Günther, E. (2004). QT-screen: high-throughput cardiac safety pharmacology by extracellular electrophysiology on primary cardiac myocytes. *Assay Drug Dev Technol*, 2, 507-14.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Multichannelsystems. (2021). 60EcoMEA-gr. [Online]. Available: <https://www.multichannelsystems.com/products/60ecomea-gr> [Accessed 07.01.2021, 13:00].
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S. und Yeh, Y. H. (2007). Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*, 87, 425-56.
- Navarrete, E. G., Liang, P., Lan, F., Sanchez-Freire, V., Simmons, C., Gong, T., Sharma, A., Burrige, P. W., Patlolla, B., Lee, A. S., Wu, H., Beygui, R. E., Wu, S. M., Robbins, R. C., Bers, D. M. und Wu, J. C. (2013). Screening drug-induced arrhythmia [corrected] using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays. *Circulation*, 128, S3-13.
- Nerbonne, J. M. und Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, 85, 1205-53.
- Ono, K. und Lindsey, E. S. (1969). Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 57, 225-9.
- Osadchii, O. E. (2007). Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev*, 12, 66-86.
- Parrish, A. R., Gandolfi, A. J. und Brendel, K. (1995). Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci*, 57, 1887-901.
- Pedrotty, D. M., Rame, J. E. und Margulies, K. B. (2013). Management of ventricular arrhythmias in patients with ventricular assist devices. *Curr Opin Cardiol*, 28, 360-8.
- Pillekamp, F., Reppel, M., Brockmeier, K. und Hescheler, J. (2006). Impulse propagation in late-stage embryonic and neonatal murine ventricular slices. *J Electrocardiol*, 39, 425.e1-4.
- Pillekamp, F., Reppel, M., Dinkelacker, V., Duan, Y., Jazmati, N., Bloch, W., Brockmeier, K., Hescheler, J., Fleischmann, B. K. und Koehling, R. (2005). Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem*, 16, 127-32.
- Piper, H. M. (2000). The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res*, 45, 123-7.
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V. P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C.,

- Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., Rutten, F. H. und van der Meer, P. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 37, 2129-2200.
- Rapundalo, S. T. (1998). Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res*, 38, 559-88.
- Remme, W. J. und Swedberg, K. (2001). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J*, 22, 1527-60.
- Sallam, K., Li, Y., Sager, P. T., Houser, S. R. und Wu, J. C. (2015). Finding the rhythm of sudden cardiac death: new opportunities using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 116, 1989-2004.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P. und Nattel, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*, 90, 939-50.
- Schwoerer, A. P. (2012). Zelluläres Remodeling bei kardialer Atrophie. Habilitation, Universität Hamburg.
- Schwoerer, A. P., Jelinek, M., Paske, M., Biermann, D., Reichenspurner, H. und Ehmke, H. (2017). Impairment of ventricular repolarization and induction of arrhythmias by mechanical unloading in a rodent model of heterotopic heart transplantation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 109.
- Schwoerer, A. P., Melnychenko, I., Goltz, D., Hedinger, N., Broichhausen, I., El-Armouche, A., Eschenhagen, T., Volk, T. und Ehmke, H. (2008a). Unloaded rat hearts in vivo express a hypertrophic phenotype of cardiac repolarization. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 633-41.
- Schwoerer, A. P., Neef, S., Broichhausen, I., Jacubeit, J., Tiburcy, M., Wagner, M., Biermann, D., Didié, M., Vettel, C., Maier, L. S., Zimmermann, W. H., Carrier, L., Eschenhagen, T., Volk, T., El-Armouche, A. und Ehmke, H. (2013). Enhanced  $Ca^{2+}$  influx through cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels maintains the systolic  $Ca^{2+}$  transient in early cardiac atrophy induced by mechanical unloading. *Pflugers Arch*, 465, 1763-73.
- Schwoerer, A. P., Neuber, C., Schmechel, A., Melnychenko, I., Mearini, G., Boknik, P., Kirchhefer, U., Schmitz, W., Ehmke, H., Eschenhagen, T. und El-Armouche, A. (2008b). Mechanical unloading of the rat heart involves marked changes in the protein kinase-phosphatase balance. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 846-52.

- Slack, J. P., Grupp, I. L., Dash, R., Holder, D., Schmidt, A., Gerst, M. J., Tamura, T., Tilgmann, C., James, P. F., Johnson, R., Gerdes, A. M. und Kranias, E. G. (2001). The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1031-40.
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W. und Haemmerle, H. (2003). Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal Bioanal Chem*, 377, 486-95.
- Taegtmeyer, H., Sen, S. und Vela, D. (2010). Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*, 1188, 191-8.
- Tertoolen, L. G. J., Braam, S. R., van Meer, B. J., Passier, R. und Mummery, C. L. (2018). Interpretation of field potentials measured on a multi electrode array in pharmacological toxicity screening on primary and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 497, 1135-1141.
- Thomas, C. A., Jr., Springer, P. A., Loeb, G. E., Berwald-Netter, Y. und Okun, L. M. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp Cell Res*, 74, 61-6.
- Toischer, K., Rokita, A. G., Unsöld, B., Zhu, W., Kararigas, G., Sossalla, S., Reuter, S. P., Becker, A., Teucher, N., Seidler, T., Grebe, C., Preuss, L., Gupta, S. N., Schmidt, K., Lehnart, S. E., Krüger, M., Linke, W. A., Backs, J., Regitz-Zagrosek, V., Schäfer, K., Field, L. J., Maier, L. S. und Hasenfuss, G. (2010). Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122, 993-1003.
- Tomita, F., Bassett, A. L., Myerburg, R. J. und Kimura, S. (1994). Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res*, 75, 296-303.
- Wang, Z., Kutschke, W., Richardson, K. E., Karimi, M. und Hill, J. A. (2001). Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin. *Circulation*, 104, 1657-63.
- Wenzel, J. (2011). Humane organotypische Herzgewebeschnitte als elektrophysiologisches Langzeitmodell. medical thesis, Universität Lübeck.
- Westhofen, S., Jelinek, M., Dreher, L., Biermann, D., Martin, J., Vitzhum, H., Reichenspurner, H., Ehmke, H. und Schwoerer, A. P. (2019). The heterotopic heart transplantation in mice as a small animal model to study mechanical unloading - Establishment of the procedure, perioperative management and postoperative scoring. *PLoS One*, 14, e0214513.
- Willemsen, D., Cordes, C., Bjarnason-Wehrens, B., Knoglinger, E., Langheim, E., Marx, R., Reiss, N., Schmidt, T., Workowski, A., Bartsch, P., Baumbach, C., Bongarth, C., Phillips, H., Radke, R., Riedel, M., Schmidt, S., Skobel, E., Toussaint, C. und Glatz, J. (2016). Rehabilitationsstandards für die Anschlussheilbehandlung und allgemeine

Rehabilitation von Patienten mit einem Herzunterstützungssystem (VAD – ventricular assist device). *Clinical Research in Cardiology Supplements*, 11, 2-49.

Wilson, S. R., Givertz, M. M., Stewart, G. C. und Mudge, G. H., Jr. (2009). Ventricular assist devices the challenges of outpatient management. *J Am Coll Cardiol*, 54, 1647-59.

Wohlschlaeger, J., Schmitz, K. J., Schmid, C., Schmid, K. W., Keul, P., Takeda, A., Weis, S., Levkau, B. und Baba, H. A. (2005). Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): a review of the morphological and molecular changes. *Cardiovasc Res*, 68, 376-86.

Yacoub, M. H. (2001). A novel strategy to maximize the efficacy of left ventricular assist devices as a bridge to recovery. *Eur Heart J*, 22, 534-40.

Zhao, W., Frank, K. F., Chu, G., Gerst, M. J., Schmidt, A. G., Ji, Y., Periasamy, M. und Kranias, E. G. (2003). Combined phospholamban ablation and SERCA1a overexpression result in a new hyperdynamic cardiac state. *Cardiovasc Res*, 57, 71-81.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachenstatistik 2016 und 2040.....	2
Abbildung 2: Übersicht über die stadienabhängige Therapie der Herzinsuffizienz.....	3
Abbildung 3: Verhältnis der verfügbaren Herztransplantate im Vergleich zu den Wartelistenplätzen.....	4
Abbildung 4: Herz mit implantiertem „Left Ventricular Assist Devices“ .....	5
Abbildung 5: Einsatz von Unterstützungssystemen vor Herztransplantation pro Jahr.....	6
Abbildung 6: Die Ejektionsfraktion nach Implantation eines „Left Ventricular Assist Devices“	7
Abbildung 7: EKG Beispiele von entlasteten Rattenherzen .....	9
Abbildung 8: Phasen des ventrikulären Aktionspotentials mit den zugehörigen Leitfähigkeiten der Ionenkanäle .....	11
Abbildung 9: Das Ca <sup>2+</sup> -Handling im ventrikulären Kardiomyozyt.....	13
Abbildung 10 Die kardiale Plastizität.....	14
Abbildung 11: Die heterotope Herztransplantation.....	18
Abbildung 12: Der Blutflusses im Spenderherz nach heterotoper Herztransplantation .....	19
Abbildung 13: Zusammenhang von Feldpotential, Aktionspotential und QT-Intervall.....	21
Abbildung 14: Übersicht über die Schritte der Versuchsdurchführung dieser Arbeit .....	26
Abbildung 15: Der Versuchszeitplan.....	27

Abbildung 16: Das Vibratom (Leica VT 1000s) .....	31
Abbildung 17: Ein Herzschnitt im Ruhepuffer .....	32
Abbildung 18: Das Microelectrode Array System Setup.....	34
Abbildung 19: Ein Herzschnitt auf einem Microelectrode Array.....	34
Abbildung 20: Ein 60EcoMicroelectrode Arrays mit Skizze des Elektrodenfeldes .....	35
Abbildung 21: Vorbereitung der Microelectrode Array System Messung .....	36
Abbildung 22: MTT Vitalitätsfärbung der Herzschnitte .....	39
Abbildung 23: Repräsentative Feldpotentiale .....	40
Abbildung 24: Beispiel einer Microelectrode Array System Messung.....	41
Abbildung 25: Startpunkt und Endpunkt der Feldpotentiale .....	42
Abbildung 26: Aus der Auswertung ausgeschlossenes exemplarisches Feldpotential .....	43
Abbildung 27: Feldpotentialdauer von orthotopen Herzschnitten .....	44
Abbildung 28: Vergleich eines orthotopen und heterotopen Herzens.....	45
Abbildung 29: Effekt der Entlastung der Spenderherzen .....	46
Abbildung 30: Feldpotentialdauer der 4 Versuchstiergruppen.....	48
Abbildung 31: Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer von orthotopen und heterotopen Phospholamban Wildtyp Herzschnitten .....	50
Abbildung 32: Frequenzabhängigkeit der Feldpotentialdauer von orthotopen und heterotopen Phospholamban Knockout Herzschnitten .....	51
Abbildung 33: Das Erregungsleitungssystem des Herzens.....	55
Abbildung 34 Zusammenhang zwischen dem QT-Intervall, der Aktionspotentialdauer und der Feldpotentialdauer.....	56
Abbildung 35 Start- und Endpunkt der Feldpotentialdauer.....	58
Abbildung 36: Das Ca <sup>2+</sup> -Handling im physiologischen, im atrophischen und im atrophischen Zustand mit Phospholamban Knockout .....	61

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schneidepuffer.....	24
Tabelle 2: Ruhepuffer .....	24
Tabelle 3: Färbepuffer .....	25
Tabelle 4: Messpuffer (DMEM ohne Serum).....	25
Tabelle 5: Übersicht der Messungen .....	47

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den Jahren während meiner Arbeit an dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Herzlich danke ich meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. med. Alexander Schwoerer für die hochwertige fachliche Betreuung und die freundschaftliche Hilfestellung in sowohl erfolgreichen Phasen als auch in Momenten, wo Geduld und Durchhaltevermögen gefragt waren.

Ebenfalls geht mein Dank an Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, Leiter des Institutes für Zelluläre und Integrative Physiologie und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Institutes. Durch die nette, kollegiale Zusammenarbeit habe ich mich von Anfang an als vollwertiges Mitglied des Institutes gefühlt. Dankbar bin ich neben der fachlichen Bereicherung auch für die nette Atmosphäre bei zahlreichen gemeinsamen Mittagsessen und in der einen oder anderen Kaffeepause.

Mein Dank geht zudem an Dr. Sumi Westhofen für die Durchführung der Mausoperationen und die schöne gemeinsame Zeit im Büro.

Besonderer Dank geht an Isabel, meine Büronachbarin, die ich jederzeit um Rat zu Prism, Word und Excel frage durfte und die mich psychisch auch in frustrierenden Phasen unterstützte.

Des Weiteren danke ich Helga, die mir als Kollegin und Ratgeberin immer zur Seite stand und die Organisation der Tierzucht übernommen hat.

Ganz besonderer Dank geht an meine Eltern für die emotionale und finanzielle Unterstützung und ihr unermüdliches Interesse an meinem Werdegang.

## 13 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 14 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: .....

(Leonie Dreher, Hamburg den 02.05.2021)