

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

(Department)

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. P. Gawaz

**Auswirkung der schnellen Vorhofstimulation auf die
ANP-Modulation des L-Typ Ca^{2+} - Kanals in einem
experimentellen Vorhofflimmermodell des Kaninchens**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Andrea Marion Joos

aus

Bietigheim-Bissingen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. F. Bosch

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. P. Gawaz

Meinen Eltern gewidmet

1	Einleitung	1
1.1	Die kardiale Erregungsbildung und -leitung.....	1
1.1.1	Erregungsbildung im Arbeitsmyokard	3
1.1.1.1	Phase 0: schnelle Depolarisation	5
1.1.1.2	Phase 1: frühe Repolarisation	5
1.1.1.3	Phase 2: Plateauphase.....	5
1.1.1.4	Phase 3: späte oder langsame Repolarisationsphase.....	6
1.1.1.5	Phase 4: Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials.....	6
1.1.2	Erregungsbildung in den Schrittmacherzellen.....	6
1.2	Calciumkanäle.....	7
1.2.1	Struktur des L-Typ Ca^{2+} -Kanals	9
1.2.2	L-Typ Ca^{2+} -Kanal: Pharmakologie, Elektrophysiologie, Regulation	12
1.3	Vorhofflimmern.....	14
1.3.1	Epidemiologie.....	14
1.3.2	Ätiologie, Krankheitsbild, EKG, Folgen	16
1.3.3	Remodeling, zelluläre und molekulare Mechanismen	20
1.3.4	Therapie.....	24
1.4	Atriales Natriuretisches Peptid	26
1.4.1	Synthese, Aufbau, Speicherung, Sekretion und Freisetzung	26
1.4.2	Allgemeine Wirkung von ANP	27

1.4.3	Wirkung von ANP am Herzen	29
1.4.4	Wirkung auf kardiale Ionenkanäle	31
1.5	Fragestellung	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Versuchstiere	33
2.1.2	Verwendete Substanzen und Lösungen	33
2.1.2.1	ANP	33
2.1.2.2	Lösungen zur Zellisolation	34
2.1.2.3	Aufbewahrungslösung „Kraftbrühe“ (KB)	35
2.1.2.4	Lösungen für Patch-clamp Experimente	36
2.1.3	Geräte	38
2.1.3.1	Operationsbesteck	38
2.1.3.2	Herzschrittmacher und bipolare Kaninchen-Elektrode	38
2.1.3.3	Langendorff-Apparatur	39
2.1.3.4	Patch-Clamp-Messplatz	39
2.1.3.5	Weitere Geräte und Zubehör	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Kaninchenmodell	41
2.2.2	Organentnahme	44
2.2.3	Isolation und Aufbewahrung der Zellen	44
2.2.4	Patch-Clamp-Messungen	46
2.2.4.1	Grundlagen der Patch-Clamp-Technik	46

2.2.4.2	Durchführung	47
2.2.4.3	Zellmembrankapazität und Serienwiderstand	48
2.2.4.4	Verwendete Spannungsprotokolle	50
2.2.5	Datenauswertung und Statistik	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Zellmembrankapazität	53
3.2	Wirkung von ANP auf den kardialen L-Typ Ca^{2+} -Kanal	54
3.2.1	Kontrollgruppe (Sham)	54
3.2.2	Gruppe mit schneller Vorhofstimulation (atriales Pacing)	60
3.3	Folgen der schnellen Vorhofstimulation	62
3.3.1	Vor Applikation von ANP	62
3.3.2	Nach Applikation von ANP	64
3.4	Vergleich aller vier Versuchsgruppen	67
4	Diskussion	73
4.1	Ergebnisdiskussion	73
4.1.1	Auswirkungen der schnellen Vorhofstimulation	73
4.1.2	Calcium-Overload	74
4.1.3	Reaktion auf den Calcium-Overload	75
4.1.3.1	Transkriptionelle Downregulation	75
4.1.3.2	Veränderungen von Regulatorproteinen (Phosphatasen)	77
4.1.3.3	Andere potentielle Mechanismen	78
4.2	Mögliche Fehlerquellen	80

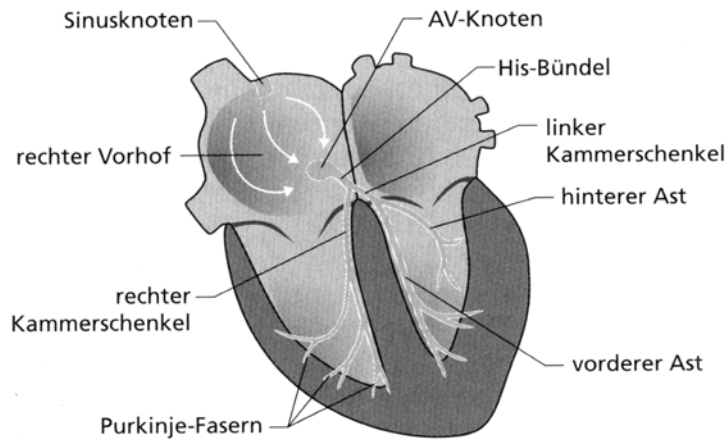
4.2.1 Geräte.....	80
4.2.2 Serienwiderstand	81
4.2.3 Lösungen	82
4.2.4 Zellen.....	82
4.2.5 Auswertung	83
4.3 Klinische Relevanz.....	84
5 Zusammenfassung	85
6 Literaturverzeichnis	87

1 Einleitung

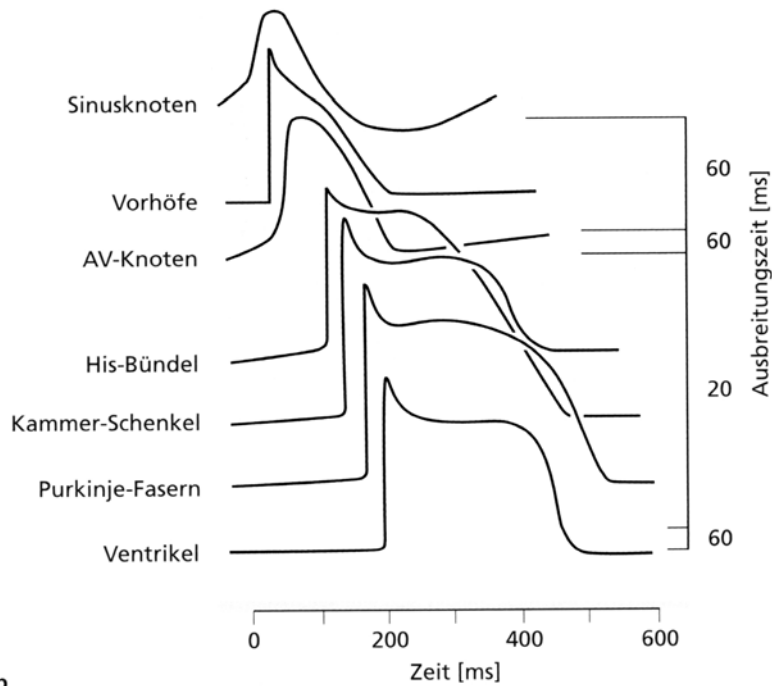
1.1 Die kardiale Erregungsbildung und -leitung

Unterschiedliche Ionenkanäle und Ionentransportmechanismen sind an der Erregungsbildung im menschlichen Herzen beteiligt. Die autonome Bildung der Aktionspotentiale in den Schrittmacherzellen des Vorhofs ist für die physiologische Frequenz des Herzens verantwortlich. Die Erregungsbildung erfolgt normalerweise in den Zellen des Sinusknotens, die ein etwa 10 mm langes und 3 mm breites Geflecht bilden, das sich im Bereich der Einmündungsstelle der Vena cava superior in der Wand des rechten Vorhofes befindet. Dies ist der Ausgangspunkt für die Erregungsausbreitung über die Vorhöfe zum Atrioventrikularknoten, von wo die Erregung über das His-Bündel zu den Tawara-Schenkeln und schließlich entlang der Purkinje-Fasern zum Kammermyokard gelangt (siehe Abb.1). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass sich das Aktionspotential in den autonomen Zentren (Sinus- und AV-Knoten) von jenen im Arbeitsmyokard unterscheidet. Vorhof-Aktionspotentiale weisen wiederum ein anderes Aussehen auf als Aktionspotentiale der Ventrikel. Im Arbeitsmyokard kommt es nach der Erregung einer Herzmuskelzelle durch die, mittels Calcium-Ionen vermittelte, elektromechanische Kopplung zur Kontraktion.

2



a



b

Abbildung 1: Die Kardiale Erregungsbildung und -weiterleitung

a Schematische Darstellung des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungs-systems. Die Pfeile zeigen die bevorzugten Verlaufsrichtungen der Erregung über das Vorhofmyokard an.

b Morphologie und zeitliche Abfolge von Aktionspotentialen im Erregungs-bildungs- und Erregungsleitungssystem.

(Nach Antoni, 1996)

1.1.1 Erregungsbildung im Arbeitsmyokard

Die Bildung eines Aktionspotentials ist ein bioelektrischer Prozess, der sich an der erregbaren Oberflächenmembran der Zellen abspielt. Die nicht erregte Zelle befindet sich in einem stabilen Ruhezustand, bei dem das Zellinnere gegenüber dem Extrazellularraum negativ polarisiert ist. Diesem Ruhemembranpotential liegt laut der Membrantheorie von Bernstein eine ungleiche Ionenverteilung zugrunde, die durch eine große Leitfähigkeit der Zellmembran für K^+ -Ionen und eine annähernd komplette Impermeabilität für andere Ionen entsteht (Bernstein, 1902). Dieses Ruhemembranpotential entspricht mit -90 mV also nahezu dem Nernst-Gleichgewichtspotential für K^+ , das bei -94 mV liegt. Die im Ruhezustand bestehende Kaliumleitfähigkeit wird durch genannte Einwärtsgerichteter-Kaliumströme (I_{K1}) bestimmt, die bei Depolarisation auf Werte positiver als -70 mV schnell inaktiviert werden.

Die Auslösung des im Arbeitsmyokard 100-300 ms andauernden Aktionspotentials folgt dem „Alles-oder-nichts-Gesetz“. Das Aktionspotential lässt sich in fünf Phasen aufteilen, die durch Ströme unterschiedlicher Ionen charakterisiert sind bzw. zustande kommen (siehe Abb. 2).

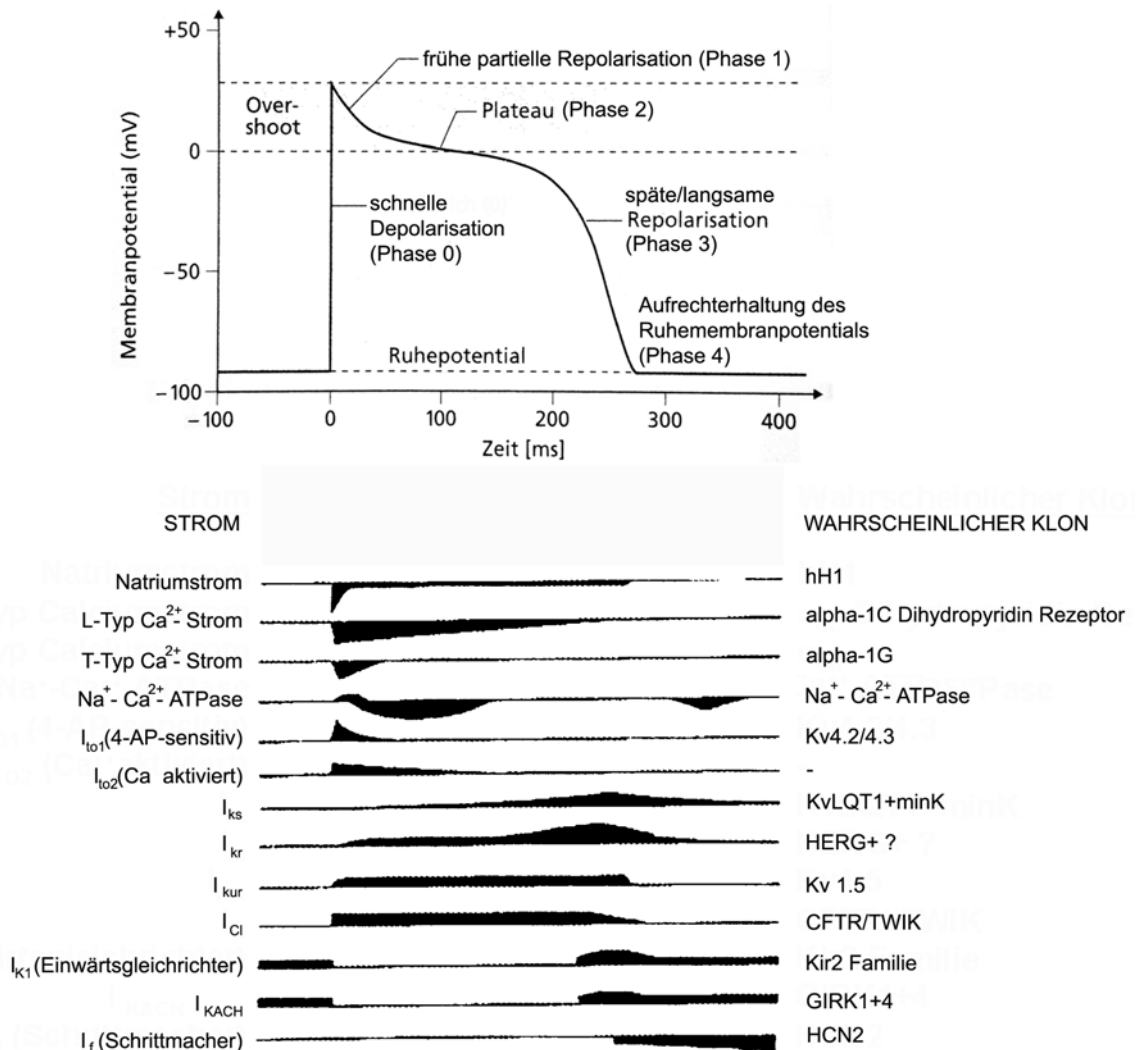


Abbildung 2: Phasen des kardialen Aktionspotentials und die dafür ursächlichen Ionenströme

Der Einstrom von Ionen in einen Kardiomyozyten wird durch einen negativen (nach unten gerichteten), der Ausstrom durch einen positiven (nach oben gerichteten) Strom dargestellt. Der zeitliche Zusammenhang der einzelnen Ströme im Verlauf des Aktionspotentials ist in der Mitte des unteren Bildteils dargestellt. Die Kanalbezeichnung findet sich links, der rechten Seite ist der wahrscheinliche Kanalklon, der den Strom verursacht, zu entnehmen. Weitere Einzelheiten zu den Phasen des Aktionspotentials im Text.

1.1.1.1 Phase 0: schnelle Depolarisation

Durch die Depolarisation einer Nachbarzelle wird eine noch ruhenden Arbeitsmyokardzelle über das Schwellenpotential von -70 mV hinaus elektrisch erregt, so dass sehr schnell spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet und die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle inaktiviert werden. Es kommt zu einem lawinenartigen Einstrom von Natriumionen (I_{Na}) in das Zellinnere, der eine Annäherung des Membranpotentials an das Na^+ -Gleichgewichtspotential bewirkt; dieses wird allerdings nicht erreicht, da die Natriumkanäle spannungsabhängig geschlossen und inaktiviert werden. Letztlich ergibt sich eine umgekehrte Aufladung („Overshoot“) mit positiver Ladung des Zellinneren (ca. $+15$ bis $+20$ mV) und negativer Ladung des Zelläußeren.

1.1.1.2 Phase 1: frühe Repolarisation

Das positive Membranpotential aktiviert Ionenkanäle, welche die Erregungsrückbildung (Repolarisation) der Zelle einleiten. Diese frühe Repolarisation wird von einem K^+ -Ionen-Ausstrom (I_{to}) und einem Cl^- -Ionen-Einstrom ($I_{to,2}$) getragen.

1.1.1.3 Phase 2: Plateauphase

Die ca. 100-200 ms andauernde Plateauphase, während der das Membranpotential bei ungefähr 0 mV liegt, ist durch ein Gleichgewicht der ebenfalls repolarisierenden langsam aktivierenden (verzögerten) Gleichrichter-Kaliumströme (Delayed rectifier I_{Kr} und I_{Ks}) und einem langsamen Calciumeinstrom ($I_{Ca, L}$) bestimmt. Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal wird bei einer Membranspannung oberhalb von ca. -40 mV aktiviert und hat eine relativ lange Öffnungszeit. In dieser Phase ist das Herz für einen neuen Reiz nicht ansprechbar; es handelt sich um die absolute Refraktärphase.

1.1.1.4 Phase 3: späte oder langsame Repolarisationsphase

Zu Beginn dominieren noch die verzögert aktivierenden Gleichrichter-Kaliumströme (I_{Kr} , I_{Ks} und der vorhofspezifische I_{Kur}), die bei wieder negativen Potentialen durch den einwärts-gleichrichtenden (Inward Rectifier I_{K1}) Kaliumstrom abgelöst werden. Dies führt das Membranpotential wieder hin zum Ruhemembranpotential.

1.1.1.5 Phase 4: Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials

In der elektrischen Diastole überwiegt wieder die Permeabilität der Membran für K^+ -Ionen und das Membranpotential strebt mit -80 bis -90 mV dem K^+ -Gleichgewichtspotential entgegen. Zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase werden die Natriumionen unter Energieverbrauch mit Hilfe der Na^+ - K^+ -ATPase und die Calciumionen mittels Na^+ - Ca^+ -Austauscher durch die Zellmembran hinaustransportiert.

1.1.2 Erregungsbildung in den Schrittmacherzellen

Die Zellen des Schrittmachergewebes unterscheiden sich von den Arbeitsmyokardzellen dadurch, dass sie kein stabiles Ruhemembranpotential aufweisen, spontan depolarisieren und selbständig Aktionspotentiale generieren. Zunächst wird ein unselektiver, hauptsächlich von Na^+ -Ionen getragener, Einwärtsstrom (I_f) aktiviert, welcher vom T-Typ-Calciumkanal unterstützt wird, der bereits bei negativeren Spannungen öffnet als der L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Der zuletzt genannte L-Typ Ca^{2+} -Kanal wird bei einer Spannung von -40 mV aktiviert und sorgt für ein rasches Fortschreiten der Depolarisation. Der Atrio-Ventrikular-Knoten ist die einzige Position im Körper, an der Calciumkanäle exzitatorische Impulse leiten (Shorofsky und Balke, 2001). Beim Erreichen eines Spitzenwertes von bis zu $+20$ mV wird der Einwärtsgleichrichter I_{K1} aktiviert, der eine langsame Repo-

larisation und Inaktivierung des L-Typ-Calciumstroms einleitet. Der Einwärtsgleichrichter I_{K1} wird bei zunehmend negativen Potentialen deaktiviert. Das Membranpotential nimmt von dem sogenannten maximalen diastolischen Potential aus in Form einer langsamen diastolischen Depolarisation allmählich ab, erreicht das kritische Schwellenpotential und löst ein neues Aktionspotential aus.

1.2 Calciumkanäle

Die kardialen Ionenkanäle werden entsprechend ihres Steuerungsmechanismus in drei Klassen unterteilt: spannungsgesteuerte Ionenkanäle, ligandengesteuerte Ionenkanäle und Ionenkanäle, die durch die Dehnung des Gewebes aktiviert werden. Die Calciumkanäle des menschlichen Herzens fallen alle in die Kategorie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle, wobei zwischen Kanälen, die durch hohe Spannungen aktiviert werden (L-Typ, N-Typ, P/Q-Typ, R-Typ), und solchen, deren Aktivierung durch niedrige Spannungen erreicht wird (T-Typ), unterschieden werden muss.

Die Struktur der wichtigsten Untereinheit – der α_1 -Untereinheit - dieser Kanäle basiert auf dem gleichen Grundprinzip: vier homologe transmembranöse Domänen, die aus jeweils sechs α -Helices bestehen, bilden eine zentrale Pore. Dabei existieren je nach Kanaltyp unterschiedliche Isoformen der α_1 -Untereinheit (siehe Tabelle 1). Hinzu kommen je nach Kanal weitere zusätzliche Untereinheiten. Diese unterschiedliche molekulare Zusammensetzung bedingt verschiedene biophysikalische Schwellenpotentiale, eine differenzierte Ionenselektivität und unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften (siehe ebenfalls Tabelle 1).

Ca²⁺-Kanal-Typ	α₁ Untereinheit	Schwellenpotential	Ionenselektivität	Antagonisten/Blocker
L-Typ	α _{1C} , α _{1D} , α _{1S} , α _{1F}	-30 bis -10 mV	Ba ²⁺ >Ca ²⁺	Dihydropyridine Phenylalkylamine Benzothiazepine
N-Typ	α _{1B}	-20 mV	Ba ²⁺ >Ca ²⁺	ω-Conotoxin GVIA, Zikonotid (SNX-111) (Mil- janich und Ra- machandran, 1995)
P/Q-Typ	α _{1A}	-60 mV	Ba ²⁺ >Ca ²⁺	ω-Agatoxin IV A, ω-Conotoxin MVIIC
R-Typ	α _{1E}	-40 mV	Ba ²⁺ >Ca ²⁺	SNX-482 (New- comb, et al., 1998)
T-Typ	α _{1G} , α _{1H} , α _{1I}	-70 mV	Ba ²⁺ =Ca ²⁺	Mibefradil (Mc- Donough und Bean, 1998); (+)- ECN (Todorovic et al., 1998), Kur- toxin (Chuang et al., 1998)

Tabelle 1.: Die α₁-Untereinheiten der verschiedenen Ca²⁺-Kanäle und deren biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften.

Spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle sind ubiquitär in neuronalen, endokrinen Zellen, in kardialen, glatten und quergestreiften Muskelzellen sowie in Fibroblasten und Nierenzellen zu finden. Sie zeichnen sich durch eine beginnende Inaktivierung bei Haltepotentialen, die positiver als -60 mV sind, aus und erreichen ihre maximale Amplitude bei ungefähr $+10 \text{ mV}$.

1.2.1 Struktur des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

Wie andere spannungsgesteuerte Calciumkanäle ist der kardiale L-Typ Ca^{2+} -Kanal ein heterooligomerer Komplex aus einer α_1 - ($\approx 240 \text{ kD}$) sowie akzessorischen α_2 - δ ($\approx 175 \text{ kD}$), β - ($\approx 60 \text{ kD}$) und γ - ($\approx 30 \text{ kD}$) Untereinheiten (siehe Abb 3). Von den zehn unterschiedlichen α_1 -Untereinheitsisoformen wird nur α_{1C} in erheblichem Maße in der kardialen Muskulatur exprimiert. α_{1D} -mRNA wurde in weit geringeren Mengen in der Vorhofmuskulatur gefunden (Takimoto et al., 1997). Von den Isoformen β_1 bis β_4 der β -Untereinheit konnte nur β_2 in hohen Dichten in der Herzmuskulatur gefunden werden (Pichler et al., 1997). Sowohl die α_1 - als auch die β -Untereinheit enthalten Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase. Die α_2 -, γ - und δ -Untereinheiten sind stark glykosyliert, was auf einen extrazellulären Anteil hindeutet (Takahashi, et al., 1987). Es ist anzunehmen, dass die durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten α_2 - δ zur Fixierung der α_{1C} -Untereinheit an der Membranoberfläche dienen (Mukherjee und Spinale, 1998).

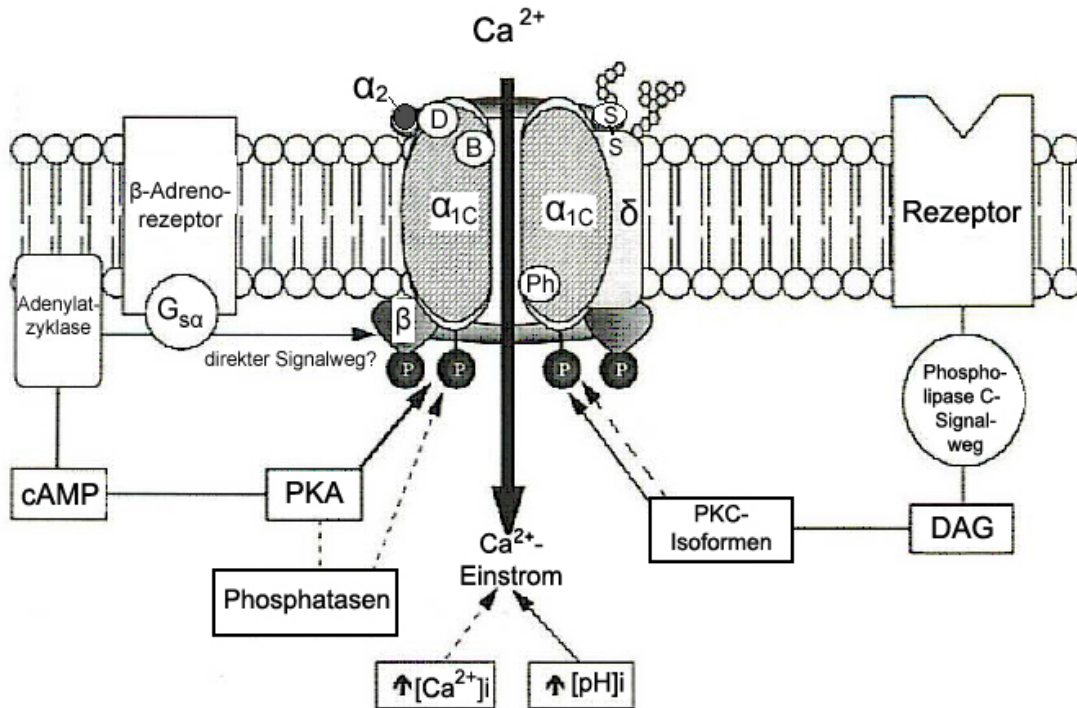


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines kardialen L-Typ Ca^{2+} -Kanals aus verschiedenen Untereinheiten und dessen Regulation. Zusätzlich werden spezifische Regulationsmechanismen der L-Typ Ca^{2+} -Kanalfunktion mittels intrazellulärer Modulatoren verdeutlicht. Weitere Einzelheiten zur Regulation in Kapitel 1.2.2.

$G_{s\alpha}$...stimulierendes G-Protein

PKA...Proteinkinase A

DAG...Diacylglycerol

D...Dihydropyridine

Ph...Phenylalkylamine

B...Benzothiazepine

— Aktivierung - - - - - ...Hemmung

(Modifiziert nach Mukherjee und Spinale, 1998).

Die α_1 -Untereinheit besitzt vier homologe Domänen (I-IV) mit jeweils sechs mutmaßlich transmembranösen Segmenten (S1-S6) (siehe Abb. 4). Sowohl das kurze Aminoende als auch das lange Carboxylende befinden sich intrazellulär. Studien von Na^+ -Kanälen, die ebenfalls eine α_1 -Untereinheit besitzen ergaben, dass das transmembranöse Segment S4 in allen spannungsgesteuerten Ionenkanälen zu finden ist und dort als Spannungssensor dient (Stühmer et al., 1989). Die α_1 -Untereinheit beinhaltet die Bindungsstellen für Calciumkanal-Blocker wie z.B. Dihydropyridine, Benzothiazepine und Phenylalkylamine (Catterall und Striessnig, 1992), wobei die Bindungsstellen dieser drei Antagonisten nicht identisch sind (Huber et al., 2000).

Das Gen der humanen α_{1C} -Untereinheit besteht aus 53 identifizierten Exons (Soldatov, 1994) und befindet sich auf dem Chromosom 12p13 (Sun et al., 1992, Powers et al., 1992). Das Gen für $\alpha_{2\delta}$ befindet sich auf dem humanen Chromosom 7q21-q22 (Powers et al., 1994). Für die β -Untereinheit existieren mindestens vier Gene (Birnbaumer et al., 1998).

Ähnlich wie beim Na^+ - Kanal kann die α_1 -Untereinheit bei heterologer Expression per se als Calciumkanal funktionieren. Die anderen Untereinheiten beeinflussen die Affinität für bestimmte Stoffe und bzw. oder die Spannungsabhängigkeit.

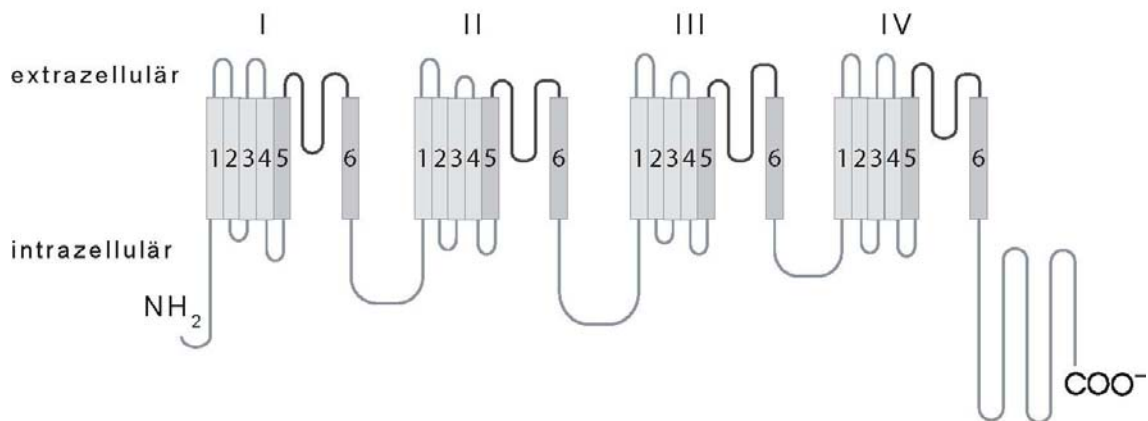


Abbildung 4: **Aufbau der α_1 -Untereinheit**

aus vier homologen Domänen (I-IV) mit jeweils sechs mutmaßlich transmembranösen Segmenten (1-6). Für weitere Einzelheiten siehe Text.

1.2.2 L-Typ Ca^{2+} -Kanal: Pharmakologie, Elektrophysiologie, Regulation

Nach der Klassifikation von Vaughan Williams zählen die Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten zu den Klasse IV Antiarrhythmika (Vaughan Williams, 1989). Die wichtigsten Vertreter sind 1,4-Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine; sie binden alle an der transmembranösen Region der Domäne IV der α_1 -Untereinheit, wobei für Dihydropyridine, zu denen z.B. Nifedipin, Nisoldipin und Felodipin gehören, zusätzliche Bindungsstellen an den Domänen I und III existieren (Striessnig et al., 1998). Da die Affinität für die inhibierenden Dihydropyridine im depolarisierten Zustand der Membran ansteigt, besteht der Verdacht, dass der spannungsinaktivierte Kanal die Konformation der hochaffinen Bindungsstelle enthält.

Die Phenylalkylamine wie z.B. Verapamil, Gallopamil oder Thiapamil blockieren den Kanal intrazellulär, wohingegen die Benzothiazepine vom Extrazellularraum

her angreifen (Trautwein et al., 1983). Bei beiden Antagonisten wirken Aminosäuren im IV-S5 – Segment des Kanals bei der Blockade mit (Motoike et al., 1999). Während Nifedipin an Gefäßen einen größeren inhibitorischen Effekt aufweist, ist derjenige von Verapamil am Herzen größer.

Die Stimulation und Regulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals kann über mehrere Signalwege erfolgen, wobei am Ende immer die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bestimmter Aminoester der α_{1C} - bzw. β - Untereinheit des Kanals stehen (siehe Abb. 3). Der phosphorylierte Calciumkanal erhöht seine Öffnungswahrscheinlichkeit, was sich in einer Aktivierung des L-Typ-Calciumstromes niederschlägt. Die funktionellen Eigenschaften des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bestimmen den zellulären Calciumstrom gemäß der Gleichung

$$I_{\text{Ca}} = N \times f_{\text{aktiv}} \times p_0 \times g \times \Delta V,$$

wobei N die Gesamtzahl der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ist, f_{aktiv} die Zahl der Kanäle, die während einer Depolarisationsphase geöffnet werden können, p_0 die Öffnungswahrscheinlichkeit eines aktiven Kanals, g die Einzelkanalleitfähigkeit und ΔV die Differenz zwischen dem Testpotential und dem Umkehrpotential des Kanals darstellt (Kamp und Hell, 2000).

Eine bedeutende Rolle spielt die über β -Adrenozeptoren führende Signalkaskade. Hierbei wirken heterotrimerische guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) entweder stimulierend (G_s) oder inhibierend (G_i) auf die cAMP-Bildung durch die membranständige Adenylatcyclase. Das vermehrt gebildete cAMP greift an den regulatorischen Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) an, die ihrerseits die α_1 - bzw. β -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals an spezifischen Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Dem entgegen wirken die Phosphodiesterase, die cAMP in 5'AMP umwandelt, sowie die Serin-Threonin-Phosphatase. Während dies für β_1 -Adrenozeptoren allgemein zu gelten scheint, wurden bei β_2 -Adrenozeptoren je nach Auswahl der Kardiomyozyten unterschiedliche Ergebnisse erzielt (Xiao et al., 1999) (Steinberg, 1999). Eine Voraussetzung für die cAMP-abhängige Stimulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals ist die Verankerung der Proteinkinase A (PKA) an einer spezifischen

subzellulären Struktur mittels eines Ankerproteins (A-kinase anchoring protein, AKAP). Dieses Protein bewirkt durch seine Bindung an die regulatorische Untereinheit R der Proteinkinase A eine verbesserte Annäherung von PKA an ihr spezifisches Substrat.

Eine Inaktivierung des Kanals kann sowohl durch die Proteinphosphatase 1 als auch durch die Proteinphosphatase 2A mittels Dephosphorylierung erfolgen.

Kontrovers diskutiert wird eine direkte Stimulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals durch eine β -adrenerge Aktivierung von $\text{G}\alpha_s$, die unabhängig von PKA sein soll; (Yatani und Brown, 1989, Hartzell et al., 1991).

Eine weitere Signalkaskade verläuft über die Phospholipase C, die durch an G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert wird (Dorn und Brown, 1999). Das über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat gewonnene Diacylglycerol aktiviert gemeinsam mit Phosphatidylserin und eventuell auch Ca^{2+} die Proteinkinase C, die wiederum den L-Typ Ca^{2+} -Kanal sowohl stimulieren als auch inhibieren kann (Bkaily et al., 1995, Cheng et al., 1995).

Das bestuntersuchte Beispiel für einen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor ist der muskarinische M_2 -Rezeptor (Mery et al., 1997). Die meisten G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren ändern nicht den Calciumstrom selbst, sondern greifen an den β -Adrenozeptoren an und verhindern so eine Stimulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals.

1.3 Vorhofflimmern

1.3.1 Epidemiologie

Vorhofflimmern ist mit 4,5 Millionen Betroffenen die häufigste Herzrhythmusstörung in der EU (Mewis et al., 2006). Aufgrund der zu erwartenden demographischen Entwicklung wird sich die Prävalenz noch erhöhen. Die Prävalenz des Vorhofflimmerns verdoppelt sich ab dem Alter von 50 mit jedem Le-

bensjahrzehnt (Go et al., 2001). Hinzu kommen Risikofaktoren wie z.B. männliches Geschlecht, Alter, Hypertonie, Diabetes, Nikotinkonsum, Herzklappenerkrankungen und bereits erlittener Myokardinfarkt (Kannel et al., 1982).

1874 gelang es Vulpian erstmals, Vorhofflimmern in vivo zu beobachten. Die Erfindung der Elektrokardiographie durch Willem Einthoven im Jahre 1900 ermöglichte es neun Jahre später Sir Thomas Lewis erstmals, das Elektrokardiogramm eines Patienten mit Vorhofflimmern aufzunehmen (Lip und Beavers, 1995). Die Erkenntnisse über diese Erkrankung nahmen nun immer rascher zu, und Garrey fasste den damaligen Wissensstand 1924 in einer ausführlichen Rückschau zusammen. Lown empfahl 45 Jahre später die Kardioversion als geeignete Therapiemaßnahme (Lip et al., 1994).

Unser heutiges Verständnis der Elektrophysiologie des Vorhofflimmerns ist von mehreren Entdeckungen geprägt: zum einen entwickelte Moe 1962 eine Hypothese zur Entstehung des Vorhofflimmerns auf der Basis der Erregungsfronten („multiple wavelets“), die wie zufällig durch das Myokard wandern und somit die Herzrhythmusstörung aufrecht erhalten. Die Form des Vorhofflimmerns wird durch die Zahl der „wavelets“ bestimmt. Dabei kommt der Heterogenität elektrophysiologischer und anatomischer Eigenschaften (Allesie et al., 1976) sowie der Länge der Exzitationswelle des Reentry-Kreises eine entscheidende Rolle zu (Lammers und Allesie, 1993).

1995 zeigten Wijffels et al., dass das Auftreten und Fortbestehen des Vorhofflimmerns durch die von diesem selbst ausgelösten elektrophysiologischen Veränderungen des Vorhofmyokards stabilisiert werden. Des Weiteren konnten Haïssaguerre et al 1998 zeigen, dass bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern 94% der Impulse ihren Ursprung in den Pulmonarvenen haben (sogenannte „ectopic beats“).

1.3.2 Ätiologie, Krankheitsbild, EKG, Folgen

85% der Patienten mit Vorhofflimmern leiden unter einer Herzerkrankung oder metabolischen Störung. Diese geht häufig mit einer Vergrößerung des Vorhofes einher (Murgatroyd und Camm, 1993), was die Koexistenz mehrerer Reentry-Kreise ermöglicht (Janse, 1997). Eine kongestive Herzinsuffizienz kann laut Maisel et al. 2003 sowohl Ursache als auch Folge des Vorhofflimmerns sein. Weiterhin sind eine diastolische Dysfunktion, eine koronare Herzkrankheit sowie eine Mitralklappenstenose als kardiale und eine Hyperthyreose als nicht-kardiale Ursache für chronisches Vorhofflimmern in Betracht zu ziehen (Tsang et al., 2002, Iqbal et al., 2005).

Akutes Vorhofflimmern wird am häufigsten durch akute Myokardinfarkte, Herzoperationen und andere chirurgische Eingriffe, Lungenembolien und Myokarditiden verursacht. Als weitere Auslöser können ganz unterschiedliche Vorgänge in Betracht gezogen werden, die bei vorgeschädigtem Herzmuskelgewebe zu Vorhofflimmern führen: physische und psychische Anstrengung bzw. Überanstrengung, Infekte, übermäßiger Alkoholgenuss oder andere toxische Einwirkungen. Als „lone atrial fibrillation“ bezeichnet man das Vorhofflimmern bei den 10% der Patienten, bei denen trotz umfangreicher Diagnostik keine kardiale oder extrakardiale Grunderkrankung eruierbar ist (Marriott und Myerburg, 1986).

Beim Vorhofflimmern kommt es, bedingt durch die gestörte Erregungsausbreitung im Vorhofmyokard, zu einem Verlust der Synchronität bei der Kontraktion benachbarter Faserbezirke. Dies führt im Elektrokardiogramm dazu, dass die P-Welle, die im gesunden Herzen durch die koordinierte Kontraktion der Vorhofmuskulatur gebildet wird, verschwindet. An ihre Stelle treten, sich in Gestalt, Dauer und Amplitude ständig verändernde kleine Flimmerwellen („f-Wellen“), die sich unter Umständen kaum von der isoelektrischen Linie des Elektrokardiogramms abheben (siehe Abb.5). Die Frequenz dieser f-Wellen beträgt 350/min – 700/min. Beim Übergang der Erregungsimpulse vom Vorhof in die

Kammer nehmen die Zellen des AV-Knotens eine Filterfunktion wahr. Nicht jeder der bis zu 700 Erregungsimpulse pro Minute trifft die Zellen im Ruhezustand an. Man spricht von einer physiologischen Blockierung. Diese Blockierung führt im körperlichen Ruhezustand zu einer Ventrikelfrequenz von 100 – 160/min. Im EKG imponiert diese unregelmäßige Weiterleitung der Impulse aus dem Vorhof in die Kammer durch unterschiedliche Abstände der QRST-Komplexe.



Abbildung 5: Elektrokardiogramm bei Vorhofflimmern

Deutlich sind die „f-Wellen“ und das unregelmäßige Auftreten der QRST-Komplexe zu erkennen. Am deutlichsten imponieren die fehlenden P-Wellen und flimmerförmigen Oszillationen in der Brustwandableitung V₁.

Die klinischen Symptome können bei Vorhofflimmern ganz unterschiedlicher Natur sein und richten sich nach der Grunderkrankung. Zum Einen kann es durch die unregelmäßige Schlagfrequenz des Herzens zu Palpitationen kommen, zum Anderen kann sich die Abnahme des Herzminutenvolumens, die bis zu 30% beträgt, in einer schlechteren körperlichen Belastbarkeit und Luftnot bemerkbar machen. Des Weiteren können Schwindel, Atemnot, Erschöpfungszustände und Kraftlosigkeit auftreten. Außerdem besteht durch den mechani-

schen Stillstand der Vorhöfe und dem daraus resultierenden trägen Blutstrom die Gefahr der Thrombenbildung einerseits, die der damit verbundenen embolischen Komplikationen andererseits (Wyse et al., 2004).

Je nach Art und Dauer der Symptome kann Vorhofflimmern in verschiedene Formen eingeteilt werden: paroxysmales, persistierendes und permanentes Vorhofflimmern (siehe Abb. 6). Paroxysmales (anfallartiges) Vorhofflimmern dauert selten länger als 24 Stunden und endet spontan ohne Einwirkung von außen. Dabei kann eine vagal induzierte Form von einer adrenerg ausgelösten unterschieden werden. Der „vagale Typ“ ist durch eine zunehmende Verlängerung der Zykluslänge des Sinusrhythmus gekennzeichnet, die der Induktion von Vorhofflimmern vorausgeht. Demgegenüber tritt das adrenerg induzierte Vorhofflimmern nach kurzen Zykluslängen bzw. unter Belastung auf.

Persistierendes Vorhofflimmern muss durch elektrische oder pharmakologische Kardioversion beendet werden. Die Rückführung in den Sinusrhythmus ist bei permanentem Vorhofflimmern definitionsgemäß nicht mehr möglich (Fuster et al., 2006).

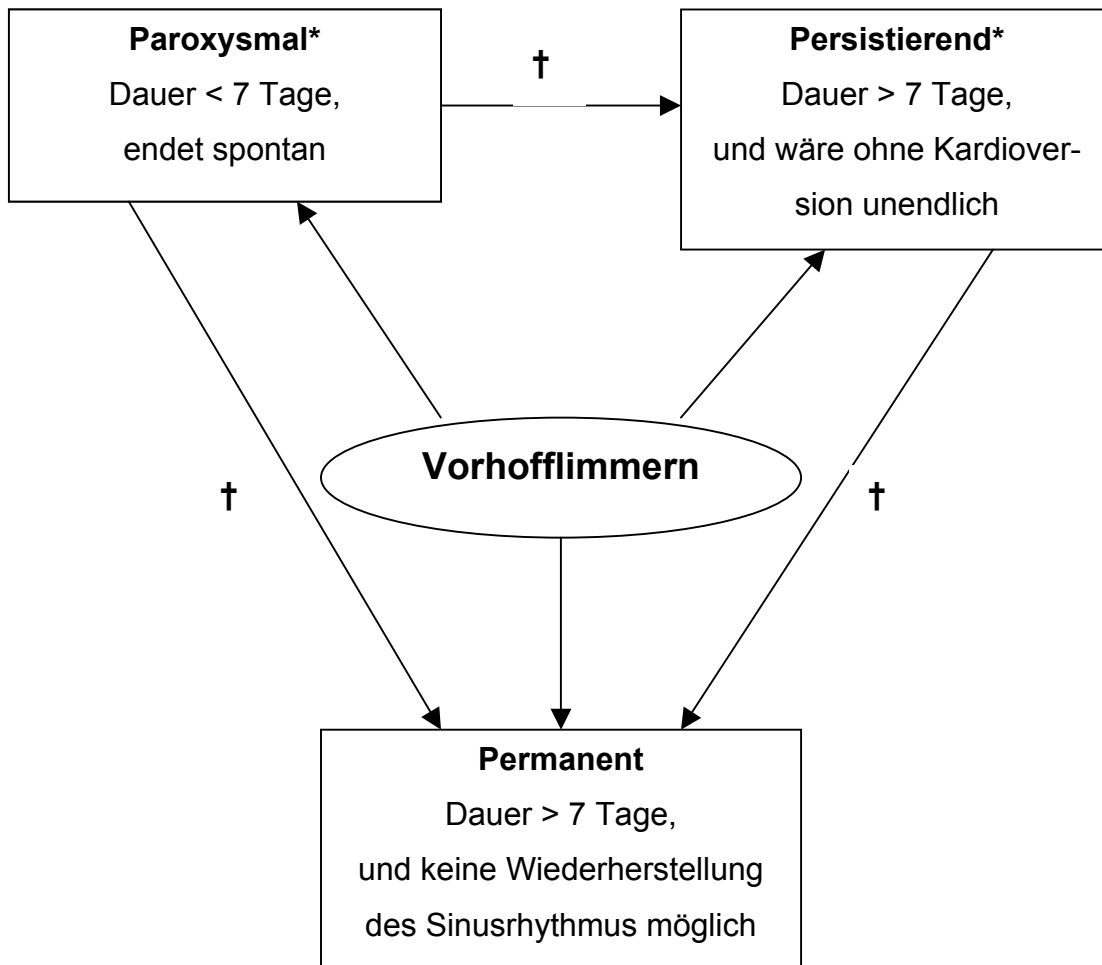


Abbildung 6: Klassifikation des Vorhofflimmerns.

Hat ein Patient zwei oder mehr Episoden von Vorhofflimmern, so wird dies rezidivierend genannt. Sowohl paroxysmales als auch persistierendes Vorhofflimmern sind potenziell rezidivierende Arrhythmien.

† Nach einiger Zeit kann paroxysmales Vorhofflimmern persistierend werden; außerdem können sich sowohl paroxysmales als auch persistierendes Vorhofflimmern zu permanentem Vorhofflimmern entwickeln.

(nach Iqbal et al., 2005)

1.3.3 Remodeling, zelluläre und molekulare Mechanismen

Vorhofflimmern führt zu einer Veränderung sowohl der Struktur als auch der elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe, dem so genannten atrialen Remodeling. Diese Veränderungen fördern die Entstehung und den Erhalt der Arrhythmie.

Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts stellten Parkinson und Campbell fest, dass die medikamentöse Kardioversion mittels Chinidin zunehmend schwieriger wurde, je länger die Arrhythmie andauerte (Parkinson und Campbell, 1929). At-tuel et al. konnten 1982 erstmals einen Zusammenhang zwischen einer Verkürzung und verminderten Frequenzadaptation der atrialen Refraktärzeit (AERP) und einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern beschreiben.

Für unser heutiges Verständnis bedeutende Erkenntnisse über die Entstehung und den Erhalt von Vorhofflimmern gewannen Wijffels et al. 1995 im experimentellen Tiermodell. Bei instrumentierten Ziegen wurde mithilfe eines externen Stimulationscomputers, der bei Rückfall in Sinusrhythmus das Vorhofflimmern durch Stimulationsimpulse, sogenannte „bursts“ (1s, 50 Hz), wieder herstellte, kontinuierlich Vorhofflimmern unterhalten. Dabei wurde festgestellt, dass die Intervalle zwischen den einzelnen Rückfällen in den Sinusrhythmus immer größer wurden, bis nach zwei bis drei Wochen 90% der Ziegen persistierendes Vorhofflimmern aufwiesen. Es kam zu einer verminderten Frequenzadaptation und Verkürzung der atrialen Refraktärzeit. Definierte Regionen langsamer Leitungsgeschwindigkeit wurden als Ursache für die erhöhte Stabilität des Vorhofflimmerns angenommen. Diese Erkenntnisse veranlassten die Autoren zu der Aussage: „Atrial fibrillation begets atrial fibrillation“, womit sie deutlich zu machen versuchten, dass sich Vorhofflimmern selbst aufrecht erhält.

Unabhängig davon zeigten andere Arbeitsgruppen in einem so genannten „Rapid-Pacing-(RAP)-Modell des Vorhofflimmerns“ beim Hund eine verminderte Frequenzadaptation und eine Abnahme der rechtsatrialen Refraktärzeit um 15% (Morillo et al., 1995). Die Autoren konnten zusätzlich eine Zunahme der Vorhofgröße feststellen. Weitergehende Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass neben der Refraktärzeit sowohl die Leitungsgeschwindigkeit, als auch die Wellenlänge - einhergehend mit einer vermehrten Heterogenität bestimmter Gewebeanteile - eine Reduktion erfahren und als Substrat für das Fortbestehen und eine Stabilisierung des Vorhofflimmerns dienen (Gaspo et al., 1997). Die Reversibilität der durch langandauerndes Vorhofflimmern mittels Remodeling ausgelösten Veränderungen des atrialen Refraktärverhaltens konnte von Yu et al. 1999 demonstriert werden. Innerhalb von vier Tagen nach Kardioversion konnte wieder ein normales Refraktärverhalten beobachtet werden. Andere Studien zeigten allerdings, dass es Monate dauern kann, bevor die Transportfunktion der Vorhöfe vollständig wieder hergestellt ist (Manning et al., 1994 und 1995). Ein Rückfall in Vorhofflimmern ist innerhalb der ersten fünf Tage nach elektrischer Kardioversion am Wahrscheinlichsten (Tieleman et al., 1998).

Auf molekularer Ebene kommt es bei Vorhofflimmern zum Teil zu Veränderungen der unterschiedlichen Ionenströme. Verschiedene Studien haben berichtet, dass der L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern um 60-75% vermindert ist (Bosch et al., 1999, Van Wagoner et al., 1999, Skasa et al., 2001 und Workman et al., 2001). Ebenso beschreiben sowohl Bosch et al. 1999 als auch Van Wagoner et al. 1999 übereinstimmend eine Abnahme des atrialen transienten Auswärtsstromes (I_{to}). Van Wagoner et al. konnten weiterhin einen Anstieg der Dichte des Inward Rectifier (I_{K1}) im linken aber nicht im rechten Atrium, sowie eine Abnahme des atrialen Sustained Outward Kaliumstrom (I_{sus}) feststellen. Grammer et al. hingegen beobachteten keine Veränderung von I_{sus} bei Patienten mit Vorhofflimmern (Grammer et al., 2000).

Die Verkürzung und verminderte Frequenzadaptation der Aktionspotentialdauer ist auf die - durch den stark verringerten L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca, L}}$) - nahezu verschwundene Plateauphase und somit veränderte Morphologie des Aktionspotentials zurückzuführen. Yue et al. demonstrierten im „Rapid-Pacing-(RAP)-Modell des Vorhofflimmerns“ beim Hund 1997 erstmals, dass die Aktionspotentiale, die bei Hunden mit atrialer Tachykardie ausgelöst werden konnten, mit denen von Patienten mit Vorhofflimmern übereinstimmen. Wurden bei Zellen mit normalem Aktionspotential der L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca, L}}$) mit Nifedipin blockiert, so zeigten die Aktionspotentiale die typische Dreiecksform, die derjenigen bei einer atrialen Tachykardie entsprach. Andere experimentelle Modelle konnten diese Beobachtungen bestätigen (Hara et al., 1999, Van Der Velden et al., 2000). Tieleman et al. 1997 fanden im Modell des schnellen atrialen Pacing an der Ziege, dass sich die effektive atriale Refraktärperiode nach Verapamil-Gabe weit weniger verkürzte als in der Kontrollgruppe. Außerdem dauerte die Wiederherstellung der normalen effektiven atrialen Refraktärperiode nach Beendigung der Stimulation bei Verapamil-Gabe weniger lange (Tielemann et al., 1997). Dies alles weist darauf hin, dass das elektrische Remodeling der Vorhöfe durch den hohen Calcium-Einstrom während hoher Vorhoffrequenzen getriggert wird.

Eine große Anzahl atrialer Kardiomyozyten imponieren durch im Licht- bzw. Elektronenmikroskop sichtbare Veränderungen ihrer zellulären Substrukturen wie dem Verlust von Myofibrillen, der perinukleären Glykogenanhäufung, Veränderungen der Struktur und Größe von Mitochondrien, der Fragmentierung des sarkoplasmatischen Retikulums und der homogenen Verteilung des nukleären Chromatins. Hinzu kommt eine Zunahme der Zellgröße (Ausma et al., 1997) und eine Vergrößerung der A-Banden, die bei paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern zu beobachten ist (Brundel et al., 2002). Des Weiteren wurde eine signifikante Zunahme des Typ-I-Kollagens beobachtet (Kostin et al.,

2002, Xu et al., 2004), die mit der Fibrosierung des flimmernden Myokards einhergeht.

In tierexperimentellen Modellen des Vorhofflimmerns war die mRNA-Konzentration der α_{1C} -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals reduziert (Van Der Velden et al., 2000, Yue et al., 1999). Beim Menschen wurden widersprüchliche Ergebnisse erzielt: zwei Arbeitsgruppen konnten einen reduzierten mRNA-Gehalt der α_{1C} -Untereinheit nachweisen (Brundel et al., 2001, Lai et al., 1999), was von einer anderen Gruppe nicht bestätigt werden konnte (Grammer et al., 2001). Auf Protein-Ebene wurde in einigen Studien eine verminderte Expression der α_{1C} -Untereinheit gefunden (Brundel et al., 2001, Klein et al., 2003), in zwei anderen dagegen nicht (Schotten et al., 2000, Schotten et al., 2003). Schotten et al. konnten weder bei der Untersuchung der β_2 -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals noch bei der der Dihydropyridinbindungsstelle des Kanals eine veränderte Expression bzw. Dichte feststellen (Schotten et al., 2003). Andere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die mRNA-Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal- β -Untereinheiten - wichtige Modulatoren für die Amplitude von $I_{\text{Ca,L}}$ - bei Vorhofflimmern stark vermindert ist (Grammer et al., 2001). Nachdem sie eine 3,1fach höhere Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals festgestellt hatten, untersuchten Klein et al. die Phosphatase 2A auf deren Protein-Expression, wobei jedoch mittels Westernblot-Analyse keinerlei Veränderungen festgestellt werden konnten (Klein et al., 2003).

Bei schneller atrialer Stimulation im Hundemodell kam es zwar zu einer progressiven Verringerung der Natriumstromdichte und Expression der α -Untereinheit des schnellen Natriumkanals (Gaspo et al., 1997, Yue et al., 1999), beim Menschen hingegen war die Natriumstromdichte unverändert gegenüber derjenigen von Patienten im Sinusrhythmus (Bosch et al., 1999).

Während die Expression der Kv4.3-mRNA, die dem transienten K^+ -Auswärtsstrom zugrunde liegt, im Tierversuch uneinheitlich bewertet wurde (Van Der Velden et al., 2000), (Yue et al., 1999), konnte in humanen Proben ei-

ne um 61% deutlich verringerte Expression bei Vorhofflimmern festgestellt werden; die mRNA-Level von Kv1.4 waren bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern identisch (Grammer et al., 2000).

Von den gap-junction-bildenden Connexinen am Herzen (Cx 40, Cx 43, Cx 45) wurden vor allem Cx 40 und Cx 43 untersucht. Hierbei kamen unterschiedliche Arbeitsgruppen zu nicht übereinstimmenden Ergebnissen, was die Expression der Connexine bei Vorhofflimmern angeht (Grammer et al., 2000, Kostin et al., 2002 und Polontchouk et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Van der Velden et al. konnten 1998 bei der Ziege eine heterogene Umverteilung von Cx40, nicht jedoch von Cx43, auf der Zelloberfläche im Vergleich zum Sinusrhythmus feststellen.

Bedeutend für die Konzeption der vorliegenden Arbeit waren Ergebnisse eigener Vorarbeiten. Wir konnten bereits nach sechsstündiger Vorhofstimulation eine Verringerung der Calciumstromdichte nachweisen, die nach 12 und 24 Stunden noch deutlicher wurde. Weiterhin konnte nach 24 Stunden erstmals eine Reduktion α_1 -Untereinheit-mRNA gezeigt werden. Alle anderen Veränderungen auf mRNA-Ebene waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls schon nachweisbar (Bosch et al., 2003).

Abschließend bleibt festzustellen, dass den Kurzeffekten des atrialen Remodeling wohl eher funktionelle Veränderungen zugrunde liegen, während die Langzeiteffekte durch eine Veränderung der Genexpression geprägt sind.

1.3.4 Therapie

Ist Vorhofflimmern nicht durch eine kardiale Grunderkrankung bedingt, stehen drei Therapiestrategien für die Behandlung zur Wahl: zum Einen das Beenden der Arrhythmie mittels medikamentöser oder elektrischer Kardioversion, der Erhalt des Sinusrhythmus durch Medikamente oder nicht pharmakologische Therapien oder die Kontrolle der Ventrikelfrequenz. Zusätzlich ist eine Antikoagula-

tionstherapie bei Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren für Thromboembolien von großer Bedeutung.

1.4 Atriales Natriuretisches Peptid

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist Teil einer Klasse von Polypeptiden, die außer ANP noch das „Brain natriuretic peptide“ (BNP), Urodilatin und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) beinhaltet.

1.4.1 Synthese, Aufbau, Speicherung, Sekretion und Freisetzung

Das in den chromaffinen Zellen der Herzvorhöfe synthetisierte Peptidhormon ANP besteht in seiner zirkulierenden Form aus folgender Aminosäuresequenz: H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys⁷-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys²³-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH. Es enthält eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cystein an Position 7 und 23, wodurch eine geschlossene Ringstruktur entsteht. Die Speicherung des humanen ANP erfolgt als sogenanntes Prä-pro-ANP als 126-Aminosäurepeptid in membrangebundenen sekretorischen Granula der atrialen Kardiomyozyten. Extrakardiale Speicherorte sind das zentrale Nervensystem und die Nieren (Nakayama et al., 1984).

Ein Dehnungsreiz auf die Zellen des Vorhofmyokards sowie eine supraventrikuläre Tachykardie bewirken die Freisetzung des atrialen natriuretischen Peptids. Letzteres konnte durch eine Studie von Petersen und Mitarbeitern belegt werden. Sie zeigten, dass die zuvor bereits in mehreren Studien nachgewiesene erhöhte Plasmakonzentration von ANP bei Patienten mit Vorhofflimmern (Anderson et al., 1986, Grozier et al., 1987 und Roy et al., 1987) nach Kardioversion innerhalb von 24 Stunden auf ein normales Niveau zurück ging und für mindestens 30 Tage bei diesen Werten blieb (Petersen et al., 1988). Ebenfalls erhöht ist die Plasmakonzentration von ANP bei ansonsten asymptomatischen Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion. Diese Tatsache erlaubt den Rück-

schluss, die ANP-Konzentration als Marker zur Identifizierung dieser ansonsten symptomlosen Patienten zu nutzen.

α -Adrenoagonisten und andere vasopressorische Hormone verursachen einen erhöhten Plasma-ANP-Spiegel (Katsube et al., 1985, Manning et al., 1985). Eine Studie von Nachshon et al. aus dem Jahr 1995 stellt die Hypothese einer Autoregulation der ANP-Sekretion durch die Aktivierung des ANPR-A-Rezeptors und die damit verbundene cGMP-Bildung auf, wobei cGMP hier als Second messenger eine Downregulation der ANP-Sekretion bewirkte.

Ebenfalls auf molekularer Ebene konnten Cui et al. 2002 zeigen, dass die ANP-Freisetzung durch cAMP inhibiert wird. Dabei stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung: ein Proteinkinase-abhängiger Mechanismus sowie ein L-Typ Calciumkanal-abhängiger als auch ein L-Typ Calciumkanal-unabhängiger Signaltransduktionsmechanismus. Änderungen im Calciumeinstrom via L-Typ und T-Typ Calciumkanal zeigen gegensätzliche Effekte, was die Regulation der ANP-Freisetzung durch die atrialen Kardiomyozyten betrifft. Eine Aktivierung des L-Typ Calciumkanals bewirkt eine Inhibierung der ANP-Freisetzung, wohingegen durch eine Blockade des Kanals eine Stimulation der ANP-Sekretion erreicht wird. Der Calcium-Einstrom durch den T-Typ Calciumkanal scheint zu einer Erhöhung der ANP-Sekretion zu führen (Wen et al., 2000).

1.4.2 Allgemeine Wirkung von ANP

Die Wirkung von ANP entfaltet sich auf verschiedenen Ebenen: erstens direkte zelluläre Effekte, zweitens beeinflusst ANP aufgrund seiner sympathoinhibitorischen und vagoexzitatorischen Eigenschaften das autonome Nervensystem und zum Dritten werden Barorezeptoren durch das Peptidhormon sensibilisiert (Clemo et al., 1996). Das humane ANP (hANP) besetzt sowohl spezifische Guanylatcyclase-gekoppelte Rezeptoren (ANPR-A und ANPR-B) auf der Zellmembran, die cGMP als second messenger produzieren, als auch Guanylatcyclase-unabhängige Rezeptoren (ANPR-C) (Chinkers et al., 1989). Während der

ANPR-A Rezeptor die meisten biologischen Aktivitäten von ANP initiiert, dient der ANPR-C Rezeptor weitgehend der Elimination von ANP aus dem Kreislauf; außerdem kann ANP mit Hilfe des letztgenannten Rezeptors auch dazu dienen, die Menge an intrazellulärem cAMP zu reduzieren. Der ANPR-B Rezeptor wird nur bei sehr hohen Konzentrationen des Peptids aktiviert. Die Stimulation dieser Rezeptoren führt in der Niere sowohl zu einer Natriurese als auch zu einer ausgeprägten Diurese. Obwohl infolge der vasodilatorischen Wirkung der Blutdruck sinkt, kommt es zu einer beträchtlichen Zunahme der glomerulären Filtrationsrate. Weitere renale Effekte beinhalten eine Hemmung der Renin- und Aldosteronsekretion. Die angiotensinvermittelte Vasokonstriktion und die angiotensinvermittelte Aldosteronausschüttung werden antagonisiert.

Es wird vermutet, dass die ständig erhöhte Plasmakonzentration von hANP bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz zu einer Desensibilisierung der hANP-Rezeptoren in den Endorganen führt.

1.4.3 Wirkung von ANP am Herzen

Nach der Gabe einzelner hoher ANP-Dosen konnte ein leichter Anstieg der Herzfrequenz beobachtet werden (Richards et al., 1985). Die Herzfrequenz wird dabei unabhängig vom autonomen Nervensystem direkt über einen cGMP-abhängigen Signalweg beeinflusst (Herring et al., 2001). Die Interaktionen von ANP mit dem autonomen Nervensystem an der kardialen Zellmembran sind in Abb.8 dargestellt.

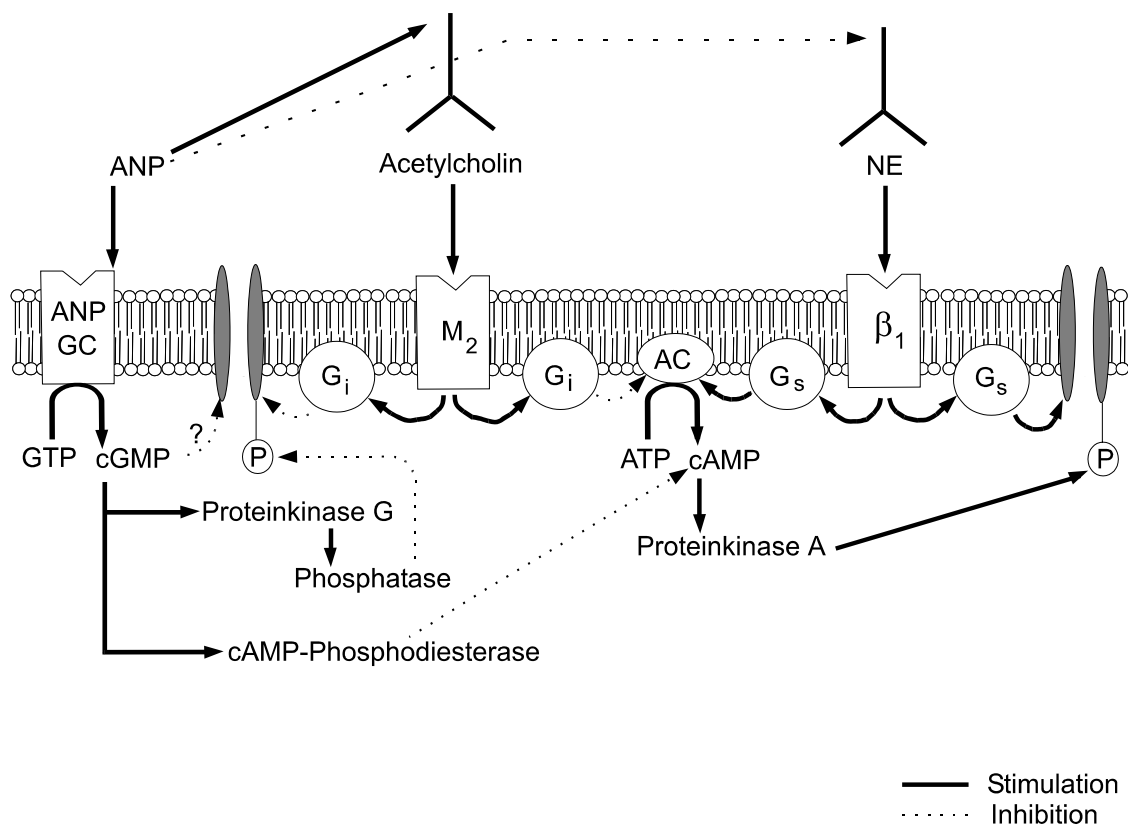


Abbildung 8: Die Auswirkungen von ANP auf verschiedene Rezeptoren der kardialen Zellmembran und die intrazelluläre Signaltransduktion

Durch die Bindung von ANP an den ANP-Guanylatcyclase-Komplex wird GTP in cGMP umgewandelt. Noch in Frage steht, ob durch cGMP eine direkte Hemmung des Ca^{2+} -Kanals verursacht werden kann. Erwiesen ist allerdings, dass über eine von Proteinkinase G aktivierte Phosphatase eine Inaktivierung des Kanals durch Dephosphorylierung erfolgen kann. Des Weiteren erfolgt durch cGMP eine Aktivierung der cAMP-Phosphodiesterase, die wiederum die Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP hemmt.

Weiterhin stimuliert ANP die Freisetzung von Acetylcholin aus parasymphatischen Nervendigungen, das über die Stimulation inhibitorischer G-Proteine durch muscarinerge Rezeptoren sowohl eine direkte Inhibition des Ca^{2+} -Kanals als auch der Adenylatcyclase bewirkt.

Die sympathoinhibitorische Wirkung von ANP äußert sich in der Inhibition der Freisetzung von Noradrenalin und der damit verbundenen verringerten Aktivierung von stimulierenden G-Proteinen durch den β_1 -Rezeptor. Die Folge ist zum Einen eine verminderte direkte Aktivierung des Ionenkanals durch das G-Protein und zum Anderen ein Ausbleiben des stimulierenden Effektes auf die Adenylatcyclase, die ursächlich für die Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals durch Phosphorylierung ist.

ANP-GC	... ANP-Guanylatcyclase
G_i	... inhibitorisches G-Protein
G_s	... stimulierendes G-Protein
M_2	... muscarinerge Rezeptor
AC	... Adenylatcyclase
β_1	... Betarezeptor
NE	... Norepinerphrin/Noradrenalin

(Modifiziert nach Clemo et al, 1996)

1.4.4 Wirkung auf kardiale Ionenkanäle

In humanen atrialen Zellen scheint ANP den L-Typ Calciumstrom durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus um ca. 38% zu verringern, was einen Einfluss auf die atriale exzitatorische Refraktärperiode (AERP), die Aktionspotentialdauer und die Herzfrequenz hat (Le Grand et al., 1992). Im Atrioventrikularknoten führt diese Inhibierung von $I_{Ca,L}$ zu einer Reduktion der Überleitungsgeschwindigkeit. Le Grand und Mitarbeiter konnten 1992 weiter nachweisen, dass auch der Ca^{2+} -unabhängige Kaliumauswärtsstrom I_{to} durch ANP gehemmt wird. Des Weiteren machte die Gruppe die interessante Beobachtung, dass $I_{Ca,L}$ in Abwesenheit von intrazellulärem cGMP sichtlich erhöht ist. Diesen Effekt schreiben sie einer G_s -Protein-Aktivierung zu. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ANP die beiden Ströme $I_{Ca,L}$ und I_{to} mithilfe unterschiedlicher Mechanismen kontrolliert: ersteren sowohl durch eine inhibitorische Guanylatcyclasegekoppelte Signalkaskade und eine G-Protein-Aktivierung, letzteren mittels einer G-Protein-Inhibierung.

1.5 Fragestellung

Das atriale natriuretische Peptid ANP, das bei supraventrikulären Tachykardien, wie dem Vorhofflimmern vermehrt ausgeschüttet wird, besitzt einen modulierenden Einfluss auf den L-Typ Calciumkanal der Kardiomyozyten (Mookherjee et al., 1991). In Zellen gesunder Patienten konnte bei erhöhter ANP-Konzentration ein verringerter Calciumeinstrom durch diesen Kanal nachgewiesen werden. Andererseits wird die ANP-Sekretion durch die Aktivierung des L-Typ Calciumkanals beeinflusst.

In einem speziell entwickelten experimentellen Tiermodell soll nun einerseits eine Bestätigung der bereits bekannten ANP-Wirkung auf linksatriale Kardiomyozyten nicht stimulierter Tiere erfolgen. Andererseits werden die Folgen der

schnellen Vorhofstimulation im Hinblick auf die ANP-Modulation des L-Typ Calciumkanals untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die isolierten Vorhofmyokardzellen stammten von weiblichen Newzealand Albino White Kaninchen [CrI:KBL (NZW)], deren durchschnittliches Gewicht bei ungefähr 4,0-4,5 kg lag. Die Zuchtlinie dieser Albino-Kaninchen hat ihren Ursprung in den Kitayama Laboratories K.K. of Nagano Refecture, Japan. Seit 1992 werden die Tiere bei Charles River, Deutschland, in Kissleg gezüchtet, woher auch die für die Versuche benötigten ehemaligen Zuchtweibchen stammten. Die Tiere wurden unter artgerechten Bedingungen in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Trinkwasser ad libitum und standardisiertes, pelletiertes Trockenfutter ssniff K-H, 4mm (ssniff, Spezialdiäten GMBH, Soest, D).

Das Herzgewicht der Tiere betrug ungefähr 20g.

2.1.2 Verwendete Substanzen und Lösungen

2.1.2.1 ANP

Für die Versuche wurde aus der Ratte gewonnenes, atriales natriuretisches Peptid verwendet: Atrial Natriuretic Factor 1-28, Rat (Calbiochem / Novabiochem, Bad Soden, D).

Eine Lösung der Substanz erfolgte in fünfprozentiger Essigsäure, um jene als 10 μ M, aliquotierte Stammlösung bei -20°C aufzubewahren. Aus dieser Stammlösung wurde am Versuchstag durch Verdünnung mit calciumfreier Tyr-

ode-Lösung die für die Versuche benötigte 10 nM ANP-Lösung hergestellt. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,35 titriert.

2.1.2.2 Lösungen zur Zellisolation

a) Calciumhaltige Tyrode-Lösung:

NaCl	136,00 mM
KCl	5,40 mM
MgCl ₂	1,00 mM
HEPES	5,00 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Glucose	10,00 mM
CaCl ₂	1,80 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,35 eingestellt.

b) Calciumfreie Tyrode-Lösung:

NaCl	136,00 mM
KCl	5,40 mM
MgCl ₂	1,00 mM
HEPES	5,00 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Glucose	10,00 mM
CaCl ₂	0,00 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,35 eingestellt

c) Collagenase-Lösung:

Die calciumfreie Tyrode-Lösung wurde hierfür mit Collagenase Typ CLS II der Firma Biochrom AG, Berlin, D versetzt. Die Aktivität der Collagenase betrug $A=240 \text{ U/mg}$.

2.1.2.3 Aufbewahrungslösung „Kraftbrühe“ (KB)

Kaliumglutamat	74,00 mM
KCl	30,00 mM
KH_2PO_4	30,00 mM
MgSO_4	3,00 mM
Taurin	20,00 mM
EGTA	0,50 mM
HEPES	10,00 mM
Glucose	10,00 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,35 eingestellt.

2.1.2.4 Lösungen für Patch-clamp Experimente

d) Pipettenlösung:

CsCl	20,00 mM
Cs-Aspartat	110,00 mM
HEPES	10,00 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	1,00 mM
Mg ₂ -ATP	5,00 mM
GTP	0,10 mM
Phosphokreatin	5,00 mM

Der pH-Wert wurde mit CsOH auf pH 7,35 eingestellt.

e) Badlösung:

CholineCl	136,00 mM
CsCl	5,60 mM
CaCl ₂	2,00 mM
MgCl ₂	1,00 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
HEPES	5,00 mM
Glucose	10,00 mM

Der pH-Wert wurde mit CsOH auf pH 7,35 eingestellt.

f) ANP-Tyrode-Lösung

CholineCl	136,00mM
CsCl	5,60mM
CaCl ₂	2,00mM
MgCl ₂	1,00mM
NaH ₂ PO ₄	0,33mM
HEPES	5,00mM
Glucose	10,00mM
ANP	10,00nM

Der pH-Wert wurde mit CsOH auf pH 7,35 eingestellt

2.1.3 Geräte

2.1.3.1 Operationsbesteck

Für die Implantation der bipolaren Kaninchen-Elektrode wurde Operationsbesteck der Firma Aesculap/B.Braun, Melsungen, D verwendet.

2.1.3.2 Herzschrittmacher und bipolare Kaninchen-Elektrode

Bei dem verwendeten Schrittmacher handelte es sich um das Modell Logos, SN 60 11 27 94 der Firma Biotronik, Berlin, D. Bei den mit Teflon ummantelten bipolaren Kaninchen-Elektroden, die Platinhülsen als Kontakte besaßen, handelt es sich um eine Sonderanfertigung der Firma Vasco Med GmbH, Binzen, D.

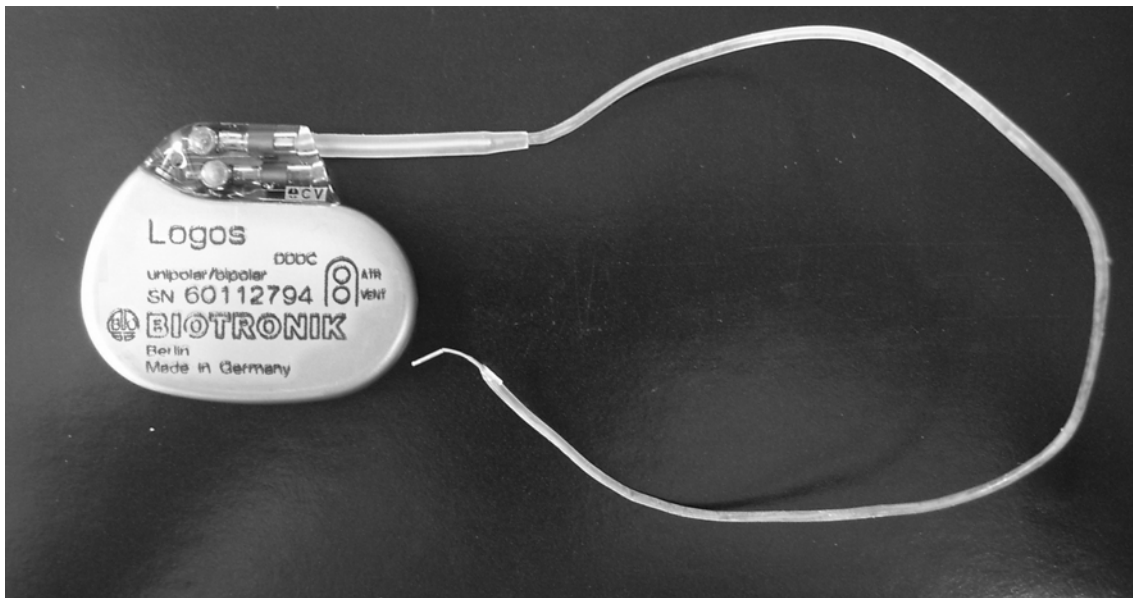


Abbildung 9: **Fotografie des verwendeten Schrittmachers mit angeschlossener Elektrode.**

2.1.3.3 Langendorff-Apparatur

Bubble Trap	Radnofi, Monrovia, USA
Herzkammer	Schott, Mainz, D
Kühler	Brand, Wertheim, D
Thermostat	Haake DC30, Gebrüder Haake, Karlsruhe, D

2.1.3.4 Patch-Clamp-Messplatz

Um eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden alle stromführenden Vorrichtungen geerdet.

Verstärker	Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, USA
A/D-Wandler	Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, USA
Software	pclamp 6.0, Axon Instruments, Foster City, USA
Mikroskop (invers)	Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen, D
Mikromanipulator (hydraulisch)	Narishige Scientific Instruments, Tokyo, J
Perifusionsleitungssystem	B.Braun, Melsungen, D
Probenkammer	Cell Micro Controls, Virginia Beach, USA
Temperiereinheit	TC ² bip. Controller, Cell Micro Controls, Virginia Beach, USA
Pumpe	Peristaltikpumpe P-1, Amersham, Freiburg, D

schwingungsdämpfender Tisch	TMC, Peabody, USA
Faraday-Käfig	Eigenanfertigung

Elektroden

Silberdraht	Typ AG 99,9%, 0,3mm Dicke, Neolab, Heidelberg, D
Elektrodenkapillaren	Borsilikatglaskapillaren GC150TF-7.5, 1,5mm OD x 1,17mm ID mit Innenfilament, Harvard Apparatures LTD., Kent, UK
Elektrodenziehgerät	DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, D

2.1.3.5 Weitere Geräte und Zubehör

Fixierfaden	Ethicon Perma – Hand Seide, 3-0, nicht resorbierbar, Johnson-Johnson, Brüssel, B
Kanülen	B.Braun, Melsungen, D
Magnetrührer	Martin und Michael Crist, Osterode, D
pH-Meter	Migge & Glock, Leonberg, D
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Sterifilter	Milex GS, Milipore, Bedford, USA
Wasserbad mit Schüttler	Köttermann, Hänigsen, D
Präparierscheren und -pinzetten	Aesculap/B.Braun, Melsungen, D

2.2 Methoden

2.2.1 Kaninchenmodell

Um die Auswirkungen von Vorhofflimmern auf die Zellen des Vorhofmyokards ganz gezielt untersuchen zu können, wurde in unserem Labor ein Tiermodell entwickelt. Alle Versuche erfolgten mit Genehmigung und unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragte der Universität Tübingen. Ausgewachsenen New Zealand White Kaninchen wurden unter Anästhesie mit ungefähr 300 mg Ketamin (Ketavet, Pharmacia, Erlangen, D) und 20 mg Xylazin (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, D) jeweils zwei Sonden (Kaninchen-Elektrode, bipolar, Teflonmantel, Platinhülse, Sonderanfertigung, Firma Vasco Med GmbH, Binzen, D) implantiert. Die erste der beiden bipolaren Elektroden wurde über die linke Vena jugularis externa im rechten Vorhof platziert. Mit der zweiten Elektrode gelangte man über die rechte Vena jugularis externa in den Sinus coronarius, wo diese am linken Vorhof liegend platziert werden konnte (siehe Abb. 11). Mit Hilfe dieser beiden Elektroden war es nun möglich, den rechten Vorhof zu stimulieren und bipolare Signale vom linken Vorhof abzuleiten. Nachdem sowohl die rechtsatriale Reizschwelle als auch die Amplitude der linksatrialen Signale überprüft worden waren, wurden die Wunden mittels Einzelknopfnaht (Ethicon Mersilene 3-0, nicht resorbierbar, Johnson-Johnson, Brüssel, B) verschlossen, wobei die Enden der Sonden jeweils extern belassen wurden. Um eine postoperative Infektion der Versuchstiere zu vermeiden, wurde subkutan ein Breitspektrum-Antibiotikum (Tardomycel, Bayer, Leverkusen, D) injiziert.

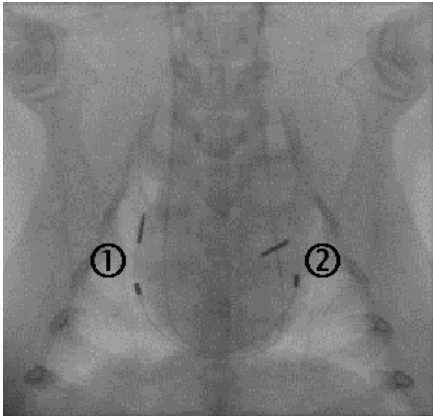


Abb. 13: **Röntgenthorax des Kaninchens**

- 1.) über die linke Vena jugularis externa im rechten Vorhof platzierte Elektrode
- 2.) über die rechte Vena jugularis externa im Sinus coronarius platzierte Elektrode

An die externen Enden der Sonden wurde ein Schrittmacher (Logos, SN 60 11 27 94, Biotronik, Berlin, D) angeschlossen, der das Herz bei einer Pulsbreite von 0,5 ms mit 600 Schlägen pro Minute stimulierte. Die Amplitude bei der Stimulation betrug 3,7 V. Das mit Hilfe dieses Rapid Atrial Pacing ausgelöste Vorhofflimmern wurde über 24 Stunden aufrecht erhalten. Im EKG wurde überprüft, ob der Vorhof diese Frequenz übernimmt und eine 2:1-Überleitung in die Ventrikel erfolgt. Vor Anschließen des Schrittmachers und Beginn der Stimulation wurden die Versuchstiere einer elektrophysiologischen Untersuchung unterzogen, mit deren Hilfe die Funktion der Sonde und die Effektivität der Stimulation untersucht werden konnte. Des Weiteren war es somit möglich zu überprüfen, in wie weit die Vorhöfe bei entsprechenden Stimulations-Schemata zu Arrhythmien neigten. Diese Versuche sind jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Das EKG der - wie oben beschrieben - narkotisierten Tiere wurde zum einen über die Extremitäten oberflächlich, und zum anderen über die am linken Vorhof liegende bipolare Sonde intrakardial aufgezeichnet. Zunächst wurde die Reizschwelle, und damit auch die Funktion der im rechten Vorhof liegenden Stimulations-Sonde ermittelt.

Anschließend wurde die atriale effektive Refraktärperiode (AERP) ermittelt und weiter Messungen durchgeführt.

Trat während der Messungen eine Arrhythmie (meist atriale Tachykardie, selten Vorhofflattern) oder eine andere Auffälligkeit auf, wurde die Untersuchung unterbrochen. Es folgte eine ca. zweiminütige Pause, in der abgewartet wurde, ob sich die Arrhythmie von selbst terminiert. Bei anhaltender Rhythmusstörung wurde durch Überstimulation versucht, diese zu beenden. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Tiere einer weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen und die Zellen isoliert und untersucht (siehe Kapitel 2.3.1/2.3.2).

Um über eine Kontrollgruppe zu verfügen, wurden einigen Tieren Schrittmachersonden implantiert, es erfolgte bei diesen Tieren jedoch keine Vorhofstimulation. Diese Tiere durchliefen bis auf die Stimulation und die abschließende elektrophysiologische Untersuchung das gleiche Prozedere wie die stimulierten Tiere.

2.2.2 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Versuchstiere mit 75 mg/kg Ketamin (Keta-vet, Pharmacia, Erlangen, D) und 5,8 mg/kg Xylazin (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, D), die jeweils intramuskulär appliziert wurden, analgosediert. Nach angemessener Wartezeit wurde der Thorax eröffnet, und das noch kontrahierende Herz rasch entnommen. Während der Entfernung des Perikard, überschüssiger Gewebereste, und für die Präparation der Aorta ascendens wurde das Herz in calciumhaltiger Tyrode-Lösung aufbewahrt. Danach wurde das Organ zur retrograden aortalen Kanülierung mit PermaHand Seidenfaden an der Langendorff-Apparatur befestigt (siehe Abb 10; Langendorff, 1895).

2.2.3 Isolation und Aufbewahrung der Zellen

Für die Isolation der Vorhofmyokardzellen wurde das Herz an einer Langendorff-Apparatur - gemäß dem Prinzip der retrograden Perifusion unter konstanten Druckverhältnissen - mit unterschiedlichen Lösungen arteriell perfundiert. Zuerst wurde das Organ so lange mit der calciumhaltigen Tyrode-Lösung durchgespült, bis das gesamte Blut ausgewaschen war. Als zweiter Schritt wurde eine Spülung mit calciumfreier Tyrode-Lösung vorgenommen, bis keine Kontraktion der Herzmuskulatur mehr wahrnehmbar war. Nun erfolgte die eigentliche Isolation der Vorhofmyokardzellen mittels enzymatischer Dissoziation. Dafür wurde die calciumfreie Tyrode-Lösung mit Collagenase (Typ CLS II, Biochrom AG, Berlin, D) versetzt und ebenfalls arteriell perfundiert. Die Isolation der Einzelzellen beruht auf der Auflösung des interstitiellen Bindegewebes und der Gap junctions, die das Vorhof- bzw. Kammermyokard jeweils zu einem funktionellen Synzytium machen. Die Entnahme von zellhaltigen Gewebsteilen des linken Atriums erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, um eine möglichst optimale Zellqualität zu erreichen. Nach der Isolation wurden die Zellen in

eine „Kraftbrühe“ genannte Lösung gegeben und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Eigenschaften der Zellen konnten so über 8-10 Stunden konstant gehalten werden.

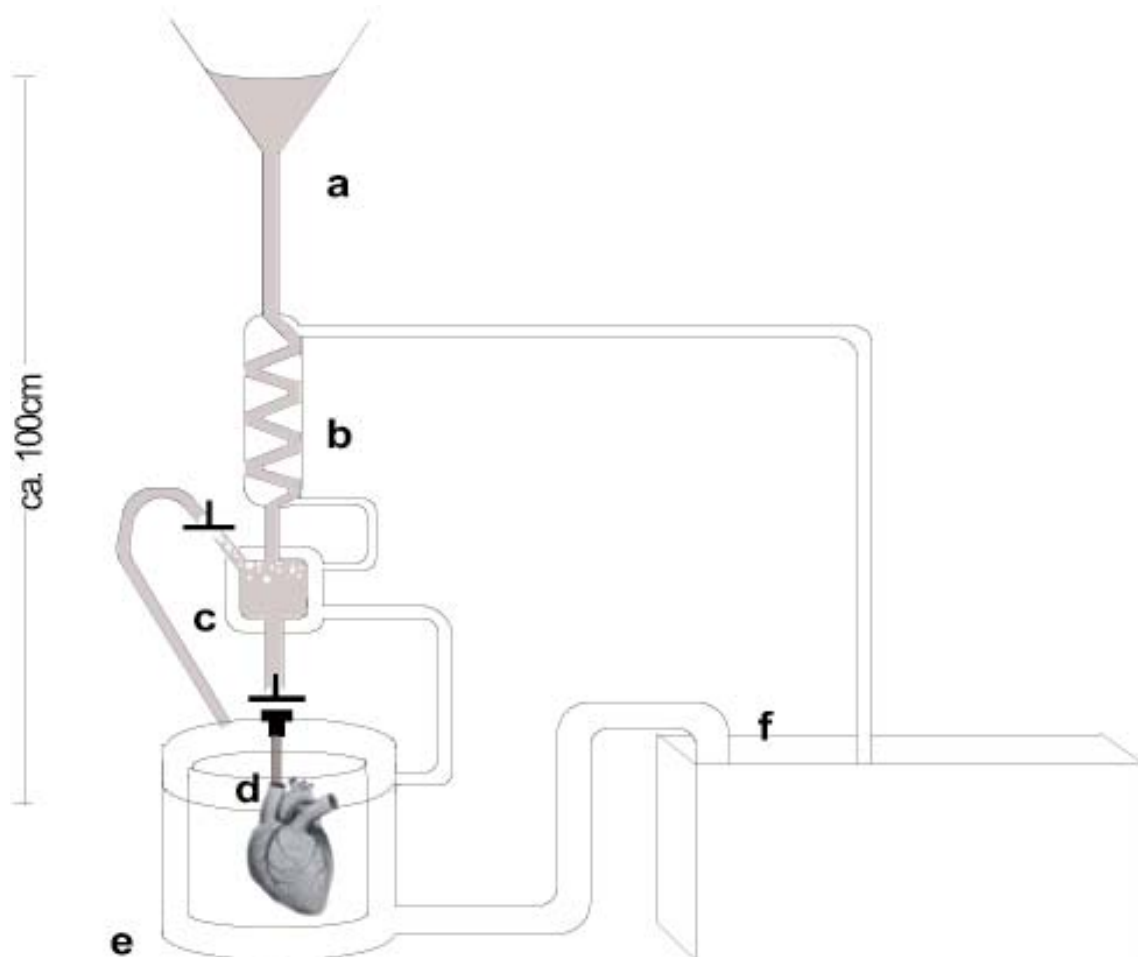


Abbildung 10: Langendorffapparatur zur Isolation von Vorhofmyokardzellen

Mittels der Befestigung der Langendorffssäule in einer Höhe von ca. 100 cm über dem zu perfundierenden Herzen konnte ein konstanter Perifusionsdruck von 800-1000 mmH₂O bzw. 58-73 mmHg erzeugt werden. Das Luftblasenauffanggefäß (c) dient der Verhinderung von Mikroembolien, das zirkulierende Wärmesystem der Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur.

- a...Vorratsgefäß
- b...beheizbarer Schlangenkühler
- c...Luftblasenauffanggefäß („bubble trap“)
- d...Kanüle mit über die Aorta fixiertem Herz
- e...Wärmekammer
- f...zirkulierendes Wasserbad (36-37°C)

2.2.4 Patch-Clamp-Messungen**2.2.4.1 Grundlagen der Patch-Clamp-Technik**

Die Hauptmotivation von Erwin Neher und Bert Sakmann bei der Entwicklung der Patch-Clamp-Technik (Membranflechklemme) bestand darin, Einzelkanalströme aus dem Hintergrundrauschen der Spannungsklemme (voltage clamp) herauszulösen. Mittels einer dünnen vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzten Glaskapillare, die als Elektrode diente, isolierten sie einen einzelnen Flecken (Patch) auf der Zellmembran elektrisch von seiner Umgebung (Neher und Sakmann, 1976). Diese Isolation erreichten Neher und Sakmann durch die Erzeugung eines Abdichtungswiderstandes (Gigaseal), der durch einen Unter-

druck (20-30 mbar) in der Glaspipette erzielt wird und im Bereich von mehreren Gigaohm liegen kann (Hamill et al., 1981). Mithilfe eines negativen Rückkopplungsmechanismus wird das Membranpotential der Zelle konstant auf dem Wert der gewünschten Sollspannung (Kommandospannung) gehalten, indem bei jeder gemessenen Änderung des Membranpotentials ein Kompensationsstrom in die Zelle injiziert wird. Dieser messbare Kompensationsstrom entspricht dem entgegengerichteten Strom, der durch die einzelnen Ionenkanäle der Zellmembran fließt. Für diese Messungen wird ein Strom-Spannungswandler benötigt, mit dessen Hilfe es gelingt, über einen Rückkopplungswiderstand indirekt den Kompensationsstrom zu messen (Numberger und Draguhn, 1996).

2.2.4.2 Durchführung

Die Herstellung der Borsilikatglaspipetten durch einen sog. Universalpuller erfolgte mit dem Ziel, möglichst gleiche Pipetten mit einem Eigenwiderstand von 2,5 bis 5 M Ω zu erhalten. Dabei gilt, dass dickwandige Pipetten mit gleichem Öffnungsdurchmesser größere Widerstände haben als dünnwandige (Numberger und Draguhn, 1996). Als Messelektroden wurden chlorierte Silberelektroden verwendet. An die mit Pipettenlösung (siehe Kapitel 2.1.2.3) befüllte Borsilikatglaspipette, in der sich die Messelektrode befand, wurde ein leichter Überdruck angelegt, um beim Aufsuchen der Zelle im auf 37°C geheizten Bad zu vermeiden, dass die Öffnung der Pipette mit Zelltrümmern oder sonstigen Geweberesten verunreinigt bzw. verstopft wird. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran wird ein leichter Unterdruck erzeugt, um einen Gigaseal zu erhalten und durch einen weiteren Impuls den Übergang vom „Cell-Attached“- in den „Whole-Cell“-Modus zu erreichen. Dabei wird ein dichter Abschluss zwischen der Pipette und der Zellmembran hergestellt, um dann innerhalb der Pipettenöffnung einen Flecken („patch“) aus der Membran herauszureißen. Durch diese Membranöffnung ist ein Ionen- und Flüssigkeitsaustausch zwischen Pipettenlösung und Intrazellularflüssigkeit möglich, wobei die Gefahr der „Auswa-

schung“ der Intrazellularflüssigkeit besteht (Pusch und Neher, 1988). Nach Kompensation des Serienwiderstandes und zweimaliger Messung der Ca-Ströme (jeweils nach fünf und acht Minuten) wurde die 10nM ANP-Tyrode-Lösung eingespült (sogenannter „wash-in“) und nach weiteren zwei beziehungsweise fünf Minuten die Ca-Ströme gemessen.

2.2.4.3 Zellmembrankapazität und Serienwiderstand

Um die Spannung, die einer Zelle anliegt, sprunghaft ändern zu können, muss zuerst die Fläche der Zellmembran, die in diesem Experiment wie ein Kondensator mit parallelgeschaltetem Membranwiderstand R_m wirkt, vollständig umgeladen werden. Dies führt zu einem Zeitverzug in der Stromapplikation durch den Verstärker.

Die Zellmembrankapazität C_m (siehe Formel 1) ist proportional zur Zellgröße und lässt die Möglichkeit der indirekten Zellgrößenbestimmung zu.

$$C_m = I_{\max} \cdot \tau / U$$

C_mKapazität der Zellmembran

I_{\max}kapazitiver Ladestrom

τexponentielle Zeitkonstante

USpannungspuls

[Formel 1]

Die somit errechnete Zellgröße erlaubt nun die Bestimmung der Stromdichte mittels Formel 2, und ermöglicht es somit auch, die gemessenen Stromstärken, die von der Zelloberfläche abhängig sind, in ein Verhältnis zueinander zu setzen.

$$\text{Stromdichte} = I / C_m$$

I.....gemessene Stromamplitude

C_m.....Kapazität der Zellmembran bzw. Größe der Zelloberfläche

[Formel 2]

Der limitierende Faktor für die Ladegeschwindigkeit des Kondensators ist der Serienwiderstand R_s , der durch die Größe der Pipettenöffnung gebildet wird. Theoretisch entspricht er dem Pipettenwiderstand R_{Pip} , allerdings nimmt er in der Praxis, durch Membranbestandteile und Zellorganellen im Bereich des „Patches“ bedingt, deutlich höhere Werte an, die bis hin zu einer Verdoppelung des Pipettenwiderstandes reichen können. Dieser erhöhte Widerstand R_s führt nun zu dem sogenannten „voltage drop“, dem Abfallen der geklemmten Sollspannung vor dem Erreichen der Zelle und somit auch zu verfälschten Messergebnissen (Numberger und Draguhn, 1996). Das Ohmsche Gesetz erlaubt die Berechnung des „voltage drops“:

$$R_s = U_{\text{voltage drop}} / I_{\text{mess}} \Leftrightarrow U_{\text{voltage drop}} = R_s \cdot I_{\text{mess}}$$

$U_{\text{voltage drop}}$ Spannungsabfall „voltage drop“

R_s Serienwiderstand

I_{mess} gemessener Strom durch einen Ionenkanal

[Formel 3]

Sowohl für die durch die Zellmembrankapazität als auch für die durch den Serienwiderstand verursachten Messfehler bzw. Verzögerungen gibt es Kompensationsmöglichkeiten: Bei der Kapazitätskompensation wird das Erscheinen des Transienten-Strom-Signals im Strom-Spannungswandler dadurch vermieden,

dass dieser Strom über einen zweiten Eingang in die Pipette gespeist wird. Die Kompensation des Serienwiderstandes wird durch die Addition eines zum jeweils injizierten Strom proportionalen Anteils zur Kommandospannung erreicht (Numberger und Draguhn, 1996).

Durch ein hinreichend negatives Haltepotential wird ein gleichzeitiges Versetzen möglichst aller Kanäle in den aktivierbaren Zustand erreicht.

2.2.4.4 Verwendete Spannungsprotokolle

Folgende Spannungsprotokolle wurden für die Aufzeichnung des $I_{Ca,L}$ -Stromes und zur Bestimmung der Zellmembrankapazität verwendet (Abb.11 und 12):

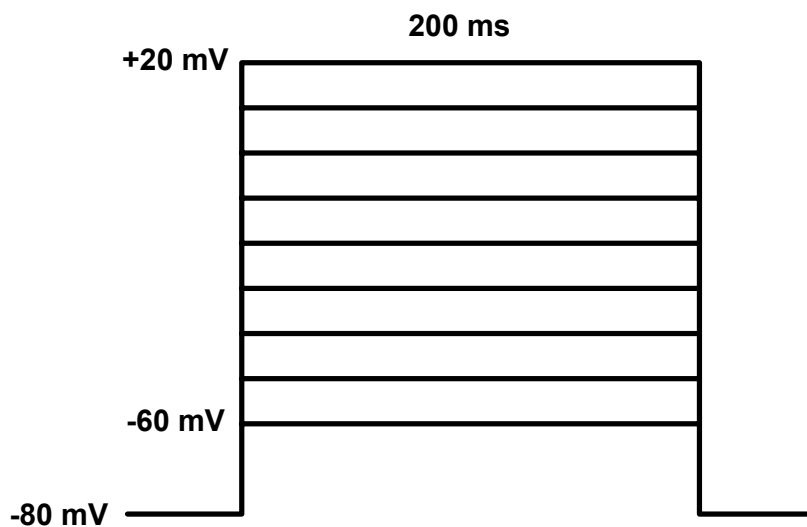


Abbildung 11: **Spannungsprotokoll für die Messung des $I_{Ca,L}$ -Stromes**

Das Haltepotential lag bei -80 mV. Ausgehend davon wurden die Zellen für je 200 ms auf -60 mV bis $+20$ mV depolarisiert.

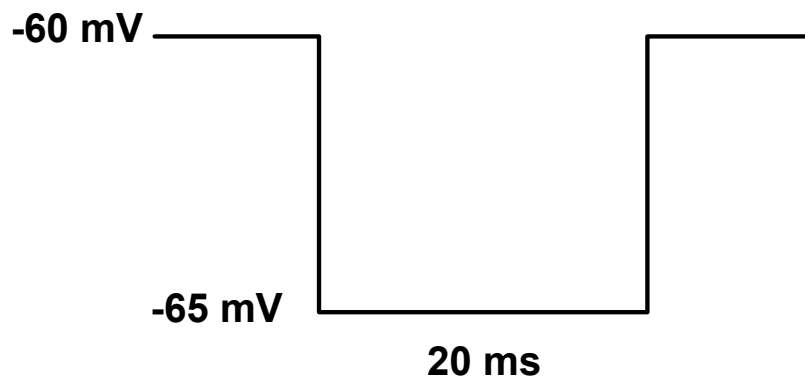


Abbildung 12: **Spannungsprotokoll zur Messung der Zellmembrankapazität**

Das Haltepotential war bei dieser Messung mit -60 mV angelegt. Es erfolgte nun ein einzelner 20 ms andauernder Spannungsimpuls von -65 mV.

2.2.5 Datenauswertung und Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden, falls nicht anders beschrieben, als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of Mean) angegeben. Die Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten wurde mit „n“ angegeben.

Die Werte wurden mit dem gepaarten Student t-Test auf statistische Signifikanz geprüft und nur Werte für $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Wenn aufgrund der Versuchskonstellation der gepaarte t-Test nicht anwendbar war, wurden die Ergebnisse mittels eines Two Way Analysis of Variances (=Two-Way-ANOVA) auf Signifikanz geprüft und ebenfalls nur Werte mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

Mittels Extrapolation der Messwerte vor Applikation der Substanz konnte ein gelegentlich auftretender Rundown-Effekt rechnerisch eliminiert werden. Somit konnte eine „bereinigte“ Differenz der Stromdichten vor und nach Einwaschen der untersuchten Substanz gebildet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellmembrankapazität

Die Zellmembrankapazität errechnet sich aus Formel 1. Der durchschnittliche Wert für die Zellmembrankapazität betrug $85,4 \pm 9,23$ pF bei einer Streuung von 44,07 pF bis zu 211,92 pF. Hierbei war allerdings ebenso wenig ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zellgruppen wie eine einheitlich signifikante Verteilung der Zellgrößen zu beobachten.

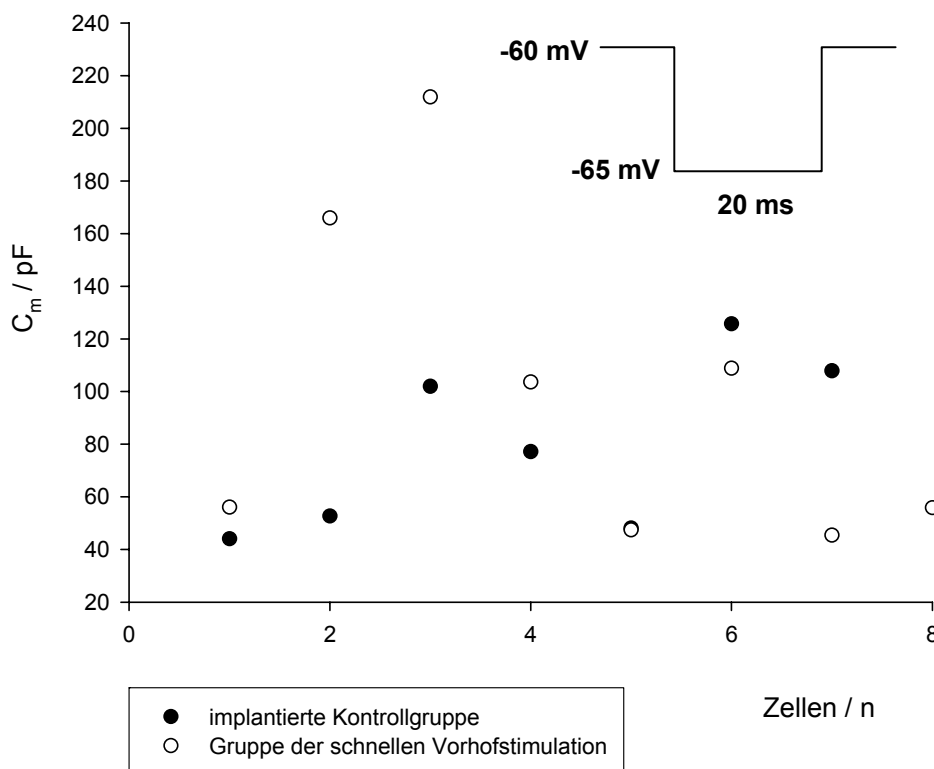


Abbildung 14: **Zellmembrankapazitäten der einzelnen Kardiomyozyten**

Der für die Errechnung der Membrankapazität notwendige Spannungspuls ist in der rechten oberen Ecke dargestellt.

3.2 Wirkung von ANP auf den kardialen L-Typ Ca^{2+} -Kanal

Ausgehend von einem hinreichend negativen Haltepotential $V_H = -80$ mV, das alle Kanäle in den aktivierbaren Zustand versetzte, wurden die Vorhofmyokardzellen gemäß dem Spannungsprotokoll (siehe Abb.11) für jeweils 200 ms auf Spannungen von -60 mV bis $+20$ mV geklemmt und die dabei entstehenden Einwärtsströme durch den L-Typ Calciumkanal aufgezeichnet.

3.2.1 Kontrollgruppe (Sham)

Hier werden nun die Ergebnisse der Zellen aufgeführt, die aus den Tieren stammen, denen zwar Schrittmacher implantiert, jedoch kein Vorhofflimmern induziert wurde. Sie werden im Folgenden „sham“ genannt.

Die Originalaufzeichnungen des $I_{\text{Ca,L}}$ -Stromes einer einzelnen ausgewählten Zelle vor (Abb. 15) und nach (Abb. 16) Einwaschen (*wash-in*) von 10 nMol/l ANP zeigen eine deutliche Abnahme der Stromamplitude. Das Maximum vor *wash-in*, das bei einer Spannung von $+10$ mV erreicht wird, beträgt ungefähr -770 pA. Nach fünfminütigem Einwaschen der Substanz wurde - bei einer auf $+10$ mV geklemmten Spannung - eine maximale Stromamplitude von ungefähr -500 pA gemessen. Dies entspricht einer Reduktion des I_{Ca} -Stromes nach *wash-in* von 10 nMol/l ANP um knapp -30% .

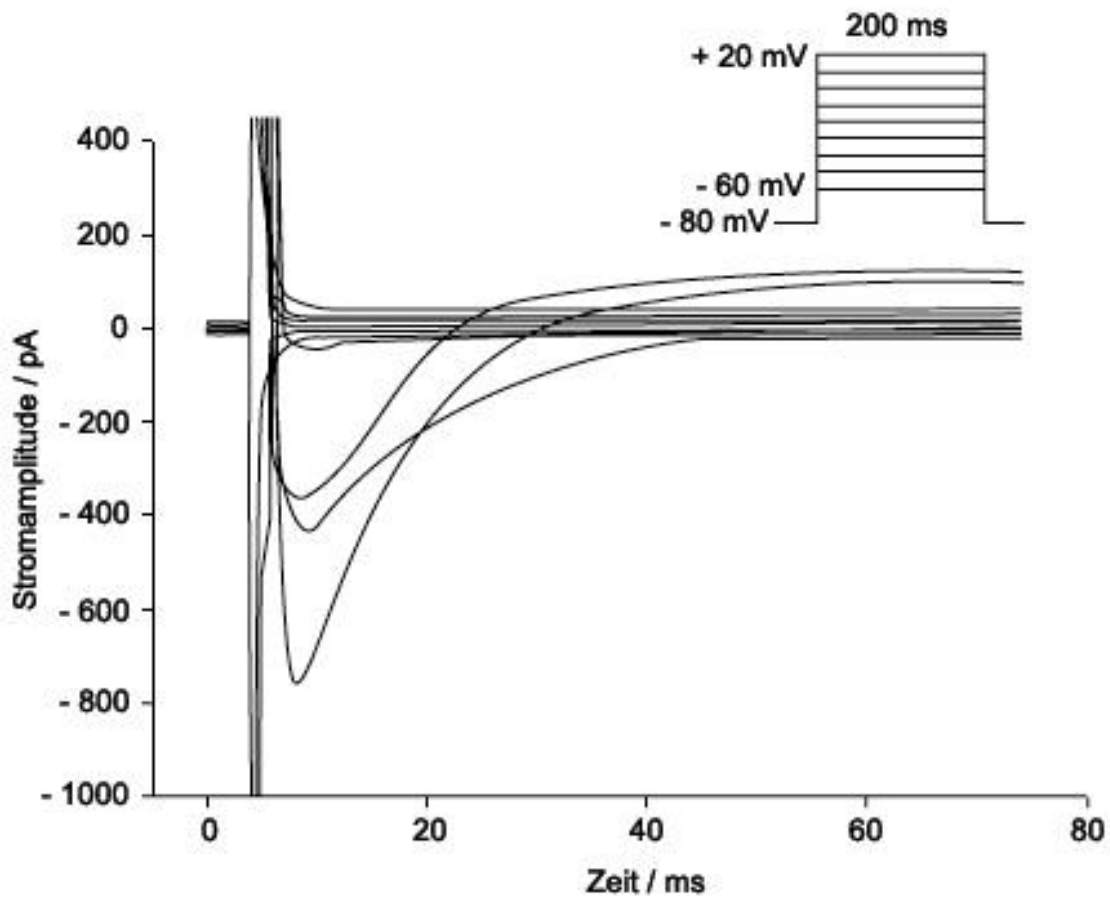


Abbildung 15: **Originalaufzeichnung eines I_{Ca}-Stromes vor dem Einwaschen von 10 nMol/l ANP-Lösung**

Die Auslösung der Ströme erfolgte gemäß dem Spannungsprotokoll in der rechten oberen Ecke der Abbildung. Es wird eine Zelle der Kontrollgruppe (sham) dargestellt.

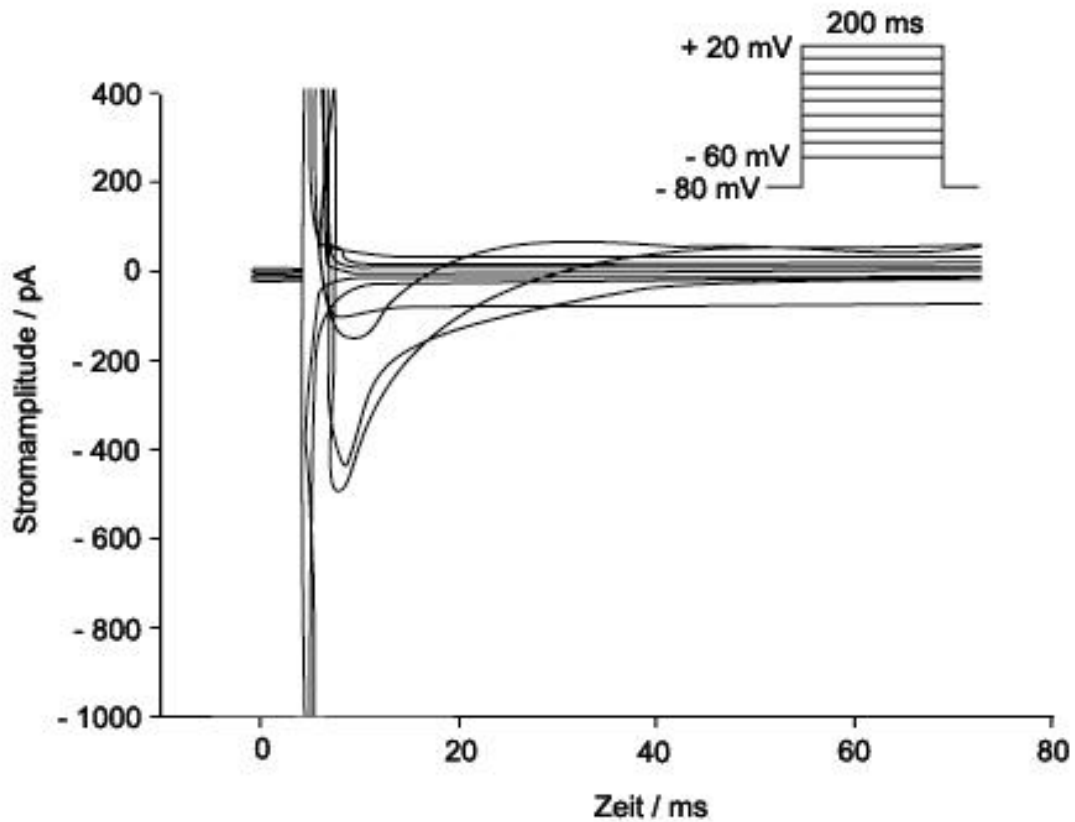


Abbildung 16: **Originalaufzeichnung eines I_{Ca} -Stromes nach fünfminütigem Einwaschen von 10 nMol/l ANP**

Die Auslösung der Ströme erfolgte gemäß dem Spannungsprotokoll in der rechten oberen Ecke der Abbildung. Dargestellt wird wieder dieselbe Zelle wie in Abbildung 15.

Die Auswertung der $I_{Ca,L}$ -Ströme mehrerer Zellen ($n=7$) ergab eine deutliche Abnahme der Stromamplitude nach Superfusion mit 10 nMol/l ANP. Der durchschnittliche Wert der maximalen Stromamplitude, die bei einer geklemmten Spannung von 10 mV gemessen wurde, betrug vor Applikation der Substanz $820,07\text{pA} \pm 161,13\text{ pA}$. Nach fünfminütiger Superfusion mit 10 nMol/l ANP be-

trugen die gemessenen Werte der maximalen Stromamplitude $534,60 \text{ pA} \pm 84,96 \text{ pA}$.

Ein Vergleich der unterschiedlich großen Zellen wird erst durch die Ermittlung der Stromdichte möglich (siehe Methodenteil Kapitel 2.2.3.3). Die durchschnittliche Stromdichte vor *wash-in* der ANP-Lösung betrug $-12,39 \text{ pA/pF} \pm 3,07 \text{ pA/pF}$. Nach Superfusion mit der 10 nMol/l ANP-Lösung über fünf Minuten, konnten für diese Zellen Werte von $-8,78 \text{ pA/pF} \pm 2,25 \text{ pA/pF}$ ermittelt werden. Die Abnahme des Betrages der Stromdichte beläuft sich, wie in Abbildung 17 dargestellt, auf $29,1 \%$.

Im Laufe der Versuchsdauer erfährt die Zelle eine physiologische Reduktion ihrer Stromdichte, den sogenannten Rundown. Um hierdurch verfälschte Ergebnisse für die Reduktion der Stromdichte nach Applikation der untersuchten Substanz auszuschließen, wurde für jede einzelne Zelle eine Korrektur des Rundown, der als linear betrachtet werden darf, durchgeführt. Mittels Extrapolation mehrerer Messwerte zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Substanzapplikation wurde eine Gerade errechnet, deren Schnittpunkt mit dem x-Wert, der dem Zeitpunkt der Substanzapplikation entspricht, ergab den bereinigten Ausgangswert für den Vergleich der Stromdichten vor und nach Substanzapplikation.

Implantierte Kontrollgruppe (Sham)

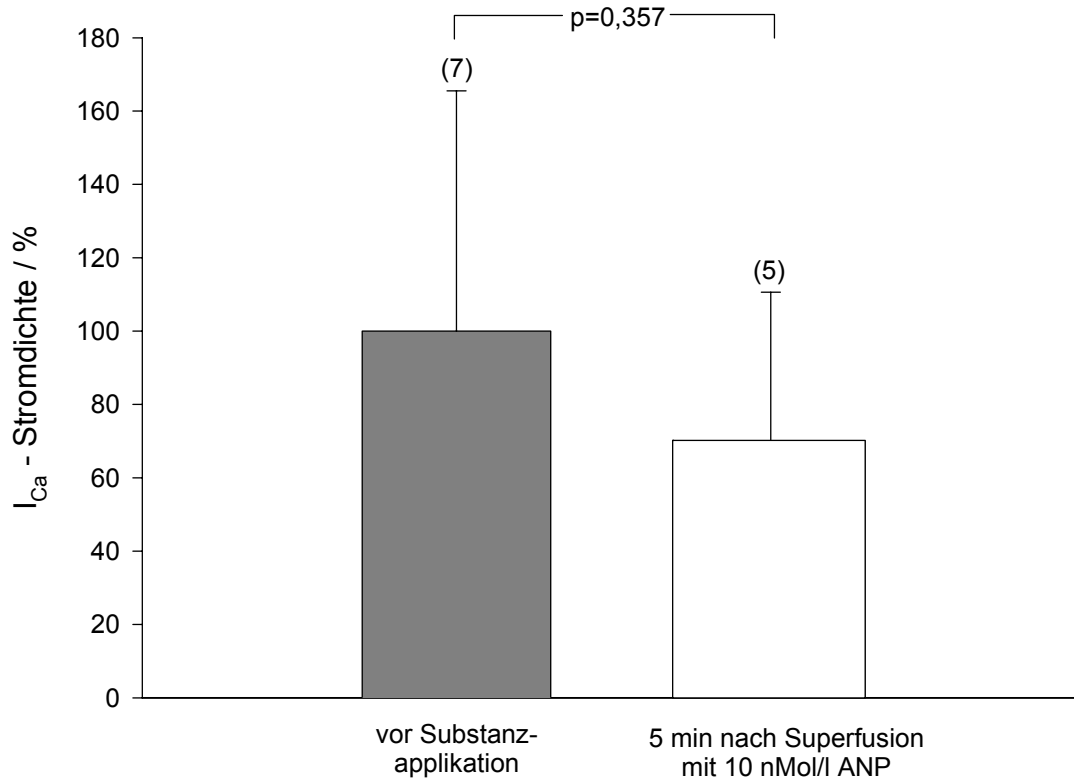


Abbildung 17: Verringerung der maximalen I_{Ca} - Stromdichten fünf Minuten nach Applikation (wash-in) von 10 nMol/l ANP (Zellen der Kontrollgruppe)

Der Betrag der Stromdichte weist nach Applikation der Substanz noch 70,9 % der anfänglichen Stromdichte auf. $p = 0,357$, $n=7$ bzw. $n=5$

Trägt man alle Stromdichten gegen die entsprechend geklemmten Spannungen auf, ergibt sich ein Stromspannungsdiagramm, aus dem deutlich wird, dass eine spannungsabhängige Reduktion der Stromamplitude bzw. Stromdichte zwischen den Spannungspulsen $U = -10$ mV und $U = +20$ mV erfolgte (Abb. 18).

implantierte Kontrollgruppe (Sham)

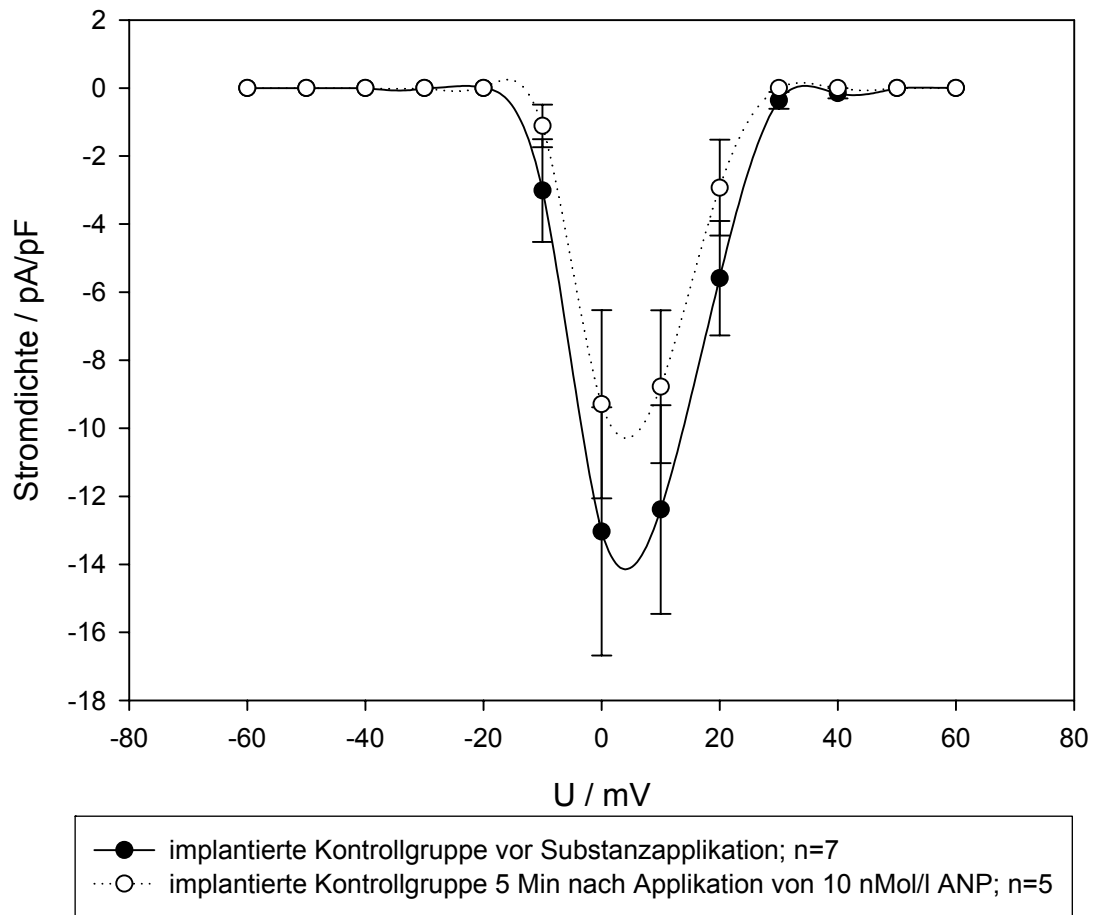


Abbildung 18: **Stromspannungsdiagramm der implantierten Kontrollgruppe**

für die Spannungspulse von -60 mV bis $+60$ mV vor bzw. nach Zugabe von 10 nMol/l ANP.

3.2.2 Gruppe mit schneller Vorhofstimulation (atriales Pacing)

Stellte man einen Vergleich zwischen stimulierten Kardiomyozyten vor der Applikation von 10 nMol/l ANP und fünf Minuten nach der Superfusion mit dieser ANP-Lösung an, so ergab sich eine signifikante Abnahme der Stromdichte zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Abb. 19). Die maximale Amplitude der Stromdichte verringerte sich signifikant von $-5,59 \pm 0,65$ pA/pF um 75,9 % auf $-1,35 \pm 0,37$ pA/pF.

Gruppe der schnellen Vorhofstimulation (atriales Pacing)

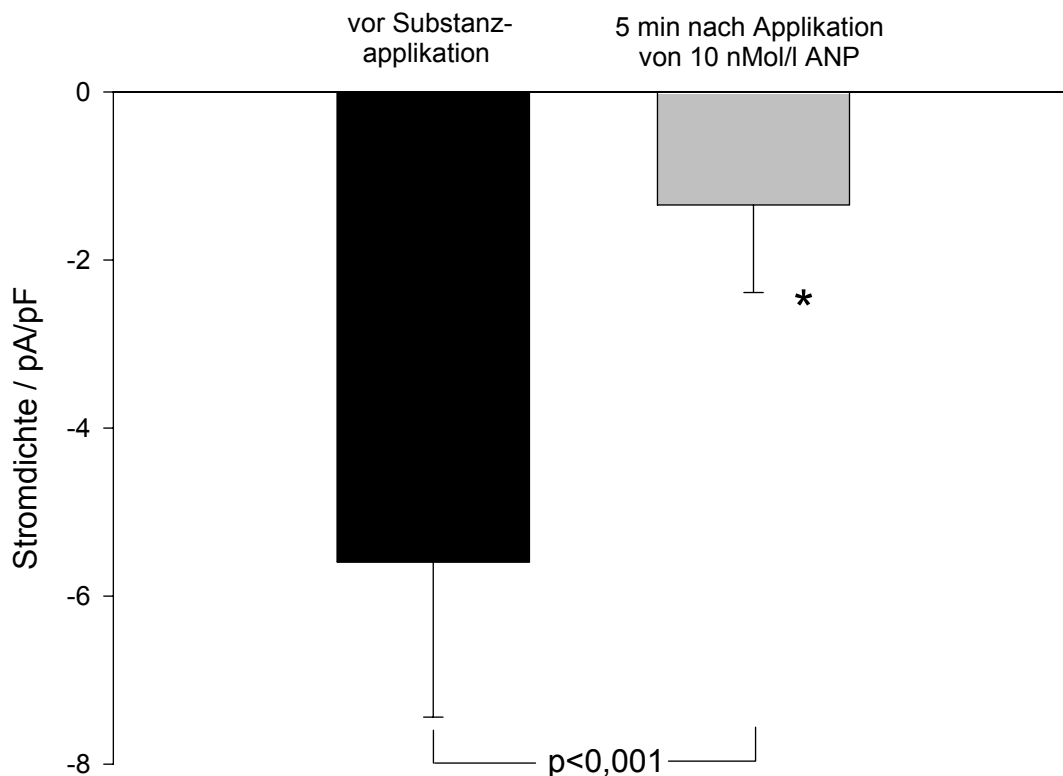


Abbildung 19: Verringerung der maximalen Stromdichte von Zellen der schnellen Vorhofstimulation (Pace) nach Applikation von 10 nMol/l ANP

Die maximale Amplitude der Stromdichte wurde bei einer Spannung von + 10mV erreicht. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt. n = 8, p < 0,001.

Das Stromspannungsdiagramm der durch Vorhofflimmern in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften beeinflussten atrialen Kardiomyozyten weist eine deutlich sichtbare Diskrepanz zwischen den Stromdichten vor Applikation der 10 nMol/l-ANP-Lösung und den Werten nach Superfusion auf. Die Reduktion der maximalen Amplitude um 75,9% in Abbildung 20 ist offensichtlich.

Gruppe der schnellen Vorhofstimulation (atriales Pacing)

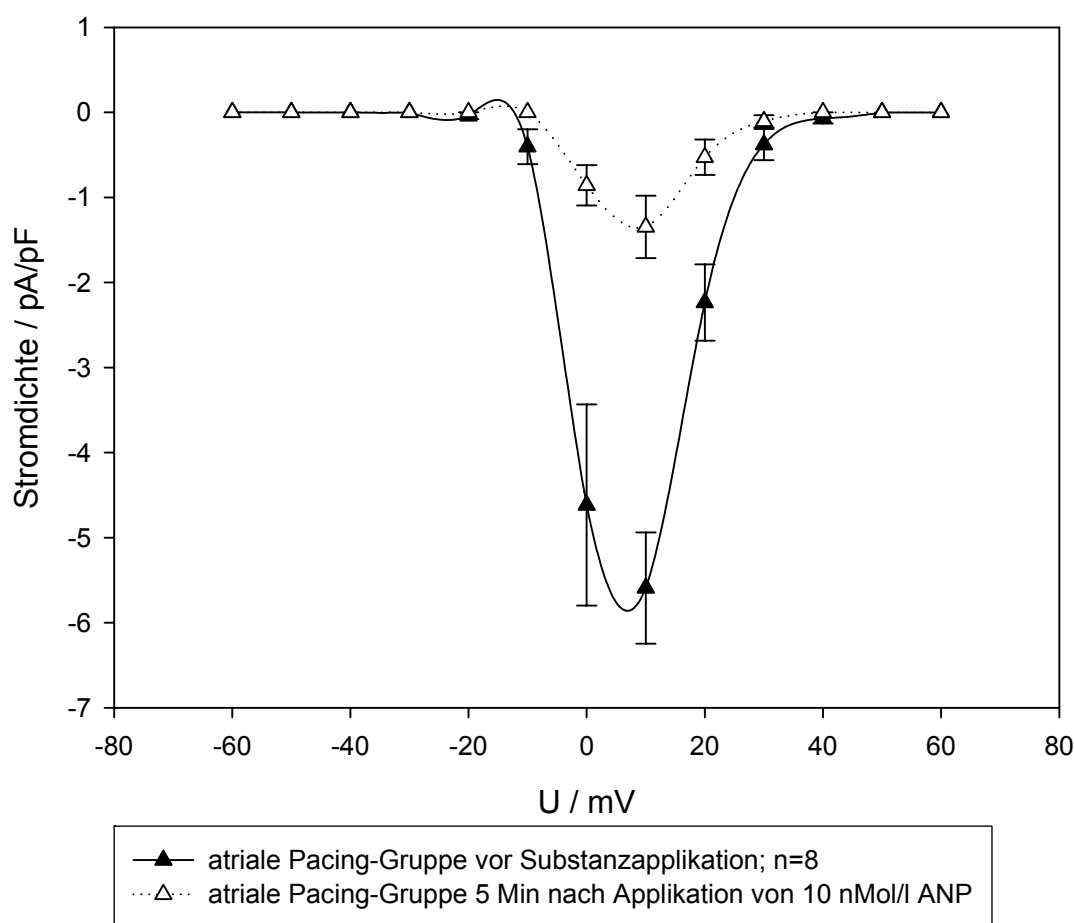


Abbildung 20: **Stromspannungsdiagramm von stimulierten atrialen Kardiomyozyten**

Die signifikante Abnahme der maximalen Stromdichte bei einer Spannung von + 10 mV offenbart sich auch bei Spannungspulsen von –10 mV bis einschließlich + 30 mV. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt. n=8

3.3 Folgen der schnellen Vorhofstimulation

Die schnelle Vorhofstimulation (atriales Pacing) bewirkt auch schon nach der kurzen Zeit von 24 Stunden eine Änderung der elektrophysiologischen Eigenschaften der atrialen Kardiomyozyten.

3.3.1 Vor Applikation von ANP

Ein direkter Vergleich der I_{Ca} -Ströme vor dem Einwaschen der Substanz ANP erlaubt eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Stromdichten. Für die Spannungspulse von -60 mV bis $+60$ mV, die gemäß dem Spannungsprotokoll, das bereits in Kapitel 2.2.3.4 erläutert wurde, aufgezeichnet wurden, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Stromdichten innerhalb der Gruppe der stimulierten atrialen Kardiomyozyten.

Vor Applikation der untersuchten Substanz

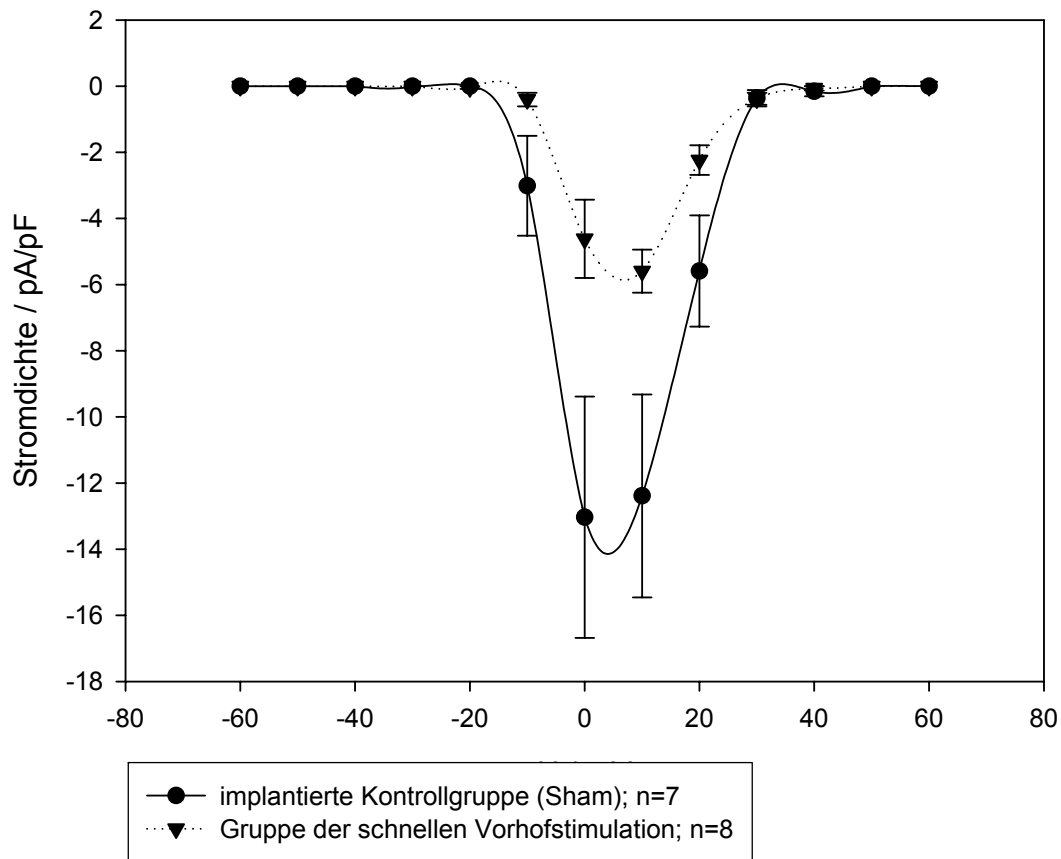


Abbildung 21: **Stromspannungsdiagramm zum Vergleich der Auswirkung von atrialem Pacing auf Kardiomyozyten des Vorhofes.**

Es wurden die implantierte Kontrollgruppe (Sham) sowie die Gruppe der schnellen Vorhoffstimulation (Pace) vor dem Einwaschen von 10 nMol/l ANP miteinander verglichen.

Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Two way ANOVA-Testes. $p=0,002$

Die statistisch signifikante Herabsetzung der durchschnittlichen Stromdichte von Vorhofkardiomyozyten nach atrialem Pacing bewegte sich im Bereich von - 55%. Die Gruppe der schnellen Vorhofstimulation wies bei einem Spannungspuls von $U = 10 \text{ mV}$ ein absolutes Maximum der durchschnittlichen Stromdichte von $- 5,59 \pm 0,65 \text{ pA/pF}$ auf. Der Maximalwert der Kontrollgruppe im Bereich dieser Spannung lag bei $-12,39 \text{ pA/pF} \pm 3,07 \text{ pA/pF}$. Ihr absolutes Maximum erreichte die Kontrollgruppe mit $-13,03 \pm 3,65 \text{ pA/pF}$ allerdings bei einer angelegten Spannung von 0 mV .

3.3.2 Nach Applikation von ANP

Der signifikante Unterschied zwischen der Kontroll- und der Vorhofflimmergruppe wurde bei der Betrachtung der ANP-Wirkung auf die beiden verschiedenen Gruppen noch ausgeprägter. Während die Kontrollgruppe der Zellen von den operierten aber nicht stimulierten Tieren nach fünfminütiger Superfusion mit 10 nMol/l ANP einen Rückgang der Stromdichte auf $- 8,78 \text{ pA/pF} \pm 2,25 \text{ pA/pF}$ zeigte, wurden bei den Zellen der stimulierten Tiere nur noch Werte von $- 1,35 \pm 0,37 \text{ pA/pF}$ gemessen ($p < 0,002$). Das bedeutet eine Differenz der Stromdichten der beiden unterschiedlichen Zellgruppen um mehr als 80 Prozentpunkte bezogen auf den Wert der nicht stimulierten Gruppe (Abb. 22).

Nach fünfminütiger Applikation von 10 nMol/l ANP

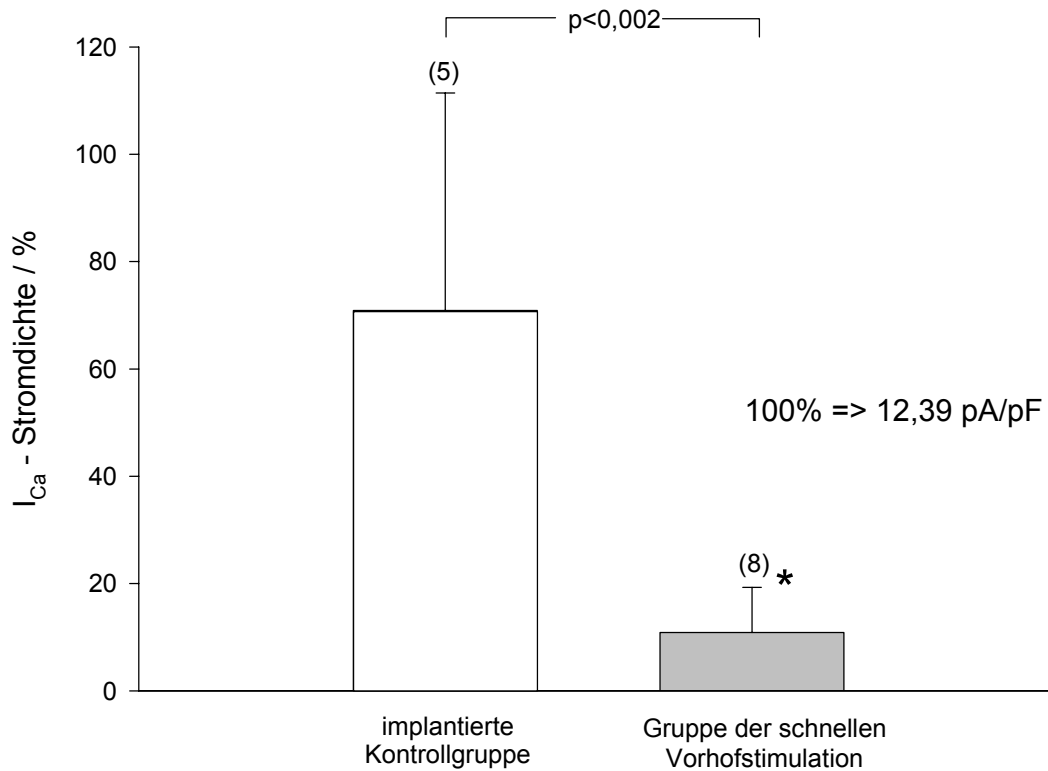


Abbildung 22: Differenz der maximalen $I_{Ca,L}$ - Stromdichte zwischen Zellen der Kontroll- und Vorhofflimmergruppe

Werte bezogen auf Ausgangswert der KontrollgruppENZellen (100% => 12,39 pA/pF). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe eines Two way ANOVA-Tests ermittelt. Die Anzahl der Zellen ist in Klammern über den jeweiligen Balken dargestellt.

Die Darstellung der Stromspannungskurve zeigt eine stark abgeflachte Kurve für die Gruppe der Zellen, die 24-stündigem Vorhofflimmern ausgesetzt waren (Abb. 23). Ihre maximale Stromdichte lag ebenso wie vor Applikation von 10

nMol/l ANP bei $U = +10$ mV. Ebenso keine Veränderung seiner Lage zeigt das Maximum der Kontrollgruppe, das wiederum bei $U = 0$ mV zu finden ist.

Nach fünfminütiger Applikation von 10 nMol/l ANP

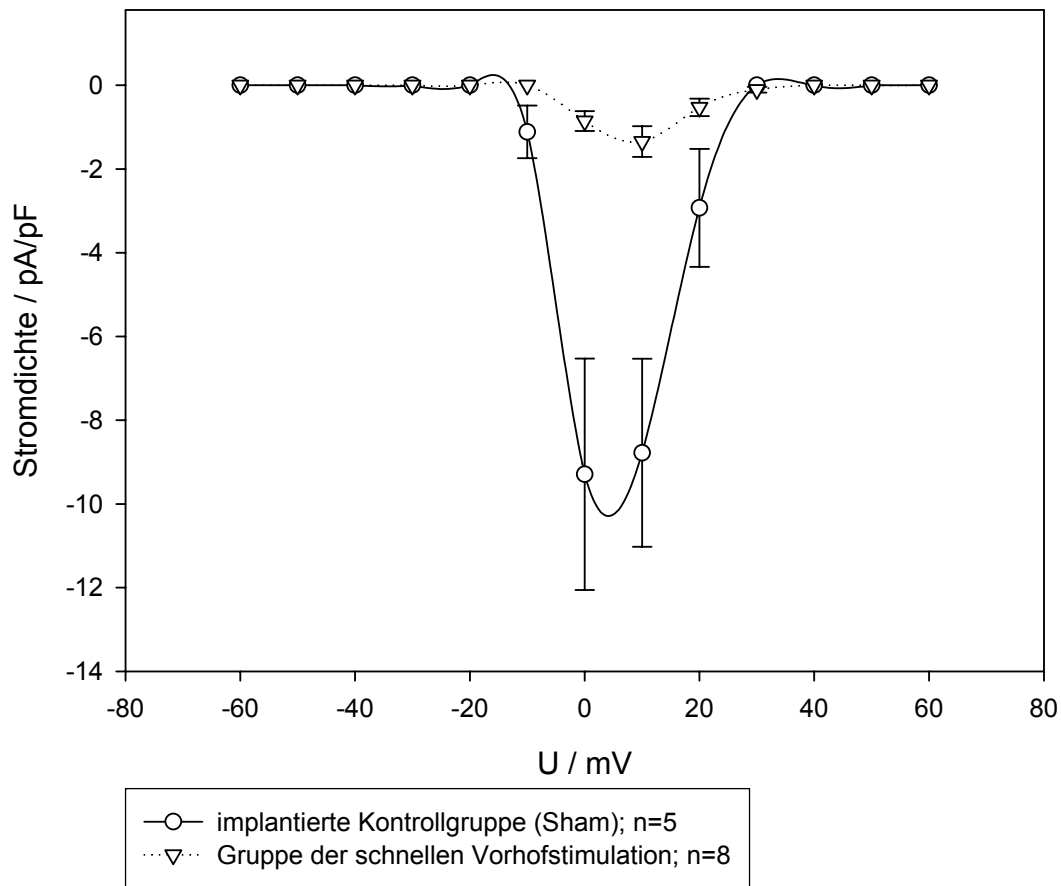


Abbildung 23: **Stromspannungskurve für die Zellen der Kontroll- bzw. Vorhofflimmergruppe nach Applikation von 10 nMol/l ANP über fünf Minuten**

Die statistisch signifikante Differenz der beiden Gruppen wurde mittels Two-Way-ANOVA ermittelt.

3.4 Vergleich aller vier Versuchsgruppen

Um alle vier Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die Stromdichten der Kontroll- bzw. Vorhofflimmergruppe jeweils vor und nach der Applikation von 10 nMol/l ANP gegen die jeweils „geklemmte“ Spannung aufgetragen (Abb. 24). Um einen besseren Vergleich der Verhältnismäßigkeiten zu ermöglichen, wurden die Werte gegen den höchsten Wert normalisiert und gegen Eins aufgetragen (Abb. 25).

Die Abklärung der statistischen Signifikanz erfolgte wiederum mithilfe eines „Two-Way-ANOVA“.

Kontroll- und atriale Pacing-Gruppe vor bzw. nach
Applikation von 10 nMol/l ANP

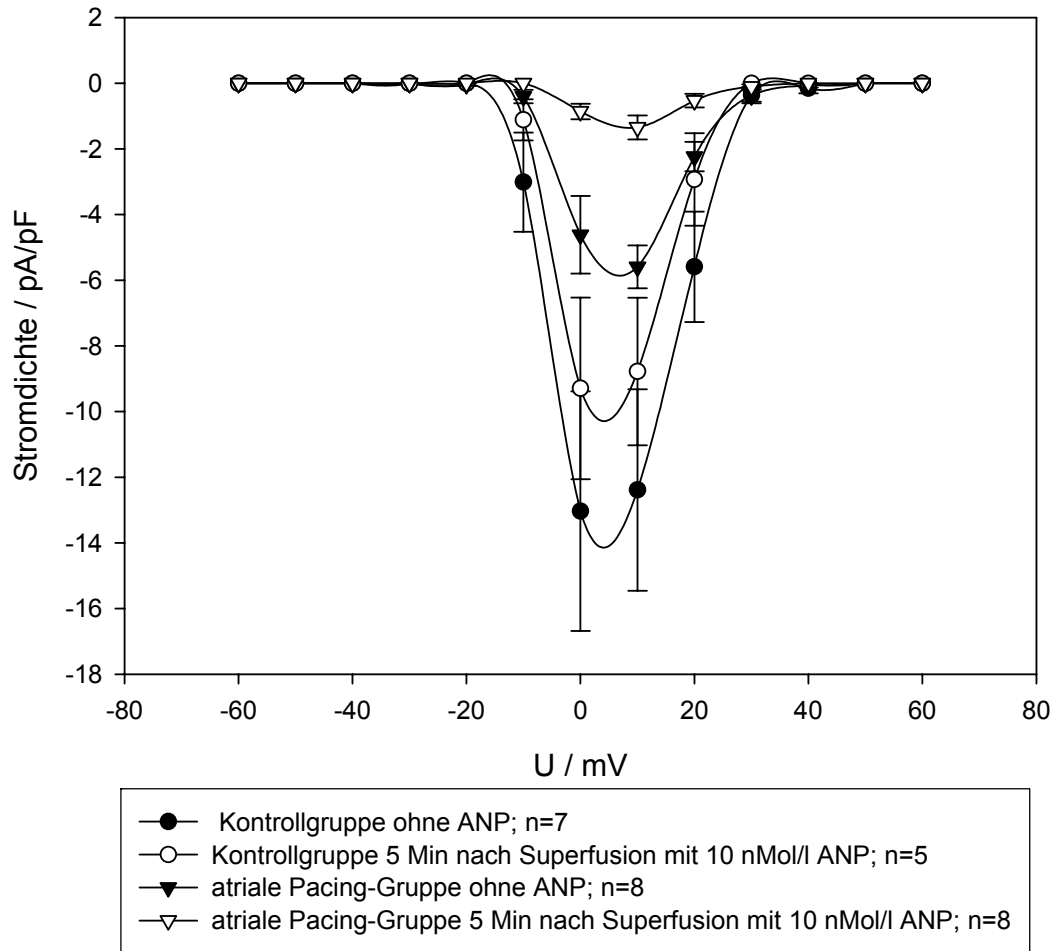


Abbildung 24: Stromspannungsdiagramm der vier Versuchsgruppen:

In der Abbildung wurden die unterschiedlichen Stromdichten der einzelnen Gruppen aufgetragen. Die Zellen der implantierten Kontrollgruppe haben ihr absolutes Maximum bei einer Spannung von ± 0 mV. Der höchsten Wert findet sich mit $13,03 \pm 3,65$ pA/pF bei den Zellen der Kontrollgruppe vor Superfusion. Es folgt die Kontrollgruppe nach Substanzapplikation mit $9,29 \pm 2,77$ pA/pF. Für Vergleiche der vier Gruppen wurden die Werte bei einer Spannung von $+ 10$ mV herangezogen, welche bei $12,39 \pm 3,07$ pA/pF bzw. $8,78 \pm 2,25$ pA/pF lagen. Einen weit geringeren Wert weisen die gepaceten Kardiomyozyten bei vor ANP-Gabe mit $5,59 \pm 0,65$ pA/pF auf. Die Gruppe mit der stärksten Reduktion der Stromdichte ist letztlich die atriale Pacing-Gruppe nach fünfminütiger Superfusion mit 10 nMol/l ANP, hier wurden nur noch $1,35 \pm 0,37$ pA/pF gemessen. Die absoluten Maxima dieser Gruppen lagen bei $+ 10$ mV.

Stromdichten-Spannungs-Diagramm aller Gruppen mit normalisierten Werten

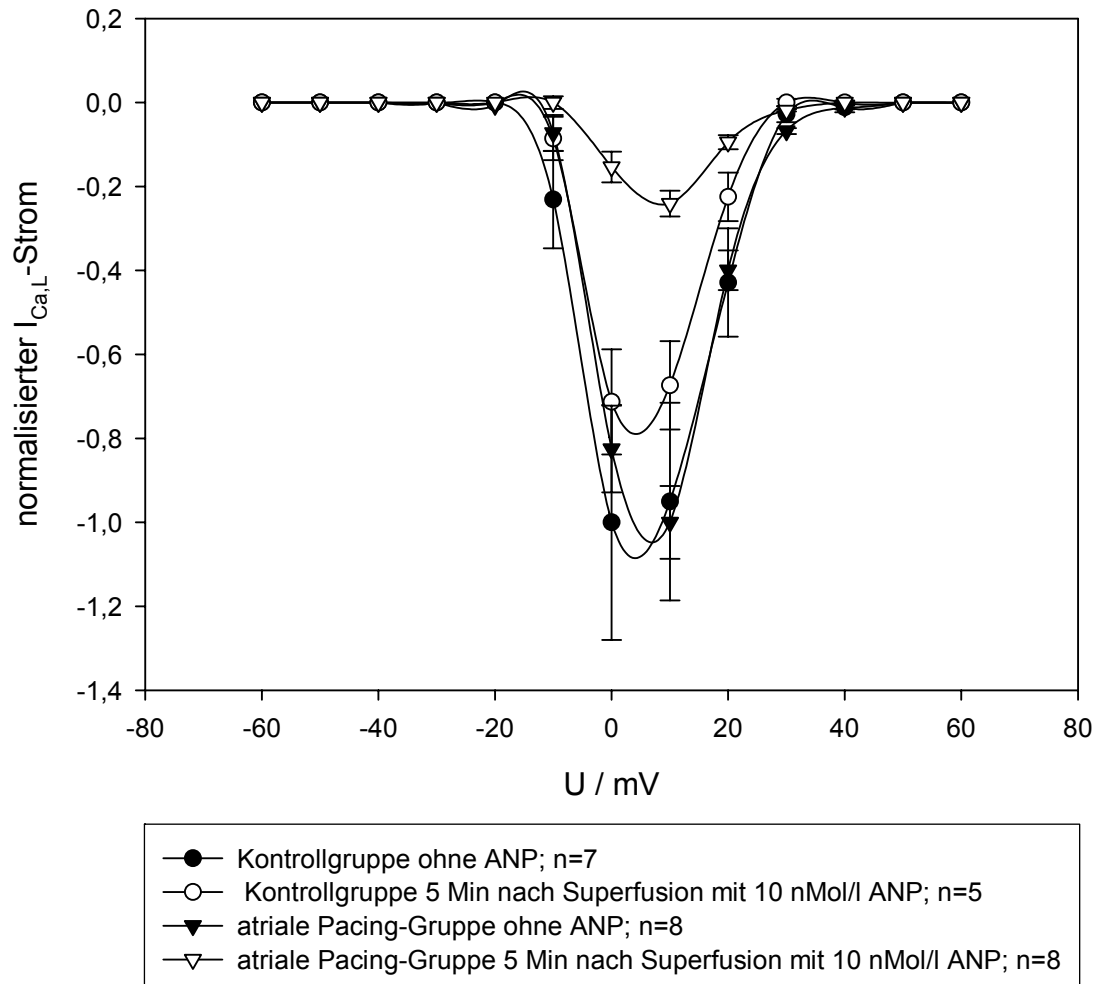


Abbildung 25: **normalisiertes Stromspannungsdiagramm der vier Versuchsgruppen.**

Werden die gemessenen Ergebnisse auf das jeweilige Maximum vor Applikation von 10nM/l ANP bezogen, ergibt sich unabhängig von der angelegten Spannung ein deutlicher Unterschied in der Reduktion. Die Gruppe der gepaceten Kardiomyozyten erfährt eine weit stärkere Reduktion ihrer Stromdichte als die Kontrollgruppe. Bei ihr ist der ANP-Effekt weit weniger stark ausgeprägt.

Die Kontrollgruppe vor Applikation von 10 nMol/l ANP besitzt die größte maximale Stromamplitude der vier Versuchsgruppen. Ihr folgt die Kontrollgruppe nach fünfminütiger Applikation von 10 nMol/l ANP, deren maximale Stromamplitude auf $70,9 \pm 18,2\%$ reduziert ist. An dritter Stelle steht die Gruppe, die die stimulierten Kardiomyozyten beeinhaltet; diese Zellen wurden nicht mit Substanz versetzt. Ihre maximale Amplitude des I_{Ca} –Stromes beträgt noch $45,1 \pm 5,2\%$ verglichen mit der Kontrollgruppe. Interessanter ist allerdings die Stromdichtenreduktion der Zellen, die von den Tieren stammen, die über 24 Stunden unter „Vorhofflimmerbedingungen“ gehalten wurden. Im Vergleich zu den Werten vor Superfusion mit 10 nMol/l ANP sind sie nach fünfminütiger Applikation auf $24,1\% \pm 6,6\%$ des Ausgangswertes reduziert (Abb. 26).

Implantierte Kontrollgruppe und gepacete Kardiomyozyten vor und nach Applikation von 10 nMol/l ANP

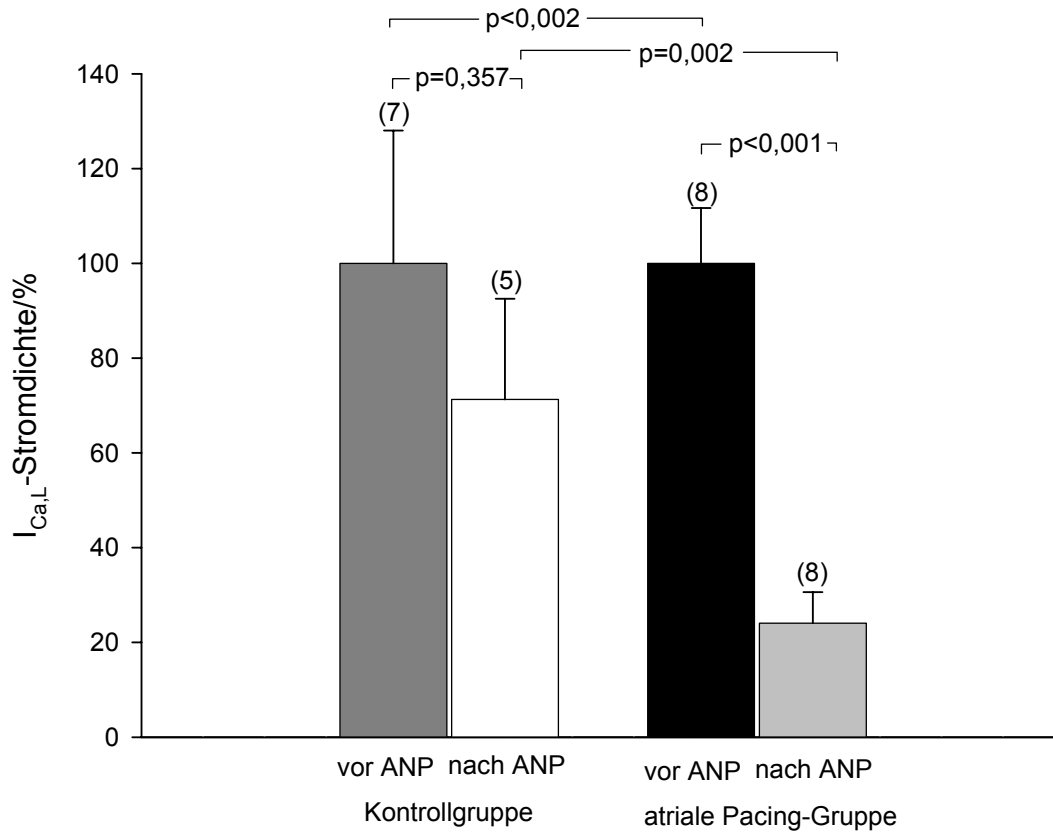


Abbildung 26: Vergleich der Versuchsgruppen vor und fünf Minuten nach Applikation von 10 nMol/l ANP

Es werden die maximalen Stromdichten des $I_{Ca,L}$ -Kanals sowohl der Kontrollgruppe als auch die der gepaceten Kardiomyozyten vor und nach fünfminütigem Einwaschen von 10 nMol/l ANP dargestellt. Die Werte sind auf das jeweilige Stromdichtenmaximum der beiden Gruppen bei + 10 mV bezogen, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen.

Die Unterschiede zwischen den gepaceten Kardiomyozyten und der entsprechenden Kontrollgruppe sind jeweils statistisch signifikant. Eine statistische Signifikanz zwischen den Werten vor und nach fünfminütiger Superfusion mit ANP war nur bei der Flimmergruppe festzustellen.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisdiskussion

4.1.1 Auswirkungen der schnellen Vorhofstimulation

Für die Zellmembrankapazität als Parameter der Zellgröße, die durchschnittlich bei 85,4 pF lag, war keine statistisch signifikante Veränderung für die einzelnen Zellgruppen zu ermitteln. Skasa et al. und Van Wagoner et al. hatten im Zusammenhang mit Vorhofflimmern bei humanen atrialen Kardiomyozyten eine signifikante Steigerung der Zellgröße nachgewiesen (Skasa et al., 2001, Van Wagoner et al., 1999). Die Erklärung für den nichtvorhandenen Unterschied in der Zellgröße kann zum Einen in interindividuellen Varianzen liegen, ist aber wohl eher in der Dauer des Vorhofflimmerns zu suchen: Sowohl Skasa als auch Van Wagoner untersuchten rechtsatriale Kardiomyozyten von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern, während es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen um nur 24 Stunden stimulierte Kardiomyozyten handelte.

Neben der Zellgröße ist auch die Anzahl der Calcium-Kanäle auf der Zellmembran ein kontrovers diskutierter Punkt, der insofern auch für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist, als es sich hierbei nicht um Einzelkanalmessungen handelt, sondern um die Messung eines „makroskopischen“ Kanals (Skasa et al., 2001). Diesen Ausdruck veranschaulichten McDonald et al. 2001 in folgender Gleichung:

$$I = N \cdot P_0 \cdot i$$

I... Stromstärke

N... Kanalanzahl

P_0 ... Öffnungswahrscheinlichkeit

i... der bei definierter Spannung durch einen Kanal geleitete Strom

[Formel 4]

Aus Abbildung 21 wird ersichtlich, dass die Spannungsabhängigkeit des L-Typ Ca^{2+} -Stromes nicht, wie von mehreren Autoren beschrieben, durch Vorhofflimmern unbeeinflusst blieb (Bosch et al., 1999, Allesie et al., 2002). Während die Zellen der Kontrollgruppe ihr Stromdichtenmaximum im Spannungsbereich von $U = 0 \text{ mV}$ aufwiesen, zeigten die Zellen, die nach 24-stündigem induziertem Vorhofflimmern isoliert wurden, das Maximum des $I_{\text{Ca,L}}$ – Stromes bei einem Spannungspuls von $U = + 10 \text{ mV}$; letzteres konnte von oben genannten Autoren ebenso gezeigt werden. Chen et al. demonstrierten 2002 hingegen an humanen ventrikulären Myozyten, dass eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Zellen gesunder Patienten bzw. Herzfehlerzellen hin zu positiven Spannungswerten stattfindet (Chen et al., 2002). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür mag die durch Proteinkinase A-induzierte, im Vergleich zu den Vorhofflimmerzellen erhöhte, Phosphorylierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Komplexes der Kontrollgruppe sein, die gewöhnlich über einen β -adrenergen Signalweg verläuft (Doupnik und Pun, 1992).

Um für die vorliegende Arbeit möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu gewinnen, was sowohl eine möglichst lange Dauer des atrialen Pacing als auch noch auswertbare Stromamplituden voraussetzt, wurde unter Berücksichtigung eigener Voruntersuchungen eine „Stimulationsdauer“ von 24 Stunden gewählt (Bosch et al., 2003).

4.1.2 Calcium-Overload

Die erhöhte Aktivierungsrate bei Vorhofflimmern führt zu einer Überladung der Zelle mit Calciumionen, dem sogenannte „Calcium-Overload“ (Bosch et al., 2000). Diese überhöhte Calciumkonzentration im myokardialen Zytoplasma, die durch den vermehrten Einstrom von Calciumionen durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal verursacht wird, kann verschiedene pathophysiologische Folgen haben: einerseits wird auf mitochondrialer Ebene die Calciumaufnahme durch die erhöhte Calciumkonzentration getriggert und es kommt über einen Kollaps des mito-

chondrialen Membranpotentials zum Zelltod (Duchen, 2000), andererseits spielt der Calcium-Overload eine herausragende Rolle beim durch Vorhofflimmern induzierten atrialen Remodeling. Die Expression der Calcium-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums wird durch das erhöhte Calciumangebot reduziert (Van Wagoner et al., 2000). Eine Dysfunktion des Sarkoplasmatischen Retikulums wiederum führt zu einer Entkopplung des Erregungs-Kontraktions-Systems (Bolli et al., 1999). Zudem aktiviert die Überladung von Kardiomyozyten mit Calcium das Enzym Calpain I, was in einer selektiven Proteolyse von Myofibrillen resultiert (Bolli et al., 1999).

4.1.3 Reaktion auf den Calcium-Overload

Als mögliche Schutzreaktion der Zelle auf den durch hohe Vorhoffrequenzen ausgelösten Calcium-Overload wurde eine statistisch signifikante Reduktion der $I_{Ca,L}$ -Stromdichte um 54,9% festgestellt, was mit den von anderen Arbeitsgruppen bisher gefundenen Werten im Großen und Ganzen übereinstimmt: mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es bei chronischem Vorhofflimmern in humanen Kardiomyozyten (Grammer et al. 2000, Van Wagoner et al., 1999) bzw. im 24 Stunden stimulierten Kaninchenmodell (Bosch et al., 2003) zu einer signifikanten Downregulation der Stromdichte des $I_{Ca,L}$ um ungefähr 60% kommt.

Der exakte Mechanismus dieser Amplitudendownregulation ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Mehrere Möglichkeiten sind dabei in Betracht zu ziehen.

4.1.3.1 Transkriptionelle Downregulation

Eine potenzielle Ursache der transkriptionellen Downregulation der Kanalbaustein-mRNA ist die intrazelluläre Calciumüberladung der Kardiomyozyten.

Die reduzierte Expression der mRNA und die als Folge davon auch verringerten Konzentrationen der Kanal-Proteine werden kontrovers diskutiert. In humanen Zellen wurden unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Beim chronischen Vorhofflimmern konnte für die mRNA-Expression der porenbildenden α_{1C} - Untereinheit eine Reduktion um 18,9% festgestellt werden, die der β_b/β_c -Untereinheit war 77,7% verringert (Grammer et al., 2000), wobei anzumerken ist, dass in anderen Studien für die Expression der α_{1C} - Untereinheit erheblich größere Unterschiede festgestellt wurden (Brundel et al., 1999, Lai et al., 1999). 2001 gelang es Grammer et al. bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression für die α_2/δ_1 - und die β_{1b} -Untereinheit nachzuweisen. Eine Studie von Schotten et al. kam 2003 allerdings zu dem gegensätzlichen Ergebnis, dass die Proteinexpression der α_{1C} - sowie die der β -Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern keine Veränderung zeigt. Brundel et al. waren 2001 hingegen zu einem gegenteiligen Ergebnis gekommen.

Im Tiermodell konnte von Bosch et al. gezeigt werden, dass die Expression der α_{1C} - Untereinheit-mRNA nach 24 Stunden atrialem Pacing erstmals sichtbar reduziert wird und einen um 24% geringeren Wert aufweist, als bei Tieren im Sinusrhythmus. Die β -Untereinheit hingegen weist schon deutlich reduzierte Werte auf, bevor eine Reduktion der Stromdichte nachzuweisen ist (Bosch et al., 2003).

Die durch diese Vorgänge verringerte Anzahl an funktionellen L-Typ Calcium-Kanälen und die dadurch reduzierte Stromstärke könnten dazu dienen, einen Calcium-„Overload“ der Zellen zu vermeiden. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse wurden in jüngster Zeit weitere zusätzliche Mechanismen diskutiert.

4.1.3.2 Veränderungen von Regulatorproteinen (Phosphatasen)

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Aktivität spielen die Proteinphosphatasen 1 und 2A. Hescheler konnte 1987 mit seiner Arbeitsgruppe nachweisen, dass das sowohl die Proteinphosphatase 1 als auch die Proteinphosphatase 2A einen durch Isoproterenol stimulierten $I_{\text{Ca,L}}$ -Strom in kardialen Myozyten von Meerschweinchen deutlich reduzieren. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Phosphataseinhibitoren die Einzelkanal-Aktivität erhöhen und die Phosphorylierung anderer Regulatorproteine wie zum Beispiel Phospholamban verstärken (Herzig et al., 2000).

Eine kürzlich von Laszlo et al. durchgeführte Studie unserer Arbeitsgruppe zur Expression der Proteinphosphatasen 1A und 2A im 24 Stunden stimulierten Kaninchen-Modell kam zu folgenden für diese Arbeit relevanten Ergebnissen: 1. die Expression der Proteinphosphatase 2A α wurde durch das atriale Pacing nicht beeinflusst; 2. für die Proteinphosphatase 1 α konnte mittels Western Blot eine um 32% erhöhte Expression festgestellt werden; 3. bei einer Vorbehandlung der Tiere mit dem Calciumkanal-Blocker Verapamil erfuhr die Proteinphosphatase 1 α keine Veränderung (Laszlo et al., 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verstärkte Expression der Proteinphosphatase 1A Teil des Pathomechanismus in den frühen Phasen des atrialen Remodeling ist.

Christ et al. kamen 2004 zu teilweise anderen Ergebnissen, allerdings handelte es sich hierbei auch um eine Studie mit humanen Proben chronischen Vorhofflimmerns. Es wurde eine erhöhte Phosphatase-Aktivität gefunden und im Gegensatz zu Laszlo et al. auf dem Protein-Level eine erhöhte Expression der Proteinphosphatase 2A und eine gleichbleibende für die Proteinphosphatase 1. Bezüglich der mRNA-Expression der Proteinphosphatase 1 konnte sogar ein statistisch signifikant niedriger Wert ermittelt werden als für Patienten im Sinusrhythmus. Diese Diskrepanzen in den Ergebnissen der beiden Untersuchungen

sind mit einiger Sicherheit auf das unterschiedliche Studiendesign zurückzuführen.

Richtungsweisend ist aber die generell erhöhte Phosphatase-Aktivität, die zu einer Downregulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals führt.

4.1.3.3 Andere potentielle Mechanismen

a) Wirkung von ANP auf die Zellen der Kontrollgruppe

Die Sekretion und Freisetzung von ANP aus den kardialen Vorhöfen ist äußerst komplex und wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren berichten, ein durch BAY K 8644 verstärkter Ca^{2+} -Einstrom vermehre die ANP-Sekretion (Ruskoaho et al., 1986, Saito et al., 1986), was als potentieller Regulationsmechanismus betrachtet werden könnte, da ANP selbst, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, den I_{Ca} -Strom verkleinert. Aus anderen Arbeitsgruppen verlautet jedoch ein Widerspruch; hier wurde eine Negativ-Regulation der ANP-Sekretion durch Ca^{2+} beobachtet (Ito, et al., 1988, Ruskoaho et al., 1990).

Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen dem rechtsatrialen Druck, der bei supraventrikulären Tachykardien gesteigert ist, und einem Anstieg der Plasma-ANP-Konzentration beobachtet werden (Roy et al., 1987).

Ngo et al. konnten 1990 in einer Studie nachweisen, dass die Plasmakonzentration des ANP-Prohormons bei Vorhofflimmern signifikant ansteigt und 30 Minuten nach Kardioversion wieder absinkt. Von anderen Autoren konnte demonstriert werden, dass die erhöhten ANP-Konzentrationen bei Vorhofflimmern und -flattern weder von der Größe des linken Atriums, der Dauer der Arrhythmie, der Ventrikelfrequenz noch vom Blutdruck abhängig sind (Mookherjee et al., 1991).

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiermodell konnten bei der Verwendung von 10nMol/l ANP deutliche Effekte auf den $I_{Ca,L}$ -Strom beobachtet werden. In den Zellen der Kontrollgruppe ergab sich nach fünfminütigem Einwaschen eine Reduktion der Stromdichte um 29,1%, was über den Werten von Tohse et al. liegt, die beim Kaninchen nach Zugabe von 10nMol/l ANP nur eine um 10% reduzierte Stromdichte messen konnten. Allerdings wurden von der Arbeitsgruppe um Tohse nicht atriale Kariomyzyten, sondern Ventrikelzellen verwendet (Tohse et al., 1995). In humanen Zellen konnte eine Verminderung der Stromstärke nach Superfusion mit der gleichen ANP-Konzentration um 37,81% beobachtet werden (Le Grand et al., 1992). Eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit konnte in den durchgeführten Experimenten nicht festgestellt werden.

Erklärbar ist die verminderte Stromdichte des L-Typ Ca^{2+} -Kanals nach Zugabe von 10 nMol/l ANP durch eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration (Cramb et al., 1987), die wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase G führt, was letztendlich eine Inhibierung des $I_{Ca,L}$ -Stromes zur Folge hat.

Weiterhin denkbar ist eine durch cGMP stimulierte Aktivierung der Phosphodiesterase, die zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Kirstein et al., 1995). Zuletzt sollte auch noch die direkte Inhibierung über Kopplung von ANP an einen ANP-Rezeptor und die damit verbundene Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins (G_i) genannt werden.

b) Wirkung von ANP auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal bei atrialem Pacing

Bei dem in der vorliegenden Arbeit experimentell induzierten atrialen Pacing ist die Wirkung der selben ANP-Menge auf die Stromdichte des L-Typ Calcium Kanals mit einer Reduktion um 75,9% erheblich stärker, als bei den Zellen der Kontrollgruppe, wo sie bei nur 29,1% liegt. Die statistisch signifikante Verringe-

nung der Stromdichte der gepaceten atrialen Kardiomyozyten auf $24,1\% \pm 6,6\%$ ihres Ausgangswertes gibt Anlass zu neuen Überlegungen, was die Bedeutung von ANP für das Vorhofflimmern angeht.

Möglicherweise ist die reduzierte Stromdichte von $I_{Ca,L}$, die durch ANP noch eine weitere Verringerung erfährt, und die erhöhte Plasma-ANP-Konzentration bei Vorhofflimmern als eine Art Regelkreis in Bezug auf die Plasma-ANP-Konzentration zu sehen, um ein Überschießen der ANP-Konzentration mit all ihren negativen Folgen unbedingt zu verhindern.

Wesentlich wahrscheinlicher ist allerdings, dass die deutlich erhöhte Sensitivität des L-Typ Calciumkanals für ANP bei gepaceten atrialen Kardiomyozyten einen bisher nicht beachteten Mechanismus im zellspezifischen Umgang mit der drohenden Calciumüberladung bei Vorhofflimmern darstellt. Die, relativ gesehen, wesentlich stärkere Verringerung der $I_{Ca,L}$ -Stromamplitude bei gepaceten atrialen Kardiomyozyten ist als protektiver Gegenregulationsmechanismus zur Verhinderung des Calcium-Overload mit all seinen pathophysiologischen Folgen zu sehen.

4.2 Mögliche Fehlerquellen

4.2.1 Geräte

Mittels eines Faraday'schen Käfigs und der Erdung der einzelnen Komponenten wurde versucht, von anderen Geräten ausgehende elektrische Störungen weitestgehend zu vermeiden. Verunreinigungen des Perifusionssystems durch die verwendeten Substanzen sollten durch eine gründliche Reinigung nach jeder Substanzapplikation verhindert werden. Beschädigungen der AgCl-Elektrode und dem damit verbundenen „Rauschen“ der Aufnahmen wurde durch eine regelmäßige Erneuerung der AgCl-Schicht vorgebeugt. Die Pipettenwiderstände

wurden regelmäßig kontrolliert und nur Pipetten mit einem Eigenwiderstand von 2,5 bis 5 M Ω verwendet.

Um sogenannten Offsetpotentialen, d.h. Spannungen, die nicht direkt von der Zelle bzw. dem Kommandopotential selbst herrühren, sondern als Polarisierungserscheinungen an der Silber-/Silberchloridelektrode oder als Übergangspotentiale zwischen verschiedenen Elektrolyten auftreten, entgegenzuwirken, war eine Korrektur während bzw. vor der eigentlichen Messung notwendig, da ansonsten ein nicht korrektes Kommandopotential ausgegeben wird.

Da Leckströme am Ansatzpunkt der Pipette auf der Zelle zu Rauschen in der Aufzeichnung führen können, wurde versucht, diese durch einen sehr guten „Seal“, d.h. einen Widerstand im Gigaohm-Bereich, möglichst gering zu halten.

4.2.2 Serienwiderstand

Der sogenannte „voltage drop“ – das Abfallen der geklemmten Sollspannung – wird durch den Serienwiderstand R_S verursacht (siehe Kapitel 2.2.3.3). Weiterhin ist der Serienwiderstand der limitierende Faktor für die Geschwindigkeit mit der die Ladung zur Spannungsänderung injiziert werden kann; liegen große Serienwiderstände vor, werden intrazelluläre Spannungsabweichungen stark verzerrt wiedergegeben. Im bestmöglichen Fall entspricht der Serienwiderstand dem Pipettenwiderstand, ist dies nicht der Fall, kann die intrazelluläre Spannung empfindlich vom Kommandopotential abweichen, ohne dass dies vom Verstärker angezeigt wird (Numberger und Draguhn, 1996). Um diesem Problem zu begegnen, wurde der Serienwiderstand regelmäßig vor Beginn der Experimente und bei Bedarf im Verlauf der Messungen mittels des verwendeten Verstärkers elektronisch kompensiert.

4.2.3 Lösungen

Verunreinigungen der Lösungen beim Herstellungsprozess, sowie deren Veränderungen durch Licht bzw. Temperatur können ebenfalls Faktoren für verfälschte Ergebnisse sein. Um diesen Einflüssen entgegen zu wirken, wurden die Lösungen am Versuchstag jeweils aus Stammlösungen neu angesetzt und in lichtundurchlässigen Behältern bei konstanter Temperatur aufbewahrt.

Die untersuchte Substanz ANP wurde nach Herstellerangaben gelöst und als aliquotierte Stammlösung bei -20° C aufbewahrt, wie bereits in Kapitel 2.1.2.1 beschrieben.

4.2.4 Zellen

Um die Beeinträchtigung der Ergebnisse durch interindividuelle Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchstieren möglichst gering zu halten, wurden in jeder Gruppe Zellen von mindestens vier unterschiedlichen Tieren verwendet. Eine weitere Problematik bestand in „Qualitätsunterschieden“ zwischen den einzelnen Kardiomyozyten, da die enzymatische Dissoziation der Myozyten von verschiedenen Parametern, wie den äußeren Bedingungen, dem Alter der Tiere, der Organentnahmedauer, der Aktivität der verwendeten Collagenasen u.a. abhängt. Diese äußerten sich vor allem in der Größe des basalen Leckstromes. Es wurden nur Zellen in optisch optimalem Zustand mit minimalen Leckströmen in die Analyse einbezogen.

Da die Möglichkeit in Erwägung gezogen muss, dass sich alleine durch die Invasivität der Elektrodenimplantation eine Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten etabliert hat, wurde eine Kontrollgruppe angelegt, bei der nach alleiniger Implantation der Schrittmacherelektrode dieselben Messungen durchgeführt wurden, wie bei der atrialen Pacing-

Gruppe. Hiermit wurde sichergestellt, dass die ermittelten Veränderungen der $I_{Ca,L}$ -Stromdichte auf das atriale Pacing und nicht auf die Implantation der Schrittmacherelektroden zurückzuführen ist.

Neben den verwendeten Zellen muss auch die angewandte Methode kritisch betrachtet werden: Zum einen können bei der hier durchgeführten Whole-cell-Patch-Methode keine Einzelkanäle gemessen, sondern nur statistisch verteilte Übergänge mehrerer Ionenkanäle in einen aktiven Zustand erhoben werden. Zum anderen ergibt sich durch die relativ groß angelegte Kontaktfläche der Pipettenlösung mit Cytoplasma die Problematik des Auswaschens eines großen Teiles dieser Substanz bzw. der Second-Messenger-Systeme (z.B. ATP, IP₃ oder kleine Proteine). Letzteres kann eine sogenannte „Rundown-Bildung“, also das Abflachen der gemessenen Strom-Amplitude zur Folge haben. Allerdings entsteht durch den Austausch der intrazellulären Flüssigkeit mit der Pipettenlösung eine klar definierte Zusammensetzung, was wiederum zum Vorteil gereichen kann. Eine Möglichkeit, die „Rundown-Bildung“ zumindest zu verzögern, besteht in der Verwendung von Mg₂-ATP als Bestandteil der intrazellulären Lösung (siehe Zusammensetzung der Pipettenlösung in Kapitel 2.1.2.4) (Belles et al., 1988).

Ebenfalls positive Aspekte der durchgeführten Methode sind einerseits darin zu sehen, dass die komplette Zellmembran bei den Messungen erfasst wird und andererseits fällt das sogenannte „Rauschen“ erheblich geringer aus als dies bei intrazellulären Ableitungen der Fall ist (Numberger und Draguhn, 1996).

4.2.5 Auswertung

Die zur Elimination eines vorhandenen „Rundowns“ verwendete Extrapolation der Werte birgt ein gewisses Risiko in sich, da nicht ausgeschlossen werden

kann, dass es sich wirklich nur um eine qualitäts- und zeitbedingte Verschlechterung der Zellen handelte.

Weiterhin mag auch die, durch die Versuchskonstellation bedingte, relativ geringe Anzahl der Fälle eine Rolle bei der Auswertung der statistischen Signifikanz spielen.

4.3 Klinische Relevanz

Der Calcium-Einstrom durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal spielt eine entscheidende Rolle in der kardialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Vorhofflimmern führt ebenso wie ANP zu einer Verringerung dieses Einstromes. Die Konsequenz des verringerten $I_{\text{Ca,L}}$ -Stromes ist eine kürzere effektive atriale Refraktärphase und eine ebenso verkürzte Aktionspotentialdauer bei Vorhofflimmern (Grammer et al., 2000), was zu einer immensen Beeinträchtigung der atrialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung führt.

Weiterhin ergibt sich ein sogenanntes strukturelles Remodeling, das durch eine Steigerung der Zellgröße sowie der Fettdepots in den Vorhöfen, durch Verluste der Trabekel, perinukleären Glykogenanlagerungen, Myolyse und Veränderungen in Quantität und Lokalisation zellulärer Strukturproteine imponiert (Allesie et al., 2002, Van Wagoner et al., 1999).

Als mögliche Behandlungsoptionen für supraventrikuläre Arrhythmien stehen Calcium-Kanal-Blocker zur Debatte, welche die Überleitung im AV-Knoten unterdrücken; allerdings wird somit auch aktiv auf die Länge von Aktionspotential und effektiver Refraktärphase eingewirkt, welches Vorhofflimmern stabilisiert. Aus diesem Grund ist die Suche nach anderen Therapieoptionen sinnvoll, die darauf ausgerichtet sein könnten, die ANP-Sekretion aus atrialen Kardiomyozyten bei supraventrikulären Arrhythmien zu verringern.

5 Zusammenfassung

Der spannungsgesteuerte L-Typ Calcium Kanal sorgt in den kardialen Schrittmacherzellen für ein rasches Fortschreiten der Depolarisation und in den ruhenden kardialen Myozyten für den, zur Erhaltung der Plateauphase notwendigen, Ca^{2+} -Ioneneinstrom. Seine Stimulation bzw. Regulation erfolgt mittels unterschiedlicher Signalwege letztlich über eine Phosphorylierung der α_1 - bzw. β -Untereinheit des Kanals.

Eine Verringerung erfährt der $I_{\text{Ca,L}}$ -Strom auch durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus, der wiederum vom „Atrialen Natriuretischen Peptid“ (ANP) einen positiven Impuls erfährt.

Beim Vorhofflimmern, der mit 4,5 Millionen Betroffenen häufigsten Herz-Kreislauf-Erkrankung in Europa, kommt es zu Veränderungen sowohl der Struktur als auch der elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe, an denen der L-Typ Calcium Kanal maßgeblich beteiligt ist. Eine zusätzliche Folge supraventrikulärer Tachykardien ist die vermehrte Freisetzung des Polypeptids ANP. In der vorliegenden Arbeit sollen die Folgen der schnellen Vorhofstimulation im Hinblick auf die ANP-Modulation des L-Typ Calciumkanals untersucht werden.

Ein speziell entwickeltes Tiermodell erlaubte die Simulation von 24-stündigem Vorhofflimmern in New Zealand White Rabbits und die Gewinnung atrialer Kardiomyozyten für die Durchführung elektrophysiologischer Untersuchungen mittels der Patch clamp Technik im sogenannten *whole-cell* Modus.

Als Folgen der schnellen atrialen Stimulation konnte sowohl vor Applikation von 10 nMol/l ANP als auch nach fünfminütigem Einwaschen der Substanz eine signifikante Verringerung der $I_{\text{Ca,L}}$ -Stromdichte nachgewiesen werden. Hierbei konnte eine Spannungsverschiebung des Stromdichtenmaximums von 0 mV in der implantierten Kontrollgruppe hin zu +10 mV in der im Vorhof stimulierten Gruppe beobachtet werden. Bei der Untersuchung der ANP-Wirkung auf die

Zellen der atrialen Pacing-Gruppe konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Stromdichte um 75,9% nachgewiesen werden, während diese für die Kontrollgruppe bei derselben Versuchskonstellation nur 29,1% betrug.

Ursachen für den reduzierten $I_{Ca,L}$ -Strom sind einerseits in der verminderten Expression der mRNA von α_1 - und β - Untereinheit zu suchen bzw. sind auf eine durch ANP stimulierte cGMP-Wirkung zurückzuführen, was an eine Art Regelkreis, der sowohl den Calciumeinstrom in die Kardiomyozyten als auch die ANP-Konzentration beinhaltet, denken lässt.

Der verminderte Calcium-Einstrom durch den L-Typ Calcium Kanal führt sowohl zu einer verkürzten effektiven atrialen Refraktärphase als auch zu einer veränderten Morphologie des atrialen Aktionspotentials, was wiederum eine immense Beeinträchtigung der Erregungs-Kontraktions-Kopplung in den Vorhöfen zur Folge hat und im Fortbestehen der therapieresistenten supraventrikulären Arrhythmie resultieren kann. Ein möglicher Therapieansatz liegt in der Kontrolle bzw. Reduktion der ANP-Konzentration bei Patienten mit supraventrikulären Tachykardien.

6 Literaturverzeichnis

1. Allesie, M A, Bonke, F I M, Schopman, F J G (1976)
Circus movement in rabbit muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block as studied with multiple microelectrodes.
Circ Res 39, 168-177
2. Allesie, M A, Ausma, J, Schotten, U (2002)
Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation
Cardiovasc Res 54, 230-246
3. Anderson, J V, Gibbs, J S R, Woodruff, P W R, Greco, C, Rowland, E, Bloom, S R (1986)
The plasma atrial natriuretic peptide response to treatment of acute cardiac failure, spontaneous supraventricular tachycardia and induced re-entrant tachycardia in man.
J Hypertension 4, 137-141
4. Antoni, H (1996)
Electrophysiology of the heart at a single cell level and cardiac rhythmogenesis.
in
Antoni, H
Comprehensive Human Physiology (Springer Verlag),
5. Attuel, P, Childers, R, Cauchemez, B, Poveda, J, Mugica, J, Coumel, P (1982)
Failure in the rate adaptation of the atrial refractory period: its relationship to vulnerability.
Int J Cardiol 2, 179-197
6. Ausma, J, Wijffels, M C, Thone, F, Wouters, L, Allesie, M A, Borgers, M (1997)
Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat.
Circulation 96, 3157-3163

7. Belles, B, Malécot, C O, Hescheler, J, Trautwein, W (1988)
"Rund-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium.
Pflügers Arch 411, 353-360
8. Bernstein, J (1902)
Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme.
Pflügers Arch ges Physiol 95, 521-
9. Birnbaumer, L, Qin, N, Olcese, R, Tareilus, E, Platano, D, Constantin, J, Stefani, E (1998)
Structure and functions of calcium channel β subunits.
J Bioenerg Biomembr 30, 357-375
10. Bkaily, G, Wang, S, Bui, M, Menard, D (1995)
ET-1 stimulates Ca^{2+} currents in cardiac cells.
J Cardiovasc Pharmacol 26, 293-296
11. Bolli, R, Marbán, E (1999)
Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning.
Physiol Rev 79, 609-634
12. Bosch, R F, Zeng, X, Grammer, J B, Popovic, K, Mewis, C, Kühlkamp, V (1999)
Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation.
Cardiovasc Res 44, 121-131
13. Bosch, R F, Grammer, J B, Kühlkamp, V, Seipel, L (2000)
Electrical Remodeling in atrial fibrillation - cellular and molecular mechanisms
Z Kardiol 89, 795-802
14. Bosch, R F, Scherer, C R, Rüb, N, Wöhr, S, Steinmeyer, K, Haase, H, Busch, A E, Seipel, L, Kühlkamp, V (2003)
Molecular Mechanisms of Early Electrical Remodeling: Transcriptional Downregulation of Ion Channel Subunits Reduces $I_{Ca,L}$ and I_{to} in Rapid Atrial Pacing in Rabbits.
J Am Coll Cardiol 41, 858-869

15. Brundel, B J, Van Gelder, I C, Henning, R H, Tuinenburg, A E, Deelman, L E, Tieleman, R G, Grandjean, J G, Van Gilst, W H, Crijns, H J M G (1999)
Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation
Cardiovasc Res 42, 443-454
16. Brundel, B J, Van Gelder, I C, Henning, R H, Tieleman, R G, Tuinenburg, A E, Wietses, M, Grandjean, J, Van Gilst, W H, Crijns, H J M G (2001)
Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation.
Circulation 103, 684-690
17. Brundel, B J, Ausma, J, Van Gelder, I C, Van Der Want, JJ, Van Gilst, W H, Crijns, H J M G, Henning, R H (2002)
Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation.
Cardiovasc Res 54, 380-389
18. Catterall, W A, Striessnig, J (1992)
Receptor sites for Ca channel antagonists.
Trends Pharmacol Sci 13, 256-262
19. Chen, X, Piacentino, V 3rd, Furukawa, S, Goldman, B, Margulies, K B, Houser, S R (2002)
L-Type Ca²⁺ Channel Density and Regulation Are Altered in Failing Human Ventricular Myocytes and Recover After Support With Mechanical Assist Devices.
Circ Res 91, 517-524
20. Cheng, T H, Chang, C Y, Wei, J, Lin, C I (1995)
Effects of endothelin 1 on calcium and sodium currents in isolated human cardiac myocytes.
Can J Physiol Pharmacol 73, 1774-1783
21. Chinkers, M, Garbers, D L, Chang, M S, Lowe, D G, Chin, H M, Goeddel, D V, Schulz, S (1989)
A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor.
Nature 338, 78-83

22. Christ, T, Boknik, P, Wöhrl, S, Wettwer, E, Graf, E M, Bosch, R F, Knaut, M, Schmitz, W, Ravens, U, Dobrev, D (2004)
L-Type Ca^{2+} Current Downregulation in Chronic Human Atrial Fibrillation is Associated with Increased Activity of Protein Phosphatases.
Circulation 110, 2651-2657
23. Chuang, R S, Jaffe, H, Cribbs, L, Perez-Reyes, E, Swartz, K J (1998)
Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin.
Nat Neurosci 1998 1, 668-674
24. Clemo, H F, Baumgarten, C M, Ellenbogen, K A, Stambler, B S (1996)
Atrial Natriuretic Peptide and Cardiac Electrophysiology: Autonomic and Direct Effects.
J Cardiovasc Electrophysiol 7, 149-162
25. Cramb, G, Banks, R, Rugg, E L, Aiton, J F (1987)
Action of atrial natriuretic peptide (ANP) on cyclic nucleotide concentrations and phosphatidylinositol turnover in ventricular myocytes.
Biochem Biophys Res Commun 148, 962-970
26. Cui, X, Wen, J F, Jin, J Y, Xu, W X, Kim, S Z, Kim, S H, Lee, H S, Cho, K W (2002)
Protein kinase-dependent and Ca^{2+} -independent cAMP inhibition of ANP-release in beating rabbit atria.
Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 282, R1477-R1489
27. Dorn, G W, Brown, J H (1999)
 G_q signaling in cardiac adaptation and maladaptation.
Trends Cardiovasc Med 9, 26-34
28. Dornblüth, O (1998)
Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch (de Gruyter)
29. Doupnik, C A, Pun, R Y (1992)
Cyclic AMP-dependent phosphorylation modifies the gating properties of L-type Ca^{2+} channels in bovine adrenal chromaffin cells.
Pflügers Arch 420, 61-71

30. Duchen, M R (2000)
Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death.
J Physiol 529, 57-68

31. Fuster, V, Rydén, LE, Cannom, DS, Crijns, H J M G, Curtis, AB, Ellenbogen, K A, Halperin, JL, Le Heuzey, J-Y, Kay, GN, Lowe, JE, Olsson, SB, Prystowsky, EN, Tamargo, JL, Wann, S, Smith, SC, Jacobs, AK, Adams, CD, Anderson, JL, Antman, E M, Hunt, SA, Nishimura, S, Ornato, JP, Page, RL, Riegel, B, Priori, SG, Blanc, J-J, Budaj, A, Camm, AJ, Dean, V, Deckers, JW, Despres, C, Dickstein, K, Lekakis, J, McGregor, K, Metra, M, Morais, J, Osterspey, A, Zamorano, JL (2006)
ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation - Executive Summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation).
J Am Coll Cardiol 48, 854-906

32. Garrey, W (1914)
The nature of fibrillary contraction of the heart: its relation to tissue mass and form.
Am J Physiol 33, 397-414

33. Garrey, W E (1924)
Auricular fibrillation.
Physiol.Rev. 4, 250-

34. Gaspo, R, Bosch, R F, BouAbboud, E, Nattel, S (1997)
Tachykardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation.
Circ Res 81, 1045-1052

35. Gaspo, R, Bosch, R F, Talajic, M, Nattel, S (1997)
Functional Mechanisms Underlying Tachykardia-Induced Sustained Atrial Fibrillation in a Chronic Dog Model.
Circulation 96, 4027-4035

36. Go, A S, Hylek, E M, Phillips, K A, Chang, Y, Henault, L E, Selby, J V, Singer, D E (2001)
Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study.
JAMA 285, 2370-2375
37. Grammer, J B, Bosch, R F, Kühlkamp, V, Seipel, L (2000)
Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation.
J Cardiovasc Electrophysiol 11, 626-633
38. Grammer, J B, Bosch, R F, Kühlkamp, V, Seipel, L (2000)
Molecular and electrophysiological evidence for "remodeling" of the L-type Ca²⁺ channel in persistent atrial fibrillation in humans.
Z Kardiol 89, IV/23-IV/29
39. Grammer, J B, Zeng, X, Bosch, R F, Kühlkamp, V (2001)
Atrial L-type-Ca²⁺-channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation.
Bas Res Cardiol 96, 82-90
40. Grozier, I G, Ikram, H, Nicholls, M G, Espiner, E A, Yandle, T G (1987)
Atrial natriuretic peptide in spontaneous tachycardias.
Br Heart J 58, 96-100
41. Haïssaguerre, M, Jaïs, P, Shah, D C, Takahashi, A, Hocini, M, Quiniou, G, Garrigue, S, Le Mouroux, A, Le Métayer, Ph, Clémenty, J (1998)
Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins.
N Engl J Med 339, 659-666
42. Hamill, O P, Marthy, A, Neher, E, Sakmann, B, Sigworth, F J (1981)
Improved Patch-Clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflügers Arch. 391, 85-100

43. Hara, M, Shvilkin, A, Rosen, M R, Danilo, P jr, Boyden, PA (1999)
Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillation canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms.
Cardiovasc Res 42, 455-469
44. Hartzell, H C, Mery, P F, Fischmeister, R, Szabo, G (1991)
Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation.
Nature 351, 573-576
45. Herring, N, Zaman, J A B, Paterson, D J (2001)
Natriuretic peptides like NO facilitate cardiac vagal neurotransmission and bradycardia via cGMP pathway.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 281, H2318-H2327
46. Herzig, S, Neumann, J (2000)
Effects of Serine/Threonine Protein Phosphatases on Ion Channels in Excitable Membranes.
Physiol Rev 80, 173-210
47. Hescheler, J, Kameyama, M, Trautwein, W, Mieskes, G, Soling, H D (1987)
Regulation of the cardiac calcium channel by protein phosphatases.
Eur J Biochem 165, 261-266
48. Huber, I, Wappl, E, Herzog, A, Mittendorfer, J, Glossmann, H, Langer, T, Striessnig, J (2000)
Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridines-binding domain.
Biochem J 347, 829-836
49. Iqbal, M B, Taneja, A K, Lip, G Y H, Flather, M (2005)
Recent developments in atrial fibrillation.
BMJ 330, 238-243
50. Ito, T, Toki, Y, Siegel, N, Gierse, J K, Needleman, P (1988)
Manipulation of stretch-induced atriopeptin prohormone release and processing in the perfused rat heart.
Proc Natl Acad Sci USA 85, 8365-8369

51. Janse, M J (1997)
Why does atrial fibrillation occur?
Eur Heart J 18, C12-C18
52. Kamp, T J, Hell, J W (2000)
Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C.
Circ Res 87, 1095-1102
53. Kannel, W B, Abbott, R D, Savage, D D, Patricia M M (1982)
Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation. The Framingham Study.
N Engl J Med 306, 1018-1022
54. Katsube, H, Schwartz, D, Needleman, P (1985)
Release of atriopeptin in the rat by vasoconstrictors or water immersion correlates with changes in right atrial pressure.
Biochem Biophys Res Commun 133, 944-
55. Kirstein, M, Rivet-Bastide, M, Hatem, S, Bernadeau, A, Mercadier, J-J, Fischmeister, R (1995)
Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes.
J Clin Invest 95, 794-802
56. Klein, G J, Schroder, F, Vogler, D, Schaefer, A, Haverich, A, Schieffer, B, Korte, T, Drexler, H (2003)
Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation. Role of phosphatase 2A.
Cardiovasc Res 59, 37-45
57. Kostin, S, Klein, G J, Szalay, Z, Hein, S, Bauer, E P, Schaper, J (2002)
Structural correlate of atrial fibrillation in human patients.
Cardiovasc Res 54, 361-379

58. Lai, L P, Su, M J, Lin, J L, Lin, F Y, Tsai, C H, Chen, Y S, Huang, S K, Tseng, Y Z, Lien, W P (1999)
Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling.
J Am Coll Cardiol 33, 1237-
59. Lammers, W J E P, Allesie, M A (1993)
Pathophysiology of atrial fibrillation: current aspects.
Herz 18, 1-8
60. Lang, F (2000)
Herz
in
Lang, F
Basiswissen Physiologie (Springer-Verlag), 157-182
61. Langendorff, O (1895)
Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.
Arch Ges Physiol Mens Tiere Pflügers 61, 291-332
62. Laszlo, R, Winkler, C, Wöhrl, S, Busch, M, Schreieck, J, Bosch, R F (2007)
Influence of verapamil on tachycardia induced alterations of PP1 and PP2A in rabbit atrium – beneficial for treatment of atrial fibrillation?
Experimental and clinical cardiology (in press)
63. Le Grand, B, Deroubaix, E, Couétil, J-P, Coraboeuf, E (1992)
Effects of atrionatriuretic factor on Ca²⁺ current and Ca_v-independent transient outward K⁺ current in human atrial cells.
Pflügers Arch. 421, 486-491
64. Lewis, T H (1918)
Observations upon flutter and fibrillation.
Heart 7, 293

65. Lip, G Y H, Tean, K N, Dunn, F G (1994)
Treatment of atrial fibrillation in a district general hospital.
Br Heart J 71, 92-95
66. Lip, G Y H, Beevers, D Gareth (1995)
ABC of Atrial Fibrillation: HISTORY, EPIDEMIOLOGY AND IMPORTANCE OF ATRIAL
FIBRILLATION.
BMJ 311, 1361-1363
67. Maisel, W H, Stevenson, L W (2003)
Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for
therapy.
Am J Cardiol 91, 2D-8D
68. Manning, P T, Schwartz, D, Katsube, N C, Holmberg, W S, Needleman, P (1985)
Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: endocrine antagonists in fluid homeo-
stasis.
Science 229, 395-397
69. Manning, W J, Silverman, D I, Katz, S E, Riley, M F, Come, P C, Doherty, R M,
Munson, J T, Douglas, P S (1994)
Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of
atrial fibrillation.
J Am Coll Cardiol 23, 1535-1540
70. Manning, W J, Silverman, D I, Katz, S E, Riley, M F, Doherty, R M, Munson, J T, Doug-
las, P S (1995)
Temporal dependence of the return of atrial mechanical function on the mode of cardio-
version of atrial fibrillation to sinus rhythm.
Am J Cardiol 75, 624-626
71. Marriott, H J L Myerburg, R J (1986)
Recognition of arrhythmias and conduction abnormalities.
in
Marriott, H J L Myerburg, R J
The Heart (McGraw Hill), 431-431

72. McDonald, T F, Pelzer, S, Trautwein, W, Pelzer, D J (1994)
Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells.
Physiol Rev 74, 365-507
73. McDonough, S I, Bean, B P (1998)
Mibefradil inhibition of T-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons.
Mol Pharmacol 54, 1080-1087
74. Mery, P F, Abi-Gerges, N, Vandecasteele, G, Jurevicius, J, Eschenhagen, T, Fischmeister, R (1997)
Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes.
Life Sci 60, 1113-1120
75. Mewis, C, Neuberger, H-R, Böhm, M (2006)
Vorhofflimmern (atrial fibrillation)
Dtsche Med Wochenschr 131, 2843-2854
76. Miljanich, G P, Ramachandran, J (1995)
Antagonists of neuronal calcium channels: Structure function and therapeutic implications.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 35, 707-734
77. Mines, G R (1914)
On circulating excitations in the heart muscle and their possible relation to tachykardia and fibrillation.
Trans roy Soc Can 3, 43-
78. Moe, G K (1962)
On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation.
Arch Int Pharmacodyn 140, 183-188
79. Mookherjee, S, Anderson, G jr, Smulyan, H, Vardan, S (1991)
Atrial Natriuretic Peptide Response to Cardioversion of Atrial Flutter and Fibrillation and Role of Associated Heart Failure.
Am J Cardiol 67, 377-380

80. Morillo, C A, Klein, G J, Jones, D L, Guiraudon, C M (1995)
Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional and electrophysiological characteristics
of a new model of sustained atrial fibrillation.
Circulation 91, 1588-1595
81. Motoike, H K, Bodi, I, Nakayama, H, Schwartz, A, Veradi, G (1999)

A region in IVS5 of the human cardiac L-type calcium channel is required for the use-
dependent block by phenylalkylamines and benzothiazepines.
J Biol Chem 274, 9409-9420
82. Mukherjee, R, Spinale, F G (1998)
L-type Calcium Channel Abundance and Function with Cardiac Hypertrophy and Failure:
A Review.
J Mol Cell Cardiol 30, 1899-1916
83. Murgatroyd, F, Camm, A J (1993)
Atrial arrhythmias.
Lancet 341, 1317-1322
84. Nachshon, S, Zamir, O, Matsuda, Y, Zamir, N (1995)
Effects of ANP receptor antagonists on ANP secretion from adult rat cultured atrial myo-
cytes.
Am J Physiol 268, E428-E432
85. Nakayama, K, Ohkubo, H, Hirose, T, Inayama, S, Nakanishi, S (1984)
mRNA sequence for human cardiodilatin-atrial natriuretic factor precursor and regulation
of precursor mRNA in rat atria.
Nature 310, 699-701
86. Nattel, S, Li, D, Yue, L (2000)
Basic Mechanisms of Atrial Fibrillation - very new insights into very old ideas.
Annu.Rev.Physiol. 62, 51-77
87. Neher, E, Sakmann, B (1976)
Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature 260, 799-801

88. Newcomb, R, Szoke, B, Palma, A, Wang, G, Chen, XH, Hopkins, W, Cong, R, Miller, J, Urge, L, Tarczy-Hornoch, K, Loo, JA, Dooley, DJ, Nadasdi, L, Tsien, RW, Lemos, J, Miljanich, G (1998)
Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*.
Biochemistry 37, 15353-15362
89. Ngo, L, Bissett, J K, Winters, C J, Vesley, D L (1990)
Plasma prohormone atrial natriuretic peptides 1-98 and 31-67 increase with supraventricular and ventricular arrhythmias.
Am J Med Sci 300, 71-77
90. Numberger, M, Draguhn, A (1996)
Patch Clamp Technik (Spektrum Akademischer Verlag)
91. Parkinson, J, Campbell, M (1929)
The quinidine treatment of auricular fibrillation.
Q J Med 22, 281-303
92. Petersen, P, Kastrup, R, Vilhelmsen, R, Schütten, H J (1988)
Atrial natriuretic peptide in atrial fibrillation before and after electrical cardioversion therapy.
Eur Heart J 9, 639-641
93. Pichler, M, Cassidy, T N, Reimer, D, Haase, H, Kraus, R, Ostler, D, Striessnig, J (1997)
Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type calcium channels.
J Biol Chem 272, 13877-13882
94. Polontchouk, L, Haefliger, J A, Ebelt, B, Schaefer, T, Stuhlmann, D, Mehlhorn, U, Kuhn-Regnier, F, De Vivie, E R, Dhein, S (2001)
Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria.
J Am Coll Cardiol 38, 883-891
95. Powers, P A, Gregg, R G, Hogan, K (1992)
Linkage mapping of the human gene for the α_1 subunit of the cardiac DHP-sensitive Ca^{2+} channel (CACNL1A1) to chromosome 12p-13.2pter using a dinucleotide repeat.
Genomics 14, 206-207

96. Powers, P A, Scherer, S W, Tsui, L-C, Gregg, R G, Hogan, K (1994)
Localization of the gene encoding the $\alpha_2\delta$ subunit (CACNL2A) of the human skeletal muscle voltage dependent Ca^{2+} channel to chromosome 7q21-q22 by somatic cell hybrid analysis.
Genomics 19, 192-193
97. Pusch, M, Neher, E. (1988)
Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette.
Pflügers Arch. 411, 204-211
98. Reiche, D (2003)
Roche, Lexikon Medizin (Urban&Fischer Verlag)
99. Richards, A M, Nicholls, M G, Ikram, H, Webster, M W, Yandle, T G, Espiner, E A (1985)
Renal, hemodynamic, and hormonal effects of human alpha atrial natriuretic peptide in healthy volunteers.
Lancet 1, 545-549
100. Roy, D, Paillard, F, Cassidy, D, Bourassa, M G, Gutowska, J, Genest, J, Cantin, M (1987)
Atrial natriuretic factor during atrial fibrillation and supraventricular tachycardia.
J Am Coll Cardiol 9, 509-514
101. Ruskoaho, H, Toth, M, Ganten, D, Unger, Th, Lang, R E (1986)
The Phorbol ester induced atrial natriuretic peptide secretion is stimulated by forskolin and BAY K 8644 and inhibited by 8-bromo-cyclic GMP.
Biochem Biophys Res Commun 139, 266-274
102. Ruskoaho, H, Vuolteenaho, O, Leppaluoto, J (1990)
Phorbol esters enhance stretch-induced atrial natriuretic peptide secretion.
Endocrinology 127, 2445-2455
103. Saito, Y, Nakao, K, Morii, N, Sugawara, A, Shiono, S, Yamada, T, Itoh, H, Sakamoto, M, Kurahashi, K, Fujiwara, M, Imura, H (1986)
BAY K 8644, a voltage sensitive calcium channel agonist, facilitates secretion of atrial natriuretic peptide from isolated perfused rat hearts.
Biochem Biophys Res Commun 138, 1170-1176

104. Schotten, U, Haase, H, Frechen, D, Stellbrink, C, Schoendube, F, Hanrath, P, Allesie, M A (2000)
Protein expression of L-type Ca channel subunits is not reduced in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation.
Pacing Clin Electrophysiology 23, 604-????
105. Schotten, U, Haase, H, Frechen, D, Greiser, M, Stellbrink, C, Vazquez-Jimenez, J F, Morano, I, Allesie, M A, Hanrath, P (2003)
The L-type Ca²⁺-channel subunits alpha1C and beta2 are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation.
J Mol Cell Cardiol 35, 437-443
106. Schweizer, W (1972)
Das Vorhofflimmern
in
Schweizer, W
Einführung in die Kardiologie (Verlag Hans Huber), 151-154
107. Shorofsky, S R, Balke, C W (2001)
Calcium Currents and Arrhythmias: Insights from Molecular Biology.
Am J Med 110, 127-140
108. Silbernagel, S Lang, F (1998)
Rhythmusstörungen des Herzens
in
Silbernagel, S Lang, F
Taschenatlas der Pathophysiologie (Georg Thieme Verlag), 186-187
109. Skasa, M, Jüngling, E, Picht, E, Schöndue, E, Lückhoff, A (2001)
L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation.
Bas Res Cardiol 96, 151-159
110. Soldatov, N M (1994)
Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel.
Genomics 22, 77-87

111. Steinberg, S F (1999)
The molecular basis for distinct β -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes.
Circ Res 85, 1101-1111
112. Striessnig, J, Grabner, M, Mittendorfer, J, Hering, S, Sinnegger, M J, Glossmann, H (1998)
Structural basis of drug binding to L-type Ca^{2+} channels.
Trends Pharmacol Sci 19, 108-115
113. Stühmer, W, Conti, F, Suzuki, H, Wang, X, Noda, M, Yahagi, N, Kubo, H, Numa, S (1989)
Structure parts involved in activation and inactivation of the sodium channel.
Nature 339, 597-603
114. Sun, W, McPherson, J D, Hoang, D Q, Wasmuth, J J, Evans, G A, Montal, M (1992)
Mapping of a human brain voltage gated calcium channel to human chromosome 12p13-pter.
Genomics 14, 1092-1094
115. Takahashi, M, Seager, M J, Jones, J F, Reber, B F X, Catterall, W A (1987)
Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle.
Proc Natl Acad Sci USA 84, 5478-5482
116. Takimoto, K, Li, D, Nerbonne, J M, Levitan, E S (1997)
Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ voltage-gated calcium channel mRNAs.
J Mol Cell Cardiol 1997, 29:3035-3042 29, 3035-3042
117. Tieleman, R G, De Langen, C, Van Gelder, I C, De Kam, P J, Grandjean, J, Bel, K J, Wijffels, M C, Allesie, M A, Crijns, H J M G (1997)
Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria.
Circulation 95, 1945-1953

118. Tieleman, R G, Van Gelder, I C, Crijns, H J M G, De Kamp, P J, Van Den Berg, M P, Haaksma, J, Van Der Woude, H J, Allesie, M A (1998)
Early recurrences of atrial fibrillation after electrical cardioversion: a result of fibrillation-induced electrical remodeling of the atria?
J Am Coll Cardiol 31, 173-
119. Todorovic, S M, Prakriya, M, Nakashima, Y M, Nilsson, K R, Han, M, Zorumski, C F, Covey, D F, Lingle, C J (1998)
Enantioselective blockade of T-type Ca^{2+} current in adult rat sensory neurons by a steroid that lacks gamma-aminobutyric acid-modulatory activity.
Mol Pharmacol 54, 918-927
120. Tohse, N, Nakaya, H, Takeda, Y, Kanno, M (1995)
Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca^{2+} channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells.
Br J Pharmacol 114, 1076-1082
121. Trautwein, W, Pelzer, D, McDonald, T F (1983)
Interval- and voltage dependent effects of the calcium channel-blocking agents D600 and AQA 39 on mammalian ventricular muscle.
Circ Res 52, 60-68
122. Tsang, T S, Gersh, B J, Appleton, C P, Tajik, A J, Barnes, M E, Bailey, K R, Oh, J K, Leibson, C, Montgomery, S C, Seward, J B (2002)
Left ventricular diastolic dysfunction as a predictor of the first diagnosed nonvalvular atrial fibrillation in 840 elderly men and women.
J Am Coll Cardiol 40, 1636-1644
123. Van Der Velden, H M, Van Kempen, M J, Wijffels, M C, Van Zijverden, M, Groenewegen, W A, Allesie, M A, Jongsma, H J (1998)
Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat.
J Cardiovasc Electrophysiol 9, 596-607

124. Van Der Velden, H M, Van Der Zee, L, Wijffels, M C, Van Leuven, C, Dorland, R, Vos, M A, Jongsma, H J, Allesie, M A (2000)
Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization.
J Cardiovasc Electrophysiol 11, 1262-1269
125. Van Gelder, I C, Crijns, H J M G, Tieleman, R G, Brugada, J, De Kam, P J, Gosselink, A T, Verheugt, F W, Lie, K I (1996)
Chronic atrial fibrillation: success of serial cardioversion therapy and safety of oral anticoagulation.
Arch Intern Med 156, 2585-2592
126. Van Wagoner, D R, Pond, A L, Lamorgese, M, Rossie, S S, McCarthy, P M, Nerbonne, J M (1999)
Atrial L-Type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation.
Circ Res 85, 428-436
127. Van Wagoner, D R, Nerbonne, J M (2000)
Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation.
J Mol Cell Cardiol 32, 1101-1117
128. Vaughan Williams, E M (1989)
Relevance of cellular to clinical electrophysiology in interpreting antiarrhythmic drug action.
Am J Cardiol 64, 5J-9J
129. Vulpian, A (1874)
Note sur les effets de la faradisation directe des ventricules du coeur chez le chien.
Arch.Physiol. 1, 975-980
130. Wen, J F, Cui, X, Ahn, J S, Kim, S H, Seul, K H, Kim, S Z, Park, Y K, Lee, H S, Cho, K W (2000)
Distinct roles for L- and T-type Ca^{2+} channels in regulation of atrial ANP release.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 279, H2879-H2888

131. Wijffels, M C, Kirchhof, C J, Dorland, R, Allesie, M A (1995)
Atrial fibrillation begets Atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats.
Circulation 92, 1954-1968
132. Workman, A J, Kane, K A, Rankin, A C (2001)
The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation.
Circulation 52, 226-235
133. Wyse, DG, Gersh, B J (2004)
Atrial fibrillation: A perspective: Thinking Inside and Outside the Box.
Circulation 109, 3089-3095
134. Xiao, R-P, Cheng, H, Zhou, Y-Y, Kuschel, M, Lakatta, E G (1999)
Recent advances in cardiac β -adrenergic signal transduction.
Circ Res 85, 1092-1100
135. Xu, J, Cui, G, Esmailian, F, Plunkett, M, Marelli, D, Ardehali, A, Odum, J, Laks, H, Sen, L (2004)
Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation.
Circulation 109, 363-368
136. Yatani, A, Brown, A M (1989)
Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway.
Science 245, 71-74
137. Yu, W C, Lee, S H, Tai, C T, Tsai, C F, Hsieh, M H, Chen, C C, Ding, Y A, Chang, M S, Chen, S A (1999)
Reversal of atrial electrical remodeling following cardioversion of long-standing atrial fibrillation in man.
Cardiovasc Res 42, 470-476
138. Yue, L, Feng, J, Gaspo, R, Li, G R, Wang, Z, Nattel, S (1997)
Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation.
Circ Res 81, 512-525

139. Yue, L, Melnyk, P, Gaspo, R, Wang, Z, Nattel, S (1999)
Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation.
Circ Res 84, 776-784

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Ralph F. Bosch, für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Roman Laszlo und Frau Jeannette Gogel für ihre unermüdliche Unterstützung sowohl in der Entstehungs-, als auch in der Korrekturphase dieser Arbeit, bedanken.

Ferner gilt mein Dank:

- Herrn Dr. Alexander Schneck und Herrn Stephan Wöhrl für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre ebenso moralische wie auch praktische Unterstützung.
- Herrn Steffen Höss für seine wertvolle Hilfe bei graphischen Problemen und Frau Carmen Buckley für ihre Hilfe bei der Erstellung des Abstracts.
- Frau Claudia Schöllkopf für das gewissenhafte Durchlesen des Manuskripts und ihre von mir sehr geschätzten Korrekturen.
- Herrn Dr. Jörg Unger für seine unermüdliche Hilfe und Gelassenheit, die manchmal dringend notwendig war.
- Und letztlich meinen Eltern für ihre Geduld und Unterstützung.

Lebenslauf

20.12.1979	Geboren als Tochter von Marianne und Manfred Joos in Bietigheim-Bissingen
08/86 – 07/9	Grundschule Hillerschule in Bietigheim-Bissingen
08/90 – 06/99	Ellentalgymnasium in Bietigheim-Bissingen
23.06.1999	Abitur am Ellentalgymnasium in Bietigheim-Bissingen
10/1999	Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
04.10.2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung in Tübingen
02.10.2002	Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) in Tübingen
04/2004	Beginn der Promotionsarbeit im Labor für zelluläre kardiale Elektrophysiologie der Universitätsklinik Tübingen unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Ralph F. Bosch
06.06.2005	Staatsexamen an der Eberhard-Karls-Universität
Seit 10/2005	Vorbereitungsassistentin in der Praxis Drs. Rieger in Reutlingen