

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Univ.-Professor Dr. med. Martin Lohse

**Erhöhte Calcium-Empfindlichkeit
der kardialen Myofilamente –
ein Mechanismus bei der
Entstehung von Herzrhythmusstörungen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Tilman Schober
aus Münster in Westfalen

Würzburg, September 2007

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Lohse

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Januar 2009

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.1.1 Plötzlicher Herztod	1
1.1.2 Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie	2
1.1.3 Ca ²⁺ und der kardiale Kontraktionszyklus.....	3
1.1.4 Die Ca ²⁺ -Empfindlichkeit der Myofilamente	5
1.1.5 Regulation der Ca ²⁺ -Empfindlichkeit	6
1.1.6 Ca ²⁺ -Sensitizer.....	8
1.2 Fragestellung.....	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Versuchstiere	12
2.1.1 Mäuse.....	12
2.1.2 Katzen	13
2.2 Präparation der isoliert-perfundierten Herzen.....	13
2.2.1 Mäuse.....	13
2.2.2 Katzen	14
2.3 Elektrophysiologische Messungen an isolierten Herzen	14
2.3.1 Volumen-abgeleitete EKGs und monophasische Aktionspotentiale	14
2.3.2 Messungen der effektiven Refraktärzeit.....	17
2.3.3 Arrhythmie-Protokoll.....	18
2.4 Kontraktile Messungen an isolierten Herzen.....	19
2.5 Isolierung der Kardiomyozyten.....	20
2.6 Intrazelluläre Ca²⁺-Messungen.....	21
2.7 Chemikalien, Ca²⁺-Sensitizer.....	22
2.8 Statistik.....	23

3 Ergebnisse.....	24
3.1 Veränderungen des intrazellulären Ca²⁺-Zyklus.....	24
3.1.1 Erniedrigte Ca ²⁺ -Transienten mit verlangsamtem Abfall	24
3.1.2 Erhöhung der diastolischen Ca ²⁺ -Konzentration bei schnellen Herzfrequenzen und β-adrenerger Stimulation	25
3.1.3 Erhöhung der Ca ²⁺ -Gehalts des Sarkoplasmatischen Retikulum bei β-adrenerger Stimulation	28
3.2 Veränderungen der Aktionspotential-Regulation.....	30
3.2.1 Veränderungen der Repolarisation im Steady-state-Zustand....	30
3.2.2 Frequenzabhängige Verlängerung der Aktionspotential-Dauer nach Pausen	33
3.2.3 Frequenzabhängig erhöhte Rate von Nachdepolarisationen und getriggerten Schlägen.....	36
3.2.4 Isoproterenol hat keinen wesentlichen Effekt auf die beobachteten Aktionspotential-Veränderungen	39
3.2.5 Aktionspotential-Veränderungen und vermehrte Nach- depolarisationen zeigen sich auch in Katzenherzen	40
3.3 Veränderungen auf Organ-Ebene	43
3.3.1 EKG-Veränderungen und eine verkürzte effektive Refraktär- zeit in Mäusen und Katzen.....	43
4 Diskussion	45
4.1 Auswirkungen des veränderten Ca²⁺-Zyklus	45
4.1.1 Erniedrigung und Verlangsamung der Ca ²⁺ -Transienten durch vermehrte Ca ²⁺ -Pufferung.....	45
4.1.2 Erhöhte diastolische Ca ²⁺ -Konzentration und eingeschränkte Relaxation bei schnellen Herzfrequenzen	47
4.1.3 Einfluss β-adrenerger Aktivierung auf den Ca ²⁺ -Zyklus	49
4.1.4 Vergrößerung des Ca ²⁺ -Inhalts des SR.....	50
4.2 Relevanz der diastolischen Dysfunktion	52

4.3 Mechanismen der Aktionspotential-Veränderung	53
4.3.1 Ca^{2+} moduliert das Aktionspotential über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Austauscher	53
4.3.2 Auswirkung von Dehnung auf die Aktionspotential-Regulation .	56
4.4 Mechanismen der Arrhythmie-Entstehung	58
4.4.1 Entstehung der Nachdepolarisationen durch Ca^{2+} -aktivierten transienten Einwärtsstrom	58
4.4.2 Erleichterung eines Wiedereintritts durch Verkürzung der Refraktärzeit.....	59
4.4.3 Weitere mögliche Mechanismen der Arrhythmogenese	60
4.4.4 Differentieller Effekt β -adrenerger Aktivierung.....	61
4.4 Bedeutung der Studie.....	63
4.5 Einschränkungen der Studie.....	63
5 Zusammenfassung	65
6 Literatur	67

Abkürzungen

AP	Aktionspotential
APD _x	Aktionspotentialdauer bei x % Repolarisation
BDM	2,3-Butanedionmonoxim
CamKII	Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
CICR	<i>Calcium-induced Calcium Release</i>
DAD	<i>Delayed Afterdepolarization</i> , späte Nachdepolarisation
EAD	<i>Early Afterdepolarization</i> , frühe Nachdepolarisation
EKG	Elektrokardiogramm
ERZ	Effektive Refraktärzeit
Fa.	Firma
FHK	Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie
Fura-2	Fura-2-Acetoxymethylester
GS	Getriggter Schlag
I _{Ca}	Stromfluss über L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle der Plasmamembran
I _{Na/Ca}	Stromfluss über den Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
I _{ti}	<i>Transient inward current</i> , transienter Einwärtsstrom
MAP	Monophasisches Aktionspotential
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PVB	<i>Premature Ventricular Beat</i> , vorzeitiger ventrikulärer Schlag
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SAC	<i>Stretch-activated Channel</i> , dehnungsabhängiger Ionenkanal
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TNT	Troponin T
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

1.1.1 Plötzlicher Herztod

Plötzlicher Herztod, definiert als Tod kardialer Genese im Schlaf oder innerhalb von einer Stunde nach Auftreten der ersten Symptome, ist eine der häufigsten unmittelbaren Todesursachen weltweit und einer der wichtigsten Probleme der Kardiologie und Notfallmedizin.¹ In Deutschland versterben jährlich etwa 100.000 Menschen an plötzlichem Herztod, in den USA sind es nach konservativen Schätzungen etwa 400.000 Menschen; dies entspricht etwa einem Zehntel der jährlichen Gesamtsterblichkeit.^{2,3} Über 90% der Fälle werden dabei durch ventrikuläre Tachykardien und folgendes Kammerflimmern sowie Kreislaufversagen ausgelöst.^{1,4} Neben der hohen Inzidenz und der niedrigen Rate erfolgreicher Wiederbelebungen stellt die unerwartete, plötzliche Natur des Ereignisses ein besonderes Problem dar.

Der wichtigste Risikofaktor des plötzlichen Herztodes im hohen Alter ist die koronare Herzkrankheit. Der plötzliche Herztod ist dessen schwerwiegendste und oftmals auch erste Manifestation.¹ So findet sich bei plötzlich verstorbenen Sportlern über 35 Jahren in etwa 80% eine koronare Herzkrankheit als wahrscheinliche Todesursache.⁵ Bei Kindern und jungen Erwachsenen hingegen spielt die Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie (FHK) als Risikofaktor die entscheidende Rolle.^{6,7} Bei verstorbenen Sportlern unter 35 Jahren findet man entsprechend in etwa der Hälfte der Fälle eine zu Grunde liegende FHK.⁵

1.1.2 Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie

Die FHK beruht auf Mutationen der kontraktilen Proteine des Herzens.⁷ Mit einer gesicherten Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung von 0,2% und einer deutlich höheren Dunkelziffer ist es eine relativ häufige Erkrankung.^{8,9} In der Mehrzahl der Fälle ist es eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, daher der Name *Familiäre* Hypertrophe Kardiomyopathie. Seit ihrer Erstbeschreibung durch Alfred Vulpian im Jahre 1868¹⁰ sind mehr als 150 ursächliche Punktmutationen von bisher elf verschiedenen Proteinen gefunden worden. Sie wirken wahrscheinlich nicht über eine Haploinsuffizienz mit entsprechender Veränderung der Protein-Stöchiometrie, sondern werden normal in das Wildtyp-Protein eingebaut und ändern als so genanntes *poison peptides* dessen Funktion.¹¹ Die Mehrheit der Mutationen betrifft die schwere Kette des β -Myosins mit etwa 30% der Fälle, Troponin T (TNT)-Mutationen stehen mit 15% an zweiter Stelle, während α -Tropomyosin, Myosin-Bindeprotein C, Myosin-Leichtketten, Troponin I, Aktin und Titin zusammen etwa 5% ausmachen.^{7,12-14} In bis zu 50% der FHK-Fälle ist der genetische Defekt bisher unbekannt.

Das klinische Spektrum der FHK reicht vom plötzlichem Herztod bis zu langsam fortschreitender kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz.¹⁵ Die Anfälligkeit für plötzlichen Herztod und letztendlich die klinische Prognose der Mutationen sind eng mit dem Phänotyp, d.h. mit dem Ausmaß an Hypertrophie und Fibrose korreliert.^{16,17} Obwohl die klinische Diagnose üblicherweise auf Basis der myokardialen Wandverdickung gestellt wird, so ist inzwischen bekannt, dass jegliche Wanddicke mit einer FHK-Mutation vereinbar ist.¹⁴ Eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen haben bislang leider keine klaren Ergebnisse liefern können.^{14,18} Insofern sind die Mechanismen, die zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen in jungen Patienten ohne manifeste Hypertrophie führen, bisher kaum verstanden.

Eine besondere Gruppe stellen Patienten mit bestimmten TNT-Mutationen dar, die frühzeitig auch in Abwesenheit von Hypertrophie und Fibrose an

Herzrhythmusstörungen versterben und einen deutlich überproportionalen Anteil der plötzlichen Todesfälle ausmachen.^{14,19,20} Sie betreffen vor allem junge Patienten, und das Risiko eines plötzlichen Herztodes scheint vom histologischen Befund weitgehend unabhängig zu sein.^{21,22}

Nach *in-vitro*-Studien haben TNT-Mutationen unterschiedliche Wirkungen auf die Regulation der Kontraktion, z.B. in Änderungen der maximal entwickelten Kraft, der Aktin/Myosin-ATPase-Aktivität oder der pH-Abhängigkeit.^{23,24} Interessanterweise erhöhen beinahe alle TNT-Mutationen die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente.^{12,24-32} Dies legt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit eine eigenständige Rolle bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen darstellt.^{23,33}

1.1.3 Ca^{2+} und der kardiale Kontraktionszyklus

Zum Verständnis der Auswirkungen einer veränderten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente erscheint eine Erläuterung des kardialen Kontraktionszyklus sinnvoll (Abb. 1).³⁴⁻³⁷ Bei der Depolarisation der Zellmembran gelangt Ca^{2+} durch Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ in die Zelle, dieser Einstrom trägt zum Plateau des Aktionspotentials (AP) bei. Der Ca^{2+} -Einstrom löst darüber hinaus eine weitere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) aus. Diese übertrifft mengenmäßig den initialen Einstrom bei Weitem. Dieser Vorgang wird auch als *Calcium-induced Calcium Release* (CICR) bezeichnet. Die nachfolgende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) erlaubt eine Aktivierung der dünnen Filamente: Ca^{2+} bindet an Troponin C, die Ca^{2+} -bindende Untergruppe des Troponins. Diese bildet zusammen mit Troponin T, Troponin I und Tropomyosin die regulatorische Komponente des kontraktiven Apparates des Kardiomyozyten. Die Bindung von Ca^{2+} am Troponin C entfernt die hemmenden Wirkungen des Troponin I und des Troponin T-Tropomyosin-Komplexes, Aktin und Myosin können so interagieren. Der „Kopf“ des Myosins und Aktin bilden Querbrücken und es

kommt zur Kontraktion, wie sie erstmals von Andrew Huxley im Jahr 1954 beschrieben wurde.³⁸ Eine Erniedrigung des $[Ca^{2+}]_i$ ermöglicht anschließend die Relaxation. Hierfür muss Ca^{2+} wieder aus der Zelle entfernt werden, dieses findet über vier unterschiedliche Wege statt: die SR- Ca^{2+} -ATPase, die zellmembran-ständige Ca^{2+} -ATPase, den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und eine Aufnahme in die Mitochondrien. Der Aufnahme in das SR kommt dabei der bei weitem größte Anteil zu; beim Menschen und anderen großen Säugetieren wie Katzen sind es etwa 70% des freigesetzten Ca^{2+} , bei der Maus sogar über 90%.^{36,39}

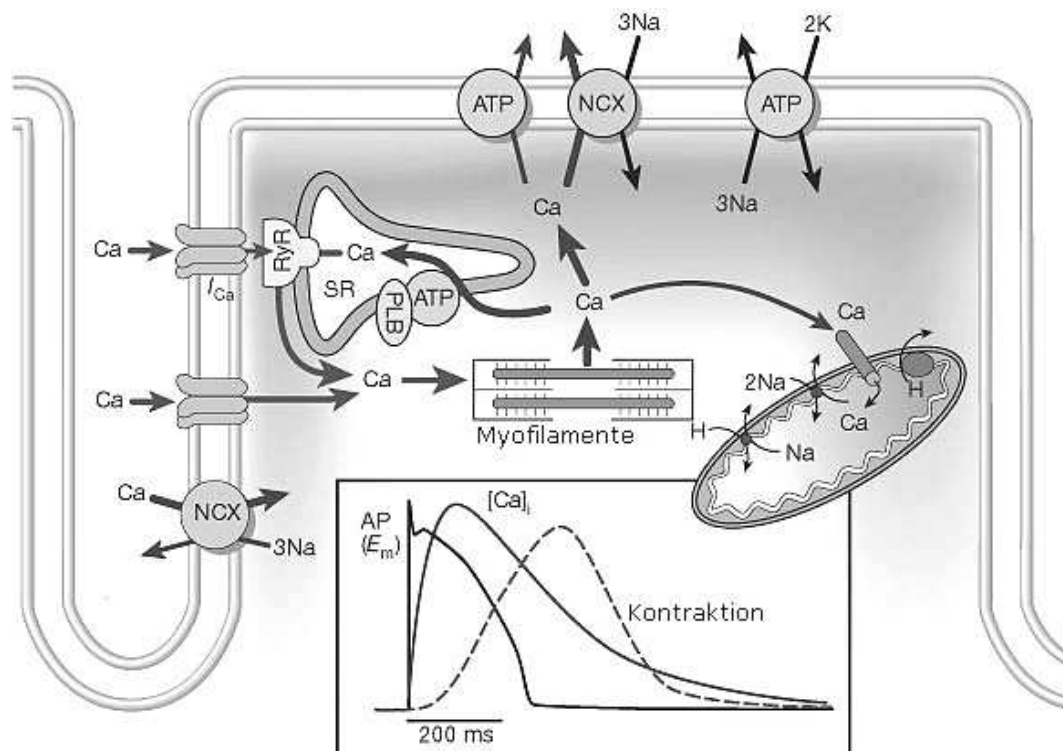


Abbildung 1. Ca^{2+} -Zyklus eines Kardiomyozyten. Das Fenster zeigt ein Aktionspotential, den folgenden Ca^{2+} -Transienten sowie den entsprechenden Kontraktionsablauf. NCX bedeutet Na^+/Ca^{2+} -Austauscher, RyR Ryanodin-Rezeptor, ATP ATPase; PLB Phospholamban und SR Sarkoplasmisches Retikulum. (Abb. modifiziert nach Bers.³⁴)

1.1.4 Die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente

Für die Kraftentwicklung der Kontraktion sind zwei Faktoren entscheidend: Erstens die Höhe und Dauer des Ca^{2+} -Transienten, d.h. des Zeitverlaufs von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ innerhalb einer Herzaktion, zweitens die Kraft, die bei vorgegebenem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entwickelt wird. Diese entwickelte Kraft ist wiederum eine Funktion der *Anzahl* der gebundenen Querbrücken (abhängig vom Ausmaß der Aktivierung der dünnen Filamente) und der *Kraft* jeder einzelnen Querbrücke. Messungen der Ca^{2+} -Empfindlichkeit erhält man mit Hilfe isometrischer Muskel-Präparationen, wobei die Abhängigkeit zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und entwickelter Kraft gemessen wird.⁴⁰ Die entstehenden Kurven werden auf die maximal entwickelte Kraft normalisiert. Diese wird erhalten, wenn alle verfügbaren Troponin C-Moleküle Ca^{2+} gebunden haben und die maximale Anzahl krafterzeugender Querbrücken gebildet ist. Auf diese Weise kann man für jegliche Unterschiede in der Kraftproduktion der einzelnen Querbrücken korrigieren. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit zeigt sich dabei als Linksverschiebung dieser Kurve. So ist für ein gegebenes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Aktivierung der dünnen Filamente höher und mehr Troponin C-Moleküle haben Ca^{2+} gebunden. Die Aktivierung der dünnen Filamente ist ein sehr kooperativer Prozess mit einem Hill-Koeffizienten von über 5 im intakten Herzmuskel, so dass die erhaltenen Kurven eine ausgeprägte nicht-lineare Abhängigkeit zeigen.⁴¹ Abbildung 2 zeigt ein repräsentatives Beispiel.

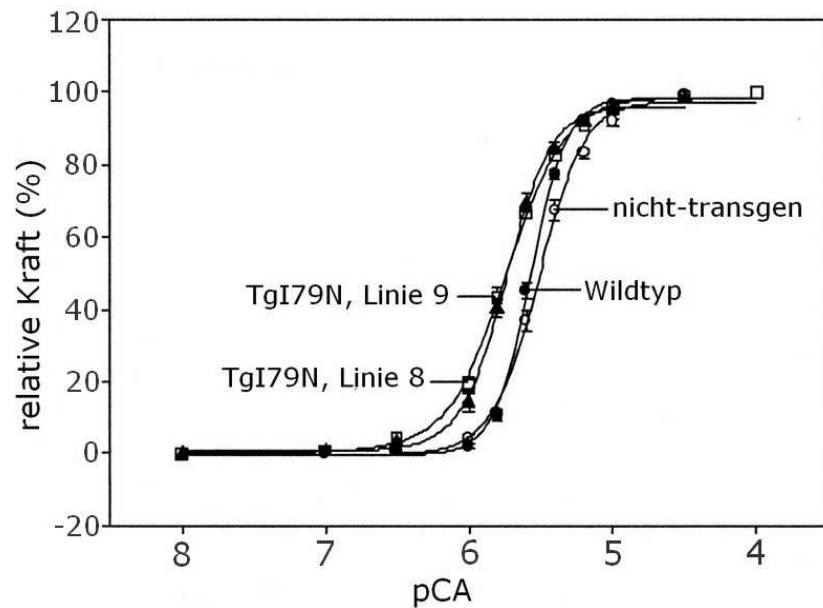


Abbildung 2. Die Ca^{2+} -Empfindlichkeit als Abhängigkeit zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der entwickelten Kraft, normalisiert auf die maximal entwickelte Kraft. Das Beispiel zeigt zwei Linien transgener Mäuse mit einer Troponin T-Mutation (TgI79N) im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren sowie Tieren, die den humanen Wildtyp exprimieren (Abb. modifiziert nach Miller et al.⁴²).

1.1.5 Regulation der Ca^{2+} -Empfindlichkeit

Die Ca^{2+} -Empfindlichkeit wird von einer Vielzahl von Faktoren eng reguliert, um dem Herzen kurz- und langfristige Anpassungen an veränderte Anforderungen zu ermöglichen. Eine Füllung des Herzens und entsprechende Dehnung der Myofilamente führt zu einer signifikanten Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit, vor allem hervorgerufen durch eine optimierte Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente.^{34,35,43} Dieser wichtige autoregulatorische Mechanismus ermöglicht dem Herzen auf wechselnde Vorlasten auf einer Schlag-zu-Schlag-Basis zu reagieren, er ist auch als Frank-Starling-Mechanismus bekannt.⁴⁴ Zu einer Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit hingegen kommt es bei Azidose, erhöhten Phosphat- und Mg^{2+} -Konzentrationen.^{34,35} Alle drei Faktoren kommen bei Ischämie

vor. Die Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit spielt wahrscheinlich initial eine Rolle bei der Einschränkung der Kontraktilität bei kardialer Ischämie. Eine Reduzierung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit resultiert auch aus β -adrenerger Aktivierung. Hierbei kommt es über eine Stimulation der Adenylatzyklase und eine vermehrte Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese erniedrigt die Ca^{2+} -Empfindlichkeit vorwiegend über eine Phosphorylierung von Troponin I.^{35,45} Die Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit spielt auch eine Rolle bei der beschleunigten Relaxation des Herzens mit β -adrenerger Stimulation, dem so genannten lusitropen Effekt.⁴⁵ Dieser ist vor allem durch eine schnellere Ca^{2+} -Aufnahme in das SR bedingt, welche über eine PKA-induzierte Phosphorylierung von Phospholamban vermittelt wird. Eine Ca^{2+} -Empfindlichkeit wirkt dabei unterstützend, indem sie eine schnellere Dissoziation des gebundenen Ca^{2+} von den Myofilamenten erlaubt. Die Ca^{2+} -Bindung der Myofilamente spielt insgesamt eine bedeutende Rolle als Puffer im Ca^{2+} -Zyklus einer Herzmuskelzelle.³⁶ So bindet etwa 50% des aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} während eines typischen Herzschlages an Troponin C.⁴⁶ Insofern werden Änderungen der Ca^{2+} -Empfindlichkeit nicht nur die myokardiale Kontraktilität erhöhen, sondern vielfältige zusätzliche Auswirkungen auf den Ca^{2+} -Zyklus der Myozyten haben.

Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit findet sich auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz und bei Tieren nach einem Myokard-Infarkt,⁴⁷⁻⁵¹ zwei Zuständen die ebenfalls mit einer hohen Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien einhergehen und die wichtigsten Ursachen für den plötzlichen Herztod im Alter darstellen.^{5,52,53}

In beiden Fällen scheint die Ursache in einer veränderten Signaltransduktion bei adrenerger Stimulierung zu liegen, hervorgerufen durch eine verminderte Phosphorylierung des Troponin I.⁴⁹⁻⁵¹ Ausdauertraining ist erwiesenermaßen eines der effektivsten Therapieverfahren nach einem Herzinfarkt, es senkt klinisch und experimentell die Mortalität und

insbesondere auch die Anfälligkeit für plötzlichen Herztod.⁵⁴⁻⁵⁷ Interessanterweise normalisiert Ausdauertraining nach einem Herzinfarkt im Tiermodell die zuvor erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit, wie de Waard und Kollegen kürzlich zeigen konnten.⁵⁰ Der Stellenwert dieser Daten ist noch nicht eindeutig zu beurteilen, er verdient jedoch einer näheren Betrachtung.⁵⁸

1.1.6 Ca^{2+} -Sensitizer

Die Ca^{2+} -Empfindlichkeit lässt sich auch pharmakologisch erhöhen. Seit einigen Jahrzehnten wird versucht, den positiv inotropen Mechanismus einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit mit Hilfe so genannter Ca^{2+} -Sensitizer bei der Behandlung der Herzinsuffizienz zu nutzen. Medikamente, die ausschließlich über eine Veränderung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit wirken, haben sich jedoch nicht durchsetzen können und keine klinische Zulassung erhalten, da sie eine diastolische Dysfunktion verstärken.⁵⁹ Das am besten untersuchte Medikament dieser Gruppe ist EMD 57033. Es wirkt wahrscheinlich durch Reduktion der hemmenden Wirkung des TNT-Tropomyosin-Komplexes sowie durch direkten Eingriff in den Querbrückenzyklus. Damit ist es in seiner Wirkung sowohl unabhängig von Ca^{2+} als auch vom Troponin C.⁶⁰ Zusätzlich zu seiner Wirkung auf die Ca^{2+} -Empfindlichkeit besitzt es eine äußerst schwache Phosphodiesterase (PDE)-III-inhibitorische Wirkung, die jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen zu tragen kommt und in physiologischen Konzentrationen zu vernachlässigen ist.⁶¹ Vor einigen Jahren konnten Evans und Kollegen zeigen, dass EMD 57033 die Anfälligkeit für ventrikuläre Tachykardien im Tiermodell erhöht,⁶² allerdings konnte eine andere Gruppe diese Ergebnisse nicht bestätigen.⁶³ Somit bleibt das Thema kontrovers.

Eine klinische Zulassung erhalten haben hingegen Ca^{2+} -Sensitizer, die eine ausgeprägte PDE-inhibitorische Wirkung aufweisen: einzige Vertreter dieser Gruppe sind Levosimendan und Pimobendan.⁵⁹ Sie werden als Mittel der zweiten und dritten Wahl bei schwerer Herzinsuffizienz eingesetzt.

Durch die Hemmung der Phosphodiesterase-III kommt es über eine Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphats zu einem lusitropen Effekt, der dem einer β -adrenergen Stimulation ähnelt und der diastolischen Dysfunktion entgegen wirkt.⁶⁴ In klinischen Studien konnte jedoch keine Verbesserung der Mortalität mit Pimobendan nachgewiesen werden.⁶⁵ Für Levosimendan hingegen wurde in einer kontrollierten randomisierten Studie kürzlich eine erhöhte Inzidenz ventrikulärer Tachykardien berichtet.⁶⁶ Selbstverständlich können die beobachteten Arrhythmien vielfältige Ursachen haben; gleichwohl zeigen die zitierten Studien eine interessante weitere Assoziation zwischen erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit und plötzlichem Herztod.

1.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente ein unabhängiger Risikofaktor bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Einfluss sowohl akut als auch chronisch erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf 1) den Ca^{2+} -Zyklus 2) die Regulation des Aktionspotentials und 3) die Anfälligkeit für Arrhythmien untersucht.

Als chronisches Modell dienten transgene Mäuse mit einer TNT-Mutation (TgI79N), die eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit (Abb. 2) und eingeschränkte diastolische Relaxation, aber keine Hypertrophie oder Fibrose zeigen.^{42,67} Dieser Mutation wurde eine TNT-Mutation (TgR278C) mit unveränderter Ca^{2+} -Empfindlichkeit gegenübergestellt.²⁷ Sie zeigt ebenfalls eine eingeschränkte Relaxation,⁶⁸ besitzt klinisch/phänotypisch jedoch eine bessere Prognose und weist ebenfalls keine Hypertrophie oder Fibrose auf.^{18,27,69} Beide Gruppen wurden weiterhin mit nicht-transgenen Tieren (Non-Tg) sowie mit Mäusen verglichen, die humanes TNT exprimieren (Wildtyp, WT). Diese dienten als Kontrollgruppe.

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld zeigen, dass die TgI79N-Mutation *in vivo* nach Applikation des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol eine erhöhte Rate ventrikulärer Ektopie aufwies (Abb. 3). Dieses gilt auch für die Troponin-Mutationen F110I und ssTNI, die ebenfalls eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit aufwiesen. TgR278C hingegen zeigte keine vermehrte ventrikuläre Ektopie und unterschied sich nicht von den beiden Kontrollgruppen.

Als Modell für eine akut erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit wurde der Ca^{2+} -Sensitizer EMD 57033 gewählt. Wie erwähnt ähnelt dieser Wirkstoff in seiner Wirkung den allermeisten FHK-Mutationen, da er seine Wirkung nicht am Troponin C, sondern in der Interaktion der dicken und dünnen Filamente entwickelt. Weiterhin können mit dieser akuten Intervention sekundäre Langzeiteffekte wie Hypertrophie und Fibrose ausgeschlossen werden. Als Versuchsobjekt dienten hierbei neben Mäusen auch Katzen, die in ihrer Elektrophysiologie dem Menschen ähnlicher als Mäuse sind und daher eine gute Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen zulassen.^{70,71}

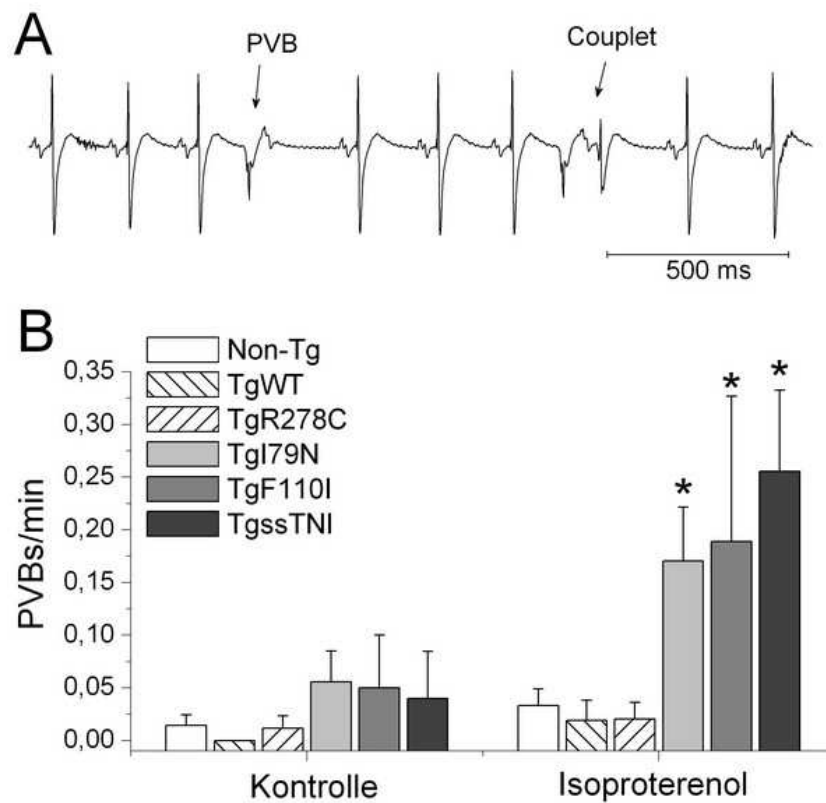


Abbildung 3. Ventrikuläre Ektopie in Troponin-Mutationen, induziert durch Isoproterenol. **A**, Beispiel eines vorzeitigen Schläges sowie eines *Couplets* in einer TgF110I-Maus. **B**, Inzidenz vorzeitiger ventrikulärer Schläge (*Premature Ventricular Beats*, PVBs) in anästhesierten Mäusen vor und nach Isoproterenol-Gabe. Non-Tg, n=14; TgWT, n=7; TgR278C, n=13; TgI79N, n=9; TgF110I, n=6; TgssTNI, n=5. *p<0,05.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den Einrichtungen für Versuchstiere im Georgetown University Medical Center, Washington DC, USA untergebracht. Die Tiere wurden entsprechend der Richtlinien des *National Institutes of Health* (NIH) gehalten. Die Experimente wurden vom *Institutional Animal Care and Use Committee* der Georgetown University genehmigt.

2.1.1 Mäuse

Die Tiere für das chronische Modell stellte die Arbeitsgruppe von Dr. James Potter der University of Miami School of Medicine, FL, USA zur Verfügung. Die Genierung und *in-vitro*-Charakterisierung dieser transgenen Modelle sind ausführlich beschrieben.^{27,42,67} Es handelte sich um männliche und weibliche Tiere im jeweils gleichen Verhältnis in allen Gruppen. Um die Teststärke zu erhöhen, wurden die Daten der beiden Kontrollgruppen, der nicht-transgenen Tiere sowie der Tiere mit Wildtyp-TNT, kombiniert. Vorherige Charakterisierungen hatten keine signifikanten Unterschiede bezüglich kontraktile Parameter *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Ferner bestanden *in vivo* keine Unterschiede zwischen nicht-transgenen und Wildtyp-Mäusen im Hinblick auf EKG-Parameter und der Inzidenz ventrikulärer Tachykardien.^{42,68}

Für das Akutmodell wurden 3-4 Monate alte Mäuse beiderlei Geschlechts vom ICR-Stamm verwandt, sie wurden von der Fa. Taconic Inc.; Germantown, NY, USA bezogen.

2.1.2 Katzen

Die Katzen wurden von der Fa. Biomedical Association Inc.; Friedensburg, PA, USA bezogen; es handelte sich um männliche und weibliche Tiere.

2.2 Präparation der isoliert-perfundierten Herzen

2.2.1 Mäuse

Die Mäuse wurden heparinisiert (250 IE Natrium-Heparin; Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) und mit 2%igem Tribromoethanol (20 ml/kg Körpergewicht; Fa. Fisher Scientific; Hampton, NH, USA) intraperitoneal anästhesiert. Nachdem eine für chirurgische Eingriffe ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurden eine Thorakotomie durchgeführt und das Herz entfernt. Die Herzen wurden vom umgebenden Fettgewebe befreit, die Aorta wurde präpariert und kanüliert. Das Herz konnte so retrograd perfundiert werden, da das herzwärts strömende Perfusat einen Schluss der Aortenklappen bewirkt und in die Koronararterien fließt. Dieses Verfahren, 1895 von Oscar Langendorff erstmals beschrieben,⁷² ist auch als Langendorff-Perfusion bekannt.

Über eine Rollerpumpe (Minipulse, Fa. Gilson; Middleton WI, USA) erfolgte die Zufuhr des Perfusats, der Perfusionsdruck betrug 80 ± 10 mmHg, die Temperatur $36,5^{\circ}$ C. Als Perfusionslösung wurde Krebs-Henseleit-Puffer verwandt, mit der Zusammensetzung (mmol/l): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,3; MgSO₄ 1,2; Na-EDTA 0,5; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; Glukose 11. Der Puffer wurde für mindestens eine Stunde ausbalanciert mit 95% O₂ und 5% CO₂, um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Der Fluss der Vv. cordis minimae (Thebesii) wurde durch eine kleine Öffnung im Apex der linken Kammer drainiert, welches mit einer 25 Gauge-Nadel gestochen worden war.

2.2.2 Katzen

Die Katzen wurden durch eine intramuskuläre Gabe von Ketamin (22 mg/kg Körpergewicht) und Acepromazin (0,2 mg/kg Körpergewicht; jeweils Fa. Fisher Scientific; Hampton, NH, USA) sediert und analgisiert. Über die linke Vena femoralis wurde ein intravenöser Zugang gelegt und Heparin appliziert (500 IE Natrium-Heparin; Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Anschließend wurde intravenös Pentobarbital (25 mg/kg Körpergewicht; Fa. Fisher Scientific; Hampton, NH, USA) gegeben, bis eine für chirurgische Eingriffe ausreichend tiefe Anästhesie erreicht war. Über eine mediane Sternotomie wurde das Herz entfernt und entsprechend dem Vorgehen bei der Maus an eine Langendorff-Perfusion angeschlossen. Der Perfusionsdruck betrug dabei 90 ± 10 mmHg, ansonsten unterschied sich der Aufbau nicht vom oben beschriebenen bei der Maus.

2.3 Elektrophysiologische Messungen an isolierten Herzen

2.3.1 Volumen-abgeleitete EKGs und monophasische Aktionspotentiale

Der experimentelle Aufbau der elektrophysiologischen Messungen an Maus-Herzen wird in Abbildung 4 gezeigt. Die Apparatur ist speziell für die beschriebenen Experimente gefertigt worden.

Das kanülierte Herz wurde in ein mit Perfusionslösung gefülltes Bad gelegt. Dort ruhte es horizontal in einer Mulde aus Silikon für mindestens 10 Minuten, bevor Messungen durchgeführt wurden. Das EKG wurde über vier Silber/Silberchlorid-Elektroden abgeleitet, die ähnlich der Einthoven-Konfiguration um die Mulde positioniert waren.⁷³

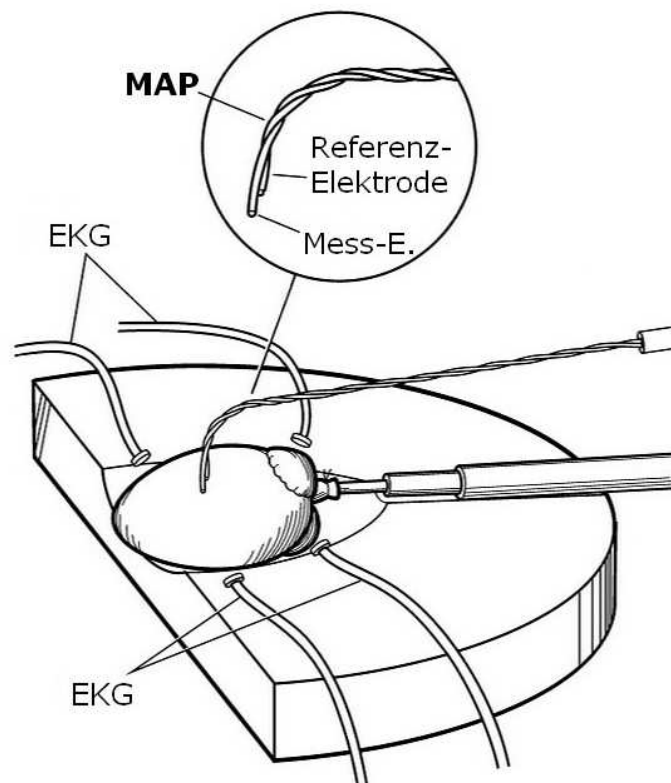


Abbildung 4. Experimenteller Aufbau für elektrophysiologische Untersuchungen isoliert-perfundierter Herzen (Abb. modifiziert nach Knollmann et al.⁷⁴)

Die Messung ventrikulärer Aktionspotentiale in intakten Herzen in Form von Monophasischen Aktionspotentialen (MAPs) sind von Franz, Knollmann und Kollegen ausführlich beschrieben und gegenüber transmembranen Aktionspotentialen validiert worden.⁷⁴⁻⁷⁶ Durch den Kontakt des Katheters auf dem Myokard kommt es zu einer lokalen Depolarisation in unmittelbarer Nachbarschaft der Elektrode. Die entstehenden Feldströme können mit Hilfe der MAP-Elektrode relativ verlustfrei aufgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden MAPs mit Hilfe eines 0,25 mm-Katheters gewonnen, der dafür speziell gefertigt worden war. Dieser besteht aus einem elastischen Strang zwei verdrehter Silberdrähte von 95%iger Reinheit, die durch Teflon-Hülsen bis auf die Spitze isoliert sind. Die

distalen 3 mm der Spitze sind im rechten Winkel zum Schaft gebogen. Die Spitzen beider Drähte sind galvanisch chloridiert, um Leckströme zu verhindern. Der als Mess-Elektrode vorgesehene Draht ist an der Spitze abgerundet, damit es nicht zu einer Verletzung des Myokards kommt. Die Spitze der Referenzelektrode endet etwa 2 mm proximal der Messelektrode, um gleichzeitigen Kontakt mit dem Myokard zu verhindern. Der MAP-Katheter wurde nun vorsichtig in rechten Winkel auf das Epikard des linken Ventrikels abgesenkt, bis ein schonender, aber stabiler Kontakt hergestellt war. Die elastische Eigenschaft des Schaftes stellte sicher, dass der Anpressdruck auch bei schlagendem Herzen konstant erhalten blieb.

Die EKG- und MAP-Aufnahmen wurden verstärkt (EKG: Fa. Stellar Technology Inc.; San Jose, CA, USA. MAP: EP Technologies Inc.; Manlo Park, CA, USA), mit einer Aufnahmezeit von 2000 Hz digitalisiert (Fa. Data Sciences International; Saint Paul, MN, USA) und in dem Datenaufnahme-System PowerLab gespeichert (Fa. ADInstruments Inc.; Menlo Park, CA, USA). Anschließend konnten die Daten *offline* analysiert werden. Für die morphologischen Untersuchungen von EKG und MAPs wurde eine speziell in LabVIEW geschriebene Software genutzt (Fa. National Instruments; Austin, TX, USA), für die Auswertung von Häufigkeiten arrhythmischer Aktivität wurde das Programm Chart des Datenaufnahme-Systems verwendet.

Die MAP-Aufnahmen mussten folgenden Qualitätskriterien erfüllen: eine stabile Grundlinie; ein gerader Aufstrich mit einer Dauer von weniger als 2 ms und einer Amplitudenhöhe von wenigstens 1 mV sowie eine schnelle erste Phase der Repolarisation ohne Plateau. Bei der typischen murinen MAP-Form gibt es kein Plateau in der frühen Repolarisationsphase, deshalb wurde der Beginn der Repolarisation mit der Spitze des jeweiligen MAPs definiert und das Ende der Repolarisation wurde in der elektrischen Diastole gemessen.⁷⁴ Abbildung 5 zeigt ein typisches Beispiel.

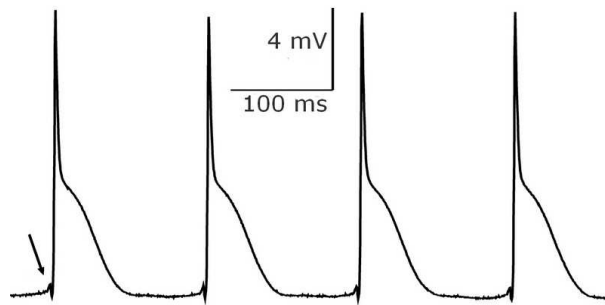


Abbildung 5. Repräsentatives Beispiel eines murinen MAPs von links-ventrikulärem Epikard. Stimuliert mit 400 Schlägen/min, der Pfeil zeigt auf das Stimulationsartefakt.

Mit Katzen-Herzen wurde bis auf folgende drei Ausnahmen gleichermaßen vorgegangen: die Herz-Mulde wurde der Größe angepasst, an Stelle des speziell gefertigten 0,25mm-Katheters wurde ein handelsüblicher MAP-Katheter (Fa. EP Technologies Inc.; Manlo Park, CA, USA) verwandt, und bei der Analyse der MAPs wurde der Beginn der Repolarisation mit der Spitze des Plateaus definiert.

2.3.2 Messungen der effektiven Refraktärzeit

Ein speziell gefertigter bipolarer Haken aus Platindraht wurde in den linken Ventrikel der isolierten Herzen eingebracht. Der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) wurde thermisch abladiert, so konnte eine spontane Aktivität unterbunden und eine gleichmäßige Weiterleitung der Erregung garantiert werden. Der Block des AV-Knotens wurde durch diskordante atriale und ventrikuläre Aktivität im EKG bestätigt. Mit Hilfe eines programmierbaren Stimulators (Fa. Bloom Associates Ltd; Reading, PA, USA) konnten die Herzen nun stimuliert werden; die Stimulationsstärke entsprach dabei dem Doppelten des diastolischen Schwellenwertes. Zur Messung der effektiven Refraktärzeit (ERZ) wurden die Herzen mit 400 Schlägen/min stimuliert.

Nach einer Stimulationsserie von 40 Schlägen folgte eine Pause mit einem Extrastimulus. Das Intervall zwischen Stimulationsserie und Extrastimulus wurde sukzessiv verkürzt und das längste Intervall, das keine fortgeleitete Erregung hervorbrachte, ergab die ERZ.

2.3.3 Arrhythmie-Protokoll

Für die Quantifizierung ventrikulärer Arrhythmien in transgenen Maus-Modellen haben sich Stimulationsprotokolle bewährt, nicht zuletzt in Mäusen mit FHK-Mutationen.⁷⁷ Weiterhin konnte beim Vergleich zweier FHK-Modelle eine signifikant häufigere Inzidenz induzierbarer Arrhythmien in der Mutante mit jeweils klinisch schlechteren Prognose gezeigt werden.⁷⁸ Vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass Nachdepolarisationen und getriggerte Arrhythmien häufiger nach Pausen auftreten. Deshalb wurde ein standardisiertes Stimulationsprotokoll entwickelt, um das Ausmaß an Nachdepolarisationen und ventrikulären Arrhythmien quantifizieren zu können. Nach Ablation des AV-Knotens wurden die isoliert-perfundierten Maus-Herzen mit dem Doppelten des diastolischen Schwellenwertes stimuliert. Bei unterschiedlichen Frequenzen wurden dabei Stimulationsserien von 40 Schlägen wiederholt. Nach dem letzten Schlag jeder Stimulationsserie, dem so genannten S1-Schlag, folgten eine Pause von 500 ms und ein weiterer Schlag, der so genannte S2-Schlag. Nach einer erneuten Pause von 500 ms begann eine neue Stimulationsserie. Arrhythmische Aktivität, die dem S2-Schlag folgte, wurde simultan mit Hilfe Volumen-abgeleiteter EKGs und MAPs aufgenommen. Aufnahme-Serien mit spontaner Aktivität in der ersten Pause, dem S1S2-Intervall, wurden verworfen.

Das Vorgehen bei Katzen war mit dem beschriebenen Protokoll weitgehend identisch; die Pause zwischen den Stimulationsserien war jedoch länger: 800 ms nach einer Stimulationsserie erfolgte der S2-Schlag, dem wiederum nach 500 ms ein weiterer Schlag innerhalb der Pause folgte.

Sämtliche Aufnahmen wurden blind ohne Kenntnis des Genotyps analysiert. Die MAP-Aufnahmen wurden mit den gleichzeitig aufgenommenen EKG-Signalen verglichen und klassifiziert als a) frühe Nachdepolarisation (Early Afterdepolarization, EAD), b) getriggelter Schlag, c) getriggerte ventrikuläre Arrhythmie, d) Artefakt bzw. nicht bestimmbar. Auffälligkeiten in den EKG-Aufnahmen wurden klassifiziert als a) getriggelter Schlag, b) getriggerte ventrikuläre Arrhythmie, c) Artefakt bzw. nicht bestimmbar.

Eine positive Auslenkung in der Repolarisationskurve wurde als EAD definiert. Bei einem Teil der EADs wurden die Amplitude des Schlages, die Amplitude des EADs, der Zeitpunkt des EAD-Beginns, das durchschnittliche Membranpotential bei EAD-Beginn (das so genannte *takeoff*-Potential) sowie der Zeitpunkt des EAD-Maximums analysiert. Für einen getriggerten Schlag mussten sowohl ein QRS-Komplex im EKG-Signals auch ein Aktionspotential im MAP-Signal vorhanden sein. Der Zeitabstand zwischen dem S2-Schlag und dem getriggerten Schlag durfte dabei 150 ms nicht überschreiten. Beobachtete *Couplets*, *Triplets* und ventrikuläre Tachykardien wurden als getriggerte ventrikuläre Arrhythmie gewertet, wenn sie im selben Zeitfenster von 150 ms nach dem S2-Schlag begannen.

2.4 Kontraktile Messungen an isolierten Herzen

Druckmessungen wurden mit Hilfe eines blasenfreien, wassergefüllten Ballons vorgenommen, welcher speziell aus Polyvinylchlorid-Folie hergestellt worden war. Der Ballon wurde über eine Inzision im linken Atrium durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht und mit einem kurzen Polyethylenschlauch verbunden.^{67,79} Ein 1,4 French-messender Mikrospitzen-Drucksensor (Fa. Millar Instruments Inc.; Houston, TX, USA) wurde über den Polyethylen-Schlauch im Inneren des Ballons positioniert. Der Ballon wurde nun mit Hilfe einer gasdichten 50 μ l-Glasspritze gefüllt. Er war so groß, dass beim Füllen des Ballons auf 50 μ l

nur ein Druck von maximal 2 mmHg durch den Ballon selbst erzeugt wurde. Der Ballon wurde langsam auf einem enddiastolischen Druck von 6-10 mmHg eingestellt. Durch eine Füllung des Ballons konnte nun der Einfluss einer veränderten Vorlast und einer entsprechenden Dehnung der Myofilamente auf kontraktile und elektrophysiologische Parameter untersucht werden. Der linksventrikuläre Druck wurde mit einer Aufnahmerate von 1000 Hz digitalisiert (Fa. Data Sciences International; Saint Paul, MN, USA) und mit Chart *offline* gemessen. Enddiastolischer und systolischer Druck von drei konsekutiven Schlägen während jedes Füllungszustandes wurden gemittelt, die Differenz zwischen beiden Werte ergab den entwickelten Druck.

2.5 Isolierung der Kardiomyozyten

Ventrikuläre Myozyten wurden mit Hilfe einer Modifikation der Kollagenase/Protease-Methode nach Mitra und Morad gewonnen.⁸⁰ Nach Exzision der Herzen wurde die Aorta kanüliert und für 5 Minuten mit Tyrode-Puffer perfundiert. Dieser war wie folgt zusammengesetzt (mmol/l): NaCl 137; KCl 5,4; MgCl₂ 0,5, HEPES 10; Glukose 10. Der pH war mit Hilfe von HCl und NaOH bei 7.4 eingestellt worden. Es folgte eine Perfusion für 7-9 Minuten mit 50 ml Tyrode-Puffer. Dieser erhielt zusätzlich 25 mg Kollagenase B, 15 mg Kollagenase D (jeweils Fa. Boehringer Ingelheim; Ingelheim, Deutschland) und 2 mg Protease (Type IV, Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

Der linke Ventrikel wurde nun entfernt und in 50 ml der Isolations-Lösung zerkleinert. Die Myozyten wurden filtriert und für 15 Minuten ruhen gelassen. Bis zu diesem Schritt hatten alle Lösungen zusätzlich Albumin (1 mg/ml) und 2,3-Butanedionmonoxim (BDM, 10 mmol/l) enthalten. Um eine Ca²⁺-Toleranz der Zellen zu erreichen, wurden sie anschließend mit Tyrode-Lösung ansteigender Ca²⁺-Konzentrationen (0,06; 0,2; 0,6 und 1,2 mmol/l) und absteigender BDM-Konzentrationen (9,5; 8; 5 und 0 mmol/l)

gewaschen. Dieses Prozedere erbrachte etwa 30-50% stäbchenförmige Ca^{2+} -tolerante Myozyten, die bis zu 8 Stunden für Experimente benutzt werden konnten.

2.6 Intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen

Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Tyrode-Puffer inkubiert (1,2 mmol/L Ca^{2+}), der 1 $\mu\text{mol/L}$ des lipophilen, membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2; Fa. Molecular Probes; Eugene, OR, USA) enthielt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem Tyrode-Puffer gewaschen, der 500 $\mu\text{mol/L}$ Probenecid (Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) enthielt. Dadurch konnte das Ausströmen von Fura-2 minimiert werden. Die Zellen wurden nun in der Dunkelheit für zwei Stunden inkubiert, um eine Aufspaltung der Estherbindung des Fura-2 durch endogene Esterasen zu erlauben. Dies ergibt einen hydrophilen, nicht-membranpermeablen Farbstoff. Die Zellen wurden in eine geheizte Kammer transportiert, für 15-20 Minuten mit Tyrode-Puffer (1,8 mmol/L Ca^{2+} , 33°C) umspült und anschließend bei 1 Hz mit Hilfe eines SD4-Feldstimulators (Fa. Grass Instruments; Quincy, MA, USA) stimuliert.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen lassen sich mit Fura-2 messen, da das Anregungsspektrum dieses Farbstoffs von der Bindung freier Ca^{2+} -Ionen abhängig ist. Die Fluoreszenz ändert sich sowohl mit der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als auch mit der Wellenlänge des Anregungslichts.⁸¹ Diesen Effekt kann man sich zu Nutze machen, indem man photometrisch Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen schnell-alternierend mit 1,2 kHz emittiert (Fa. Vibraspec Inc; Bear Island, ME, USA). Anregungswellenlängen von 340 und 410 nm wurden genutzt, um Fluoreszenzsignale des Ca^{2+} -gebundenen und Ca^{2+} -freien Fura-2 aufzuzeichnen.⁸² Sobald Fura-2 freies Ca^{2+} bindet, nimmt seine Emissionsintensität bei

Anregung mit 340 nm zu, bei Anregung mit 410 nm jedoch ab. Subtrahiert man nun die zelluläre Autofluoreszenz und bildet den Quotienten der beiden Anregungswellenlängen, so lässt sich aus dem ermittelten Quotient F_{340}/F_{410} die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration abschätzen. Fura-2 kompartmentalisiert in den Mitochondrien,⁸³ deshalb ist die Berechnung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf der Basis absoluter Fura-2-Fluoreszenz-Werte in intakten Zellen problematisch.

Den Zeitverlauf von $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb einer Herzaktion bezeichnet man als Ca^{2+} -Transienten. Nach 5-10 minütiger gleichmäßiger Stimulation wurden für jede experimentelle Bedingung drei konsekutive Ca^{2+} -Transienten analysiert. Der Grundlinien-Wert und die Amplitude der Transienten wurden gemessen und gemittelt. Weiterhin wurde der Abfall der Transienten an die monoexponentielle Kurve $y(t)=a \times \exp(-t/k)-b$ angepasst. Hierbei entspricht „a“ der Amplitude des Transienten und „b“ dem Grundlinien-Wert ; „k“ ergibt die Zeitkonstante (τ) des Abfalls.⁸⁴ Der Grundlinien-Wert wurde als Maß des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ verwandt.

Zusätzlich wurde einem Teil der Zellen plötzlich 10 mmol/L Koffein für jeweils 5 Sekunden zugefügt. Aus der Höhe der Koffein-indizierten Ca^{2+} -Transienten lässt sich der Ca^{2+} -Inhalt des Sarkoplasmatischen Retikulum abschätzen.⁸⁵

2.7 Chemikalien, Ca^{2+} -Sensitizer

EMD 57033 wurde von der Fa. Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland zur Verfügung gestellt. Es wurde als Vorratslösung in einer Konzentration von 3 mmol/L in Dimethylsulfoxid aufbewahrt. Für die Untersuchung des Effekts von EMD 57033 wurde in allen verwandten Lösungen eine Dimethylsulfoxid-Konzentration von 0,01% eingestellt. Die Konzentration von EMD 57033 war 3 μ mol, sofern dies nicht anderweitig angegeben ist. Für isoliert-perfundierte Maus Herzen liegen bislang keine Erfahrungen vor, für Experimente mit Ratten und Kaninchen werden in der Literatur

Konzentrationen zwischen 2 und 4 μmol angegeben.^{62,86}

Vorherige Studien haben gezeigt, dass EMD 57033 eine leichte PDE-III-inhibitorische Komponente besitzt, selbst wenn diese erst bei Konzentrationen über 20 μmol in Erscheinung treten.^{61,87} Zum Ausgleich war ein β -adrenerger Rezeptorblocker (0,1 $\mu\text{mol/L}$ Propranolol, Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) in allen Lösungen zugegen, sofern das Experiment nicht den Einsatz des β -Agonisten Isoproterenol beinhaltete.

Alle anderen, nicht genannten Chemikalien und Reagenzien wurden von der Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA bezogen.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler gezeigt, sofern es nicht anders angegeben ist. Arithmetische Mittelwerte wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Ein t-Test oder gepaarte t-Tests wurden durchgeführt, falls signifikante Unterschiede mit Hilfe von ANOVA festgestellt wurden. Häufigkeiten wurden durch χ^2 oder den exakten Test nach Fisher verglichen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant eingeschätzt, wenn der p-Wert weniger als 0,05 betrug.

Die Statistik wurde durchgeführt mit Excel (Fa. Microsoft; Redmont, WA, USA) sowie mit einem Online-Programm des Department of Psychology der University of Kansas; Lawrence, KS, USA. Für die Abbildungen wurde Origin (Fa. OriginLab; Northampton, MA, USA) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Zyklus

3.1.1 Erniedrigte Ca^{2+} -Transienten mit verlangsamtem Abfall

Die Auswirkungen einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente auf die Arrhythmogenese wurden bisher nie systematisch untersucht. Zunächst war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, wie sich eine chronisch erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf den Ca^{2+} -Zyklus isolierter Kardiomyozyten auswirkt.

In TgI79N, der TNT-Mutation mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit, zeigte sich bei langsamer Stimulation von 1 Hz eine geringere Amplitude und ein langsamerer Abfall der Ca^{2+} -Transienten im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu TgR278C, der TNT-Mutation mit unveränderter Ca^{2+} -Empfindlichkeit (Abb. 6 und 7A). Zwischen TgR278C und der Kontrollgruppe bestand kein Unterschied. Als Resultat des verlangsamten Abfalls zeigte sich in TgI79N gegenüber TgR278C und der Kontrollgruppe weiterhin eine Tendenz zu einem erhöhten diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Abbildung 8B zeigt, dass der langsamere Abfall der Ca^{2+} -Transienten in TgI79N unabhängig von dessen Amplitude ist. Ein verlangsamter Abfall findet sich über das gesamte Spektrum der Amplituden hinweg.

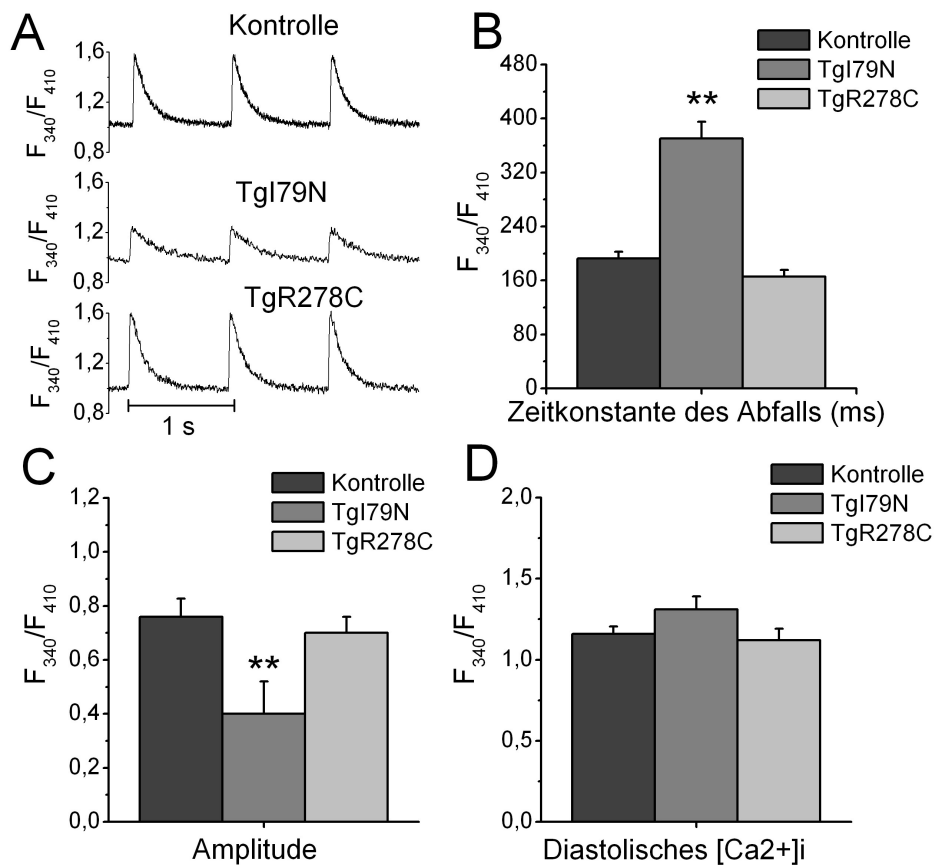


Abbildung 6. Einfluss erhöhter Ca²⁺-Empfindlichkeit auf Ca²⁺-Transienten isolierter Myozyten unterschiedlicher TNT-Mutationen, stimuliert bei 1 Hz. **A**, repräsentative Ca²⁺-Transienten. **B**, Abfall-Rate (tau). **C**, Amplitude. **D**, diastolisches [Ca²⁺]_i. Kontrolle, n=129; TgI79N, n=57, TgR278C, n=45. *p<0,05; **p<0,01.

3.1.2 Erhöhung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration bei schnellen Herzfrequenzen und β -adrenerger Stimulation

Herzrhythmusstörungen treten in der Regel nicht im Ruhezustand auf, sondern in emotionalen und körperlichen Stresssituationen. Deshalb wurden weiterhin die Auswirkungen sympathischer Aktivierung sowie schnellerer Herzfrequenzen auf den Ca²⁺-Zyklus von TgI79N untersucht. Bei einer Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 1 auf 5 Hz blieb die

Zeitkonstante des Abfalls in TgI79N verlangsamt (Abb. 7) Die bereits bestehende Tendenz eines erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in TgI79N im Vergleich zu TgR278C sowie zur Kontrollgruppe wurde weiter verstärkt und erreichte statistische Signifikanz. Zwischen Letzteren bestand kein Unterschied.

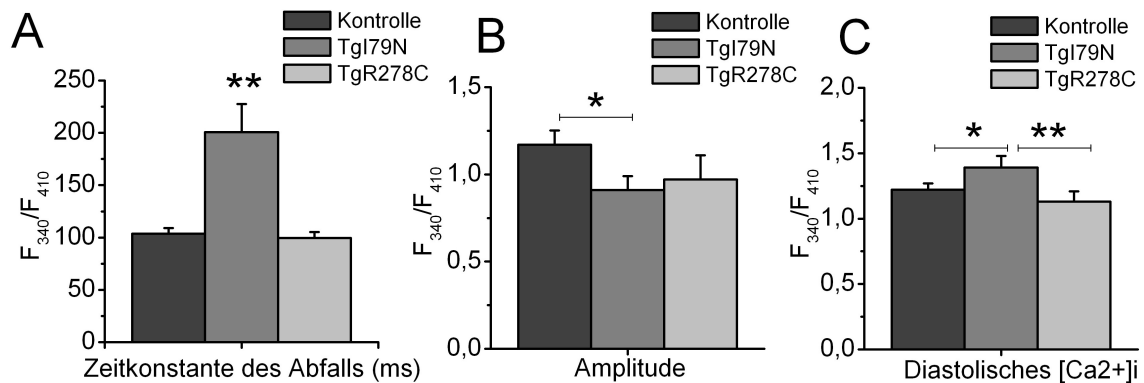


Abbildung 7. Einfluss schneller Stimulationsfrequenzen auf Ca^{2+} -Transienten unterschiedlicher TNT-Mutationen, stimuliert bei 5 Hz. **A**, Abfall-Rate (τ). **B**, Amplitude. **C**, diastolisches $[Ca^{2+}]_i$. Kontrolle, n=115; TgI79N, n=48, TgR278C, n=42. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die Applikation des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol führte bei langsamen Stimulationsfrequenzen zu einer Erhöhung der Amplitude der Transienten sowohl in TgI79N als auch in der Kontrollgruppe (Abb. 8A,C). Allerdings war der Anstieg in TgI79N höher, so dass kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr bestand (F_{340}/F_{410} : TgI79N $1,15 \pm 0,13$; n=14. Kontrolle $1,21 \pm 0,19$; n=14. $P=0,8$). Wie erwartet, beschleunigte Isoproterenol den Abfall der Ca^{2+} -Transienten in beiden Gruppen. Diese Beschleunigung war in TgI79N deutlich stärker ausgeprägt, insgesamt blieb die Zeitkonstante in TgI79N jedoch signifikant länger (τ : TgI79N: 111 ± 10 ms; n=14. Kontrolle 65 ± 3 ms; n=14. $P < 0,01$). Erneut war dieser Unterschied unabhängig von den Amplituden der Transienten (Abb. (8D).

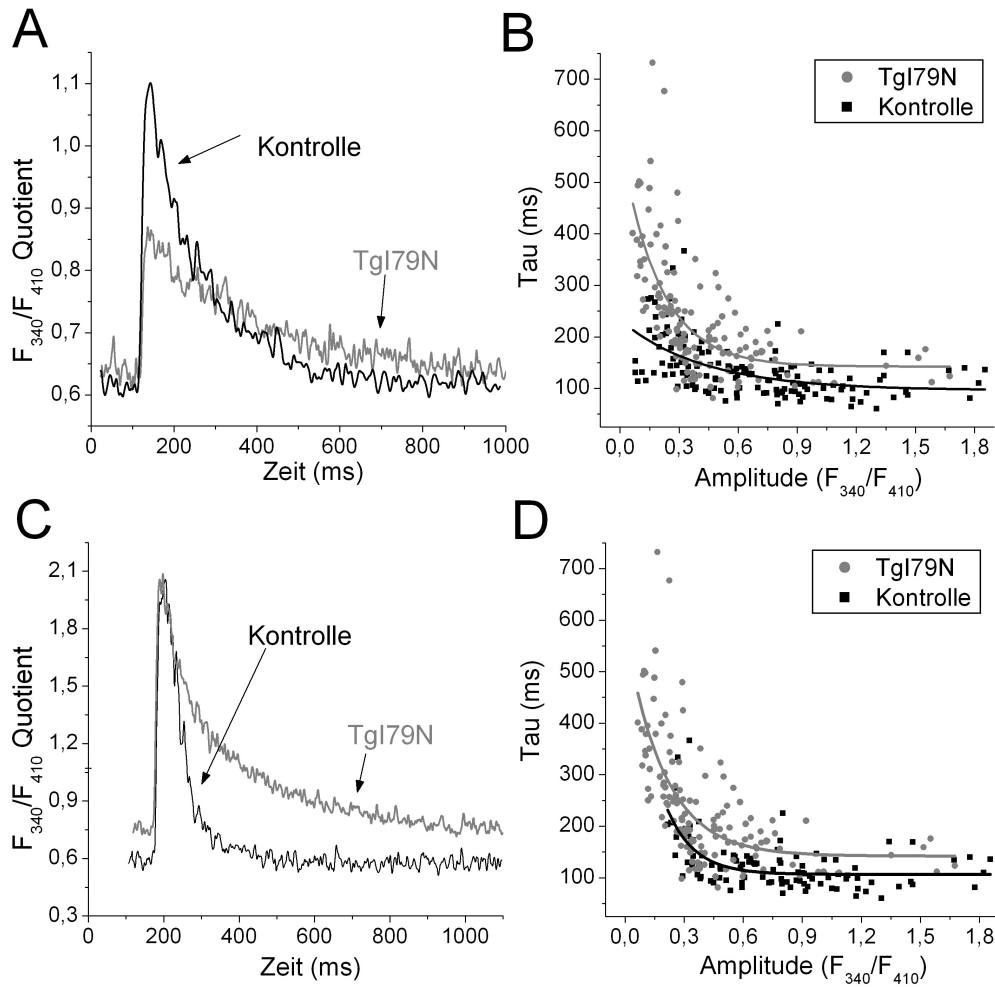


Abbildung 8. Effekt der Tgl79N-Mutation auf Ca^{2+} -Transienten in An- und Abwesenheit von β -adrenerger Stimulation, stimuliert mit 1 Hz. **A**, repräsentative Ca^{2+} -Transienten im Ausgangszustand. **B**, Abhängigkeit der Abfall-Rate (tau) von der Amplitude des Transienten. **C**, repräsentative Ca^{2+} -Transienten in Anwesenheit von Isoproterenol (0,4 μM). **D**, Abhängigkeit der Abfall-Rate (tau) von der Amplitude des Transienten in Anwesenheit von Isoproterenol.

Wie Abbildung 8C beispielhaft zeigt, kommt es ferner in der Anwesenheit von Isoproterenol zu einer Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Tgl79N im Vergleich zur Kontrollgruppe (F_{340}/F_{410} : Kontrolle: $0,57 \pm 0,04$; $n=14$. Tgl79N $0,75 \pm 0,05$; $n=14$. $P<0,01$).

Erwartungsgemäß resultierte eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz bei gleichzeitiger β -adrenerger Aktivierung ebenfalls in einer Erhöhung des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in TgI79N (Abb. 9A). Interessanterweise war der relative $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei der Frequenzsteigerung ohne Isoproterenol höher als in Anwesenheit des β -Agonisten (Abb. 9B).

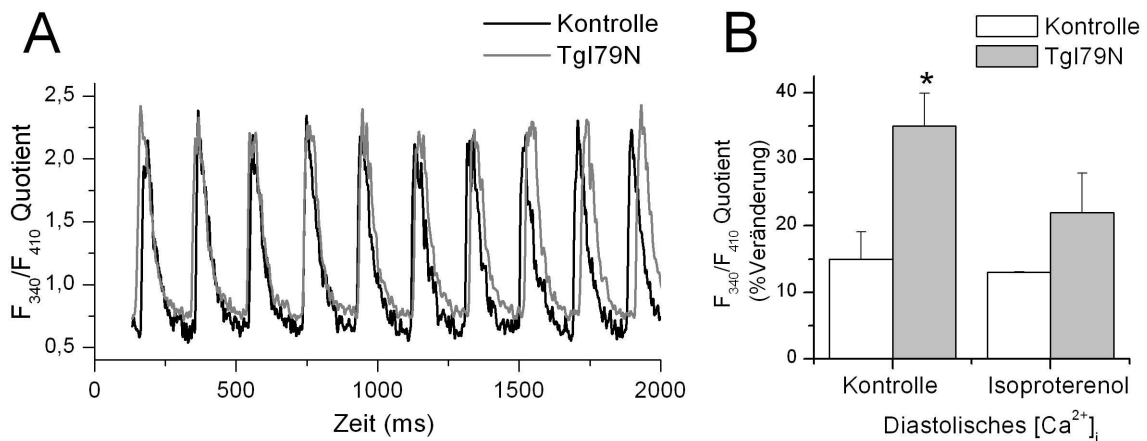


Abbildung 9. Gemeinsamer Effekt schneller Stimulationsfrequenzen und β -adrenerger Aktivierung auf Ca^{2+} -Transienten von Kontroll- und TgI79N-Myozyten. **A**, Beispielhafte Ca^{2+} -Transienten, stimuliert mit 5 Hz in Anwesenheit von Isoproterenol. **B**, Prozentuale Änderung des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in Reaktion auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 8 Hz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.1.3 Erhöhung der Ca^{2+} -Gehalts des Sarkoplasmatischen Retikulum bei β -adrenerger Stimulation

Der größte Teil des während der Systole freigesetzten Ca^{2+} wird wieder in das SR aufgenommen; so kommt diesem eine entscheidenden Rolle im Ca^{2+} -Zyklus zu. Bei plötzlicher Koffein-Applikation entleert das SR beinahe seine kompletten Ca^{2+} -Speicher. Aus dem Koffein-induzierten Transienten konnte so der Ca^{2+} -Inhalt des SR abgeschätzt werden.⁸⁵ Unter Normalbedingungen unterschied sich der SR- Ca^{2+} -Inhalt bei TgI79N und

der Kontrollgruppe nicht (Abb. 10). Basierend auf den niedrigeren Ca^{2+} -Transienten kam es jedoch zu einer relativ niedrigeren scheinbaren Ca^{2+} -Freisetzungsfraction des SR, die sich aus dem Quotienten der Amplitude des stimulierten Ca^{2+} -Transienten und der Amplitude des Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten berechnet.

Applikation von Isoproterenol erhöhte, wie erwartet, in beiden Gruppen den Ca^{2+} -Inhalt des SR. Jedoch war die Zunahme in TgI79N größer, so kam es zu einer signifikanten Vergrößerung des Ca^{2+} -Inhalt in TgI79N (Abb. 10A).

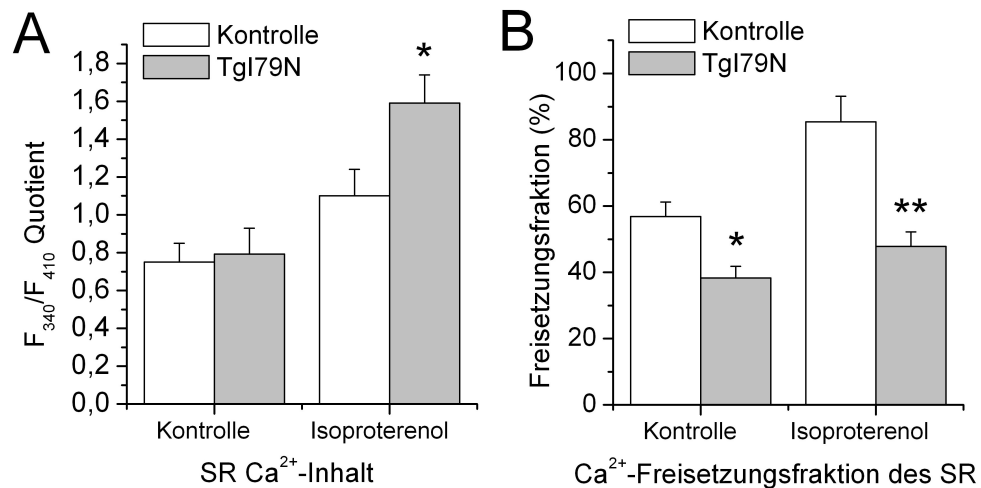


Abbildung 10. Auswirkungen der TgI79N-Mutation auf Ca^{2+} -Inhalt und scheinbare Ca^{2+} -Freisetzungsfraction des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). **A**, Durchschnittliche Amplitude Koffein-induzierter Ca^{2+} -Transienten **B**, Durchschnittliche scheinbare Ca^{2+} -Freisetzungsfraction des SR während eines stimulierten Schlages. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2 Veränderungen der Aktionspotential-Regulation

3.2.1 Veränderungen der Repolarisation im Steady-state-Zustand

Das kardiale Aktionspotential - entstehend durch den Ionen-Fluss über die Plasmamembran - ist in seiner Regulation abhängig von Veränderungen des $[Ca^{2+}]_i$.^{88,89} Insofern wurde als nächstes mit Hilfe der MAP-Technik in isoliert-perfundierten Mausherzen untersucht, ob und wie sich eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die Regulation des Aktionspotentials auswirkt.

Bei einer Frequenz von 400 Schlägen/min, die der physiologischen Herzfrequenz von Mäusen nahe kommt,⁷⁴ zeigte sich eine Veränderung der Aktionspotential-Form mit chronisch erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit. Die Gesamtdauer des Aktionspotentials blieb jedoch unbeeinflusst. TgI79N hatten eine niedrigere terminale Repolarisationsphase, die sich graphisch als „Schulter“ darstellte (Abb. 11B). Dies konnte durch eine Verkürzung der Aktionspotential-Dauer bei 70% und 50% Repolarisation (APD_{70} und APD_{50}) quantifiziert werden (Abb. 11A). Demgegenüber waren Ruhepotential, Overshoot-Potential, APD_{30} , und APD_{90} im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert. Tg278C verhielt sich wie die Kontrollgruppe, es fanden sich keinerlei Unterschiede in den untersuchten Parametern. Interessanterweise führte akute Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit durch $5\mu\text{mol}$ EMD 57033 zu Veränderungen in der Aktionspotential-Form, die denen in TgI79N verblüffend ähnelten: eine deutliche Verkürzung der APD_{70} bei marginaler Veränderung der späten Repolarisation (Abb. 11C,D). Dieser Effekt von EMD 57033 war vollständig umkehrbar durch zehnminütiges Auswaschen des Wirkstoffs.

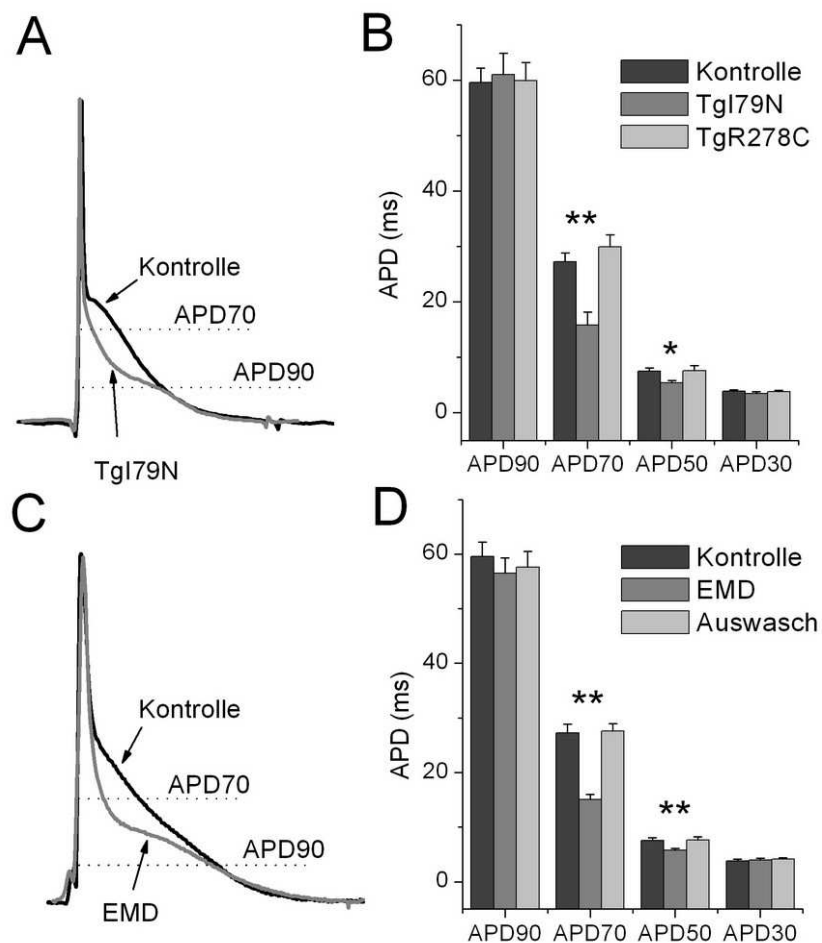


Abbildung 11. Auswirkung erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die Form des Aktionspotentials der Maus. **A**, Beispielhaft übereinandergelegte MAP-Aufnahmen von TgI79N- und Kontrollherzen. **B**, Aktionspotential-Dauer bei 30%, 50%, 70% und 90% Repolarisation in TNT-Mutationen. Kontrolle, n=37; TgI79N, n=20; TgR278C, n=15. **C**, Beispielhaft übereinandergelegte MAP-Aufnahmen in der Kontrollgruppe und mit EMD 57033. **D**, Aktionspotential-Dauer bei 30%, 50%, 70% und 90% Repolarisation mit EMD 57033. Kontrolle n=18, EMD n=21, Auswasch n=15. *p<0,05; **p<0,01.

Der Frank-Starling-Mechanismus, d.h. die plötzliche Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit durch stärkere Füllung des Herzens und Dehnung der Myofilamente, spielt eine herausragende Bedeutung in der Autoregulation des Herzens. Folglich wurde untersucht, in welcher Weise sich die so

veränderte Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die Regulation des Aktionspotentials auswirkt. Abbildung 12A zeigt, dass das Herz bei plötzlicher Dehnung durch einen intraventrikulären Ballon wie erwartet einen höheren Druck entwickelte. Gleichzeitig abgeleitete MAPs zeigten eine veränderte Aktionspotential-Form mit unveränderter Gesamtdauer, wie wir sie bei den anderen untersuchten Szenarien mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit bereits gesehen hatten (Abb. 12B).

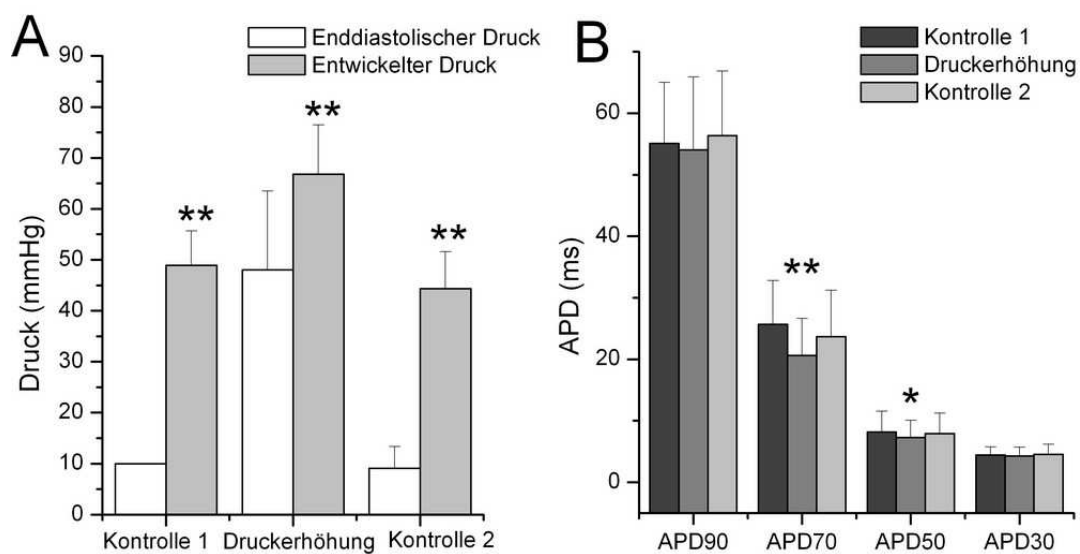


Abbildung 12. Konsequenzen eines erhöhten Füllungsdrucks isoliert-perfundierter muriner Herzen auf Kontraktilität und Aktionspotential-Form. Werte im Ausgangszustand (Kontrolle 1), bei erhöhtem Füllungsdruck und bei erneuter Normalisierung (Kontrolle 2). **A**, Änderungen von enddiastolischem Druck und entwickeltem Druck. **B**, Dauer des Aktionspotentials bei 30%, 50%, 70% und 90% Repolarisation. Jeweils $n=14$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

3.2.2 Frequenzabhängige Verlängerung der Aktionspotential-Dauer nach Pausen

In-vivo-Daten von TgI79N legen nahe, dass Arrhythmien verstärkt bei hohen Herzfrequenzen auftreten. Zudem kam es bei schneller Stimulation in TgI79N zu einer Erhöhung des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 7). Deshalb wurde die Auswirkung verschiedener Herzfrequenzen auf das Remodelling des Aktionspotentials bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit untersucht. Alle untersuchten Genotypen (Kontroll-Gruppe, TgI79N, TgR278C) hatten eine vergleichbare Gesamt-Aktionspotential-Dauer nicht nur bei normalen Frequenzen (Abb.11), sondern auch bei langsamen und schnellen (Tabelle 1).

Tabelle 1. APD₉₀ bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen

	Kontrolle (n=14-37)	TgI79N (n=9-26)	TgR278C (n=8-15)
200 Schläge/min	61,6 ± 3,8 ms	63,6 ± 7,6 ms	69,7 ± 7,2 ms
400 Schläge/min	59,5 ± 2,6 ms	61,0 ± 3,9 ms	59,9 ± 3,2 ms
750 Schläge/min	42,6 ± 1,8 ms	39,6 ± 3,0 ms	41,1 ± 2,6 ms

APD₇₀ hingegen war signifikant kürzer in TgI79N im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu TgR278C im gesamten Frequenzspektrum. Zwischen der Kontrollgruppe und TgR278C bestand erneut kein Unterschied (Tabelle 2).

Tabelle 2. APD₇₀ bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen

	Kontrolle (n=14-37)	TgI79N (n=9-26)	TgR278C (n=8-15)
200 Schläge/min	32,6 ± 2,8 ms	17,7 ± 1,5 ms †	36,3 ± 3,5 ms
400 Schläge/min	27,2 ± 1,5 ms	15,7 ± 2,3 ms †	29,9 ± 2,1 ms
750 Schläge/min	21,3 ± 1,9 ms	11,4 ± 0,9 ms †	19,8 ± 2,3 ms

†p<0,01; TgI79N vs. Kontrolle und TgR278C

Die Abbildungen 11C und 11D zeigen, dass die Verabreichung von 5 μmol EMD 57033 bei physiologischen Herzfrequenzen die Gesamt-Aktionspotential-Dauer nicht ändert. Wir wiederholten dieses Experiment bei unterschiedlichen Frequenzen mit einer kleineren Dosis von EMD 57033 (3 μmol), die bei schnellen Frequenzen von den Herzen besser toleriert wurde. Bei einer normalen Frequenz von 400 Schlägen/min ergaben sich sehr ähnliche Resultate: APD_{90} blieb unverändert und APD_{70} wurde nach Applikation von EMD 57033 signifikant kürzer. Bei schnelleren Frequenzen ergab sich interessanterweise eine Verlängerung von APD_{90} mit EMD 57033, während APD_{70} immer noch signifikant kürzer blieb.

Tabelle 3. Aktionspotentialdauern mit EMD 57033

		Kontrolle (n=21)	EMD 57033 (n=19)
APD ₉₀	400 Schläge/min	52,1 \pm 2.8 ms	54,8 \pm 4.3 ms
	750 Schläge/min	46,5 \pm 1.6 ms	51,9 \pm 1.9 ms *
APD ₇₀	400 Schläge/min	28,5 \pm 2.1 ms	19,3 \pm 1.8 ms †
	750 Schläge/min	26,3 \pm 1.5 ms	18,1 \pm 1.3 ms †

* $p < 0,05$; † $p < 0,01$, EMD vs. Kontrolle

Um der Ursache der frequenzabhängigen ventrikulären Arrhythmien weiter auf den Grund gehen, wurde ein Stimulationsprotokoll entworfen, welches unter 2.2.3 beschrieben und in den Abbildungen 13A und 14 gezeigt ist.

Bei einer Stimulationsfrequenz von 400 Schlägen/min konnte die Tendenz zur Aktionspotential-Verlängerung nach einer Pause mit EMD 57033 beobachtet werden. Bei schnelleren Frequenzen war diese Entwicklung eindeutig sichtbar und erreichte statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Zustand nach zehnminütigem Auswaschen (Abb. 13A,B). Die Aktionspotential-Verlängerung nach Pausen wird noch deutlicher, wenn man anstelle der absoluten Aktionspotential-Dauer die relative Aktionspotential-Verlängerung nach jeder Pause betrachtet, d.h.

das Verhältnis zwischen dem letzten Schlag vor der Pause (dem S1-Schlag) und dem ersten Schlag nach der Pause (dem S2-Schlag). In Abbildung 13D wurde dieses Verhältnis gegen die Stimulationsfrequenz aufgetragen.

Eine chronische Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit in TgI79N resultierte ebenfalls in einer markanten Aktionspotential-Verlängerung nach Pausen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und TgR278C. TgR278C unterschied sich dabei nicht von der Kontrollgruppe. Abbildung 13C illustriert diese Ergebnisse in Analogie zu Abbildung 13D.

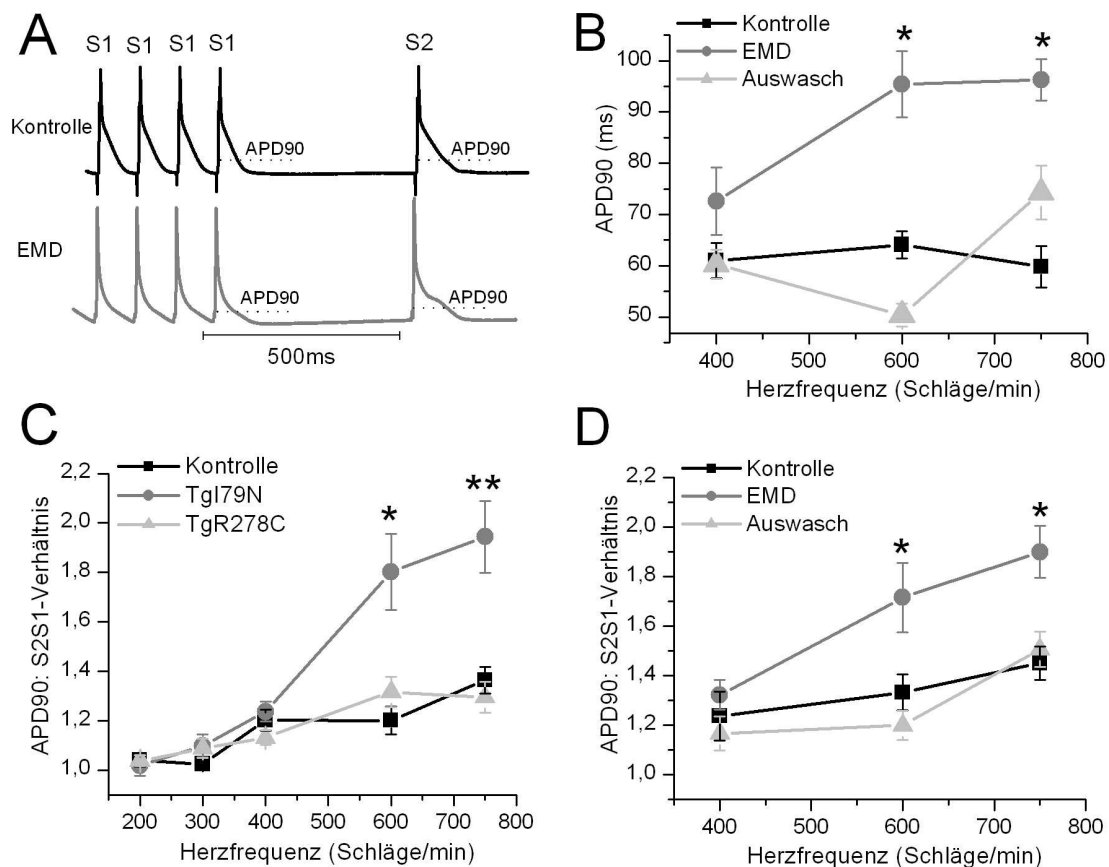


Abbildung 13. Folge erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die Aktionspotentialdauer nach Pausen. **A**, Repräsentatives Beispiel, 600 Schläge/min. **B**, Aktionspotentialdauer des S2-Schlages nach der Pause bei 90% Repolarisation. n=9-16 **C**, APD90 (S2) im Verhältnis zu APD90 (S1) vor der Pause in TNT-Mutationen. n=9-16 **D**, APD90 (S2) im Verhältnis zu APD90 (S1) mit EMD 57033. n=8-26. *p<0,05; **p<0,01.

3.2.3 Frequenzabhängig erhöhte Rate von Nachdepolarisationen und getriggerten Schlägen

Überschießende Aktionspotential-Verlängerungen können zu Nachschwankungen des Potentials vor Abschluss der Repolarisationsphase führen, so genannten frühen Nachdepolarisationen (Early Afterdepolarisations, EADs). Erreicht eine solche Nachdepolarisation die Schwelle eines neuen Aktionspotentials, kann getriggerte elektrische Aktivität entstehen. Diese sind ein wohlbekannter Ausgangspunkt ventrikulärer Arrhythmien.⁹⁰ Deshalb wurde erforscht, ob die beobachteten Verlängerungen der Aktionspotential-Dauer mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit auch die Häufigkeit früher Nachdepolarisationen erhöhen.

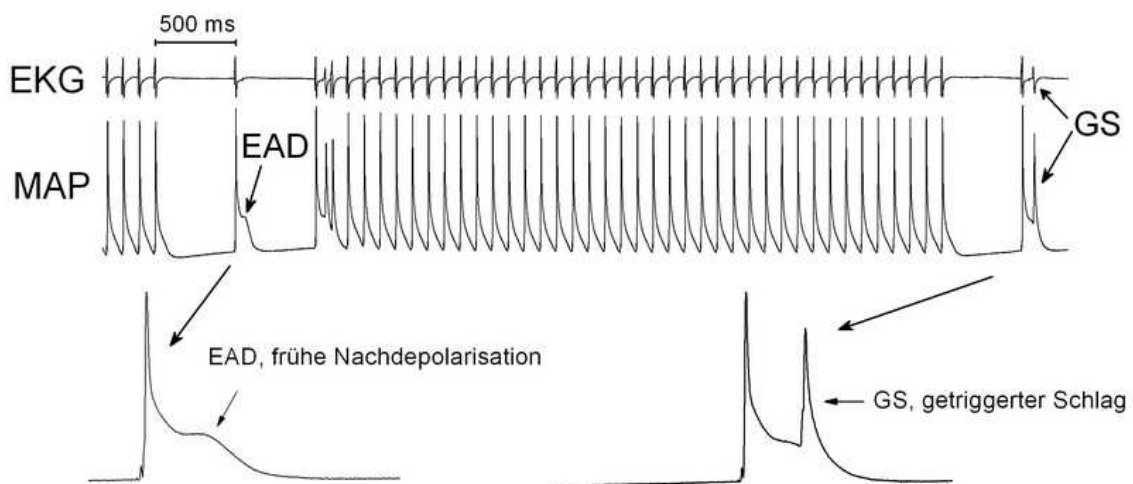


Abbildung 14. Effekt von EMD 57033 auf EKG und MAP bei schneller Stimulation (600 Schläge/min).

Der Einsatz von EMD 57033 bewirkte eine signifikante Erhöhung der Häufigkeit von EADs nach Pausen bereits bei normalen Frequenzen von 400 Schlägen/min (Abb. 15D). Diese Wirkung war erneut vollständig umkehrbar durch zehnmütiges Auswaschen. Bei schnelleren Herz-

frequenzen war die Zunahme von EADs noch ausgeprägter, bei langsamen Frequenzen zeigte sich hingegen kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Abbildungen 14 und 15A zeigen repräsentative Beispiele. Das durchschnittliche Membranpotential bei Beginn der Nachdepolarisation, das so genannte *takeoff*-Potential, lag dabei bei etwa 80% der Repolarisation ($78,6\% \pm 3,2$; $n=22$). Chronische Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit hatte ebenfalls ein gehäuftes Auftreten von EADs zur Folge (Abb. 15C). Hier zeigte sich jedoch ein Unterschied nur bei schnellen Stimulationsfrequenzen. Die Morphologie der EADs entsprach denen, die in der Anwesenheit von EMD 57033 beobachtet wurden. Das durchschnittliche *takeoff*-Potential lag ebenfalls bei etwa 80% der Repolarisation ($80,6\% \pm 2,0$; $n=17$).

Oftmals folgten den EADs getriggerte Schläge. Abbildung 14 zeigt eine beispielhafte Stimulationsserie. Dementsprechend wurde im Weiteren die Häufigkeit getriggelter Aktivität nach dem S2-Schlag untersucht. Die Anwesenheit von EMD 57033 erhöhte das Auftreten getriggelter Schläge signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe bei normalen und schnellen Stimulationsfrequenzen (Abb. 15F). Dieser Effekt konnte durch zehnminütiges Auswaschen rückgängig gemacht werden. Bei langsamen Frequenzen von 200 und 300 Schlägen/min sah man erneut keine Unterschiede.

Diese Beobachtungen konnten auch im chronischen Modell gemacht werden. Bei langsamen Frequenzen zeigten sich keine Unterschiede, bei normalen oder schnellen Frequenzen (400 and 600 Schläge/min) zeigte sich jedoch eine signifikante Häufung getriggelter Aktivität in Tgl79N. TgR278C verhielt sich wiederum entsprechend der Kontrollgruppe. Bei sehr schnellen Frequenzen von 750 Schläge/min war der Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen statistisch nicht mehr signifikant, da es auch in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg von arrhythmischer Aktivität kam; die Tendenz zu einer höheren Inzidenz in Tgl79N blieb jedoch bestehen.

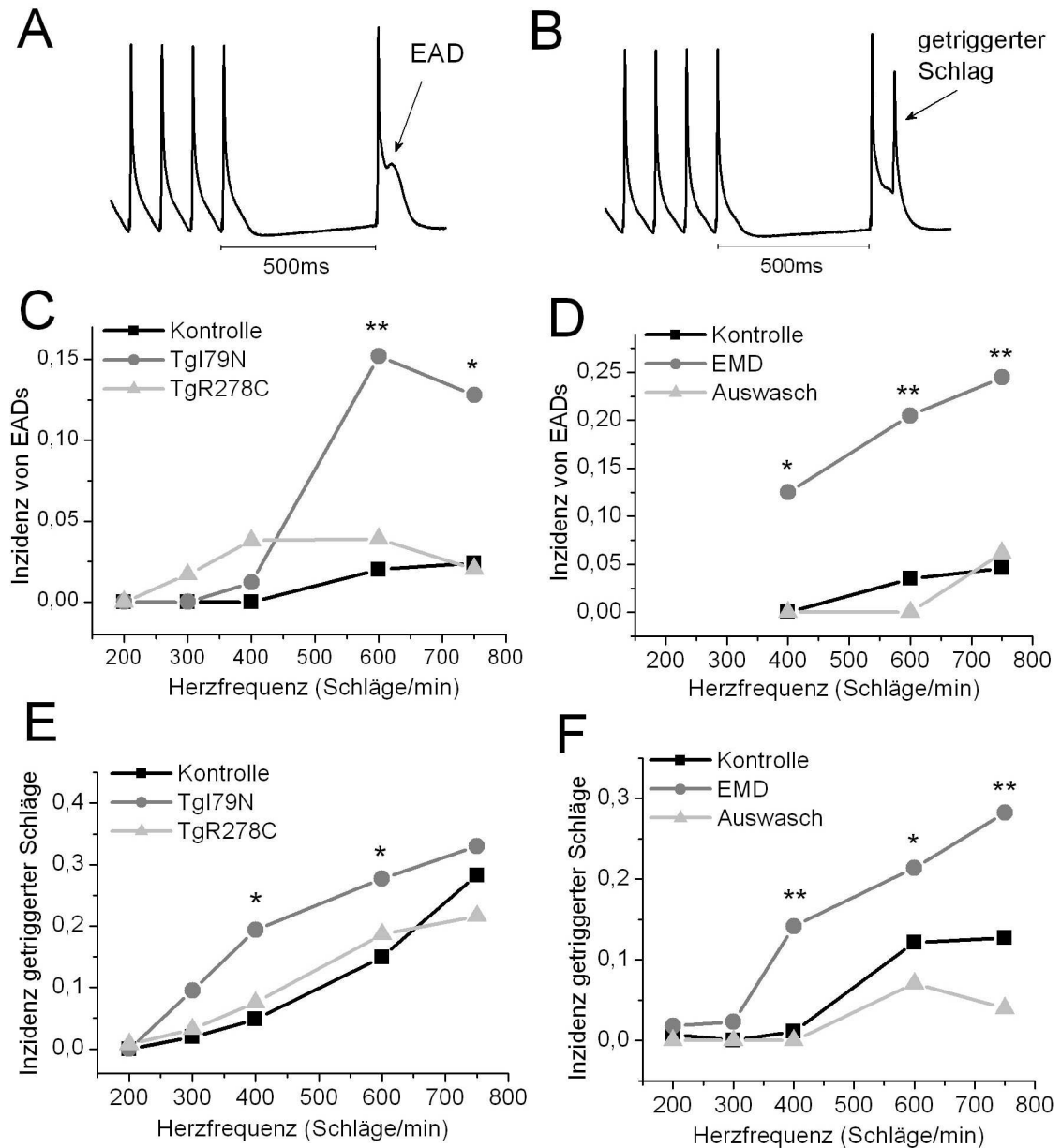


Abbildung 15. Folge einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die Häufigkeit früher Nachdepolarisationen (EADs) und getriggertter Schläge nach einer 500 ms-Pause bei unterschiedlichen Herzfrequenzen. **A**, Beispiel eines EADs mit EMD 57033, 600 Schläge/min. **B**, Beispiel eines getriggerten Schlages in einer TgI79N-Maus, 600 Schläge/min. **C**, Inzidenz von EADs in TNT-Mutationen. Kontrolle, n=10 Herzen; TgI79N, n=7, TgR278C, n=6. **D**, Inzidenz von EADs mit EMD 57033, n=10 Herzen. **E**, Inzidenz getriggertter Schläge in TNT-Mutationen, n=99-238 Stimulationsserien. **F**, Frequenzabhängigkeit getriggertter Schläge mit EMD 57033, n=12 Herzen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.4 Isoproterenol hat keinen wesentlichen Effekt auf die beobachteten Aktionspotential-Veränderungen

Eine β -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol führte in *in-vivo*-Studien zu einem deutlichen Anstieg ventrikulärer Ektopie in TgI79N-Mäusen (Abb. 3). Deshalb wurde die Wirkung von Isoproterenol auf die Aktionspotential-Form, EADs und die getriggerte Aktivität in TgI79N- und TgR278C-Mäusen systematisch untersucht. Der Effekt von Isoproterenol bei akut erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit konnte nicht untersucht werden, da die Maus Herzen besonders bei hohen Stimulationsfrequenzen die gemeinsame Applikation von EMD 57033 und Isoproterenol schlecht tolerierten.

In allen untersuchten Genotypen zeigte sich eine leichte Verkürzung des APD_{90} mit Isoproterenol, in TgI79N war diese Verkürzung am deutlichsten ausgeprägt und erreichte statistische Signifikanz (Abb. 16A). Die beobachteten Unterschiede in APD_{70} wurden durch Isoproterenol tendenziell abgemildert, jedoch waren die Veränderungen nur sehr gering und statistisch nicht signifikant (Abb. 16B).

Als nächstes wurde auf das Stimulations-Protokoll zurückgegriffen und Aktionspotential-Veränderungen nach Pausen untersucht. Im Ausgangszustand, vor der Applikation von Isoproterenol, ließ sich die frequenzabhängige Aktionspotential-Verlängerung in TgI79N im Vergleich zu TgR278C und der Kontrollgruppe reproduzieren. Interessanterweise hatte Isoproterenol insgesamt nur geringe Auswirkungen auf die Aktionspotential-Veränderungen in allen untersuchten Genotypen (Abb. 16C). Im Ausgangszustand vor der Applikation von Isoproterenol konnte entsprechend Abbildung 15B eine erhöhte Inzidenz von EADs in TgI79N nachgewiesen werden. Isoproterenol führte jedoch überraschenderweise zu keinem weiteren Anstieg in den untersuchten Genotypen (Abb. 16D). Damit übereinstimmend zeigte sich auch eine unveränderte Inzidenz getriggelter Aktivität mit Isoproterenol (Daten nicht gezeigt).

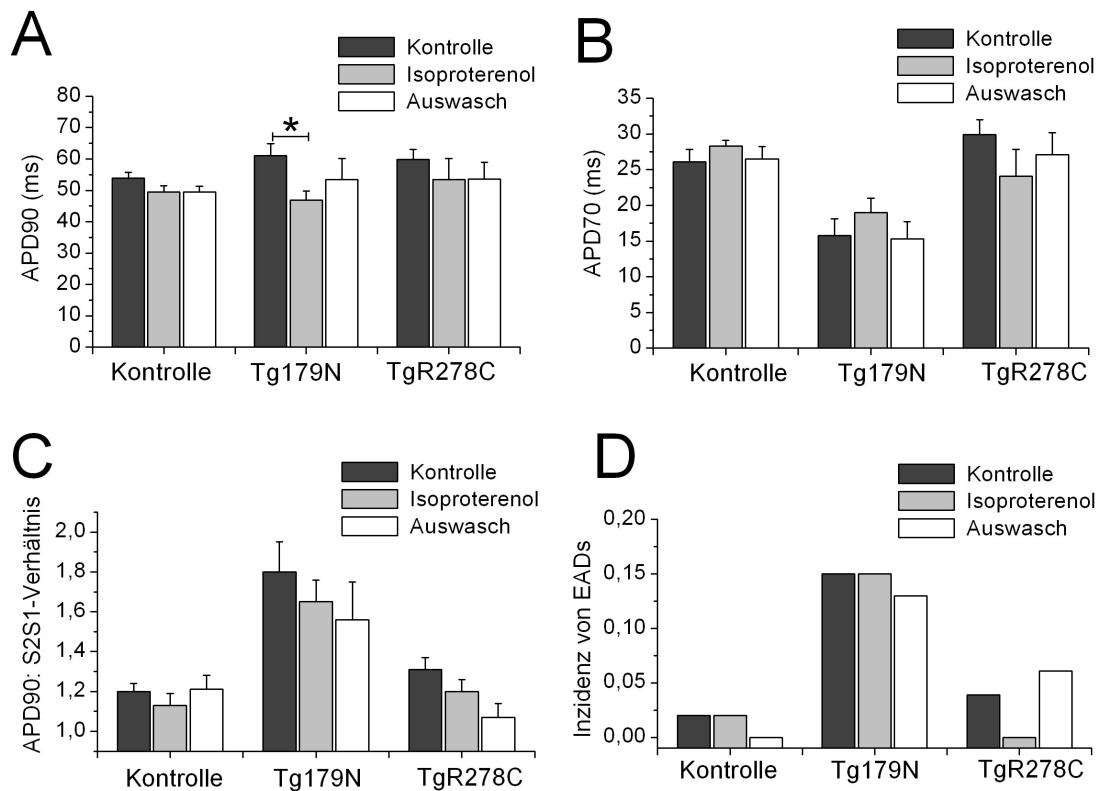


Abbildung 16. Wirkung von Isoproterenol (0,1 µg/L Perfusionslösung) auf Aktionspotential-Dauer und Arrhythmogenese in Troponin T-Mutanten **A**, **B**, APD90 und APD70 im Steady-state-Zustand, 400 Schläge/min. Kontrolle, n=8-25; TgI79N, n=6-20; TgR278C, n=5-15. **C**, APD90 (S2) nach einer Pause im Verhältnis zum APD90 (S1) vor der Pause. Kontrolle, n=14-17; TgI79N, n=6-24; TgR278C, n=5-16. **D**, Inzidenz von EADs, 600 Schläge/min. Kontrolle, n=6-10; TgI79N, n=5-7; TgR278C, n=3-6. *p<0.05.

3.2.5 Aktionspotential-Veränderungen und vermehrte Nachdepolarisationen zeigen sich auch in Katzenherzen

Um die Aussagekraft der bisherigen Experimente in Bezug auf den Menschen zu erhöhen, wurde neben Mäusen eine größere Säugetier-Spezies untersucht, Katzen. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit durch EMD 57033 führte in isoliert-perfundierten Katzenherzen ebenfalls zu Veränderungen der Repolarisation bei unveränderter Gesamtdauer des

Aktionspotentials (Abb. 17). Es zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Aktionspotential-Dauer bei 70% Repolarisation, im Gegensatz zu murinen Aktionspotentialen fand sich jedoch auch eine Verkürzung der Aktionspotential-Dauer bei 50% und 30% Repolarisation (Abb. 17B). Dieser Effekt konnte durch zehnmütiges Auswaschen des Ca^{2+} -Sensitizer vollständig aufgehoben werden.

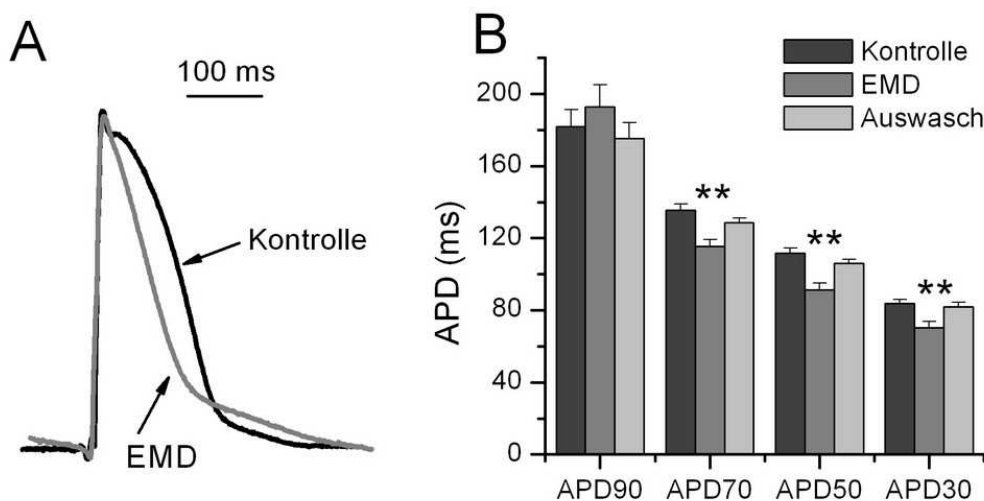


Abbildung 17. Wirkung von EMD 57033 auf das ventrikuläre Aktionspotential der Katze im Steady-state-Zustand. **A**, Überlagerung zweier MAP-Aufnahmen unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von EMD 57033. **B**, Dauer des Aktionspotentials bei 30%, 50%, 70% und 90% Repolarisation mit EMD 57033. n=4 Herzen. **p<0.01.

Im Arrhythmie-Protokoll kam es wie bei der Maus bei schnellen Herzfrequenzen zu einer Verlängerung der Aktionspotential-Gesamtdauer. Dies konnte in der Form einer längeren APD_{90} nach 800ms-Pausen quantifiziert werden (Kontrolle 192 ± 5 ms, EMD 214 ± 7 ms; $p < 0,05$; n=8). Abbildung 18A zeigt ein typisches Beispiel, Abbildung 18B die Frequenz-abhängigkeit der relativen Aktionspotential-Verlängerung. Ferner fand sich bei schnellen Frequenzen eine signifikant höhere Inzidenz von EADs mit EMD 57033 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 19).

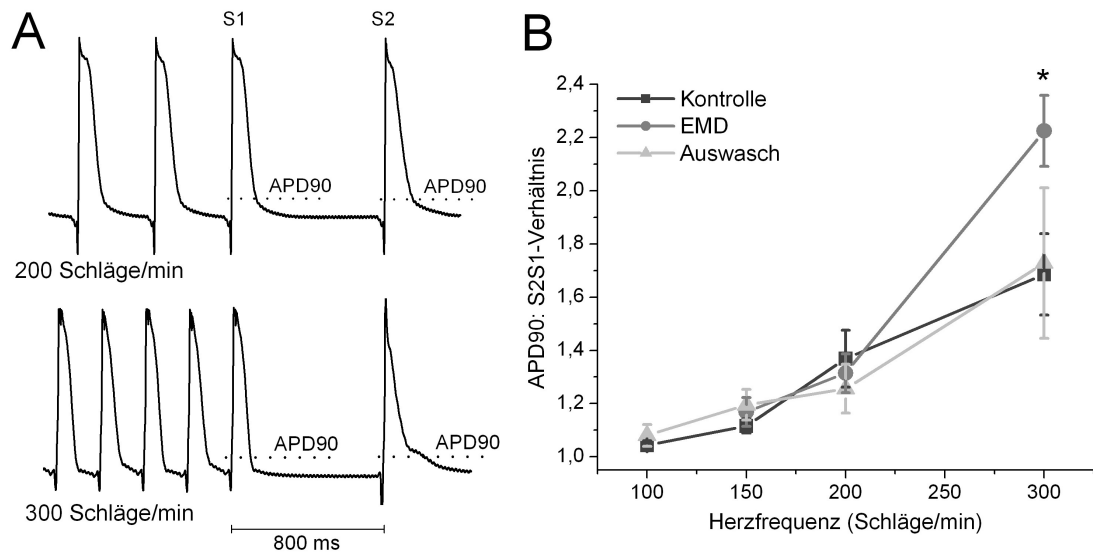


Abbildung 18. Wirkung von EMD 57033 auf die Aktionspotential-Dauer nach Pausen bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen in Katzen **A.** Repräsentative MAPs mit EMD 57033. **B.** Durchschnittliches S2S1-Verhältnis von APD90 bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen mit EMD 57033. ** $p < 0,05$

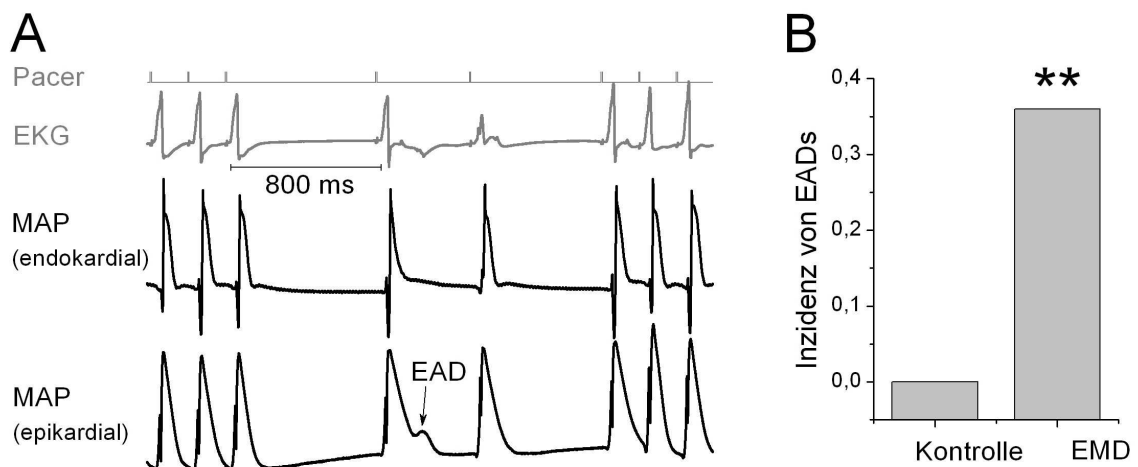


Abbildung 19. Wirkung von EMD 57033 auf das Auftreten früher Nachdepolarisationen (EADs). **A,** Gleichzeitige Aufnahmen von EKG, endokardialen und epikardialen MAP in Anwesenheit von EMD 57033 in Katzen. **B,** Inzidenz von EADs nach Pausen unter Kontrollbedingungen und mit EMD 57033. ** $p < 0,01$.

3.3 Veränderungen auf Organ-Ebene

3.3.1 EKG-Veränderungen und eine verkürzte effektive Refraktärzeit in Mäusen und Katzen

Herzrhythmusstörungen sind ein Krankheitsbild, bei dem neben fokalen Mechanismen dem Zusammenspiel der Zellen im Organverband eine entscheidende Rolle zukommt. Deshalb wurden anschließend elektrophysiologische Parameter der Modell-Organismen auf Organ-Ebene ermittelt.

Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit führte zu typischen EKG-Veränderungen isolierter Herzen: In spontan-schlagenden Herzen mit EMD 57033 waren das QT-Intervall und die T-Wellen-Flächen kleiner als unter Kontrollbedingungen oder nach Auswaschen (Tabelle 4). Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit *in-vivo*-Daten von Tgl79N, bei denen ebenfalls ein verkürztes QT-Intervall beobachtet wurde.⁶⁷

Tabelle 4. Effekt von EMD 57033 auf EKG-Parameter

	Kontrolle (n=5)	EMD (n=5)	Auswasch (n=5)
Frequenz (Hz)	5,5 ± 0,27	5,8 ± 0,12	5,6 ± 0,15
PR (ms)	36,2 ± 1,90	36,2 ± 1,40	36,5 ± 1,40
QJ (ms)	12,2 ± 1,00	12,1 ± 0,90	12 ± 0,90
JT (ms)	66,0 ± 3,10	53,0 ± 4,40 †	67 ± 4,00
QT (ms)	78,0 ± 2,70	65,0 ± 3,90 †	79 ± 3,50
T-Wellen-Fläche ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	1,7 ± 0,30	0,7 ± 0,22 *	1,8 ± 0,33
QRS-Amplitude (mV)	0,57 ± 0,11	0,57 ± 0,11	0,58 ± 0,10

* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; EMD vs. Kontrolle und Auswasch

Passend zum verkürzten QT-Intervall führte EMD 57033 zu einer signifikant verkürzten effektiven Refraktärzeit (ERZ). Abbildung 20A zeigt typische EKG-Aufzeichnungen vom selben Herzen im Ausgangszustand, mit EMD 57033 und nach dem Auswaschen.

Eine chronische Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit in Tg-I79N verkürzte ebenfalls die effektive Refraktärzeit im Vergleich zu TgR278C und Kontrollmäusen. Zwischen Letzteren bestand dabei kein Unterschied (Abb. 20B).

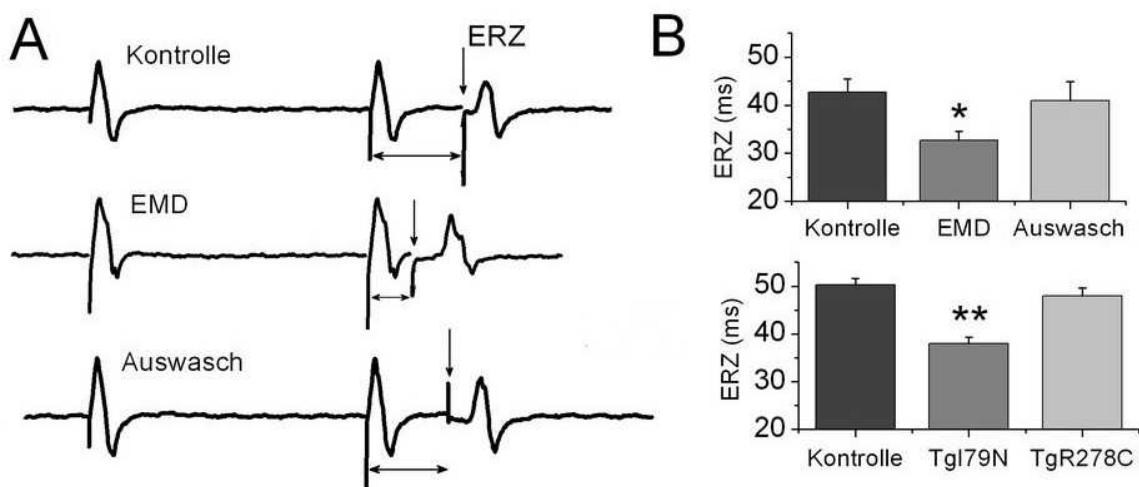


Abbildung 20. Auswirkung einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit auf die effektive Refraktärzeit (ERZ). **A**, Beispielhafte EKG-Aufzeichnungen mit EMD 57033. **B**, ERZ mit EMD 57033 und in TNT-Mutationen. Akutes Modell (oben): $n=12$. Chronisches Modell (unten): Kontrolle $n=7$; TgI79N, $n=11$; TgR278C, $n=7$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Abschließend wurde untersucht, in wie weit eine akute Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit die Refraktärzeit auch in Katzenherzen beeinflusst. Mit EMD 57033 fand sich ebenfalls eine signifikante und reversible Verkürzung der effektiven Refraktärzeit (150 Schläge/min; Kontrolle 169 ± 3 ms, EMD 151 ± 6 ms, Auswasch 173 ± 3 ms; $p<0,05$; $n=6-8$).

4 Diskussion

In dieser Arbeit ist erstmalig der Einfluss einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente auf den intrazellulären Ca^{2+} -Zyklus, die Aktionspotential-Regulation und die Arrhythmogenese systematisch untersucht worden. Auf zellulärer Ebene finden sich in murinen Kardiomyozyten veränderte Ca^{2+} -Transienten mit erhöhtem diastolischem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und erhöhtem Ca^{2+} -Inhalt des SR. Die Aktionspotential-Regulation zeigt sich ebenfalls verändert, sowohl bei Mäusen als auch bei Katzen. Bei schnellen Herzfrequenzen treten Aktionspotential-Verlängerung, Nachdepolarisationen und getriggerte Schläge auf. Auf Organ-Ebene ist eine verkürzte Refraktärzeit nachweisbar. Die Relevanz der gefundenen Ergebnisse, mögliche Einschränkungen sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen werden im Weiteren diskutiert.

4.1 Auswirkungen des veränderten Ca^{2+} -Zyklus

4.1.1 Erniedrigung und Verlangsamung der Ca^{2+} -Transienten durch vermehrte Ca^{2+} -Pufferung

Die Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten in Tgl79N stellen wahrscheinlich eine direkte Konsequenz der erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit dar. Die Ca^{2+} -Bindung der Myofilamente macht einen Großteil der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Pufferung aus, etwa 50% des während eines Schlages freigesetzten Ca^{2+} werden so gebunden.³⁶ Bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit bindet initial mehr Ca^{2+} an die Myofilamente, da die Affinität des Troponin C für Ca^{2+} höher ist; entweder direkt oder, wie bei EMD 57033, indirekt durch verstärkte Interaktion der von Myosin und Aktin und entsprechend stärker gebundenen Querbrücken.⁹¹ Später, wenn der Muskel anfängt sich zu entspannen, löst sich das zusätzliche Ca^{2+} langsamer und produziert die

verlangsamten Abfälle. Anders ausgedrückt: die höhere Bindungsaffinität für Ca^{2+} bewirkt, dass die Myofilamente „klebriger“ für Ca^{2+} sind. Während der Systole wird Ca^{2+} mehr an den Troponin-Komplex gebunden wird, das Resultat ist ein geringeres freies systolisches $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und eine niedrigere Amplitude der Ca^{2+} -Transienten. Während der Diastole hingegen dissoziiert das gebundene Ca^{2+} langsamer, es zeigt sich ein langsamerer Abfall der Transienten mit einer Tendenz zu einem erhöhten diastolisches $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Miller und Kollegen hatten - basierend auf experimentellen Daten von enthäuteten Fasern - in mathematische Modellen bereits kleinere und verlängerte Ca^{2+} -Transienten in Tg179N im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhergesagt.⁴² Voraussetzung dieser Berechnungen waren ein unveränderter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle sowie eine nicht-erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Diese Voraussetzungen sind erfüllt: Der Ca^{2+} -Einstrom durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal blieb in Tg179N-Myozyten unverändert, wie andere Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten.⁹² Abbildung 10 zeigt, dass der Ca^{2+} -Gehalt des SR unter Normalbedingungen unverändert ist und es nicht zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung kommt (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.4).

Die beobachteten Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten sind damit eine direkte Konsequenz der erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit. Die Richtigkeit dieser Annahme wird durch weitere Beobachtungen gestützt: Eine experimentell erhöhte Ca^{2+} -Pufferung resultiert ebenfalls in kleineren und verlangsamten Ca^{2+} -Transienten.⁹³ Die Applikation von EMD 57033 zeigt gleichermaßen veränderte Ca^{2+} -Transienten und erhöhtes enddiastolisches $[\text{Ca}^{2+}]_i$.^{63,87} Schließlich weisen auch Mäuse, die Troponin I-Mutationen mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit exprimieren - unter anderem die in Abbildung 3 gezeigt Mutante ssTNI - erniedrigte und verlängerte Ca^{2+} -Transienten auf.^{94,95}

Ähnliche Beobachtungen kann man beim Vergleich von Ca^{2+} -Transienten bei isometrischen und ungeladenen Muskelkontraktionen machen.⁹⁶ Die Transienten zeigen als Reaktion auf plötzliche Dehnung der Myofilamente

initial eine Abnahme der Amplitude mit einem Anstieg in der terminalen Phase.⁹⁷ Für Letzteres wurde von mehreren Autoren eine verlangsamte Dissoziation des Ca^{2+} im Kontext einer erhöhten Puffer-Kapazität der Myofilamente verantwortlich gemacht.^{98,99} Diese Prozesse treten innerhalb von Millisekunden auf. Deutlich später kommt es dann zu einem Anstieg der Transienten, dem jedoch ein gänzlich anderer Mechanismus zu Grunde liegt, nämlich die Aktivierung dehnungs-abhängiger Ionenkanäle (*stretch-activated channels*, SACs) mit konsekutivem Ca^{2+} -Einstrom.⁹⁹

4.1.2 Erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration und eingeschränkte Relaxation bei schnellen Herzfrequenzen

Während die verlangsamte Kinetik der Ca^{2+} -Transienten bei Ruhe keine Auswirkung auf basale Ca^{2+} -Spiegel hat, kommt es bei schnelleren Frequenzen und adrenerger Stimulation zu signifikant erhöhtem diastolischem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 7 bis 9). Mit Erhöhung der Frequenz und entsprechender Verkürzung der Diastole verbleibt nicht mehr ausrechnend Zeit, um das verlangsamt freigesetzte Ca^{2+} aus dem Zytoplasma zu entfernen.⁸⁸ Um dem entgegen zu wirken, kommt es normalerweise bei schnelleren Frequenzen zu einer Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente. Dieser Effekt findet unabhängig von einer adrenergen Stimulation statt und wird wahrscheinlich über die PKA-unabhängige Troponin I-Phosphorylierung erzielt, wie kürzlich beim Kaninchen gezeigt werden konnte.¹⁰⁰ Die Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit entspricht in seinem Umfang dabei mindestens dem der PKA-induzierten Troponin I-Phosphorylierung.

Die frequenzabhängige Erniedrigung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit ist so bei der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation von großer Bedeutung. Bei größeren Säugetieren als den von mir untersuchten Mäusen spielt sie wahrscheinlich eine noch wichtigere Rolle, da eine frequenzabhängige Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}]_i$ bei Ersteren

ausgeprägter ist. Der Grund liegt darin, dass in Menschen und anderen großen Säugern wie Kaninchen und Katzen etwa 30% des intrazellulären Ca^{2+} -Abfalls über die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher geleistet werden, während es in Mäusen nur etwa 5% sind.¹⁰¹ Die Entfernung von Ca^{2+} mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist jedoch signifikant langsamer als die Wiederaufnahme in das SR über die SR- Ca^{2+} -ATPase. So kommt es beim Menschen eher als bei der Maus zu einer frequenzabhängigen Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}]_i$.¹⁰⁰

Eine dauerhafte Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit wirkt diesem wichtigen Mechanismus nun entgegen. Entsprechend vergrößern schnelle Herzfrequenzen die diastolische Einschränkung in TgI79N mehr als in TgR278C, wie *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte.^{68,102} Eine Einschränkung der frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation ist weiterhin auch ein typisches Kennzeichen der Herzinsuffizienz,¹⁰³ einer Erkrankung, bei der ebenfalls eine Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit vorliegt.⁴⁷⁻⁴⁹ Andererseits sind hier eine Vielzahl anderer pathophysiologischer und biochemischer Mechanismen ebenfalls beteiligt, so dass die erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit sicherlich nicht die einzige Ursache der eingeschränkten frequenzabhängigen Beschleunigung der Relaxation ist.

Diese Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat mehrere wichtige Implikationen: 1) Es kommt zu einer Einschränkung der Relaxation, die sich klinisch als diastolische Dysfunktion äußert; siehe Abschnitt 4.2. 2) Eine Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist ein bekannter unabhängiger Auslöser von Arrhythmien;^{37,104} siehe Abschnitte 4.4.1 und 4.4.3. 3) Langfristig indiziert erhöhtes basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ventrikuläres Remodelling durch die Aktivierung regulatorischer Proteinen wie Calcineurin oder Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CamKII).¹⁰¹ Dieser Effekt spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz. Gemäss Engelhardt und Kollegen ist er unabhängig von Veränderungen der hämodynamischen Belastung.¹⁰⁵ Sie schlussfolgerten, dass eine

Verminderung des Ca^{2+} -Eintritts in die Zelle diesem Effekt entgegen wirke und deshalb günstig sei. Westermann und Kollegen konnten entsprechend zeigen, dass die Applikation des Ca^{2+} -Kanal Blockers Diltiazem die Mortalität in Tgl79N-Mäusen signifikant senkt.¹⁰² Dies unterstreicht die Bedeutung der beobachteten Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Tgl79N-Mäusen bei schnellen Herzfrequenzen.

4.1.3 Einfluss β -adrenerger Aktivierung auf den Ca^{2+} -Zyklus

Zu einer Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt es auch frequenzunabhängig bei adrenerger Stimulation. Hierbei sind mehrere Faktoren beteiligt: einerseits ein erhöhter Einstrom über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal (I_{Ca}), andererseits eine größere Verfügbarkeit des Ca^{2+} aus dem SR.³⁴ Beide Effekte vergrößern signifikant die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, wie in Abbildung 8 gut erkennbar ist. Sie bilden auf zellulärer Ebene die Grundlage der positiv-inotropen Wirkung β -adrenerger Aktivierung. Einem Anstieg des basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wirkt der lusitrope Effekt entgegen, es kommt zu einer schnelleren Ca^{2+} -Aufnahme in das SR sowie zu einer Senkung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit.⁴⁵ Interessanterweise zeigt sich bei β -adrenerger Aktivierung in Tgl79N eine stärkere Zunahme der Amplitude sowie eine stärkere Beschleunigung des Abfalls der Ca^{2+} -Transienten. Über die Ursache dieser Ergebnisse kann nur spekuliert werden, da in der Literatur keine Daten über den Umfang der PKA-induzierten Senkung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit in Szenarien mit zuvor Ca^{2+} -Empfindlichkeit vorliegen. Vermutlich ist der lusitrope Effekt von Isoproterenol in Tgl79N verstärkt. Dafür spricht, dass die relative Steigerung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei Frequenzsteigerung ohne Isoproterenol höher war als in Anwesenheit des β -Agonisten (Abb. 9B). Im Resultat sehen wir bei hohen Frequenzen vergleichbare diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei niedrigeren Frequenzen in Tgl79N signifikant höher war.

Dennoch blieb auch mit Isoproterenol der Abfall der Ca^{2+} -Transienten in Tgl79N im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, so dass es im Kontext eines vermehrten Ca^{2+} -Einstrom zu einer Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kam.

4.1.4 Vergrößerung des Ca^{2+} -Inhalts des SR

Bei der verwendeten Methode zur Erfassung des Ca^{2+} -Inhalts des SR stellen sich zwei mögliche Probleme: Erstens kann die Verwendung einer plötzlichen Koffein-Applikation den Ca^{2+} -Inhalts des SR unterschätzen, wenn die zytoplasmatische Ca^{2+} -Puffer-Kapazität erhöht ist, wie es im untersuchten Modell der Fall ist. Dies würde zu falsch-niedrigen Ergebnissen führen. Es ist jedoch aus folgendem Grund unwahrscheinlich, dass dies in der vorliegenden Arbeit der Fall ist: Koffein erhöht die Ca^{2+} -Empfindlichkeit zusätzlich und damit auch die Pufferkapazität der Myofilamente.³⁵ Dadurch, und auf Grund der hohen Kooperativität der Myofilament-Aktivierung, werden die Ca^{2+} -bindenden Troponin C-Moleküle in Anwesenheit von Koffein vollständig saturiert sein. Die I79N-Mutation würde die Pufferkapazität unter diesen Bedingungen nur um weniger als 5% erhöhen.⁹² Dies wird die Amplitude der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten nicht wesentlich beeinflussen, so dass die gezeigten Daten eine gute Abschätzung des wirklichen SR- Ca^{2+} -Inhalts darstellen sollten.

Das zweite mögliche Problem besteht darin, dass die Fluoreszenz-Messungen von Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten mit dem wirklichen Ca^{2+} -Gehalt des SR nicht linear korreliert sind und so nur eine ungefähre Abschätzung erlauben. Die genutzte nicht-lineare Methode zur Messung des SR- Ca^{2+} -Gehalts sowie der fraktionellen Ca^{2+} -Freisetzung ist in der Literatur jedoch hinlänglich etabliert.^{106,107} Dieser Ansatz hat weiterhin den Vorteil, dass er schnell und unkompliziert durchführbar ist. Alternativ hätte man das Fluoreszenzsignal für jeden einzelnen Kardiomyozyten kalibrieren können. Dieser Ansatz ist deutlich zeitaufwändiger. Weiterhin ist die

Kalibrierung der FURA-2-Fluoreszenz mit zusätzlichen Messfehlern behaftet, da der Farbstoff in Zellorganellen akkumuliert.⁸³

Wie Abbildung 10 zeigt, sehen wir in TgI79N im Normalzustand einen unveränderten Ca^{2+} -Inhalts des SR sowie eine niedrigere scheinbare fraktionelle Freisetzung pro Herzzyklus. Letztere wurde aus dem Quotienten der regulären Ca^{2+} -Transienten und Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten berechnet, wie es Bassani und Kollegen vorschlagen.¹⁰⁸ Für die beobachtete scheinbar niedrigere fraktionelle Freisetzung gibt es zwei mögliche Erklärungen: 1) Die Freisetzung aus dem SR selbst ist unverändert. Dadurch, dass mehr Ca^{2+} gebunden wird, ergeben sich kleinere Transienten. Mit einem kleineren Nenner in der genannten Formel ergibt sich so die scheinbar niedrigere fraktionelle Freisetzung. 2) Die scheinbar niedrigere Freisetzungsfraction beruht auf einer realen niedrigeren Freisetzung, einem niedrigeren Ertrag des *Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release* (CICR).

Erstgenanntes ist die wahrscheinlichere These: I_{Ca} ist in TgI79N unverändert.⁹² Eine Berechnung des CICR-Ertrages durch den Quotienten der Ca^{2+} -Transient-Amplitude und von I_{Ca} , wie sie von Janczewski und Kollegen angeregt wurde,¹⁰⁹ ergibt einen unveränderten CICR-Ertrag. Dies überrascht nicht, da CICR ein sehr lokales Phänomen ist. Änderungen der globalen Ca^{2+} -Puffer-Kapazität werden die Kinetik von I_{Ca} nicht wesentlich beeinflussen.¹¹⁰

Während der Ca^{2+} -Inhalt des SR im Normalzustand in TgI79N und der Kontrollgruppe gleich sind, zeigt sich eine deutliche Vergrößerung in TgI79N mit adrenerger Stimulation. Der Ca^{2+} -Inhalt des SR ist abhängig von mehreren Faktoren, die sich wiederum gegenseitig beeinflussen: der Ca^{2+} -Aufnahme mit der Ca^{2+} -ATPase, dem Ca^{2+} -Ausfluss/Leck, der Ca^{2+} -Puffer-Kapazität des SR sowie $[\text{Ca}^{2+}]_i$.¹¹¹ Die beobachtete Erhöhung des Ca^{2+} -Inhalt des SR mit adrenerger Stimulierung ist wahrscheinlich eine Konsequenz des erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Bei basal erhöhtem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt es

über eine Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteine zu einer erhöhten Aufnahme mit Hilfe der SR-Ca^{2+} -ATPase.^{88,101} Die anderen Mechanismen scheinen im vorliegenden Fall weniger bedeutsam: Eine Veränderung der Puffer-Kapazität des SR erscheint unwahrscheinlich. Die adrenerge Modulation des Ca^{2+} -Ausfluss/Lecks schließlich ist umstritten und entsprechend schwierig zu beurteilen.³⁴ Es erscheint jedoch ausgeschlossen, dass die beobachtete signifikante Zunahme des SR-Ca^{2+} -Inhalt durch eine entsprechend erniedrigte Ca^{2+} -Freisetzung zustande gekommen ist, schließlich erhöht eine β -adrenerge Stimulation die Ca^{2+} -Transienten in Tgl79N mehr als in der Kontrollgruppe (Abb. 8).

Bei einem hohen Ca^{2+} -Inhalt des SR in Tgl79N steht nicht nur mehr Ca^{2+} für die nächste Freisetzung zur Verfügung. Moduliert über regulatorische Domänen auf der luminalen Seite des Ryanodin-Rezeptors vergrößert sich darüber hinaus dessen Öffnungswahrscheinlichkeit.^{34,101,111} Es kommt so gehäuft zu so genannter „spontaner“ Ca^{2+} -Freisetzung, die einen bekannten Trigger für Nachdepolarisationen darstellt (siehe hierzu Abschnitt 4.4.1).³⁷

4.2 Relevanz der diastolischen Dysfunktion

Eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit verbessert die systolische Funktion, führt jedoch auch zu einer eingeschränkten Entspannung des Herzens in der Diastole. Dies konnte für Dehnung der Myofilamente und beim Einsatz von Ca^{2+} -Sensitizern gezeigt werden.^{59,112} Diastolische Dysfunktion ist auch ein Kennzeichen der FHK und ebenso in Tiermodellen mit TNT-Mutationen durchweg anzutreffen.^{15,24}

Die Bedeutung der diastolischen Dysfunktion in Hinblick auf die Arrhythmogenese ist nicht klar zu ermessen. Mit TgR278C haben wir jedoch eine TNT-Mutation, die einerseits eine eingeschränkter Relaxation ausweist, andererseits aber einen unveränderten Ca^{2+} -Zyklus, normale

Aktionspotentiale und keine Neigung zu Rhythmusstörungen zeigt. Deshalb spielt die diastolische Dysfunktion bei der Entstehung der Rhythmusstörungen und letztendlich des plötzlichen Herztodes bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit wahrscheinlich nicht die entscheidende Rolle.

4.3 Mechanismen der Aktionspotential-Veränderung

4.3.1 Ca^{2+} moduliert das Aktionspotential über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Die Repolarisation des Aktionspotentials wird im Wesentlichen vom Verhältnis des depolarisierenden Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) und des repolarisierenden K^+ -Ausstroms bestimmt.¹¹³ Moduliert wird es darüber hinaus vom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und von der Na^+/K^+ -ATPase, die jedoch einen vernachlässigbar kleinen Anteil hat. I_{Ca} und der K^+ -Ausstrom sind in Tgl79N-Mäusen⁹² und mit EMD 57033 (Daten unveröffentlicht) jedoch unverändert, wie andere Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die in Abbildungen 11 und 17 gezeigten Veränderungen der Repolarisation durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bedingt sind.

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist der wichtigste Mechanismus der Ca^{2+} -Entfernung aus der Zelle. Wegen seiner Stöchiometrie von 3 Na^+ -Ionen zu 1 Ca^{2+} -Ion ist er elektrogen, daher die Beeinflussung des Aktionspotentials. Wenn er im *forward mode* Ca^{2+} aus der Zelle entfernt, entsteht ein depolarisierender Einwärtsstrom; wenn er hingegen im *backward mode* Na^+ aus der Zelle schafft, kommt es zu einem repolarisierenden Strom. Die Richtung und das Ausmaß des generierten Stromes ($I_{\text{Na/Ca}}$) hängen dabei vom Membranpotential (E_m) sowie von den Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen in direkter Nachbarschaft des Austauschers ab. Während des Ablaufes eines Aktionspotentials ändern sich diese Bedingungen kontinuierlich. Bei normalen diastolischen Bedingungen beträgt das Umkehrpotential etwa -40

mV. Beim Ruhepotential agiert er also im *forward mode* und es kommt zu einem leichten Einwärtsstrom. Mit der Depolarisation wechselt er für eine gewisse Zeit die Richtung, so dass ein Auswärtsstrom entsteht. Die Dauer, die er so im *backward mode* agiert, hängt entscheidend von der Höhe und Breite des Plateaus ab. Im weiteren Verlauf der Repolarisation wechselt er mit negativ-werdendem Membranpotential und steigendem $[Ca^{2+}]_i$ wieder in den *forward mode* zurück.^{88,101,114}

Die Ca^{2+} -Transienten in Tgl79N erreichen ihr Maximum im Bereich von 50-70% Repolarisation, dies konnte bei zeitgleichen Aufnahmen von Ca^{2+} -Transienten und Aktionspotentialen mit Hilfe der *perforated patch*-Technik gezeigt werden.⁹² Dieser Maximalwert ist bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit vermindert, wie Abbildungen 6 bis 8 demonstrieren. Es kann so weniger Ca^{2+} durch den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher aus den Myozyten entfernt werden. Dies wiederum ergibt einen geringeren Einwärtsstrom und in der Folge verkürzte APD_{50} and APD_{70} . Ein anderes Bild ergibt sich am Ende des Aktionspotentials und in der Diastole: bei langsamen Frequenzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ca^{2+} -Transienten mit normaler und erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit, deshalb sieht man auch keine Unterschiede in APD_{90} , d.h. in der Gesamtdauer der Aktionspotentiale.

Diese Ca^{2+} -abhängige Modulation der Aktionspotentialdauer ist ein bekannter Mechanismus und konnte in einer Vielzahl an Modellen bestätigt werden.^{88,104,114-116} Die Richtigkeit dieser Annahmen wird ferner durch Ergebnisse anderer Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Sie konnten zeigen, dass eine Blockade des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers die beobachteten Aktionspotential-Veränderungen bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit beseitigt.⁹² Ebenso glich eine Erhöhung der Ca^{2+} -Pufferung mit Hilfe von EGTA vorher bestehende Unterschiede in der Repolarisation von Tgl79N und der Kontrollgruppe vollständig aus. Es passt auch zum beschriebenen Mechanismus, dass die Unterschiede zwischen Tgl79N und der Kontrollgruppe bzw. R278C durch Isoproterenol gemildert werden (Abb. 16). Isoproterenol vergrößert schließlich die Amplitude der Ca^{2+} -Tran-

sienten in Tgl79N stärker als in den anderen beiden Gruppen (Abb. 8), so dass die Einschränkung des Einwärtsstroms weniger stark ausgeprägt ist.

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir kürzlich zeigen, wie stark Ca^{2+} -Transienten auch die so genannte Restitutionskurve des Aktionspotentials, d.h. die Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer von der Stimulationsfrequenz, prägen. So wird die Restitutionskurve der späten Repolarisationsphase der Maus offenbar überwiegend von der frequenzabhängigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bestimmt.¹¹⁷ Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Das bei schnellen Frequenzen erhöhte diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 7) induziert eine verstärkte Ca^{2+} -Entfernung aus der Zelle. Diese führt zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom, der die Gesamtdauer des Aktionspotentials entsprechend verlängert. Wie man Tabelle 3 entnehmen kann, ist dies in Anwesenheit von EMD 57033 im Steady-state-Zustand der Fall. Nach Pausen ist die Aktionspotential-Verlängerung noch ausgeprägter und in Tgl79N und mit EMD 57033 jeweils hoch signifikant (Abb. 13). Während der schnellen Stimulationsserien kommt wahrscheinlich es zu einer Ca^{2+} -Überladung des SR, die bei plötzlicher Freisetzung nach einer Pause $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zusätzlich erhöht.

Die Ca^{2+} -abhängige Modulation des Aktionspotentials spielt bei allen Säugetieren eine Rolle. Da der Stromfluss über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher von der Aktionspotential-Konfiguration abhängig ist, ergeben sich im Detail jedoch Spezies-Unterschiede. Wegen des breiten Plateaus des Aktionspotentials agiert der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bei Menschen und Katzen im Vergleich zu Mäusen länger im *backward mode*, es kommt zu einem etwas längeren und stärkeren Auswärtsstrom, anstelle eines verminderten Einwärtsstroms bei der Maus. Diese Unterscheide erklären wahrscheinlich auch, warum EMD 57033 in Katzen im Gegensatz zu Mäusen auch zu einer Verkürzung von APD_{50} und APD_{30} führt (Abb. 11 und 17). Bei normalem

diastolischem $[Ca^{2+}]_i$ wird ist Gesamtdauer, quantifiziert durch APD_{90} , jedoch auch hier nicht verändert. Erst bei schnellen Herzfrequenzen und entsprechendem Anstieg des diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ kommt es zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer, wie es in Abbildung 18 gezeigt wird.

4.3.2 Auswirkung von Dehnung auf die Aktionspotential-Regulation

Der Effekt von Dehnung der Myofilamente auf die Aktionspotential-Gestalt ist von Cazorla und Kollegen ausführlich beschrieben worden.¹¹⁸ In der Regel kommt es sofort nach Beginn der Dehnung zu einer Verkürzung der Aktionspotential-Dauer. Ein Teil der Autoren sah interessanterweise so genannte *cross-over*-Phänomene mit einer leichten Verlängerung der terminalen Repolarisation bei ansonsten verkürztem Aktionspotential.¹¹⁹ Erst viele Schläge später wird das Aktionspotential etwas länger, es kommt zu einer Normalisierung oder sogar zu einer Verlängerung gegenüber dem Ausgangszustand.^{118,120}

Wie bei den in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten sind zwei unterschiedliche Mechanismen für die Änderungen der Aktionspotential-Gestalt verantwortlich: die Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit sowie die Aktivierung dehnungsabhängiger Ionenkanäle (SACs). Erstere tritt bereits nach Millisekunden und damit deutlich vor der Aktivierung von SACs auf. Die beobachtete initiale Verkürzung der Aktionspotential-Dauer sowie das *cross-over*-Phänomen werden so dem Na^+/Ca^{2+} -Austauscher zugeschrieben, der Mechanismus entspricht dabei dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen.^{99,121}

Allerdings ist die Situation etwas komplizierter, da SACs in gleicher Art und Weise wie der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher auf das Aktionspotential wirken können. SACs sind unspezifische Kationen-Kanäle.¹¹⁸ Bei Membranpotentialen positiv vom seinem Umkehrpotential (d.h. in der frühen Phase des Aktionspotentials) wird es unter bestimmten Bedingungen zu einem

Auswärtsstrom und damit zu der beschriebenen Verkürzung des Aktionspotentials kommen. Langfristig führt die Öffnung von SACs über einen Ca^{2+} -Einstrom zu einer Erhöhung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$,⁹⁹ was wiederum unter anderem auf die Regulation des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Auswirkungen hat. Es ist insofern schwierig abzuschätzen, welcher Anteil im Aktionspotential-Remodelling der Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit und welcher Anteil SACs zukommt. Wir wissen jedoch sicher, dass beide eine Rolle spielen, da sowohl Streptomycin als SAC-Blocker als auch erhöhte Ca^{2+} -Pufferung das Aktionspotential wieder normalisieren.¹²⁰

Die verstärkte Arrhythmogenese mit Dehnung lässt sich sicherlich nicht hinreichend durch die diskutierten Änderungen der Aktionspotential-Regulation erklären, es ist eine Vielzahl weiterer Mechanismen beteiligt.¹²² Dennoch sind die beschriebenen Auswirkungen von Dehnung auf die Aktionspotential-Regulation aus mehreren Gründen interessant. Erstens lässt sich zumindest eine Beteiligung der veränderten Ca^{2+} -Empfindlichkeit bei der Arrhythmogenese mit Dehnung vermuten. So erschwert die verlangsamte Kinetik der Ca^{2+} -Transienten in der Diastole die Entfernung des Ca^{2+} , welches zusätzlich über SACs einströmt. Zweitens sind die beschriebenen Veränderungen ein weiteres Beispiel für die Kausalkette: Erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit \Rightarrow erniedrigte Ca^{2+} -Transienten mit langsamerem Abfall \Rightarrow Aktionspotential-Remodelling. Damit stützen sie die vorgestellten Ergebnisse von TNT-Mutationen und Ca^{2+} -Sensitizern. Und schließlich ist der Anstieg der Ca^{2+} -Empfindlichkeit durch Dehnung offenbar in TNT-Mutationen mit bereits erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit größer ist als in Kontrollgruppen. Dies konnte für transgene Mäuse mit einer anderen TNT-Mutation gezeigt werden.³⁰ Wäre dies bei allen TNT-Mutationen mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Fall, dann würde eine Erhöhung der Vorlast die in TgI79N beobachteten Veränderungen von Ca^{2+} -Zyklus und Aktionspotential-Regulation gewissermaßen potenzieren.

4.4 Mechanismen der Arrhythmie-Entstehung

4.4.1 Entstehung der Nachdepolarisationen durch Ca^{2+} -aktivierten transienten Einwärtsstrom

Das erhöhte diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei schnellen Herzfrequenzen ist wahrscheinlich der Schlüssel zur Entwicklung der Arrhythmien bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit. Man unterscheidet zwei Arten von Nachdepolarisationen: frühe (EADs) und späte Nachdepolarisationen (DADs). DADs sind diastolische Depolarisationen, die durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR initiiert werden. Die Entfernung des zusätzlich freigesetzten Ca^{2+} aus der Zelle mit Hilfe des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im *forward mode* löst einen transienten Einwärtsstrom (I_{ti}) aus.^{37,104,116} Deshalb findet man DADs bei schnellen Herzfrequenzen und in Szenarien mit intrazellulärer Ca^{2+} -Überladung. Besonders unter Bedingungen eines hohen SR Ca^{2+} -Inhalts kann jede zusätzliche spontane Ca^{2+} -Freisetzung hier ein DAD auslösen.

EADs mit einem *takeoff* zu Beginn der Depolarisation werden durch eine vorzeitige Reaktivierung von I_{Ca} ausgelöst. Sie treten vor allem bei langsamen Herzfrequenzen und einer Verlängerung des Aktionspotentials auf. Ein typischer prädisponierender Faktor ist das Long-QT-Syndrom mit einem verminderten Kalium- oder erhöhten Natriumstrom.¹²³ EADs mit einem späteren *takeoff*, auch *Phase 3-EADs* oder *High Membrane Potential-EADs* genannt, haben jedoch einen anderen Mechanismus: sie werden durch I_{ti} ausgelöst und entsprechen in ihrem Mechanismus so den DADs.^{37,111,116}

Es stellt sich natürlich die Frage, durch welchen Mechanismus die EADs in der vorliegenden Studie ausgelöst wurden. Die beobachteten EADs hatten ein *takeoff* im Bereich von 80% Repolarisation. Mit einem angenommenen Ruhemembranpotential (E_m) von -70 mV und einem *Overshoot* von 20 mV, entsprechen 80% der Repolarisation einem E_m von -52 mV. Die Gültigkeit

dieser Berechnung ist gezeigt worden.⁷⁴ Bei -52 mV können EADs nicht mehr durch eine Reaktivierung des Ca^{2+} -Kanals ausgelöst werden, da der *window current* vom L-Typ- Ca^{2+} -Kanal oberhalb von -40 mV liegt.¹²³ Dementsprechend müssen die EADs durch Ca^{2+} -aktivierte Ströme ausgelöst werden; diese wiederum sind beinahe ausschließlich auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zurückzuführen.^{104,111,116}

4.4.2 Erleichterung eines Wiedereintritts durch Verkürzung der Refraktärzeit

Ein erhöhtes Auftreten von Nachdepolarisationen und Extraschlägen hat arrhythmogenes Potential. Zur Entstehung lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien sind jedoch zusätzlich Störungen der Impulsweiterleitung erforderlich.⁹⁰ Bei der Impulsausbreitung trifft die Erregung normalerweise auf nicht wiedererregbares Myokard, da dieses noch refraktär ist. Dies ist gewährleistet, solange die Länge der weitesten Erregungsschleife kleiner ist als das Produkt aus der effektiven Refraktärzeit und der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit.¹²⁴ Zu einem Wiedereintritt der Erregung mit ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern kann es jedoch kommen, wenn 1) die Länge der Erregungsschleife zunimmt; dies ist beispielsweise bei der Hypertrophie der Fall, spielt in den untersuchten Modellen jedoch keine vorrangige Rolle 2) die Ausbreitungsgeschwindigkeit verlangsamt ist oder 3) die Refraktärzeit verkürzt ist (Abb. 20).

Die beobachtete kürzere effektive Refraktärzeit (ERZ) ist konsistent mit dem verkürzten QT-Intervall (Tabelle 4), da das QT-Intervall im EKG Ausdruck der ventrikulären Repolarisation ist. So gibt eine enge Beziehung zwischen der ERZ und dem QT-Intervall.¹²⁵ Die kürzere ERZ passt weiterhin gut zu den Änderungen im MAP, da die Aktionspotential-Dauer ebenfalls eng mit der ERZ korreliert ist.^{113,126} Im Maus Herzen kommt es zu einer Wiedererregbarkeit bei einem durchschnittlichen Repolarisations-Niveau von 80%.⁷⁴ Dazu passend wurde in dieser Studie eine Verkürzung

der Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation gesehen (Abb. 11 und 17).

Der Stellenwert einer verkürzten ERZ darf nicht unterschätzt werden: Maguire und Kollegen konnten zeigen, dass die ERZ in Mäusen derjenige elektrophysiologische Parameter ist, der am besten mit einer Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien korreliert.¹²⁷ Die verkürzte ERZ mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit bildet so ein arrhythmogenes Substrat, das zusätzlich mit dem Trigger häufigerer Nachdepolarisation und Extraschlägen die Entwicklung tödlicher Herzrhythmusstörungen hinreichend erklären kann.

4.4.3 Weitere mögliche Mechanismen der Arrhythmogenese

Es gibt zusätzlich zu den beschriebenen Möglichkeiten weitere Mechanismen, die - basierend auf den beobachteten Unterschieden im Ca^{2+} -Zyklus sowie der Aktionspotential-Regulation - eine verstärkte Arrhythmogenese erklären können:

1) Verlangsamte Ca^{2+} -Transienten können zur Aktivierung regulatorischer Proteine wie der Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II (CamKII) führen.^{128,129} Eine Hochregulierung von CamKII wiederum kann auch bei nicht verlängerter Aktionspotential-Dauer und nach Normalisierung des diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ EADs auslösen.¹²⁸ Eine Inhibition von CamKII hemmt den depolarisierenden $I_{\text{Na/Ca}}$ wahrscheinlich sekundär über eine Verhinderung der CaMKII-abhängigen Ca^{2+} -Überladung des SR.¹³⁰ Dieser Mechanismus ist so synergistisch zu dem von mir beschriebenen Mechanismus der Arrhythmogenese. Bei chronischer Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit spielt er wahrscheinlich eine verstärkende Rolle. Für die Zukunft stellt eine Blockierung von CaMKII dementsprechend eine vielversprechende therapeutische Option dar, um in Szenarien mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit Rhythmusstörungen zu verhindern.¹²⁹

2) Es gibt angeborene regionale Unterschiede in der Repolarisation, die

sich auf Unterschiede im Ca^{2+} -Zyklus zurückführen lassen.¹³¹ Eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit könnte die regionale Variabilität der Ca^{2+} -Transienten erhöhen, im Falle der Ca^{2+} -Sensitizer beispielsweise durch lokal unterschiedliche Verteilung im Gewebe. Verstärkte regionale Unterschiede in der Repolarisation wiederum führen zu räumlicher Heterogenität der Refraktärzeit, welche zu Wiedereintritt und Kammerflimmern disponiert.^{132,133}

3) Ca^{2+} -induzierte EADs können unter bestimmten Bedingungen einen bereits beendeten Wiedereintritt selbständig erneut einleiten, wie Huffaker und Kollegen kürzlich vorgeschlagen haben.¹³⁴

4) Erhöhtes basales $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bremst die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregung und schafft somit Bedingungen, die einen Wiedereintritt erleichtern.^{37,135} Verantwortlich hierfür ist neben Veränderungen der depolarisierenden Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme auch eine verlangsamte Leitung der Gap Junctions bei erhöhtem $[\text{Ca}^{2+}]_i$.¹³⁶ Entsprechend haben London und Kollegen in einem Herzinsuffizienz-Modell mit verändertem Ca^{2+} -Zyklus, welches ventrikuläre Tachykardien unabhängig von Nachdepolarisationen, getriggerten Schlägen oder regionalen Unterschieden der Refraktärzeit aufwies, eine zu Grunde liegende verlangsamte heterogene Ausbreitung vorzeitiger Schläge gesehen.¹³⁷

4.4.4 Differentieller Effekt β -adrenerger Aktivierung

Das Fehlen einer gehäuften Inzidenz von EADs und getriggerten Schlägen in Anwesenheit von Isoproterenol mag überraschend erscheinen, da Ca^{2+} -aktivierte Nachdepolarisationen verstärkt bei β -adrenerger Aktivierung entstehen.^{37,104} Während sich die beobachtete Wirkung von Isoproterenol auf Arrhythmogenese nicht vollständig erklären lässt, so gibt es doch einige Erklärungsansätze:

1) Isoproterenol hat einen positiv-inotropen, lusitropen und chronotropen Effekt. Wenn man die nachdrückliche Frequenzabhängigkeit der getriggerten Aktivität in Abbildung 15 betrachtet, so könnte die

Isoproterenol-induzierte Zunahme ventrikulärer Ektopie *in vivo* (Abb. 1) und in spontan-schlagenden Herzen vorrangig durch den chronotropen Effekt erklärt werden. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 diskutiert, könnte der lusitrope Effekt von Isoproterenol in Tgl79N verstärkt sein. Dieser würde einer Erhöhung des basalen $[Ca^{2+}]_i$ bei verstärktem Ca^{2+} -Einstrom entgegen wirken.

2) In vorbereitenden Experimenten wurden ventrikuläre Arrhythmien vornehmlich nach Pausen gesehen. Deshalb war das Stimulationsprotokoll speziell entworfen, um getriggerte Aktivität nach Pausen zu untersuchen. Aufnahmen mit spontaner Aktivität in der ersten Pause (dem S1S2-Intervall) mussten verworfen werden. In allen Genotypen, d.h. in Tgl79N, TgR278C und der Kontrollgruppe, sah man eine höhere Inzidenz spontaner, nicht getriggelter Schläge. So gab es in Anwesenheit von Isoproterenol mehr Aufnahmen mit spontaner Aktivität, die eine Analyse von Aktionspotential-Remodelling, EADs und getriggerten Schlägen ausschlossen. Deshalb konnten weniger Stimulationsserien analysiert werden. Deren Anzahl mag nicht ausreichend gewesen sein, um kleine Unterschiede aufzuspüren.

3) Eine andere Möglichkeit ist, dass der arrhythmogene Effekt von Isoproterenol bei vorgegebener Herzfrequenz vor allem auf der Organebene stattfindet, beispielsweise durch eine verbesserte Weiterleitung von EADs. Dieser Mechanismus ist auch von Wu und Kollegen vorgeschlagen worden, die in einem Mausmodell mit CaMKII-Überexpression die selben Beobachtungen gemacht haben.¹²⁸

4.4 Bedeutung der Studie

Die gewonnenen und vorgestellten Daten zeigen erstmals, dass akute und chronische Erhöhungen der Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente unabhängige Risikofaktoren bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen sind. Sie bieten so eine mögliche Erklärung für plötzlichen Herztod bei jungen Patienten mit Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie, die keine ausgeprägte Hypertrophie und Fibrose aufweisen. Im Fokus der Forschung hierzu stand bisher ein Zusammenspiel von diastolischer Dysfunktion und myokardialer Ischämie.¹⁴ Ein davon unabhängiger Mechanismus der Arrhythmogenese ist bisher nicht systematisch untersucht worden.

Die Arbeit zeigt weiterhin, warum der pharmakologische Einsatz von Ca^{2+} -Sensitizern mit einem besonderen Risiko für Herzrhythmusstörungen verbunden ist und daher genau abgewogen werden sollte. Die beschriebenen Mechanismen spielen möglicherweise auch eine Rolle bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit im Rahmen von einer erhöhten Vorlast, chronischer Herzinsuffizienz sowie nach einem Myokard-Infarkt. Während die Situation hier sicherlich komplex ist und eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen beteiligt ist, sollte die Regulation der Ca^{2+} -Empfindlichkeit mit den entsprechenden Auswirkungen auf den Ca^{2+} -Zyklus in Zukunft verstärkt bedacht werden. Beispielhaft hierfür steht eine kürzlich veröffentlichte Studie, nach der körperliches Training nach einem Myokard-Infarkt die zuvor erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit senken kann.^{50,58}

4.5 Einschränkungen der Studie

Die Elektrophysiologie von Menschen und Mäusen unterscheidet sich substantiell und die beobachteten Veränderungen mit erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit im Mausmodell sind nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar.⁷⁰ Während Untersuchungen am Ca^{2+} -Zyklus nur im

Mausmodell durchgeführt wurden, so konnten die wichtigsten Befunden zur Aktionspotential-Regulation und Arrhythmogenese in Katzen bestätigt werden. Die Elektrophysiologie von Katzen ist dem Menschen ähnlicher, jedoch bestehen weiterhin Unterschiede, so dass auch diese Ergebnisse nicht zwangsläufig übertragbar sind.⁷¹

Mit TgI79N wurde ein transgenes Tiermodell untersucht, welches eine schlechte klinische Prognose bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente aufweist. Dem wurde mit TgR278C eine Mutante gegenübergestellt, die eine klinisch eine gute Prognose bei unveränderter Ca^{2+} -Empfindlichkeit zeigt. Während es sehr gute Hinweise gibt, dass diese beiden Mutationen repräsentativ für ein jeweils größeres Kollektiv sind, ist dies selbstverständlich nicht garantiert.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie zeigt erstmals, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente im Tiermodell einen selbstständigen Risikofaktor bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen darstellt. Dies konnte sowohl für chronische Erhöhung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit im Rahmen einer Familiären Hypertrophen Kardiomyopathie (FHK) als auch für eine akute Erhöhung mit Hilfe eines Ca^{2+} -Sensitizers gezeigt werden. Die Ergebnisse der Arbeit bieten so eine mögliche Erklärung für plötzlichen Herztod bei bestimmten Patienten mit FHK. Sie schränken weiterhin den Einsatz von Ca^{2+} -Sensitizern ein. Schließlich beleuchten sie einen bisher kaum untersuchten Aspekt in der Arrhythmogenese von Herzinsuffizienz und nach einem Myokard-Infarkt.

Abbildung 21 zeigt zusammenfassend den vermuteten Mechanismus: Auf zellulärer Ebene findet sich ein veränderter Ca^{2+} -Zyklus mit erniedrigten und verlangsamten Transienten. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich eine direkte Konsequenz der erhöhten Bindungsaffinität für Ca^{2+} . Die Myofilamente sind „klebriger“ für Ca^{2+} , während der Systole wird mehr Ca^{2+} gebunden, während der Diastole hingegen dissoziiert es langsamer. Bei adrenerger Stimulation und schnellen Herzfrequenzen mit entsprechender Verkürzung der Diastole kommt es zu erhöhtem diastolischem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zu erhöhtem Ca^{2+} -Inhalt des SR.

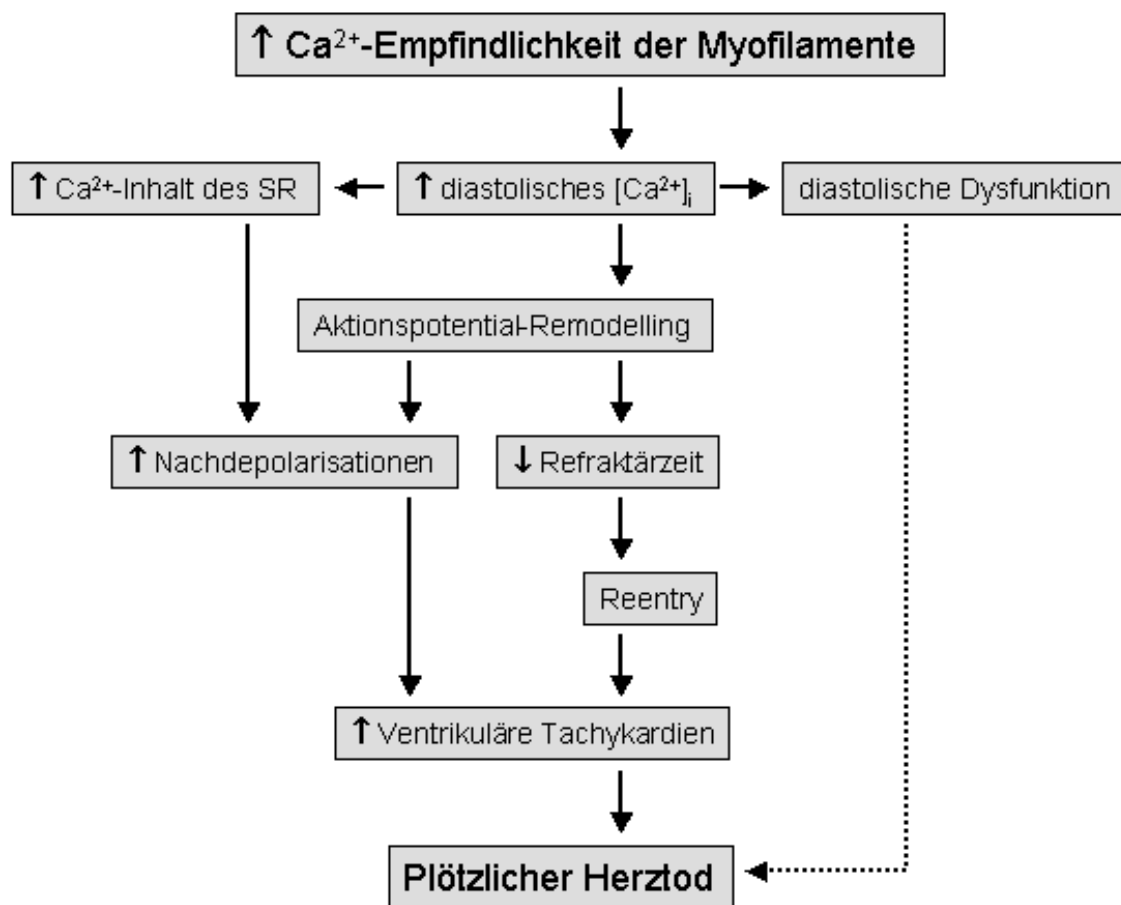


Abbildung 21. Schaubild zur vermuteten Entstehung von plötzlichem Herztod bei erhöhter Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente

Der so veränderte Ca^{2+} -Zyklus führt wahrscheinlich mit Hilfe des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zu Veränderungen der Repolarisation des Aktionspotentials. Bei schnellen Herzfrequenzen treten Aktionspotential-Verlängerung, Ca^{2+} -abhängige Nachdepolarisationen und getriggerte Schläge auf. Auf Organ-Ebene findet sich eine verkürzte Refraktärzeit. Damit sind sowohl ein Trigger als auch ein arrhythmogenes Substrat für die beobachteten ventrikulären Arrhythmien gegeben.

6 Literatur

1. Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation*. 1998;98:2334-51.
2. Müller-Nordhorn JA, HR. Löwel. H. Willich, SN. Epidemiologie des plötzlichen Herztodes. *Intensivmed*. 2001;38:499-507.
3. Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation*. 2001;104:2158-63.
4. Hinkle LE, Jr., Thaler HT. Clinical classification of cardiac deaths. *Circulation*. 1982;65:457-64.
5. Maron BJ, Epstein SE, Roberts WC. Causes of sudden death in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol*. 1986;7:204-14.
6. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama*. 1996;276:199-204.
7. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:655-70.
8. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults [see comments]. *Circulation*. 1995;92:785-9.
9. Maron BJ, Peterson EE, Maron MS, Peterson JE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in an outpatient population referred for echocardiographic study. *Am J Cardiol*. 1994;73:577-80.

10. Vulpian A. Contribution à l'étude des rétrécissements de l'orifice ventriculo-aortique. *Arch Physiol*. 1868;3:220-222.
11. Kohler J, Winkler G, Schulte I, Scholz T, McKenna W, Brenner B, Kraft T. Mutation of the myosin converter domain alters cross-bridge elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3557-62.
12. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell*. 1994;77:701-12.
13. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990;62:999-1006.
14. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, 3rd, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED. American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1687-713.
15. Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment [see comments]. *Circulation*. 1995;92:1680-92.
16. Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A, Mahon NG, McKenna WJ. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2212-8.

17. Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342:1778-85.
18. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003;108:445-51.
19. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1995;332:1058-64.
20. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation.* 2001;104:1380-4.
21. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:549-55.
22. Maass AH, Ikeda K, Oberdorf-Maass S, Maier SK, Leinwand LA. Hypertrophy, fibrosis, and sudden cardiac death in response to pathological stimuli in mice with mutations in cardiac troponin T. *Circulation.* 2004;110:2102-9.
23. Gomes AV, Potter JD. Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:214-24.
24. Knollmann BC, Potter JD. Altered regulation of cardiac muscle contraction by troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:206-12.

25. Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H, Reggiani C. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity [see comments]. *Circ Res.* 1998;82:106-15.
26. Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Morimoto S, Ohtsuki I. Functional consequences of the deletion mutation deltaGlu160 in human cardiac troponin T. *J Biochem (Tokyo)*. 2000;127:263-8.
27. Hernandez O, Szczesna-Cordary D, Knollmann BC, Miller T, Bell M, Zhao J, Sirenko SG, Diaz Z, Guzman G, Xu Y, Wang Y, Kerrick WG, Potter JD. F110I and R278C troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy affect muscle contraction in transgenic mice and reconstituted human cardiac fibers. *J Biol Chem.* 2005;280:37183-94.
28. Nakaura H, Morimoto S, Yanaga F, Nakata M, Nishi H, Imaizumi T, Ohtsuki I. Functional changes in troponin T by a splice donor site mutation that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol.* 1999;277:C225-32.
29. Tardiff JC, Factor SM, Tompkins BD, Hewett TE, Palmer BM, Moore RL, Schwartz S, Robbins J, Leinwand LA. A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1998;101:2800-11.
30. Chandra M, Rundell VL, Tardiff JC, Leinwand LA, De Tombe PP, Solaro RJ. Ca(2+) activation of myofilaments from transgenic mouse hearts expressing R92Q mutant cardiac troponin T. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H705-13.

31. Morimoto S, Yanaga F, Minakami R, Ohtsuki I. Ca²⁺-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol*. 1998;275:C200-7.
32. Nakaura H, Yanaga F, Ohtsuki I, Morimoto S. Effects of missense mutations Phe110Ile and Glu244Asp in human cardiac troponin T on force generation in skinned cardiac muscle fibers. *J Biochem (Tokyo)*. 1999;126:457-60.
33. Gomes AV, Venkatraman G, Potter JD. The miscommunicative cardiac cell: when good proteins go bad. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:30-7.
34. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
35. Bers DM. Myofilaments: The End Effector of E-C Coupling. In: *Excitation and Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 2001:19-38.
36. Bers DM. Calcium Sources and Sinks. In: *Excitation and Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 2001:39-56.
37. Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev*. 2007;87:457-506.
38. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 1954;173:971-3.
39. Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol*. 1998;274:H1335-47.

40. Holzer JR, Fong LE, Sidorov VY, Wikswo JP, Jr., Baudenbacher F. High resolution magnetic images of planar wave fronts reveal bidomain properties of cardiac tissue. *Biophys J*. 2004;87:4326-32.
41. Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*. 1998;83:471-80.
42. Miller T, Szczesna D, Housmans PR, Zhao J, deFreitas F, Gomes AV, Culbreath L, McCue J, Wang Y, Xu Y, Kerrick WG, Potter JD. Abnormal Contractile Function in Transgenic Mice Expressing an FHC-Linked Troponin T (I79N) Mutation. *J Biol Chem*. 2001;276:3743-3755.
43. Hibberd MG, Jewell BR. Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol*. 1982;329:527-40.
44. Frank O. Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol*. 1895;32:370-447.
45. Solaro JR. *Modulation of Cardiac Myofilament Activity by Protein Phosphorylation*. New York: Oxford University Press; 2002.
46. Sidorov VY, Woods MC, Baudenbacher P, Baudenbacher F. Examination of stimulation mechanism and strength-interval curve in cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2602-15.
47. Brixius K, Savvidou-Zaroti P, Mehlhorn U, Bloch W, Kranias EG, Schwinger RH. Increased Ca²⁺-sensitivity of myofibrillar tension in heart failure and its functional implication. *Basic Res Cardiol*. 2002;97 Suppl 1:I111-7.
48. Brixius K, Reuter H, Bloch W, Schwinger RH. Altered hetero- and homeometric autoregulation in the terminally failing human heart. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:29-35.

49. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res.* 2003;57:37-47.
50. de Waard M, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje N, Dekkers D, Schoonderwoerd K, Schuurbiens H, de Crom R, Stienen G, Sipido K, Lamers J, Duncker D. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res.* 2007;100:1079-88.
51. van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DH, Stienen GJ, Lamers JM, Duncker DJ. Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;95:e85-95.
52. Tomaselli GF, Zipes DP. What causes sudden death in heart failure? *Circ Res.* 2004;95:754-63.
53. Solomon SD, Zelenkofske S, McMurray JJ, Finn PV, Velazquez E, Ertl G, Harsanyi A, Rouleau JL, Maggioni A, Kober L, White H, Van de Werf F, Pieper K, Califf RM, Pfeffer MA. Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both. *N Engl J Med.* 2005;352:2581-8.
54. Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N, Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001:CD001800.
55. Kalapura T, Lavie CJ, Jaffrani W, Chilakamarri V, Milani RV. Effects of cardiac rehabilitation and exercise training on indexes of dispersion of ventricular repolarization in patients after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2003;92:292-4.

56. Billman GE, Schwartz PJ, Stone HL. The effects of daily exercise on susceptibility to sudden cardiac death. *Circulation*. 1984;69:1182-9.
57. Billman GE, Kukielka M. Effects of endurance exercise training on heart rate variability and susceptibility to sudden cardiac death: protection is not due to enhanced cardiac vagal regulation. *J Appl Physiol*. 2006;100:896-906.
58. Schober T, Knollmann BC. Exercise after myocardial infarction improves contractility and decreases myofilament Ca²⁺ sensitivity. *Circ Res*. 2007;100:937-9.
59. Schwinger RH, Brixius K. [If the myofilaments become sensitive: Ca²⁺-sensitizer for the therapy of heart insufficiency]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005;130:969-73.
60. Slinker BK, Wu Y, Green HW, 3rd, Kirkpatrick RD, Campbell KB. Overall cardiac functional effect of positive inotropic drugs with differing effects on relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:1-13.
61. de Zeeuw S, Trines SA, Krams R, Duncker DJ, Verdouw PD. In vivo evidence that EMD 57033 restores myocardial responsiveness to intracoronary Ca(2+) in stunned myocardium. *Eur J Pharmacol*. 2000;403:99-109.
62. Evans SJ, Levi AJ, Lee JA, Jones JV. EMD 57033 enhances arrhythmias associated with increased wall-stress in the working rat heart. *Clin Sci (Lond)*. 1995;89:59-67.
63. Kawai M, Lee JA, Orchard CH. Effects of the Ca²⁺ sensitizer EMD 57033 on intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes: relevance to arrhythmogenesis during positive inotropy. *Clin Sci (Lond)*. 2000;99:547-54.
64. Lee JA, Allen DG. Calcium sensitisers: mechanisms of action and potential usefulness as inotropes. *Cardiovasc Res*. 1997;36:10-20.

65. Effects of pimobendan on adverse cardiac events and physical activities in patients with mild to moderate chronic heart failure: the effects of pimobendan on chronic heart failure study (EPOCH study). *Circ J.* 2002;66:149-57.
66. Flevari P, Parissis JT, Leftheriotis D, Panou F, Kourea K, Kremastinos DT. Effect of levosimendan on ventricular arrhythmias and prognostic autonomic indexes in patients with decompensated advanced heart failure secondary to ischemic or dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2006;98:1641-5.
67. Knollmann BC, Blatt SA, Horton K, de Freitas F, Miller T, Bell M, Housmans PR, Weissman NJ, Morad M, Potter JD. Inotropic stimulation induces cardiac dysfunction in transgenic mice expressing a troponin T (I79N) mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2001;276:10039-48.
68. Sirenko SG, Potter JD, Knollmann BC. Differential effect of troponin T mutations on the inotropic responsiveness of mouse hearts--role of myofilament Ca²⁺ sensitivity increase. *J Physiol.* 2006;575:201-13.
69. Elliott PM, D'Cruz L, McKenna WJ. Late-onset hypertrophic cardiomyopathy caused by a mutation in the cardiac troponin T gene. *N Engl J Med.* 1999;341:1855-6.
70. London B. Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001;12:1089-91.
71. McDonald TF, Trautwein W. Membrane currents in cat myocardium: separation of inward and outward components. *J Physiol.* 1978;274:193-216.
72. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 1895;61:291–332.

73. Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BE, Weissman NJ, Jones LR, Morad M. Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol.* 2000;525 Pt 2:483-98.
74. Knollmann BC, Katchman AN, Franz MR. Monophasic action potential recordings from intact mouse heart: validation, regional heterogeneity, and relation to refractoriness. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001;12:1286-94.
75. Knollmann BC, Tranquillo J, Sirenko SG, Henriquez C, Franz MR. Microelectrode study of the genesis of the monophasic action potential by contact electrode technique. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2002;13:1246-52.
76. Franz MR. Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res.* 1999;41:25-40.
77. Berul CI, Christie ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest.* 1997;99:570-6.
78. McConnell BK, Fatkin D, Semsarian C, Jones KA, Georgakopoulos D, Maguire CT, Healey MJ, Mudd JO, Moskowitz IP, Conner DA, Giewat M, Wakimoto H, Berul CI, Schoen FJ, Kass DA, Seidman CE, Seidman JG. Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2001;88:383-9.
79. Lim CC, Liao R, Varma N, Apstein CS. Impaired lusitropy-frequency in the aging mouse: role of Ca(2+)-handling proteins and effects of isoproterenol. *Am J Physiol.* 1999;277:H2083-90.

80. Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol.* 1985;249:H1056-60.
81. Roe MW, Lemasters JJ, Herman B. Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium.* 1990;11:63-73.
82. Cleemann L, Morad M. Role of Ca²⁺ channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from Ca²⁺ transients and contraction. *J Physiol (Lond).* 1991;432:283-312.
83. Williford DJ, Sharma VK, Korth M, Sheu SS. Spatial heterogeneity of intracellular Ca²⁺ concentration in nonbeating guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 1990;66:241-8.
84. Lim CC, Apstein CS, Colucci WS, Liao R. Impaired cell shortening and relengthening with increased pacing frequency are intrinsic to the senescent mouse cardiomyocyte. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2075-82.
85. Sitsapesan R, Williams AJ. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol.* 1990;423:425-39.
86. Hgashiyama A, Watkins MW, Chen Z, LeWinter MM. Effects of EMD 57033 on contraction and relaxation in isolated rabbit hearts. *Circulation.* 1995;92:3094-104.
87. White J, Lee JA, Shah N, Orchard CH. Differential effects of the optical isomers of EMD 53998 on contraction and cytoplasmic Ca²⁺ in isolated ferret cardiac muscle. *Circ Res.* 1993;73:61-70.
88. Carmeliet E. Intracellular Ca(2+) concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium.* 2004;35:557-73.

89. duBell WH, Boyett MR, Spurgeon HA, Talo A, Stern MD, Lakatta EG. The cytosolic calcium transient modulates the action potential of rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1991;436:347-69.
90. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell.* 2001;104:569-80.
91. Solaro RJ, Gambassi G, Warshaw DM, Keller MR, Spurgeon HA, Beier N, Lakatta EG. Stereoselective actions of thiadiazinones on canine cardiac myocytes and myofilaments. *Circ Res.* 1993;73:981-90.
92. Knollmann BC, Kirchhof P, Sirenko SG, Degen H, Greene AE, Schober T, Mackow JC, Fabritz L, Potter JD, Morad M. Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca²⁺-dependent action potential remodeling. *Circ Res.* 2003;92:428-36.
93. Diaz ME, Trafford AW, Eisner DA. The effects of exogenous calcium buffers on the systolic calcium transient in rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 2001;80:1915-25.
94. MacGowan GA, Du C, Cowan DB, Stamm C, McGowan FX, Solaro RJ, Koretsky AP, Del Nido PJ. Ischemic dysfunction in transgenic mice expressing troponin I lacking protein kinase C phosphorylation sites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H835-43.
95. Fentzke RC, Buck SH, Patel JR, Lin H, Wolska BM, Stojanovic MO, Martin AF, Solaro RJ, Moss RL, Leiden JM. Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *J Physiol.* 1999;517 (Pt 1):143-57.
96. Janssen PM, de Tombe PP. Protein kinase A does not alter unloaded velocity of sarcomere shortening in skinned rat cardiac trabeculae. *Am J Physiol.* 1997;273:H2415-22.

97. Backx PH, Ter Keurs HE. Fluorescent properties of rat cardiac trabeculae microinjected with fura-2 salt. *Am J Physiol.* 1993;264:H1098-110.
98. Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 1982;327:79-94.
99. Calaghan SC, White E. The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71:59-90.
100. Varian KD, Janssen PM. Frequency Dependent Acceleration of Relaxation Involves Decreased Myofilament Calcium Sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2212-9.
101. Schaub MC, Hefti MA, Zaugg M. Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:183-214.
102. Westermann D, Knollmann BC, Steendijk P, Rutschow S, Riad A, Pauschinger M, Potter JD, Schultheiss HP, Tschope C. Diltiazem treatment prevents diastolic heart failure in mice with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2006;8:115-21.
103. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:951-69.
104. Bers DM. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res.* 2002;90:14-7.
105. Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V, Kranias EG, Isenberg G, Lohse MJ. Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation.* 2004;109:1154-60.

106. Bers DM. Sarcoplasmic Reticulum. In: *Excitation and Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 2001:161-202.
107. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*. 2007;100:391-8.
108. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1993;265:C533-40.
109. Janczewski AM, Spurgeon HA, Stern MD, Lakatta EG. Effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ load on the gain function of Ca²⁺ release by Ca²⁺ current in cardiac cells. *Am J Physiol*. 1995;268:H916-20.
110. Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. Cross-signaling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1996;108:435-54.
111. Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, Wellens HJ, Lazzara R. Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc Res*. 2000;46:376-92.
112. Rice JJ, Winslow RL, Hunter WC. Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. *Am J Physiol*. 1999;276:H1734-54.
113. Conrath CE, Opthof T. Ventricular repolarization: An overview of (patho)physiology, sympathetic effects and genetic aspects. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005.

114. Janvier NC, McMorn SO, Harrison SM, Taggart P, Boyett MR. The role of Na(+)-Ca²⁺ exchange current in electrical restitution in ferret ventricular cells. *J Physiol*. 1997;504 (Pt 2):301-14.
115. Noble D, Noble SJ, Bett GC, Earm YE, Ho WK, So IK. The role of sodium-calcium exchange during the cardiac action potential. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;639:334-53.
116. Spencer CI, Sham JS. Effects of Na⁺/Ca²⁺ exchange induced by SR Ca²⁺ release on action potentials and afterdepolarizations in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2552-62.
117. Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR. Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H614-21.
118. Cazorla O, Pascarel C, Brette F, Le Guennec JY. Modulation of ions channels and membrane receptors activities by mechanical interventions in cardiomyocytes: possible mechanisms for mechanosensitivity. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;71:29-58.
119. Franz MR, Burkhoff D, Yue DT, Sagawa K. Mechanically induced action potential changes and arrhythmia in isolated and in situ canine hearts. *Cardiovasc Res*. 1989;23:213-23.
120. Calaghan SC, Belus A, White E. Do stretch-induced changes in intracellular calcium modify the electrical activity of cardiac muscle? *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;82:81-95.
121. Lab MJ, Allen DG, Orchard CH. The effects of shortening on myoplasmic calcium concentration and on the action potential in mammalian ventricular muscle. *Circ Res*. 1984;55:825-9.

122. Evans SJ, Dalton GR, Levi AJ. Experimental studies on myocardial stretch and ventricular arrhythmia in hypertrophied and non-hypertrophied hearts. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7:163-75.
123. January CT, Moscucci A. Cellular mechanisms of early afterdepolarizations. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;644:23-32.
124. Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 1 ed. Stuttgart: Thieme Verlag; 1998.
125. Guss SB, Kastor JA, Josephson ME, Schare DL. Human ventricular refractoriness. Effects of cycle length, pacing site and atropine. *Circulation*. 1976;53:450-5.
126. Koller BS, Karasik PE, Solomon AJ, Franz MR. Relation between repolarization and refractoriness during programmed electrical stimulation in the human right ventricle. Implications for ventricular tachycardia induction. *Circulation*. 1995;91:2378-84.
127. Maguire CT, Wakimoto H, Patel VV, Hammer PE, Gauvreau K, Berul CI. Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. *Physiol Genomics*. 2003;15:84-91.
128. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2002;106:1288-93.
129. Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther*. 2005;106:39-55.
130. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res*. 1999;84:906-12.

131. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*. 1991;69:1427-49.
132. Boersma L, Zetelaki Z, Brugada J, Allessie M. Polymorphic reentrant ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart studied by high-density mapping. *Circulation*. 2002;105:3053-61.
133. Laurita KR, Katra R, Wible B, Wan X, Koo MH. Transmural heterogeneity of calcium handling in canine. *Circ Res*. 2003;92:668-75.
134. Huffaker R, Lamp ST, Weiss JN, Kogan B. Intracellular calcium cycling, early afterdepolarizations, and reentry in simulated long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2004;1:441-8.
135. Luscher C, Lipp P, Luscher HR, Niggli E. Control of action potential propagation by intracellular Ca²⁺ in cultured rat dorsal root ganglion cells. *J Physiol*. 1996;490 (Pt 2):319-24.
136. White RL, Doeller JE, Verselis VK, Wittenberg BA. Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H⁺ and Ca⁺⁺. *J Gen Physiol*. 1990;95:1061-75.
137. London B, Baker LC, Lee JS, Shusterman V, Choi BR, Kubota T, McTiernan CF, Feldman AM, Salama G. Calcium-Dependent Arrhythmias in Transgenic Mice with Heart Failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002.

DANKSAGUNG:

Mein Dank gilt allen voran Herrn Dr. Björn Knollmann, der mir die Arbeit an der Georgetown University ermöglicht und mich fachlich und persönlich außerordentlich unterstützt hat. Weiterhin möchte ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Martin Lohse danken, der mich großzügig adoptiert hat und mir auch über weite Distanz und lange Dauer zur Seite stand.

Finanzielle Hilfe kam von Seiten des Studienförderwerks der Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw).

CURRICULUM VITAE

Tilmann Schober

PERSÖNLICHES

Geburt am 15.10.1979 in Hannover
Mutter Anna Schober, geb. Nolte; Ärztin
Vater Otmar Schober; Arzt und Physiker, Hochschullehrer
Geschwister Katharina und Kilian
Konfession römisch-katholisch
Nationalität deutsch

SCHULBILDUNG

1990-96, 1997-99 Gymnasium Paulinum, Münster
1996-97 Stonyhurst College, Lancashire, Großbritannien
06/1999 Abitur (Note: 1,4)

ZIVILDIENST

07/1999 – 09/2000 Deutschsprachige Katholische Gemeinde
St. Albertus Magnus, Barcelona, Spanien

STUDIUM

10/2000 – 05/2007 Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg;
Studium der Humanmedizin
(Note der Ärztlichen Prüfung: Sehr gut)
09/2003 – 04/2004 Forschungsaufenthalt an der Georgetown University,
Dep. of Clinical Pharmacology, Washington DC, USA
04/2006 – 03/2007 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Würzburg,
dem Kinderspital Zürich, Schweiz, und dem Golisano
Children's Hospital, Rochester NY, USA

WEITERBILDUNG

Seit 10/2007 Assistenzarzt am Zentrum für Kinderheilkunde der
Medizinischen Hochschule Hannover

FÖRDERUNG

- 05/2002 – 05/2007 Vollstipendium des Studienförderwerkes der
Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw)
- 09/2003 – 04/2004 Forschungsstipendium der
Stiftung der Deutschen Wirtschaft
- 08/2006 – 11/2006 *Hombberger-Stipendium* der Universität Würzburg

WEITERE AKTIVITÄTEN

- 01/2002 – 11/2005 Engagement und Mitglied in der Fachschaft Medizin
- 10/2002 – 09/2003 Mitglied des Fachbereichsrates der
Medizinischen Fakultät, Universität Würzburg
- 11/2002 Kongressorganisation zum Thema
„*AIDS/HIV und sozioökonomische Konsequenzen*“

FREMDSPRACHEN

Englisch (fließend), Spanisch (fließend), Französisch (Grundlagen)
Latein (Latinum), Altgriechisch (Graecum)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Baudenbacher*, Schober* et al, *J Clin Invest.* 2008 Dec;118 (12):3893-903

*gemeinsame Erstautorenschaft

Schober et al, *Circ Res* 2007; 100:937-9

Knollmann et al, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; Sep 8;

Knollmann et al, *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310:311-8

Knollmann et al, *Circ Res.* 2003; 92:428-36

KONGRESSBEITRÄGE

Baudenbacher et al, *Circulation* 116 (16), II-252, 2007

Henriksen et al, *Biophys. J. [Annual meeting abstract]* 2006

Schmidt et al, *Clin Pharmacol Ther.*, 77(2):P65, 2005

Knollmann et al, *Biophys. J. [Annual meeting abstract]* 2005

Schober et al, *Circulation* 110(17),III-781, 2004

Knollmann et al, *Biophys. J. [Annual meeting abstract]* 2002

Tilman Schober