

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Altersabhängige Vulnerabilität für supraventrikuläre und
ventrikuläre Arrhythmien bei Popdc2-Nullmutanten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth van Elten

aus Köln

Würzburg, im Februar 2014

Referent: Prof. Dr. med. Sebastian Maier

Koreferent: Prof. Dr. E. Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2014

Die Promovendin ist Ärztin

Für Stephan Goerlich.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Elektrophysiologie des Herzens	2
1.2 Herzrhythmusstörungen.....	5
1.2.1 Sick-Sinus-Syndrom (SSS).....	5
1.2.2 Kongenitales Long QT-Syndrom.....	6
1.3 Die Popdc-Genfamilie	8
1.3.1 Vorkommen und Struktur	8
1.3.2 Expressionsmuster von Podc2 während der Embryonalentwicklung und im Erwachsenenalter von Mäusen	9
1.3.3 EKG-Auswertungen und strukturelle Untersuchungen des Sinusknotens von Popdc2-Mäusen.....	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Oberflächen-EKG in Ruhe und unter pharmakologischem Stress	13
2.2.1 Ruhe-EKG.....	14
2.2.2 Stress-EKG	16
2.3 Elektrophysiologische Untersuchung	16
2.3.1 Vorhof-Stimulation	18
2.3.2 Kammer-Stimulation.....	19
2.4 Langendorff-Herz	21
2.4.1 Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Puffer	22
2.4.2 Aufbau der Langendorff-Aparatur	23
2.5 EKG-Auswertung	23
2.6 Entwicklung eines Arrhythmie-Scores	24
2.7 Statistische Auswertung	26
2.8 Graphische Auswertung	26

3 Ergebnisse	27
3.1 Oberflächen-EKG in Ruhe und unter pharmakologischem Stress	27
3.2 Elektrophysiologische Untersuchung	33
3.2.1 Einfluss der Variablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ auf die EKG-Parameter	33
3.2.2 Einfluss des Genotyps auf die EKG-Parameter	35
3.2.3 Einfluss des Genotyps und des Alters auf die Häufigkeit der aufgetretenen Arrhythmien	36
3.3 Bild-Beispiele ausgelöster Arrhythmien im Oberflächen-EKG	38
3.3.1 Score-Punkt von 1: Vorzeitiger atrialer oder ventrikulärer Schlag.....	39
3.3.2 Score-Punkt von 2: paarweise ventrikuläre Schläge oder selbstlimitierende atriale Tachykardie.....	40
3.3.3 Score-Punkt von 3: Bigeminus oder Trigemini oder selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie von ≥ 3 Schlägen.....	41
3.3.4 Score-Punkt von 4: Selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie von ≥ 10 Schlägen	42
3.3.5 Score-Punkt von 5: Kammerflimmern	43
3.4 Isoliertes EKG	43
4 Diskussion	44
4.1 Die Maus als Modell.....	44
4.2 Diskussion der Ergebnisse aus Serie 1	46
4.3 Diskussion der EPU-Parameter	46
4.3.1 Signifikante p-Werte der ANOVA	46
4.3.2 Mittelwertunterschiede	47
4.3.3 Arrhythmieneigung	48
4.4 Molekularbiologische Aspekte	48
4.5 Anatomische Effekte	49
5 Zusammenfassung.....	50
6 Literaturverzeichnis.....	51

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

In den Industrienationen, zu denen auch die Bundesrepublik Deutschland zählt, sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes konnten im Jahr 2010 etwa 41% aller Todesfälle darauf zurückgeführt werden (1). Dabei bilden die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz zusammen die drei häufigsten Todesursachen (siehe Abbildung 1).

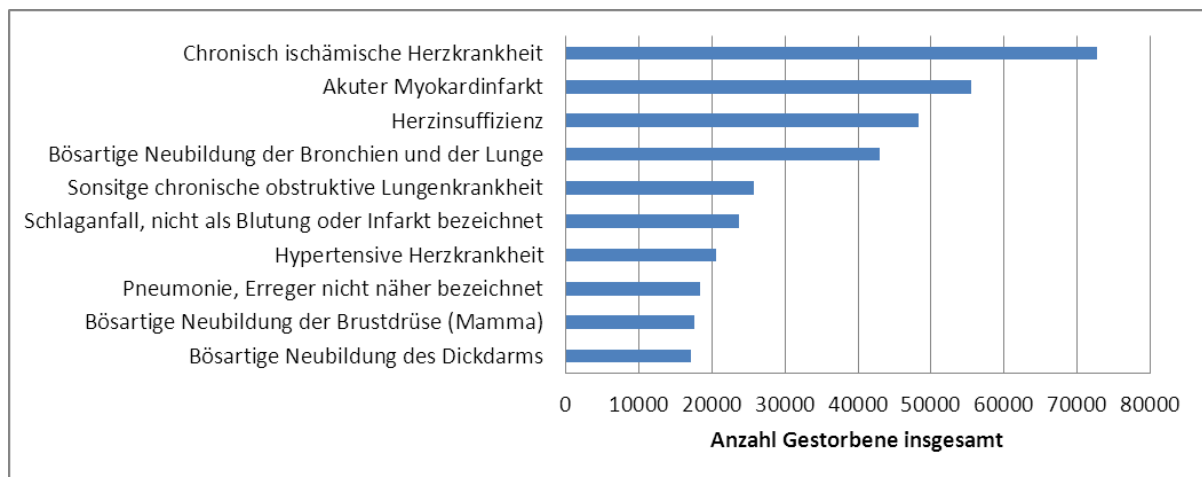


Abbildung 1: Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2010. Die Abbildung zeigt die Sterbefälle insgesamt im Jahr 2010 gegliedert nach den zehn häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) (2)

Der Tod tritt bei den genannten kardialen Erkrankungen zumeist durch ein rhythmogenes Ereignis plötzlich ein.

Die International Classification of Diseases (ICD-10) definiert den plötzlichen Herztod (*sudden cardiac death = SCD*) als natürlichen Tod aufgrund von Erkrankungen des Herzens, wenn der Tod eine Stunde nach Symptombeginn eintritt. Ursächlich für den SCD sind zumeist ventrikuläre Tachykardien (*VT*) oder Kammerflimmern (*VF*), die Asystolie oder nicht-rhythmogene Ursachen spielen eine untergeordnete Rolle (3, 4).

Sowohl die Inzidenz als auch die Ursachen des plötzlichen Herztodes sind altersabhängig (5). Während diesem im Erwachsenenalter zumeist die Koronare Herzerkrankung oder eine andere Form der Kardiomyopathie zugrunde liegt (6), sind in der Adoleszenz bzw. im jungen Erwachsenenalter zumeist angeborene genetische Veränderungen von kardialen Strukturproteinen oder Kanalproteinen ursächlich für das Erleiden eines plötzlichen Herztodes

(7, 8). Die Inzidenz des plötzlichen Herztodes steigt ab dem 30. Lebensjahr an und beträgt in der Altersgruppe der 35-75jährigen etwa 1-2 pro 1000 Einwohner/Jahr (9).

Der demographische Wandel lässt eine weitere Zunahme von kardiovaskulären Erkrankungen in den nächsten Jahren erwarten. Dies macht es notwendig, Menschen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil zu identifizieren, die pathophysiologischen Hintergründe zu erforschen und neue Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten zu finden um diesem Wandel des Krankheitsspektrums gerecht zu werden (10). Deswegen ist es essentiell, prophylaktische Behandlungen für den plötzlichen Herztod zu finden, insbesondere in der Therapie der Herzinsuffizienz, die nachweislich mit einem erhöhten Risiko für maligne Herzrhythmusstörungen einhergeht (11). Es ist ebenso wichtig, unter den Patienten mit bekannter struktureller Herzerkrankung oder Herzinsuffizienz diejenigen herauszufiltern, die tatsächlich ein erhöhtes Risiko für einen kardial bedingten Tod haben (12).

1.1 Elektrophysiologie des Herzens

Man unterscheidet im Herzen Zellen des Reizbildungs- und -leitungssystems vom sogenannten Arbeitsmyokard. Die Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards stellen den weitaus größten Anteil der Zellen im Herzen dar.

Die normale Herzerregung findet ihren Ursprung im Sinusknoten (Nodus sinuatrialis), der an der Innenseite der hinteren Wand des rechten Vorhofs lokalisiert ist, und wird von dort über die Zellen der Vorhofmuskulatur zum AV-Knoten (Nodus atrioventricularis), der sich auf der rechten Seite des Vorhofseptums an der Grenze von Vorhof und Kammer befindet, weitergeleitet. Von dort aus läuft die Erregung über das His-Bündel (Truncus fasciculi atrioventricularis) und die Tawara-Schenkel, bis sie schließlich über die Purkinje-Fasern auf die Ventrikelmuskulatur übertragen wird. Dort kommt es zu einer Depolarisation der Kardiomyozyten, konsekutiv zu einem Calciumeinstrom in die Zellen, welcher nachfolgend über das Ineinandergreifen von Aktin- und Myosinfilamenten zu einer Kontraktion des Herzmuskels führt (13).

Der Sinusknoten fungiert als Taktgeber des Herzens und ist das primäre Schrittmacherzentrum. Er besitzt eine komplexe Struktur mit verschiedenen Zelltypen (14, 15), die die Automatie des Herzschlags gewährleisten. Das Vorhandensein des Sinusknotens und die Kopplung der Zellen des Erregungsleitungssystems und des Arbeitsmyokards durch gap junctions führen zu erfolgreicher elektrophysiologischer Stimulation und Kontraktion des Herzens (16).

Die Schrittmacherzellen des Sinusknotens besitzen kein stabiles Ruhemembranpotential wie die Zellen des Arbeitsmyokards. Das maximal negative Potential von Schrittmacherzellen liegt bei -70 mV (Maximal diastolisches Potential = MDP), verglichen dazu liegt das Ruhemembranpotential des Arbeitsmyokards bei -90 mV. Nach jeder Repolarisation steigt das Membranpotential so lange an (Präpotential), bis der Schwellenwert erreicht ist und ein Aktionspotential ausgelöst wird. Ein unselektiver Kationeneinstrom I_f führt zur spontanen diastolischen Depolarisation, bei einem Schwellenpotential von ca. -40 mV werden ladungsabhängige Calciumkanäle aktiviert (siehe Abbildung 2), die Repolarisation erfolgt durch einen Kaliumauswärtsstrom.

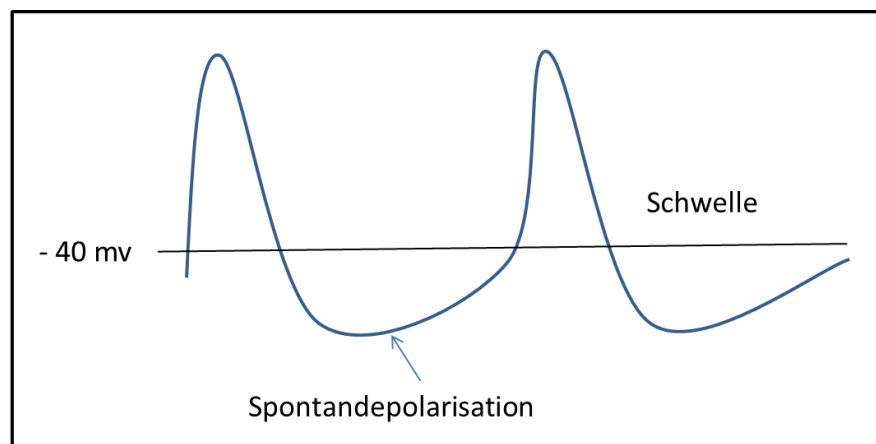


Abbildung 2: Spontandepolarisation des Sinusknotens, modifiziert nach Schmidt/Thews (13)

Im Gegensatz dazu sorgen im Arbeitsmyokard spannungsgesteuerte Natriumkanäle für einen Natriumeinstrom und damit für einen relativ raschen Aufstrich des Aktionspotentials. Es schließt sich eine kurze Repolarisationsphase an, die durch einen Kaliumausstrom und einen Chlorideinstrom vermittelt wird. Das Aktionspotential öffnet Dihydropyridin-assoziierte Calciumkanäle (L-Typ Calciumkanäle), die durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+} -Funke) ligandengesteuerte, sogenannte Ryanodin-sensitive Calciumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums öffnen, das als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert, wodurch es zur Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration kommt. Die Repolarisation wird dann vor allen Dingen durch Kaliumströme verursacht (siehe Abbildung 3).

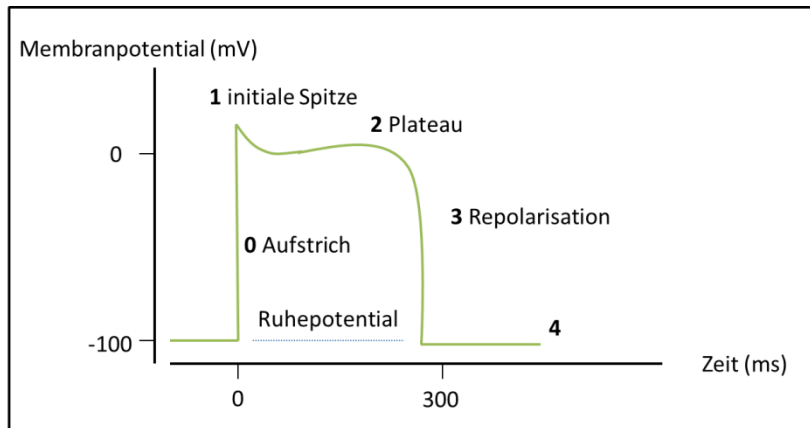


Abbildung 3: Aktionspotential des Kammermyokards, modifiziert nach Schmidt/Thews (13)

Die Bindung von Ca^{2+} an das Regulatorprotein Troponin C führt zur Kontraktion des Herzmuskels. In der Relaxationsphase wird Ca^{2+} über die SERCA (Sarko-Endoplasmatische-Retikulum-ATPase) wieder in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt. Das Absinken der zytosolischen Calciumkonzentration bewirkt die Abnahme der Bindung von Ca^{2+} an Troponin C, wodurch der kontraktile Apparat deaktiviert wird (13, 17).

Die verschiedenen Potentialdifferenzen während der De- und Repolarisationsvorgänge im Herzen können mit dem Elektrokardiogramm (EKG) aufgezeichnet werden. Dabei spiegelt die P-Welle die Erregung der Herzvorhöfe wieder, der QRS-Komplex die Erregung der Kammern. Die Erregungsrückbildung des Herzens wird in der T-Welle abgebildet (siehe Abbildung 4).

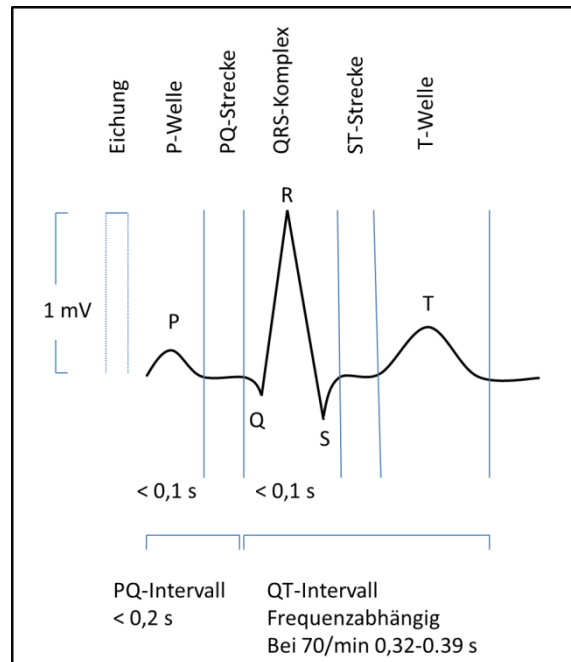


Abbildung 4: EKG mit Darstellung einer physiologischen Erregungsbildung und Rückbildung im Herzen, modifiziert nach Schmidt/Thews (13)

1.2 Herzrhythmusstörungen

Das klinische Wörterbuch Pschyrembel definiert Herzrhythmusstörungen als „alle Veränderungen der elektrischen Herztätigkeit, die durch eine unregelmäßige Abfolge der Erregungen (Arrhythmie), eine Abweichung von der normalen Herzfrequenz (ca. 60-80/min) oder eine Störung des zeitlichen Ablaufs der einzelnen Herzaktionen gekennzeichnet sind“ (18). Dabei kann man Herzrhythmusstörungen nach ihrer Frequenz, ihrem Entstehungsort und ihrem Entstehungsmechanismus einteilen. Eine mögliche klinische Einteilung ist die Unterscheidung in persistierend oder paroxysmal oder nach der hämodynamischer Wirksamkeit. Weiterhin kann zwischen angeborenen, also genetischen Ursachen von Herzrhythmusstörungen, sowie nach erworbenen Ursachen, z.B. nach einem Myokardinfarkt, unterschieden werden.

Die De- und Repolarisationsvorgänge im Herzen sind an verschiedenen Stellen störanfällig und können in unterschiedlichen Störungen des Herzrhythmus resultieren.

Zwei Beispiele sollen dies verdeutlichen.

1.2.1 Sick-Sinus-Syndrom (SSS)

Der Begriff des Sick-Sinus-Syndroms beschreibt eine Störung der Impulsgeneration und der Impulsweiterleitung vom Sinusknoten zum Vorhof (19).

Dem Sick-Sinus-Syndrom liegt nicht eine einzelne Ätiologie oder Pathogenese zugrunde. Die Fehlfunktion der kardialen Impulsgeneration kann durch eine Dysfunktion des Sinusknoten selbst oder durch extrinsische Ursachen zustande kommen (20). Intrinsische Ursache für eine Sinusknoten-Dysfunktion nach Wahls et al. (21) können zum Beispiel Infarzierungen des Sinusknoten-Areals, rheumatische Erkrankungen, Speicherkrankheiten wie die Amyloidose, Peri- oder Myokarditiden sein. Am häufigsten ist hierbei jedoch die idiopathische Degeneration des Leitungssystems (M. Lenègre, M. Lev). Extrinsische Ursachen beinhalten Elektrolytstörungen wie die Hyperkaliämie, Hypoxie, Pharmakotherapie (Betablocker, Digitalis) oder andere Toxine (21). Weitere Ursachen sind zum Beispiel angeborene Mutationen des Natrium- (SCN5A)- und funny-(HCN4)-Ionenkanals.

Das Sick-Sinus-Syndrom kann sich im Elektrokardiogramm als atriale Brady- oder Tachykardie, als Sinus-Arrest, als sinuatrialer Block, als alternierende Phasen von Brady- oder Tachykardien (Brady-Tachy-Syndrom) oder als mangelnden Herzfrequenzanstieg unter Belastung (chronotrope Inkompetenz) manifestieren (22).

Die Inzidenz des Sick-Sinus-Syndroms ist am häufigsten bei älteren Menschen, kann aber prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten (21). Das mittlere Alter bei dieser Erkrankung beträgt 68 Jahre und Männer und Frauen sind ungefähr gleich häufig betroffen (23).

Häufige Symptome sind Schwindel und/oder (Prä-/)Synkopen. Zur Diagnoseführung führt oft ein über 24-72h aufgezeichnetes Langzeit-EKG, in dem sich verschiedene Manifestationen des Sick-Sinus-Syndroms dokumentieren lassen können. Symptomatische Herzrhythmusstörungen im Rahmen eines Sick Sinus Syndroms sind eine Indikation für eine Herzschrittmacher-Therapie (24).

1.2.2 Kongenitales Long QT-Syndrom

Das kongenitale Long QT-Syndrom ist eine genetische Erkrankung, die durch die Verlängerung der QT-Zeit im Oberflächen-EKG gekennzeichnet ist und die mit einem erhöhten Risiko für den plötzlichen Herztod aufgrund von ventrikulären Tachyarrhythmien einhergeht. Bis heute sind 13 verschiedene Gene identifiziert, deren Mutation zu einer Verlängerung der QT-Zeit führt (25, 26). Das kongenitale Long QT-Syndrom ist eine monogenetische Erkrankung mit vorzugsweiser autosomal-dominanter Vererbung und variabler Penetranz (27). In 95% der Fälle sind die Mutationen LQT1, LQT2 und LQT3 verantwortlich für Veränderungen an Kanalproteinen, welche konsekutiv zu einer Störung der Repolarisation führen. Am häufigsten ist hierbei die Form des LQT1, welche durch eine Loss-of-Function-Mutation des KCNQ1-Gens verursacht wird. Dieses codiert für die alpha-

Untereinheit des langsamen aktivierenden Kaliumkanals und ist damit für den I_K -Strom verantwortlich. Verminderte Kaliumströme resultieren in einer Verzögerung der Repolarisation und Verlängerung der vulnerablen Phase, sodass früh einfallende Nachdepolarisationen zu einer Triggerung von Arrhythmien, insbesondere für Torsade de Pointes, führen können. Elektrokardiographisch findet sich eine prolongierte QT-Zeit sowie häufig eine abgeflachte oder negative T-Welle (siehe Abbildung 5).

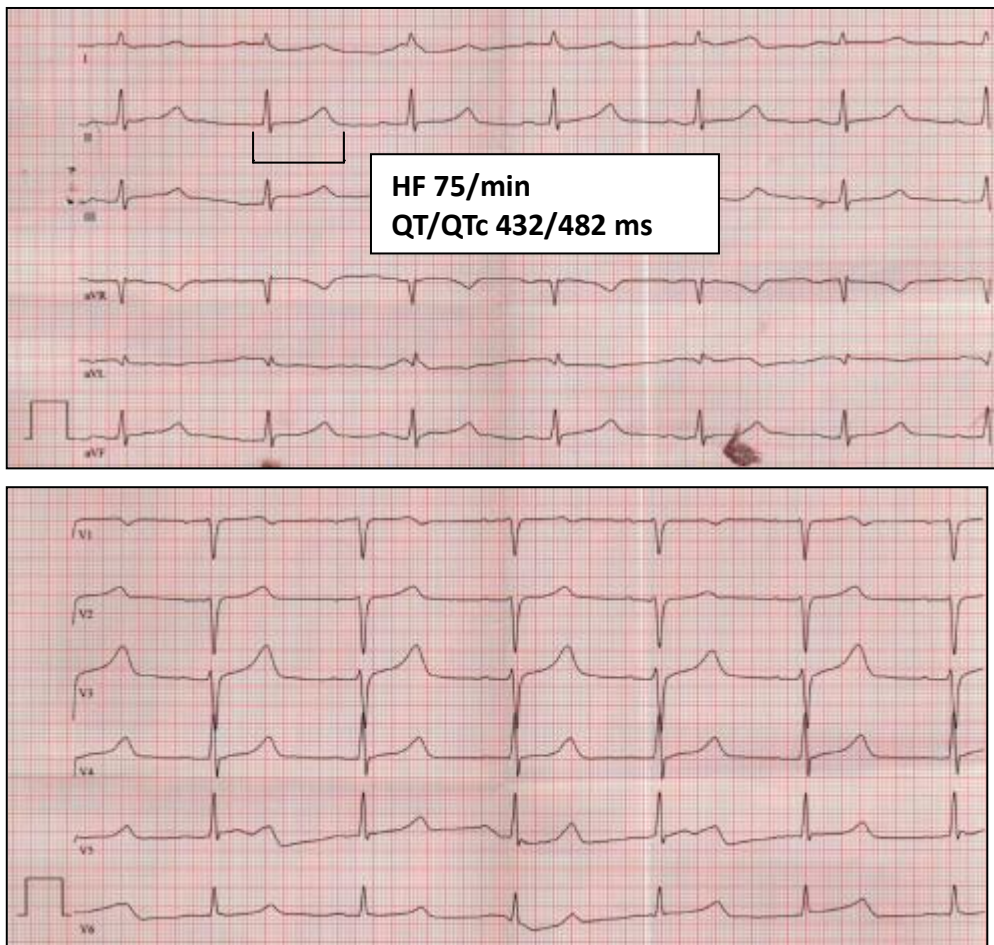


Abbildung 5: EKG-Beispiel eines Long QT-Syndroms. Dargestellt ist die Abmessung vom Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle (432 ms). Nach Frequenzkorrektur bei der vorliegenden Herzfrequenz von 75/min ergibt sich eine QTc von 482 ms.

Somit ist das Long QT-Syndrom ein Beispiel für eine Störanfälligkeit der elektrischen Herzerregung in der Erregungsrückbildungsphase.

1.3 Die Popdc-Genfamilie

1.3.1 Vorkommen und Struktur

Die Popeye domain containing gene Familie codiert für Transmembranproteine, die vorzugsweise in quer-gestreifter Muskulatur von Vertebraten vorhanden sind (28, 29). Das erste Gen dieser Familie konnte 1999 identifiziert werden und erhielt den Namen *Bves* (blood vessel/epicardial substance). Synonyme sind das Popeye1 oder das Popdc1 (Popeye-domain-containing). Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich Popdc1-positive Zellen im Epikard und in den sich in der Entwicklung befindenden Koronararterien fanden (30). Popdc1 ist weiterhin im Proepikard, Epikard und in der glatten Muskulatur der Koronararterien lokalisiert (31). Wahrscheinlich besitzt Popdc1 eine Funktion als Zell-Adhäsions-Molekül (31). Bis jetzt fand sich ein Popdc-interagierendes Protein, das ZO1 (Zonula occludens 1), durch welches Bves/Popdc1 die Integrität von tight junctions modulieren könnte (32).

Weitere Vertreter dieser Gen-Familie sind das Popdc2 und das Popdc3. Die Expression dieser Proteine beginnt bereits während der Embryonalentwicklung (28, 29).

Popdc-Proteine finden sich in quergestreifter und glatter Muskulatur im Zebrafisch (33), Frosch, Hühnchen (34), Mäuse-Embryonen, was den Schluss nahelegte, dass während der Evolution eine Konservierung dieser Genfamilie stattfand (35-37).

Außerhalb der quer-gestreiften Muskulatur finden sich diese Proteine in anderen Organen wie dem Gehirn, den Nieren, dem Magen, der Milz und dem Uterus schwangerer Mäuse (35).

Popdc-Proteine sind an der Plasmamembran lokalisiert (38) und besitzen drei Transmembrandomänen mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einer konservierten cytoplasmatischen Popeye-Domäne (30, 35, 39). Es sind mehrere Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen. Die entstandenen Proteine bestehen aus 300 bis 360 Aminosäuren (30, 35).

Popdc1-defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Skelett-Regeneration nach Injektion von Cardiotoxin (36). Nach induzierter Ischämie und nachfolgender Reperfusion erfolgt die Erholung des Myokards langsamer als in der Kontrollgruppe (40).

In unserer Arbeit wurde der Fokus auf das Popdc2 gelegt, da es neben der Expression im Skelettmuskel und in der glatten Muskulatur von Blase, Kolon und Rektum sowie den Nabelgefäßen eine starke Expression im Herzen und hier insbesondere in Strukturen des Reizbildungs- und -leitungssystems aufweist (28).

1.3.2 Expressionsmuster von Podc2 während der Embryonalentwicklung und im Erwachsenenalter von Mäusen

Um die Expression von Popdc2 in Mäusen während der Embryonalentwicklung und postnatal sichtbar zu machen, wurde in der Arbeit von Froese et al. das NLS-LacZ-Reporter Gen in das erste codierende Exon des Popdc2 mithilfe homologer Rekombination eingeschleust. Mit Hilfe eines gegen das LacZ gerichteten markierten Antikörpers, wurde die Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien dargestellt (41). Es wurden homo- und heterozygote Tiere verwendet, und es zeigte sich kein Unterschied im Expressionsmuster.

Eine schwache Popdc2/LacZ-Expression konnte zuerst am Tag 6,0 der Embryonalentwicklung im extraembryonischen Mesoderm beobachtet werden. Am Tag 7,0 verstärkte sich diese Expression und zusätzlich fand sich eine Anfärbung im Hensen'schen Knoten, der Chorda-Gewebe enthält. Am Tag 7,5 war eine starke Expression in der Herzsichel und im amniotischen Mesoderm nachweisbar. Auch am Tag 8,5 blieb die Popdc2-Expression begrenzt auf das kardiales Mesoderm, den Herzschlauch, das Perikard und das Amnion. Im Herzschlauch selber zeigte sich die Expression im Endokard, Myokard und dorsalem Mesokard.

Am Tag 12,5 konnte dann eine Anfärbung in der Skelettmuskulatur der Extremitäten beobachtet werden. Im Herzen zeigte sich weiterhin eine Expression im Myo- und Perikard, nicht aber im Epi- und Endokard. Im sagittalen Schnitt fand sich eine starke Expression im Herzen, im Skelettmuskel und in der glatten Muskulatur von Darm und Blase (siehe Abbildungen 6-7). Am Tag 17,5 fand sich zusätzlich eine Expression in den Pulmonalvenen.

Die postnatale Expression wurde an Mäuseembryonen im Alter von 6-7 Tagen und an Mäusen im Alter von drei Monaten untersucht. Hier fand sich ebenfalls eine starke Anfärbung des Myokards (siehe Abbildung 8). Es bestand kein offensichtlicher Unterschied in der Expression des Popdc2-Gens zwischen Vorhöfen und Kammer mit Ausnahme des Reizleitungssystems, in dem eine höhere Expression als im Arbeitsmyokard nachgewiesen werden konnte. Im Endokard, dem Klappengewebe, den Koronararterien und dem Epikard wurde das Gen nicht exprimiert.

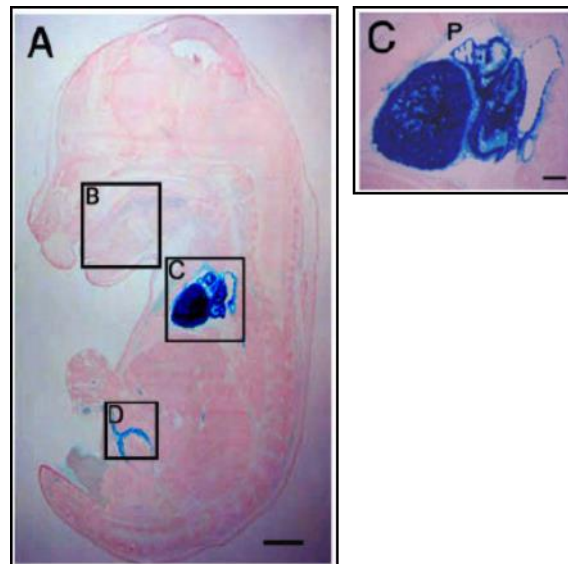


Abbildung 6: Expression des Podpc2-Gens am Entwicklungstag 12,5 in Zunge (B), Herz (C) und Blase (D), modifiziert nach Froese et al. (41)

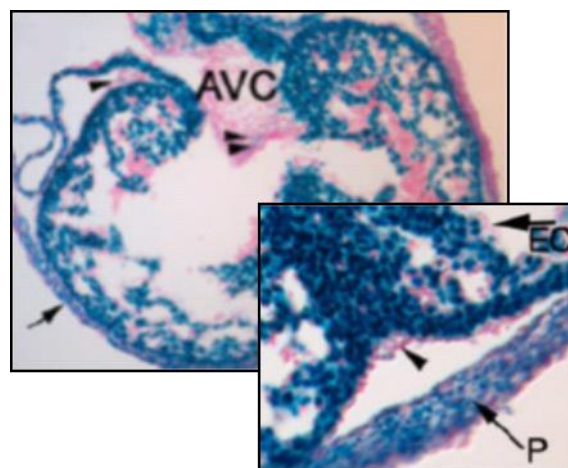


Abbildung 7: Schnitt durch einen 12,5 Tage alten Mäuseembryo: prominente Expression im Myokard, im AV-Areal (AVC) und Perikard (P); der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Abwesenheit von Popdc2 im Endokard (EC) und Epikard (Pfeil), modifiziert nach Froese et al. (41)

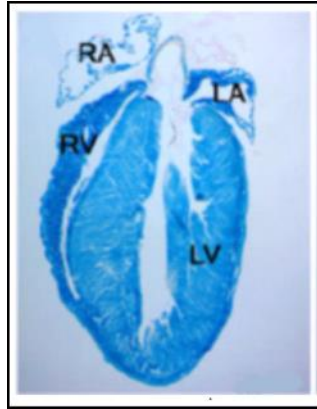


Abbildung 8: Schnitt durch das Herz einer sieben Tage alten Maus: Popdc2-Expression im Myokard, modifiziert nach Froese et al. (41); RA = rechtes Atrium, RV = rechter Ventrikel, LA = linkes Atrium, LV = linker Ventrikel

1.3.3 EKG-Auswertungen und strukturelle Untersuchungen des Sinusknotens von Popdc2-Mäusen

Von den drei bisher bekannten Popdc-Genen zeigt das Popdc2 die höchste und selektivste Expression im Myokard. Die Popdc2-Knockout Mäuse sind lebensfähig und zeigten außer einem im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziertem Körpergewicht keine phänotypischen Auffälligkeiten. Das Herz bei Popdc2-Nullmutanten scheint weder morphologisch noch funktionell verändert zu sein, auch wird beim Fehlen von Popdc2 die Expression von Popd1 und Popd3 nicht hochreguliert (42).

Telemetrische EKG-Aufzeichnungen von Wildtyp und Popdc2-Knockout Mäusen erbrachten keinen signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Herzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität. Die älteren Popdc2-Knockout Mäuse wiesen eine Dysfunktion des Sinusknotens auf, wobei es zu schweren Bradykardien und längeren Pausen mit allerdings einsetzendem sowohl schmal- als auch breitkomplexigen Ersatzrhythmus kam. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass 5,5 bzw. 8 Monate alte Tiere eine chronotrope Inkompetenz, das heißt einen mangelnden Herzfrequenzanstieg unter Belastung, bei physischem und psychischem Stress zeigten. Gleiches konnte für die Popdc1-Nullmutanten nachgewiesen werden. (42)

Weiterhin waren von Froese et al. strukturelle Untersuchungen des Sinusknotens bei Popdc2-defizienten Mäusen durchgeführt worden (42), welche bei den 8-Monate alten Knockout Mäusen einen Verlust der Schrittmacherzellen im unteren Teil des Sinusknotens sowie eine generelle Verdichtung des Gewebes im oberen Abschnitt des Sinusknotens erbrachten. Es

wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese strukturellen Veränderungen für die Sinusknotendysfunktion verantwortlich sein könnten.

Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die drei Popdc-Gene 1, 2 und 3 cAMP binden können und somit an intrazellulären Signalwegen beteiligt sind. Außerdem wird die Expression des zweiporigen Kaliumkanals TREK-1 durch die Coexpression mit Popdc1, 2 oder 3 verstärkt. Ferner wird der Ausstrom von Kalium aus der Zelle erhöht (Hyperpolarisation) und dadurch die elektrische Aktivität vermindert. (42)

Boukens et al. gelangten zu der Schlussfolgerung, dass die Ursache für die Dysfunktion des Sinusknotens nicht ein Problem der Weiterleitung des elektrischen Impulses ist (Exit Block), sondern vielmehr eine Störung der Impulsgeneration von vorneherein. (43)

Die Expression des Popdc-Gens verändert sich bei terminaler Herzinsuffizienz bei Menschen. Bisher konnte für das Popdc1-Gen eine reduzierte Expression von mRNA und Protein im linken Ventrikel gezeigt werden. (40)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Proteine der Popdc-Genfamilie finden sich vorzugsweise im Myokard, aber auch in der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur verschiedenster Organe. Die verstärkte Expression des Popdc2-Gens im Reizleitungs- und -bildungsystems des Herzen lässt einen Einfluss von Popdc auf die kardiale Impulsbildung und -weiterleitung vermuten. Bei Popdc1- und -2-defizienten Mäusen wurde aufgrund von nachgewiesenen Bradykardien, einer chronotropen Inkompetenz und eines intermittierenden Sinusarrests der Verdacht auf eine Sinusknotendysfunktion geäußert.

Für diese Arbeit wurden männliche und weibliche Mäuse des Stammes Popdc2/B16 sowie eine entsprechende Kontrollgruppe bezüglich eventueller Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen sowie ihrer Neigung für tachykarde Herzrhythmusstörungen untersucht. Es wurden nicht-invasive EKG-Aufzeichnungen in Ruhe und unter Katecholamin-Stimulation sowie invasive elektrophysiologische Untersuchungen mit programmierten Stimulationen durchgeführt. Weiterhin wurde der Herzrhythmus am isolierten Herzen, somit unter Ausschaltung des autonomen Nervensystems, aufgezeichnet.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Expression vom Popdc2 auf die Vulnerabilität von Herzrhythmusstörungen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden Popdc2-Knockout(KO)-Mäuse verwendet, die von Brand et al. generiert wurden. Das erste Exon des Popdc2-Gens wurde durch das LacZ in TBV2 ES Zellen ersetzt. Die chimären männlichen Mäuse wurden mit C57BL/6 weiblichen Mäusen gekreuzt. Die F1-Generation wurde wiederum mit CD1-Mäusen gekreuzt und dann dreimalig untereinander gekreuzt. Anschließend wurden sie mit ZP3-Cre Mäusen gekreuzt, um die Neomycin-Sequenz zu entfernen (41, 44).

Popdc2-KO-Mäuse durchlaufen eine normale embryonale Entwicklung, sind fertil und zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Lebensdauer ist nicht verkürzt (45). Allerdings zeigten die erwachsenen Tiere eine verzögerte Regeneration der Skelettmuskulatur nach Injektion von Kardiotoxin (29). Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Popdc2-KO-Mäuse vier bis achtzehn Monate alt und wogen 17 bis 28g. Die Wildtyp-Mäuse in der Kontrollgruppe waren ebenfalls fünf bis achtzehn Monate alt und wogen im Durchschnitt das Doppelte der KO-Mäuse, etwa 25 bis 59g. Dieses entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen aus der German Mouse Clinic (44). Männliche und weibliche Mäuse des Stammes Pop2/B16 wurden in Käfigen mit bis zu 10 Tieren bei einer Raumtemperatur von 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten. Mit Kunstlicht wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Wasser und Futter waren den Tieren frei zugänglich. Bei allen Untersuchungen wurden die Vorgaben des Tierschutzgesetzes (TierSchG) der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils gültigen Fassung eingehalten. Die Genehmigung der Regierung von Unterfranken für die Experimente lag vor.

2.2 Oberflächen-EKG in Ruhe und unter pharmakologischem Stress

Es wurden insgesamt fünf Messreihen mit männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen sowie Tieren des Stammes pop2/B16 unterschiedlichen Alters durchgeführt. Die Messreihen bestanden jeweils aus der Durchführung eines Ruhe- und Stress-EKGs mit Isoproterenol unter Avertinnarkose sowie einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) in Inhalationsnarkose mit Isoflouran. Die Messreihen wurden in den Jahren 2007 und 2008 durchgeführt.

Das Oberflächen-EKG mit Ruhe- und Stress-Komponente wurde insgesamt bei 95 Tieren, davon 43 Wildtyp-Mäusen und 52 Mäusen des Stammes Popdc2/B16 durchgeführt.

Für die erste Serie, bestehend aus jeweils neun männlichen Knockout-Mäusen und neun Wildtyp-Mäusen, wurden im Oberflächen-EKG unter Ruhe und unter Stress-Bedingungen

folgende EKG-Parameter erhoben und mittels Student-T-Test miteinander verglichen: Alle 15 Sekunden wurde für die Parameter Herzfrequenz, Dauer der P-Welle, PR-Abstand, RR-Abstand, QRS-Dauer, QT-Dauer und Frequenz-korrigierte QT-Zeit (QTc) ein Mittelwert errechnet. Die Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs erfolgte über sechs Minuten. Es wurden acht Mittelwerte unter Ruhe-Bedingungen miteinander verglichen und acht Mittelwerte nach Isoproterenol-Gabe. Die Gabe von Isoproterenol erfolgte nach zwei Minuten Aufzeichnung, die Auswertung allerdings erst nach insgesamt vier Minuten Aufzeichnung, um die Einwaschzeit des Isoproterenols zu berücksichtigen.

Eine elektrophysiologische Untersuchung wurde bei insgesamt 48 Tieren durchgeführt. Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Verteilung der Mäuse getrennt nach Alter, Genotyp und Geschlecht (siehe Tabellen 1-2).

Mauslinien	Geschlecht		EKG		EPU
	Männlich	Weiblich	Ruhe-EKG	Stress-EKG	
Pop2/Bl6	8	7	15	15	15
Wildtyp	9	9	18	18	18
Gesamt	17	16	33	33	33

Tabelle 1: Einteilung der Mäuse über neun Monate nach ihrer Genmutation Pop2/Bl6 und in die Kontrollgruppe Wildtyp ohne Mutation.

Mauslinien	Geschlecht		EKG		EPU
	Männlich	Weiblich	Ruhe-EKG	Stress-EKG	
Pop2/Bl6	10	5	15	15	15
Wildtyp	8	2	10	10	10
Gesamt	18	7	25	25	25

Tabelle 2: Einteilung der Mäuse unter neun Monate nach ihrer Genmutation Pop2/Bl6 und in die Kontrollgruppe Wildtyp ohne Mutation.

2.2.1 Ruhe-EKG

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Applikation von 100 µg 2,5% Avertin pro 10g Körpergewicht narkotisiert (Herstellung von Avertin – siehe unten). Anschließend wurden sie mit Klebestreifen auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert, um eine Körpertemperatur von 37°C aufrechtzuerhalten und Hypothermie zu vermeiden (siehe Abbildungen 9-10). Die Körpertemperatur der Tiere wurde kontinuierlich mit einer

Rektalsonde gemessen (Wärmeplatte mit Rektalsensor TKM 0902, Föhr). Über vier 24gauge-Nadeln, eine in jeder Extremität, erfolgte die Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs nach den Ableitungen I und II nach Einthoven (PowerLab/ 4 SP, ADInstruments, Chart 5.5.4). Der Papiervorschub betrug 100 mm/s. So konnte der Herzrhythmus kontinuierlich überwacht und aufgezeichnet werden, die Dauer der P-Welle und des QRS-Komplexes gemessen und die entsprechenden Intervalle (PQ, QRS, QT, QTc, RR) errechnet werden (siehe Abbildung 11). Die Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs unter Ruhebedingungen erfolgte für jedes Tier zwei Minuten.

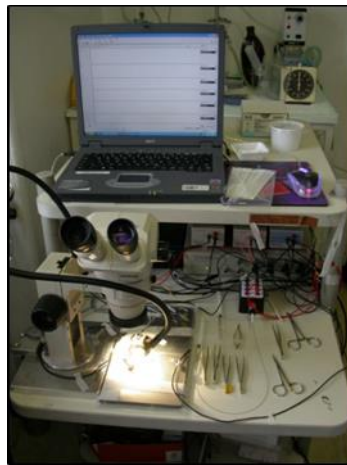


Abbildung 9: Arbeitsplatz mit Wärmeplatte, Operationsmikroskop, EKG-Aufzeichnung

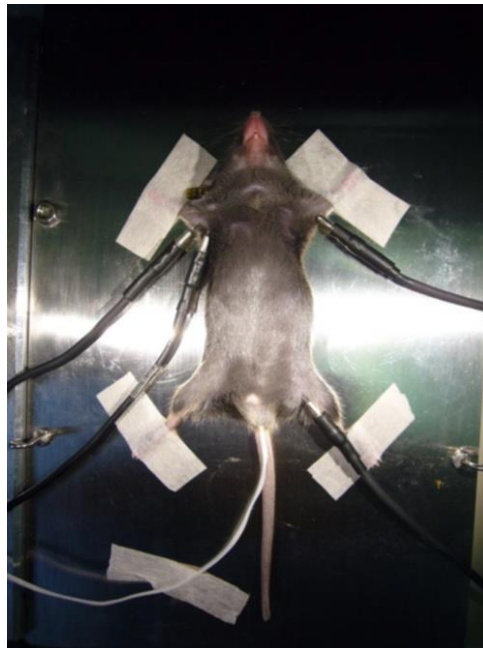


Abbildung 10: Ableitung eines Ruhe-EKGs bei einer Maus

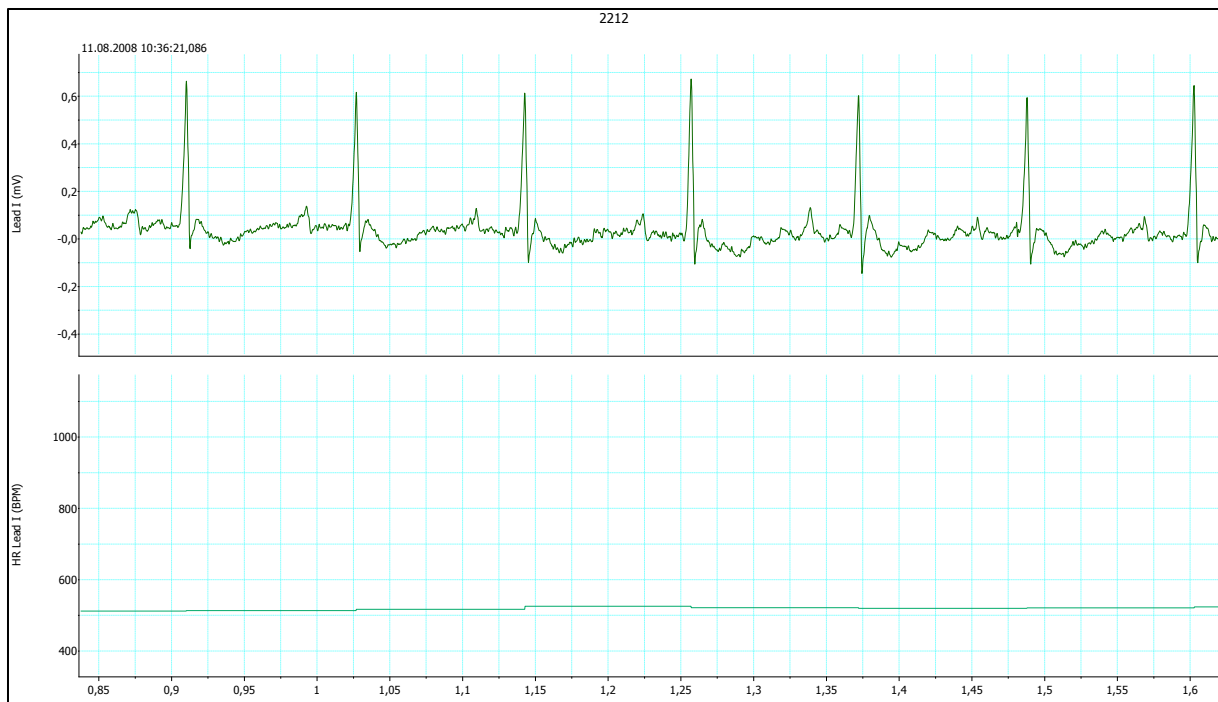


Abbildung 11: Ruhe-EKG, in der oberen Zeile die Ableitung des EKGs, in der unteren Zeile die Aufzeichnung der Herzfrequenz, hier ca. 500 bpm

Zur Narkose während der Aufzeichnung der Oberflächen-EKGs wurde das Anästhetikum Avertin verwendet, weil es eine relativ kurze Wirkdauer und nur geringe hämodynamische Auswirkungen hat (46). Zur Herstellung von 2,5%igem Avertin wurde eine 97%ige 2,2,2-Tribromethanol-Lösung (TBE) mit 98%igen Isoamylalkohol im Verhältnis 1g:1ml mit Hilfe eines Vortex-Geräts gemischt. Danach erfolgte die Verdünnung mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:40. Die Stammlösung wurde bei +4°C und lichtgeschützt gelagert.

2.2.2 Stress-EKG

Nach der Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs unter Ruhebedingungen wurde jedem Tier 2mg/ kg KG Isoproterenol (Isoproterenol 16504, SIGMA) als hauptsächlicher β_1 -Agonist intraperitoneal appliziert, um Katecholamin-sensitive Tachykardien zu provozieren (47, 48). Nach der Applikation wurde das EKG für fünf Minuten aufgezeichnet, sodass die Reaktion auf Katecholamin-Stimulation im Verlauf beobachtet werden konnte.

Die Tiere wurden nach Aufzeichnung der Oberflächen-EKGs zurück in ihre Käfige gesetzt.

2.3 Elektrophysiologische Untersuchung

Die invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) diente dazu, grundlegende Parameter wie die Sinusknotenerholungszeit (*sinus node recovery time, SNRT*) oder

Überleitungseigenschaften des AV-Knotens zu erheben, und gleichzeitig eine programmierte elektrische Stimulation von Atrium und Ventrikel zur Induktion von Herzrhythmusstörungen (HRST) durchzuführen.

Für die elektrophysiologische Untersuchung wurden die Tiere mit einem 6%-Isofluran-Sauerstoffgemisch betäubt. Wiederum wurden die Mäuse auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert, um während der Untersuchungszeit Auskühlung zu vermeiden und eine Körpertemperatur von 37°C beizubehalten. Im zweiten Schritt wurde die Zunge zur besseren Sicht mit einer Klemme zur Seite geschoben, die Maus mit einer Venenverweilkanüle (Vasofix® Safety 22G) intubiert und an ein Beatmungsgerät (UGO Basite 7025, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Der Tubus wurde mit einem Klebestreifen fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit bis 1,5% Isofluran (Isoflurane Vapor 2000, Dräger) bei einem Atemvolumen von 1ml und einer Atemfrequenz von 120 pro Minute. Es wurden die Elektroden für die Ableitung des Oberflächen-EKGs wie oben beschrieben platziert. Vor der eigentlichen Präparation wurde der Halsbereich der Tiere rasiert und mit einem Hautantiseptikum desinfiziert. Unter dem Operationsmikroskop (Auflichtmikroskop SZ 40, Olympus) wurde zuerst ein 10 bis 15mm Schnitt in Höhe des Larynx gesetzt und anschließend die rechte Vena jugularis externa in stumpfer Präparation freigelegt (siehe Abbildung 12). Nach einer proximalen Ligatur erfolgte die Venotomie mit einer Mikroschere.



Abbildung 12: Präparation der Vena jugularis externa, transvenöse Platzierung des EPU-Katheters

Vorsichtig wurde dann ein 1.7F octopolarer Pace-/Sense-Katheter (Octopolar Catheter FT1131, SciSense, siehe Abbildung 13) in das rechte Atrium vorgeschoben. Der Abstand

zwischen den Elektroden beträgt genau 0,5mm, wodurch über die proximale Elektrode im rechten Atrium der Rhythmus aufgezeichnet und gleichzeitig stimuliert werden konnte, währenddessen die distale Elektrode im rechten Ventrikel lag.

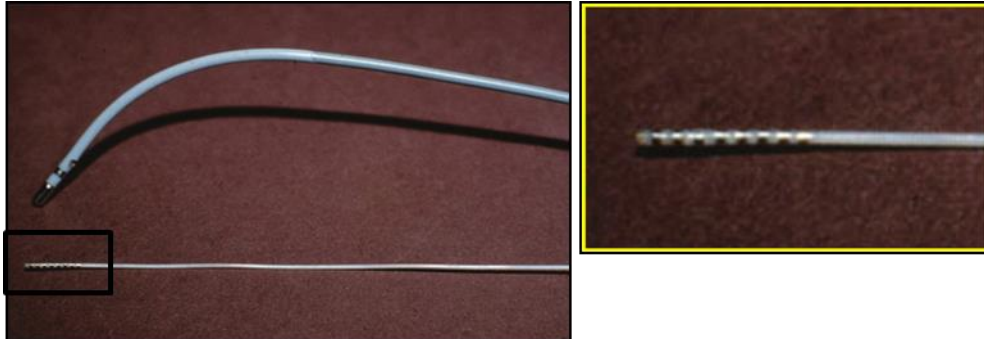


Abbildung 13: EPU-Katheter, octopolar; links: EPU-Katheter verwendet in der Humanmedizin; unten: für unsere Experimente verwendeter Katheter im Größenvergleich, modifiziert nach Berul (49); rechts: Vergrößerung des für unsere Experimente verwendeten Katheters

Einmal intrakardial platziert war es möglich, gleichzeitig den Herzrhythmus aufzuzeichnen und das Herz elektrisch zu stimulieren. Die Stimulation erfolgte mit 1ms-Pulsen (STG1001, Multi Channel Systems, MC Stimulus 2.1.2). Während der gesamten Untersuchung wurden Herzfrequenz und -rhythmus kontinuierlich überwacht.

2.3.1 Vorhof-Stimulation

Wichtige Parameter zur Messung der elektrischen Erregung im Herzvorhof sind die Sinusknotenerholungszeit, die effektiven Refraktärperioden von Vorhof und AV-Knoten sowie der antegrade Wenckebachpunkt.

Zur Bestimmung der SNRT erfolgte eine Stimulation des Vorhofs mit einer Frequenz oberhalb der Eigenfrequenz des Sinusknotens für 30s (siehe Abbildung 14). Die SNRT definiert sich als das Zeitintervall bis zum ersten Wiederauftreten einer Sinusknotenaktion nach Beendigung der Stimulation. Die korrigierte Sinusknotenerholungszeit errechnet sich hierbei als die SNRT minus der spontanen Zykluslänge (47, 50). Zur Testung der effektiven Refraktärperiode von Vorhof und AV-Knoten erfolgten zehn Schrittmacherimpulse mit einer konstanten Zykluslänge (S1-S1-Intervall) gefolgt von einem vorzeitig einfallenden Stimulus S2. Das S1-S2-Intervall wurde schrittweise verkleinert bis der S2-Impuls nicht mehr beantwortet wurde, also dementsprechend keine Depolarisation mehr stattfand. Die effektive Refraktärperiode definiert sich hierbei als das gerade noch beantwortete S1-S2-Intervall (47).

Zur Bestimmung des antegraden Wenckebachpunkts erfolgte eine Stimulation des Vorhofs mit zunehmend höherer Frequenz bis zum Auftreten einer Wenckebach-Periodik der AV-Knoten-Überleitung. Dies bedeutet eine zunehmende Verlängerung der AV-Knoten-Überleitung bis zum kompletten Ausfall einer Überleitung zum Ventrikel.



Abbildung 14: Vorhofstimulation: Stimulation des Vorhofs mit einer Zykluslänge von 100 ms Pulsen und intrinsischer AV-Überleitung; 1. Spalte: intrakardiales EKG1 (rot), 2. Spalte: intrakardiales EKG2 (blau), 3. Spalte: Synchronisation/Stimulation (rosa), 4. Spalte: Herzfrequenz/min (HF/bpm = beats per minute) (grün)

2.3.2 Kammer-Stimulation

Nach Beendigung der Stimulation im Vorhof wurde der EPU-Katheter vorsichtig in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Im Ventrikel platziert erfolgte die Stimulation mit 100, 85 und 75 ms Zykluslänge, um Herzfrequenzen von 600, 700 und 800/min zu erreichen. Analog zur Vorhof-Stimulation erfolgte auch in der Kammer die Stimulation mit Stimuli konstanter Zykluslänge (S1-S1-Intervall) und einem vorzeitig einfallenden Stimulus S2 (siehe Abbildungen 16-17). Mit der Stimulation der Herzfrequenz über die Eigenfrequenz des Sinusknotens sollten Arrhythmien provoziert werden. Ferner wurde eine Burst-Stimulation mit fünfzehn aufeinanderfolgenden schnellen Pulsen durchgeführt, um eine erhöhte Bereitschaft zu Arrhythmien zu erkennen (siehe Abbildung 15).

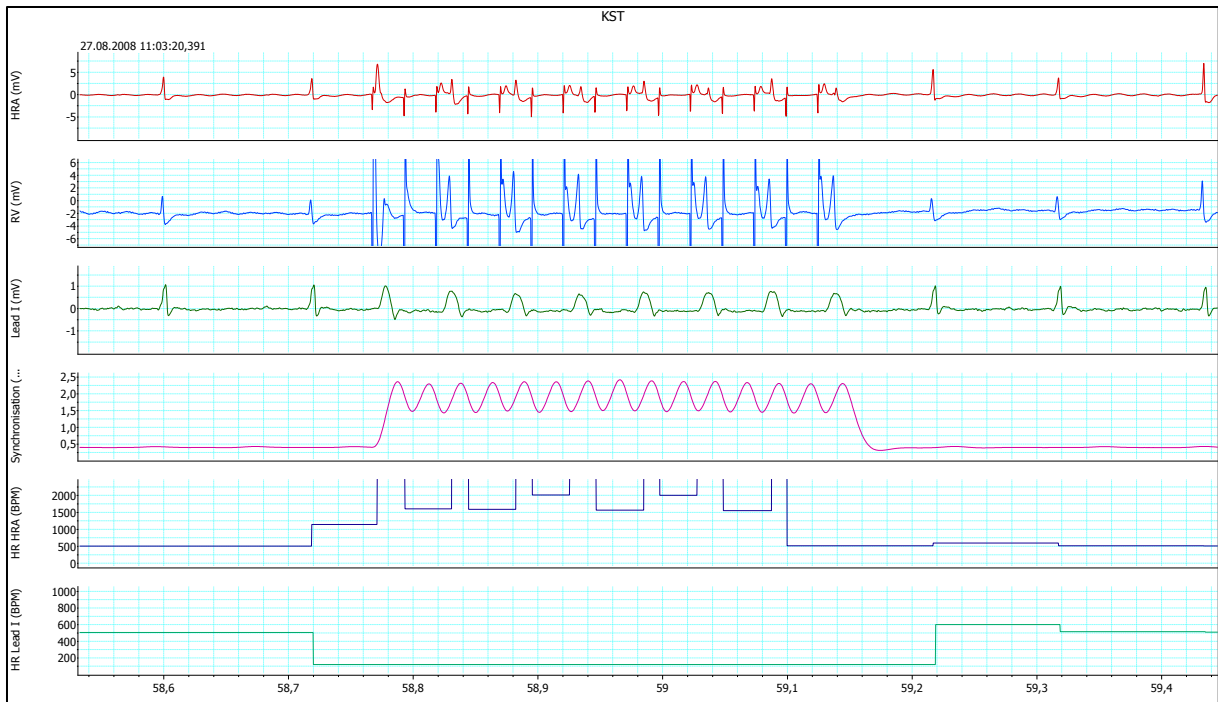


Abbildung 15: Kammerschnelltest: Stimulation des Ventrikels mit 15 schnell aufeinander folgenden Schlägen; 1. Spalte: intrakardiales EKG1 (rot), 2. Spalte: intrakardiales EKG2 (blau), 3. Spalte: Oberflächen-EKG mit 1. Ableitung (grün), 4. Spalte: Synchronisation/Stimulation (rosa), 5. und 6.. Spalte: Herzfrequenz/min (HF/bpm = beats per minute) (blau und grün)



Abbildung 16: Kammerstimulation: Die S2-Stimulation wird noch beantwortet

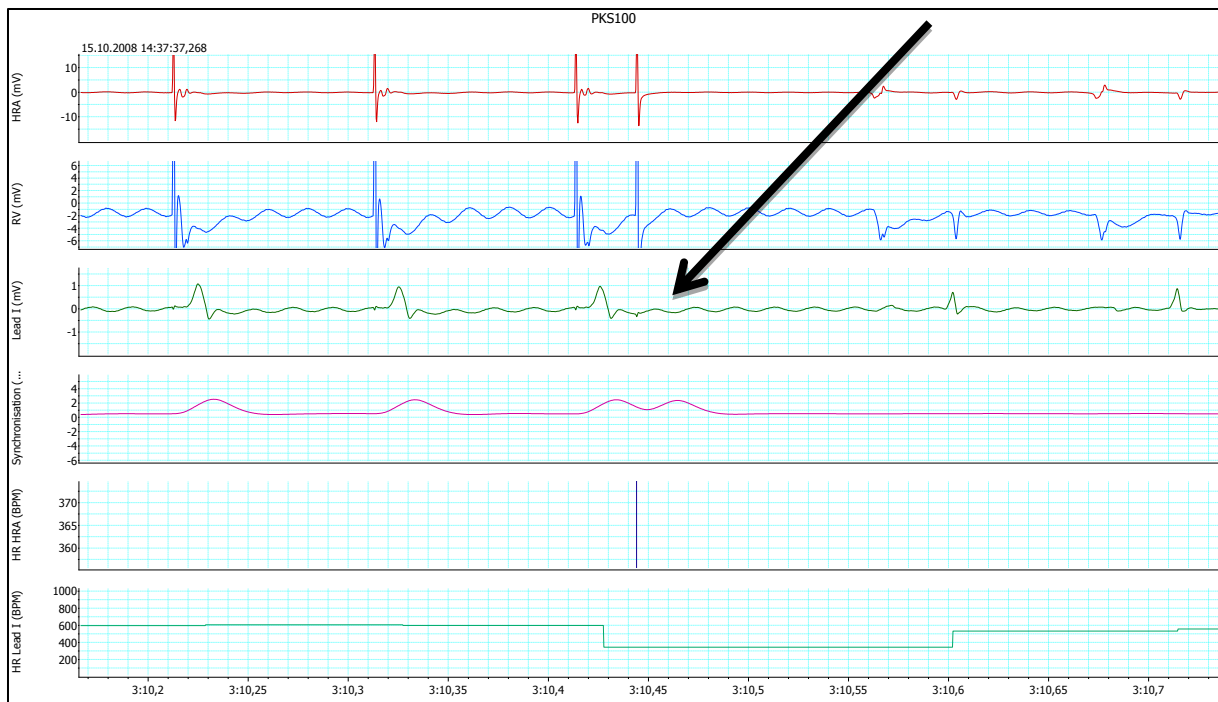


Abbildung 17: Kammerstimulation: Das S2-Intervall wird nicht mehr beantwortet (siehe v.a. grüne Ableitung)

2.4 Langendorff-Herz

Nach den Aufzeichnungen der Ruhe-EKGs und den invasiven elektrophysiologischen Untersuchungen, wurden den anästhesierten Mäusen die Herzen entnommen und EKG-Aufzeichnungen am isolierten Herzen nach einem modifizierten Modell, dessen Ursprung auf dem Prinzip von Oskar Langendorff und Kollegen (1895) beruht, durchgeführt (51). So war es möglich, den Einfluss des autonomen Nervensystems auf die kardiale Funktion auszuschalten. Grundprinzip des Langendorff-Herzens ist dabei die retrograde Perfusion des Herzens über die Aorta mit einer oxygenierten Pufferlösung.

Die Maus wurde mit einer intraperitonealen Injektion von Avertin in Narkose versetzt und auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen an den Pfoten auf der Arbeitsplatte fixiert. Zuerst erfolgte die Eröffnung des Abdomens über einen Unterbauch Medianschnitt. Danach wurde das Zwerchfell vorsichtig von links und rechts lateral inzidiert und von der unteren Thoraxapertur abgelöst. Nachfolgend wurden von kaudal die Rippen links- und rechts-thorakal durchtrennt und mit dem Sternum nach kranial geklappt. Dies ermöglichte den Blick auf das vordere Mediastinum und das noch immer schlagende Herz. Vorsichtig wurde nun das Herz aus dem Perikard herausgelöst und an der Einmündung der Aorta sorgfältig vom umgebenden Thymus-, Fett- und Bindegewebe abpräpariert. Im Weiteren erfolgte das Absetzen des Herzens an der Aorta. Das noch immer schlagende Herz wurde sofort in eine

Petrischale mit kalter, oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung verbracht. Unter dem Operationsmikroskop erfolgte dann die Kanülierung der Aorta mit einer Knopfkanüle (1,5 x 80mm). Mit einem vorgelegten Faden (Ethicon, Perma - Hand Seide, 6-0) wurde die Aorta dann an der Kanüle fixiert. Die Kanüle wurde dann in die Langendorff-Aparatur eingebaut und sofort begonnen, das Herz mit der oxygenierten und auf 37°C erhitzten Pufferlösung zu durchspülen (51).

EKG-Elektroden wurden jeweils am linken und rechten Herzohr angebracht, sodass Frequenz und Rhythmus bestimmt werden konnte. Die Aufzeichnung erfolgte über fünf Minuten.

2.4.1 Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Puffer

Substanz	Konzentration [mMol/l]	Menge [g]
NaCl	118,90	6,90
KH ₂ PO ₄	1,20	0,163
KCl	4,70	0,351
MgSO ₄	1,20	0,145
CaCl ₂	1,75	0,257
EDTANa ₂	0,50	0,186
Glucose	11,00	1,981
NaHCO ₃	25,00	2,10

Tabelle 3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers

Nach Abwiegen der einzelnen Substanzen wurden diese in Aqua dest. gelöst und mit CO₂ begast. Erst nach der Begasung bis zur CO₂-Sättigung erfolgte die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat.

2.4.2 Aufbau der Langendorff-Aparatur

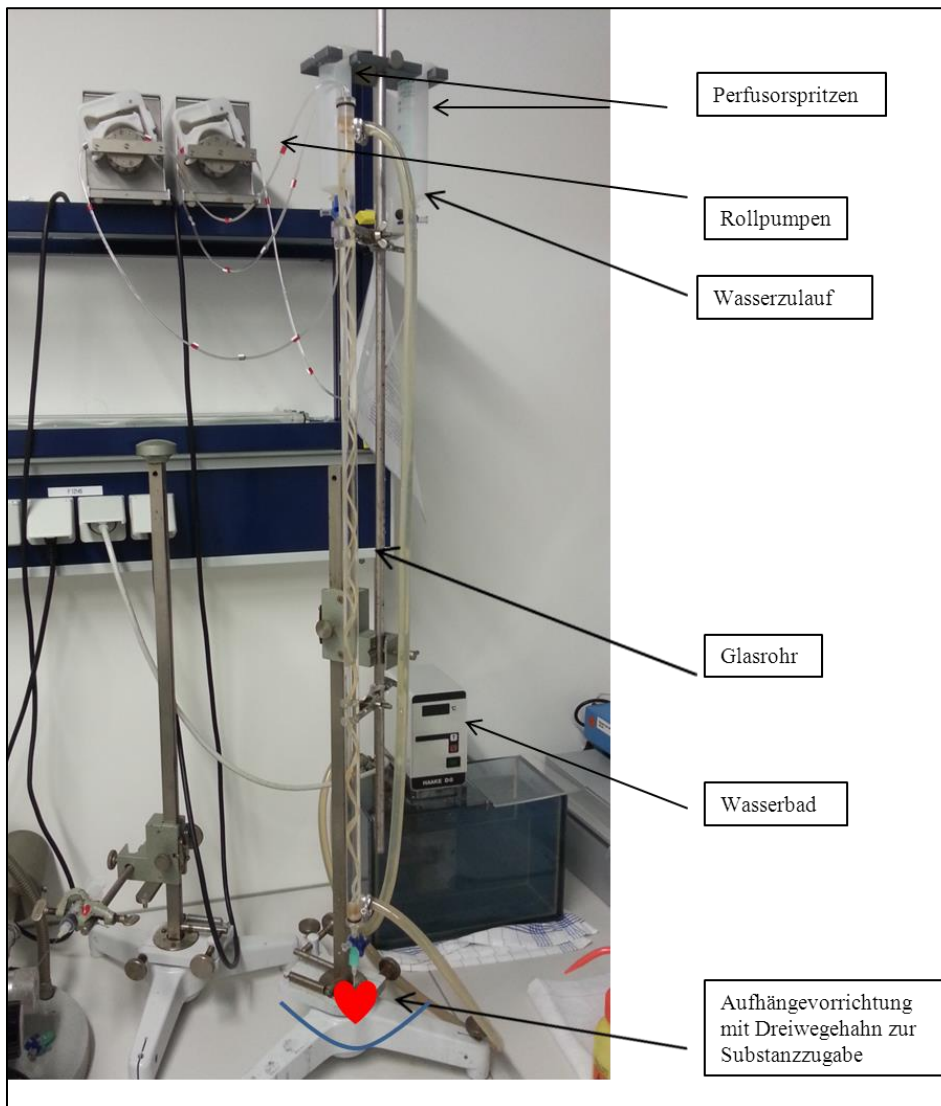


Abbildung 18: Funktionsprinzip des isolierten Herzens nach Langendorff: Das entnommene Herz wird mit der durch **Rollpumpen** ins System gespeiste Pufferlösung aus den **Perfusorspritzen** perfundiert. Die Pufferlösung wird im **Glasrohr** durch das Gegenstromprinzip auf 37°C erwärmt.

2.5 EKG-Auswertung

Die EKG-Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ECG-auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies, USA).

Aus den bereits aufgezeichneten EKGs wurden einzelne EKG-Aufnahmen, die sich in der gleichen oder ähnlichen Morphologie häufig im aufgezeichneten Zeitraum wiederholten und bei denen die einzelnen Punkte eindeutig festgelegt werden konnten, ausgewählt und die Punkte P, Q, R, S und T festgelegt (siehe Abbildung 19).

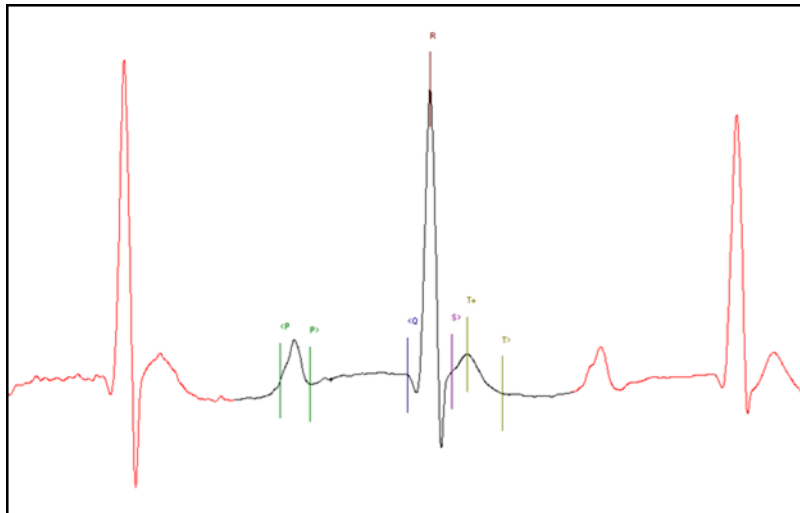


Abbildung 19: EKG-Auswertung: <P definiert dabei den Beginn, P> das Ende der P-Welle, <Q den Beginn, S> das Ende des QRS-Komplexes. T+ bzw. T- markiert den Höhepunkt bzw. den Tiefpunkt und T> das Ende der T-Welle.

Mit mehreren dieser Muster-EKGs wurde dann eine sogenannte „Library“ erstellt, also eine Sammlung der Muster-EKGs, mit der die aufgezeichneten Maus-EKGs verglichen wurden. So war es möglich, die EKG-Intervalle auszuwerten und für jedes Tier für jeden Parameter einen Mittelwert für das entsprechende Intervall zu errechnen.

Wichtige Parameter waren in diesem Fall: Heart Rate (HR), Dauer der P-Welle (Pdur = duration of P), PR, QRS, QT+ und RR-Abstände. Die QT-Zeit wurde mit Hilfe der Formel nach Bazett frequenzkorrigiert. Die frequenzkorrigierte QT-Zeit berechnet sich dabei aus dem Quotienten der QT-Zeit und der Wurzel aus dem RR-Abstand in ms. Eine weitere Frequenzkorrektur erfolgte nach der von Mitchell et al. speziell für Mäuse entwickelten Formel $Q-T_c = Q-T_0 / (R-R_0 / 100)^{1/2}$ (52).

2.6 Entwicklung eines Arrhythmie-Scores

Für die Einteilung der aufgetretenen Arrhythmien im Ruhe- und Stress-EKG modifizierten wir das von Wu et al. entwickelte Score-System (53) (siehe Tabelle 4). Damit ließen sich die Arrhythmien einerseits klassifizieren und andererseits quantifizieren, d. h. in nieder- oder höhergradige Rhythmusstörungen einteilen. So war es möglich, Wildtyp- und KO-Mäuse in ihrem Arrhythmieverhalten zu vergleichen und gleichzeitig zu beobachten, ob zum Beispiel mit dem Alter höhergradige Rhythmusstörungen auftraten.

Höhergradige Rhythmusstörungen wurden mit einem Score von ≥ 3 Punkten klassifiziert, niedriggradige dementsprechend mit einem Score von < 3 Punkten.

Punkte	Bedeutung
0	Keine Arrhythmien, normaler Sinusrhythmus
1	Vorzeitige atriale oder ventrikuläre Schläge
2	Supraventrikuläre Tachykardie oder vorzeitige ventrikuläre gepaarte Schläge
3	Ventrikulärer Bigeminus oder Trigemini oder nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (≥ 3 Schläge)
4	Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (≥ 10 Schläge)
5	Kammerflimmern

Tabelle 4: Arrhythmie-Score

Aus den analysierten EKGs wurde folgende bildliche Darstellung der klassifizierten Arrhythmien erstellt.

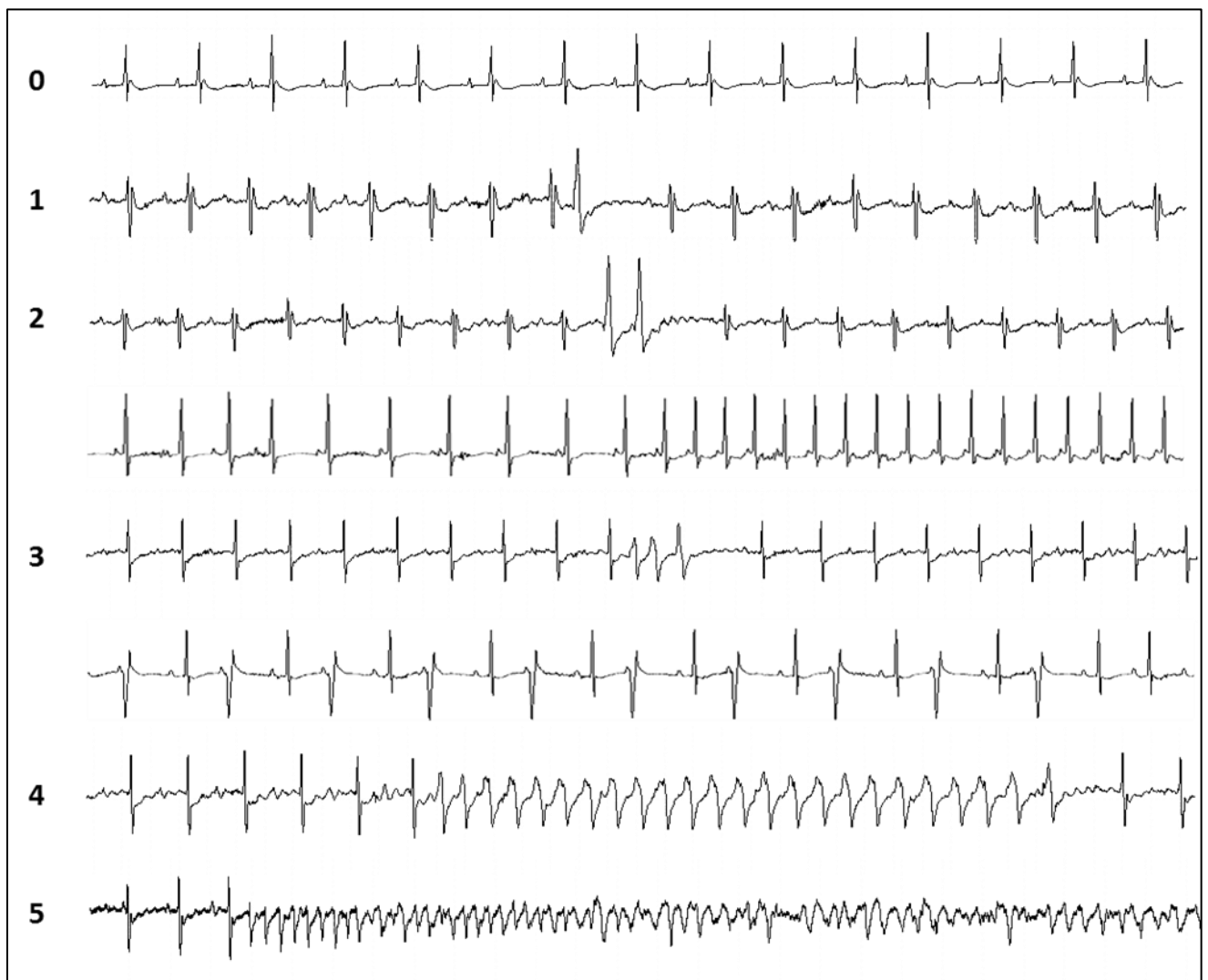


Abbildung 20: Arrhythmie-Score

2.7 Statistische Auswertung

Sämtliche erhobene Daten werden als Mittelwert mit ihrer jeweiligen Standardabweichung angegeben und auf dieser Basis interpretiert.

Die erhobenen Daten aus den Oberflächen-EKGs der ersten Serie wurden mittels Student's-T-Test verglichen.

Die absoluten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen bezüglich der Arrhythmieneigung wurden mittels Chi-Quadrat-Test untersucht. Die erhobenen Parameter in der elektrophysiologischen Untersuchung, sowohl die EKG-Parameter, die elektrophysiologischen Parameter als auch die Stimulationsparameter wurden nicht-parametrisch mithilfe des Man-Whitney-U-Tests ausgewertet um Mittelwertunterschiede aufzudecken. Weiterhin wurden die biologischen Daten mit der univariaten Varianzanalyse (engl.: analysis of variance, ANOVA) nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur untersucht. Ziel hierbei war es, signifikante Kreuzeffekte zwischen den drei Haupt-Variablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ aufzudecken.

Von einer statistischen Signifikanz wurde ausgegangen, wenn $p < 0,05$ war. Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde mit Microsoft Excel 2007 sowie SPSS durchgeführt.

2.8 Graphische Auswertung

Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2007 sowie Igor 6.

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächen-EKG in Ruhe und unter pharmakologischem Stress

Es wurden neun Popdc2-KO-Mäuse und neun Wildtyp-Mäuse mittels Ruhe-EKG und EKG unter pharmakologischen Stress untersucht und die erhobenen Daten miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Oberflächen-EKG-Aufzeichnungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Abbildung 21 (siehe unten) zeigt eine graphische Darstellung des Herzfrequenzanstiegs nach Applikation von Isoproterenol.

Parameter	Wildtyp		Podc2-B16	
	Ruhe	Nach Iso	Ruhe	Nach Iso
Herzfrequenz (bpm)	496,91 ± 1,45	623,17 ± 1,78	566,12 ± 1,19	600,82 ± 1,31
P Dauer (ms)	12,01 ± 0,02	13,71 ± 0,07	15,51 ± 0,07	17,04 ± 0,22
PR (ms)	37,71 ± 0,02	37,36 ± 0,12	35,02 ± 0,18	35,26 ± 0,23
QRS (ms)	15,30 ± 0,01	16,68 ± 0,04	13,43 ± 0,04	13,04 ± 0,09
QT (ms)	52,08 ± 0,08	44,40 ± 0,08	51,64 ± 0,10	51,2 ± 0,44
QTc (ms)	35,23 ± 0,08	28,13 ± 0,25	33,16 ± 0,05	22,76 ± 0,92

Tabelle 5: Übersicht über erhobene Daten aus dem Oberflächen-EKG. Sämtliche Werte werden als Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung angegeben. **Ruhe** bedeutet Aufzeichnung ohne pharmakologischen Stress; **Nach Iso** bedeutet Aufzeichnung nach Gabe von Isoproterenol.

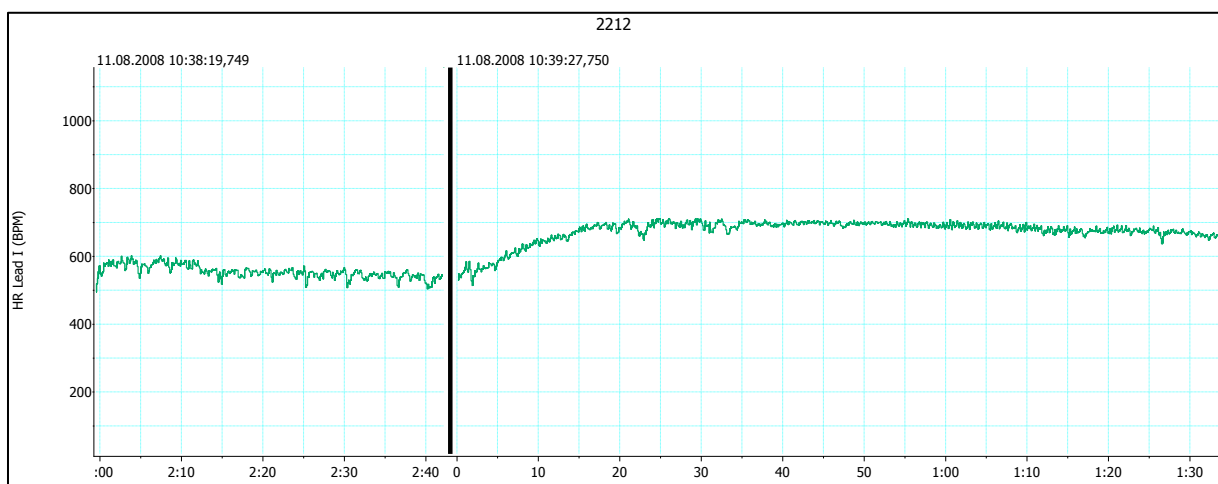


Abbildung 21: Herzfrequenzanstieg nach Gabe von Isoproterenol: Der schwarze Balken markiert die Applikation von Isoproterenol. Herzfrequenz vorher ca. 600 bpm, nach Applikation von Isoproterenol max. ca. 700 bpm. Einwaschzeit von Isoproterenol bis zum Erreichen der maximalen Herzfrequenz ca. 15 Sekunden.

Die mittlere Herzfrequenz der Popdc2-Knockout-Mäuse unter Ruhe-Bedingungen und nach Katecholamin-Gabe unterschied sich von der mittleren Herzfrequenz der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,001$). Während die Herzfrequenz der Knockout-Mäuse unter Ruhe-Bedingungen deutlich höher war als die Frequenz der Wildtyp-Mäuse ($566,12 \pm 1,19$ bpm vs. $496,91 \pm 1,45$ bpm), kam es nach Katecholamin-Stimulation zu einem deutlich höherem Frequenzanstieg bei den Wildtyp-Mäusen ($623,17 \pm 1,78$ bpm) als bei den Popdc2-defizienten Mäusen ($600,82 \pm 1,31$ bpm) (Abbildung 23 und 24).

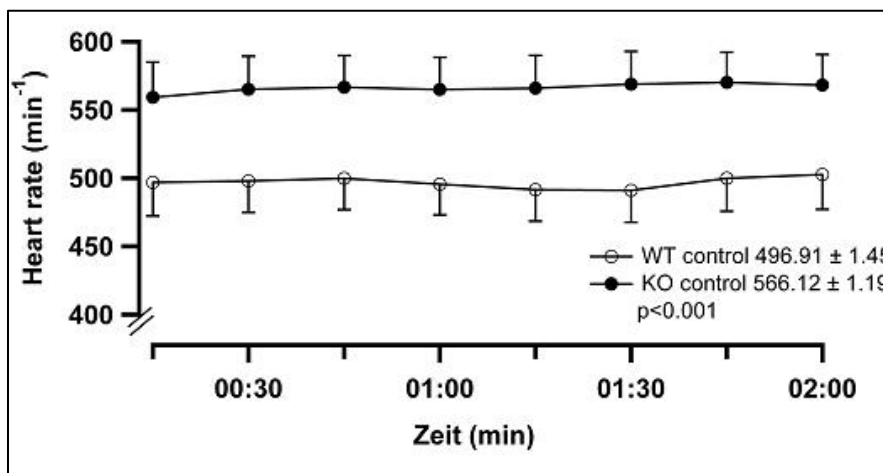


Abbildung 22: Aufzeichnung der Herzfrequenz unter Ruhe-Bedingungen

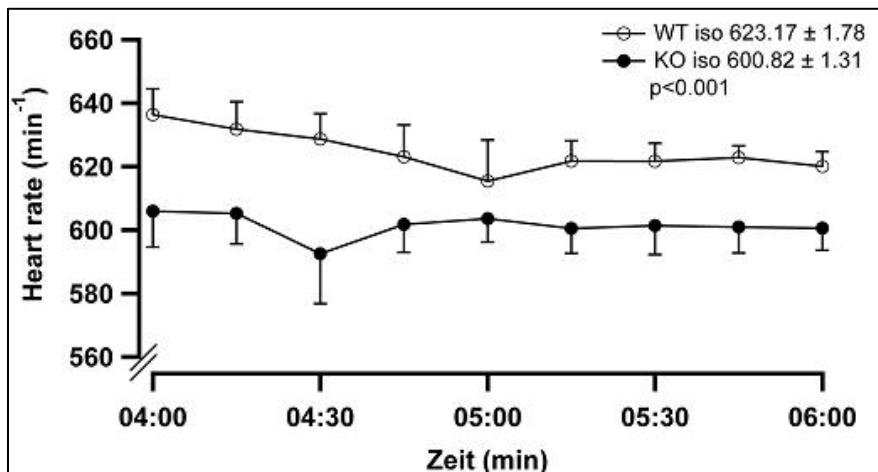


Abbildung 23: Aufzeichnung der Herzfrequenz nach Gabe von Isoproterenol

Die mittlere Dauer der P-Welle unter Ruhe-Bedingungen und nach Katecholamin-Stimulation unterschied sich ebenfalls ($p < 0,001$) zwischen beiden Gruppen. Sowohl unter Ruhe-Bedingungen als auch nach pharmakologischem Stress war die Dauer der P-Welle bei den

Popdc2-Knockout-Mäusen höher als bei den Wildtyp-Mäusen ($15,51 \pm 0,07$ ms vs. $12,01 \pm 0,03$ ms bzw. $17,04 \pm 0,22$ ms vs. $13,71 \pm 0,07$ ms) (Abbildung 25 und 26).

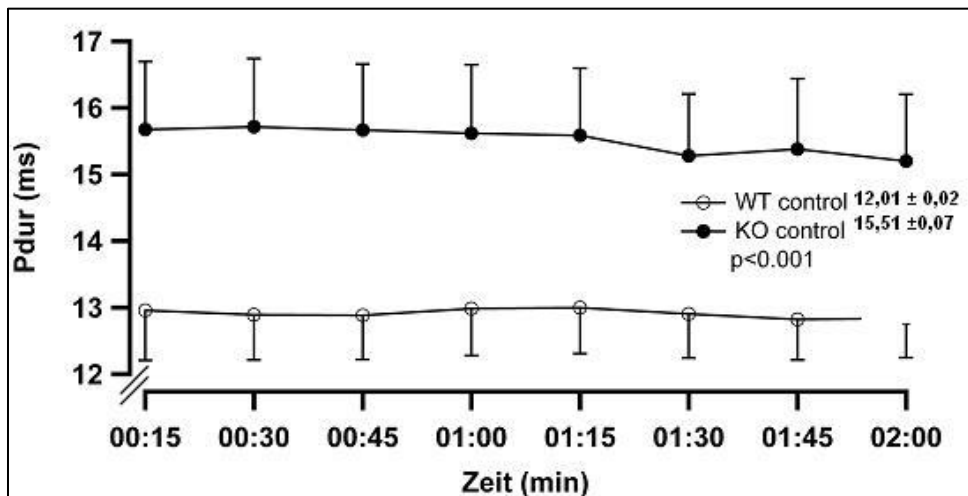


Abbildung 24: Dauer der P-Welle unter Ruhe-Bedingungen

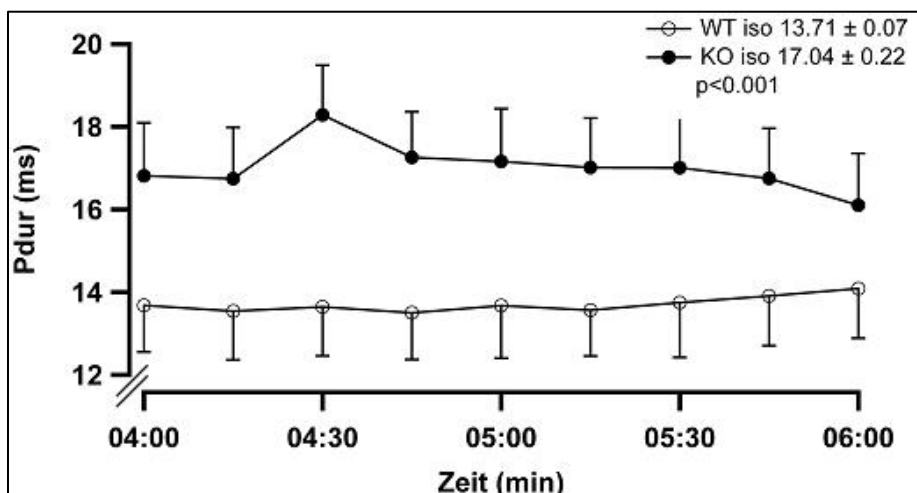


Abbildung 25: Dauer der P-Welle nach Gabe von Isoproterenol

Für den PR-Abstand zeigte sich ebenfalls ein Mittelwertunterschied in beiden Gruppen ($p < 0,001$). Sowohl unter Ruhe-Bedingungen als auch nach der Gabe von Isoproterenol war der PR-Abstand in der Kontrollgruppe höher als bei den Popdc2-defizienten Mäusen ($37,71 \pm 0,02$ ms vs. $35,02 \pm 0,18$ ms bzw. $37,36 \pm 0,12$ ms vs. $35,26 \pm 0,23$ ms), letztendlich zeigte sich kein aber signifikanter Unterschied in der Dauer der P-Welle vor und nach Katecholaminstimulation (Abbildung 27 und 28).

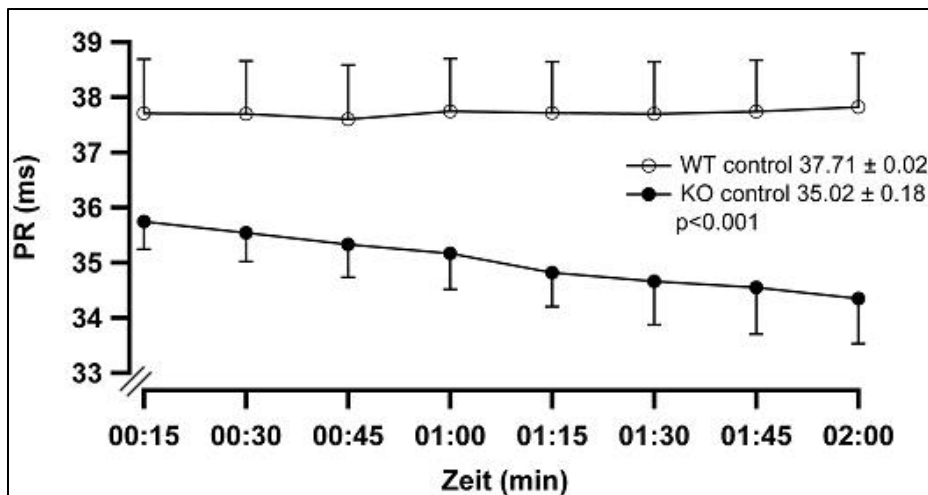


Abbildung 26: PR-Abstand unter Ruhe-Bedingungen

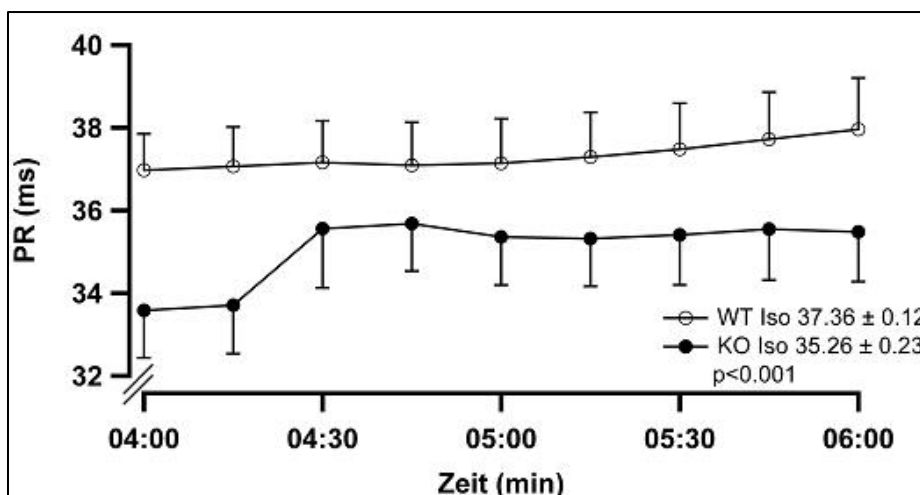


Abbildung 27: PR-Abstand nach Gabe von Isoproterenol

Die Dauer des QRS-Komplexes der Popdc2-Knockout-Mäuse unter Ruhe-Bedingungen und nach Katecholamin-Gabe unterschied sich von der QRS-Dauer der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,001$). Unter Ruhe-Bedingungen war die QRS-Dauer der Wildtyp-Mäuse höher als die der Knockout-Mäuse ($15,30 \pm 0,01$ ms vs. $13,43 \pm 0,04$ ms). Nach Katecholamin-Stimulation zeigte sich die gleiche Tendenz ($16,68 \pm 0,04$ ms bei den Wildtypen vs. $13,04 \pm 0,09$ ms bei den Knockouts), in beiden Gruppen zeigte sich allerdings keine wesentliche Veränderung der QRS-Dauer vor und nach pharmakologischer Stimulation (Abbildung 29 und 30).

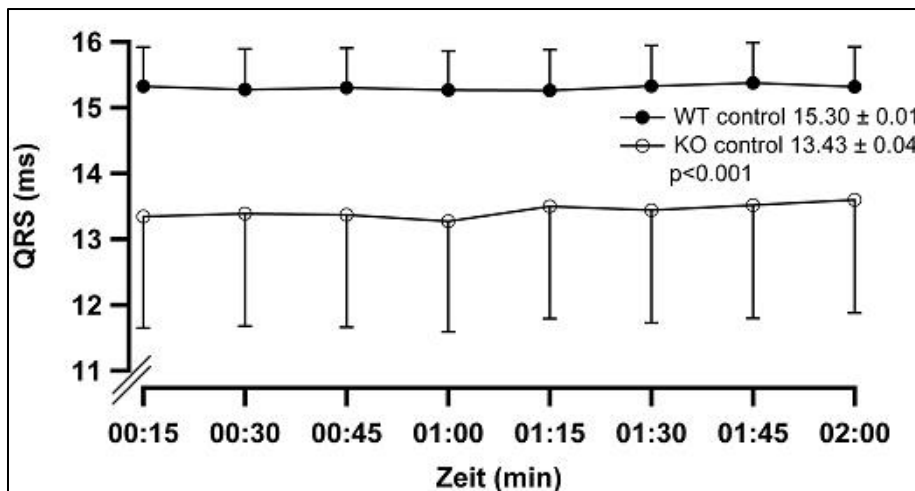


Abbildung 28: QRS-Dauer unter Ruhe-Bedingungen

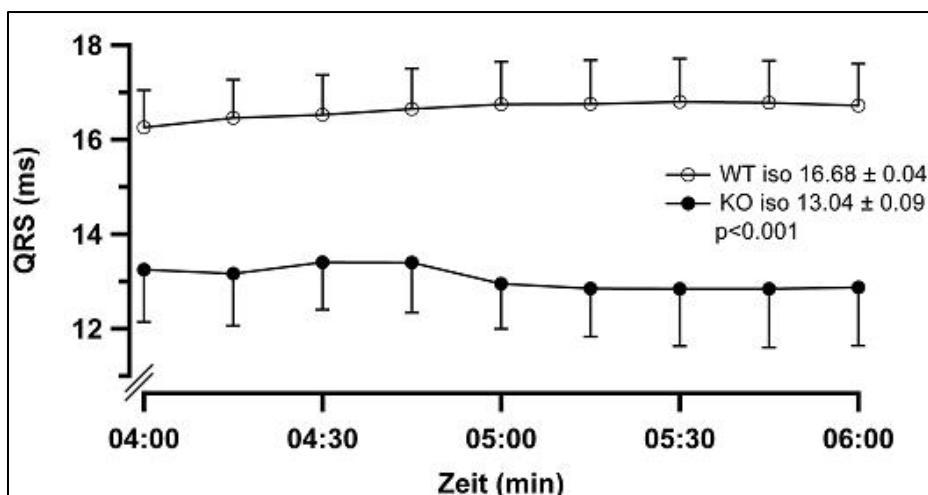


Abbildung 29: Dauer des QRS-Komplexes nach Gabe von Isoproterenol

Die mittlere QT-Dauer in beiden Gruppen in Ruhe und nach pharmakologischem Stress zeigte ebenfalls einen Mittelwertunterschied ($p < 0,005$ in Ruhe und $p < 0,001$ nach Katecholamin-Gabe). In Ruhe zeigte sich eine kürzere QT-Dauer bei den Popdc2-defizienten Mäusen als bei den Wildtyp-Mäusen ($51,64 \pm 0,10$ ms vs. $52,08 \pm 0,08$ ms), während sich nach Katecholamin-Stimulation eine deutliche Verkürzung der QT-Dauer in der Kontrollgruppe ($44,4 \pm 0,08$ ms) bei annähernd gleicher Dauer bei den Popdc2-Knockout-Mäusen ($51,2 \pm 0,44$ ms) zeigte (Abbildung 31 und 32).

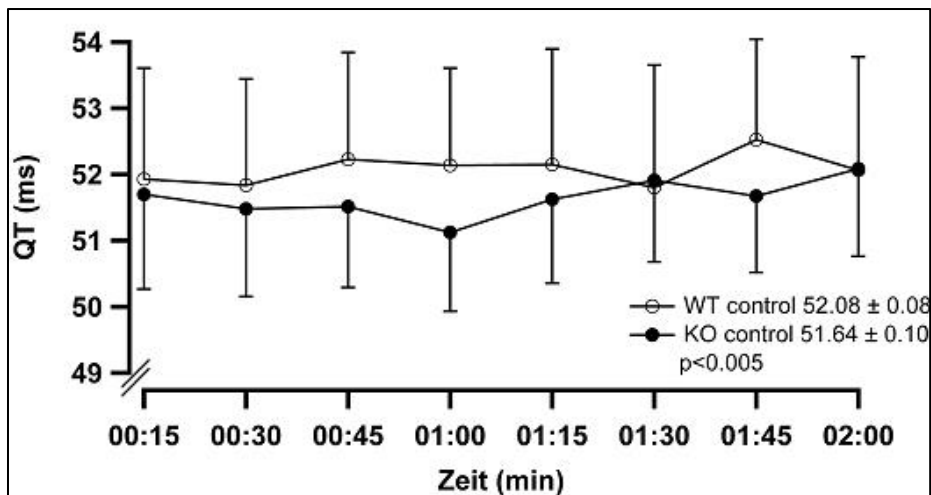


Abbildung 30: QT-Dauer unter Ruhe-Bedingungen

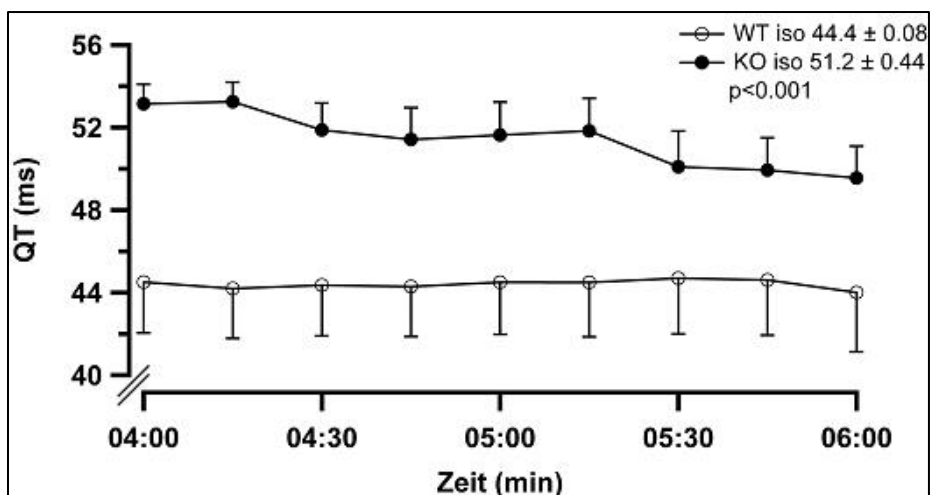


Abbildung 31: QT-Dauer nach Gabe von Isoproterenol

In Ruhe wiesen die Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den *Podc2*-Knockout-Mäusen eine höhere Dauer der Frequenz-korrigierten QT-Dauer QT_c auf ($35,23 \pm 0,08$ ms vs. $33,16 \pm 0,05$ ms) ($p < 0,001$), während sich nach Katecholamin-Gabe eine deutliche Verkürzung in beiden Gruppen zeigte ($28,13 \pm 0,25$ ms bei den Wildtypen vs. $22,76 \pm 0,92$ ms bei den *Podc2*-defizienten Mäusen) ($p < 0,001$) (Abbildung 33 und 34).

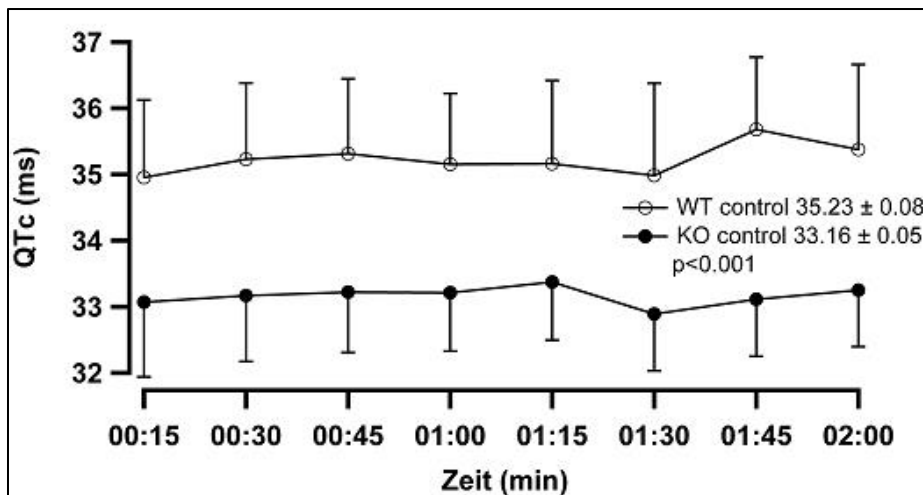


Abbildung 32: QTc unter Ruhe-Bedingungen

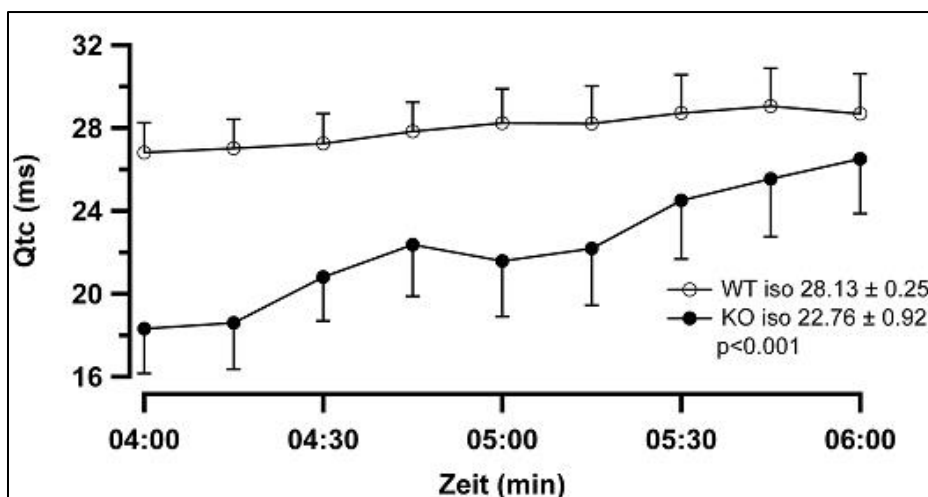


Abbildung 33: QTc nach Gabe von Isoproterenol

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen im Oberflächen-EKG erhobenen Parameter statistisch signifikante bis hoch signifikante Mittelwertsunterschiede zu finden sind. Hervorzuheben ist hierbei die Herzfrequenz, die in Ruhe bei den Knockout-Mäusen deutlich höher war als in der Kontrollgruppe, allerdings nach Katecholamin-Stimulation einen signifikant geringeren Anstieg zeigte als die Herzfrequenz der Wildtyp-Mäuse. Dies untermauert den von Brand et al. postulierten Verdacht der chronotropen Inkompetenz der Popdc2-defizienten Mäuse.

3.2 Elektrophysiologische Untersuchung

3.2.1 Einfluss der Variablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ auf die EKG-Parameter

Ausgehend von der Fragestellung in Kapitel 1.4 sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

- Haben die drei Variablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ jeweils einen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter?
- Und wenn ja, werden diese Haupteffekte der einzelnen Variablen jeweils durch Kreuzeffekte mit den anderen Variablen beeinflusst?

Die ANOVA lieferte zu den untersuchten Variablen folgende p-Werte:

Parameter	Alter	Genotyp	Geschlecht	Alter* Genotyp	Alter* Geschlecht	Genotyp* Geschlecht	Alter* Genotyp* Geschlecht
HR	0,018	0,749	0,591	0,092	0,679	0,869	
RR	0,010	0,689	0,583	0,237	0,926	0,411	0,343
PR	0,482	0,803	0,376	0,365	0,517	0,563	0,607
Pdur	0,180	0,036	0,916	0,408	0,073	0,210	0,063
CL	0,482	0,628	0,560	0,217	0,978	0,382	0,359
SNRT 100	0,034	0,286	0,450	0,857	0,078	0,042	0,540
cSNRT 100	0,074	0,878	0,199	0,081	0,136	0,107	0,231
SNRT 85	0,330	0,987	0,068	0,136	0,372	0,508	0,090
cSNRT 85	0,664	0,817	0,130	0,155	0,229	0,642	0,015
WBP	0,182	0,052	0,598	0,797	0,840	0,770	0,426
PKS 100	0,785	0,105	0,423	0,962	0,713	0,546	0,161
PKS 85	0,829	0,033	0,752	0,806	0,626	0,407	0,207
PKS 75	0,645	0,039	0,645	0,725	0,949	0,400	0,383

Tabelle 6: p-Werte der ANOVA für Haupt- und Kreuzeffekte

Blau hinterlegt sind signifikante p-Werte, entsprechend einem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Grün hinterlegt sind signifikante p-Werte für die Kreuzeffekte zwischen zwei bzw. drei der Variablen „Alter“, „Geschlecht“ und „Genotyp“.

Mit obiger Tabelle wurde zunächst untersucht, ob es signifikante Kreuzeffekte der Variablen gibt. Sie sagt aus, dass es keine signifikanten Kreuzeffekte der drei Modellvariablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ bis auf die Parameter SNRT 100 und cSNRT 85 gibt. Das heißt, falls einer der Variablen einen signifikanten Effekt aufweist, so wird die „Richtung des Effekts“ durch die anderen beiden Variablen beeinflusst.

An den Beispielen der Herzfrequenz (HR), des RR-Abstandes und der Sinusknotenerholzeit bei einer Stimulation mit 100 ms Pulsen lassen sich zeigen, dass es bezüglich dieser

Parameter einen signifikanten Mittelwertunterschied zwischen den jüngeren Mäusen und den älteren Mäusen gibt. In diesen Fällen gibt es keinen Einfluss des Geschlechts oder des Genotyps auf die Mittelwertunterschiede, da die Kreuzeffekte nicht signifikant sind.

Auf die signifikanten p-Werte der Hauptvariablen in obiger Tabelle wird hier nicht näher eingegangen. Die Mittelwertunterschiede werden im folgenden Kapitel mit einem geeigneten nicht-parametrischen Testverfahren untersucht.

3.2.2 Einfluss des Genotyps auf die EKG-Parameter

Im Folgenden wurde der Einfluss des Genotyps auf die erhobenen Parameter nicht-parametrisch mit dem Man-Whitney-U-Test untersucht. Dazu wurde für die erhobenen Parameter bei den Popdc2-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen kumuliert über das Alter und das Geschlecht der Mittelwert errechnet.

Parameter	Wildtyp	Popdc2/Bl6
HR (bpm)	458,6 ± 49,2	463,5 ± 73,0
RR (ms)	132,2 ± 14,5	132,8 ± 21,0
Pdur (ms)	49,6 ± 16,2	48,1 ± 14,1
Cycluslänge (ms)	132,2 ± 14,2	133,0 ± 21,1
SNRT100 (ms)	179,2 ± 34,3	172,3 ± 38,7
cSNRT 100 (ms)	52,6 ± 26,3	39,3 ± 21,8
SNRT85 (ms)	166,8 ± 37,0	174,9 ± 34,9
cSNRT85 (ms)	45,5 ± 30,7	50,0 ± 24,9
Wenckebachpunkt	80 ± 9	87 ± 8
PKS 100	48 ± 11	41 ± 10
PKS 85	47 ± 9	39 ± 10
PKS 75	46 ± 10	39 ± 10

Tabelle 7: Übersicht über erhobene Daten aus den elektrophysiologischen Untersuchungen kumuliert über Alter und Geschlecht. Sämtliche Werte werden als Mittelwerte mit ihrer jeweiligen Standardabweichung angegeben.

In der statistischen Auswertung mit dem Man-Whitney-U-Test zeigte sich nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur kein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen der Popdc2/Bl6-Gruppe und der Kontrollgruppe kumuliert über das Alter und das Geschlecht.

Da in der ANOVA signifikante Kreuzeffekte zwischen den Variablen ausgeschlossen werden konnten, wurde auf die Durchführung des Man-Whitney-U-Tests getrennt nach dem Alter und dem Geschlecht verzichtet.

3.2.3 Einfluss des Genotyps und des Alters auf die Häufigkeit der aufgetretenen Arrhythmien

Sämtliche aufgezeichnete Oberflächen-EKGs unter Ruhe- und Stressbedingungen wurden auf das Auftreten von Arrhythmien untersucht. Vor der Gabe von Isoproterenol fanden sich keine Rhythmusstörungen, weder bei den Knockout- noch bei den Wildtyp-Mäusen (hier nicht abgebildet). Die nach Katecholamin-Stimulation gefundenen Arrhythmien wurden nach oben beschriebenem Score (siehe Kapitel 2.7) klassifiziert. So erhielt jedes Tier, bei dem Arrhythmien auftraten, eine Punktzahl abhängig von der Häufigkeit und dem Schweregrad der aufgetretenen Arrhythmien. Nach Katecholamin-Applikation fanden sich gehäuft ventrikuläre Arrhythmien inklusive Kammerflimmern bei den älteren, männlichen Knockout-Mäusen, das allerdings stets selbstlimitierend war. Hervorzuheben ist, dass sich bei den Wildtyp-Mäusen auch nach Katecholamin-Stimulation **keine** Arrhythmien auslösen ließen.

Dies soll nachfolgende Abbildung verdeutlichen:

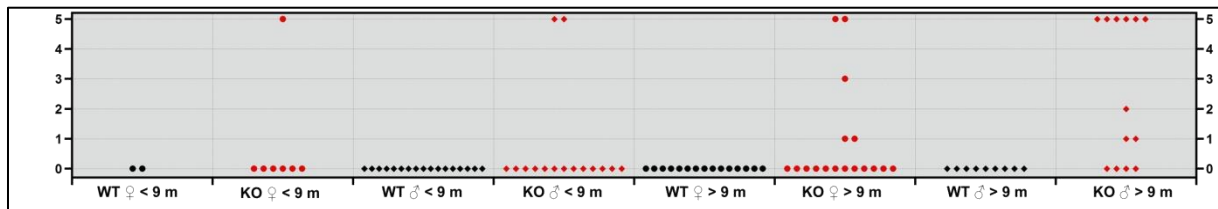


Abbildung 34: Verteilung der Arrhythmien klassifiziert nach dem Arrhythmie-Score. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die Aufteilung erfolgte nach dem Genotyp (WT oder KO), dem Alter (<9 Monate oder >9 Monate) und nach dem Geschlecht.

Um dies statistisch zu prüfen, wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Die Variablen „Alter“ und „Arrhythmiegrad“ sind voneinander abhängig.
- Ferner ist diese Abhängigkeit wiederum beeinflusst durch den Genotyp.

Zuerst erfolgte die Einteilung in höher- bzw. niedriggradige Arrhythmien.

Arrhythmie-grad	Wildtyp	Popdc2/Bl6	Gesamt
< 3	43	40	83
≥ 3	0	12	12
Gesamt	43	52	95

Tabelle 8: Einteilung der untersuchten Mäuse nach dem Genotyp und dem Grad ihrer Arrhythmien

Die Ausführung des Chi-Quadrat-Testes ergab bezogen auf den Genotyp und den Arrhythmiegrad eine hohe Signifikanz mit einem p-Wert von 0,001.

Das bedeutet also, dass die Tiere des Stammes Popdc2/Bl6 signifikant häufiger höhergradige Arrhythmien aufweisen, als die Tiere der Kontrollgruppe.

Als nächstes erfolgte die Ausführung des Chi-Quadrat-Testes nach dem Alter, also getrennt für die jüngeren und älteren Mäuse.

Das bedeutet für die jüngeren Mäuse:

Arrhythmie-grad	Wildtyp	Popdc2/Bl6	Gesamt
< 3	19	19	38
≥ 3	0	3	3
Gesamt	19	22	41

Tabelle 9: Einteilung der Mäuse unter neun Monaten nach ihrem Genotyp und Arrhythmiegrad

Die Ausführung des Chi-Quadrat-Testes ergab für die jüngeren Mäuse einen p-Wert von 0,095.

Somit ergibt sich kein signifikanter Unterschied bei dem Auftreten höhergradiger Arrhythmien bei dem Vergleich von jungen Mäusen des Stammes Popdc/Bl6 und der Kontrollgruppe.

Analog erfolgte die Durchführung des Chi-Quadrat-Tests für die älteren Mäuse:

Arrhythmie-grad	Wildtyp	Popdc2/Bl6	Gesamt
< 3	24	21	45
≥ 3	0	9	9
Gesamt	24	30	54

Tabelle 10: Einteilung der Mäuse über neun Monaten nach ihrem Genotyp und Arrhythmiegrad

Hier ergab sich ein p-Wert von 0,003.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Arrhythmieeigung zwischen den Knock-out Mäusen und der Kontrollgruppe gibt. Allerdings wird diese Signifikanz durch die alten Mäuse hervorgerufen. Das heißt wiederum, dass sich vor allen Dingen bei den älteren Podc2-defizienten Mäusen höhergradige Arrhythmien auslösen ließen.

3.3 Bild-Beispiele ausgelöster Arrhythmien im Oberflächen-EKG

Nachfolgend sollen einige Abbildungen verdeutlichen, welche Rhythmusstörungen sich bei den Popdc2-Knockout-Mäusen nach Katecholamin-Stimulation beobachten ließen.

Es folgt zunächst die Darstellung eines normalen Sinusrhythmus mit regelhafter Abfolge von P, QRS und T.



Abbildung 35: Normaler Sinusrhythmus

3.3.1 Score-Punkt von 1: Vorzeitiger atrialer oder ventrikulärer Schlag

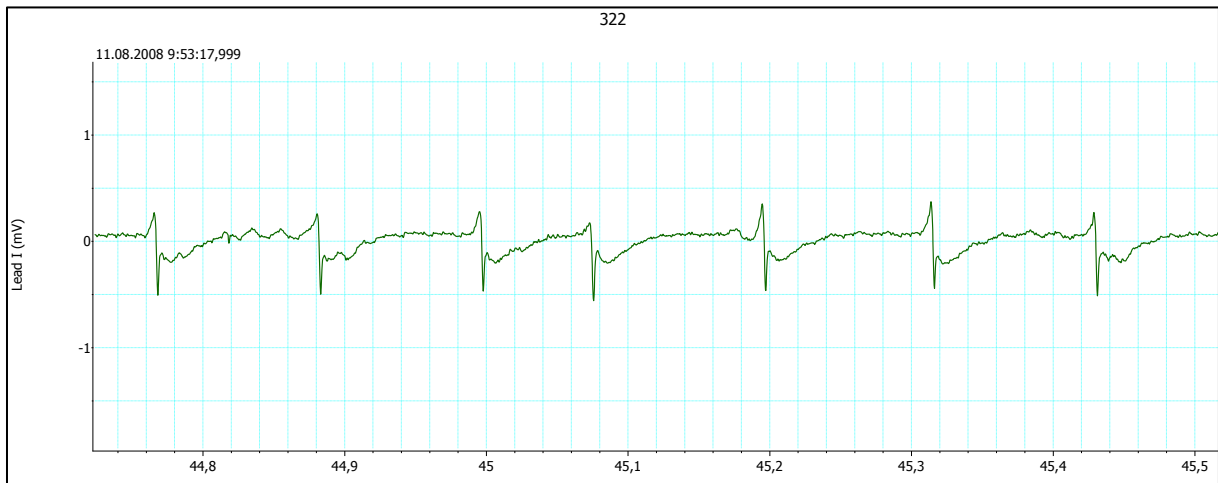


Abbildung 36: Vorzeitiger atrialer Schlag

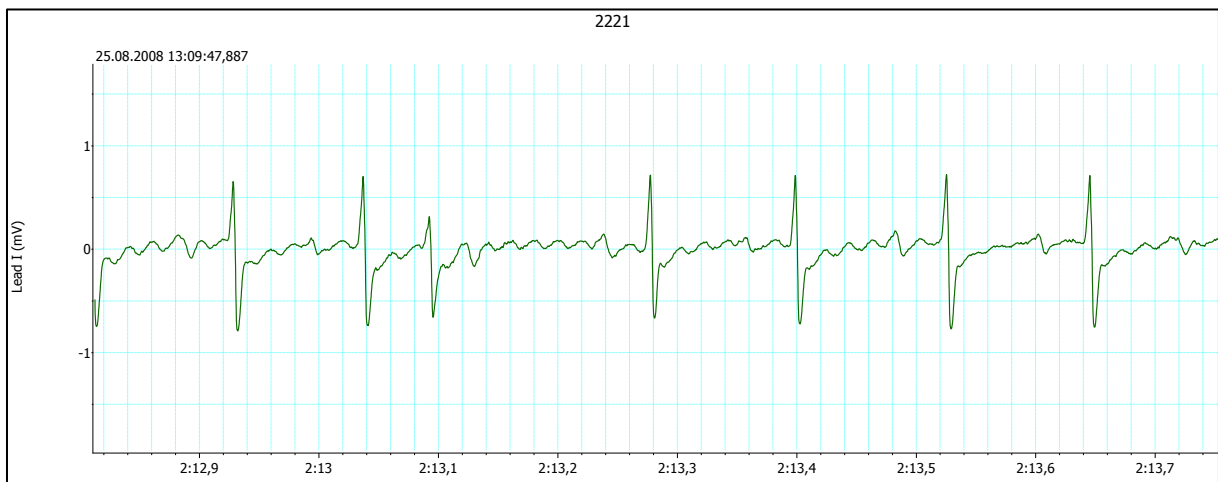


Abbildung 37: Vorzeitiger ventrikulärer Schlag

3.3.2 Score-Punkt von 2: paarweise ventrikuläre Schläge oder selbstlimitierende atriale

Tachykardie

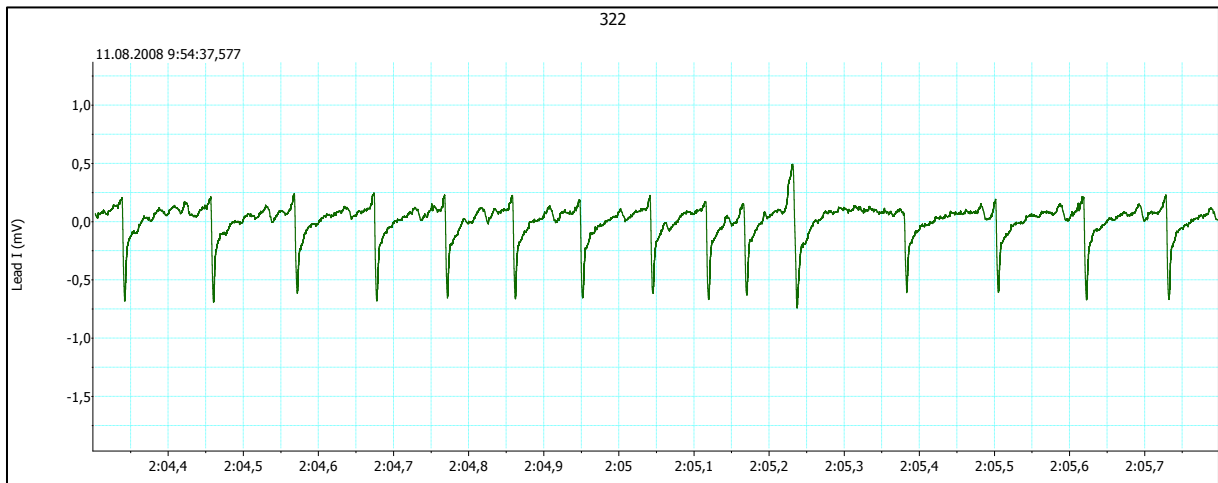


Abbildung 38: Atriale Akzeleration



Abbildung 39: Atriale Extrasystolie

3.3.3 Score-Punkt von 3: Bigeminus oder Trigemini oder selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie von ≥ 3 Schlägen

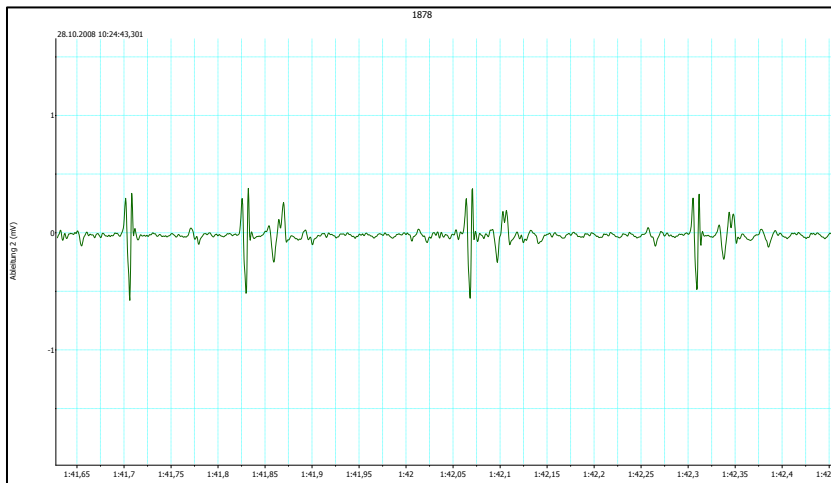


Abbildung 40: Ventrikulärer Bigeminus



Abbildung 41: Trigemini



Abbildung 42: Kurze selbstlimitierende Tachykardie von vier Schlägen

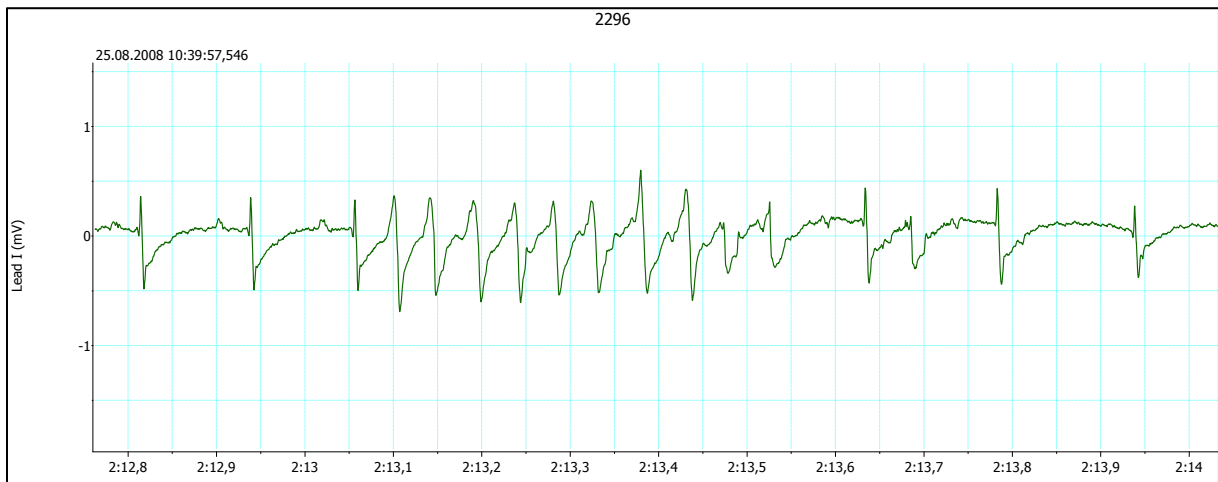


Abbildung 43: Selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie von neun Schlägen

3.3.4 Score-Punkt von 4: Selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie von ≥ 10 Schlägen

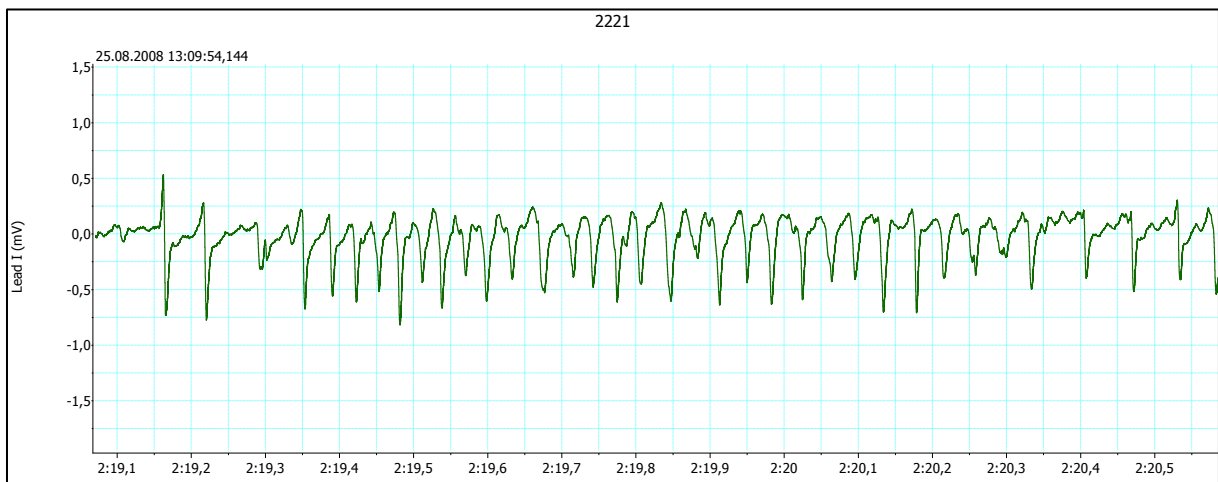


Abbildung 44: Selbstlimitierende ventrikuläre Tachykardie

3.3.5 Score-Punkt von 5: Kammerflimmern

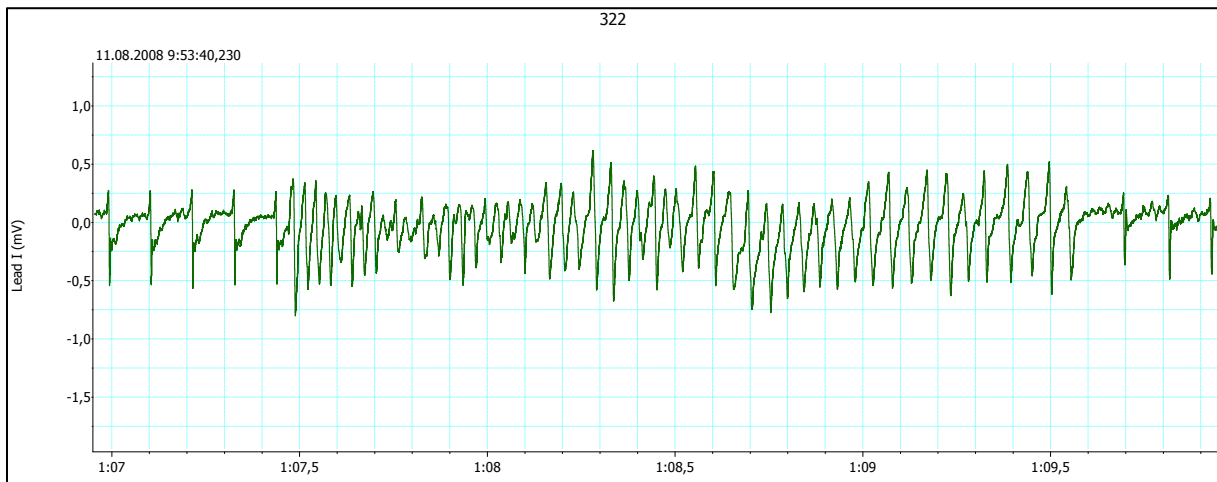


Abbildung 45: Kammerflattern DD Kammerflimmern

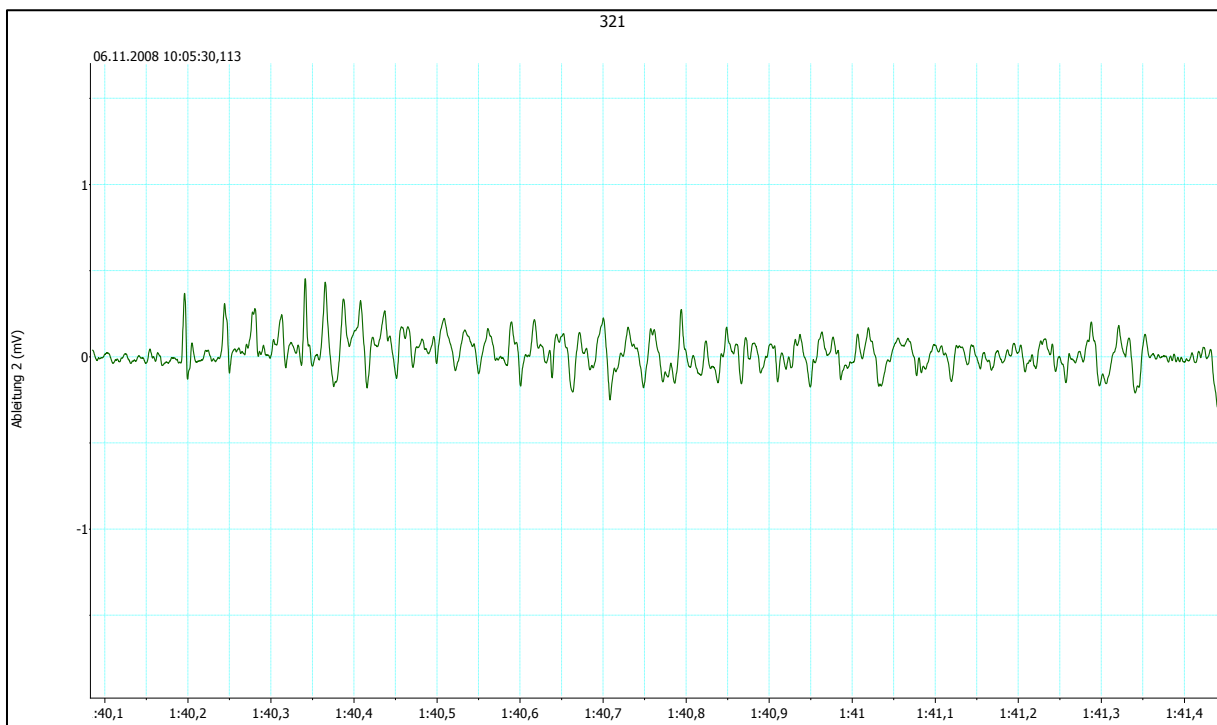


Abbildung 46: Kammerflimmern

3.4 Isoliertes EKG

Auf eine detaillierte Auswertung der isolierten EKGs wurde aufgrund mangelnder Daten verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Die Maus als Modell

Genetisch veränderte Tiere sind wichtig, um die Mechanismen elektrophysiologischer Erkrankungen beim Menschen zu erforschen. Auch wenn genetische Manipulation in verschiedenen Tieren möglich ist, ist die Maus das wichtigste Säugetier für in vivo Untersuchungen (49, 54) als auch für Untersuchungen auf molekularer Ebene (55). Es sollte trotzdem bedacht werden, dass sich die Maus und ihr Herz aufgrund ihrer geringen Körpergröße sehr von den elektrophysiologischen Eigenschaften des menschlichen Herzens unterscheiden können, obwohl das menschliche und murine Genom zu >80% identisch sind.

Gemeinsamkeiten des menschlichen und des Mäuseherzens sind das Vorhandensein von vier Kammern und eines spezialisierten Reizbildungs- und -leitungssystems mit einem Sinus- und AV-Knoten. Auch die an der Reizbildung- und -weiterleitung beteiligten Ionenkanäle mit ihren Strömen sind ähnlich, wenn auch zum Teil verschieden (56).

Ein wichtiger Unterschied ist die deutlich höhere Ruheherzfrequenz der Mäuse, die mit 600 bis 700 Schlägen pro Minute etwa 10 Mal so schnell ist, als die des Menschen, und wodurch es erschwert wird, die verschiedenen Zeitintervalle klar voneinander abzugrenzen (57). Dies fängt bereits bei der Festlegung der einzelnen EKG-Punkte an, wie nachfolgendes Beispiel verdeutlichen soll.

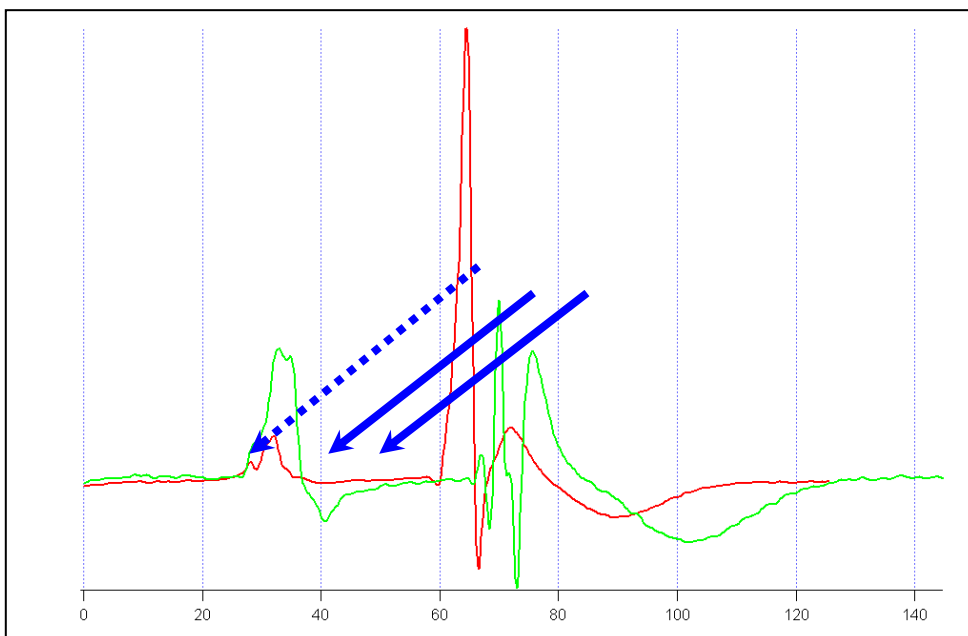


Abbildung 47: Wo endet die P-Welle? Gestrichelter Pfeil: Beginn der P-Welle, durchgezogene Pfeile: mögliches Ende der P-Welle; Rotes EKG: Wildtyp, grünes EKG: Trop T Mutante

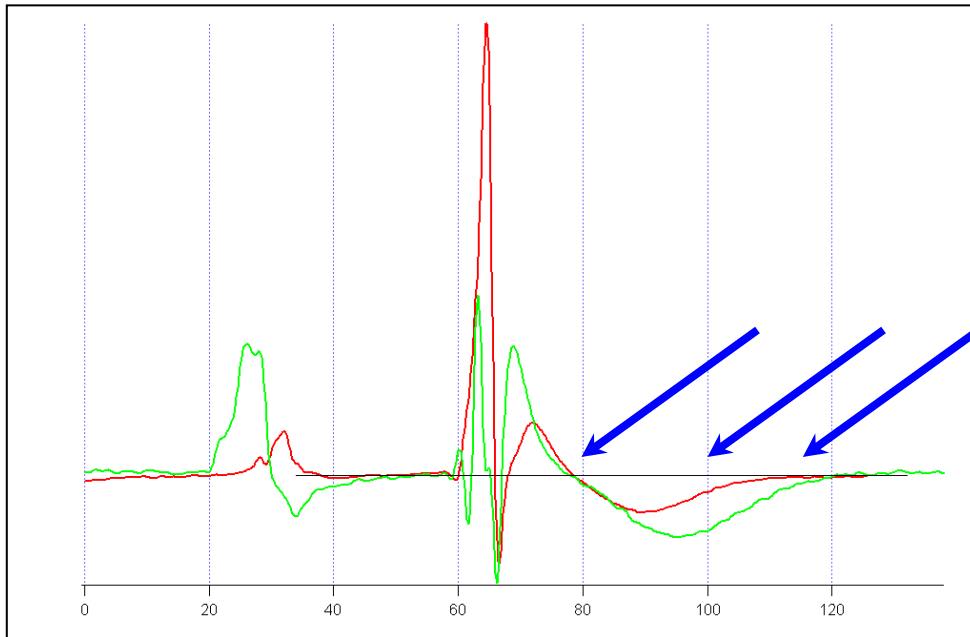


Abbildung 48: Wie lange ist die QT-Dauer? Die Pfeile markieren das mögliche Ende der T-Welle. Rotes EKG: Wildtyp; grünes EKG: Trop T Mutante

Weiterhin beträgt die Dauer des Aktionspotentials unter 30 ms in Mäusen weniger als 10% der Dauer des Aktionspotentials im Menschen (58), was auf unterschiedliche repolarisierende Kaliumströme zurückzuführen ist (56). Es ist also eine große technische Herausforderung, aus den elektrophysiologischen Eigenschaften gentechnisch veränderter Mäuse Rückschlüsse auf den entsprechenden menschlichen Phänotypen zu ziehen.

Da die Oberfläche der Vorhöfe des Mäuseherzens unter 35 mm² beträgt, ist zunächst bezweifelt worden, ob überhaupt atriale Tachykardien mit programmierter elektrischer Stimulation auslösbar sind. Wakimoto et al. konnten allerdings nachweisen, dass nach cholinergischer Stimulation sowohl selbstlimitierende atriale Tachykardien als auch Vorhofflimmern ausgelöst werden konnten (59).

Weiterhin sollte beachtet werden, dass die verwendeten elektrophysiologischen Protokolle ursprünglich für das menschliche und nicht das murine Herz entwickelt worden sind (60) und entsprechender Anpassung bedürfen.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die gentechnisch veränderte Maus eine wichtige Rolle bei der Erforschung von genetisch bedingten Herzrhythmusstörungen spielt, aber man sich trotzdem vor Augen halten sollte, welche Unterschiede es in der Physiognomie als auch in den elektrischen Eigenschaften zwischen dem menschlichen und murinem Herzen gibt.

Erstmals wurde in dieser Arbeit eine systematische elektrophysiologische Charakterisierung von Popdc2-Knockout-Mäusen durchgeführt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse aus Serie 1

Für die erste Messreihe bestehend aus jeweils neun männlichen Wildtyp-Mäusen und neun männlichen Mäusen des Stammes Popdc2/B16 wurde eine detaillierte Auswertung der einzelnen Parameter im Oberflächen-EKG unter Ruhe- und unter Stressbedingungen durchgeführt.

Für alle Parameter zeigten sich statistisch hoch signifikante Mittelwertunterschiede. Hervorzuheben ist der Vergleich der Herzfrequenz vor und nach Katecholamin-Gabe. In Ruhe haben die Knockout-Mäuse eine signifikant höhere Herzfrequenz als die Kontrollgruppe ($566,12 \pm 1,19$ bpm vs. $496,91 \pm 1,45$ bpm), steigen aber nach Katecholamin-Gabe deutlich weniger mit der Herzfrequenz an ($600,82 \pm 1,31$ bpm vs. $623,17 \pm 1,78$ bpm). Dies untermauert den von Froese et al. postulierten Verdacht einer Sinusknotendysfunktion im Sinne einer chronotropen Inkompetenz (42), das heißt einem mangelnden Herzfrequenzanstieg unter Belastung. Allerdings ließ sich der schon in Ruhe bestehende Herzfrequenzunterschied zwischen beiden Gruppen (s.o.) in den Elektrophysiologischen Untersuchungen nicht reproduzieren (Wt vs. KO $458,55 \pm 9,13$ bpm vs. $463,50 \pm 14,89$ bpm).

4.3 Diskussion der EPU-Parameter

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dienten dazu, die elektrischen Eigenschaften des Sinusknotens und des AV-Knotens sowie die Induzierbarkeit von atrialen und ventrikulären Arrhythmien zu untersuchen. Die in der klinischen Elektrophysiologie verwendeten Mess- und Stimulationsprotokolle wurden von uns derart modifiziert, dass sie auch bei den verwendeten Mäusen auswertbare Daten lieferten. Die erhobenen Parameter wurden mit der ANOVA ausgewertet, um Kreuzeffekte zwischen den Hauptvariablen „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“ aufzudecken und weiterhin die Mittelwertunterschiede mit dem nichtparametrischen Man-Whitney-U-Test ausgewertet. Die absoluten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich ihrer Arrhythmieneigung wurden mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet.

4.3.1 Signifikante p-Werte der ANOVA

In der Auswertung der in der elektrophysiologischen Untersuchung erhobenen Parameter hatten sich bezüglich der Hauptvariable „Alter“ signifikante p-Werte für die Herzfrequenz,

den RR-Abstand und die Sinusknotenerholungszeit bei einer Stimulation mit 100 ms Pulsen gezeigt.

- HF >9mon vs. <9mon: 448,0 bpm vs. 485,24 bpm
- RR >9mon vs. <9mon: 136,5 ms vs. 125,1 ms
- SNRT 100 >9mon vs. <9mon: 182,7 ms vs. 161,7 ms

Dies bedeutet also, dass das Alter einen signifikanten Einfluss auf den Mittelwertunterschied oben genannter Parameter unabhängig vom Genotyp und Geschlecht hat.

Ein signifikanter Kreuzeffekt zwischen Genotyp und Geschlecht fand sich ebenfalls bei der Sinusknotenerholungszeit mit 100 ms Pulsen. Dies würde also bedeuten, dass falls das Geschlecht einen signifikanten Effekt auf den gemessenen Parameter hat, dieser wiederum durch den Genotyp beeinflusst ist.

Ein signifikanter Kreuzeffekt zwischen allen drei Hauptvariablen, also „Alter“, „Genotyp“ und „Geschlecht“, fand sich bei der korrigierten Sinusknotenerholungszeit mit 85 ms Pulsen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in diesen Parameter nur sehr wenige Messwerte mit eingegangen sind, da es technisch schwierig war, diese Stimulation durchzuführen und sie auch nur bei wenigen Mäusen zum Erfolg geführt hat, sodass überhaupt ein Messwert erhoben werden konnte.

Letzten Endes sehen wir keinen verwendbaren signifikanten Kreuzeffekt der drei Hauptvariablen.

4.3.2 Mittelwertunterschiede

Die absoluten Mittelwertunterschiede wurden nachfolgend mit dem Man-Whitney-U-Test ausgewertet. Kumuliert über das Alter und das Geschlecht zeigte sich in sämtlichen der erhobenen Parameter kein signifikanter Mittelwertunterschied.

Dies bedeutet zum einen, dass der Mittelwertunterschied in der Herzfrequenz (KO vs. WT: $566,12 \pm 1,19$ bpm vs. $496,91 \pm 1,45$ bpm) und dem PR-Abstand (WT vs. KO: $37,71 \pm 0,02$ ms vs. $35,02 \pm 0,18$ ms) aus der Serie 1 nicht reproduziert werden konnten.

Zum anderen sollte im Hinblick auf die von Froese et al. postulierte Sinusknotendysfunktion die Sinusknotenfunktion mittels der Sinusknotenerholungszeit weiter quantifiziert werden. Da sich auch hier kein signifikanter Mittelwertunterschied zeigte (SNRT100 WT vs. KO: $179,2 \pm 34,3$ vs. $172,3 \pm 38,7$), konnte die vorbeschriebene Sinusknotendysfunktion von uns nicht verifiziert werden. Unseren Ergebnissen zufolge, gibt es keinen Unterschied in der Sinusknotenfunktion oder in der Überleitung des AV-Knotens zwischen der Kontrollgruppe und den Mäusen des Stammes Pop2/B16.

4.3.3 Arrhythmieneigung

Betrachtet man den Unterschied in der Arrhythmieneigung zwischen der Kontrollgruppe und den Popdc2-KO-Mäusen unabhängig vom ihrem Alter ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Betrachtet man nur die jungen Mäuse, zeigt sich, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von Arrhythmien gibt ($p < 0,095$). Es findet sich jedoch ein statistisch hoch signifikanter Unterschied in der Arrhythmieneigung zwischen der Kontrollgruppe und den Popdc2-Mäusen über neun Monaten ($p < 0,03$).

Dies lässt zwei Schlussfolgerungen zu:

1. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigen Popdc2-Knockout-Mäuse eine erhöhte Vulnerabilität für tachykarde Herzrhythmusstörungen unter Katecholamin-Einfluss.
2. Dieser Prozess ist altersabhängig. Sowohl die Häufigkeit als auch der Schweregrad von aufgetretenen Herzrhythmusstörungen nehmen mit dem Alter zu.

4.4 Molekularbiologische Aspekte

Froese et al. konnten zeigen, dass Popdc1 und 2 sowohl cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) binden, als auch die Expression des Kalium-Kanals TREK-1 modifizieren (42). Diese Ergebnisse wurden von Boukens et al. aufgegriffen, um die bei älteren Mäusen aufgetretenen Bradyarrhythmien zu erklären (43).

Die Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes, was nachfolgend zu einer Depolarisation der Zellmembran führt (13, 17). Hier ergibt sich die erste Möglichkeit für eine Interaktion durch das Popdc-Protein, welches cAMP binden kann.

Gleichzeitig können Popdc1 und 2 an den Kaliumkanal TREK-1 binden, wodurch der Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird, was wiederum eine Hyperpolarisation der Zelle und eine Verminderung oder Erschwerung der elektrischen Aktivität nach sich zieht.

Ebenso konnten Froese et al. zeigen, dass eine cAMP-Erhöhung bewirkt, dass sich das Popdc wieder vom TREK-1 löst, wodurch der Kaliumauswärtsstrom wieder inhibiert wird.

Dies lässt als Schlussfolgerung zu, dass sowohl eine β -adrenerge Stimulation als auch die Abwesenheit von Popdc1 und 2 den Kaliumauswärtsstrom reduzieren und somit zu einer Steigerung der elektrischen Aktivität führen.

Weiterhin führt die Aktivierung von β -Rezeptoren zu einer PKA-induzierten Phosphorylierung von TREK-1, wodurch ebenfalls der Kaliumauswärtsstrom inhibiert wird.

Das wiederum würde bedeuten, dass die Abwesenheit von Popdc1 und 2 einen vergleichbaren Effekt auf TREK-1 hat, wie die β -adrenerge Stimulation.

Dies könnte bezogen auf unsere Ergebnisse die Neigung zu tachykarden Rhythmusstörungen unter Katecholamin-Einfluss erklären. Die Popdc2-defizienten Mäuse wiesen im Alter eine signifikant höhere Neigung zu tachykarden Arrhythmien auf als die Mäuse der Kontrollgruppe, in denen das Podpc2-Gen nicht ausgeschaltet war.

4.5 Anatomische Effekte

Obwohl das Popdc2-Gen in höherem Maße im Reizbildungs- und -leitungssystem des Herzens zu finden ist (28), erbrachte die von uns systematisch durchgeführte elektrophysiologische Charakterisierung keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Sinusknotenerholungszeit und den AV-Überleitungseigenschaften. Dies wirft die Frage auf, welche Rolle die Anwesenheit von Popdc überhaupt bei Reizbildung und -leitung spielt. Pathophysiologisch scheint das Fehlen des Popd2-Gens zu einer erhöhten Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen zu führen, was im Umkehrschluss bedeuten könnte, dass das Genprodukt des Podpc2-Gens in gewisser Weise zur Stabilisierung der Reizleitung und/oder -bildung beiträgt, sich jedoch das Fehlen nicht signifikant auf die elektrophysiologischen Prozesse auswirkt.

5 Zusammenfassung

Obwohl die molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften von Popdc2 immer noch nicht vollständig erforscht sind, ist es unbestreitbar, dass es Einfluss auf die kardiale Funktion in vivo besitzt. Unsere Untersuchungen konnten den bisher aufgestellten Verdacht, dass das Popdc2-Gen Einfluss auf bradykarde Herzrhythmusstörungen im Sinne eines Sick-Sinus-Syndroms hat, nicht bestätigen.

Vielmehr scheint das Popdc2-Gen Einfluss auf die Vulnerabilität für Katecholamin-sensitive tachykarde Herzrhythmusstörungen zu nehmen, ein Prozess, der altersabhängig ist. Besonders bei den älteren Popd2-KO-Mäusen ließen sich maligne ventrikuläre Rhythmusstörungen auslösen.

Ziel weiterer Studien sollte die Aufdeckung der Relevanz des Popd2-Gens und seinen potentiellen Einfluss auf die Entstehung von malignen Herzrhythmusstörungen im Menschen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt Deutschland. "Sterbefälle insgesamt 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10."
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursache/n/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>, abgerufen am 12.01.2014.
2. Bundesministerium für Gesundheit, Robert Koch Institut.
http://www.rki.de/DE/Home/Forschungsergebnisse_Gesundheit_Alter.pdf?__blob=publicationFile, abgerufen am 26.06.2012.
3. Zipes, D.P., and Wellens, H.J. 1998. Sudden cardiac death. *Circulation* 98:2334-2351.
4. Huikuri, H.V., Castellanos, A., and Myerburg, R.J. 2001. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 345:1473-1482.
5. Zipes, D.P., Camm, A.J., Borggrefe, M., Buxton, A.E., Chaitman, B., Fromer, M., Gregoratos, G., Klein, G., Moss, A.J., Myerburg, R.J., et al. 2006. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114:e385-484.
6. Myerburg, R.J. 2001. Sudden cardiac death: exploring the limits of our knowledge. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:369-381.
7. Basso, C., Carturan, E., Pilichou, K., Rizzo, S., Corrado, D., and Thiene, G. 2010. Sudden cardiac death with normal heart: molecular autopsy. *Cardiovasc Pathol* 19:321-325.
8. Krous, H.F., Beckwith, J.B., Byard, R.W., Rognum, T.O., Bajanowski, T., Corey, T., Cutz, E., Hanzlick, R., Keens, T.G., and Mitchell, E.A. 2004. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114:234-238.

9. Myerburg, R.J., and Castellanos, A. 2006. Emerging paradigms of the epidemiology and demographics of sudden cardiac arrest. *Heart Rhythm* 3:235-239.
10. Andresen, D. 2005. Epidemiologie des akuten Herz-Kreislaufstillstandes. *Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie* 16:73-77.
11. Goldberger, J.J., Cain, M.E., Hohnloser, S.H., Kadish, A.H., Knight, B.P., Lauer, M.S., Maron, B.J., Page, R.L., Passman, R.S., Siscovick, D., et al. 2008. American Heart Association/american College of Cardiology Foundation/heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. *Heart Rhythm* 5:e1-21.
12. Chugh, S.S., Reinier, K., Teodorescu, C., Evanado, A., Kehr, E., Al Samara, M., Mariani, R., Gunson, K., and Jui, J. 2008. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis* 51:213-228.
13. Schmidt, R.F., Lang, F., and Thews, G. 2005. *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 554-602 pp.
14. Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 47:658-687.
15. Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Lancaster, M.K., Jones, S.A., Honjo, H., and Kodama, I. 2003. Sophisticated architecture is required for the sinoatrial node to perform its normal pacemaker function. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:104-106.
16. Joyner, R.W., and van Capelle, F.J. 1986. Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophys J* 50:1157-1164.
17. Silbernagl, S., and Despopoulos, A. 2003. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 186-222 pp.
18. Pschyrembel, W. 2007. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.

19. Dobrzynski, H., Boyett, M.R., and Anderson, R.H. 2007. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* 115:1921-1932.
20. Mangrum, J.M., and DiMarco, J.P. 2000. The evaluation and management of bradycardia. *N Engl J Med* 342:703-709.
21. Wahls, S.A. 1985. Sick sinus syndrome. *Am Fam Physician* 31:117-124.
22. Bigger, J.T., Jr., and Reiffel, J.A. 1979. Sick sinus syndrome. *Annu Rev Med* 30:91-118.
23. Lamas, G.A., Lee, K., Sweeney, M., Leon, A., Yee, R., Ellenbogen, K., Greer, S., Wilber, D., Silverman, R., Marinchak, R., et al. 2000. The mode selection trial (MOST) in sinus node dysfunction: design, rationale, and baseline characteristics of the first 1000 patients. *Am Heart J* 140:541-551.
24. Gregoratos, G., Abrams, J., Epstein, A.E., Freedman, R.A., Hayes, D.L., Hlatky, M.A., Kerber, R.E., Naccarelli, G.V., Schoenfeld, M.H., Silka, M.J., et al. 2002. ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/NASPE Committee to Update the 1998 Pacemaker Guidelines). *J Am Coll Cardiol* 40:1703-1719.
25. Hedley, P.L., Jorgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P.A., Kanters, J.K., Corfield, V.A., and Christiansen, M. 2009. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* 30:1486-1511.
26. Brenyo, A.J., Huang, D.T., and Aktas, M.K. 2012. Congenital long and short QT syndromes. *Cardiology* 122:237-247.
27. Priori, S.G., Napolitano, C., and Schwartz, P.J. 1999. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 99:529-533.
28. Brand, T. 2005. The Popeye domain-containing gene family. *Cell Biochem Biophys* 43:95-103.

29. Osler, M.E., Smith, T.K., and Bader, D.M. 2006. Bves, a member of the Popeye domain-containing gene family. *Dev Dyn* 235:586-593.
30. Reese, D.E., Zavaljevski, M., Streiff, N.L., and Bader, D. 1999. bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev Biol* 209:159-171.
31. Wada, A.M., Reese, D.E., and Bader, D.M. 2001. Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development* 128:2085-2093.
32. Osler, M.E., Chang, M.S., and Bader, D.M. 2005. Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci* 118:4667-4678.
33. Kirchmaier, B.C., Poon, K.L., Schwerte, T., Huisken, J., Winkler, C., Jungblut, B., Stainier, D.Y., and Brand, T. 2012. The Popeye domain containing 2 (popdc2) gene in zebrafish is required for heart and skeletal muscle development. *Dev Biol* 363:438-450.
34. Breher, S.S., Mavridou, E., Brenneis, C., Froese, A., Arnold, H.H., and Brand, T. 2004. Popeye domain containing gene 2 (Popdc2) is a myocyte-specific differentiation marker during chick heart development. *Dev Dyn* 229:695-702.
35. Andree, B., Hillemann, T., Kessler-Icekson, G., Schmitt-John, T., Jockusch, H., Arnold, H.H., and Brand, T. 2000. Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev Biol* 223:371-382.
36. Andree, B., Fleige, A., Arnold, H.H., and Brand, T. 2002. Mouse Pop1 is required for muscle regeneration in adult skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 22:1504-1512.
37. Hitz, M.P., Pandur, P., Brand, T., and Kuhl, M. 2002. Cardiac specific expression of Xenopus Popeye-1. *Mech Dev* 115:123-126.
38. DiAngelo, J.R., Vasavada, T.K., Cain, W., and Duncan, M.K. 2001. Production of monoclonal antibodies against chicken Pop1 (BVES). *Hybrid Hybridomics* 20:377-381.

39. Knight, R.F., Bader, D.M., and Backstrom, J.R. 2003. Membrane topology of Bves/Pop1A, a cell adhesion molecule that displays dynamic changes in cellular distribution during development. *J Biol Chem* 278:32872-32879.
40. Gingold-Belfer, R., Bergman, M., Alcalay, Y., Schlesinger, H., Aravot, D., Berman, M., Salman, H., Brand, T., and Kessler-Icekson, G. 2011. Popeye domain-containing 1 is down-regulated in failing human hearts. *Int J Mol Med* 27:25-31.
41. Froese, A., and Brand, T. 2008. Expression pattern of Popdc2 during mouse embryogenesis and in the adult. *Dev Dyn* 237:780-787.
42. Froese, A., Breher, S.S., Waldeyer, C., Schindler, R.F., Nikolaev, V.O., Rinne, S., Wischmeyer, E., Schlueter, J., Becher, J., Simrick, S., et al. 2012. Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *J Clin Invest*.
43. Boukens, B.J., and Christoffels, V.M. 2012. Popeye proteins: muscle for the aging sinus node. *J Clin Invest* 122:810-813.
44. German mouse clinic. <http://www.mouseclinic.de/phenomap/phenomap.html>, abgerufen am 28.11.2012.
45. Andree, B., Fleige, A., Hillemann, T., Arnold, H.H., Kessler-Icekson, G., and Brand, T. 2002. Molecular and functional analysis of Popeye genes: A novel family of transmembrane proteins preferentially expressed in heart and skeletal muscle. *Exp Clin Cardiol* 7:99-103.
46. Chu, D.K., Jordan, M.C., Kim, J.K., Couto, M.A., and Roos, K.P. 2006. Comparing isoflurane with tribromoethanol anesthesia for echocardiographic phenotyping of transgenic mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 45:8-13.
47. Koller ML, R.O., Bauer WR. 2005. Grundlagen der Elektrophysiologie und Ablation, Teil 1: Diagnostik. *Kardiologie Assistenz* 1:5.
48. Mitrani, R.D., Miles, W.M., Klein, L.S., and Zipes, D.P. 1998. Phenylephrine increases T wave shock energy required to induce ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9:34-40.

49. Berul, C.I. 2003. Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol Genomics* 13:207-216.
50. Berul, C.I., Aronovitz, M.J., Wang, P.J., and Mendelsohn, M.E. 1996. In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation* 94:2641-2648.
51. Dhein S, M.F., Delmar M. 2005. Practical Methods in Cardiovascular Research. 2:18.
52. Mitchell, G.F., Jeron, A., and Koren, G. 1998. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274:H747-751.
53. Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., Roden, D.M., Passier, R., Olson, E.N., Colbran, R.J., et al. 2002. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 106:1288-1293.
54. Battey, J., Jordan, E., Cox, D., and Dove, W. 1999. An action plan for mouse genomics. *Nat Genet* 21:73-75.
55. Schaper, W., and Winkler, B. 1998. Of mice and men--the future of cardiovascular research in the molecular era. *Cardiovasc Res* 39:3-7.
56. Wang, L., and Duff, H.J. 1997. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circ Res* 81:120-127.
57. Aranega, A., De La Rosa, A.J., and Franco, D. 2012. Cardiac conduction system anomalies and sudden cardiac death: insights from murine models. *Front Physiol* 3:211.
58. Binah, O., Arieli, R., Beck, R., Rosen, M.R., and Palti, Y. 1987. Ventricular electrophysiological properties: is interspecies variability related to thyroid state? *Am J Physiol* 252:H1265-1274.
59. Wakimoto, H., Maguire, C.T., Kovoov, P., Hammer, P.E., Gehrman, J., Tiedman, J.K., and Berul, C.I. 2001. Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res* 50:463-473.
60. Fisher, J.D., Kim, S.G., Ferrick, K.J., Artoul, S.G., Fink, D., Roth, J.A., Johnston, D.R., and Williams, H.R. 1992. Programmed electrical stimulation of the ventricle: an efficient, sensitive, and specific protocol. *Pacing Clin Electrophysiol* 15:435-450.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Maier danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Übernahme des Referates. Weiterhin danke ich ihm für die stets zugewandte kompetente und ausdauernde Betreuung und Hilfe.

Herrn Dr. med. Jan Becher und Frau Dr. med. Susann Kaufmann danke ich ebenfalls für Ihre großartige Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung, Korrektur und Fertigstellung der Dissertation.

Herrn Marco Abeßer, der dank seiner technischen Begabung und seines Fingerspitzengefühls eine Lösung für fast jedes Problem hatte, danke ich besonders für die Einarbeitung im Labor und die immer freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Bei Frau Dr. rer. nat. Diana Tichy möchte ich mich herzlich für statistische Auswertung und Hilfe bei deren Interpretation bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Frau PD Dr. med. Delia Lorenz für das aufmerksame Lesen dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik.

Zum Schluss gilt mein Dank all denjenigen, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und mir aufmunternd zur Seite gestanden haben – hier vor allen Dingen meiner kleinen und großen Familie.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname van Elten, Elisabeth

Geburtsdatum, -ort 06.08.1984, Köln

Hochschulausbildung

Oktober 2004 bis November 2011 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Approbation

November 2011 erteilt durch die Regierung von Unterfranken

Facharztausbildung

Seit April 2012 Assistenzärztin der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, im Februar 2014

Elisabeth van Elten