

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl



**Kardialer Phänotyp und SUDEP durch Knockout des
Na_v1.1-Kanalgens (SCN1A) in einem Dravet-Mausmodell**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Leonhard Kaiser

aus Würzburg

Würzburg, September 2016

Referent: Professor Dr. med. S. Maier
Koreferent: Professor Dr. med. K. Schuh
Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2018

Der Promovend ist Arzt

Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
Nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832)

MEINEN LIEBSTEN IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 KARDIALE EXZITATION UND KONDUKTION	9
1.1.1 Complexus stimulans und Systema conductente cordis.....	9
1.1.2 Kardiales Aktionspotential	11
1.2 SPANNUNGSABHÄNGIGE NATRIUMKANÄLE.....	13
1.2.1 Struktur und Topologie.....	14
1.2.2 Isoformen mit Lokalisation und Funktion.....	17
1.3 IONENKANALOPATHIEN	22
1.3.1 Spektrum der Natriumkanalopathien.....	23
1.3.2 Scn1a Mutation und Dravet-Syndrom.....	24
1.4 FRAGESTELLUNG UND INTENTION DIESER ARBEIT	27
2 MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 TRANSGENES MAUSMODELL.....	28
2.1.1 Scn1a-Knockout.....	28
2.1.2 Genotypisierung via PCR	30
2.2 ELEKTROKARDIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG (EKG RUHE/STRESS)	34
2.2.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software.....	35
2.2.2 Narkose mittels 2,2,2 Tribromethanol.....	35
2.2.3 Datenakquisition und -analyse	36
2.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG (EPU).....	39
2.3.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software.....	39
2.3.2 Narkose mittels Isofluran.....	40
2.3.3 Operatives Prozedere/Vorgehen	41
2.3.4 Datenakquisition und -analyse.....	43
2.3.5 EPU-Protokolle	45
2.4 HYPERTHERMIE-VERSUCHE (EKG/EPU)	53
2.4.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software.....	54
2.4.2 Narkose mittels Isofluran.....	54

2.4.3	Datenakquisition und –analyse	54
2.5	ARRHYTHMIE-SCORE	55
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	57
3	ERGEBNISSE	59
3.1	EKG.....	59
3.1.1	Ruhe-EKG	59
3.1.2	Stress-EKG unter Isoproterenolstimulation.....	61
3.2	EPU.....	63
3.2.1	Basisparameter	63
3.2.2	Arrhythmiescore.....	66
3.2.3	Quantität und Arrhythmiesamples	68
3.3	HYPERTHERMIE-VERSUCHE.....	75
3.3.1	EKG-Teil Hyperthermie-Versuche	76
3.3.1.1	<i>Ruhe-EKG</i>	76
3.3.1.2	<i>Stress-EKG unter Hyperthermie</i>	77
3.3.2	EPU-Teil Hyperthermie-Versuche.....	79
3.3.2.1	<i>Basisparameter Hyperthermie-Versuche</i>	79
3.3.2.2	<i>Arrhythmiescore (Ruhe und Hyperthermie)</i>	81
3.3.2.3	<i>Quantität und Arrhythmiesamples</i>	85
3.4	ARRHYTHMIESCORE.....	91
4	DISKUSSION	94
4.1	METHODISCHE ASPEKTE.....	94
4.1.1	Mausstamm, Alter und Stichprobenumfang	95
4.1.2	Perioperatives Setting.....	98
4.1.3	Extrapolation des Mausmodells	100
4.2	INHALTLICHE ASPEKTE.....	101
4.2.1	EKG-Parameter	101
4.2.2	EPU und Arrhythmogenität	106
4.3	BEDEUTUNG DER STUDIE UND AUSBLICK.....	111
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
	LITERATURVERZEICHNIS.....	114
	APPENDIX.....	128
	DANKSAGUNG	132
	CURRICULUM VITAE.....	134
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Nukleinbase Adenin
Abb	Abbildung
AFI	Atrial Fibrillation Induction (Stimulationsprotokoll)
bp	Basenpaare
bpm	Beats per minute
C	Nukleinbase Cytosin
Ca ²⁺	Calcium Kation
CURE	Citizens United for Research in Epilepsy
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinacid
DS	Dravet-Syndrom
DSF	Dravet Syndrome Foundation
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
for	forward Primer
G	Nukleinbase Guanin
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
h	Stunde
HET	Heterozygote Knockout-Maus (entspricht Genotyp Scn ^{+/-})
HR	Heart rate
i. p.	Intraperitoneal
Iso	Isoproterenol
K ⁺	Kalium Kation
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Knoll _{A/V}	Stimulationsprotokolle nach Knollmann (atrial/ventricular)
KO	Knockout
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

ms	Millisekunde
Na ⁺	Natrium Kation
Na _v	Natriumkanal, voltage gated
nM	Nanomolar
OD	Outside Diameter
PCR	Polymerase chain reaction
P _{dur}	P-duration
PP	PP-Abstand
PR	PR-Abstand
P _x	Tag x postnatal
QT	QT-Zeit
QT _B	QT-Zeit korrigiert nach Bazett
QT _F	QT-Zeit korrigiert nach Fridericia
rev	reverse Primer
rpm	Rounds per minute
RR	RR-Abstand
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit
SD	Standard deviation
sek	Sekunde
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome (Plötzlicher Kindstod)
SMEI	severe myoclonic epilepsy in infancy
SNRT	Sinus node recovery time
SUDEP	Sudden unexpected death in epilepsy
T	Nukleinbase Thymin
Tab	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	2,2,2-Tribromethanol (Avertin®)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VFI	Ventricular Fibrillation Induction (Stimulationsprotokoll)
VST	Ventrikelschnelltest (Stimulationsprotokoll)
W	Watt
WBP	Wenckebachpunkt
WBT	Wenckebachtest
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Nav _v -Isoformen mit assoziierten Kanalopathien.....	24
Tab. 2: Primersequenzen.....	31
Tab. 3: PCR-Mastermix Pipettierschema	32
Tab. 4: PCR-Protokoll des Thermocyclers.....	33
Tab. 5: Parameter der EKG Auswertung.....	38
Tab. 6: Arrhythmie-Score	56
Tab. 7: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen.	59
Tab. 8: Stress-EKG-Parameter unter Isoproterenolstimulation	61
Tab. 9: Basisparameter EPU	64
Tab. 10: Arrhythmiescore-Verteilung EPU.....	66
Tab. 11: Arrhythmiescore EPU.....	67
Tab. 12: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen (Hyperthermie-Versuch).....	76
Tab. 13: Stress-EKG-Parameter unter Hyperthermie von 39,5 °C	77
Tab. 14: Basisparameter EPU-Teil Hyperthermie-Versuche.....	80
Tab. 15: Arrhythmiescore-Verteilung Hyperthermietest.....	82
Tab. 16: Arrhythmiescore Hyperthermietest in Ruhe	83
Tab. 17: Arrhythmiescore Hyperthermietest unter Hyperthermie	84
Tab. 18: Arrhythmiescore-Verteilung EPU und Hyperthermietest gesamt.....	91
Tab. 19: Arrhythmiescore EPU und Hyperthermietest gesamt.....	92
Tab. 20: PCR-Materialien und Chemikalien	128
Tab. 21: Inhalt DNeasy® Blood & Tissue Kit.....	129
Tab. 22: Chemikalien und Laborbedarf EKG.....	129
Tab. 23: Software/Hardware EKG.....	130
Tab. 24: Chemikalien und Laborbedarf EPU	130
Tab. 25: Software/Hardware EPU.....	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erregungsbildungs- und Leitungssystem am Herzen	10
Abb. 2: Kardiales Aktionspotential	13
Abb. 3: Membrantopologie eines Na _v -Kanals	15
Abb. 4: Schaltverhalten eines Na _v -Kanals	16
Abb. 5: Quantitative Analyse der Na _v -Isoformen in ventrikulären Myozyten	19
Abb. 6: Elektronenmikroskopische Ultrastruktur eines Kardiomyozyten.....	20
Abb. 7: Immunlokalisation der Na _v -Isoformen in murinen Ventrikelmyozyten	22
Abb. 8: Kontinuum der Na _v 1.1-Kanalopathien.....	25
Abb. 9: Überleben der Scn-Mutanten.....	29
Abb. 10: Versuchstieralter	30
Abb. 11: PCR-Marker.....	32
Abb. 12: UV-Fotodokumentation der PCR	34
Abb. 13: Auswertungsintervalle Ruhe- und Stress-EKG	37
Abb. 14: EKG-Parameter.....	38
Abb. 15: EPU-Arbeitsplatz	41
Abb. 16: EPU-Katheterisierung	43
Abb. 17: EPU-Katheter.....	44
Abb. 18: Intrakardiale Lage des EPU-Katheters.....	45
Abb. 19: Sinusknotenerholzeit (SNRT).....	47
Abb. 20: Wenckebachtest	49
Abb. 21: Programmierte Vorhofstimulation (Knollmann _A)	50
Abb. 22: Burst-Stimulation AFI.....	51
Abb. 23: Ventrikelschnelltest VST	53
Abb. 24: Arrhythmiescore	57
Abb. 25: EKG-Parameter Ruhebedingungen.....	61
Abb. 26: EKG-Parameter unter Isoproterenolstimulation.....	63
Abb. 27: Basisparameter EPU	65
Abb. 28: Quantität der Arrhythmieformen	68
Abb. 29: Supraventrikuläre Extrasystole (SVES) bei einer HET-Maus	69
Abb. 30: Zwei ventrikuläre Extrasystolen (VES) bei einer HET-Maus.....	69
Abb. 31: Ventrikuläres Couplet bei einer HET-Maus.....	70
Abb. 32: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT).....	70
Abb. 33: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) bei einer HET-Maus	71
Abb. 34: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) für 1,5 Minuten einer HET-Maus.....	72
Abb. 35: Absolute Arrhythmie mit intermitt. AV-Block bei einer HET-Maus.....	73
Abb. 36: Intermittierender AV-Block bei einer HET-Maus.....	73
Abb. 37: Ventrikuläres Triplet nach Stimulation bei einer WT-Maus.....	74

Abb. 38: Ventrikuläres Triplet im stimulusfreien Intervall bei einer HET-Maus.....	74
Abb. 39: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT) einer HET Maus.....	75
Abb. 40: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen (Hyperthermie-Versuch).....	77
Abb. 41: Stress-EKG-Parameter unter Hyperthermie.....	79
Abb. 42: Basisparameter EPU-Teil Hyperthermie-Versuche.....	81
Abb. 43: Quantität der Arrhythmieformen unter Ruhe und Hyperthermie.....	85
Abb. 44: Supraventrikuläre Extrasystole (SVES) bei einer HET-Maus.....	87
Abb. 45: Ventrikuläre Extrasystole (VES) bei einer HET-Maus.....	87
Abb. 46: Intermittierender ventr. Bigeminus einer HET-Maus nach Stimulation.....	88
Abb. 47: Intermittierender ventrikulärer Bigeminus bei einer HET-Maus.....	88
Abb. 48: Ventrikuläres Couplet bei einer HET-Maus.....	89
Abb. 49: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) bei einer HET-Maus.....	89
Abb. 50: Ventrikuläres Triplet bei einer HET-Maus.....	90
Abb. 51: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT) bei einer HET-Maus (1) .	90
Abb. 52: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT) bei einer HET-Maus (2) .	91

1 Einleitung

SUDEP – dieses Akronym steht für den plötzlichen und unerwarteten Epilepsietod. Ein derartiger dramatischer Vorfall findet sich in der frühen US-amerikanischen Geschichte:

„She rose from Dinner about four Oclock [sic!], in better health and spirits than she appeared to have been in for some time; soon after which she was siezd [sic!] with one of her usual Fits, & expired in it, in less than two Minutes without uttering a Word, a groan, or scarce a Sigh. This Sudden, and unexpected blow, I scarce need add has almost reduced my poor Wife to the lowest ebb of Misery“ (Washington, 1773 zit. in Jackson und Twohig, 1978, S. 188).

Mit diesen Worten bedauert George Washington den plötzlichen Tod seiner an Epilepsie erkrankten Stieftochter im Alter von 17 Jahren (DeToledo et al., 1999; Surges et al., 2009). Ihr plötzlicher und unerwarteter Tod im Zusammenhang mit einem epileptischen Anfall im Jahre 1773 kann als einer der ersten gut dokumentierten Fälle von SUDEP (*sudden unexpected death in epilepsy*) gesehen werden (Doherty, 2004).

Doch was ist SUDEP genau? Es ist definiert als unerwarteter, beobachteter oder auch unbeobachteter, nicht trauma- oder ertrinkungsbedingter Tod eines Epilepsiepatienten mit oder ohne direkten Zusammenhang eines Anfalls, jedoch unter Ausschluss der Maximalvariante eines epileptischen Anfalls, des *Status epilepticus* (Nashef, 1997; Nashef et al., 2012). Zu den Kriterien gehört weiter das Fehlen eines Autopsiebefundes hinsichtlich einer toxikologischen oder anatomischen Todesursache (Nashef, 1997). Unter mindestens 50 Millionen Menschen weltweit, welche an einer Epilepsieerkrankung leiden (Scorza et al., 2012), ist SUDEP wohl als die häufigste Todesursache anzusehen (Surges et al., 2009; Bateman et al., 2010; Surges und Sander, 2012). Besonders hoch ist das Mortalitätsrisiko sowohl bei Patienten während der Adoleszenz als auch bei Patienten mit einem langjährigen, therapierefraktären Leiden (Tomson et al., 2005; Tomson et al., 2008; Surges und Sander, 2012). Das hohe Risiko ist bei diesen Epilepsiepatienten auf bis zu 24-fach gesteigert und nicht nur deshalb ein bedeutendes und forschungsrelevantes Ereignis (Ficker et al., 1998; Surges und Sander, 2012). Doch was ist die Ursache für den plötzlichen und unerwarteten Tod? Nach jahrzehntelanger Forschung besteht kein einheitlicher Konsens über zugrundeliegende Pathomechanismen. Kontrovers wird unter anderem diskutiert, ob kardiale,

respiratorische, neuronale oder metabolische Aspekte dazu beitragen, oder womöglich eine Verkettung dieser Gesichtspunkte maßgeblich ist. Die vermuteten Mechanismen reichen dabei von iktaler Hypoxämie oder Hyperkapnie, respiratorischem Arrest durch zentrale Apnoe oder peripherer Obstruktion, über autonome Dysregulation und neurogenem Lungenödem bis hin zu Dysregulationen in Katecholamin-, pH- oder Elektrolythaushalt (Surges et al., 2009; Bateman et al., 2010; Surges et al., 2010a; Velagapudi et al., 2012; Seyal, 2015). Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung von SUDEP unter Beleuchtung der potentiellen kardialen Ätiologie durch Arrhythmie oder Asystolie liefern.

1.1 Kardiale Exzitation und Konduktion

Zur Einordnung der Thematik in den kardiologischen Kontext ist zunächst ein kurzer Abriss über die kardiale Erregung sinnvoll.

1.1.1 Complexus stimulans und Systema conductente cordis

Mehr als zwei Milliarden Mal schlägt das menschliche Herz rhythmisch während einer gewöhnlichen Lebensspanne (Chen et al., 2010). Doch was passiert, wenn das System einmal aus dem Takt gerät? Grundlage jedes einzelnen Herzschlages ist die Initiation einer Erregung auf zellulärer Ebene und ihre koordinierte Weiterleitung bis zur Kontraktion des gesamten Herzmuskels. Diese Aufgabe wird von dem Erregungsbildungssystem (*Complexus stimulans*) und dem Erregungsleitungssystem (*Systema conductente cordis*) übernommen (Abb. 1). Es handelt sich dabei um eine Ansammlung von spezialisierten Herzmuskelzellen, nicht etwa um Nervenzellen (Benninghoff und Drenckhahn, 2003; Schmidt et al., 2005). Das System lässt sich anatomisch in vier hierarchisch gegliederte Abschnitte unterteilen: Sinusknotenareal, Atrioventrikularknoten, Atrioventrikularbündel sowie Kammerschenkel mit Purkinje-Fasern (Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Das Sinusknotenareal (*Nodus sinuatrialis*) repräsentiert den Sitz des primären Schrittmacherzentrums im *Sulcus terminalis* des rechten Vorhofs an dem Mündungsbereich der oberen Hohlvene (*Vena cava superior*). Von hier aus gelangt der Schrittmacherimpuls über das Vorhofmyokard zu dem AV-Knoten (*Nodus atrioventricularis*, Aschoff-Tawara-Knoten) im Bereich des Koch-Dreiecks am Rand des

septalen Trikuspidalsegels. Nach einer gewissen zeitlichen Leitungsverzögerung zur adäquaten Füllung der Ventrikel gelangt der Impuls über die einzige elektrische Leitstruktur zwischen Vorhof und Ventrikel, dem Atrioventrikularbündel (*Truncus fasciculi atrioventricularis*, HIS-Bündel), zu den beiden Kammerschenkeln (Tawara-Schenkel). Der linke Tawara-Schenkel zweigt dabei nahezu senkrecht aus dem HIS-Bündel ab und unterteilt sich anschließend in einen anterioren, mittleren und posterioren Faszikel, während der rechte Tawara-Schenkel im Ventrikelseptum weiter herzsitzenwärts zieht (Benninghoff und Drenckhahn, 2003; Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Über das terminale Netzwerk der Purkinje-Fasern gelangt der Impuls schließlich an das Ventrikelmyokard, das als funktionelles Synzytium wirkt und die Erregung von der Herzspitze aus in Richtung Herzbasis fortleitet, um einen effektiven Blutauswurf in den kleinen sowie großen Kreislauf zu gewährleisten (Benninghoff und Drenckhahn, 2004; Schmidt et al., 2005).

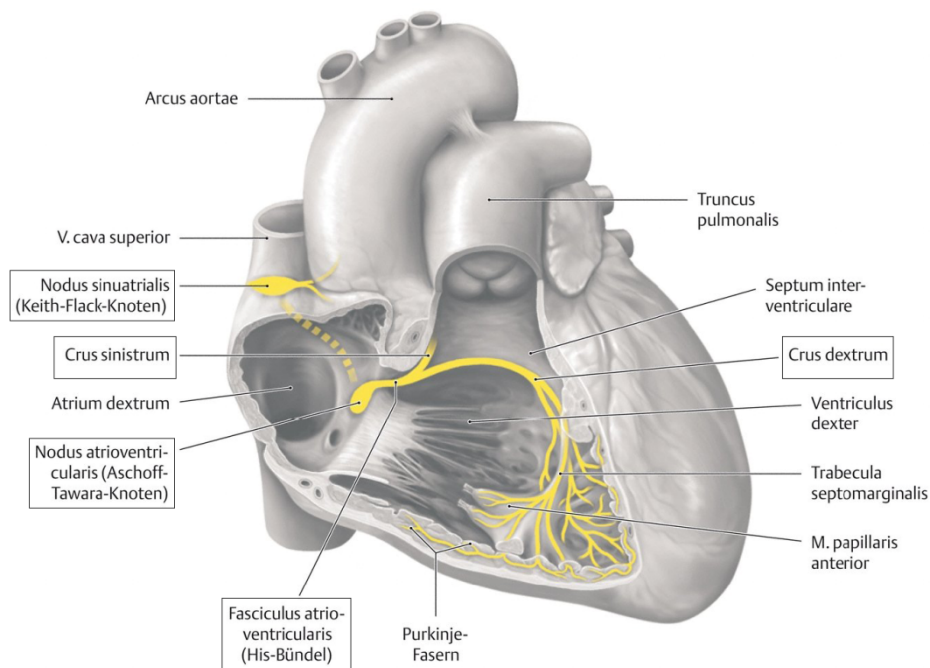


Abb. 1: Erregungsbildungs- und Leitungssystem am Herzen

Sicht in rechten Vorhof und rechte Kammer mit skizziertem Sinusknoten (primäres Schrittmacherzentrum), AV-Knoten (sekundäres Schrittmacherzentrum) und HIS-Bündel mit linkem und rechtem Tawara-Schenkel (Crus sinistrum et dextrum) als tertiäres Schrittmacherzentrum; nach (Schünke et al., 2005)

Ort der Entstehung des elektrischen Impulses ist das hierarchisch aufgebaute Schrittmachersystem. Unter physiologischen Bedingungen wird der Herzschlag durch den primären Schrittmacher des Sinusknotenareals initiiert. Bei dessen Ausfall sind auch

AV-Knoten als sekundäres sowie HIS-Tawara-System als tertiäres Zentrum zur Schrittmacheraktivität fähig. Während die Ruhefrequenz des primären Schrittmachers bei 60-80 bpm liegt, erfolgt der Schrittmacherersatz der subsidiären Zentren mit reduzierter Eigenfrequenz von 40-50 bpm im sekundären beziehungsweise 30-40 bpm im tertiären Schrittmacherzentrum (Schmidt et al., 2005).

1.1.2 Kardiales Aktionspotential

Das Aktionspotential am Herzen lässt sich in zwei grundlegend verschiedene Formen unterteilen: das Aktionspotential einer Herzschrirrmacherzelle und das einer Herzmuskelzelle. Allen Schrittmacherzellen sind einige Eigenschaften gemeinsam, die sie vom Arbeitsmyokard abgrenzen. Neben histologischen Besonderheiten wie Myofibrillenarmut ist dies vor allem die Fähigkeit zur Automatie der Herzschlaginitiation, die sogenannte intrinsische Aktivität (Benninghoff und Drenckhahn, 2003). Grundlage hierfür ist das Fehlen eines stabilen Ruhemembranpotentials und somit der Hang zur Spontandepolarisation der Schrittmacherzellen. Diese Fähigkeit wird durch differenzierte Expression von Ionenkanälen in den unterschiedlichen Zelltypen erreicht (Marionneau et al., 2005). Im menschlichen Herzen wurde bereits die Expression von mehr als 70 verschiedenen Kanälen und kanalverwandten Genen identifiziert (Marionneau et al., 2005), auf die im Folgenden allerdings nur bedingt eingegangen werden kann. Transmembranäre Ionenströme über Ionenkanäle sind generell bei der Entstehung von Potentialen an biologischen Membranen maßgeblich beteiligt (Surges et al., 2010b). Bei einer Schrittmacherzelle liegt das maximale diastolische Potential bei etwa -60 mV und ist damit deutlich weniger negativ als das Potential des Arbeitsmyokards bei etwa -90 mV (Boyett, 2009). Während das Myokard ein stabiles Ruhemembranpotential aufweist, das überwiegend durch den Ausstrom von K^+ -Ionen in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials strebt, tendiert das Schrittmacherpotential zu spontaner Depolarisation. Verantwortlich hierfür ist der Schrittmacherstrom I_f über HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*). Diese Kanäle beschreiben unspezifische Kationenkanäle, die aufgrund ihrer unkonventionellen Aktivierung während der Hyperpolarisation der Zellmembran bei ihrer Entdeckung auch *funny channel* genannt wurden (Larsson, 2010). Durch diesen Ionenstrom sowie dem Strom über Calciumkanäle vom T-Typ wird die Membran der Schrittmacherzelle

langsam in Richtung des Schwellenpotentials bei etwa -40 mV depolarisiert. Auch dem intrazellulären Ca^{2+} -Strom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum sowie der Reduzierung potentialstabilisierender K^+ -Ströme ($I_{\text{K}1}$) werden Anteile der spontanen Depolarisation zugesprochen (Chen et al., 2010; Larsson, 2010). Ist das Schwellenpotential erreicht, entsteht ein Aktionspotential, das zur Fortleitung über das Herzleitungssystem fähig ist. Im Gegensatz zu dem steilen Aufstrich des Aktionspotentials (Phase 0) des Arbeitsmyokards, welcher durch den schnellen Na^+ -Einstrom (I_{Na}) ermöglicht wird, ist der Aufstrich einer Schrittmacherzelle deutlich flacher (Abb. 2). Der flachere Aufstrich und die damit verbundene geringere Depolarisationsgeschwindigkeit von etwa 10 V/s, verglichen mit ungefähr 100 V/s in der Arbeitsmyokardzelle, wird von dem trägen Ca^{2+} -Einstrom über Calciumkanäle vom L-Typ getragen (Boyett, 2009). Ein weiteres Charakteristikum des Aktionspotentials einer Schrittmacherzelle ist das Fehlen einer Plateauphase, die in der Arbeitsmuskulatur dafür sorgt, die elektromechanische Kopplung zur Kraftentwicklung zu gewährleisten. Die Membran wird also direkt nach dem *Overshoot* der Depolarisationsphase wieder repolarisiert. Dies erfolgt durch das Überwiegen von repolarisierenden K^+ -Auswärtsströmen nach Inaktivierung der depolarisierenden Kanäle. Damit befindet sich die Zellmembran nach gewisser Zeit wieder in repolarisiertem Zustand für den folgenden Zyklus mit dem Beginn spontaner Depolarisation. Welche funktionale Rolle Na^+ -Kanäle bei der Entstehung und Leitung der Erregung im menschlichen Herzen übernehmen, scheint bis dato nicht abschließend geklärt (Maier et al., 2003; Kaufmann et al., 2013). Allerdings wurden im Mausmodell eine verringerte Herzfrequenz sowie eine größere Herzfrequenzvariabilität beim selektiven Blockieren von Na^+ -Kanälen beobachtet, die für eine Beteiligung dieser Kanäle sprechen (Maier et al., 2003; Lei et al., 2004).

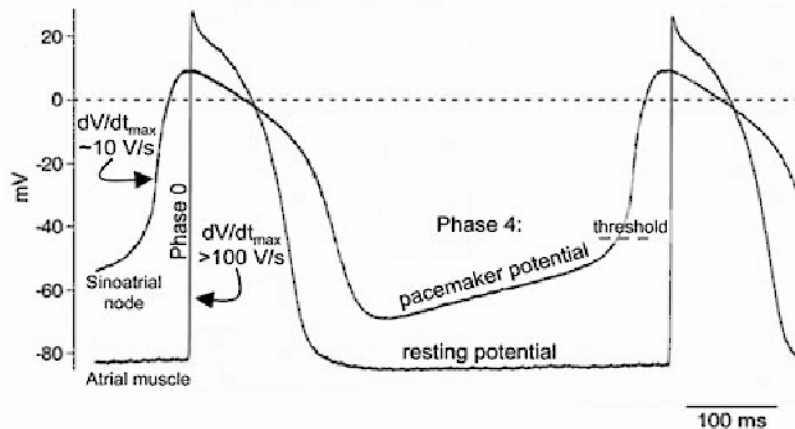


Abb. 2: Kardiales Aktionspotential

Überlagerung des Aktionspotentials einer Sinusknoten- und einer Myokardzelle. Zu beachten sind stabiles Ruhepotential (resting potential) und senkrechter Aufstrich (Na^+ -Einstrom) des Aktionspotentials im Arbeitsmyokard (Atrial muscle, 100 V/s) versus spontaner Depolarisation des Schrittmacherpotentials (pacemaker potential) mit anschließendem flacheren Aufstrich (Ca^{2+} -Einstrom) im Sinusknoten (Sinoatrial node, 10 V/s). Ebenfalls zu beachten ist das reduzierte maximal diastolische Potential von -60 mV im Sinusknoten versus Ruhepotential bei -90 mV im Arbeitsmyokard; nach (Boyett, 2009)

1.2 Spannungsabhängige Natriumkanäle

Den Durchtritt von Ionen durch die elektrisch isolierende Lipiddoppelschicht der Zellmembran ermöglichen Ionenkanäle, die als integrale Membranproteine den intrazellulären Raum mit dem extrazellulären Raum verbinden (Schmidt et al., 2005). Innerhalb der großen Gruppe der Ionenkanäle lassen sich Superfamilien nach Art ihrer Aktivierung unterteilen. Neben den ligandenaktivierten oder auch chemisch aktivierten Ionenkanälen besteht eine Vielzahl von über 140 Ionenkanälen, welche durch Änderung der Membranspannung aktiviert werden (Yu et al., 2005). Hierunter befindet sich die Familie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Na_v). Sie sorgen mit dem Strom von hydrophilen Ionen über die hydrophobe Zellmembran dafür, dass eine Signalübertragung in erregbarem Gewebe wie Herz- oder Skelettmuskulatur, neuronales Gewebe oder auch neuroendokrine Zellen stattfinden kann (Isom, 2001; George, 2005). Über elektrische Signale wird somit eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Muskelkontraktion, Hormonsekretion, neuronaler Informationsverarbeitung über intrazellulären Metabolismus bis hin zu Genexpression und Proteinsynthese ermöglicht (Catterall et al., 2007). Im Folgenden soll die Gruppe der Na_v -Kanäle näher betrachtet werden. Die Nomenklatur dieser Kanäle bezieht sich dabei auf das wesentliche permeable Ion Na^+ und setzt den physiologischen Regulator Spannung (*voltage gated*) in den tiefgestell-

ten Index (Na_v). Die folgende Ziffer Na_v1 indiziert die Gensubfamilie SCN. Verschiedene Isoformen des Kanals werden weiter durch eine zweite Ziffer wie zum Beispiel $\text{Na}_v1.1$ abgegrenzt (Goldin et al., 2000).

1.2.1 Struktur und Topologie

Spannungsabhängige Na^+ -Kanäle (Na_v) sind Glykoproteinkomplexe innerhalb der Zellmembran. Sie sind durch schnellen Na^+ -Einstrom für den initialen Aufstrich des Aktionspotentials in den meisten erregbaren Zellen verantwortlich (Isom, 2001; Catterall et al., 2005). Ihre heterotrimere Struktur besteht aus einer α -Untereinheit, welche die Kanalpore bildet, in Assoziation mit bis zu zwei verschiedenen auxiliären β -Untereinheiten (Meisler und Kearney, 2005; Catterall et al., 2007).

α -Untereinheit

Von den zehn identifizierten Genen, die α -Untereinheiten kodieren, wurden bislang neun funktionell exprimiert (Goldin et al., 2000; Kaufmann et al., 2013). Die α -Untereinheit besitzt eine atomare Masse von 220-260 kDa und bildet nicht nur die Ionenpore, sondern beinhaltet auch wichtige funktionale Elemente für ihre Selektivität, die Spannungssensorik und die Inaktivierung (Catterall et al., 2007). Sie wird in vier homologe Domänen (I-IV) mit jeweils sechs hydrophoben transmembranären Segmenten (S1-6) gegliedert (Abb. 3). Durch die dreidimensionale Tertiärstruktur der Proteindomänen bildet sich die selektive Ionenpore, ein wässriger Kanal, der den passiven Durchtritt von Na^+ -Ionen entlang ihres osmotischen Gradienten zulässt. Die Pore wird dabei von den Segmenten S5, S6 und einer sie verbindenden Schleife, dem sogenannten *P loop*, gebildet (Catterall et al., 2007). Der Selektivitätsfilter entsteht durch einen inneren und äußeren Ring über der extrazellulären Öffnung der Kanalpore. Diese Ringe bestehen aus geladenen Aminosäureresten der intersegmentalen Loops und interagieren mit den selektiv permeablen Na^+ -Ionen bei deren Durchtritt durch die Membran (Catterall, 2000).

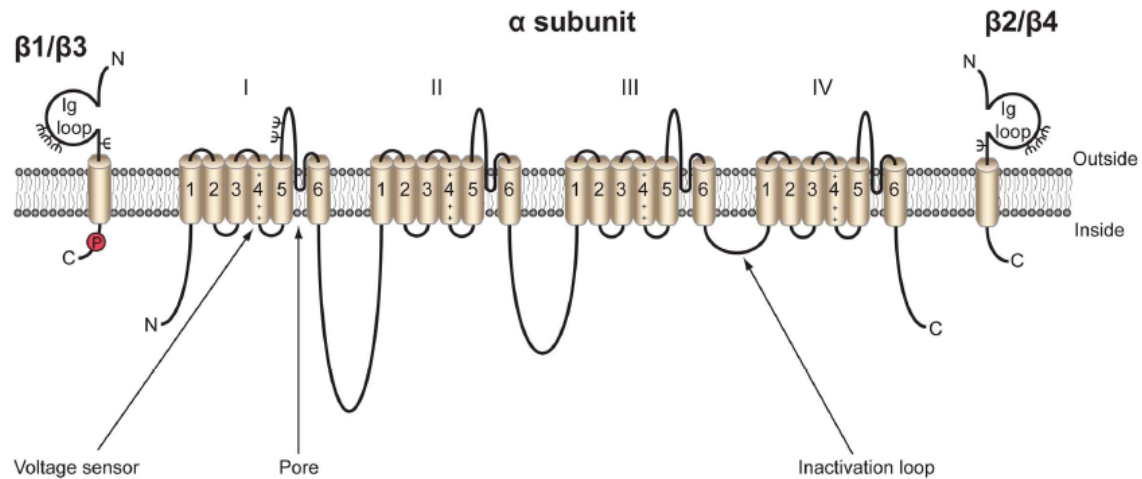


Abb. 3: Membrantopologie eines Na_v -Kanals

α -Untereinheit bestehend aus vier homologen Domänen (I-IV) mit jeweils sechs helicalen Transmembransegmenten (S1-6), Porenöffnung zwischen S5/6, Spannungssensor bei S4 mit +-markierter positiver Ladung, Inaktivierungsloop zwischen Domäne III und IV. Flankiert wird die α -Untereinheit von β -Untereinheiten mit singulärer transmembranärer Verankerung und extrazellulärem Ig-ähnlichem Loop; nach (Brackenbury und Isom, 2011)

Die Mechanismen des Öffnens und Schließens der Pore, das sogenannte *pore gating*, sind komplex. Hierbei ist wichtig, die verschiedenen Funktionsstadien des Natriumkanals zu betrachten. Es werden dabei drei verschiedene Schaltzustände postuliert (Schmidt et al., 2005). Der Kanal kann demnach geschlossen und aktivierbar, offen oder geschlossen und inaktiviert vorliegen (Abb. 4). Der im geschlossenen und aktivierbaren Zustand befindliche Kanal öffnet bei Spannungsänderung die Kanalpore für den Durchtritt von Na^+ -Ionen. Nach Millisekunden schließt sich die Pore allerdings wieder und versetzt den Kanal in einen geschlossenen und nicht aktivierbaren Zustand (Schmidt et al., 2005). Vor erneutem Öffnen muss der Kanal anschließend zunächst wieder in den aktivierbaren Zustand versetzt werden. Diese Rückführung in den aktivierbaren Zustand (*recovery from inactivation*) wird durch Repolarisation der Zellmembran erreicht (George, 2005). Wichtig für spannungsabhängiges Öffnen des Kanals ist der Spannungssensor in dem transmembranären Segment S4 (Stuhmer et al., 1989). Dieses funktionelle Element besteht aus einer α -helicalen Struktur mit überwiegend positiv geladenen Aminosäuren (Stuhmer et al., 1989). Im elektrischen Feld des Ruhemembranpotentials mit deutlich negativer Ladung auf zytosolischer Seite der Membran halten elektrische Kräfte diesen positiv geladenen Abschnitt in Richtung Zytosol zurück. Dadurch ist der Kanalzustand geschlossen (Catterall, 1986). Bei

Depolarisation schwinden diese elektrischen Anziehungskräfte und die positiv geladene α -Helix führt eine Art Auswärtsbewegung innerhalb der Membran durch. Diese Bewegung wurde mit verschiedenen Modellen wie *sliding helix* (Catterall, 1986) oder *helical screw* (Guy und Seetharamulu, 1986) beschrieben und führt demnach über eine Konformationsänderung der assoziierten Segmente S5 und S6 zum spannungsabhängigen Öffnen der Kanalpore (Catterall, 2000). Die Inaktivierung erfolgt innerhalb von Millisekunden. Dabei wird ein kurzer intrazellulärer Loop, der die Domänen III und IV verbindet, bei anhaltender Depolarisation ebenfalls spannungsabhängig in die innere Öffnung der Pore bewegt und verschließt diese somit (Catterall, 2000). Dieser spannungsabhängige Inaktivierungsvorgang wurde mit dem sogenannten *ball-and-chain model* beschrieben (Armstrong und Bezanilla, 1977; Armstrong und Hille, 1998) und veranschaulicht die Okklusion der inneren Pore durch eine Seitenkette des Kanalproteins bei Potentialänderung der Membran (Abb. 4).

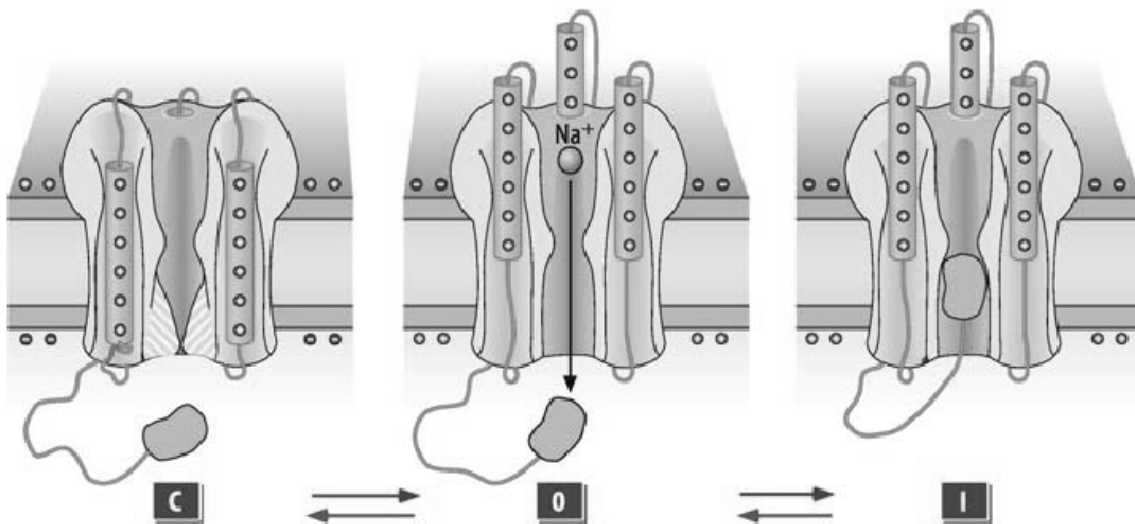


Abb. 4: Schaltverhalten eines Na_v-Kanals

Gezeigt sind die drei Funktionsformen: geschlossen und aktivierbar (C), offen (O), geschlossen und inaktiv (I). Auswärtsbewegung der Spannungssensoren bei Depolarisation führt zum Öffnen und folglich zum Na⁺-Einstrom (O); Blockade der inneren Porenöffnung bei anhaltender Depolarisation durch den Inaktivierungsloop führt bereits nach Millisekunden zum Schließen des Kanals (I); nach (Schmidt et al., 2005)

β-Untereinheit

Bislang wurden im Säugetiergenom vier Gene identifiziert, die für β -Untereinheiten des Na_v-Kanals kodieren – β 1, β 2, β 3 und β 4 (Brackenbury und Isom, 2011). Wie α -Untereinheiten sind auch sie Transmembranproteine. Allerdings besitzen sie im

Gegensatz zu ihnen nur eine einzige Transmembrandomäne, einen kurzen intrazellulären Carboxy-Terminus und eine singuläre extrazelluläre Schleife mit struktureller Ähnlichkeit zu Immunglobulinen (Isom, 2001; Meisler und Kearney, 2005) (Abb. 3). Eine fünfte β -Untereinheit, β 1B, stellt als alternative Splicevariante ein sekretorisches Protein dar, welchem im Unterschied zu den anderen Untereinheiten der n-terminale Teil zur transmembranären Verankerung fehlt (Brackenbury und Isom, 2011). Während β 2 und β 4 über Disulfidbrücken kovalent an die α -Untereinheit des Kanals binden, sind β 1 und β 3 nicht kovalent assoziiert (Yu et al., 2003; Brackenbury und Isom, 2011). Lange Zeit galten β -Untereinheiten als auxiliar oder akzessorisch, da sie kein strukturelles Element von Ionenpore, Spannungssensor oder Inaktivierungsloop darstellen. Zahlreiche Studien zeigen allerdings ihre Multifunktionalität. Sie tragen modulierend zu der Regulation und Kinetik des Na_v -Kanals bei (Isom et al., 1992; Isom et al., 1994; Malhotra et al., 2001; Yu et al., 2003) und sind weit darüber hinaus an Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Malhotra et al., 2000; Isom, 2001; Malhotra et al., 2001; Brackenbury und Isom, 2011). Sie regulieren das Level der Kanalexpression an der Zelloberfläche und die Kanallokalisierung in verschiedenem Gewebe (Isom et al., 1992; Isom, 2001; Malhotra et al., 2001; Kim et al., 2007). Gleichzeitig sind sie über Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen wie Tenascin-C und Tenascin-R sowie mit zytoskelettären Strukturen wie Ankyrin an Zelladhäsion und Zellaggregation beteiligt (Isom und Catterall, 1996; Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999; Malhotra et al., 2000; Isom, 2001; Malhotra et al., 2001). Auch Zellmigrationsvorgänge scheinen durch β -Untereinheiten beeinflusst zu werden und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen (Brackenbury und Isom, 2011).

1.2.2 Isoformen mit Lokalisation und Funktion

Na_v1 -Kanäle der SCN-Gensubfamilie lassen sich anhand ihrer genetischen Grundlage in neun spezifische Kanalisofomen, $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$, unterteilen (Catterall et al., 2005). Diese Isoformen haben unterschiedliche gewebespezifische Expressionsmuster, die auch während der Maturation des Gewebes mit unterschiedlicher Expression in neonatalen und adulten Zellen variieren (Scheinman et al., 1989; Maier et al., 2002; Lei et al., 2004; Kaufmann et al., 2010). Klassischerweise lassen sich die Isoformen in Na_v -Kanaltypen vom kardialen (*heart-type*) und neuronalen Typen (*brain-type*)

differenzieren. Während $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ und $\text{Na}_v1.6$ als brain-type Isoformen präferentiell in Neuronen des Zentralnervensystems vorkommen, mit unterschiedlicher Expression in Zellsoma oder Axon, stellt $\text{Na}_v1.5$ die sogenannte kardiale Isoform dar (Whitaker et al., 2000; Westenbroek et al., 2013). Darüber hinaus sind $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ sowie $\text{Na}_v1.9$ vorwiegend im peripheren Nervensystem wie somatosensorischen und teilweise sympathischen Nervenfasern zu finden (Catterall et al., 2008). $\text{Na}_v1.4$ ist dagegen die primäre Isoform des adulten Skelettmuskels (Goldin, 2001).

Tetrodotoxinsensibilität

Neben dem differentiellen Expressionsmuster unterscheiden sich Na_v -Kanäle auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften bezüglich des Tetrodotoxins (*TTX*). Tetrodotoxin, unter anderem das Gift der Familie der Kugelfische (*Tetraodontidae*) sowie einiger anderer Tiere wie Wassermolche (*Taricha*) oder Nabelschnecken (*Naticidae*), ist ein potentes Neurotoxin (Zakon, 2012). Durch die Inhibition von Natriumkanälen führt das Toxin zu neuromuskulärer Blockade und damit zu zentraler wie auch peripherer Atemlähmung. Sogenannte neuronale Na_v -Kanäle ($\text{Na}_v 1.1$, -1.2 , -1.3 , -1.6) werden bereits ab einer nanomolaren *TTX*-Konzentration ($\text{KD} \approx 1\text{-}10 \text{ nM}$) inhibiert und gelten somit als *TTX*-sensibel, wie auch der skelettmuskuläre Kanal $\text{Na}_v1.4$ (Maier et al., 2003). Dahingegen wird die sogenannte kardiale Isoform $\text{Na}_v1.5$ erst ab einer mikromolaren *TTX*-Konzentration ($\text{KD} \approx 2\text{-}6 \text{ }\mu\text{M}$), also eine um den Faktor 10^3 höhere Dosis, inhibiert und gilt damit als *TTX*-insensibel oder sogar -resistent (Maier et al., 2003; Maier et al., 2004; Westenbroek et al., 2013). Diese Resistenz beruht auf dem Austausch einer aromatischen Seitenkette der Toxinbindungsstelle innerhalb der Porenregion mit der Aminosäure Cystein, wodurch reduzierte Affinität gegenüber *TTX* erreicht wird (Satin et al., 1992; Fozzard und Hanck, 1996; Kaufmann et al., 2010).

Lokalisation und Funktion

Der sogenannte kardiale $\text{Na}_v1.5$ -Kanal stellt mit ungefähr 80% die prädominante Isoform des Herzens dar und ist für einen großen Anteil des kardialen Natriumstroms verantwortlich (Kaufmann et al., 2013; Westenbroek et al., 2013). Zahlreiche Studien konnten allerdings belegen, dass ebenso Natriumkanäle vom neuronalen Typ ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.6$) sowie der skelettmuskelspezifische Kanal $\text{Na}_v1.4$ in verschie-

denen Regionen des Herzens exprimiert werden, wodurch eine Partizipation an kardialen Funktionen nahe gelegt wurde (Malhotra et al., 2001; Maier et al., 2002; Maier et al., 2004; Ducholier, 2005; Marionneau et al., 2005; Tomson, 2008; Kaufmann et al., 2010; Kaufmann et al., 2013; Westenbroek et al., 2013) (Abb. 5).

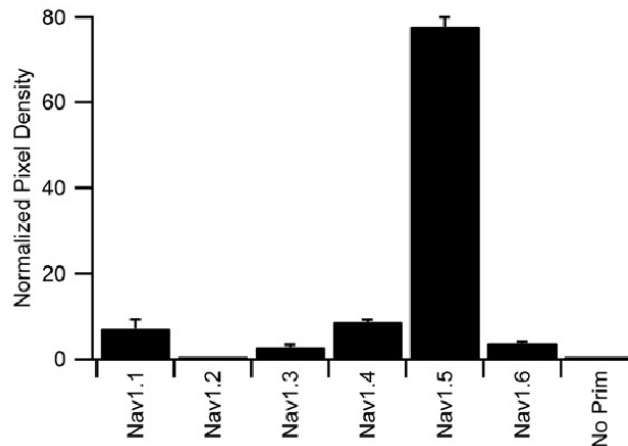


Abb. 5: Quantitative Analyse der Na_v -Isoformen in ventrikulären Myozyten

Neben der prädominanten Isoform $Na_v1.5$ wird auch kardiale Expression von brain-type Isoformen ($Na_v1.1, -1.3, -1.6$) sowie skelettmuskulärer Isoform ($Na_v1.4$) in Ventrikelmiozyten deutlich; nach (Westenbroek et al., 2013)

Neuronale Na_v -Kanäle konnten im Herzen sowohl in Zellen des Reizbildungssystems wie dem Sinusknoten als auch in Zellen des Arbeitsmyokards identifiziert werden. Innerhalb des Sinusknotens wurden neuronale $Na_v1.1$ -Kanäle in zentraler Lage detektiert, während der kardiale Kanaltyp $Na_v1.5$ in der Sinusknotenperipherie lokalisiert wurde (Maier et al., 2003). Durch diese unterschiedliche Verteilung sowie die Veränderung von Herzfrequenz und Frequenzvariabilität bei selektiver Blockade neuronaler Kanäle konnte eine Beteiligung des Kanals an der Schrittmacherfunktion des Sinusknotens gezeigt werden (Maier et al., 2003; Lei et al., 2004).

Innerhalb der Zellen des Arbeitsmyokards sind die Kanalisformen in bestimmten Mustern auf subzellulärer Ebene verteilt und scheinen dabei verschiedene Funktionen wie Impulsübertragung zwischen Kardiomyozyten oder Übertragung des Impulses auf den intrazellulären kontraktilem Apparat des Herzens zu übernehmen (Maier et al., 2002). Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur agiert der kardiale Zellverband als funktionelles Synzytium, indem Kardiomyozyten zur Impulsübertragung elektrochemisch gekoppelt sind. Somit kann eine einzelne ankommende Erregung das komplette Herz stimulieren

und durch organisierte Kontraktion effektiven Blutauswurf gewährleisten. Die Impulsübertragung erfolgt dabei über Nexus (*Gap junctions*) an den Glanzstreifen (*Disci intercalares*) und wird durch spannungsabhängige Natriumkanäle erleichtert (Kucera et al., 2002; Benninghoff und Drenckhahn, 2003) (Abb. 6).

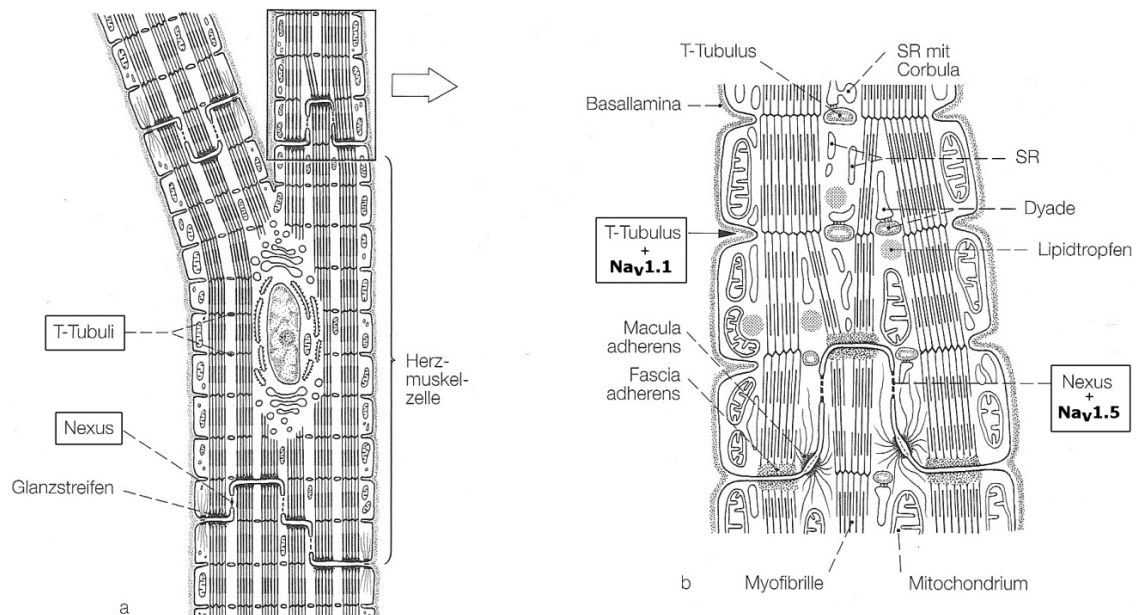


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Ultrastruktur eines Kardiomyozyten

a) Schema eines Kardiomyozyten mit Zell-Zell-Verbindungen über Glanzstreifen (*Disci intercalares*), Nexus an longitudinalem Abschnitt des Glanzstreifens und streifenförmiger Anordnung der T-Tubuli.
 b) Vergrößerter Ausschnitt eines Glanzstreifens. Nexus (*Gap junctions*) dienen der elektrischen Kopplung zwischen den Zellen. In dem Bereich befinden sich zudem herzspezifische Natriumkanäle (Nav1.5). *Macula adherens* sowie *Fascia adherens* dienen darüber hinaus der mechanischen Verankerung des Zellverbandes während der Kontraktion. T-Tubuli bilden Dyaden mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Hierüber gelangt die Erregung der Zelloberfläche in das Zellinnere bis hin zur Kontraktion der Myofibrillen. Die Lokalisation ist gleichzeitig Sitz sogenannter neuronaler Natriumkanäle (Nav1.1); nach (Benninghoff und Drenckhahn, 2003)

Molekulare Bestandteile der Nexus sind Connexine: Transmembranproteine, die zusammengenommen einen Halbkanal, das Connexon, bilden (Lüllmann-Rauch, 2006). Das herzspezifische Connexin ist Connexin 43. In Ventrikelmyozyten von Maus und Ratte konnte durch immunzytochemische Färbung eine Kollokalisierung der primär kardialen Isoform Nav1.5 mit Connexin 43 und somit deren Lokalisation an den *Disci intercalares* gezeigt werden (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004) (Abb. 7). Im Gegensatz dazu wurden neuronale Isoformen Nav1.1 , Nav1.3 , Nav1.6 in streifenförmiger Distribution am T-tubulären System detektiert (Malhotra et al., 2001; Maier et al., 2002) (Abb. 7). T-Tubuli sind transversal angeordnete Einstülpungen der Zellmembran auf Höhe der Z-Scheiben. Sie bilden Kontakte (*Dyaden*) mit den terminalen Zisternen

des sarkoplasmatischen Retikulums, einem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (Lüllmann-Rauch, 2006). Über diese Kontakte gelangt die Erregung der Zellmembran in das Innere des Kardiomyozyten und führt zur intrazellulären Freisetzung des Ca^{2+} während der elektromechanischen Kopplung. Zusammengefasst sprechen die genannten Erkenntnisse für eine Beteiligung der sogenannten neuronalen Isoformen sowohl an Schrittmacherfunktionen als auch an der Kopplung der Oberflächenerregung bis hin zur Kontraktion, während die kardiale Isoform an der interzellulären Erregungsförderung beteiligt zu sein scheint (Maier et al., 2002; Maier et al., 2003).

Informationen aus Studien mit humanen Atriummyozyten sprechen für eine abweichende Isoformendistribution beim Menschen. Der Kanal $\text{Na}_v1.2$ wurde dabei im Bereich der Disci intercalares detektiert, während die kardiale Isoform $\text{Na}_v1.5$ an der Zelloberfläche in Deckung mit den Z-Linien der Sarkomere gefunden wurde (Kaufmann et al., 2013).

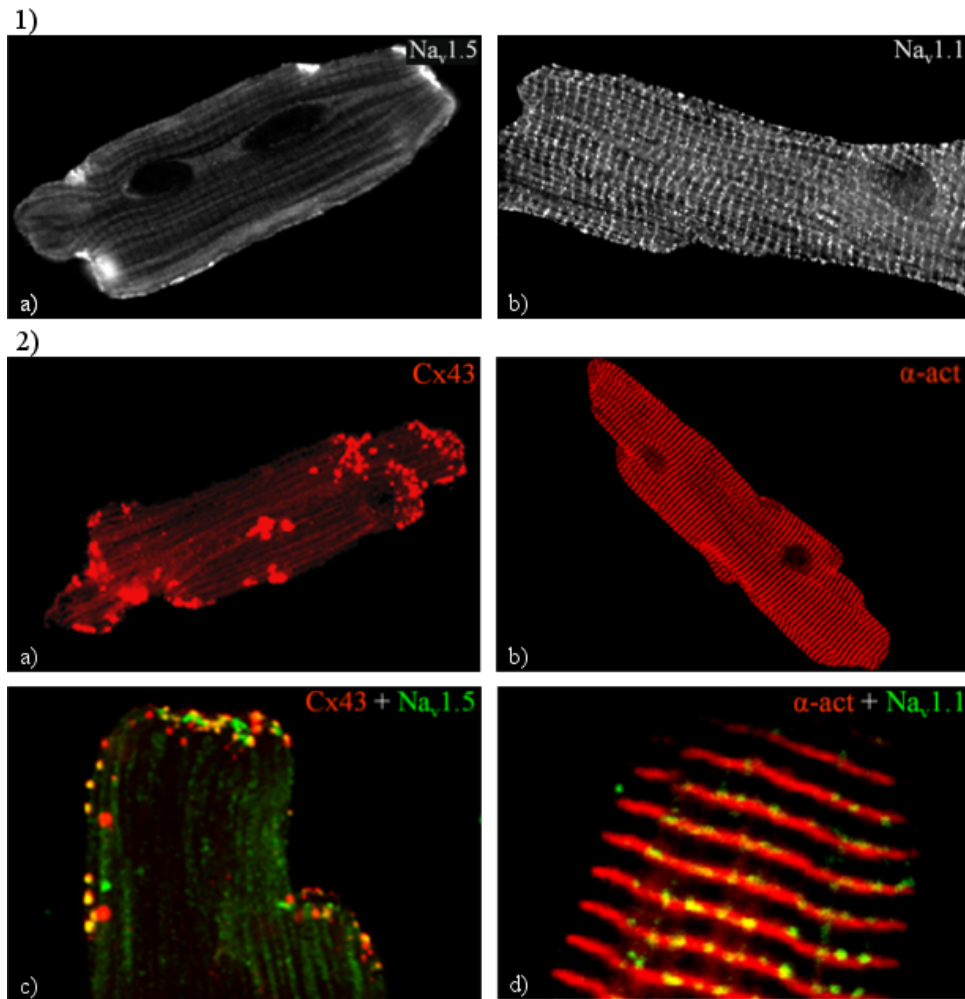


Abb. 7: Immunlokalisation der Na_v-Isoformen in murinen Ventrikelfibrozyten

1) zeigt immunhistochemische Anfärbung mittels Anti-Na_v1.5 im Bereich der Disci intercalares (a) sowie streifenförmige Anfärbung mittels Anti-Na_v1.1 entlang des T-tubulären Systems (b).

2) zeigt Immunfärbungen der Markerproteine Connexin 43 als Marker der Disci intercalares (a), α-Actinin als Markerprotein der Z-Linien im Bereich der T-Tubuli (b). c) und d) zeigen Doppelimmunfärbungen mit Kolokalisation des kardialen Na_v1.5 (grün) und Connexin 43 (rot) im Bereich der Glanzstreifen (c) sowie Kolokalisation von Na_v1.1 (grün) und α-Actinin (rot) mit streifenförmiger Anordnung entlang der T-Tubuli (d); nach (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004)

1.3 Ionenkanalopathien

Die Vielfalt von Ionenkanälen ist groß, ebenso ihre unterschiedliche Aufgabe und Distribution in verschiedenem Gewebe. Entsprechend hoch ist die Anzahl der Erkrankungen in Zusammenhang mit ihnen. Diese Erkrankungen, sogenannte Kanalopathien, haben ihren Ursprung in Mutationen der zugrundeliegenden Gene, die zu aberrantem Schaltverhalten der Kanäle und damit zu unterschiedlicher Erregbarkeit des betroffenen Gewebes führen (George, 2005). Dabei reicht das Spektrum von leichten beziehungs-

weise latenten bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen. Der folgende Abschnitt soll keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben, sondern lediglich einen Einblick in die Vielfalt der Na_v -Kanalopathien im Allgemeinen geben, bevor auf die $\text{Na}_v1.1$ -Erkrankungen genauer eingegangen wird.

1.3.1 Spektrum der Natriumkanalopathien

Die Vielfalt der Na_v -Kanalisoformen und ihre unterschiedliche Expression in verschiedenem Gewebe lässt eine hohe Variation an Erkrankungen bei ihrer Dysfunktion erwarten. Das weite Spektrum reicht von Erkrankungen der Skelettmuskulatur und des Herzens bis hin zu Erkrankungen des zentralen sowie des peripheren Nervensystems (George, 2005; Mullen und Scheffer, 2009). Auch psychiatrische Erkrankungen oder kognitive Einschränkungen sind in Verdacht in Zusammenhang mit Natriumkanal-dysfunktionen zu stehen (Meisler und Kearney, 2005). Unterschiedliche Erbkrankheiten der Skelettmuskulatur resultieren aus Mutationen des skelettmuskelspezifischen Kanals $\text{Na}_v1.4$. Verminderte Kanalaktivität führt dabei zu episodentartiger Muskelerschlaffung bei der *hyperkaliämischen periodischen Paralyse*, während vermehrte Aktivität des Kanals zu fehlender Relaxation bei der *Paramyotonia congenita* führt (George, 2005). Mutationen des herzspezifischen Kanals $\text{Na}_v1.5$ führen zu kardialen Rhythmusstörungen wie etwa bei dem *Brugada-Syndrom* oder dem *Long-QT-Syndrom Typ 3* (Catterall und Yu, 2006). Bei Dysregulationen der *brain-type* Na_v -Kanäle kommt es zu genetischen Formen der Epilepsie wie die *benigne familiäre neonatal-infantile Epilepsie* (BFNIE), *generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus* (GEFS+), *Dravet-Syndrom* oder auch einer Form der *familiären hemiplegischen Migräne* (FHM3) (Mulley et al., 2005; Kahlig et al., 2008). Verändertes Schaltverhalten der peripher neuronalen Kanäle $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$, $\text{Na}_v1.9$ führt über Hyperexzitabilität von sensiblen Neuronen zu familiären Schmerzsyndromen wie die *paroxysmale extreme Schmerzstörung* (PEPD) oder die *primäre Erythromelalgie* mit anfallartigem brennenden Schmerz sowie Schwellung und Rötung der Extremitäten (Catterall et al., 2008). Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die Na_v -Kanalisoformen und assoziierte Kanalopathien geben.

Tab. 1: Na_v-Isoformen mit assoziierten Kanalopathien

S= sensibel; n.s.= non selektiv; R= Resistent, ZNS= Zentralnervensystem; PNS= Peripheres Nervensystem; SIDS= Sudden Infant Death Syndrom (Plötzlicher Kindstod); nach (Savio-Galimberti et al., 2012)

Kanal	Gen	Expression	TTX	Kanalopathie
Nav1.1	SCN1A	Neuronen des ZNS (Soma), Kardiomyozyten (T-Tubuli)	S	Epilepsieerkrankungen (GEFS+, Dravet-Syndrom, West-Syndrom, Lennox-Gestaut-Syndrom) Familiäre hemiplege Migräne (FHM),
Nav1.2	SCN2A	Neuronen des ZNS (Axon)	S	Erbbedingte Fieberkrämpfe und Epilepsie
Nav1.3	SCN3A	Embryonale Neuronen des ZNS (Soma), Kardiomyozyten	S	Potentieller Faktor bei peripher neuropathischem Schmerz nach Rückenmarksverletzung
Nav1.4	SCN4A	Skelettmuskelzelle	S (n.s.)	Hyperkaliämische periodische Paralyse, Paramyotonia congenita, Kaliumbedingte Myotonie, Maligne Hyperthermie
Nav1.5	SCN5A	Kardiomyozyt, unreife/denervierte Skelettmuskelzelle, bestimmte Neurone	R	Long QT-Syndrom, Brugada-Syndrom, Sick-Sinus-Syndrom, SIDS, Dilatative Kardiomyopathie
Nav1.6	SCN8A	Neuronen des ZNS (Purkinje-Zellen, Hippocampus), Astrozyten, PNS, Kardiomyozyt (T-Tubuli)	S (n.s.)	Cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der motorischen Endplatte
Nav1.7	SCN9A	Neuronen der Spinalganglien, Sympathische Neuronen, Schwannzellen, neuroendokrine Zellen,	S (n.s.)	Congenitale Schmerzunempfindlichkeit (CIP), Primäre Erythromelalgie, Paroxysmale extreme Schmerzstörung (PEPD)
Nav1.8	SCN10A	Neuronen der Spinalganglien, Intrakardiale Neurone	R	Periphere Schmerzstörung, Leitungsstörung (atrial/ventrikulär)
Nav1.9	SCN11A	Neuronen der Spinalganglien (Nozizeption)	R	Potentielle Rolle bei Nozizeption und Hyperalgesie

1.3.2 Scn1a Mutation und Dravet-Syndrom

Der überwiegend im zentralen Nervensystem exprimierte Kanal Nav1.1 wird durch das Scn1a-Gen kodiert. Zahlreiche Mutationen dieses Gens führen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Erkrankungen, die in erster Linie aus dem Bereich der Epilepsieerkrankungen kommen. Das Spektrum reicht hierbei von leichten Störungen wie einfachen Fieberkrämpfen sowie benigner familiärer neonatal-infantiler Epilepsie (*BFNIE*) über generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (*GEFS+*) bis hin zu schweren epileptischen Enzephalopathien wie das Dravet-Syndrom (Scheffer und Berkovic, 1997; Berkovic et al., 2004; Dravet et al., 2005; Mantegazza et al., 2005). Hierbei besteht ein

gewisses Kontinuum in der Schwere der Erkrankung, das von dem unterschiedlichen Ausmaß der zugrundeliegenden Mutation abhängig ist (Ragsdale, 2008) (Abb. 8). Als schwerwiegend gelten dabei unter anderem sogenannte *nonsense*-Mutationen, die zu verkürzten und damit funktionslosen Kanalproteinen führen, sowie Mutationsloki in essentiellen Bereichen der porenbildenden Region des Kanals (Mulley et al., 2005). Eine unterschiedliche Ausprägung des Phänotypen scheint zudem durch modulierende Gene sowie verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst zu sein (Akiyama et al., 2012; Guerrini, 2012).

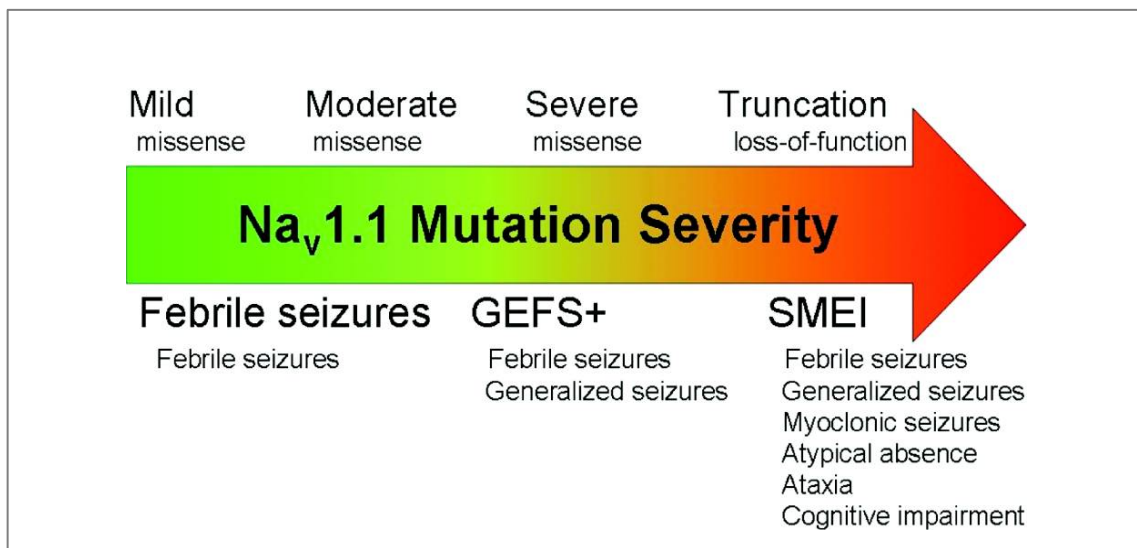


Abb. 8: Kontinuum der Na_v1.1-Kanalopathien

Mit der Progression des Mutationsausmaßes bis zu komplettem Verlust der Kanalfunktion steigt der Schweregrad des klinischen Phänotyps von familiären Fieberkrämpfen über GEFS+ bis hin zu SMEI (Dravet-Syndrom); nach (Catterall et al., 2010)

Dravet-Syndrom

Es wird von 100 bis 700 Na_v1.1-Kanalmutationen berichtet, die in Zusammenhang mit dem Dravet-Syndrom stehen (Catterall et al., 2008; Nabbout, 2008; Akiyama et al., 2012). Diese überwiegend sporadisch entstehenden Mutationen, sogenannte *de novo* Mutationen, sollen für ungefähr 70-80% der Erkrankungen verantwortlich sein (Mulley et al., 2005; Le Gal et al., 2010; Dravet et al., 2011). Die mutierten Kanäle führen dabei über Reduktion des Na⁺-Ionenstroms in inhibitorischen GABAergen Interneuronen des Hippocampus zu einer neuronalen Übererregbarkeit, welche zu Epilepsie führt (Yu et al., 2006). Das Dravet-Syndrom, ursprünglich 1978 als *severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI)* bezeichnet, beschreibt eine schwere Form der infantilen epileptischen

Enzephalopathie (Dravet et al., 2005). Nach der *International League Against Epilepsy (ILAE)* ist es definiert als Epilepsieerkrankung, die innerhalb des ersten Lebensjahres mit unterschiedlichen therapierefraktären Krampfanfällen bei ansonsten unauffälligen Säuglingen beginnt und mit Störungen in der kognitiven sowie motorischen Entwicklung einhergeht (Dravet, 2011a). Innerhalb des Syndroms lassen sich drei Krankheitsphasen abgrenzen. Zunächst die initiale Phase des Krankheitsausbruchs mit typischerweise langanhaltenden, fieber- oder vakzinationsbezogenen, konvulsiven klonischen oder tonisch-klonischen Anfällen. Die Krankheit beginnt innerhalb des ersten Lebensjahres bei einem zuvor unauffälligen Säugling (Dravet, 2011a; Akiyama et al., 2012). Darauf folgt eine Phase der klinischen Verschlechterung zwischen dem ersten und dem fünften Lebensjahr unter Zunahme der Frequenz sowie des Repertoires epileptischer Anfälle mit atypischen Absencen, myoklonischen und partialen Anfällen. Simultan werden psychomotorische Entwicklungsstörungen auffällig (Guerrini, 2012). Es treten neurologische Störungen wie Ataxie, Pyramidenbahnzeichen sowie unkoordinierte Bewegungen auf und es werden Auffälligkeiten in der kindlichen Sprach- und Verhaltensentwicklung deutlich. Nach dem fünften Lebensjahr setzt meist eine Phase der Stabilisierung ein. Zwar persistieren epileptische Anfälle weiterhin, ihre Häufigkeit nimmt jedoch ab (Akiyama et al., 2012; Guerrini, 2012). Auch die mentale Entwicklung wird verbessert, wobei kognitive Defizite bestehen bleiben. Innerhalb des Dravet-Syndroms besteht eine weite Heterogenität bezüglich der Krankheitsausprägung mit neuropsychologischem Outcome sowie mentaler Retardierung und es werden atypische, sogenannte *borderline Formen (SMEIB)* abgegrenzt, welche nicht alle Kriterien der typischen Form erfüllen (Dravet, 2011b). Im Vergleich zur nicht betroffenen Bevölkerung haben Dravet-Patienten ein erhöhtes Risiko von bis zu 17,5% frühzeitig zu versterben (Dravet, 2011b). Unter den Ursachen befinden sich neben dem *Status epilepticus* unter anderem auch anfallsbedingte Unfälle sowie Ketoazidose. Auffällig ist zudem die besonders hohe Rate von 50% einen plötzlichen unerwarteten Epilepsietod (*SUDEP*) zu erleiden, welche die durchschnittliche SUDEP-Rate anderer Epilepsieerkrankungen deutlich übersteigt (Dravet, 2011b). Dieses erhöhte Risiko ist ein ernst zu nehmendes Problem bei Dravet-Patienten und gilt es daher weiter zu erforschen.

1.4 Fragestellung und Intention dieser Arbeit

Das Dravet-Syndrom, auch *severe myoclonic epilepsy in infancy* (SMEI) bezeichnet, ist eine therapierefraktäre schwere Form der epileptischen Enzephalopathie. Sie wird durch Mutation des $\text{Na}_v1.1$ -Kanalgens (*Scn1a*) verursacht. Epilepsiepatienten tragen im Allgemeinen ein erhöhtes Risiko im Vergleich zur nicht betroffenen Bevölkerung frühzeitig zu versterben (Surges und Sander, 2012). Mit einer Beteiligung von 10-20% der Todesfälle zählt hierbei der plötzliche und unerwartete Epilepsietod (SUDEP) zu den Hauptursachen (Velagapudi et al., 2012). Bei Dravet-Patienten ist das SUDEP-Risiko hingegen auf bis zu 50% der frühzeitigen Todesfälle erhöht. Über die pathophysiologischen Vorgänge des SUDEP herrscht bis dato jedoch kein einheitlicher Konsens.

Da der epilepsieverursachende $\text{Na}_v1.1$ -Kanal nicht exklusiv im Gehirn, sondern auch im Herzen exprimiert wird, stellt sich die Frage, welche kardialen Auswirkungen ein Defekt dieses Kanals mit sich bringt. Es wird hypothetisiert, dass kardiale Arrhythmien durch den Defekt der Ionenkanäle an der Pathogenese von SUDEP in SMEI-Patienten beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den kardialen Phänotyp eines SMEI-Modells mit möglicher Beteiligung des $\text{Na}_v1.1$ -Kanals an der Entstehung von SUDEP zu evaluieren.

Der kardiale Einfluss der $\text{Na}_v1.1$ -Defizienz wurde anhand eines Knockout-Mausmodells im Rahmen von elektrokardiographischen sowie elektrophysiologischen Untersuchungen charakterisiert. Diese wurden sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Stresssimulation durchgeführt. Die Stressinduktion erfolgte dabei mittels pharmakologischer Stressstimuli sowie des Weiteren mittels Induktion von Hyperthermie.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden alle bei dieser Arbeit angewandten Versuchsanordnungen vorgestellt und die dabei verwendeten Materialien aufgelistet.

2.1 Transgenes Mausmodell

In den durchgeführten Versuchen wurde ein transgenes Mausmodell herangezogen, das nachfolgend näher beschrieben wird. Im Anschluss wird die Genotypisierung für die korrekte Zuordnung der untersuchten Mäuse in die jeweilige Gruppe erläutert.

2.1.1 Scn1a-Knockout

Um die *loss-of-function* Mutation des $Na_v1.1$ kodierenden SCN1A-Gens zu studieren, die zu generalisierter Epilepsie wie dem Dravet-Syndrom führt, wurde in vorliegender Arbeit ein transgenes Mausmodell verwendet, das von Yu et al. (2006) entwickelt wurde. Im Rahmen der internationalen Kooperationen *CURE (Citizens United for Research in Epilepsy)* und der *DSF (Dravet Syndrome Foundation)* wurde dieses 129SvJ:C57BL6. $Na_v1.1$ Mausmodell freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei diesem hybriden Modell sind sowohl homozygote ($Scn1a^{-/-}$) als auch heterozygote ($Scn1a^{+/-}$) Mutanten von wildtypischen Mäusen bis zu Tag neun nach Geburt (P9) phänotypisch nicht zu unterscheiden (Yu et al., 2006). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die initiale Expression des $Na_v1.1$ Kanals ab der zweiten postnatalen Woche (Gordon et al., 1987; Scheinman et al., 1989). Homozygote Mutanten beginnen ab dem neunten postnatalen Tag (P9) koordinative Auffälligkeiten wie Tremor sowie posturale Instabilität zu zeigen. Bis zu ihrem Exitus am fünfzehnten postnatalen Tag (P15) (Abb. 9a) zeigen diese Mäuse neben allgemeiner Inaktivität periodische generalisierte konvulsiv klonische Anfälle und versterben selbst unter manueller Fütterung bis zu P17.5 aufgrund von Dehydration und insuffizienter Nahrungsaufnahme (Yu et al., 2006) (Abb. 9b). Diese homozygot Scn1a-negativen Mäuse ($Scn1a^{-/-}$) wurden den Versuchsreihen in vorliegender Arbeit nicht zugeführt. Es wurden ausschließlich heterozygote Tiere in der Experimentalgruppe neben Wildtypen in der Kontrollgruppe

verwendet. Heterozygote Mutanten ($Scn1a^{+/-}$) werden zwischen P21 und P27 durch erste spontane Anfälle und spontanen Exitus auffällig, wobei 40% der Mäuse beider Geschlechter innerhalb von fünfzehn Wochen versterben (Yu et al., 2006).

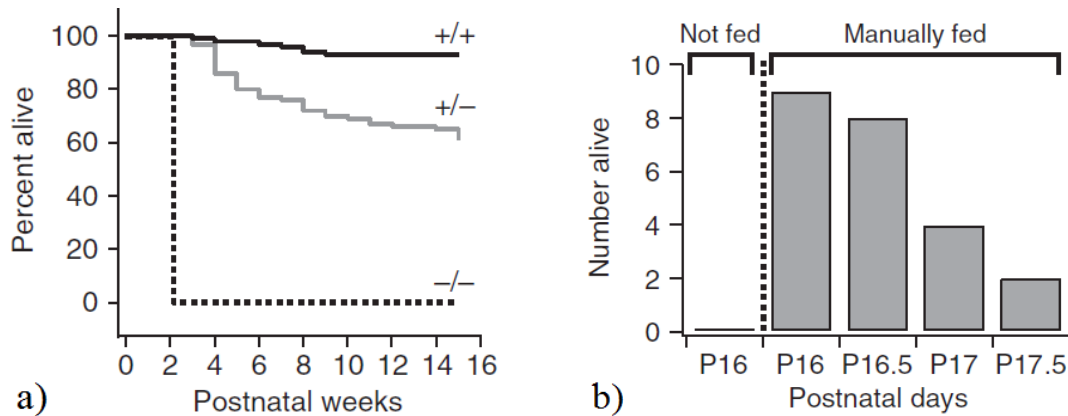


Abb. 9: Überleben der Scn-Mutanten

a) Überlebenskurve nach Kaplan-Maier. Während homozygote $Scn1a^{-/-}$ Mäuse bereits in der zweiten postnatalen Woche ausnahmslos versterben, sterben 40% der heterozygoten $Scn1a^{+/-}$ Mäuse bis zur fünfzehnten Woche. Wildtypische Mäuse $Scn1a^{+/+}$ sind hiervon nicht betroffen und zeigen diese gesteigerte Mortalität der Dravet-Mutanten nicht.

b) Überleben der homozygoten KO-Mäuse unter manuellem Füttern. Während die Mäuse ohne manuelle Nahrungszufuhr bereits bis zu Tag 16 versterben, überleben wenige von ihnen unter Fütterung bis zu Tag 17,5; nach (Yu et al., 2006)

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 69 Tiere beider Geschlechter mit dem Genotyp $Scn1a^{+/+}$ (WT) sowie $Scn1a^{+/-}$ (HET) in vivo untersucht. Einer elektrokardiographischen Untersuchung (EKG) wurden 22 Tiere unterzogen, welche sich in einem Alter zwischen 70 und 80 Tagen (P70-80) befanden. Weitere 27 Tiere in diesem Alter wurden elektrophysiologischen Untersuchungen (EPU) zugeführt. An 20 Tieren wurden daneben 40 bis 45 Tage post natum (P40-45) kombinierte elektrokardiographische sowie elektrophysiologische Untersuchungen unter temperierten Bedingungen durchgeführt, um altersspezifische Unterschiede des Kardiophänotyps und eine mögliche Thermosensitivität zu untersuchen. Die Mäuse wurden geschlechtsspezifisch getrennt in Käfigen mit bis zu fünf Tieren unter freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24 Grad Celsius (°C) und ein zirkadianer zwölfstündiger Tag/Nacht-Rhythmus wurde eingehalten. Alle Untersuchungen wurden mit der Erlaubnis der Regierung von

Unterfranken unter den Vorgaben des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt.

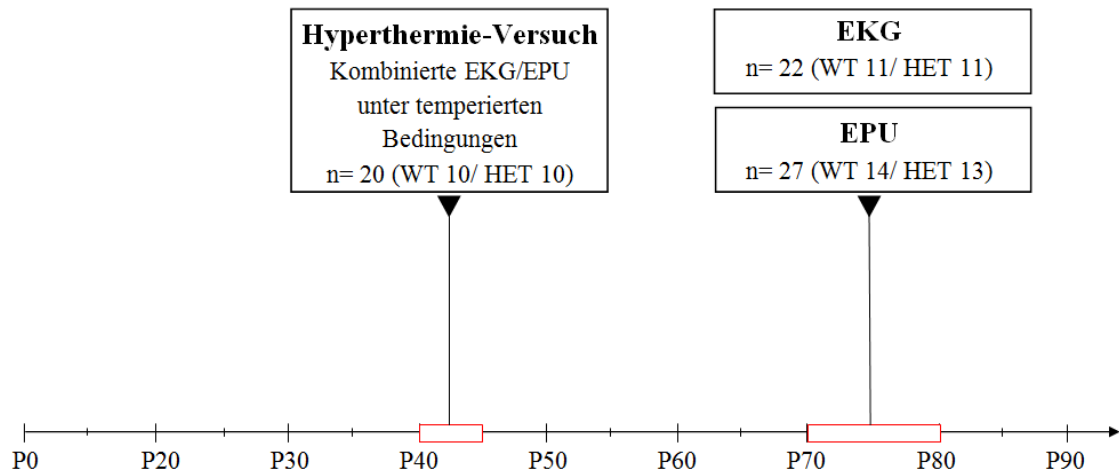


Abb. 10: Versuchstieralter

Abgebildeter Zeitstrahl verdeutlicht Alter und Anzahl der Versuchstiere bei den unterschiedlichen Versuchsanordnungen. P0 markiert den Zeitpunkt der Geburt. Px das Versuchstieralter in Tagen postnatal. Während isolierte EKG- sowie EPU-Versuche an Mäusen im Alter zwischen 70-80 Tagen postnatal (P70-80) durchgeführt wurden, erfolgte die kombinierte Versuchsanordnung der Hyperthermie-Versuche bereits an Mäusen im Alter zwischen 40 und 45 Tagen postnatal (P40-45).

2.1.2 Genotypisierung via PCR

Für korrekte Zuordnung der Versuchstiere in die HET- oder Kontrollgruppe wurden die Mäuse hinsichtlich ihres Scn-Genotyps genetisch identifiziert. Die Genotypisierung erfolgte in üblicher Art und Weise über drei Schritte. Beginnend mit der DNA-Extraktion über die DNA-Amplifikation bis zur UV-Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Banden (Mullis et al., 1986). Die hierfür verwendeten Materialien und Chemikalien werden tabellarisch in dem Gliederungspunkt der Appendix dargestellt (Tab. 20, Tab. 21).

Zunächst wurde DNA aus Schwanzbiopsien der Versuchstiere extrahiert. Dies erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kit (250) (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Hierbei wurde das Biopsiematerial nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K in einem Eppendorfgefäß unter Erwärmung auf 60 °C durch ein Thermogerät über Nacht lysiert. Um beim Durchlauf des Lysats das selektive Haften der DNA an die Matrix der Trennsäulen (DNeasy mini spin columns) zu verbessern,

wurde dem Lysat 200 µl AL-Puffer sowie 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt. Der Durchlauf wurde von der mit DNA behafteten Trennsäule in einer Tischzentrifuge bei 6000 x g (8000 rpm) für eine Minute getrennt und verworfen. In zwei separaten Waschschrritten mit 500 µl AW1-Puffer bei 6000 x g für eine Minute sowie 500 µl AW2-Puffer bei 20000 x g (14000 rpm) für drei Minuten wurde die DNA von Kontaminanten befreit. In einem letzten Schritt wurde die haftende DNA nach Inkubation von einer Minute mit 200 µl AE-Puffer durch Zentrifugieren bei 6000 x g für eine weitere Minute von der Matrix gelöst und lag nun für die nachfolgende Verwendung in Lösung vor (Qiagen-GmbH, 2006).

Die relevanten DNA-Segmente der aufgereinigten DNA wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion im Folgeschritt exponentiell amplifiziert. Hierfür wurde wie üblich eine thermostabile Polymerase des Organismus *Thermus aquaticus* (Taq) zwecks Automatisierung in einem Thermocycler verwendet (Saiki et al., 1988). Es wurden insgesamt drei Primer (bezogen von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) verwendet, um die DNA-Fragmente in wildtypisches Scn-Gen und Knockout-Gen differenzieren zu können. Die Primer-Nukleotidsequenzen werden in folgender Tabelle dargestellt (Tab. 2).

Tab. 2: Primersequenzen

A=Adenin; C=Cytosin; G=Guanin; T=Thymin

Oligoname	Nukleotidsequenz 5'→3'	Funktion
268 for	CGA ATC CAG ATG GAA GAG CGG TTC ATG GCT	WT/ KO forward Primer
269 rev	ACA AGC TGC TAT GGA CAT TGT CAG GTC AGT	WT reverse Primer
316 rev	TGG CGC TCG ATG TTC AGC CCA AGC	KO reverse Primer

Bei beiden gesuchten Fragmenten wurde der Startpunkt der Amplifikation mit Primer Oligo 268 for gewählt (Tab. 2). Das Ende differierte jeweils, um unterschiedlich große Fragmente zu erhalten und die Genotypen somit anhand der Fragmentgröße unterscheiden zu können. Primer Oligo 269 rev terminierte das wildtypische Scn-Gen, wodurch sich ein Amplifizierungsfragment von circa 300 bp ergab, während Primer Oligo 316 rev die Termination des circa 150 bp langen Knockout-Fragments bestimmte (Abb. 11). Durch die unterschiedliche Größe der Fragmente und die damit verbundene unterschied-

liche gelelektrophoretische Auftrennung konnten die Genotypen der heterozygoten Knockout-Mäuse von den wildtypischen Genotypen unterschieden werden.

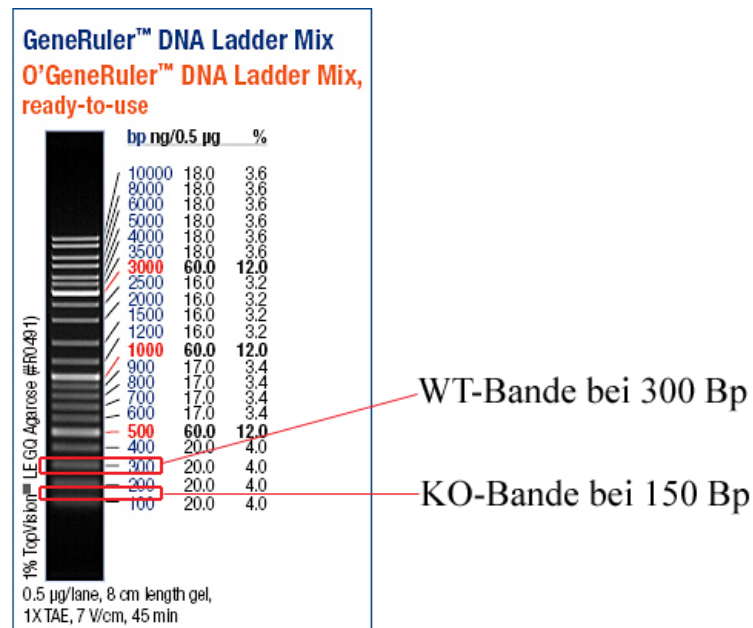


Abb. 11: PCR-Marker

Die Abbildung zeigt die Auftrennung des GeneRuler™ Ladder Mixes nach Banden unterschiedlicher Größe bei 1%igem Agarosegel, angelegter Spannung von 7V/cm und 45 minütiger Laufzeit. Rot markiert sind die relevanten Bandenbereiche für die Genfragmente des WT-Gens bei 300 bp sowie die Fragmente des KO-Gens bei 150 bp; nach (Thermo-Fisher-Scientific-Inc, 2014)

Der genaue Reaktionsansatz zur DNA-Amplifizierung findet sich in Tab. 3. Wie beschrieben wurden hierbei 10 µl DNA-Lysat mit 40 µl des Mastermix-Reaktionsansatzes vermischt und anschließend in einem Thermocycler nach beschriebenenem PCR-Protokoll behandelt (Tab. 4).

Tab. 3: PCR-Mastermix Pipettierschema

PCR-Reaktionsansatz
pro Sample

[DNA-Sample	10 µl]
Primer 268 for (5 µM)	2 µl
Primer 269 rev (10 µM)	4 µl
Primer 316 rev (5 µM)	2 µl
Puffer (5x)	5 µl
dNTPs (0,2 mM)	1 µl
DREAMTAQ inklusive	0,6 µl

PCR-Reaktionsansatz pro Sample	
MgCl ₂	
H ₂ O	25,4 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tab. 4: PCR-Protokoll des Thermocyclers

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Denaturierung initial	95	2	
Denaturierung	95	30	} × 30
Annealing	67	30	
Elongation	72	45	
Elongation final	72	7	
Pause	15	<i>unbestimmt</i>	

Nachdem die DNA-Fragmente des KO- sowie des WT-Gens amplifiziert in Lösung vorlagen, wurden sie gemäß ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um eine differenzierte Auftrennung der 150 bp und 300 bp Fragmente zu ermöglichen, wurde ein Elektrophoresegel mit 2% Agaroseanteil gewählt. Zur Färbung der doppelsträngigen DNA wurde dem Gel bei der Herstellung Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) hinzugefügt. Dieses bewirkt durch Interkalierung eine Veränderung des UV Emissionsspektrums, wodurch die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Tisch sichtbar werden (Le Pecq und Paoletti, 1966; Sharp et al., 1973). Aufgrund der Kanzerogenität des Ethidiumbromids wurden hierbei die üblichen Sicherheitsvorschriften wie das Tragen von Handschuhen und einer Schutzbrille eingehalten. Vor dem Gellauf wurden jeweils 10 µl Ladepuffer zu den PCR-Proben pipettiert und die Geltaschen anschließend mit 25 µl des Gemisches geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Anlegen einer Spannung von 140 V (ca. 250 mA, 39 W) für eine Stunde in der Elektrophoreseapparatur. Als Laufpuffer wurde dabei 1× TAE (TRIS-Acetat-EDTA) verwendet. Im letzten Schritt wurde das Gel durch Auflage auf einen UV-Tisch der Fotodokumentation zugänglich gemacht. Durch Verwendung des bp-Markers konnten die aufgetrennten DNA-Banden ihrer Größe entsprechend zugeordnet und die Genotypen der Mäuse aufgrund ihres Bandenmusters bestimmt werden. Als Positivkontrolle diente DNA von

bereits hetero- beziehungsweise homozygot getesteten Mäusen ($Scn1a^{+/-}$; $Scn1a^{+/+}$). Als Negativkontrolle diente H_2O .

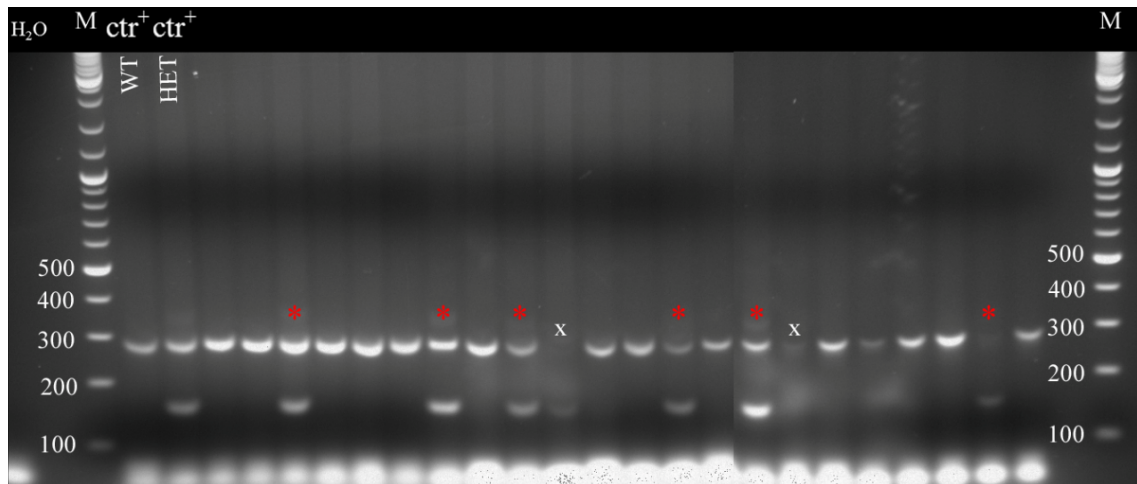


Abb. 12: UV-Fotodokumentation der PCR

Die Abbildung zeigt die Fotodokumentation von 22 PCR-Samples. Die mit rotem Stern markierten Samples sind als heterozygot $Scn1a^{+/-}$ zu werten. Die mit x markierten Samples sind nicht auszuwerten. Restliche nicht markierte Samples entsprechen dem WT-Genotyp $Scn1a^{+/+}$. H_2O = Negativkontrolle; WT/HET Ctr^+ = Positivkontrollen, M=Marker mit zugehörigen Banden.

2.2 Elektrokardiographische Untersuchung (EKG Ruhe/Stress)

Zur Erforschung kardialer Phänotypen in vivo sind Mausmodelle weit verbreitet, trotz der nicht zu vernachlässigenden Unterschiede in der Durchführung und Auswertung eines murinen EKGs zu einem humanen EKG (Richards et al., 1953; London, 2001). Lange Zeit galten unter vielen Aspekten vor allem die räumliche Auflösung des kleinen Mäuseherzens sowie die zeitliche Auflösung der schnellen Herzfrequenz als Herausforderung (Hartley et al., 2002). Sie liegt mit ungefähr 500-700 Schlägen pro Minute im Vergleich zu 60-70 Schlägen pro Minute beim Menschen in etwa bei dem Zehnfachen (Desai et al., 1997; Kass et al., 1998; Ho et al., 2011). Nicht nur aus diesen Gründen gibt es einige Punkte bei der Elektrokardiographie von Mäusen zu beachten. Ihre Durchführung soll im Folgenden detailliert beschrieben werden. In vorliegender Arbeit wurden Oberflächen-EKGs abgeleitet. Sie wurden sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Stressinduktion mittels pharmakologischer Stimuli durchgeführt. Als Pharmakon wurde hierbei das Adrenergikum Isoproterenol verwendet, welches vornehmlich über selektive Aktivierung von β -Adrenozeptoren (β_1 / β_2) wirkt.

2.2.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software

Für einen besseren Überblick sind verwendete Materialien, Chemikalien, Hard- sowie Software der elektrokardiographischen Untersuchungen tabellarisch aufgelistet. Diese Tabellen befinden sich unter dem Gliederungspunkt der Appendix (Tab. 22, Tab. 23).

2.2.2 Narkose mittels 2,2,2 Tribromethanol

Die Tiere wurden mit Hilfe von 2,2,2-Tribromethanol (TBE), das früher unter dem Handelsnamen Avertin[®] vertrieben wurde, narkotisiert. Eine Narkose der Mäuse ist notwendig, um Schmerzfreiheit der Tiere zu garantieren und die Mäuse vor Stressinduktoren der ungewohnten Situation während der Untersuchung abzuschirmen. Auf diese Weise kann die hiermit verbundene kardiale Beeinflussung minimiert werden und das EKG möglichst artefaktfrei aufgezeichnet werden. Avertin[®] ist ein verbreitetes Allgemeinanästhetikum beim Umgang mit Mäusen, das für angemessene Anästhesie bei spontaner Atmung während kurzzeitiger chirurgischer Interventionen sorgt (Arras et al., 2001). Allerdings sind korrekte Herstellung der Substanz sowie Sorgfalt in Umgang und Lagerung wichtig, um ausreichende Anästhesie und Verträglichkeit bei den Mäusen zu erreichen (Weiss und Zimmermann, 1999; Roth et al., 2002). Zunächst wurde mittels Glaspipette jeweils 1 ml tert-Amylalkohol zu 1 g Aliquot TBE Pulver in ein Reagenzglas gegeben und für zwei Minuten bei Zimmertemperatur (ca. 25 °C) in einem Vortexrüttler gründlich vermischt. Die hergestellte Stammlösung wurde beschriftet und durch Aluminiumfolie lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Somit war sie zum weiteren Gebrauch für einen Monat haltbar. Für die Versuche wurde die eigentliche Anästhesielösung täglich frisch angesetzt. Dafür wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:40 mit einer Natriumchloridlösung 0,9% verdünnt und wiederum für zwei Minuten gevortext, um das gewünschte TBE 2,5% zu erhalten. Dieses wurde den Mäusen präinterventionell zu 10 µl/g Körpergewicht intraperitoneal appliziert und anschließend fünf Minuten gewartet, um adäquate Anflutung, Verteilung und Anästhesiewirkung zu gewährleisten. Im direkten Anschluss an die Versuche wurden die Mäuse noch im narkotisierten Zustand durch zervikale Dislokation euthanasiert, um eventuelle Folgen des TBE wie Hepatotoxizität, Peritonitis, Muskelnekrosen oder Ileus zu vermeiden (Roth et al., 2002; Lieggi et al., 2005).

2.2.3 Datenakquisition und -analyse

Nachdem die Mäuse wie beschrieben narkotisiert worden waren und Anästhesie mittels Verlust des Schmerzreflexes bestätigt wurde, wurden die Tiere mit Hilfe von Leukosilk[®] Klebestreifen auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Normothermie bei ca. 37 °C Körperkerntemperatur wurde durch das Temperaturkontrollmodul inklusive des rektalen Temperatursensors sichergestellt. Somit konnte kardiale Beeinflussung durch Hypothermie wie Reduktion der Herzfrequenz während der Narkose der Tiere minimiert werden (Richards et al., 1953). Oberflächen-EKGs wurden im Sinne der bipolaren Extremitätenableitungen nach Einthoven über subkutan angebrachte 29-Gauge Nadel Elektroden abgeleitet. Das schwache elektrische Signal wurde dabei durch Powerlab und BIOamp Verstärker amplifiziert und gefiltert. Der *low-pass* Filter wurde bei 1 kHz festgelegt, der *high-pass* Filter bei 0,3 Hz. Zusätzlich wurde ein *notch*-Filter bei 50 Hz angelegt, um Netzstörsignale umliegender elektronischer Geräte zu minimieren und das EKG möglichst rauschfrei aufzuzeichnen. Begonnen wurde nach korrekter Platzierung der Nadelelektroden und kurzer Akklimatisationsphase mit der EKG-Aufzeichnung in Ruhe für zwei Minuten. Im Anschluss wurde für das Stress-EKG ein pharmakologischer Stimulus mittels abdomineller Injektion von 2 µg/g Körpergewicht Isoproterenol gesetzt. Hierzu wurde in einer täglich frisch angesetzten Stammlösung 10 mg Isoproterenol-Hydrochlorid in 50 ml Natriumchlorid 0,9% gelöst. Anschließend wurden den Mäusen hiervon entsprechend 10 µl/g Körpergewicht appliziert. Isoproterenol ist ein potenter non-selektiver β-Rezeptoragonist, der vor allem via β₁-Rezeptorstimulation am Herzen eine positiv chrono-, dromo- sowie inotrope Wirkung besitzt (Whalen et al., 2006). Um die regelgerechte Isoproterenolgabe zu erfassen, wurde der Applikationszeitpunkt dokumentiert und der folgende kardiale Effekt der Herzfrequenzsteigerung aufgezeichnet. Die Aufzeichnung des Stress-EKGs erfolgte für fünf Minuten. Dahingegen beschränkte sich die Auswertung auf zwei Minuten nach dem Erreichen einer plateauartigen Phase der Herzfrequenz nach initialem Anstieg direkt im Anschluss an die Isoproterenolgabe. Somit konnte Anflutung und adäquate Wirkung des Pharmakons gewährleistet werden. Demnach wurden jeweils zwei Minuten der Ruhe- sowie der Stress-EKGs ausgewertet und analysiert (Abb. 13).

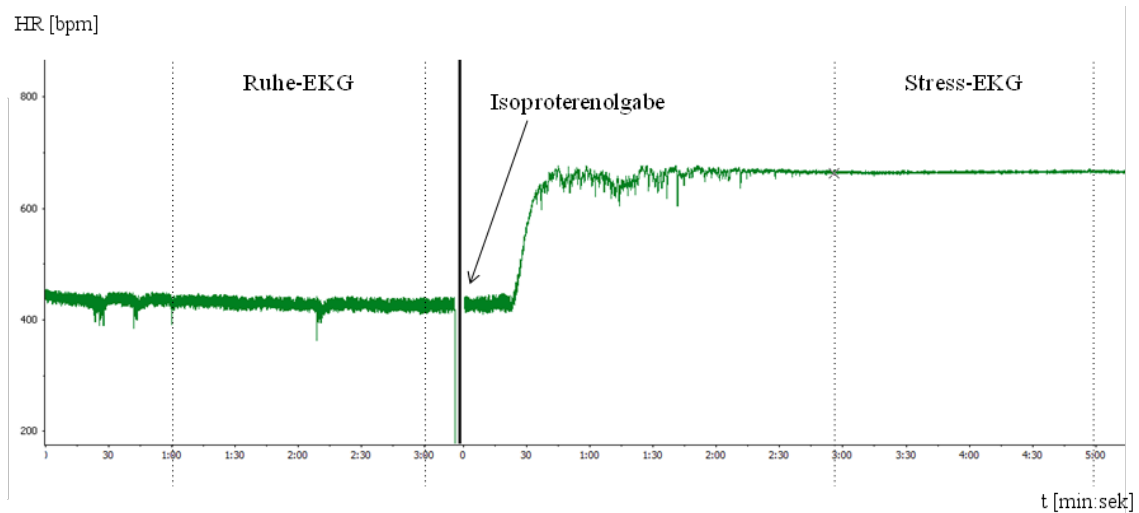


Abb. 13: Auswertungsintervalle Ruhe- und Stress-EKG

Die Aufzeichnung des EKGs ist über fünf Minuten dargestellt. Das Auswertungsintervall in Ruhe beginnt bei Minute 1 für zwei Minuten nach kurzer Akklimatisation (erstes gestricheltes Intervall) mit anschließender dokumentierter Isoproterenolgabe. Deutlich wird im Anschluss an die i.p. Injektion des Adrenergikums eine Steigerung der Herzfrequenz nach kurzer Latenz zur Anflutung des Pharmakons von ungefähr 450 auf 650 bpm, welche gleichzeitig als Nachweis regelrechter Injektion galt. Das zweiminütige Intervall zur Auswertung des EKGs unter Stressbedingungen beginnt nach Erreichen der plateauartigen Phase konstanter Herzfrequenz (zweites gestricheltes Intervall). Im Verlauf des gesamten Aufzeichnungsintervalls wurden somit jeweils zwei Minuten möglichst konstanter Herzfrequenz in Ruhe und unter Stressbedingungen ausgewertet und verglichen.

Das auszuwertende Intervall wurde mittels EKG-Auswertungssoftware ecgAuto (emka TECHNOLOGIES S.A.S., Paris, Frankreich) in Abschnitte zu je 15 Sekunden unterteilt. In repräsentativen EKG-Abschnitten wurden die zu untersuchenden Parameter bei jedem Versuchstier zunächst manuell bestimmt und in einer sogenannten Library zusammengeführt. Diese Libraries beinhalteten somit ein Arsenal an unterschiedlichen repräsentativen Abschnitten des EKGs und bildeten die Grundlage der softwareunterstützten EKG-Analyse (Abb. 14).

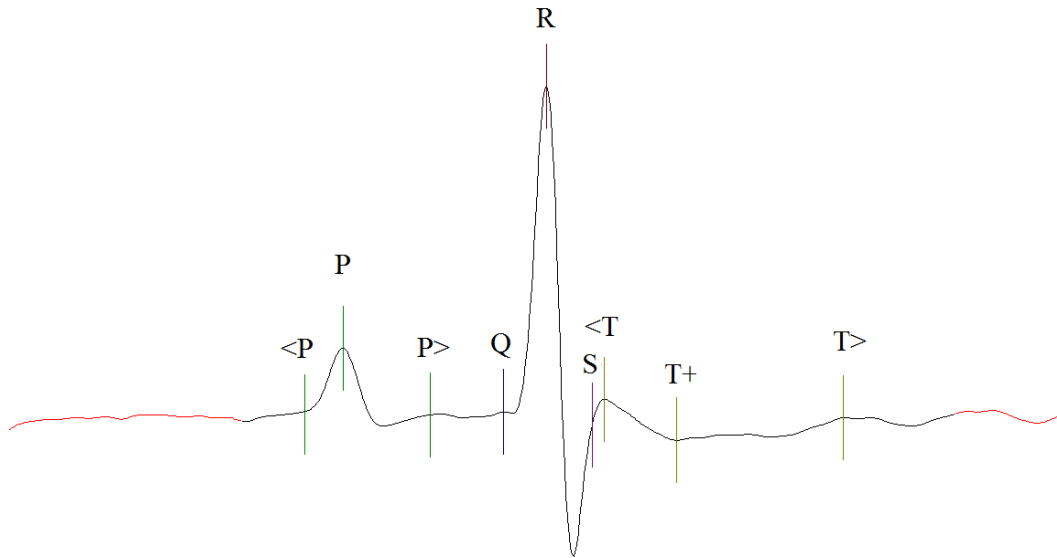


Abb. 14: EKG-Parameter

Repräsentativer EKG-Abschnitt innerhalb des Aufzeichnungsintervalls mit manueller Eingabe der gesuchten EKG-Parameter. Mehrere solcher manuell bearbeiteter EKG-Abschnitte wurden individuell für jede einzelne Maus erstellt und in einer Library zusammengeführt, welche die Basis der softwareunterstützten EKG-Auswertung bildete.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende EKG-Parameter bei WT- und KO-Mäusen in beschriebener Weise sowohl in Ruhe als auch unter Stressbedingungen (Iso) analysiert und verglichen. Bei den beiden korrigierten QT-Zeiten (QT_{Bazett} , $QT_{\text{Fridericia}}$) handelte es sich um Frequenzkorrekturen (Bazett, 1920; Fridericia, 1921), die ebenfalls bei klinischen elektrophysiologischen Untersuchungen Anwendung finden, um den Einfluss der Herzfrequenz auf die Dauer des QT-Intervalls zu berücksichtigen.

Tab. 5: Parameter der EKG Auswertung

EKG Parameter	Definition
RR [ms]	Abstand zweier folgender R-Zacken (R_1 bis R_2)
HR [bpm]	Herzfrequenz reziprok zum RR Intervall
PR [ms]	Intervall Beginn P bis Beginn QRS Komplex (<P bis Q)
Pdur [ms]	Dauer der P-Welle (<P bis P>)
PP [ms]	Abstand Beginn zweier folgender P-Wellen (<P ₁ bis <P ₂)
QRS [ms]	Dauer des QRS-Komplexes (Q bis S)
QT [ms]	Intervall Beginn QRS-Komplex bis Ende T Welle (Q bis T>)
QT+ [ms]	Intervall Beginn QRS-Komplex bis negatives Maximum T-Welle (Q bis T+)
QT_{Bazett} [ms]	QT-Intervall frequenzkorrigiert nach Bazett
$QT_{\text{Fridericia}}$ [ms]	QT-Intervall frequenzkorrigiert nach Fridericia

2.3 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) sind heute in der Kardiologie nicht mehr wegzudenken. Ihr Einfluss erstreckt sich von Rhythmusdiagnostik, Therapie der Herzrhythmusstörungen bis hin zur Erforschung ihrer Arrhythmogenese (Horowitz, 1986; Feld, 1999; Luderitz, 2003; Wellens, 2008). Zugrundeliegende Mechanismen konnten erst nach Miniaturisierung des Instrumentariums und Entwicklung der nötigen Techniken anhand von Mausmodellen funktionell analysiert werden (James et al., 1998; Berul, 2003). Hierbei wurde der ursprünglich epikardiale Zugang, verbunden mit relevantem chirurgischen Trauma, durch weniger invasive endokardiale oder transösophageale Zugangswege abgelöst (Berul et al., 1996; Berul et al., 1997; Berul et al., 1998; Saba et al., 2000). Im Unterschied zu dem epikardialen *open-chest*-Zugang mit Eröffnen der Thoraxhöhle haben die weniger invasiven Zugangsformen den Vorteil im überwiegend intakten Organismus unter physiologischeren Bedingungen zu messen. Ohne mediane Sternotomie können somit mögliche kardiale Einflüsse des autonomen Systems durch den chirurgischen Eingriff per se sowie durch damit verbundene Schmerzen reduziert werden (Berul, 2003; Sastry et al., 2006). Aufgrund dieser Vorteile wurde in vorliegender Arbeit eine minimalinvasive endokardiale Form mit vaskulärem Zugang gewählt. Allgemein können mit Hilfe der elektrophysiologischen Untersuchungstechniken induzierte Genalterationen im Sinne von spezifischen Krankheitsmodellen hinsichtlich ihres kardialen Phänotyps charakterisiert werden (Berul et al., 1996; Saba et al., 2000). In vorliegender Arbeit wurden in diesem Sinne *Scn1a*^{+/-}-Mäuse als Krankheitsmodell des Dravet-Syndroms im Vergleich zu wildtypischen Mäusen untersucht. Somit konnten neben basalen elektrophysiologischen Parametern der Impulsinitiation, Konduktion sowie Refraktarität ebenso Arrhythmogenität bei programmierter elektrischer Stimulation evaluiert werden.

2.3.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software

Verwendete Materialien werden wiederum übersichtshalber tabellarisch aufgelistet und im Abschnitt der Appendix angeführt, sofern sie nicht bereits im Materialteil der elektrokardiographischen Untersuchungen zu finden sind. Sie werden somit um jene

erweitert, welche ausschließlich bei den elektrophysiologischen Untersuchungen und nicht gleichzeitig bei der EKG-Ableitung Anwendung fanden (Tab. 24, Tab. 25).

2.3.2 Narkose mittels Isofluran

Während der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Mäuse via Intubationsnarkose mit Isofluran narkotisiert. Es handelt sich hierbei um ein halogeniertes volatiles Narkotikum. Unter den Pharmaka, die zur Narkotisierung von Nagern eingesetzt werden, scheint Isofluran besonders günstige Eigenschaften im Bezug auf rasche Narkoseeinleitung sowie Steuerung der Narkosetiefe bei geringer Toxizität zu haben (Roth et al., 2002). Gerade bei prolongierten Studien wie etwa elektrophysiologische Untersuchungen sind diese Charakteristika entscheidend, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Ebenso entscheidend ist der geringe depressive Einfluss auf die kardiale Funktion verglichen mit alternativen Narkotika (Roth et al., 2002). Intubation erfolgte über direkte Laryngoskopie. Hierfür wurden die Mäuse zunächst in einer verschließbaren transparenten Narkosekammer, in der sich ein isoflurangetränkter Wattepad befand, sediert. Anschließend wurden sie dorsal mit leichter Reklination des Kopfes auf einer Wärmeplatte gelagert. Für freie Sicht auf den Larynxbereich wurde die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette gefasst und nach kranioventral verlagert. Nun konnte die Intubationskanüle (1,2 mm OD) zwischen die *Plicae vocales* hindurch tracheal eingeführt werden. Der Tubus wurde durch einen Klebestreifen an der Wärmeplatte fixiert, die regelrechte Lage anhand suffizienter Beatmung nach Anschluss an den Respirator kontrolliert. Das Respirationssetting wurde in Konsens mit wissenschaftlicher Literatur (Holland, 1973; Schwarte et al., 2000; Römer, 2003) innerhalb der Herstellervorgaben (Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) in Bezug auf murine Tidalvolumina von ungefähr 10 μ l/g Körpergewicht und einer Respirationsrate von 130-150 Atemzügen pro Minute gewählt. Der Frischgaszufluss am Flowmeter betrug 0,2 l/min Sauerstoff, um die Funktion des nachgeschalteten Anästhesiegassystems nicht durch zu geringen Frischgasflow zu beeinträchtigen (Römer, 2003). Die Isoflurankonzentration wurde zu Beginn auf 2% eingestellt und anschließend unter Beachtung ausreichender Anästhesietiefe sukzessive bis auf 1% für den Zeitraum der Messung reduziert.

2.3.3 Operatives Prozedere/Vorgehen

Bei der Durchführung der EPU wurde eine intrakardiale Positionierung des Katheters via vaskulärem Zugang gewählt. Die im Folgenden beschriebene Katheterisierung erfolgte über die *Vena jugularis externa dextra*. Während der Intervention wurde der Isoflurananteil des Narkosegasgemisches am Vaporisator auf 1,5-2% eingestellt, unter Beachtung ausreichender Narkosetiefe. Analog des Versuchsaufbaus der beschriebenen EKG-Studien wurde wiederum über 29-Gauge Nadelelektroden ein Oberflächen-EKG nach Einthoven abgeleitet. Neben Herzrhythmus und -frequenz wurde die Körperkern-temperatur über einen rektal eingeführten Temperatursensor überwacht. Über das Temperaturkontrollmodul und die damit verbundene Wärmeplatte wurde die gewünschte Körpertemperatur von ungefähr 37 °C reguliert.

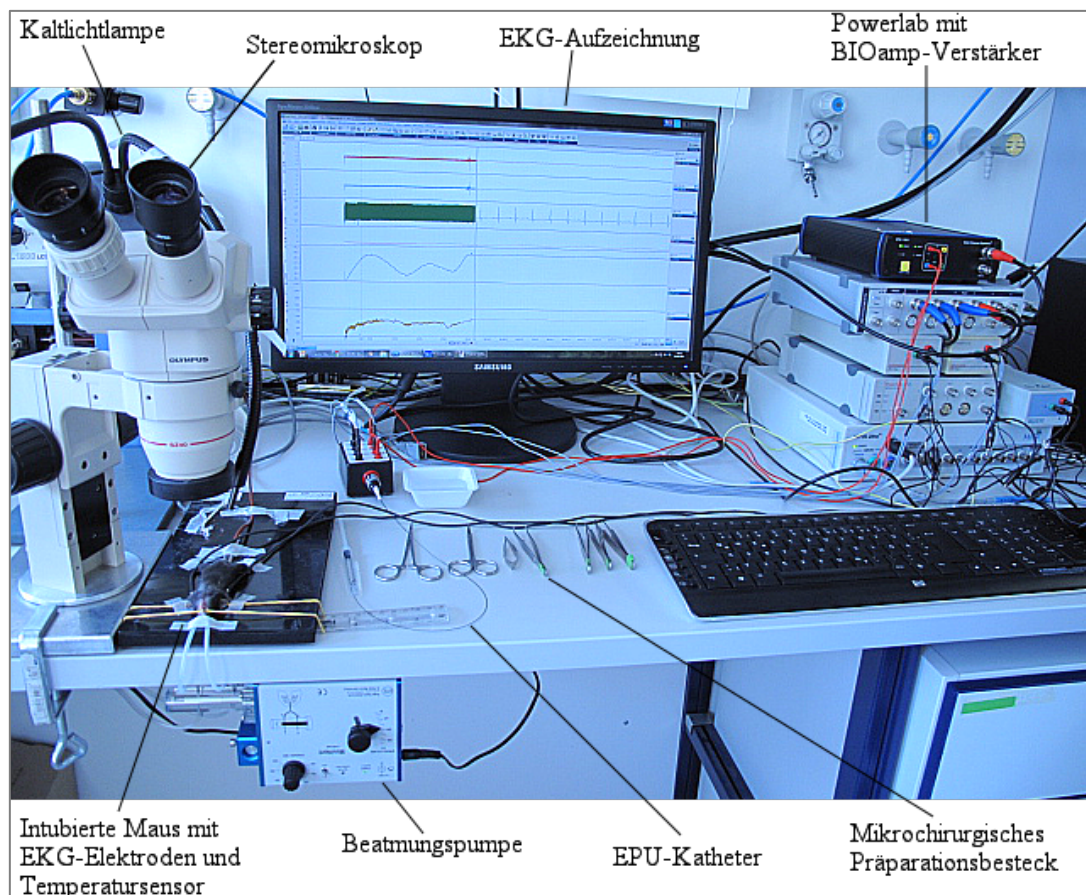


Abb. 15: EPU-Arbeitsplatz

In der Bildmitte befindet sich der Monitor zur EKG-Aufzeichnung mit den unterschiedlichen Ableitungskanälen. Links davon ist unter dem Operationsmikroskop eine intubierte Maus mit angeschlossenen EKG-Elektroden und Temperatursensor auf einer Wärmeplatte fixiert zu sehen. Die Beatmungspumpe befindet sich an der Unterseite des Tisches. Das angeschlossene Anästhesiegassystem ist auf dem Bild nicht zu sehen. Der 1.1French octapolare Katheter ist in einer Einmalspritze mit isotonischer Kochsalzlösung gelagert. Daneben befindet sich das mikrochirurgische Instrumentarium. Rechts ist die Einheit zur EKG-Aufzeichnung, Verstärkung und Stimulation mit Powerlab und BIOamp-Verstärker abgebildet.

Nachdem das intraoperative Monitoring installiert, das hierfür notwendige Instrumentarium mittels Klebestreifen fixiert und ausreichende Anästhesie des Tieres sichergestellt wurde, folgte der eigentliche operative Eingriff. Das Operationsgebiet wurde zunächst mit einer Schermaschine enthaart und mittels Desinfektionsspray desinfiziert. Die Arbeit an dem grazen Mausegewebe erfolgte mikrochirurgisch unter dem Binokular nach Einstellen des Stereomikroskops. Mit einer feinen chirurgischen Schere wurde die zervikale Kutis für ungefähr 7 - 12 mm rechts des Jugulums inzidiert. Subkutanes Binde- und Fettgewebe wurde durch stumpfes Präparieren mit feinen Pinzetten vorsichtig disseziert, um die oberflächlich verlaufende *Vena jugularis externa* aufzufinden. Anschließend wurde die Vene von restlichem Bindegewebe befreit, isoliert dargestellt und mittels zweier chirurgischer Fäden (USP 8-0) angeschlossen. Die kraniale Ligatur wurde verknotet, um den störenden venösen Rückstrom ins OP-Gebiet zu unterbinden und das Gefäß zu fixieren. Die kardialwärts gelegene Umschlingung wurde mit einer Klemme fixiert und leicht angezogen, um eine unterstützende Führung bei der anschließenden Venotomie zu bekommen. Das fixierte Gefäß wurde mittels Mikroschere vorsichtig zwischen beiden Fäden venotomiert und der EPU-Katheter anschließend unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette in das Gefäßlumen eingeführt (Abb. 16). Der Katheter wurde vorsichtig gemäß des Gefäßverlaufs über die *Vena jugularis externa dextra*, die *Vena brachiocephalica dextra* und die *Vena cava superior* schließlich bis ins rechte Herz antegrad vorgeschoben. Bei leichtem Widerstand wurde der Katheter vor erneutem Vorschieben zunächst etwas zurückgezogen, um weder eine Perforation noch eine Dissektion der fragilen Gefäße zu provozieren. Nach korrekter Positionierung der Kathetersonde im Mäuseherzen, die im Folgenden beschrieben wird, wurde der Katheter mittels Ligatur in seiner Lage fixiert. Der fixierte Katheter war somit einsatzbereit für die elektrophysiologischen Untersuchungen.

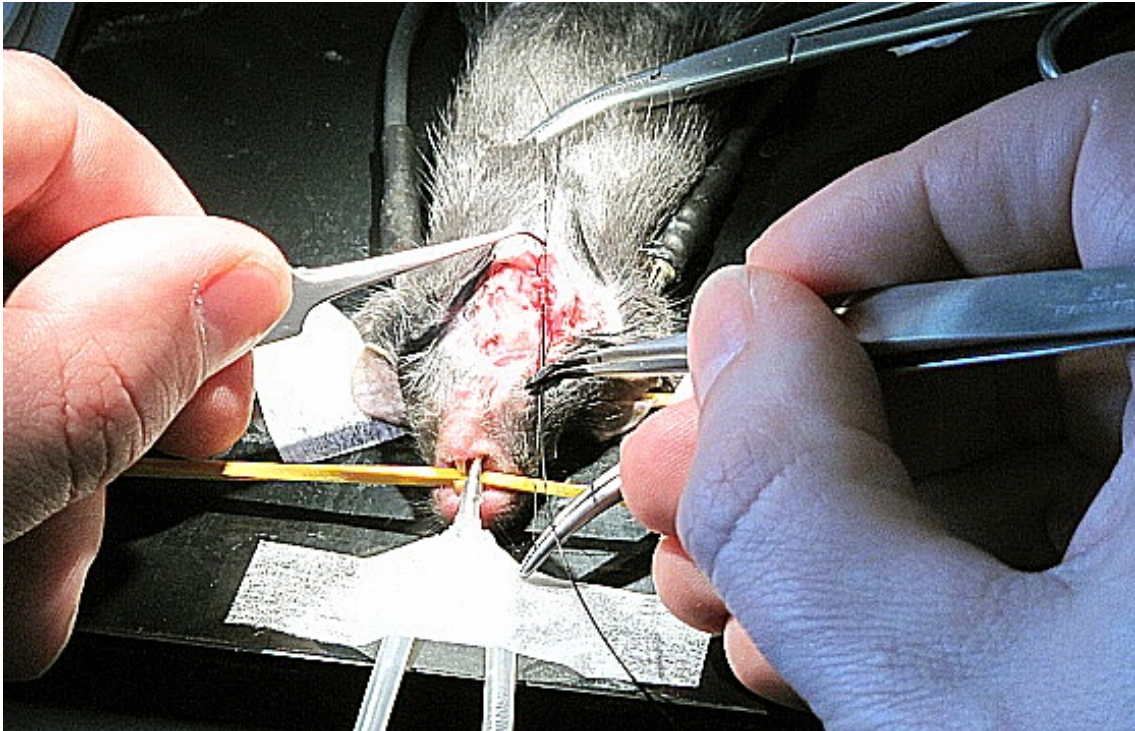


Abb. 16: EPU-Katheterisierung

*Dorsalfixierte und intubierte Maus mit rechtsjugulärer Inzision. Die Katheterisierung erfolgt nach Venotomie unter Sicht mittels mikrochirurgischer Pinzette (rechte Hand) via *V. jug. ext.*, wobei das Gefäß zur Fixierung mit einer Ligatur angeschlungen wurde (linke Hand). Im Folgenden wird der 1.1French octapolare Katheter vorsichtig entsprechend des Gefäßverlaufs antegrad bis in das rechte Herzen vorgeschoben.*

2.3.4 Datenakquisition und -analyse

Elektrophysiologische Untersuchungen erfolgten an intubierten, narkotisierten Mäusen unter Normothermie von ungefähr 37 °C. Während der EPU wurden kontinuierlich sowohl Oberflächen- als auch intrakardiale EKGs abgeleitet und über die Aufzeichnungssoftware LabChart 7.3 (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) aufgezeichnet. Erstere wurden analog der EKG-Untersuchungen bipolar nach Einthoven abgeleitet, gefiltert, amplifiziert und oszillographisch am Monitor dargestellt. Die intrakardialen Signale wurden ebenfalls *low-* (1 kHz) sowie *high-pass* (0,3 Hz) gefiltert, amplifiziert und oszillographisch dargestellt. Bei verwendetem EPU-Katheter handelte es sich um einen 1.1-French (0,37 mm OD) kleinen octapolaren Katheter (Scisense, London, Ontario, Kanada) (Abb. 17). Dieser ist durch acht konsekutiv angeordnete Platinelektroden von 0,25 mm und einem Interelektrodenabstand von 0,5 mm spezifiziert. Durch diese Anordnung konnte über die Elektroden an multiplen intrakardialen Lokalisationen abgeleitet und simultan elektrisch stimuliert werden.

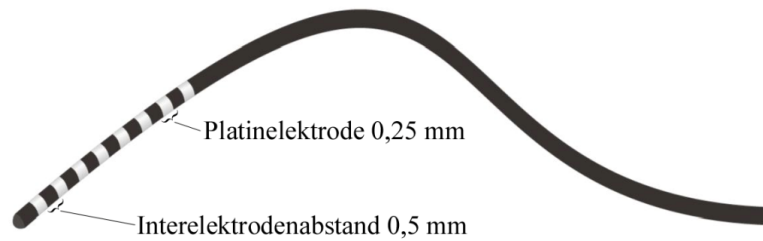


Abb. 17: EPU-Katheter

Das Schema des verwendeten 1.1-French (0,37mm OD) octapolaren EPU-Katheters zeigt acht konsekutiv angeordnete Platinelektroden von 0,25 mm Länge und einem Interelektrodenabstand von 0,5 mm; nach (Scisense-Inc, 2015)

Für die korrekte Datenerhebung wurde zunächst die intrakardiale Lage des Katheters dokumentiert (Abb. 18). Die gewünschte Positionierung des EPU-Katheters im Mäuseherzen erfolgte EKG-gesteuert. Hierbei wurden neben dem intrakardialen Signal auch die Extremitätenableitungen beachtet. Durch taktile Reizung des Vorhofendokards konnten Unregelmäßigkeiten des kardialen Rhythmus provoziert werden, sobald der Katheter in das rechte Atrium geführt wurde. Die intraatriale Lage konnte zudem durch Ableitung eines deutlichen Vorhofsignals bestätigt werden. Das Signal, welches über den EPU-Katheter abgeleitet wurde, stimmte in diesem Fall zeitlich mit der P-Welle des Oberflächen-EKGs überein, als Pendant der Vorhoferregung. Bei weiterem Vorschub des Katheters über die Klappenebene hinaus in den rechten Ventrikel fiel das Signal dagegen zeitlich auf den QRS-Komplex des Oberflächen-EKGs, als Pendant für die Kammererregung. Auch durch elektrische Stimulation über die Kathetersonde konnte deren Lage anhand des Oberflächen-EKGs bestimmt werden. Folgte auf den Stimulus eine P-Welle, lag der Stimulus im Bereich des Vorhofs. Folgte dagegen unmittelbar ein QRS-Komplex, lag er im Bereich des Ventrikels. Somit konnte die exakte Katheterlage für die entsprechenden Protokolle ermittelt werden.

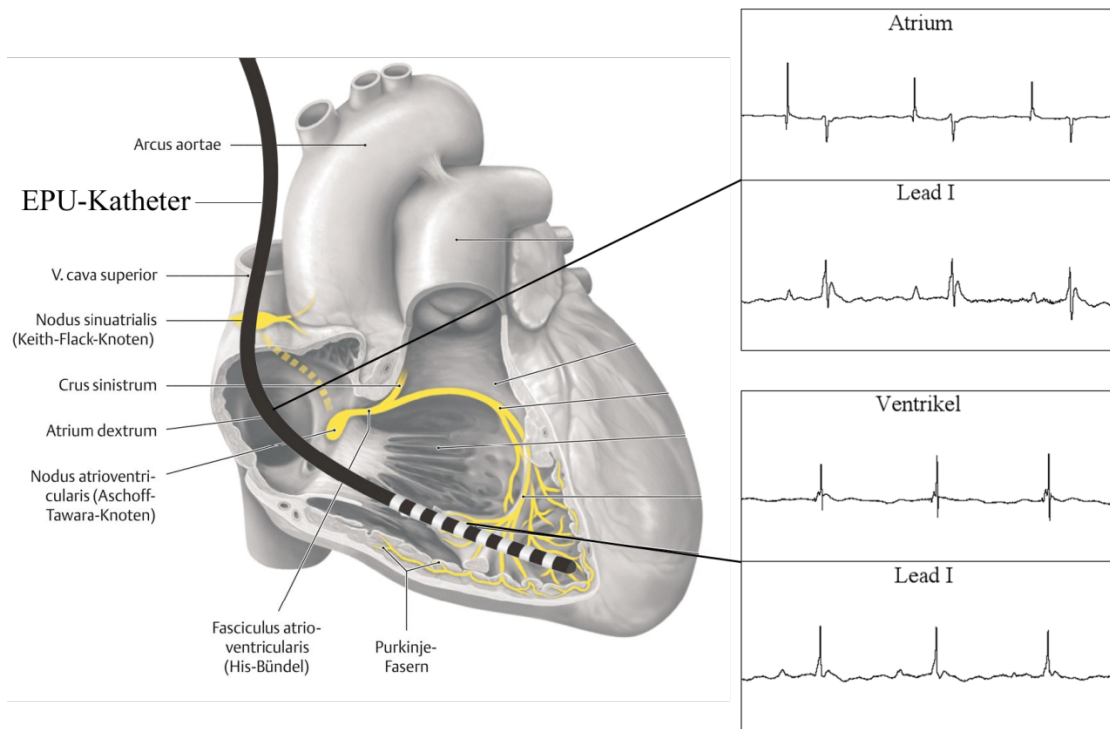


Abb. 18: Intrakardiale Lage des EPU-Katheters

Schematische Lage des EPU-Katheters nach transjugulärem Zugang mit Blick in das humane rechte Herz. Bei diesem Schema ist der Katheter bereits in den rechten Ventrikel vorgeschoben, wobei die proximale Katheterelektrode ebenfalls im rechten Ventrikel zu liegen kommt.

Rechts daneben sind exemplarisch EKG-Ableitungen zur Katheterlokalisierung zu sehen. Im oberen Kasten ist in der intrakardialen Ableitung (Atrium) ein deutliches Signal in Übereinstimmung mit der P-Welle des Oberflächen-EKGs (Lead I) zu sehen, was für eine Vorhof-Lokalisation der Katheterelektrode spricht. In dem unteren Kasten dagegen zeigt die intrakardiale Ableitung (Ventrikel) keinen deutlichen Ausschlag im Zusammenhang mit der P-Welle des Oberflächen-EKGs, jedoch ein deutliches Signal synchron zum QRS-Komplex. Dies steht für eine intrakardiale Lage der Katheterelektrode in der rechten Herzkammer; nach (Schünke et al., 2005)

2.3.5 EPU-Protokolle

Nachdem der Katheter ordnungsgemäß intrakardial installiert wurde, konnten die elektrophysiologischen Untersuchungen anhand folgender Protokolle nach kurzer Akklimatisationsphase durchgeführt werden. Diese standardisierten Protokolle wurden in Anlehnung an humane klinische EPU-Protokolle für murine Herzen entwickelt (Berul et al., 1996; Gehrmann et al., 2001; Appleton et al., 2004; Knollmann et al., 2007). EPU-Protokolle geben den genauen zeitlichen Ablauf der elektrischen Stimulation, den Ort der Stimulation sowie die Analyse der elektrokardiographischen Antwort auf den elektrischen Reiz an. Stimuliert wurde mit Hilfe von Stimulationssoftware und Stimulationsgenerator (beides Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland) über den Katheter in Form eines Impulses von 1 V über eine Impulsdauer von 500 μ s.

Vorab wurden analog zu den EKG-Untersuchungen zunächst basale EKG-Parameter unmittelbar vor der ersten Stimulationsserie erhoben. Neben der Herzfrequenz (HR) sowie der Zykluslänge, die hier als Dauer zwischen zwei aufeinanderfolgenden P-Wellen ermittelt wurde, wurden wiederum PR-Zeiten sowie die Dauer der P-Welle (Pdur) erhoben. Die anschließenden Stimulationsversuche wurden in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wurden Vorhofprotokolle durchgeführt, bei denen der EPU-Katheter im rechten Atrium lag. Hierbei wurden zunächst übliche Basisparameter der EPU wie die Sinusknotenerholzeit (SNRT) und die Wenckebach-Zykluslänge (WBT) untersucht (Berul et al., 1996). Im Folgenden wurden verschiedene Protokolle mit programmierten Vorhofstimulationen durchgeführt, um potentielle atriale respektive supraventrikuläre Arrhythmien zu induzieren. Neben Extrastimulationstechniken mit vorzeitig einsetzendem Stimulus wurden sogenannte Burst-Stimulationen durchgeführt, bei denen durch rapide Abfolge elektrischer Impulse das kardiale Reizleitungssystem maximal stimuliert wurde, um potentielle Arrhythmien auszulösen. Für den zweiten EPU-Abschnitt wurde der Katheter wie bereits beschrieben EKG-gesteuert bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Es schlossen sich Ventrikelprotokolle an. Diese bestanden zu weiten Teilen aus Protokollen, die analog zu den Vorhofprotokollen der Arrhythmieinduktion waren. Im Folgenden soll auf die einzelnen Protokolle genauer eingegangen werden. Nach Ablauf der EPU wurden die Versuchstiere im Rahmen des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durch zervikale Dislokation euthanasiert.

Atriumprotokolle

Während der Atriumprotokolle befand sich der EPU-Katheter im Bereich des rechten Atriums, um dort sowohl stimulieren als auch intrakardial ableiten zu können. Die Intention lag hierbei zum einen in der Analyse der Eigenschaften des Sinusknotenareals sowie des AV-Knotens, zum anderen in der Analyse der Induzierbarkeit von atrial ausgelösten Arrhythmien.

Sinusknotenerholzeit (SNRT)

Das Sinusknotenareal besitzt als primäres Zentrum der Erregungsbildung die höchste intrinsische Aktivität aller Erregungsbildungszentren des Herzens (Schmidt et al.,

2005). Damit übertrifft seine Frequenz unter physiologischen Bedingungen die Frequenzen der nachgeschalteten Zentren und supprimiert diese somit in ihrer Erregungsbildung (Lange, 1965). Bei der Ermittlung der Sinusknotenerholzeit oder auch *sinus node recovery time (SNRT)* wird durch Überstimulation des Vorhofs mit einer Frequenz, die über der des Sinusknotens liegt, die intrinsische Aktivität des Sinusknotens supprimiert. Nach der Stimulationsserie ist der Sinusknoten unter physiologischen Bedingungen wiederum die erste Instanz der Erregungsbildung, welche durch Automatiemechanismen die Initiation des folgenden Herzschlages übernimmt (Lange, 1965; Mandel et al., 1971). Dieses Zeitintervall bis zum Einsetzen der ersten spontanen Vorhofdepolarisation (p-Welle) nach atrialer Überstimulation wird als Sinusknotenerholzeit bezeichnet. In beschriebenem Versuch wurde jeweils über einen Zeitraum von zehn Sekunden stimuliert. Dabei betrug das Impulsintervall zunächst 100 ms, welches einer Frequenz von 600 bpm entspricht. Anschließend wurde das Impulsintervall auf 85 ms beziehungsweise 75 ms reduziert, entsprechend den Frequenzen von 700 bpm beziehungsweise 800 bpm. Anschließend wurde die SNRT als Zeitintervall bis zur ersten spontanen p-Welle des Oberflächen-EKGs nach dem letzten Stimulus gemessen (Abb. 19).

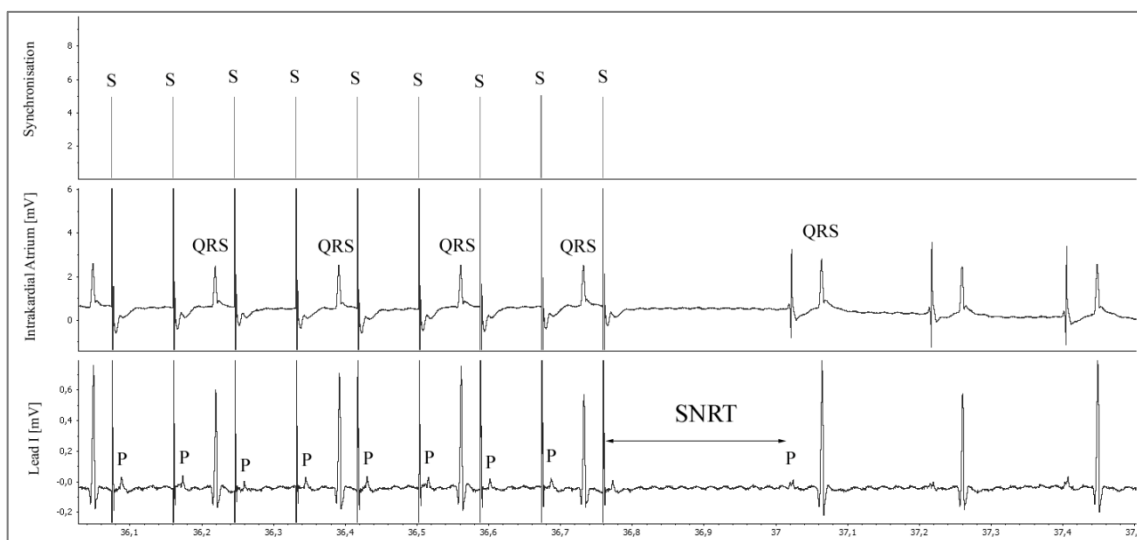


Abb. 19: Sinusknotenerholzeit (SNRT)

Die Sinusknotenerholzeit ist bei einem Stimulationsintervall von 85 ms (700 bpm) bei einer WT-Maus dargestellt. Gut zu erkennen ist die atriale Lage des Katheters aufgrund der folgenden p-Welle nach jedem Stimulus. Die SNRT ist die Zeit zwischen der letzten Stimulation und der ersten spontan einsetzenden erneuten Vorhofdepolarisation; (S=Stimulus, QRS=QRS-Komplex, P=P-Welle)

Wenckebachpunkt (WBP)

Zur Analyse der atrioventrikulären Überleitung wurden Wenckebachtests durchgeführt. Hierbei wurden vornehmlich Konduktionseigenschaften des AV-Knotens (*Nodus atrioventrikularis*) beurteilt. Im hierarchischen Schrittmachersystem des Herzens gilt der AV-Knoten als sekundärer Schrittmacher, welcher der intrinsischen Aktivität des Sinusknotens untergeordnet ist (Schmidt et al., 2005). Unter physiologischen Bedingungen besteht seine Aufgabe primär in der atrioventrikulären Übertragung der kardialen Erregung. Diese Übertragung erfolgt mit einer zeitlichen Verzögerung (James, 1961), wodurch ein gewisser Schutz des Ventrikelmyokards vor Überstimulation durch supraventrikuläre Zentren gegeben ist. Ab einer bestimmten Frequenz ankommender Erregungswellen aus übergeordneten Zentren des Vorhofs kommt es durch die Verzögerung im AV-Knoten also nicht mehr zu einer 1:1 Überleitung an das Ventrikelmyokard. Die Ventrikeldepolarisation bleibt aus. Dieses Prinzip wurde bei der Bestimmung des WBP zu Nutze gemacht. Der Vorhof wurde für jeweils 30 Schläge bei steigender Frequenz stimuliert. Begonnen wurde mit einem Stimulationsintervall von 100 ms, das einer Frequenz von 600 bpm entspricht. Anschließend wurde das Stimulationsintervall sukzessive um 2 ms reduziert, bis ein Intervall von 50 ms erreicht wurde. Dies entspricht einer Frequenz von 1200 bpm. Als WBP konnte nun dasjenige Stimulationsintervall bestimmt werden, bei welchem eine 1:1 Überleitung an das Ventrikelmyokard aufgehoben und somit erstmalig eine Ventrikelerregung blockiert wurde. Elektrokardiographisch wurde dieses Ausbleiben der Kammererregung an einem fehlendem QRS-Komplex auffällig (Abb. 20).

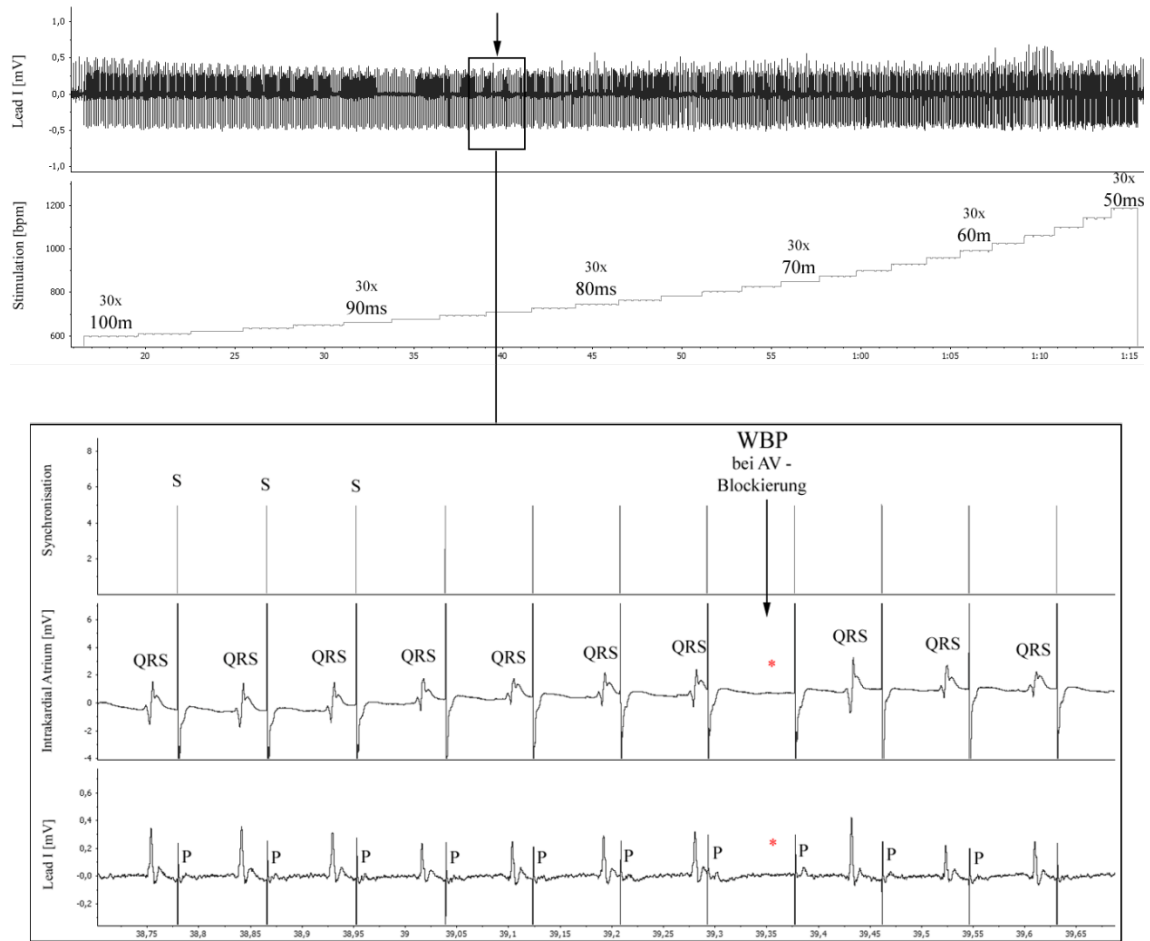


Abb. 20: Wenckebachtest

Obere Abbildung zeigt in der Übersicht die Stimulationsabfolge zur Bestimmung des Wenckebachpunktes. Die stufenförmige Anordnung repräsentiert den sukzessiven Frequenzanstieg der Stimulationsblöcke à 30 Schlägen mit jeweils um 2 ms verkürzten Stimulationsintervallen. Der Pfeil markiert die Stelle des Wenckebachpunktes, welcher in der unteren Abbildung vergrößert dargestellt ist.

Die vergrößerte Abbildung zeigt die Ermittlung des WBP bei erstmaligem Ausbleiben einer AV-Überleitung. Mit rotem Stern markiert ist das Fehlen des QRS-Komplexes durch Leitungsblockierung im AV-Knoten nach ankommender Erregung aus externer Stimulation. Gut zu beobachten ist die prolongierende PQ-Zeit der vorangehenden Schläge bis zur AV-Blockierung mit Ausbleiben des Kammerkomplexes; WBP=Wenckebachpunkt, S=Stimulus, QRS=QRS-Komplex, P=P-Welle)

Programmierte Vorhofstimulation nach Knollmann (Knoll_A)

Ziel der programmierten Vorhofstimulation nach Knollmann (Knoll_A) (Knollmann et al., 2007) war die Induktion von Rhythmusstörungen und ihre anschließende Analyse. Insbesondere tachykarde Rhythmusstörungen können mit Hilfe von Extrastimulationstechniken oder Burst-Stimulationen provoziert werden (Wakimoto et al., 2001). Ein wesentlicher Faktor ist hierbei das vorzeitige Eintreffen eines externen Stimulus in die vulnerable Phase des Erregungszyklus mit relativer Refraktarität. In dieser Phase ist das Myokard nur zum Teil bereits wieder erregungsfähig, während ein anderer Teil noch

refraktär ist. Somit können inhomogene Depolarisationskaskaden in Form kreisender Erregungen zu tachykarden Rhythmusstörungen führen (Starmer, 2006). Das Spektrum reicht hierbei von singulären Extrasystolen bis hin zu komplexeren Arrhythmien wie Flattern oder Flimmern. Durch die bereits beschriebene Leitungsverzögerung und somit Filterung im AV-Knoten bleiben diese Arrhythmien bei atrialer Stimulation üblicherweise auf supraventrikulärer Ebene. Bei dem durchgeführten Protokoll nach Knollmann handelte es sich um ein Extrastimulationsprotokoll. Dabei wurde zunächst über 30 Schläge mit einer Basisfrequenz von 600 bpm (S1) stimuliert, die einer Basiszykluslänge von 100 ms entspricht. Im Anschluss folgte ein vorzeitig einsetzender Extrastimulus mit einer Kopplungslänge von 50 ms (S2), gefolgt von drei weiteren Extrastimuli mit nochmals verkürztem Kopplungsintervall von 30 ms (S3) (Knollmann et al., 2007). Anschließend wurde die potentielle Auslösung von Arrhythmien analysiert (Abb. 21).

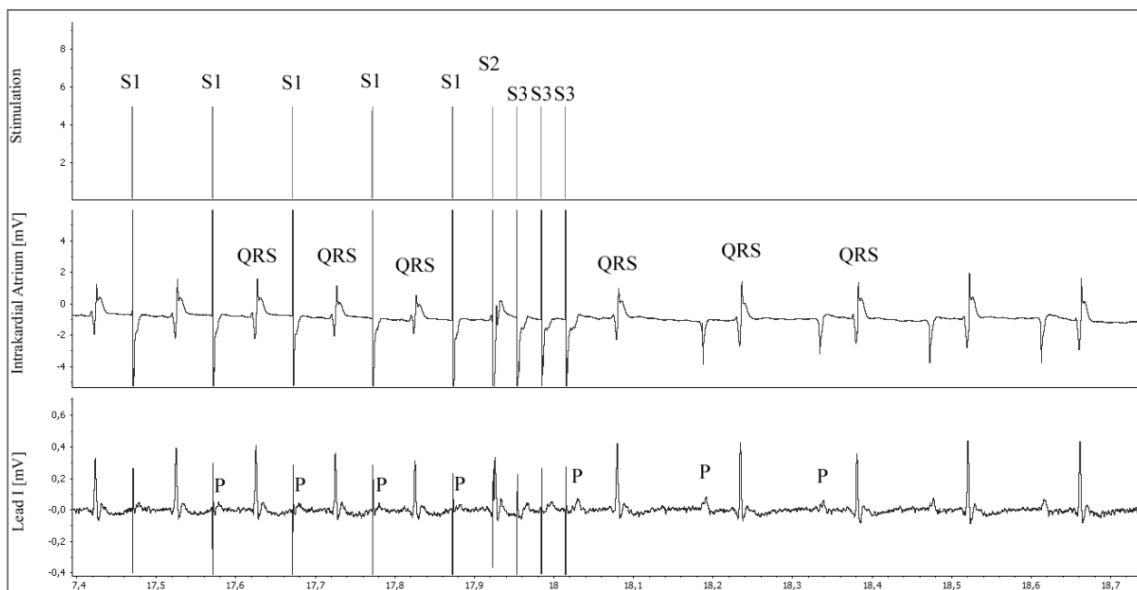


Abb. 21: Programmierte Vorhofstimulation (Knollmann_A)

Gezeigt ist die Stimulation des Vorhofprotokolls nach Knollmann_A bei einer WT-Maus. Nach 30 Schlägen mit der Basiszykluslänge von 100 ms (S1) folgen ein vorzeitig einsetzender Schlag (S2) mit einem Kopplungsintervall von 50 ms sowie 3 weitere Extrastimuli nach jeweils 30 ms (S3). In vorliegendem Beispiel zeigt sich ein unauffälliges EKG im Anschluss an die Stimulationsserie mit Übergang in den Sinusrhythmus bei einer WT-Maus; P=P-Welle, QRS=QRS-Komplex)

Atriale Burst-Stimulation (AFI, AFI₂)

Die Intention der atrialen Burst-Stimulationen lag analog zur programmierten Vorhofstimulation nach Knollmann in der Induktion und Analyse potentieller Arrhythmien.

Hierbei fanden zwei Protokolle mit den Namen *Atrial Fibrillation Induction* (AFI) sowie *Atrial Fibrillation Induction 2* (AFI₂) Anwendung. Bei Protokoll AFI₂ handelte es sich lediglich um eine Erweiterung von AFI. Die Burst-Stimulationen wurden in Stimulationsblöcken von je fünf Sekunden mit festgelegtem Impulsintervall durchgeführt. Daraufhin wurde ein impulsfreies Intervall von 30 Sekunden angeschlossen, bevor im folgenden Stimulationsblock das Impulsintervall reduziert wurde. Begonnen wurde bei beiden Protokollen mit einem Impulsintervall von 50 ms, das in den folgenden Blöcken auf 33 ms, 25 ms und schließlich auf 20 ms reduziert wurde. Im AFI₂-Protokoll wurde die Reduktion des Impulsintervalls auf 15 ms sowie 10 ms erweitert. Somit ergaben sich bei dem AFI₂-Protokoll sechs Stimulationsblöcke à fünf Sekunden mit 30 sekündiger Pause, während das AFI-Protokoll bereits nach vier Blöcken beendet wurde. Im Anschluss wurden wiederum potentielle Rhythmusstörungen analysiert.

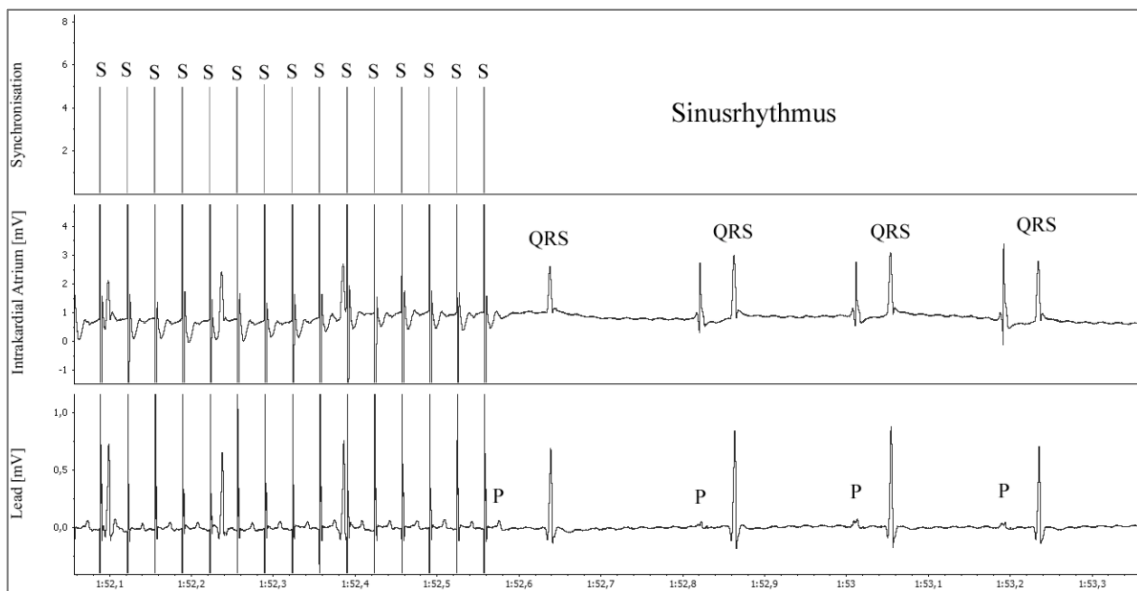


Abb. 22: Burst-Stimulation AFI

Gezeigt ist der zweite Stimulationsblock des AFI-Protokolls mit einem Impulsintervall von 33 ms und anschließendem Übergang in einen Sinusrhythmus zu Beginn des 30 sekündigen stimulationsfreien Intervalls bei einer WT-Maus; S=Stimulus, P=P-Welle, QRS=QRS-Komplex)

Ventrikelprotokolle

Im zweiten Abschnitt der EPU wurde der Katheter unter EKG-Kontrolle in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Es schlossen sich die Protokolle zur Stimulation der Ventrikel an. Diese waren in den Impulssequenzen zu weiten Teilen analog zu den Vorhofprotokollen Knollmann_A, AFI sowie AFI₂. Der Unterschied bestand lediglich im Lokus der

Stimulation. Dementsprechend wurden sie als Ventrikelstimulationsprotokoll nach Knollmann (Knollmann_v), als ventrikuläre Burst-Stimulationsprotokolle *Ventricular Fibrillation Induction* (VFI) sowie als *Ventricular Fibrillation Induction 2* (VFI₂) bezeichnet. Erweitert wurde das Spektrum der Kammerprotokolle um eine weitere Burst-Stimulationsabfolge, dem Ventrikelschnelltest (VST). Alle Protokolle zur Stimulation des rechten Ventrikels dienten der Analyse der Induzierbarkeit von ventrikulär ausgelösten Arrhythmien bei Scn^{+/-}-Mutanten im Vergleich zu wildtypischen Mäusen.

Ventrikelschnelltest (VST)

Der Ventrikelschnelltest umfasste ein EPU-Protokoll zur Stimulation der Ventrikel im Sinne einer Burst-Stimulation. Wie bereits bei den Vorhofprotokollen beschrieben, handelte es sich dabei um eine Überstimulation des Myokards mit rapiden Impulssequenzen, um Rhythmusstörungen zu provozieren. Grundlage der möglichen Arrhythmieinduktion lag hierbei wiederum in dem vorzeitigen Eintreffen eines elektrischen Impulses in die vulnerable Phase der Erregungsrückbildung (Surawicz, 1971; Shepard et al., 1999). Nach Moore and Spear (1975) kann die Asynchronität der Erregbarkeit des Gewebes in dieser Phase zu inhomogenen Depolarisationswellen führen. Über sogenannte *reentry*-Mechanismen kann diese unorganisierte Depolarisation des Ventrikelmyokards zu kreisenden Erregungen mit Rhythmusstörungen bis hin zu Kammerflimmern führen (Moore und Spear, 1975). Der Ventrikelschnelltest beinhaltete sieben Blöcke mit jeweils 15 rapiden Stimuli. Das Stimulationsintervall wurde wiederum sukzessive von Block zu Block reduziert. Zu Beginn wurde mit einem Stimulationsintervall von 50 ms stimuliert. Das Intervall wurde daraufhin im jeweils folgenden Block um fünf Millisekunden reduziert, bis ein minimales Intervall von 20 ms erreicht wurde. Zwischen den Blöcken erfolgte eine Stimulationspause von zehn Sekunden, in der potentielle Arrhythmien erfasst und analysiert werden konnten (Abb. 23).

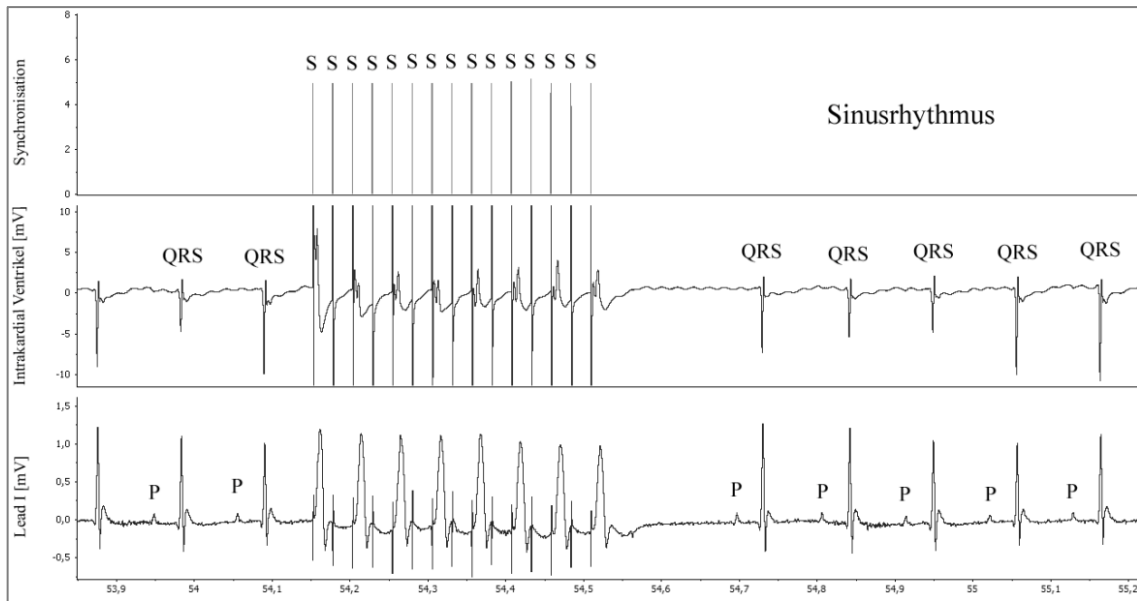


Abb. 23: Ventrikelschnelltest VST

Stimulationsblock mit 15 Stimuli bei einem S-S-Intervall von 25 ms. Anschließender Übergang in einen Sinusrhythmus während der 10 sekündigen stimulationsfreien Pause bei einer WT-Maus; S=Stimulus, P=P-Welle, QRS=QRS-Komplex)

2.4 Hyperthermie-Versuche (EKG/EPU)

Bei den Hyperthermie-Versuchen handelte es sich um eine Kombination aus den bereits ausführlich beschriebenen EKG- sowie EPU-Versuchen. Der Unterschied bestand darin, dass die bereits beschriebenen Versuche ausschließlich unter physiologischer Körperkerntemperatur von ungefähr 37 °C durchgeführt wurden, während die Körperkerntemperatur bei den Hyperthermie-Versuchen auf 39,5 °C gesteigert wurde. Hyperthermie, wie sie beispielsweise bei Fieber auftritt, wurde induziert, um die Temperaturabhängigkeit des kardialen Phänotyps der heterozygot $Na_v1.1$ -depressiven Mäuse zu analysieren. Temperatursensitivität wurde bereits bei einigen Natriumkanalisoformen beobachtet (Volkers et al., 2013). Unter anderem wurden kardiologische Veränderungen im Zusammenhang mit dem $Na_v1.5$ -Kanal beim *Brugada-Syndrom* beschrieben (Keller et al., 2006; Chockalingam et al., 2011; Hassink et al., 2014). Auch bei der *primären Erythromelalgie* führt Wärmeexposition zu Kanaldysfunktion. Hierbei kommt es durch temperaturabhängige Störung des $Na_v1.9$ zu typischen Symptomen mit einschließend brennendem Schmerz, Rötung und Schwellung im Bereich der Extremitäten (Amin et al., 2010). Auf neuronaler Ebene wurden ebenfalls temperaturbedingte Veränderungen der Elektrophysiologie von Natriumkanälen beobachtet. Über temperaturabhängige

Dysfunktionen des $\text{Na}_v1.1$ -Kanals kommt es dabei zu fieberinduzierten epileptischen Anfällen bei SMEI-Patienten (Oakley et al., 2009; Mashimo et al., 2010). Bei durchgeführtem Hyperthermie-Versuch lag die Intention deshalb darin, einen temperaturbedingten Einfluss des $\text{Na}_v1.1$ -Knockouts auf den kardialen Phänotypen insgesamt und im Besonderen eine mögliche Arrhythmogenese bei $\text{Scn1a}^{+/-}$ -Mutanten unter temperierten Bedingungen zu beschreiben.

2.4.1 Materialien, Chemikalien, Hard- und Software

Bei den Hyperthermie-Versuchen handelte es sich im Wesentlichen um eine Kombination der elektrokardiographischen und elektrophysiologischen Untersuchungen. Verwendete Utensilien deckten sich deshalb mit den ausführlichen Auflistungen der bereits beschriebenen Untersuchungen. Zur Induktion der Hyperthermie wurde das Temperaturkontrollmodul um einen Keramik-Infrarotheizstrahler 50 W (TRIXIE Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Tarp, Deutschland) erweitert. Dieser sorgte nach Anschluss an das Temperaturkontrollmodul zusammen mit einem rektalen Temperatursensor und einer Heizplatte für kontrollierte Erwärmung der Körperkern-temperatur auf 39,5 °C.

2.4.2 Narkose mittels Isofluran

Die Tiere wurden bei den Hyperthermie-Versuchen analog der EPU via Intubationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Zunächst wurde die Narkose wiederum in einer verschließbaren transparenten Acrylkammer eingeleitet, bevor sich die Intubation per direkter Laryngoskopie anschloss. Das weitere Vorgehen sowie das folgende Respirationssetting waren ebenfalls identisch mit dem bereits beschriebenen Setting der EPU.

2.4.3 Datenakquisition und -analyse

Die Datenerhebung startete unter physiologischer Körpertemperatur von ungefähr 37 °C nach erfolgreicher Anästhesie und kurzer Akklimatisationsphase. Begonnen wurde mit bipolarer Ableitung der Oberflächen-EKGs nach Einthoven wie bereits bei den EKG-

Untersuchungen beschrieben. Das technische Vorgehen sowie die Einstellungen zu Signalfilterung und -amplifizierung waren dabei ebenfalls identisch. Nach zehnmütiger EKG-Aufzeichnung wurden elektrophysiologische Untersuchungen bei 37 °C angeschlossen. Hierbei wurde zunächst das operative Prozedere der EPU mit atrialer Katheterisierung durchgeführt und anhand der EPU-Protokolle des Atriums verfahren. Daraufhin wurde der octapolare Katheter EKG-gesteuert im rechten Ventrikel platziert und es erfolgte das weitere Vorgehen anhand der Ventrikelprotokolle. Nach Abschluss der EPU-Protokolle unter Normothermie folgte der eigentliche Hyperthermietest. Dabei wurde zunächst ein Ruhe-EKG für die Dauer von ungefähr zehn Minuten bei physiologischer Körpertemperatur aufgezeichnet, bevor Hyperthermie von 39,5 °C induziert wurde. Die Bewärmung der Mäuse erfolgte unter dynamischer Temperaturregelung mit Hilfe der Wärmeplatte und der Keramik-Infrarotlampe bis zu einem Sollwert von 39,5 °C Körperkerntemperatur. Das Erwärmen erfolgte dabei unter kontinuierlicher EKG-Aufzeichnung und Temperaturkontrolle mittels Rektalsensor. Die elektrokardiographische Aufzeichnung wurde für weitere fünfzehn Minuten bei hyperthermer Körpertemperatur fortgeführt. Als letzter Versuchspunkt wurde eine abschließende elektrophysiologische Untersuchung mit intraventrikulärer Katheterlage vorgenommen, um eine mögliche Arrhythmieinduktion unter gesteigerter Körperkerntemperatur zu evaluieren. Im Anschluss an die Datenerhebung belief sich die Auswertung der EKGs auf wiederum jeweils zwei Minuten unter physiologischer sowie hyperthermer Körpertemperatur von $39,5 \pm 0,2$ °C. Dabei wurden übliche EKG-Parameter erhoben wie bereits bei den EKG-Untersuchungen beschrieben (HR, RR, PR, Pdur, PP, QRS, QT, QT⁺, QT_{Bazett}, QT_{Fridericia}). Die Auswertung der EPU-Protokolle erfolgte nach den Schemata, welche ebenfalls bereits ausführlich beschrieben wurden.

2.5 Arrhythmie-Score

Die Analyse der ausgelösten Arrhythmien während der Stimulationsprotokolle der EPU und der Hyperthermie-Versuche erfolgte anhand eines einheitlichen Systems zur Klassifizierung und Auswertung von Rhythmusstörungen. Um den Schweregrad einer Arrhythmie zu bestimmen, verschiedene Arrhythmien zu quantifizieren und miteinander vergleichen zu können, wurden bereits einige Einteilungen vorgenommen (Lown und Wolf, 1971; Bigger und Weld, 1981; Walker et al., 1988). Dabei gilt es unter anderem

den Initiationslokus (Atrium/Ventrikel), die Anzahl und Dauer der Episoden, die Termination (spontan/nicht spontan) sowie die Reproduzierbarkeit der ausgelösten Arrhythmie zu beachten (Miller et al., 2012). In vorliegender Arbeit wurde ein System in Anlehnung an den Arrhythmie-Score von Wu et al. (2002) angewandt, der bei Elten (2014) modifiziert wurde. Dabei wurde den verschiedenen Arrhythmien ein numerischer Wert zugeordnet, welcher bei zunehmendem Schweregrad der Rhythmusstörung anstieg. Es wurden sechs Gruppen von 0 bis 5 Punkten eingeteilt (Tab. 6). Hierbei galt ventrikuläres Flimmern schwerwiegender als andere ventrikuläre Tachykardien und diese wiederum galten schwerwiegender als singuläre ventrikuläre Extrasystolen (Curtis und Walker, 1988). Insgesamt galten tachykarde Rhythmusstörungen ventrikulären Ursprungs schwerwiegender als diejenigen mit supraventrikulärem Ursprung. Die Bewertung wurde hierarchisch aufgebaut, sodass der eingetragene Wert eines Versuchstieres dem maximal erreichten Score der bewerteten Arrhythmien des Tieres entsprach.

Tab. 6: Arrhythmie-Score
modifiziert nach (Elten, 2014)

Arrhythmieform	Score
Keine Arrhythmie	0
Extrasystole (<i>SVES</i> : supraventrikulär; <i>VES</i> : ventrikulär)	1
Supraventrikuläre Tachykardie (<i>SVT</i> : Vorhofflattern, Vorhofflimmern, Sinustachykardie nach Stimulation, Akzeleration/Dezeleration); Ventrikuläres Couplet	2
Ventrikulärer Bigeminus/Trigeminus; Ventrikuläres Triplet; Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie ($nsVT > 3$ konsek. vorzeitige ventr. Schläge)	3
Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie ($nsVT \geq 10$ konsek. vorzeitige ventr. Schläge)	4
Ventrikuläres Flimmern (Kammerflimmern)	5

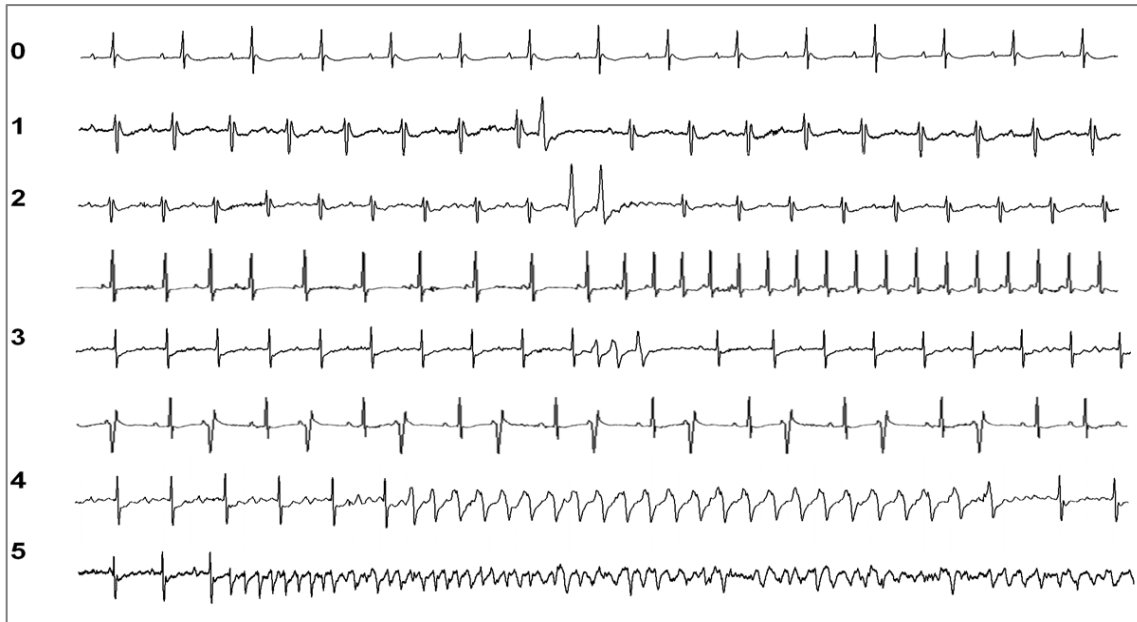


Abb. 24: Arrhythmiescore

Repräsentativ sind Beispiele der verschiedenen Score-Gruppen gezeigt. 0: keine Arrhythmie; 1: Extrasystole (hier VES); 2: Ventrikuläres Couplet/ Supraventrikuläre Tachykardie (SVT); 3: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie ($nsVT >3$)/ Bigeminus; 4: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie ($nsVT \geq 10$); 5: Kammerflattern und -flimmern; aus (Elten, 2014)

2.6 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Computersoftware OriginPro 2015G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) sowie Microsoft Office EXCEL (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Bei allen Versuchen wurden heterozygote $Scn1a^{+/-}$ -Mäuse mit altersentsprechenden wildtypischen $Scn1a^{+/+}$ -Mäusen verglichen. Die parametrischen Daten wurden jeweils als Mittelwert (*mean*) mit zugehöriger Standardabweichung (*SD*) angegeben. Die Mittelwerte der EKG-Parameter beider Stichproben wurden anhand eines zweiseitigen ungepaarten *Student's t-Tests* verglichen. Zuvor wurde jeweils Varianzhomogenität durch den *F-Test* geprüft. Die statistische Analyse der elektrophysiologischen Parameter erfolgte ebenso anhand eines zweiseitigen ungepaarten *Student's t-Tests*. Die postulierte Nullhypothese besagte Gleichheit zwischen den beiden Stichproben. Die Alternativhypothese wurde als Ungleichheit zwischen beiden Stichproben vorausgesetzt. Nichtparametrische Daten im Hinblick auf die Arrhythmieeigung wurden mit Hilfe von Kontingenztafeln statistisch untersucht. Neben dem *Chi-Quadrat-Test nach Pearson* kam dabei der *Exakte Fisher Test* zum Einsatz. Während der *Chi-Quadrat-Test* bei ausreichender Stichprobengröße

valide Ergebnisse erzielt, ist der *Exakte Fisher Test* bei geringerer Stichprobengröße zu bevorzugen. Um die Zuverlässigkeit der statistischen Aussage bei kleineren Stichprobengrößen zu gewährleisten, wurde deshalb der *Chi-Quadrat-Test* durch den *Exakten Fisher Test* ergänzt. Ausschlaggebend bei der Wahl des angewandten Testverfahrens war der Wert der erwarteten Häufigkeiten und damit indirekt der Umfang der Stichprobengröße. Lagen die erwarteten Häufigkeiten der einzelnen Felder ≥ 5 , wurde der *Chi-Quadrat-Test nach Pearson* angewandt. Unterschritten die erwarteten Häufigkeiten dagegen den geforderten Wert 5, wurde der *Exakte Fisher Test* anstelle des *Chi-Quadrat-Tests* zur statistischen Berechnung nichtparametrischer Daten herangezogen. Statistische Signifikanz wurde bei allen Tests mit einem p-Wert (*p-value*) von $<0,05$ festgelegt. Ein p-Wert von $<0,01$ galt darüber hinaus als sehr signifikant, $<0,001$ als hochsignifikant.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchungen dargestellt, bevor die Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche erläutert werden. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Hyperthermietests betrachtet.

3.1 EKG

Während elektrokardiographischer Untersuchungen wurden bei insgesamt 22 Mäusen im Alter zwischen 70 bis 80 Tagen EKG-Parameter erhoben. Unter den Mäusen befanden sich 11 wildtypische Mäuse (WT) sowie 11 heterozygote *Scn1a*^{+/-}-Mutanten (HET). Bei ihnen wurden Oberflächen-EKGs sowohl in Ruhe als auch unter Stresssimulation mittels Isoproterenolstimuli durchgeführt. Bei der Auswertung fanden nur Tiere mit einer repräsentativen Herzfrequenz von > 400 bpm Beachtung.

3.1.1 Ruhe-EKG

Die Ergebnisse der EKG-Untersuchungen unter Ruhebedingungen werden vorab tabellarisch aufgelistet (Tab. 7). Im Anschluss werden die gemessenen EKG-Parameter erläutert und für bessere Anschaulichkeit graphisch dargestellt (Abb. 25).

Tab. 7: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen.

*Avertinnarkose, Mäusealter P70-80; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant*

<i>Parameter</i>	<i>WT</i>	<i>HET (Scn1a^{+/-})</i>	<i>p-Value</i>
<i>HR [bpm]</i>	456,07 ± 28,18	454,76 ± 28,73	0,81
<i>RR [ms]</i>	132,03 ± 7,81	132,42 ± 7,79	0,80
<i>PR [ms]</i>	37,32 ± 2,46	35,99 ± 2,65	0,0096**
<i>Pdur [ms]</i>	18,63 ± 5,27	17,50 ± 4,93	0,26
<i>PP [ms]</i>	132,04 ± 8,27	133,14 ± 7,97	0,49
<i>QRS [ms]</i>	15,74 ± 0,86	15,88 ± 1,64	0,59
<i>QT [ms]</i>	58,15 ± 6,39	53,30 ± 3,80	0,000017***
<i>QT+ [ms]</i>	36,32 ± 1,66	33,53 ± 3,78	0,0000036***

<i>Parameter</i>	<i>WT</i>	<i>HET (Scn1a^{+/-})</i>	<i>p-Value</i>
<i>QT_{Bazett} [ms]</i>	160,31 ± 18,34	146,52 ± 8,49	0,000010***
<i>QT_{Fridericia} [ms]</i>	114,32 ± 12,79	104,58 ± 6,38	0,0000097***
Anzahl	6	7	

Die gemessene mittlere Herzfrequenz der wildtypischen Mäuse erwies sich in Ruhe nahezu identisch mit der mittleren Herzfrequenz der Scn1a^{+/-}-Mutanten (WT: 456,07 ± 28,18 vs. HET: 454,76 ± 28,73 bpm; p=0,81). Entsprechend verhielt es sich mit dem reziproken Wert, dem RR-Intervall (WT: 132,03 ± 7,81 vs. HET 132,42 ± 7,79 ms; p=0,80) sowie mit dem PP-Intervall als weiteren zyklusbeschreibenden Parameter (132,04 ± 8,27 vs. 133,14 ± 7,97 ms; p=0,49). Die Zeiten der Vorhoferregung, P_{dur}, sowie der Kammererregung, QRS, zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen (WT: 18,63 ± 5,27 vs. HET: 17,50 ± 4,93 ms; p=0,26 und WT: 16,05 ± 0,86 vs. 15,88 ± 1,64 ms; p=0,57). Dahingegen war das PR-Intervall der Scn1a^{+/-}-Mäuse bei den Messungen signifikant verkürzt (WT: 37,32 ± 2,46 vs. HET 35,99 ± 2,65 ms; p=0,0096). Darüber hinaus erwiesen sich bei den heterozygoten Tieren sämtliche QT-Parameter während der Ruhe-EKG-Untersuchungen als signifikant verkürzt. Die QT-Zeit war mit 53,30 ± 3,80 ms bei den HET-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen mit 58,15 ± 6,39 ms hochsignifikant verkürzt (p=0,000017). Auch die QT₊-Zeit war mit 33,53 ± 3,78 ms versus 36,32 ± 1,66 ms in der WT-Gruppe hochsignifikant verkürzt (p=0,0000036). Ebenso erwiesen sich beide frequenzkorrigierten QT-Zeiten der heterozygoten Mäuse, QT_{Bazett} und QT_{Fridericia}, als hochsignifikant verkürzt (WT: 160,31 ± 18,34 vs. HET: 146,52 ± 8,49 ms; p=0,00001 und WT: 114,32 ± 12,79 vs. HET 104,58 ± 6,38 ms; p=0,0000097).

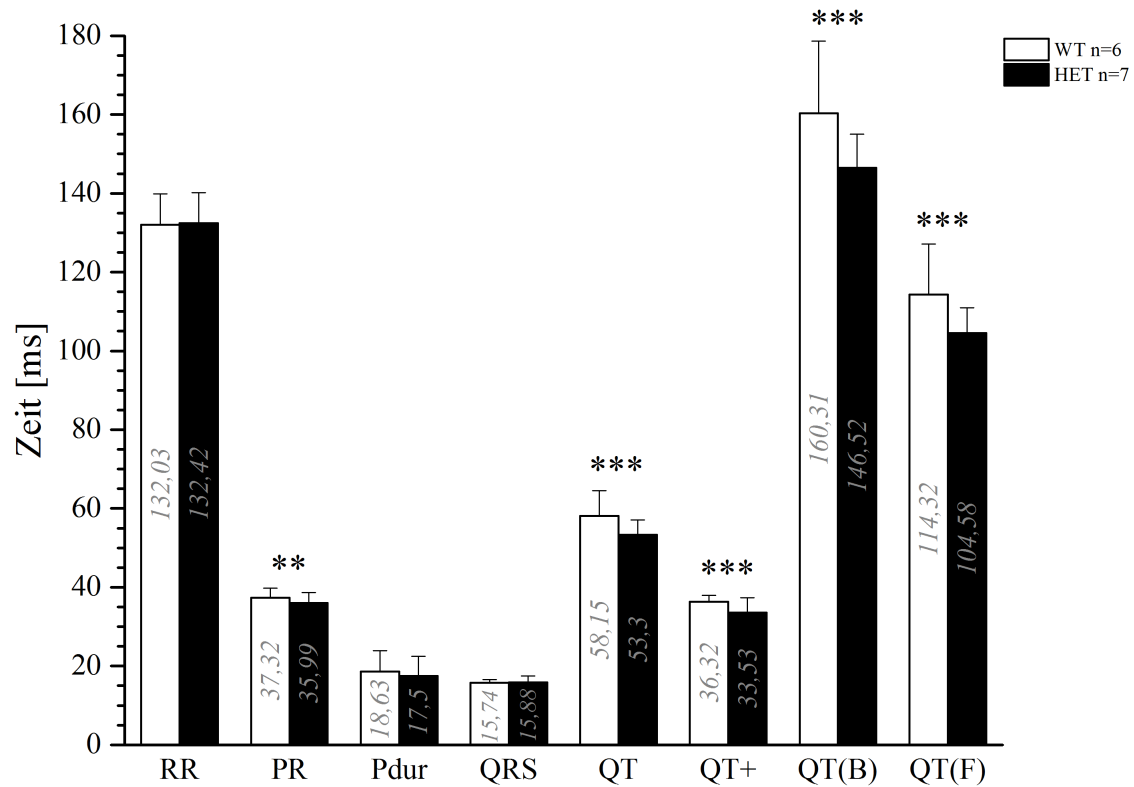


Abb. 25: EKG-Parameter Ruhebedingungen

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.1.2 Stress-EKG unter Isoproterenolstimulation

Die Ergebnisse der EKG-Untersuchungen unter pharmakologischem Stress mittels Isoproterenolstimuli sind ebenfalls zunächst tabellarisch aufgelistet (Tab. 8), bevor eine Erläuterung mit graphischer Darstellung der EKG-Parameter folgt (Abb. 26).

Tab. 8: Stress-EKG-Parameter unter Isoproterenolstimulation

Avertinnarkose, Mäusealter P70-80; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

Parameter	WT	HET (<i>Scn1a</i> ^{+/-})	p-Value
HR [bpm]	657,95 ± 16,53	669,97 ± 23,72	0,0031**
RR [ms]	91,25 ± 2,30	89,67 ± 3,20	0,0043**
PR [ms]	34,14 ± 1,67	32,01 ± 3,34	0,000065***
Pdur [ms]	16,16 ± 3,09	15,89 ± 2,27	0,62
PP [ms]	91,27 ± 2,28	89,79 ± 3,13	0,0065**
QRS [ms]	17,32 ± 2,35	16,12 ± 2,20	0,008**

<i>Parameter</i>	<i>WT</i>	<i>HET (Scn1a^{+/-})</i>	<i>p-Value</i>
<i>QT [ms]</i>	49,71 ± 5,13	48,56 ± 6,75	0,33
<i>QT⁺ [ms]</i>	29,55 ± 3,87	26,30 ± 4,17	0,000082***
<i>QT_{Bazett} [ms]</i>	164,56 ± 16,65	162,18 ± 22,06	0,53
<i>QT_{Fridericia} [ms]</i>	110,42 ± 11,32	108,49 ± 14,83	0,46
<i>Anzahl</i>	6	7	

EKG-Untersuchungen unter pharmakologischem Isoproterenolstress zeigten erwartungsgemäß gesteigerte Herzfrequenzen in beiden Versuchsgruppen. Jedoch stieg die Herzfrequenz der Scn1a^{+/-}-Mäuse im Mittel mit 669,97 ± 23,72 bpm signifikant höher als in der Vergleichsgruppe mit 657,95 ± 16,53 bpm (p=0,0031). Entsprechend verkürzten sich die weiteren zyklusbeschreibenden Parameter. Das RR-Intervall wurde mit 89,67 ± 3,20 ms in der HET-Gruppe signifikant kürzer verglichen mit 91,25 ± 2,30 ms in der Kontrollgruppe (p=0,0043). Ebenfalls kürzer wurde das PP-Intervall bei den HET-Tieren mit 89,79 ± 3,31 versus 91,27 ± 2,28 ms (p=0,0065).

Der Mittelwertunterschied bezüglich des PR-Intervalls erwies sich als hochsignifikant (p=0,000065). Mit 32,01 ± 3,43 ms bei den HET-Mäusen war das Intervall hochsignifikant kürzer als bei den wildtypischen Mäusen mit 34,14 ± 1,67 ms. Auch die QT⁺-Zeit zeigte eine hochsignifikante Reduzierung bei den genveränderten Mäusen im Vergleich zu der Gruppe der wildtypischen Mäuse (WT: 29,55 ± 3,87 vs. HET: 26,30 ± 4,17 ms; p=0,000082). Darüber hinaus wies die Dauer des QRS-Komplexes bei den Scn1a^{+/-}-Mäusen eine signifikante Verkürzung auf (WT: 17,32 ± 2,35 ms vs. HET: 16,12 ± 2,20 ms; p=0,008). Die restlichen EKG-Parameter Pdur, QT, QT_{Bazett} und QT_{Fridericia} zeigten sich unter Isoproterenolstress als nicht signifikant verändert.

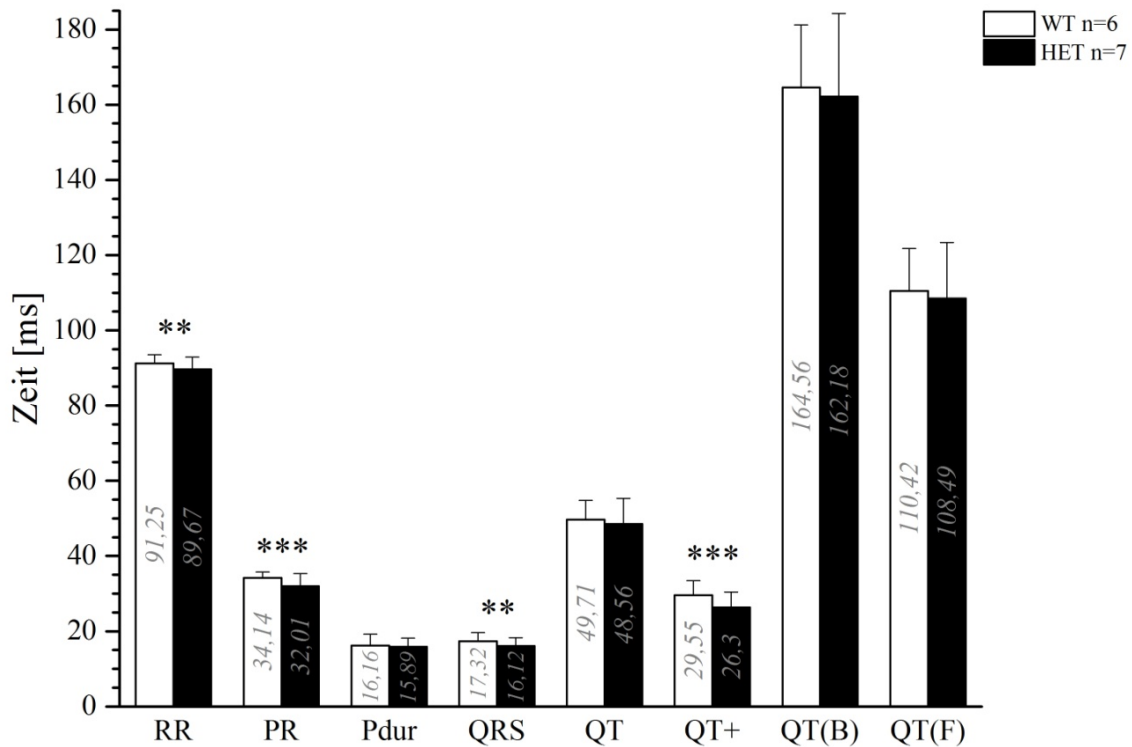


Abb. 26: EKG-Parameter unter Isoproterenolstimulation

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.2 EPU

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden an insgesamt 27 Mäusen im Alter zwischen 70 und 80 Tagen unter physiologischer Körpertemperatur von 37 °C durchgeführt. Hierunter befanden sich 14 wildtypische Mäuse, von denen drei Tiere interventionell verstarben, sowie 13 heterozygote *Scn1a*^{+/-}-Mutanten, von denen eine Maus interventionell verstarb. Alle vier Tiere verstarben aufgrund von chirurgischem Trauma oder Anästhesiekomplikationen bei Intubation und Ventilation. Damit ergab sich eine gesamte interventionelle Überlebensrate von 85%. Bei der Auswertung der EKG-Parameter fanden wiederum nur Tiere mit einer repräsentativen Herzfrequenz von >400 bpm Beachtung.

3.2.1 Basisparameter

Die elektrophysiologischen Basisparameter wurden bei allen Mäusen auf gleiche Weise bei intrakardial liegendem EPU-Katheter unmittelbar vor der ersten Stimulationsserie

erhoben. Die Ergebnisse sind zunächst tabellarisch aufgelistet (Tab. 9). Es folgt eine Erläuterung sowie graphische Darstellung der Parameter (Abb. 27).

Tab. 9: Basisparameter EPU

Isoflurannarkose, Mäusealter P70-80; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant, ÜS=Überleitungsstörung

Parameter	WT	HET (<i>Scn1a</i> ^{+/-})	p-Value
HR [bpm]	467,78 ± 48,48	498 ± 36,91	0,14
RR [ms]	129,44 ± 13,32	120,62 ± 8,01	0,095
PR [ms]	39,50 ± 2,49	40,22 ± 4,54	0,68
Pdur [ms]	13,13 ± 2,89	14,3 ± 2,78	0,38
SNRT ₁₀₀ [ms]	194,86 ± 53,26	200,97 ± 78,13	0,85
cSNRT ₁₀₀ [ms]	65,44 ± 47,38	79,62 ± 75,09	0,64
SNRT ₈₅ [ms]	161,20 ± 43,45	161,70 ± 47,18	0,98
cSNRT ₈₅ [ms]	50,65 ± 41,16	56,20 ± 33,71	0,84
SNRT ₇₅ [ms]	ÜS	ÜS	-
cSNRT ₇₅ [ms]	ÜS	ÜS	-
WBP [ms]	86,00 ± 9,17	86,20 ± 10,26	0,96
Anzahl	9	10	

Die mittlere Herzfrequenz der Heterozygoten war mit $498 \pm 36,91$ bpm höher als in der Kontrollgruppe mit $467,78 \pm 48,48$ bpm, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p=0,14$). Dementsprechend war der RR-Abstand bei heterozygoten Mäusen geringer als bei untersuchten Wildtypen, allerdings wurde das Signifikanzniveau ebenfalls nicht erreicht (WT: $120,62 \pm 8,01$ vs. HET: $129,44 \pm 13,32$ ms; $p=0,095$). Auch die weiteren Parameter wiesen Unterschiede auf, die als nicht signifikant einzuordnen sind. Dabei zeigten alle gemessenen Werte der HET-Mäuse nicht signifikante Verlängerungen gegenüber den WT-Mäusen. Die Dauer der P-Welle, Pdur, war mit $14,3 \pm 2,78$ ms bei den HET-Tieren nicht signifikant verlängert gegenüber $13,13 \pm 2,98$ ms ($p=0,38$). Auch das PR-Intervall zeigte eine nicht signifikante Verlängerung bei den heterozygoten Mäusen (WT: $39,50 \pm 2,49$ ms vs. HET: $40,22 \pm 2,78$ ms; $p=0,38$). Alle ausgewerteten Sinusknotenerholzeiten zeigten in absoluter Form (SNRT) sowie in korrigierter Form (cSNRT) geringe Verlängerungen bei den HET-Mäusen ohne

statistische Signifikanz. Die Sinusknotenerholzeit bei der Stimulationsfrequenz von 600 bpm (SNRT₁₀₀) war mit $200,97 \pm 78,13$ ms in der Gruppe der HET länger als bei den Kontrolltieren mit $194,86 \pm 53,26$ (p=0,85). Die korrigierte Zeit cSNRT₁₀₀ war ebenfalls leicht verlängert (WT: $65,44 \pm 47,38$ vs. HET: $79,62 \pm 75,09$ ms; p=0,64). Bei Stimulationsfrequenz von 700 bpm wurde eine marginale Verlängerung der SNRT₈₅ gemessen (WT: $161,20 \pm 43,45$ vs. HET: $161,70 \pm 47,18$ ms; p=0,98). Korrigiert war die Sinusknotenerholzeit bei gleicher Stimulationsfrequenz (cSNRT₈₅) ebenfalls leicht verlängert ohne statistische Signifikanz (WT: $50,65 \pm 41,16$ vs. HET: $56,20 \pm 33,71$ ms; p=0,84). Aufgrund von Überleitungsstörungen bei allen Tieren während der Stimulationsphase mit 800 bpm waren die Sinusknotenerholzeiten SNRT₇₅ und cSNRT₇₅ nicht auszuwerten. Der Wenckebachpunkt wurde in beiden Versuchsreihen nahezu identisch gemessen (WT: $86,00 \pm 9,17$ vs. HET: $86,20 \pm 10,26$ ms; p=0,96).

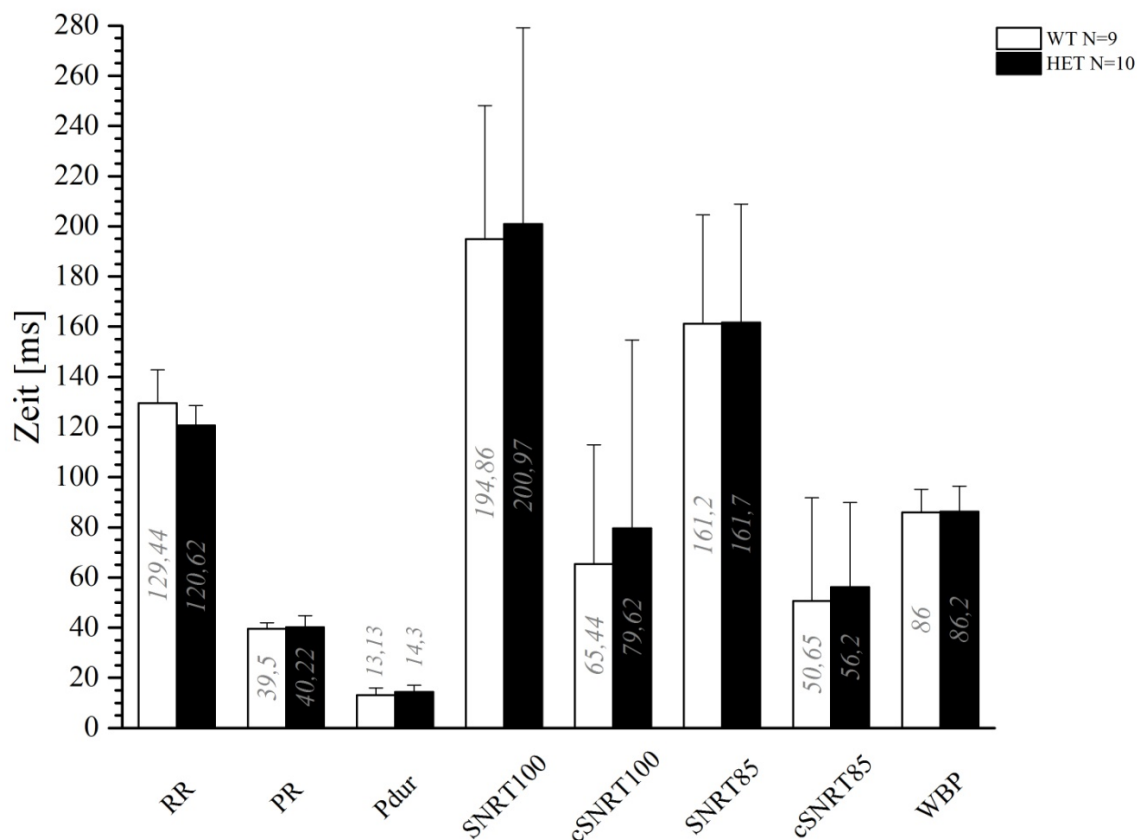


Abb. 27: Basisparameter EPU

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.2.2 Arrhythmiescore

Die aufgetretenen Arrhythmien der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden nach beschriebenem Score-System einzeln bewertet. Jede untersuchte Maus erhielt anschließend einen Score-Wert entsprechend der Qualität ihrer Rhythmusstörungen. Gemäß des angewandten hierarchischen Systems entsprach der zugeordnete Wert dem maximal erreichten Score-Wert jeder Maus. Mit anderen Worten wurde jeder Maus anhand ihrer schwerwiegendsten Rhythmusstörung ein bestimmter Score zugeordnet. Die Zuordnung in das Score-System ist im Folgenden zunächst tabellarisch zusammengefasst (Tab. 10).

Tab. 10: Arrhythmiescore-Verteilung EPU

Arrhythmiescore	Anzahl WT	Anzahl HET
Arrhythmiescore 0	3	-
Arrhythmiescore 1	3	2
Arrhythmiescore 2	3	5
Arrhythmiescore 3	2	4
Arrhythmiescore 4	-	1
Arrhythmiescore 5	-	-
Gesamtanzahl	11	12

Mit Hilfe des Score-Systems wurden ordinal skalierte Werte gewonnen. Um diese Werte anhand des *Exakten Fisher Tests* in einer Kontingenztabelle zu vergleichen, wurden sie in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe beinhaltete die Anzahl der Mäuse mit den niedriggradigen Arrhythmiescore-Werten 0 und 1. Die andere Gruppe beinhaltete die Anzahl der Mäuse mit höhergradigen Arrhythmiescore-Werten 2, 3, 4 und 5. Im Folgenden ist die Kontingenztabelle als Grundlage der statistischen Berechnung mittels des *Exakten Fisher Tests* dargestellt (Tab. 11).

Tab. 11: Arrhythmiescore EPU

Kontingenztafel der elektrophysiologischen Untersuchungen mit beobachteten sowie erwarteten Häufigkeiten nach Zuordnung zu höher- und niedriggradigen Arrhythmiegruppen. In Klammern stehen relative Häufigkeiten; AS=Arrhythmiescore; Σ = Summe

	WT		HET		Σ
	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	
AS <2	6 (55%)	3,83 (35%)	2 (17%)	4,17 (35%)	8
AS \geq 2	5 (45%)	7,17 (65%)	10 (83%)	7,83 (65%)	15
Σ	11	11	12	12	23

Exakter Fisher Test: p (zweiseitig) = 0,0894

Mit Hilfe des *Exakten Fisher Tests* wurden beide Kollektive (WT, HET) hinsichtlich des qualitativen Merkmals des Arrhythmiescore-Wertes (AS \geq 2) auf Unabhängigkeit untersucht. Die Nullhypothese H_0 wurde als Gleichheit der Häufigkeitsverteilung beider Kollektive in den Gruppen höher- sowie niedriggradiger Arrhythmien formuliert. Die Alternativhypothese H_1 besagte Ungleichheit der Häufigkeiten beider Kollektive hinsichtlich der Merkmalsausprägung. In der WT-Gruppe wurden 55% der Mäuse mit einem AS <2 beobachtet, während 45% der Mäuse einen AS \geq 2 erreichten. Damit überwog bei den Wildtypen der Anteil der Mäuse mit niedriggradigen Arrhythmien. In der Gruppe der heterozygoten $Na_v1.1$ -defizienten Mäuse überwog demgegenüber der Anteil der Mäuse mit höhergradigen Arrhythmien den Anteil der Mäuse mit niedriggradigen Arrhythmien deutlich. Es wurden bei 83% der untersuchten HET-Mäuse Arrhythmien mit einem Score \geq 2 beobachtet, während lediglich 17% der Mäuse einen AS <2 erhielten. Im Vergleich der beiden Kollektive wurden mehr HET-Tiere mit schwerwiegenderen Rhythmusstörungen (AS \geq 2) beobachtet als bei den Wildtypen (WT: 45% vs. HET: 83%). Mit dem errechneten zweiseitigen p-Wert von 0,09 wurde die postulierte Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 allerdings nicht erreicht. Die Nullhypothese konnte nicht verworfen werden und eine Unabhängigkeit beider Stichproben damit statistisch nicht bestätigt werden.

3.2.3 Quantität und Arrhythmiesamples

Eine Übersicht über die Quantität der verschiedenen Arrhythmien soll die Verteilung der aufgetretenen Rhythmusstörungen in den Kollektiven verdeutlichen. Hierfür ist zunächst eine Gesamtschau ausgewählter Arrhythmieformen dargestellt (Abb. 28), aus welchen nachfolgend exemplarische Arrhythmietraces gezeigt werden sollen.

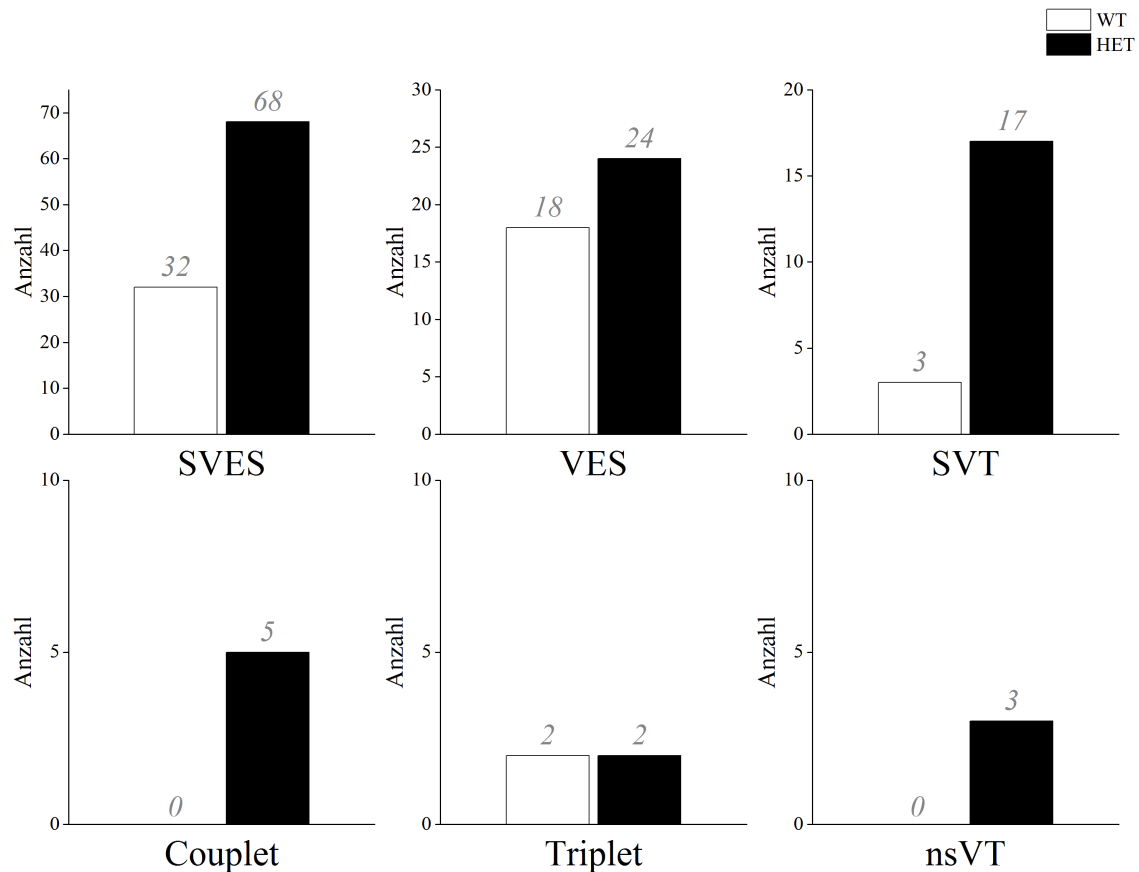


Abb. 28: Quantität der Arrhythmieformen

Die Graphiken zeigen die Quantität einer Auswahl an beobachteten Arrhythmieformen im Vergleich der beiden Kollektive. Dabei übertrifft die Anzahl der jeweiligen Arrhythmieformen der HET-Mäuse die Anzahl der Arrhythmien im Kontrollkollektiv. Ausnahme stellen die ventrikulären Triplets, welche in beiden Gruppen gleich häufig gesehen wurden. SVES=Supraventrikuläre Extrasystole; VES=Ventrikuläre Extrasystole; SVT= Supraventrikuläre Tachykardie; nsVT= nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie

Die Übersicht über die Verteilung der beobachteten Arrhythmien zeigt ein quantitatives Übergewicht der Rhythmusstörungen zugunsten der HET-Mäuse. Lediglich die Arrhythmieform der ventrikulären Triplets wurde in beiden Gruppen mit jeweils 3 Episoden gleich häufig gesehen. Alle weiteren Formen der beobachteten Rhythmusstörungen wurden deutlich häufiger in der Gruppe mit heterozygotem Knockout des

Kanalgens SCN1A dokumentiert. Die folgenden Erläuterungen geben einen detaillierteren Einblick in die Quantität der beobachteten Rhythmusstörungen bei WT- und HET-Mäusen und zeigen repräsentative Beispiele der induzierten Arrhythmieformen.

Häufigste Rhythmusstörung aller untersuchten Mäuse waren Extrasystolen supra-ventrikulärer oder ventrikulärer Art (*SVES/VES*). Insgesamt wurden 142 Extrasystolen bei elektrophysiologischer Untersuchung beobachtet. Darunter befanden sich 32 SVES in der Gruppe der WT-Mäuse sowie 68 SVES in der Gruppe der HET. Unter den VES wurden 18 in der WT- und 24 in der HET-Gruppe beobachtet. Demnach wurden sowohl SVES als auch VES häufiger in der Gruppe der Heterozygoten gefunden. Exemplarisch sind folgende SVES sowie VES abgebildet (Abb. 29, Abb. 30).

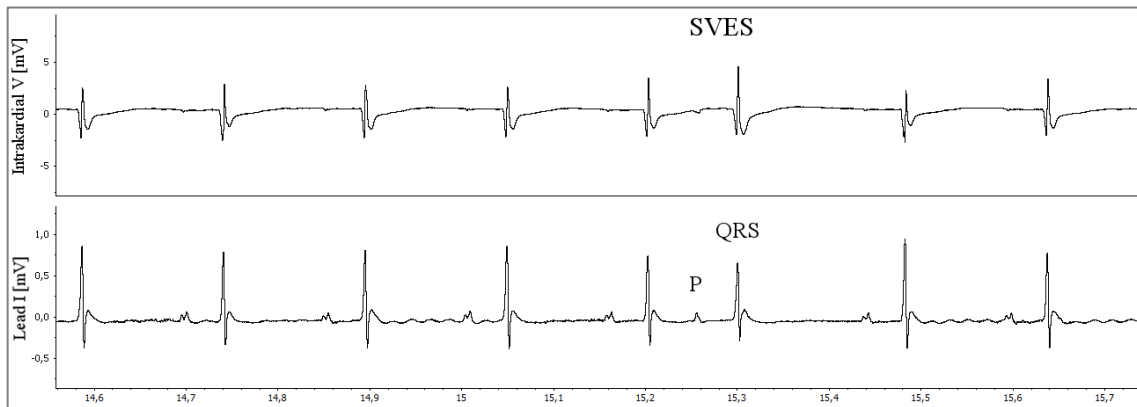


Abb. 29: Supraventrikuläre Extrasystole (SVES) bei einer HET-Maus

Vorzeitig einsetzender Schlag mit vorangehender P-Welle, normal breitem QRS-Komplex und anschließender nicht-kompensatorischer Pause; P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

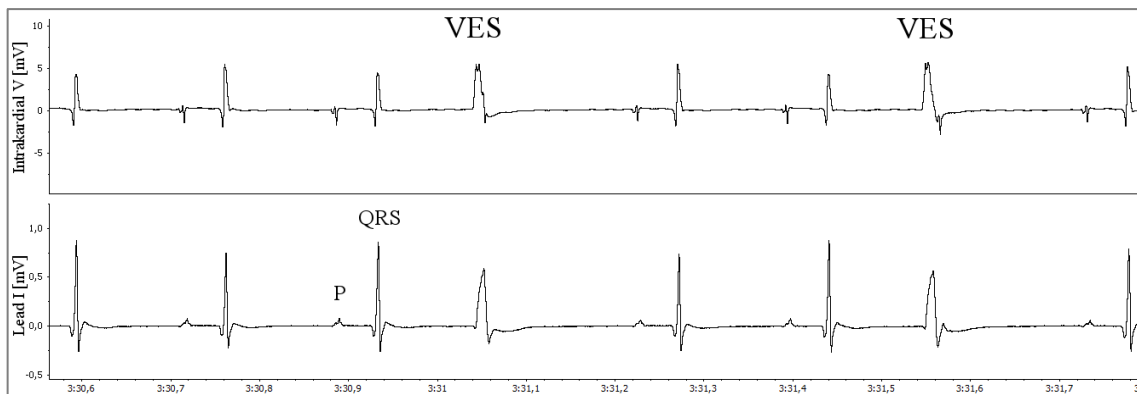


Abb. 30: Zwei ventrikuläre Extrasystolen (VES) bei einer HET-Maus

Vorzeitig einsetzender ventrikulärer Schlag mit fehlender P-Welle, verbreitertem QRS-Komplex und anschließender kompensatorischer Pause. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Ventrikuläre Couplets wurden insgesamt 5 Mal gefunden (Abb. 31). Alle Couplets wurden dabei ausnahmslos bei heterozygoten Mäusen beobachtet.

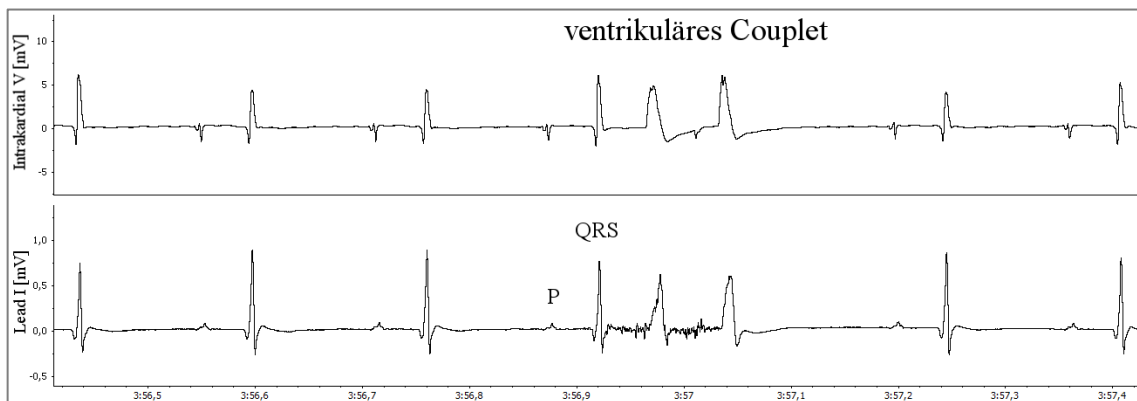


Abb. 31: Ventrikuläres Couplet bei einer HET-Maus

Zwei vorzeitig einsetzende konsekutive Schläge mit verbreitertem QRS-Komplex ohne vorangehende P-Welle. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Die Anzahl der ausgelösten supraventrikulären Tachykardien (SVT) in Form von Vorhofflimmern oder Vorhofflattern (Abb. 32, Abb. 33) und absoluter Arrhythmie (Abb. 35) betrug insgesamt 20. Davon wurden 17 Episoden zum größten Teil repetitiv bei heterozygoten Mäusen gefunden, wohingegen lediglich 3 Episoden bei Wildtypen gefunden wurden. Demnach traten also deutlich mehr Episoden mit SVT in der Gruppe der HET auf.

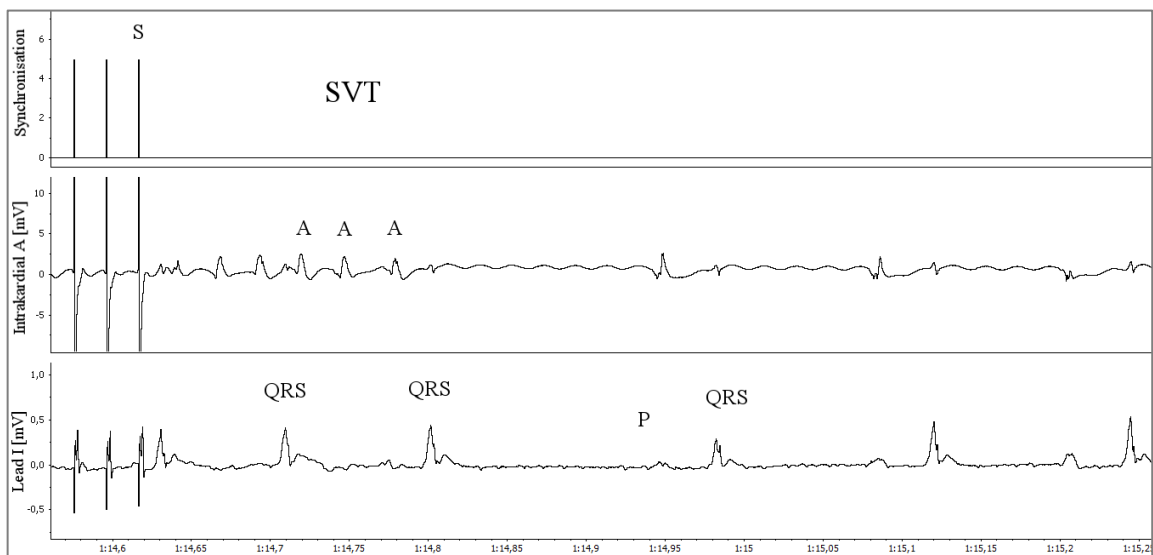


Abb. 32: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT)

Nach dem letzten Stimulus (S) sind atriale Aktionen (A) in der intrakardialen Ableitung gut zu erkennen, während QRS-Komplexe vor allem in der Oberflächenableitung weiterhin zu sehen sind. Supraventrikuläre Tachykardie mit anschließender spontaner Termination und Übergang in Sinusrhythmus; P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

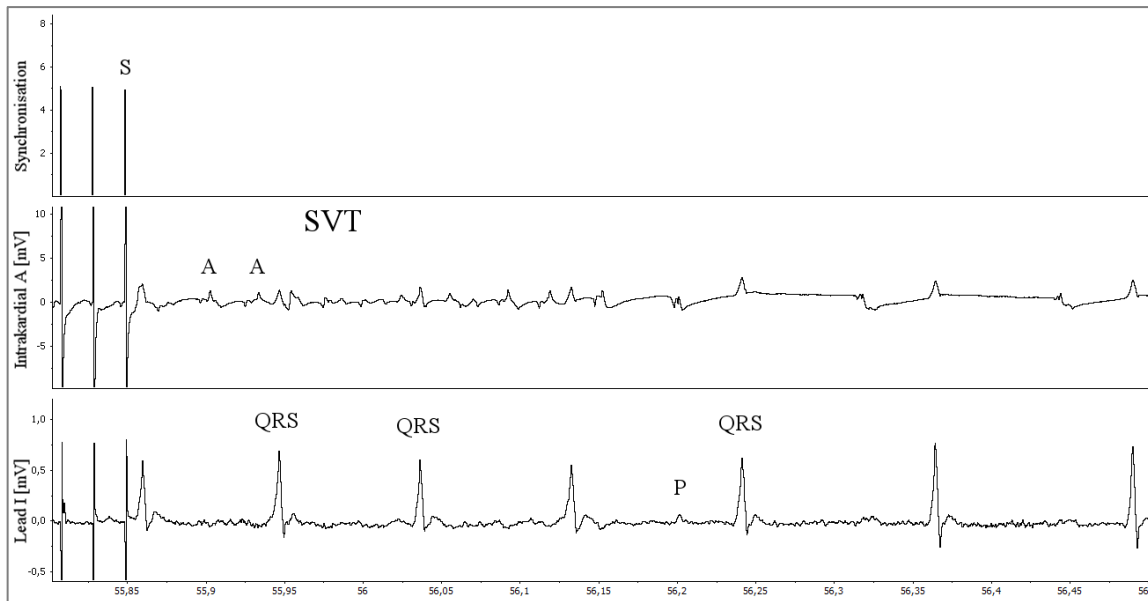


Abb. 33: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) bei einer HET-Maus

Nach der Stimulationsphase (S) sind Vorhofaktionen (A) in der atrialen Ableitung sichtbar, jedoch schwer voneinander abzugrenzen, bei erhaltenen QRS-Komplexen in der Oberflächenableitung. Vorhofflimmern, anschließende spontane Konversion in einen Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Folgende Abbildungen zeigen den besonderen Verlauf einer SVT bei einer HET-Maus, welche durch eine Phase elektrischer Stimulation induziert wurde, kontinuierlich während zweier folgender Stimulationsphasen persistierte und letztendlich nach 1,5 Minuten spontan in einen Sinusrhythmus übergang (Abb. 34). Diese langanhaltende Form der supraventrikulären Arrhythmie konnte nur einmal induziert werden und fand sich damit lediglich in der Gruppe der HET-Mäuse.

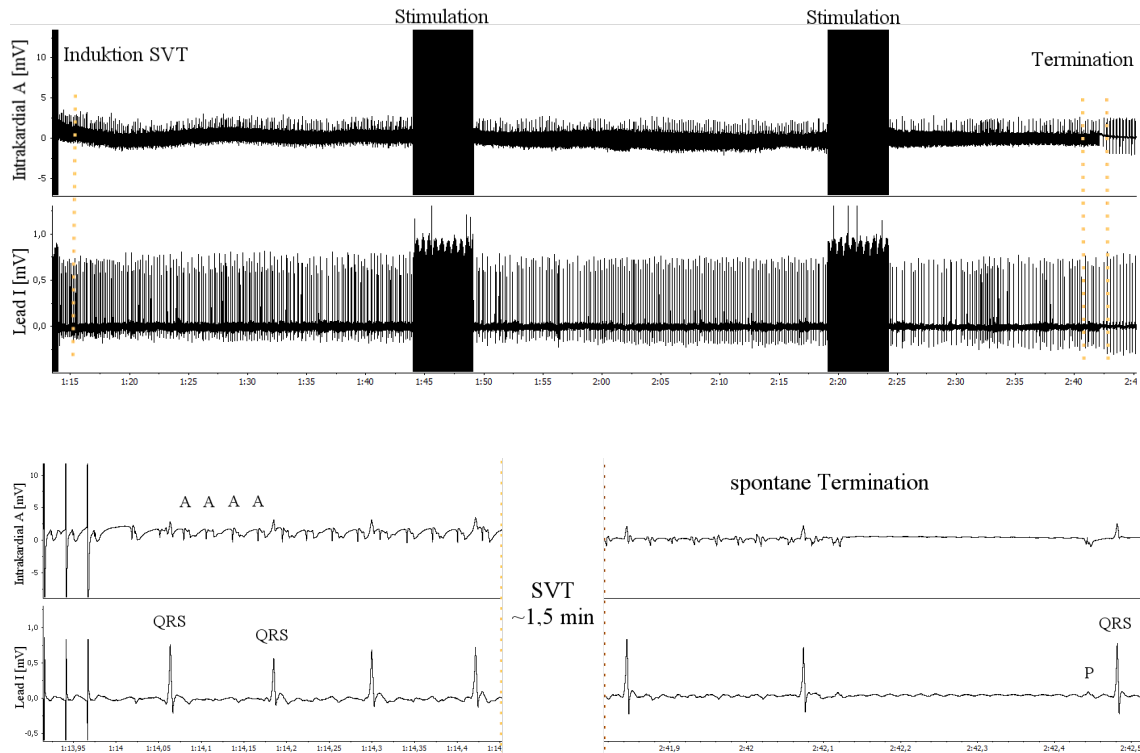


Abb. 34: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) für 1,5 Minuten einer HET-Maus

Die obere Abbildung zeigt eine Übersicht über Dauer der SVT mit Induktion nach Stimulationsphase bis zum Zeitpunkt der Spontantermination nach 1,5 Minuten. Die SVT wird dabei nicht durch zwei weitere Stimulationsphasen im Rahmen des Stimulationsprotokolls terminiert. Die untere Abbildung zeigt vergrößerte Ausschnitte der Induktions- und Terminationsphase. Nach einem Zustand geordneter tachykarder Vorhofaktionen (A) mit regulärer 4:1 Weiterleitung zu Beginn der SVT, wandelt sich das Bild zu diffuseren Vorhofaktionen unterschiedlicher Überleitung. Es folgt die spontane Termination mit Übergang in einen Sinusrhythmus; P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Ein Beispiel absoluter Arrhythmie ist bei einer HET-Maus in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 35). Gleichzeitig wird eine Leitungsstörung in Form eines intermittierenden AV-Blocks auffällig. Diese Form der Arrhythmie wurde lediglich in der Gruppe der HET-Mäuse gesehen. Bei drei der heterozygoten Tiere kam es dabei wiederholt zu dieser Form von Rhythmusstörungen.

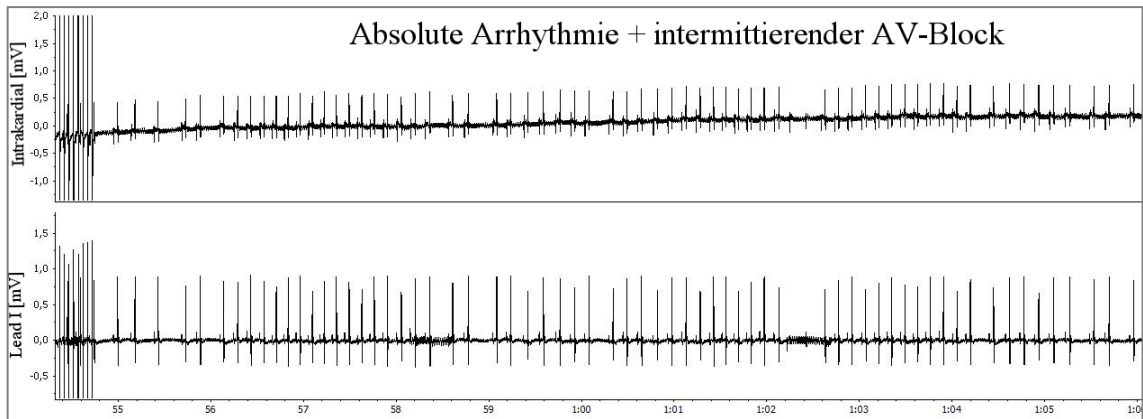


Abb. 35: Absolute Arrhythmie mit intermitt. AV-Block bei einer HET-Maus

Völlig arrhythmische Abfolge der Herzfrequenz im Sinne einer Arrhythmia absoluta. Zudem wird ein intermittierender AV-Block mit Fehlen von Kammerkomplexen nach Vorhofaktionen sichtbar (1:02,5)

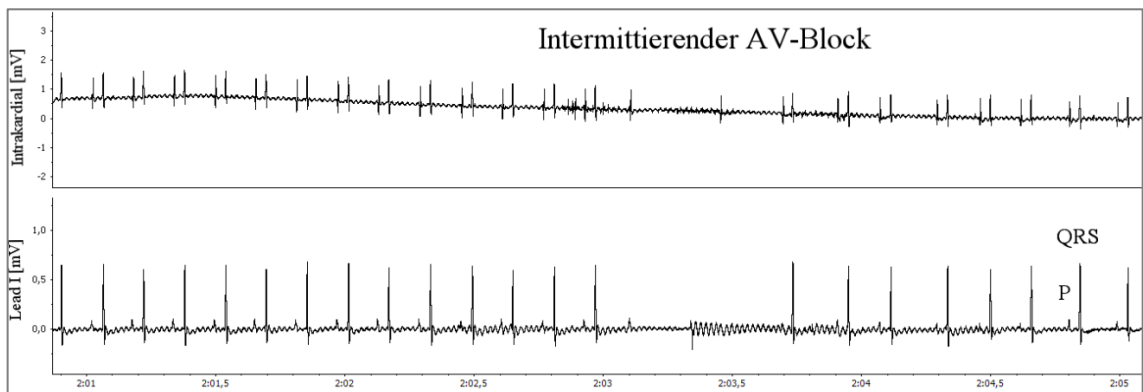


Abb. 36: Intermittierender AV-Block bei einer HET-Maus

Zu sehen ist ein intermittierendes Ausbleiben von Kammerkomplexen in der Folge frustrierter Vorhofaktionen. Im Anschluss daran kommt es zu einer Phase absoluter Arrhythmie. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Die Anzahl der ausgelösten ventrikulären Triplets war mit jeweils 2 Episoden in beiden Gruppen ausgeglichen. Während diese bei den Wildtypen stets direkt nach einer Phase elektrischer Stimulation erfolgten, traten sie bei Heterozygoten ebenfalls spontan im stimulusfreien Intervall auf. Nachfolgend soll exemplarisch ein ventrikuläres Triplet einer WT-Maus im Anschluss an eine Stimulationsphase gezeigt werden (Abb. 37). Danach folgt ein spontan aufgetretenes Triplet bei einer HET-Maus im stimulusfreien Intervall (Abb. 38).

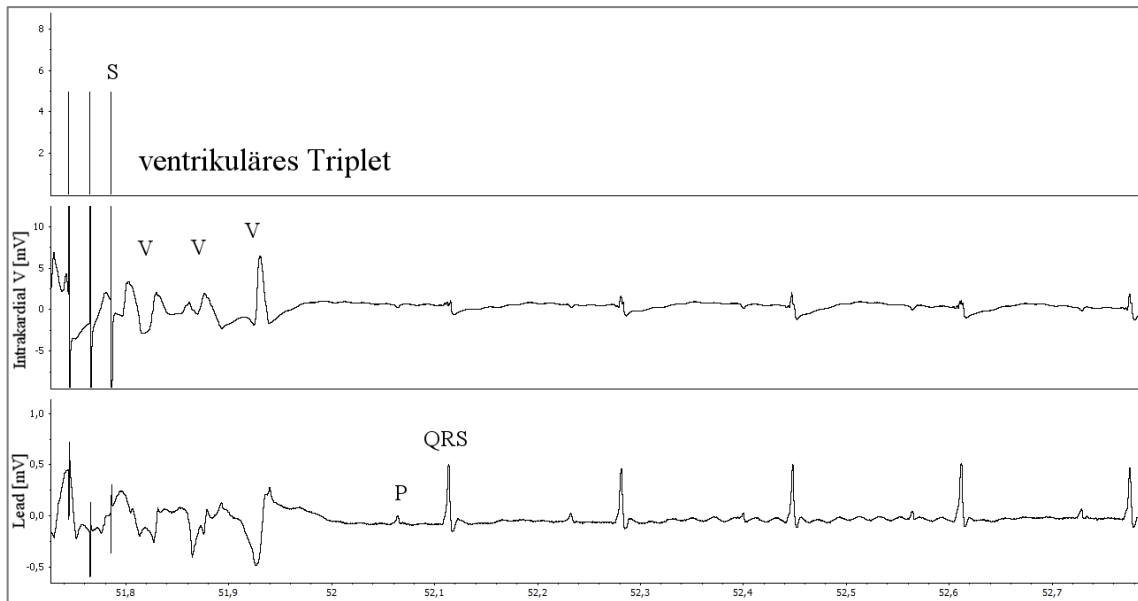


Abb. 37: Ventrikuläres Triplet nach Stimulation bei einer WT-Maus
Drei aufeinanderfolgende ventrikuläre Schläge (V) nach dem letzten Stimulus (S). Anschließend Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

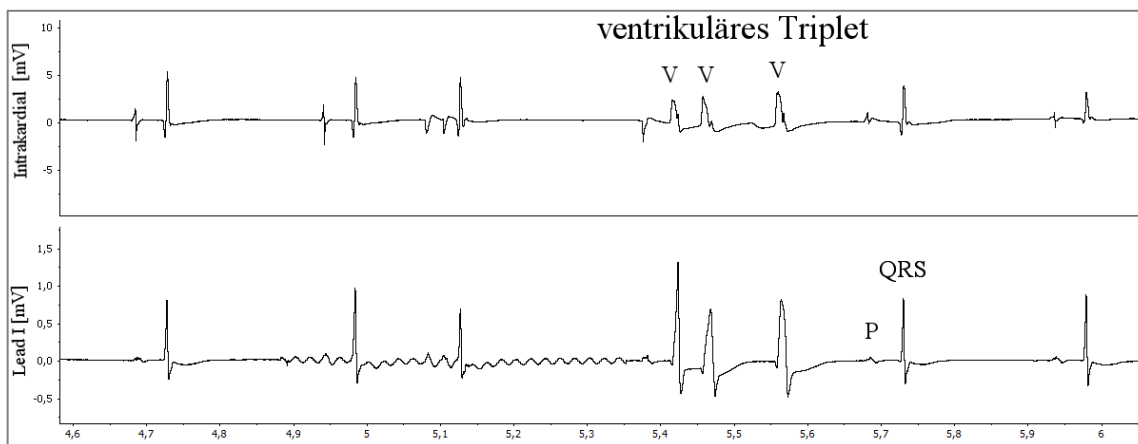


Abb. 38: Ventrikuläres Triplet im stimulusfreien Intervall bei einer HET-Maus
Drei spontan auftretende konsekutive ventrikuläre Schläge (V) mit verbreiterten QRS-Komplexen. Danach Übergang in regelrechten Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Ventrikuläre Tachykardien (VT) konnten insgesamt 3 Mal induziert werden. Alle ausgelösten VT waren dabei nicht anhaltend (*nsVT*) und wurden ausnahmslos bei heterozygoten Tieren beobachtet. Exemplarisch wird im Folgenden eine *nsVT* (≥ 10 ventrikuläre Schläge) einer HET-Maus abgebildet. Die Rhythmusstörung erreichte aufgrund der Anzahl ventrikulärer Schläge einen Arrhythmiescore von 4 Punkten (Abb. 39). Dieser Score war gleichzeitig der maximal erreichte Score aller untersuchten Tiere in vorliegender Studie.

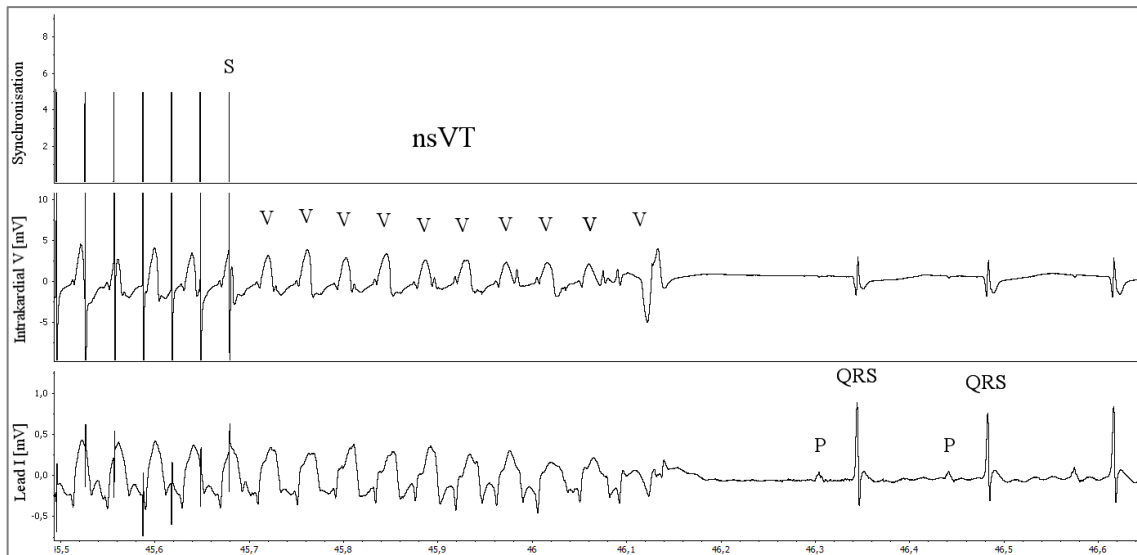


Abb. 39: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT) einer HET Maus
 ≥ 10 vorzeitig einsetzende ventrikuläre Schläge (V) direkt nach Stimulation (S). Spontane Termination mit Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex.

3.3 Hyperthermie-Versuche

Hyperthermie-Versuche wurden 40-45 Tage post natum an insgesamt 20 Mäusen durchgeführt, worunter sich jeweils 10 Wildtypen und heterozygote *Scn1a^{+/-}*-Mutanten befanden. Nach kombinierter Versuchsanordnung aus elektrokardiographischen und elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Ergebnisse dementsprechend in einen EKG-Teil und einen EPU-Teil separiert. Beide Untersuchungsmodalitäten wurden sowohl unter physiologischer Körpertemperatur von 37 °C als auch unter hyperthermer Beeinflussung von 39,5 °C durchgeführt. Drei Tiere verstarben während der Intervention aufgrund von chirurgischem Trauma oder Komplikationen bei der Anästhesie. Hieraus ergab sich eine gesamte interventionelle Überlebensrate von 85%. Bei einer WT-Maus konnte zudem aufgrund artefaktreicher Ableitung kein Ruhe-EKG ausgewertet werden. Bei einer heterozygoten Maus konnte aus gleichem Grund weder EKG noch EPU ausgewertet werden. Eine repräsentative Herzfrequenz von >400 bpm wurde wiederum bei der Auswertung der EKG-Parameter vorausgesetzt.

3.3.1 EKG-Teil Hyperthermie-Versuche

Der EKG-Teil der Hyperthermie-Versuche wird im Folgenden differenziert nach Ruhebedingungen und Stressbedingungen durch Hyperthermie vorgestellt.

3.3.1.1 Ruhe-EKG

Die Ergebnisse unter Ruhebedingungen werden zunächst tabellarisch zusammengefasst (Tab. 12), bevor die Parameter erläutert und anhand einer Graphik veranschaulicht werden (Abb. 40).

Tab. 12: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen (Hyperthermie-Versuch)

*Isoflurannarkose, Mäusealter P40-45; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant*

<i>Parameter</i>	<i>WT</i>	<i>HET (Scn1a^{+/-})</i>	<i>p-Value</i>
<i>HR [bpm]</i>	530,88 ± 25,58	533,37 ± 42,03	0,69
<i>RR [ms]</i>	113,27 ± 5,40	113,24 ± 9,71	0,98
<i>PR [ms]</i>	34,02 ± 2,81	35,14 ± 3,58	0,057
<i>Pdur [ms]</i>	13,04 ± 0,87	12,96 ± 1,43	0,70
<i>PP [ms]</i>	112,96 ± 5,65	114,37 ± 10,33	0,37
<i>QRS [ms]</i>	12,54 ± 0,88	14,09 ± 2,33	0,0000014***
<i>QT [ms]</i>	47,56 ± 5,79	49,15 ± 7,81	0,21
<i>QT⁺ [ms]</i>	32,97 ± 3,69	33,54 ± 5,54	0,51
<i>QT_{Bazett} [ms]</i>	141,24 ± 16,08	146,82 ± 25,72	0,15
<i>QT_{Fridericia} [ms]</i>	98,26 ± 11,40	107,76 ± 28,78	0,013*
<i>Anzahl</i>	6	9	

Im Rahmen der Hyperthermie-Versuche zeigten die EKG-Untersuchungen unter Ruhebedingungen lediglich bezüglich der Dauer des QRS-Komplexes und der QT-Zeit nach Fridericia (QT_F) einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte. Die QRS-Dauer war mit $14,09 \pm 2,33$ ms in der Gruppe der $Na_v1.1$ -defizienten $Scn1a^{+/-}$ -Mäuse hochsignifikant länger als bei den wildtypischen Mäusen mit einer Dauer von $12,54 \pm 0,88$ ms ($p=0,0000014$). Die QT_F -Zeit war bei den HET-Mäusen mit $107,76 \pm 28,78$ ms signifikant länger verglichen mit $98,26 \pm 11,40$ ms im Kollektiv der Kontrolltiere

($p=0,013$). Die übrigen gemessenen EKG-Parameter HR, RR, PR, Pdur, PP, QT, QT+, QT_{Bazett} wiesen unter physiologischer Körpertemperatur keine Unterschiede der Mittelwerte beider Vergleichsgruppen auf Signifikanzniveau auf.

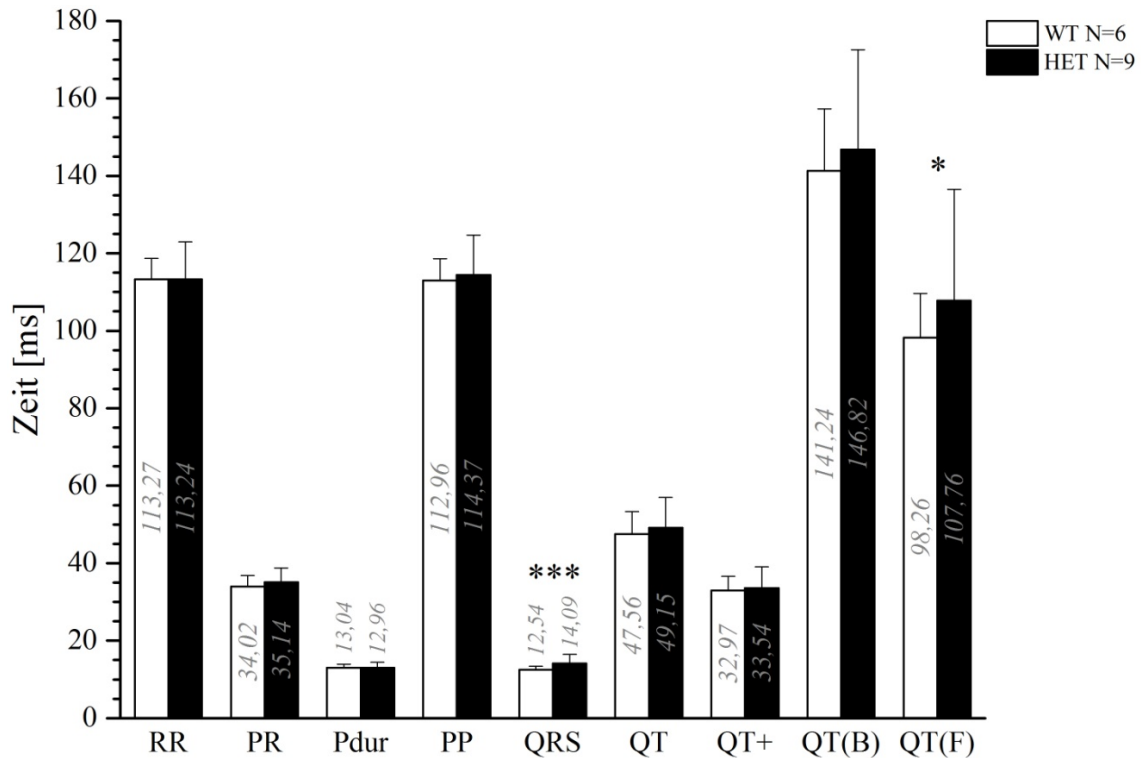


Abb. 40: EKG-Parameter unter Ruhebedingungen (Hyperthermie-Versuch)

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.3.1.2 Stress-EKG unter Hyperthermie

Die Ergebnisse unter hyperthermen Stressbedingungen werden ebenfalls tabellarisch zusammengefasst (Tab. 13), bevor sie erläutert und graphisch veranschaulicht werden (Abb. 41).

Tab. 13: Stress-EKG-Parameter unter Hyperthermie von 39,5 °C

Isoflurannarkose, Mäusealter P40-45; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

Parameter	WT	HET (<i>Scn1a</i> ^{+/-})	p-Value
HR [bpm]	568,72 ± 30,37	591,95 ± 38,84	0,00023***
RR [ms]	105,80 ± 5,83	101,78 ± 6,55	0,00043***
PR [ms]	28,38 ± 2,54	30,17 ± 3,47	0,0011**

<i>Parameter</i>	<i>WT</i>	<i>HET (Scn1a^{+/-})</i>	<i>p-Value</i>
<i>Pdur [ms]</i>	10,91 ± 1,31	12,73 ± 1,93	0,0000000036 ***
<i>PP [ms]</i>	105,84 ± 5,93	102,30 ± 6,16	0,0016**
<i>QRS [ms]</i>	13,11 ± 1,13	13,63 ± 1,61	0,034*
<i>QT [ms]</i>	49,85 ± 5,33	48,69 ± 5,94	0,26
<i>QT+ [ms]</i>	31,32 ± 3,98	31,68 ± 4,28	0,62
<i>QT_{Bazett} [ms]</i>	153,79 ± 19,85	153,04 ± 20,76	0,84
<i>QT_{Fridericia} [ms]</i>	110,73 ± 8,76	104,47 ± 13,61	0,0033**
<i>Anzahl</i>	7	9	

Bei den EKG-Untersuchungen unter Hyperthermieinduktion von 39,5 °C Körpertemperatur zeigte sich erwartungsgemäß eine Steigerung der Herzfrequenz in beiden Vergleichsgruppen. Jedoch war die mittlere Herzfrequenz der HET-Gruppe unter Hyperthermie mit 591,95 ± 38,84 bpm hochsignifikant höher verglichen mit 568,72 ± 30,37 bpm in der WT-Gruppe (p=0,00023). Dementsprechend waren die zyklusbeschreibenden Intervalle RR sowie PP in der HET-Gruppe hochsignifikant bis sehr signifikant verringert (WT: 105,80 ± 5,83 vs. HET: 101,78 ± 6,55 ms; p=0,00043 und WT: 105,84 ± 5,93 vs. 102,30 ± 6,16 ms; p=0,0016).

Bei dem Vergleich der PR-Zeiten zeigte sich eine signifikante Verlängerung in der Gruppe der Scn1a^{+/-}-Mäuse (WT: 28,38 ± 2,54 vs. HET: 30,17 ± 3,47 ms; p=0,0011). Die Dauer der Vorhoferregung zeigte sich mit einem deutlich längeren Pdur von 12,73 ± 1,93 ms bei den HET-Mäusen verglichen mit 10,91 ± 1,31 ms bei den Wildtypen als hochsignifikant verlängert (p=3,6 · 10⁻⁹). Auch die QRS-Dauer war unter hyperthermen Bedingungen bei den mutierten Mäusen verlängert (WT: 13,11 ± 1,13 vs. HET: 13,63 ± 1,61 ms; p=0,034). Dagegen war die QT-Zeit korrigiert nach Fridericia, QT_{Fridericia}, in der HET-Gruppe sehr signifikant verkürzt verglichen mit der WT-Gruppe (WT: 110,73 ± 8,76 vs. HET: 104,47 ± 13,61 ms, p=0,0033). Die weiteren EKG-Parameter QT, QT+ und QT_{Bazett} erreichten unter hyperthermen Bedingungen das Signifikanzniveau nicht.

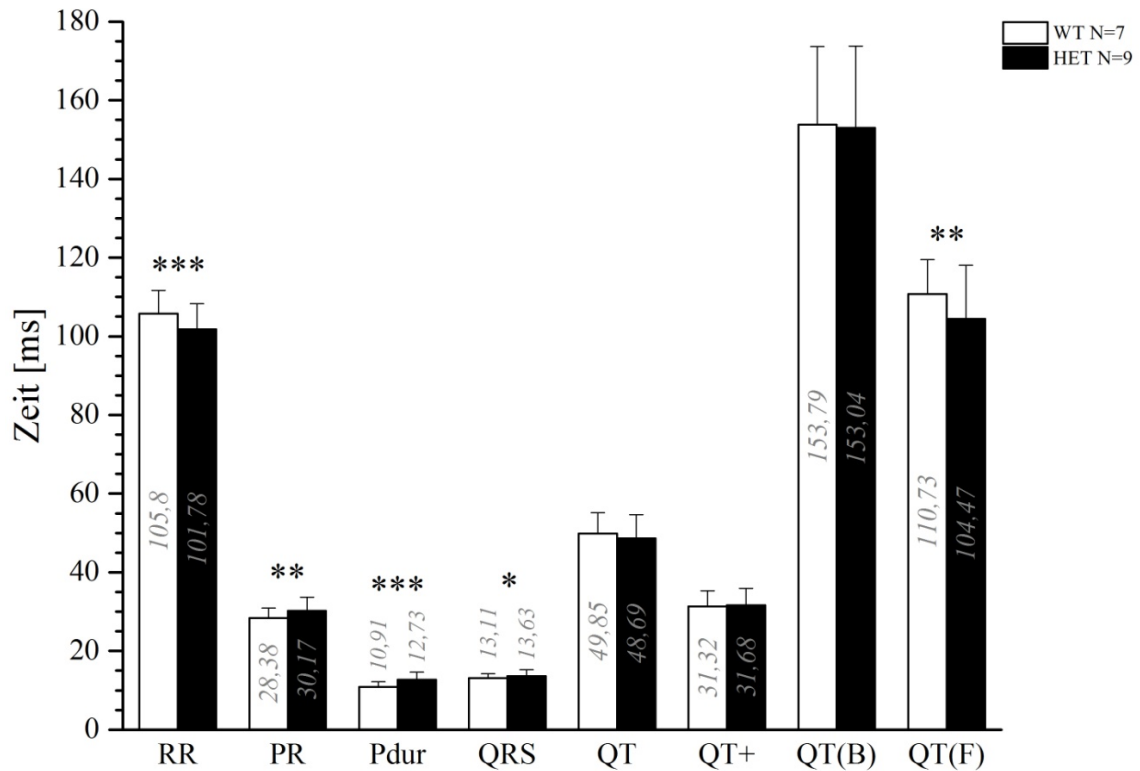


Abb. 41: Stress-EKG-Parameter unter Hyperthermie

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.3.2 EPU-Teil Hyperthermie-Versuche

Hierbei werden zunächst die Basisparameter der elektrophysiologischen Untersuchungen vorgestellt, bevor aufgetretene Arrhythmien sowohl unter Normtemperatur als auch unter Hyperthermie behandelt werden.

3.3.2.1 Basisparameter Hyperthermie-Versuche

Die EPU-Basisparameter wurden bei allen Mäusen auf gleiche Weise bei intrakardial liegendem Katheter vor dem ersten Stimulationsprotokoll unter physiologischer Körpertemperatur erhoben. Sie werden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 14), erläutert und im Anschluss anhand graphischer Darstellung veranschaulicht (Abb. 42).

Tab. 14: Basisparameter EPU-Teil Hyperthermie-Versuche

Isoflurannarkose, Mäusealter P40-45; Werte sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben; *=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

Parameter	WT	HET (<i>Scn1a</i> ^{+/-})	p-Value
HR [bpm]	529,71 ± 41,22	530 ± 48,61	0,99
RR [ms]	113,64 ± 9,12	114,55 ± 10,54	0,86
PR [ms]	34,46 ± 3,77	35,33 ± 3,05	0,62
Pdur [ms]	8,57 ± 2,80	8,83 ± 1,86	0,83
SNRT ₁₀₀ [ms]	132,07 ± 16,49	137,11 ± 25,57	0,66
cSNRT ₁₀₀ [ms]	26,08 ± 13,18	22,54 ± 18,72	0,70
SNRT ₈₅ [ms]	119,07 ± 23,50	135,89 ± 20,11	0,18
cSNRT ₈₅ [ms]	19,40 ± 8,18	23,43 ± 18,29	0,66
SNRT ₇₅ [ms]	128,08 ± 10,75	125,67 ± 18,77	0,86
cSNRT ₇₅ [ms]	18,10 ± 15,38	35,5 ± 1,41	0,23
WBP[ms]	73,71 ± 11,28	80,66 ± 10,10	0,21
Anzahl	7	9	

Die Basisparameter zeigten keinen Unterschied in beiden Versuchsgruppen auf Signifikanzniveau. Die mittlere Herzfrequenz war mit $530 \pm 48,61$ ms bei den Heterozygoten nahezu identisch mit $529,71 \pm 41,22$ ms bei den Wildtypen ($p=0,99$). Respektive war der RR-Abstand beider Gruppen nahezu gleich in beiden Gruppen (WT: $113,64 \pm 9,12$ vs. HET: $114,55 \pm 10,54$ ms; $p=0,86$). Das PR-Intervall war bei *Scn1a*^{+/-}-Genotypen leicht verlängert, erreichte allerdings das Signifikanzniveau dabei nicht (WT: $34,46 \pm 3,77$ vs. HET: $35,33 \pm 3,05$; $p=0,62$). Genauso verhielt es sich mit der Dauer der P-Welle, Pdur (WT: $8,57 \pm 2,80$ vs. $8,83 \pm 1,86$ ms; $p=0,83$). Die gemessenen Sinusknotenerholzeiten zeigten überwiegend eine geringe Verlängerung in der Gruppe der HET. SNRT₁₀₀ war mit $137,11 \pm 25,57$ ms bei den HET-Tieren versus $132,07 \pm 16,49$ ms leicht verlängert ($p=0,66$). Die Sinusknotenerholzeit bei Stimulationsfrequenz von 700 bpm (SNRT₈₅) war mit $135,89 \pm 20,11$ ms versus $119,07 \pm 23,50$ ms bei den Kontrolltieren ebenfalls geringfügig länger ($p=0,18$). Ebenso die korrigierte Zeit (cSNRT₈₅) mit $23,43 \pm 18,29$ ms bei den HET versus $19,40 \pm 8,18$ ms bei den WT-Mäusen ($p=0,66$). Auch die korrigierte Sinusknotenerholzeit bei einer Stimulationsfrequenz von 800 bpm (cSNRT₇₅) war in der heterozygoten Gruppe leicht verlängert (WT: $18,10 \pm 15,38$ vs. HET: $35,5 \pm 1,41$ ms; $p=0,23$). Lediglich die

Parameter $cSNRT_{100}$ sowie $SNRT_{75}$ zeigten sich bei den HET-Mäusen leicht verkürzt, allerdings ohne statistische Signifikanz. Der Wenckebachpunkt (WBP) wurde in der Gruppe der $Scn1a^{+/-}$ Mäusen bei einem mittleren Stimulationsintervall von $80,66 \pm 10,10$ ms gegenüber $73,71 \pm 11,28$ ms bei den Wildtypen leicht verlängert gemessen ($p=0,21$) ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

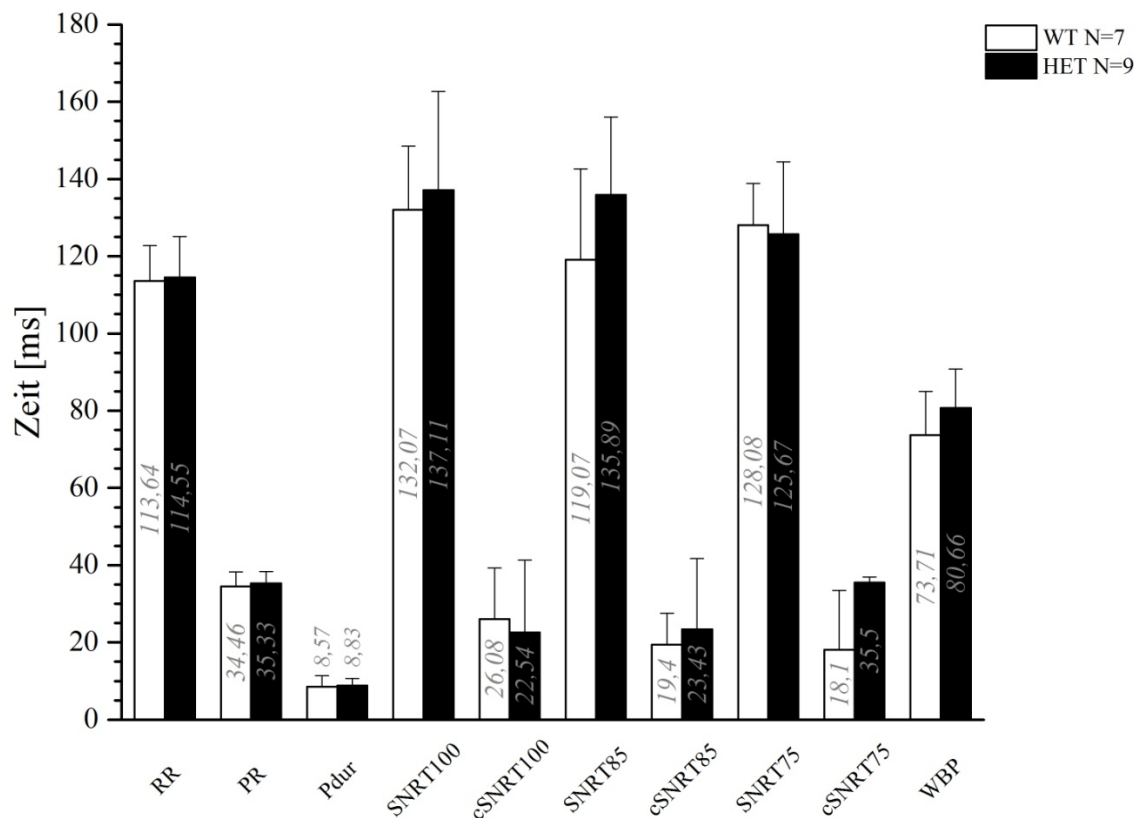


Abb. 42: Basisparameter EPU-Teil Hyperthermie-Versuche

*=statistisch signifikant, **=statistisch sehr signifikant, ***=statistisch hochsignifikant

3.3.2.2 Arrhythmiescore (Ruhe und Hyperthermie)

Das beschriebene Score-System wurde bei den Hyperthermie-Versuchen analog der Anwendung bei den elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet. Dabei wurde die Analyse anhand des Versuchsaufbaus in einen Ruheteil und in einen Teil unter hyperthermen Stressbedingungen separiert.

Die aufgetretenen Arrhythmien wurden wiederum nach beschriebenem Score-System einzeln bewertet. Anschließend wurde jeder Maus der maximal erreichte Arrhythmiescore zugeordnet. Dieser verkörperte somit die schwerwiegendste Form der Rhythmus-

störungen, welche bei jeder einzelnen Maus beobachtet werden konnte. Die Zuordnung der Individuen in das Score-System ist zunächst wieder tabellarisch zusammengefasst (Tab. 15). Im Anschluss daran erfolgt die statistische Analyse der Hyperthermietests anhand der Kontingenztabellen separiert in Ruhe- und Hyperthermie-teil.

Tab. 15: Arrhythmiescore-Verteilung Hyperthermietest

Die Tabelle umfasst die Verteilung unter Ruhebedingungen und unter hyperthermen Stressbedingungen.

Arrhythmiescore	Anzahl WT		Anzahl HET	
	Ruhe	Hyperthermie	Ruhe	Hyperthermie
Arrhythmiescore 0	1	1	-	-
Arrhythmiescore 1	3	5	3	4
Arrhythmiescore 2	2	1	2	2
Arrhythmiescore 3	1	-	4	3
Arrhythmiescore 4	-	-	-	-
Arrhythmiescore 5	-	-	-	-
Gesamtanzahl	7	7	9	9

Die statistischen Analysen erfolgten anhand des *Exakten Fisher Tests*. Sie werden im Anschluss mit Hilfe von Kontingenztabellen dargelegt und erörtert. Für den statistischen Test wurden die ordinal skalierten Werte analog der elektrophysiologischen Untersuchungen wiederum in zwei Gruppen unterteilt. Während in einer Gruppe Mäuse mit niedriggradigen Arrhythmien (Arrhythmiescore 0/1) zusammengefasst wurden, beinhaltete die zweite Gruppe Mäuse mit höhergradigen Arrhythmien (Arrhythmiescore 2/3/4/5).

Arrhythmiescore unter Ruhebedingungen

Im Folgenden wird zunächst der Ruheteil der Hyperthermietests hinsichtlich des Arrhythmiescores untersucht. Bewertete Arrhythmien wurden in diesem Teilversuch unter Ruhebedingungen bei einer Körpertemperatur von 37 °C beobachtet. Die folgende Tabelle zeigt die Kontingenztabelle als Grundlage der statistischen Berechnung mittels des *Exakten Fisher Tests* (Tab. 16).

Tab. 16: Arrhythmiescore Hyperthermietest in Ruhe

Kontingenztafel der Hyperthermietests in Ruhe mit beobachteten sowie erwarteten Häufigkeiten nach Zuordnung zu höher- und niedriggradigen Arrhythmiegruppen. In Klammern stehen die relative Häufigkeiten; AS=Arrhythmiescore; Σ = Summe

	WT		HET		Σ
	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	
AS <2	4 (57%)	3,06 (44%)	3 (33%)	3,94 (44%)	7
AS \geq 2	3 (43%)	3,94 (56%)	6 (67%)	5,06 (56%)	9
Σ	7	7	9	9	16

Exakter Fisher Test: p (zweiseitig) = 0,6145

Kollektive der wildtypischen sowie der heterozygoten $Na_v1.1$ -defizienten Mäuse wurden mit Hilfe des Exakten Fisher Tests auf Unabhängigkeit untersucht. Unabhängigkeit wurde analog der EPU hinsichtlich des qualitativen Merkmals des Arrhythmiescore-Wertes (AS \geq 2) untersucht. Die Nullhypothese H_0 besagte Gleichheit der Kollektive in den Arrhythmiegruppen. Die Alternativhypothese H_1 besagte Ungleichheit bezüglich der Arrhythmieausprägung. Unter Ruhebedingungen wurden innerhalb der Wildtypen 57% der Mäuse mit einem AS <2 beobachtet, 43% erhielten demgegenüber einen AS \geq 2. Demnach überwog bei den Wildtypen der Anteil der niedriggradigen Arrhythmien. Innerhalb der heterozygoten Mäuse überwog dagegen der Anteil in der Gruppe höhergradiger Arrhythmien mit 67% gegenüber 33% in der Gruppe niedriggradiger Arrhythmien. Im Vergleich beider Kollektive wurden bei den heterozygoten $Na_v1.1$ -defizienten Mäusen demnach mehr Tiere mit einem höheren Score (AS \geq 2) beobachtet als bei den wildtypischen Mäusen (WT: 43% vs. HET: 67%). Der errechnete zweiseitige p-Wert von 0,62 erreichte dabei allerdings das Signifikanzniveau nicht. Die Nullhypothese konnte nicht verworfen werden und Unabhängigkeit der beiden Stichproben somit nicht bestätigt werden.

Arrhythmiescore unter hyperthermen Bedingungen

Folgend werden die Ergebnisse des angewandten Score-Systems unter hyperthermen Stressbedingungen mit einer Körpertemperatur von 39,5 °C dargelegt. Die Kontingenztafel war wiederum die Grundlage der statistischen Berechnung mittels des *Exakten Fisher Tests* (Tab. 17).

Tab. 17: Arrhythmiescore Hyperthermiescore unter Hyperthermie

Kontingenztafel der Hyperthermiescoretests unter Hyperthermie mit beobachteten sowie erwarteten Häufigkeiten nach Zuordnung zu höher- und niedriggradigen Arrhythmiegruppen. In Klammern stehen die relativen Häufigkeiten; AS=Arrhythmiescore; Σ = Summe

	WT		HET		Σ
	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	
AS <2	6 (86%)	4,37 (62%)	4 (44%)	5,63 (62%)	10
AS \geq 2	1 (14%)	2,63 (38%)	5 (56%)	3,37 (38%)	6
Σ	7	7	9	9	16

Exakter Fisher Test: p (zweiseitig) = 0,1451

Bei der Prüfung auf Unabhängigkeit beider Kollektive unter Hyperthermie wurde erneut der *Exakte Fisher Test* herangezogen. Geprüft wurde wiederum das qualitative Merkmal des Arrhythmiegrades (AS \geq 2). Die Nullhypothese H_0 besagte Gleichheit, die Alternativhypothese H_1 Ungleichheit der Kollektive in den Arrhythmiegruppen. Innerhalb der Wildtypen wurden 86% der Mäuse mit einem AS <2 und lediglich 14% der Mäuse mit einem AS \geq 2 bewertet. Es überwogen somit bei den WT die Mäuse mit niedriggradigen Arrhythmien. Innerhalb der HET-Gruppe zeigte sich erneut ein anderes Bild. In dem Kollektiv der HET überwog der Anteil mit schwerwiegenderen Arrhythmien. Es wurden hierbei 56% der Mäuse mit einem höhergradigen Arrhythmiescore von \geq 2 detektiert, während ein geringerer Arrhythmiescore von <2 bei 44% der HET-Mäuse beobachtet wurde. Im Vergleich beider Kollektive wurden erneut mehr Tiere aus der Gruppe der heterozygoten $Na_v1.1$ -defizienten Mäuse mit einem höheren Score (AS \geq 2) beobachtet als bei den wildtypischen Mäusen (WT: 14% vs.

HET: 56%). Errechneter zweiseitiger P-Wert von 0,15 erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau, weshalb H_0 nicht widerlegt werden konnte. Die Unabhängigkeit der beiden Stichproben unter Hyperthermiebedingungen wurde somit statistisch nicht bestätigt.

3.3.2.3 Quantität und Arrhythmiesamples

Die Betrachtung der Quantität unterschiedlicher Rhythmusstörungen soll einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Arrhythmien in beiden Kollektiven der Hyperthermietests geben. Hierfür dient folgende graphische Zusammenstellung aufgetretener Arrhythmieformen (Abb. 43), aus welchen anschließend repräsentative Arrhythmiesamples gezeigt werden sollen. Dabei wurden Arrhythmien unter Ruhebedingungen denjenigen gegenübergestellt, welche unter gesteigerter Körpertemperatur von 39,5 °C induziert wurden.

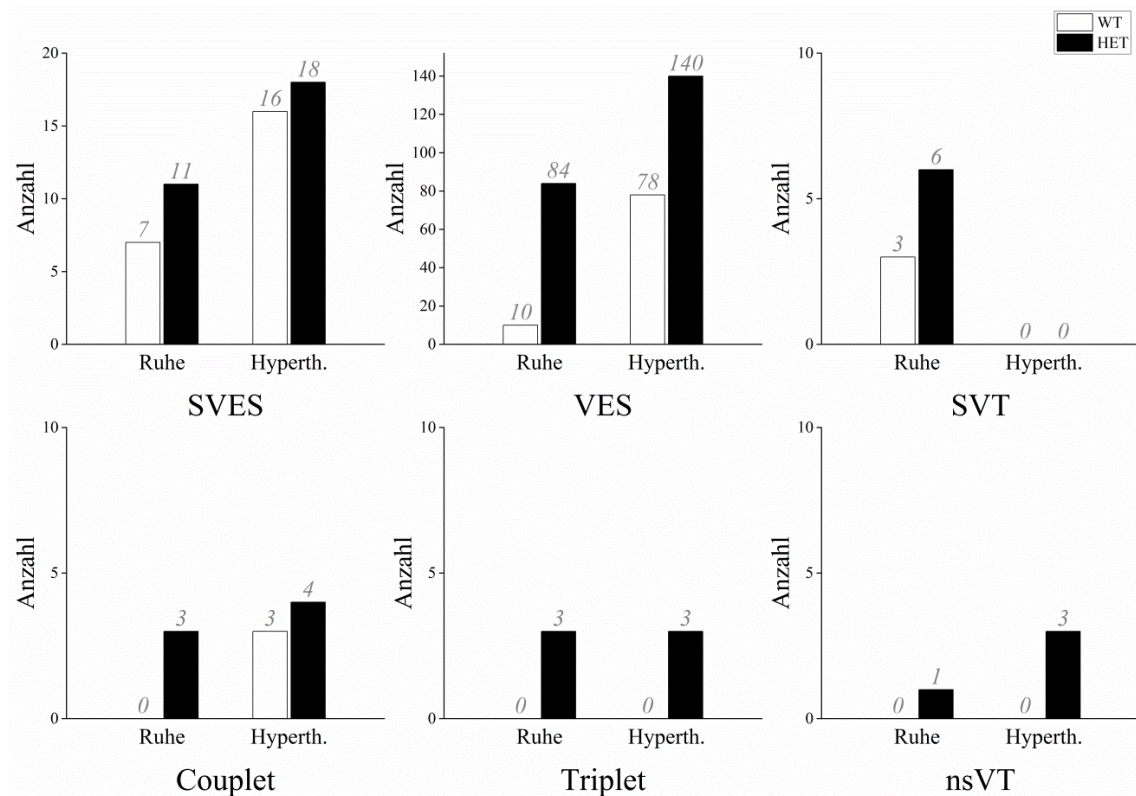


Abb. 43: Quantität der Arrhythmieformen unter Ruhe und Hyperthermie

Die Graphiken zeigen die Quantität beobachteter Arrhythmieformen im Vergleich der beiden Kollektive. Die Anzahl bei den HETs übertraf dabei diejenige des Kontrollkollektivs in elf der zwölf gezeigten Kategorien. Lediglich in der Kategorie der SVT unter Hyperthermie wurden in beiden Kollektiven gleichfalls keine Beobachtungen dokumentiert. Darüber hinaus zeigte sich der hypertherme Effekt in beiden Gruppen mit gesteigerter Arrhythmieanzahl unter Hyperthermie in mehreren Kategorien. SVES=Supraventrikuläre Extrasystole; VES=Ventrikuläre Extrasystole; SVT= Supraventrikuläre Tachykardie; nsVT= nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie

Die Verteilung der beobachteten Arrhythmien zeigte ein quantitatives Übergewicht der Rhythmusstörungen zugunsten der $Na_v1.1$ -defizienten Mäuse. Ausgenommen der SVT unter Hyperthermie, überwog die Anzahl beobachteter Episoden bei den Heterozygoten in allen Kategorien. Bei den HET-Tieren wurde lediglich in einer der zwölf Kategorien, der SVT unter Hyperthermie, kein Ereignis dokumentiert. Demgegenüber konnte bei den Wildtypen in sechs der gezeigten zwölf Kategorien sowohl in Ruhe als auch unter Hyperthermie keine Rhythmusstörung beobachtet werden. Der hypertherme Effekt gesteigerter Arrhythmogenität konnte in beiden Gruppen mit erhöhter Anzahl von Arrhythmien unter Hyperthermie gezeigt werden. Diese Steigerung wurde in den Kategorien der SVES, VES und Couplets in beiden Kollektiven ersichtlich. Im HET-Kollektiv wurde sie darüber hinaus bezüglich der nsVT ersichtlich. Die folgenden Erläuterungen geben einen detaillierteren Einblick über die Verteilung der Rhythmusstörungen und zeigen repräsentative Beispiele induzierter Arrhythmieformen.

Häufigste Arrhythmieform aller untersuchten Mäuse der Hyperthermie-Versuche waren Extrasystolen supraventrikulärer sowie ventrikulärer Art. Insgesamt wurden 112 Extrasystolen unter Normothermie beobachtet. Darunter befanden sich 7 SVES in der Gruppe der WT-Mäuse und 11 SVES in der Gruppe der HET. Unter den VES wurden 10 in der WT- und 84 in der HET-Gruppe beobachtet. Bei hyperthermen Bedingungen wurden demgegenüber 252 Extrasystolen gezählt. In der Gruppe der Wildtypen waren darunter 16 SVES sowie 78 VES. In der $Scn1a^{+/-}$ -Gruppe wurden 18 SVES und 140 VES beobachtet. Demnach überwogen beide Rhythmusstörungen sowohl in Ruhe als auch unter Hyperthermie in der Gruppe der HET-Tiere. Exemplarisch sind folgende SVES (Abb. 44) sowie VES (Abb. 45) abgebildet.

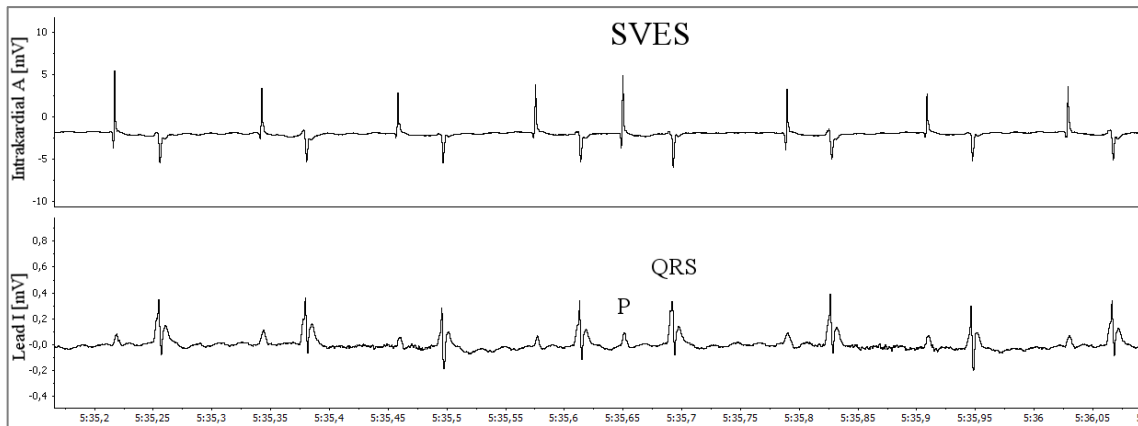


Abb. 44: Supraventrikuläre Extrasystole (SVES) bei einer HET-Maus

Frühzeitig einfallende P-Welle gefolgt von einem normal breiten QRS-Komplex mit anschließender nicht kompensierter postextrasystolischer Pause. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

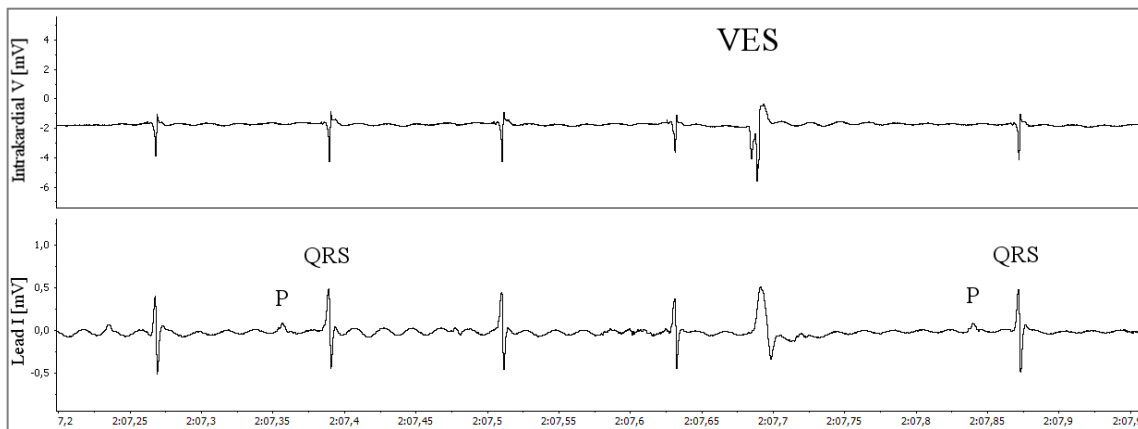


Abb. 45: Ventrikuläre Extrasystole (VES) bei einer HET-Maus

Ein frühzeitiger ventrikulärer Schlag mit verbreitertem QRS-Komplex ohne vorausgehende P-Welle. Anschließend kompensierende postextrasystolische Pause. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Ein intermittierender ventrikulärer Bigeminus wurde bei drei verschiedenen HET-Mäusen und darüber hinaus bei einer WT-Maus beobachtet. Dabei kam es bei besagter wildtypischer Maus lediglich zu zwei Phasen dieser Rhythmusstörung, während sie sich bei genannten HET-Mäusen auf etwa 20 Phasen teilweise repetitiv nach elektrischer Stimulation häuften. Ein Ausschnitt dieser intermittierenden Form des Bigeminus ist sowohl nach Stimulationsinduktion als auch nach spontaner Initiation gezeigt (Abb. 46; Abb. 47).

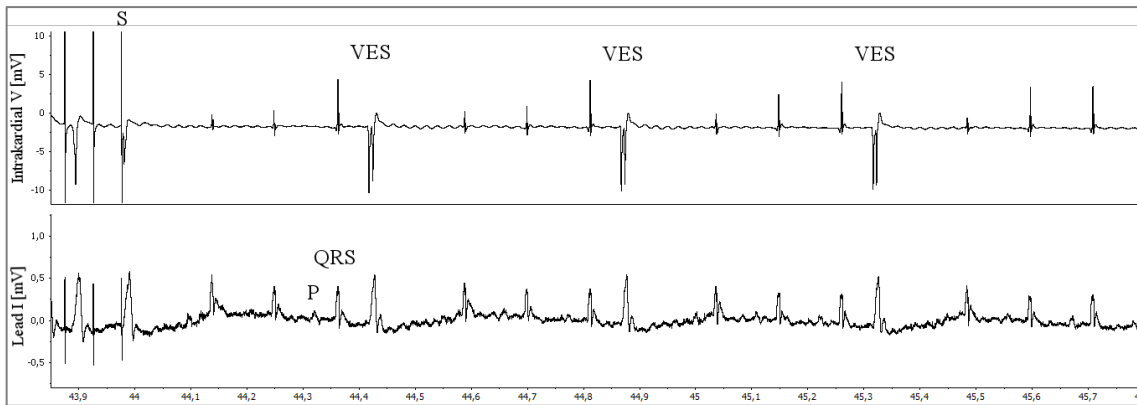


Abb. 46: Intermittierender ventr. Bigeminus einer HET-Maus nach Stimulation

Nach letztem Stimulus (S) folgt eine Phase von intermittierendem ventrikulärem Bigeminus mit ventrikulären Extrasystolen (VES) monomorpher Art. Hier nicht zu sehen: das Muster folgt bei dieser Maus nach jeder der vier konsekutiven Stimulationsphasen. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

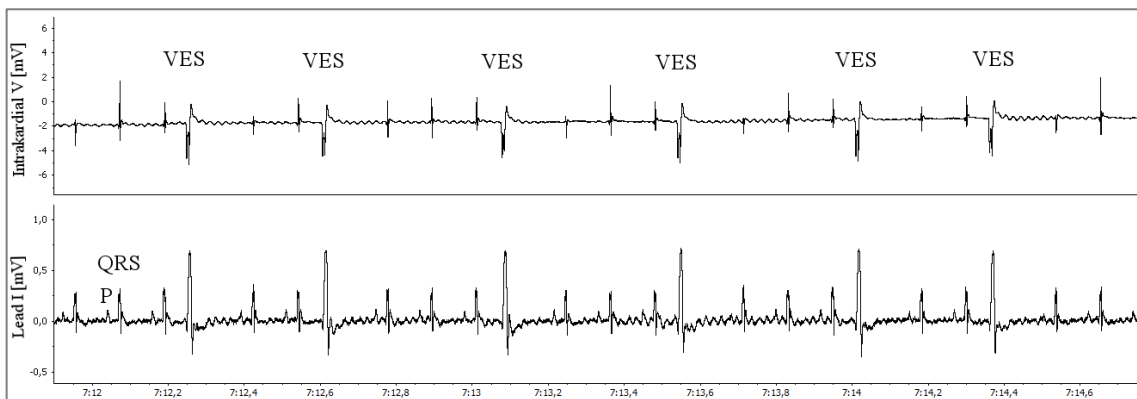


Abb. 47: Intermittierender ventrikulärer Bigeminus bei einer HET-Maus

Die Phase des intermittierenden Bigeminus beginnt spontan ohne unmittelbar vorangehende Stimulation. Monomorph konfigurierte ventrikuläre Extrasystolen (VES) folgen auf normalkonfigurierte Schläge. Dieses Muster spontaner Rhythmusstörung ist bei der HET-Maus wiederholt zu sehen. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Insgesamt wurden 10 ventrikuläre Couplets bei den Versuchen gezählt. Davon wurden 3 bei WT-Mäusen entdeckt, wobei alle unter hyperthermen Bedingungen auftraten. Dagegen wurden bei heterozygoten Mäusen 7 ventrikuläre Couplets beobachtet, 3 davon unter Ruhebedingungen sowie 4 weitere unter Hyperthermie (Abb. 48). Demnach überwog die Anzahl der ventrikulären Couplets bei den HET-Mäusen sowohl in Ruhe als auch unter hyperthermen Stress.

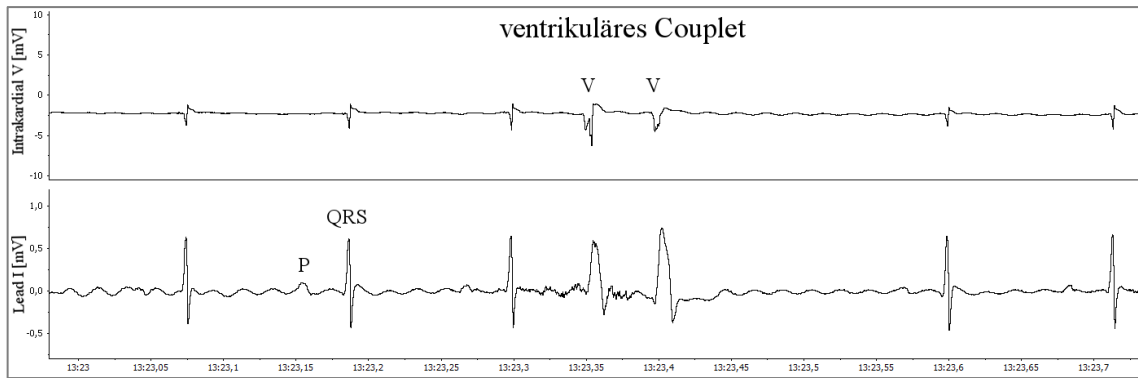


Abb. 48: Ventrikuläres Couplet bei einer HET-Maus

Zwei frühzeitig einsetzende konsekutive ventrikuläre Schläge (V) mit verbreitertem QRS-Komplex ohne sichtbare vorausgehende P-Welle. Anschließender Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex.

Unter den 9 aufgetretenen supraventrikulären Tachykardien (SVT) traten 6 bei Mäusen mit heterozygotem Genotyp auf (Abb. 49). Alle Episoden traten hierbei unter Ruhebedingungen auf.

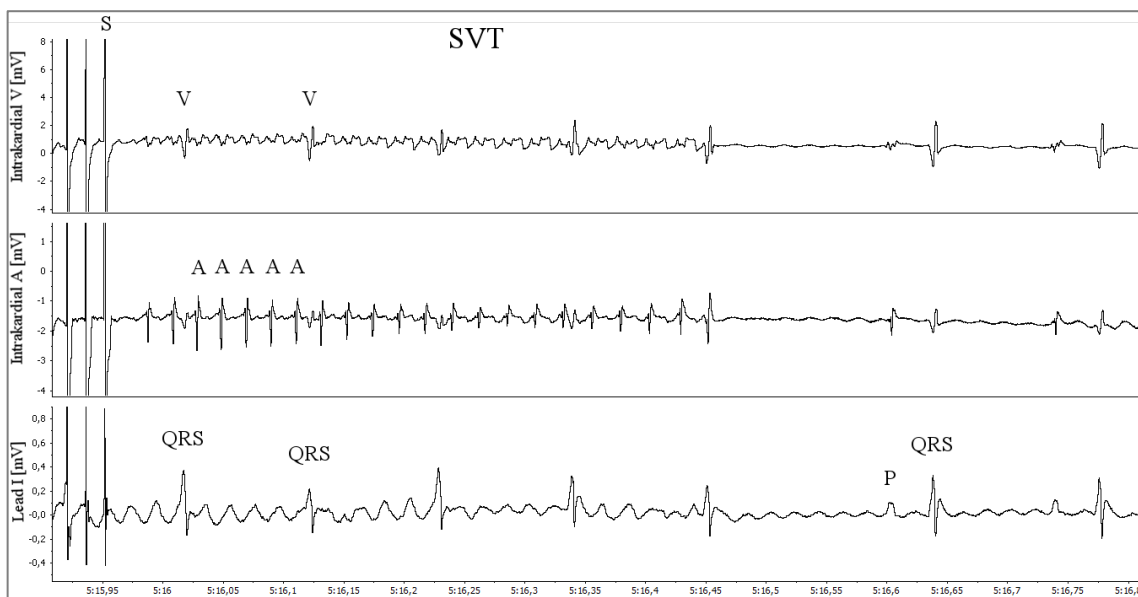


Abb. 49: Supraventrikuläre Tachykardie (SVT) bei einer HET-Maus

Nach Stimulation (S) werden besonders in der atrialen Ableitung (Mitte) regelmäßige Vorhofaktionen (A) mit einer 5:1 Weiterleitung auf die Ventrikel (V) sichtbar. Anschließend spontane Termination mit Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex.

Insgesamt wurden 6 ventrikuläre Triplets beobachtet. Davon traten alle bei Mäusen mit heterozygotem Genotyp auf. 3 Triplets wurden unter Ruhebedingungen, 3 weitere unter hyperthermen Stressbedingungen aufgenommen (Abb. 50).

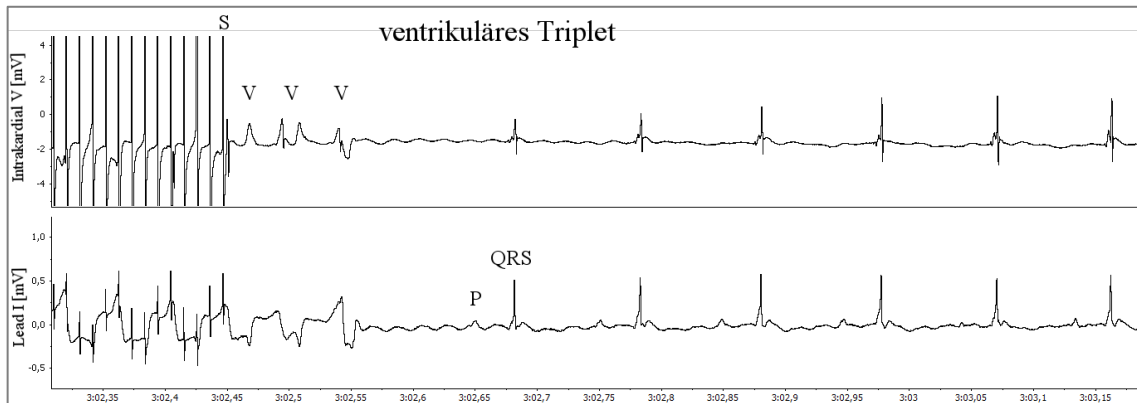


Abb. 50: Ventrikuläres Triplet bei einer HET-Maus

Auf den letzten Stimulus (S) folgen drei konsekutive ventrikuläre Schläge (V). Anschließender Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex

Unter den 4 aufgetretenen Episoden nicht anhaltender ventrikulärer Tachykardie (*nsVT*) wurden ebenfalls alle in der Gruppe der Heterozygoten gefunden. Eine Episode trat dabei unter Ruhebedingungen sowie 3 weitere unter Hyperthermie auf (Abb. 51; Abb. 52).

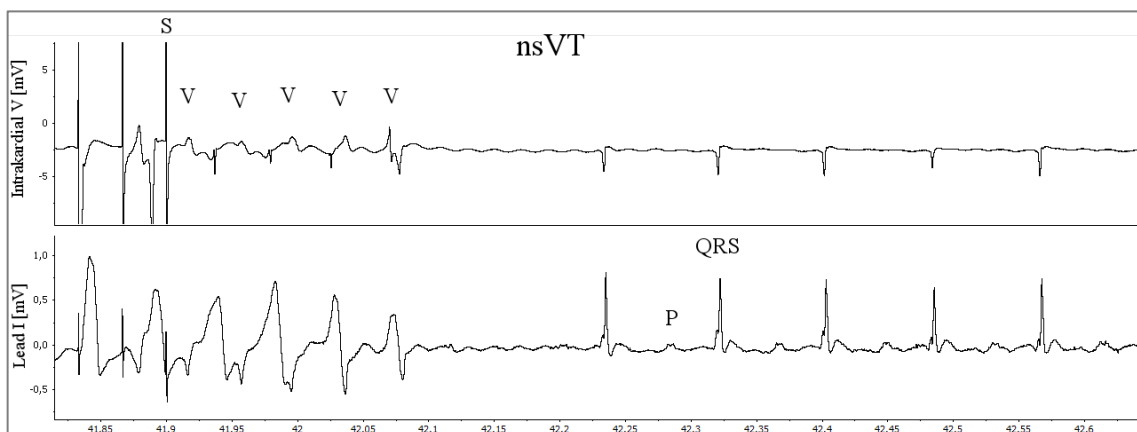


Abb. 51: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (*nsVT*) bei einer HET-Maus (1)

Nach letztem Stimulus (S) folgen fünf frühzeitig einsetzende ventrikuläre Schläge (V) mit anschließender spontaner Termination und Übergang in tachykarden Sinusrhythmus. Hier nicht zu sehen: es folgt Sinustachykardie für weitere 15 Sekunden mit spontaner Termination und abruptem Abfall der Herzfrequenz von 745 bpm auf 575 bpm. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex.

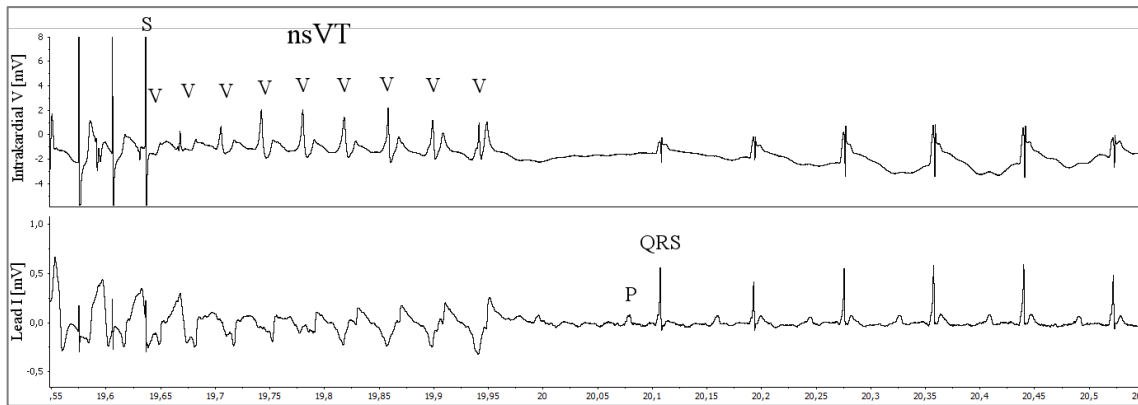


Abb. 52: Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (nsVT) bei einer HET-Maus (2)
 Weniger als zehn vorzeitig einsetzende ventrikuläre Schläge (V) direkt nach Stimulation (S). Spontane Termination mit Übergang in Sinusrhythmus. P=P-Welle; QRS=QRS-Komplex.

3.4 Arrhythmiescore

Der folgende Abschnitt fasst den Arrhythmiescore der elektrophysiologischen Untersuchungen (3.2.2) mit dem Score des elektrophysiologischen Teilabschnittes der Hyperthermie-Versuche (3.3.2.2) zusammen. Es werden somit alle detektierten Rhythmusstörungen sowohl in Ruhe als auch unter hyperthermen Stress zusammengefasst und analysiert. Die Bewertungen der einzelnen Arrhythmien nach dem Score-System entsprechen den bereits gezeigten Bewertungen aus den genannten Teilversuchen. Der eingetragene Wert repräsentiert dabei die maximal erreichte und damit schwerwiegendste Form der Rhythmusstörung jeder Maus. Die anschließende Tabelle gibt einen zusammenfassenden Überblick über alle erreichten Arrhythmiescores der Teilversuche (Tab. 18).

Tab. 18: Arrhythmiescore-Verteilung EPU und Hyperthermietest gesamt

Arrhythmiescore	Anzahl WT	Anzahl HET
Arrhythmiescore 0	5	-
Arrhythmiescore 1	11	9
Arrhythmiescore 2	6	9
Arrhythmiescore 3	3	11
Arrhythmiescore 4	-	1
Arrhythmiescore 5	-	-
Gesamtanzahl	25	30

Vergleichbar mit der Analyse der Teilversuche erfolgte die statistische Analyse des Gesamt-Arrhythmiescores auf Unabhängigkeit der beiden Kollektive hinsichtlich des Arrhythmiegrades. Der Unterschied bestand jedoch in der Wahl des statistischen Testverfahrens. Während bei den bereits beschriebenen Teilversuchen der *Exakte Fisher Test* Anwendung fand, erfolgte die Berechnung des Gesamt-Scores auf Grundlage des *Chi-Quadrat-Tests*. Ausschlaggebend war hierfür die Größe der Stichproben beziehungsweise die Größe der erwarteten Häufigkeiten in den einzelnen Gruppen. Während der *Exakte Fisher Test* bei relativ kleinem Stichprobenumfang der Teilversuche zuverlässige Ergebnisse liefert, ist der *Chi-Quadrat-Test* bei größerem Umfang der Stichprobe geeignet, valide Ergebnisse zu erzielen. Mit den erwarteten Häufigkeiten von >5 bei dem zusammengefassten Arrhythmiescore fiel die Wahl deshalb auf den *Chi-Quadrat-Test*. Zur Berechnung mittels Kontingenztabelle wurde wiederum eine Einteilung in zwei Gruppen durchgeführt. Eine Gruppe beinhaltete erneut niedriggradige Rhythmusstörungen ($AS < 2$), die andere dagegen höhergradige Rhythmusstörungen ($AS \geq 2$). Besagte Kreuztabelle als Basis der statistischen Berechnung mittels des *Chi-Quadrat-Tests* ist im Folgenden abgebildet und wird im Anschluss daran erörtert (Tab. 19).

Tab. 19: Arrhythmiescore EPU und Hyperthermietest gesamt

Kontingenztafel aller Mäuse aus elektrophysiologischen Untersuchungen und Hyperthermie-Versuchen. Dargestellt sind beobachtete sowie erwartete Häufigkeiten nach Zuordnung zu höher- und niedriggradigen Arrhythmiegruppen. In Klammern stehen relative Häufigkeiten; AS =Arrhythmiescore; Σ = Summe; * = statistisch signifikant

	WT		HET		Σ
	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	
$AS < 2$	16 (64%)	11,36 (45%)	9 (30%)	13,64 (45%)	25
$AS \geq 2$	9 (36%)	13,64 (55%)	21 (70%)	16,36 (55%)	30
Σ	25	25	30	30	55

Chi-Quadrat-Test: $p = 0,01168532^*$
 Exakter Fisher Test: p (zweiseitig) = $0,0156^*$

Im Rahmen der Zusammenfassung der genannten Teilversuche wurden beide Kollektive wiederum auf Unabhängigkeit bezüglich des Grades aufgetretener Arrhythmien hin untersucht. Demnach wurden alle beobachteten Rhythmusstörungen im Hinblick auf den zugrundeliegenden Genotyp analysiert. Die Analyse wurde sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Stressbedingungen und ohne Beachtung des unterschiedlichen Alters bei den Teilversuchen (P40-45, P70-80) durchgeführt. Als statistisches Testverfahren diente der Chi-Quadrat-Test. Die Nullhypothese H_0 besagte Gleichheit, die Alternativhypothese H_1 Ungleichheit der Häufigkeiten beider Kollektive in den Arrhythmiegruppen. Unter den Mäusen mit wildtypischem Genotyp wurden 64% mit einem AS <2 bewertet, 36% erreichten einen AS ≥ 2 . Es überwogen somit Rhythmusstörungen mit niedriger Malignität unter den WT-Mäusen. Umgekehrt verhielt es sich innerhalb der Gruppe mit $Na_v1.1$ -defizientem Genotyp. Hierbei wurden überwiegend schwerwiegendere Rhythmusstörungen gefunden. Während 70% der Mäuse einen Arrhythmiescore ≥ 2 erreichten, zeigten 30% Rhythmusstörungen geringerer Malignität (AS <2). Im Vergleich der beiden Kollektive wurden schwerwiegendere Rhythmusstörungen (AS ≥ 2) signifikant häufiger in der Knockout-Gruppe beobachtet als in der Kontrollgruppe (WT: 36% vs. HET: 70%). Erhobener *Chi-Quadrat-Test* ergab dabei einen signifikanten p-Wert von 0,012. Damit konnte die Nullhypothese verworfen werden und Unabhängigkeit der beiden Kollektive bestätigt werden. Demnach hatte die Zugehörigkeit der Mäuse zur Gruppe mit $Na_v1.1$ -defizientem Genotyp Auswirkungen auf den Grad der Arrhythmie und führte zu schwerwiegenderen Rhythmusstörungen.

4 Diskussion

Mutationen in Genen für spannungsabhängige Natriumkanäle führen zu einer Vielzahl von Erkrankungen. Durch Veränderungen der präzisen Ionenströme an der Zellmembran können sie unter anderem Herzrhythmusstörungen auslösen oder auch für verschiedene neurologische Störungen verantwortlich sein (Clancy und Kass, 2005; Meisler und Kearney, 2005). Eine Störung des neuronalen $Na_v1.1$ -Kanals verursacht beispielsweise das Dravet-Syndrom, eine schwere Form epileptischer Enzephalopathie. Neueren Erkenntnissen zufolge werden neuronale Na_v -Isoformen auch im Herzen exprimiert. Deshalb gilt es herauszufinden, in welcher Weise Dysfunktionen dieser *brain-type* Ionenkanäle das Herz beeinflussen. Intention der Arbeit war deshalb, den kardialen Phänotypen eines Dravet-Mausmodells zu evaluieren und die Beteiligung des $Na_v1.1$ -Defektes an dem erhöhten SUDEP-Risiko in Form von Herzrhythmusstörungen zu untersuchen. Der kardiale Phänotyp konnte unter anderem mit einer gesteigerten Herzfrequenz unter Stressbedingungen charakterisiert werden. Sowohl unter Isoproterenol-Stress als auch unter Hyperthermie-Stress wurden gesteigerte Herzfrequenzen ermittelt. Ebenso wurden Hinweise erhöhter Arrhythmieanfälligkeit gegenüber dem wildtypischen Kontrollkollektiv erhoben. Diese zeigte sich zum einen in Bezug auf die Qualität ausgelöster Arrhythmien mit dem Hang zu schwerwiegenderen Rhythmusstörungen. Zum anderen zeigte sich die erhöhte Arrhythmieeigung hinsichtlich der Quantität aufgetretener Arrhythmien auf Seite der heterozygoten Knockout-Mäuse. Auf einzelne Aspekte der vorliegenden Studie im Bezug auf Methodik und gewonnener Resultate soll hier kritisch eingegangen werden, um die Daten in den Kontext der bestehenden Literatur einordnen zu können.

4.1 Methodische Aspekte

Aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten und ihrer Komplexität durch den Einfluss vieler kritischer Variablen sind methodische Fehler der Studie nicht auszuschließen. Im Folgenden soll die durchgeführte Methodik daher kritisch betrachtet werden.

4.1.1 Mausstamm, Alter und Stichprobenumfang

In vorliegender Arbeit wurde ein hybridisiertes Mausmodell zweier gängiger Labormausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund verwendet. Dabei wurden Mäuse des Stamms 129SvJ mit Mäusen des Stamms C57BL/6 gekreuzt, um ein stabiles Na_v1.1-defizientes 129SvJ:C57BL/6-Mausmodell zu generieren (Yu et al., 2006). Bei der Interpretation der Ergebnisse von EKG und EPU ist der genetische Hintergrund der Versuchstiere stets zu berücksichtigen. Lange Zeit wurde angenommen, es wäre aufgrund der Konzeption des murinen Herzens nicht möglich bestimmte Arrhythmien bei nicht-genveränderten Mäusen zu induzieren (Garrey, 1914; Kirchhoff et al., 1998; Lee et al., 1998; Hagendorff et al., 1999). Diese These konnte mittlerweile widerlegt werden (Maguire et al., 2003). In der Studie von Maguire et al. (2003) wird sogar von einer 30-prozentigen Häufigkeit berichtet *nsVT* bei wildtypischen Mäusen zu induzieren. Bei der Arrhythmieanfälligkeit wurden allerdings deutliche Diskrepanzen zwischen den Wildtypen unterschiedlicher Mausstämme beobachtet. Mit anderen Worten wurde demnach eine Abhängigkeit der Induzierbarkeit von genetischem Hintergrund des untersuchten Mausmodells beschrieben. Dieser unterschiedliche kardiale Phänotyp der einzelnen Mausstämme macht einen unmittelbaren Vergleich von kardialen Parametern aus verschiedenen Studien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund somit obsolet. In vorliegender Studie wurden Arrhythmien nicht nur in der Gruppe der HET-Mäuse, sondern auch in der Gruppe des wildtypischen Kontrollkollektivs beobachtet. Zunächst scheint die Induktion von Rhythmusstörungen der Wildtypen auf ein aggressives Stimulationsprotokoll hinzuweisen, verglichen mit Arbeiten von Berul et al. (1996) und Wakimoto et al. (2001). In der Studie von Berul et al. (1996) wurden bei verwendetem C57BL/6J Mausmodell beispielsweise weder atriale noch ventrikuläre tachykarde Rhythmusstörung bei 14 untersuchten Mäusen induziert. In vorliegender Studie konnte demgegenüber unter Verwendung des Hybrid-Mausstamms bereits bei insgesamt 13 der 16 WT-Mäuse mindestens eine Tachyarrhythmie induziert werden. Beachtet man den differenten genetischen Hintergrund des hier untersuchten Mausmodells, weist dies auf eine genetische Disposition zur Induktion von Arrhythmien des Hybrid-Mausmodells hin, wie bei Maguire et al. (2003) bereits beschrieben.

Einen weiteren wichtigen Aspekt, den es bei der Ergebnisinterpretation von EKG und EPU zu berücksichtigen gilt, ist das Alter der untersuchten Tiere. In Studien konnte ein

Einfluss des Mäusealters auf EKG-Parameter wie Herzfrequenz, *PR*-, *QRS*- oder auch *QT-Zeiten* gezeigt werden (Rao und Verkman, 2000; Wehrens et al., 2000; Maguire et al., 2003). Auch bezüglich der Arrhythmieanfälligkeit im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen wurde eine Altersabhängigkeit beschrieben (Maguire et al., 2003). Somit ist bei direktem Vergleich verschiedener elektrokardiographischer und elektrophysiologischer Studien das Alter der Versuchstiere stets zu berücksichtigen. In vorliegender Studie wurden innerhalb eines Versuchsabschnittes jeweils Mäuse gleichen Alters in WT- und HET-Gruppe verglichen. Deshalb ist dieser Aspekt bei der Ergebnisinterpretation innerhalb eines Versuchsabschnittes zu vernachlässigen. Beim Vergleich zwischen den verschiedenen Versuchsabschnitten kann der Effekt der Altersdiversität bei abweichenden Ergebnissen der EKG- und EPU-Versuche in den Teilversuchen jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Während bei EKG-Untersuchungen in Ruhe und unter Isoproterenolstress (3.1) sowie bei EPU-Versuchen unter physiologischer Körpertemperatur (3.2) Mäuse im Alter zwischen 70-80 Tagen herangezogen wurden, lag das Versuchstieralter bei EKG und EPU der Hyperthermie-Versuche (3.3) zwischen 40-45 Tagen post natum. Der unmittelbare Vergleich der Parameter zwischen den Versuchsabschnitten ist deshalb unter Vorbehalt anzustellen, obgleich der Altersunterschied der Versuchstiere in den Abschnitten relativ gering war. Um den kardialen Phänotypen des $Na_v1.1$ -Modells zu evaluieren, wurde das unterschiedliche Alter in den Teilversuchen jedoch bewusst gewählt. Der Anlass lag hierfür in der engen Symptomkorrelation des verwendeten Mausmodells zu humanem Dravet-Syndrom bezüglich frühem Krankheitsbeginn und Verlauf der Erkrankung. Typischerweise beginnt das Dravet-Syndrom bei zuvor unauffälligen Säuglingen innerhalb des ersten Lebensjahres mit oftmals fieberinduzierten Anfällen (Dravet, 2011a). Nach der Phase klinischer Verschlechterung mit Zunahme der Frequenz und Heterogenität der Anfälle kommt es unter Umständen zu Stagnation oder Rückgang der Anfälle bei bleibenden zerebralen Defiziten (Akiyama et al., 2012; Guerrini, 2012). Das Risiko frühzeitig zu versterben ist bei jungen Dravet-Patienten stark erhöht, wobei *SUDEP* in mehreren Studien für jeden zweiten Todesfall verantwortlich gemacht wird (Dravet, 2011b). Die phänotypische Korrelation des verwendeten Mausmodells zum humanen Dravet-Syndrom wird bei Yu et al. (2006) deutlich. Ebenfalls zunächst unauffällige Mäuse entwickeln epileptische Anfälle in der vierten postnatalen Woche sowie koordinative

Defizite und werden durch Zunahme plötzlicher Todesfälle auffällig (Yu et al., 2006). Um eine mögliche kardiale Ursache dieser plötzlichen Todesfälle durch Arrhythmien und eine mögliche Altersabhängigkeit aufschlussreich aufdecken zu können, wurden in vorliegender Arbeit Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht. Ein weiterer Aspekt in Bezug auf gewählte Altersunterschiede ist das Wissen um altersabhängige Expression und Distribution kardialer Natriumkanäle im Laufe der Gewebematuration, die zu unterschiedlicher Kanalausstattung in neonatalen und adulten Herzen führen (Kaufmann et al., 2010). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl die EKG-Parameter als auch die Arrhythmieanfälligkeit durch das unterschiedliche Versuchstieralter beeinflusst wurden. Der unmittelbare Vergleich der Ergebnisse aus den Teilversuchen dieser Studie ist somit eingeschränkt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt deshalb unter Berücksichtigung dieser Aspekte in dem Abschnitt der inhaltlichen Diskussion.

Bei der Diskussion über die angewandte Methodik gilt es den Stichprobenumfang der vorliegenden Studie kritisch zu betrachten und in den literarischen Kontext einzuordnen. Von den insgesamt 69 untersuchten Mäusen der drei unterschiedlichen Versuchsreihen wurden 21 Mäuse aufgrund nicht repräsentativer Herzfrequenzen von <400 bpm (13 Mäuse), interventionellem Exitus (7 Mäuse) oder technischen Problemen (1 Maus) von der Studie ausgeschlossen. Somit gingen 48 Versuchstiere in die Berechnungen der Studie ein. Bezogen auf die Versuchsreihen bedeutete dies 13 untersuchte Tiere bei EKG (WT: 6/ HET: 7), 19 untersuchte Tiere bei EPU (WT: 9/ HET: 10) und weitere 16 Tiere bei den Hyperthermie-Versuchen (WT: 7/ HET: 9). Im Kontext mit vergleichbaren elektrokardiographischen und elektrophysiologischen Studien zeigt der gewählte Umfang der Stichprobe ähnliche Größe. Beispielsweise wurde bei Auerbach, Jones et al. (2013) ein anderes Dravet-Mausmodell mit 8 WT gegenüber 13 HET verglichen. Noujaim et al. (2012) untersuchten in ihren EKG-Studien über den $Na_v1.6$ -Kanal 8 WT gegenüber 9 HET. Kovoov et al. (2001) stellten in ihren Studien über den Kaliumkanal I_{KACH} 14 WT-Mäusen 11 HET-Mäuse gegenüber. Obwohl die gewählte Stichprobengröße damit in den Bereich der Angaben vergleichbarer Studien fällt, ist eine Einschränkung der statistischen Teststärke aufgrund von geringem Stichprobenumfang nicht auszuschließen. Darüber hinaus sind hierdurch statistische Fehler I. beziehungsweise II. Ordnung ebenfalls nicht auszuschließen. Die

Anzahl der untersuchten Tiere wurde jedoch aufgrund des exakt geforderten Lebensalters zum Untersuchungszeitpunkt sowie der langwierigen Versuchsabläufe eingeschränkt. Intubation und Anästhesie, präoperatives Assessment, Katheterisierung mit intrakardialer Lagekontrolle, elektrokardiographische Aufzeichnungen sowie langwierige EPU-Protokollabläufe in Atrium und Ventrikel führten dabei zu gewissem zeitlichen Aufwand.

4.1.2 Perioperatives Setting

Die Beeinflussung der Ergebnisse durch das gewählte perioperative Setting soll im Folgenden diskutiert werden. Für die Interpretation einzelner Versuchsabschnitte der vorliegenden Studie sowie die Einordnung der Ergebnisse in den literarischen Kontext stellt die Wahl des Anästhetikums einen wichtigen Aspekt dar. In unterschiedlichen Mausstudien konnte beobachtet werden, dass Wirkung und Nebenwirkungen von Anästhetika in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds divergieren (Kass et al., 1998; Homanics et al., 1999; Wehrens et al., 2000; Roth et al., 2002). Im Rahmen elektrokardiographischer Untersuchungen sind hierbei besonders kardiorespiratorisch depressive Wirkungen und damit die Beeinflussung von Parametern wie *HR*-, *PR*-, *QRS*- oder auch *QT-Zeiten* durch Anästhetika bei unterschiedlichen Mausstämmen zu beachten. Somit ist ein direkter Vergleich von Parametern verschiedener Studien durch variable Kombination von Anästhesie und Mausstamm eingeschränkt (Wehrens et al., 2000).

Zudem gilt es bei der Wahl des Anästhetikums die spezifischen Eigenschaften hinsichtlich pharmakologischer Wirkungen und kardiorespiratorischer Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Im Laufe unzähliger mausexperimenteller Studien haben sich verschiedene Anästhetika bewährt. Unter anderem finden sich in der Literatur Ether, Tribromethanol, Pentobarbital, Ketamin, Halothan oder weitere volatile Anästhetika wie Isofluran, obgleich viele dieser Anästhetika kardiorespiratorische Effekte besitzen (Rao und Verkman, 2000; Lorenz, 2002). Als besonders günstig für kardiologische Untersuchungen haben sich dabei Tribromethanol (Avertin®) sowie Isofluran im Hinblick auf einen schnellen Wirkungseintritt, adäquate Anästhesietiefe, geringe kardiorespiratorische Depression sowie gute Reproduzierbarkeit gezeigt (Roth et al., 2002). Beide Pharmaka wurden deshalb in vorliegender Studie verwendet. Bei EKG-Untersuchungen

(3.1) wurde aufgrund der einfachen Handhabung, des geringen technischen Aufwands und der guten Anästhesiewirkung Avertin[®] gewählt. Demgegenüber wurden bei allen weiteren zeitaufwändigeren Versuchsreihen (3.2, 3.3) Mäuse mittels Isofluran unter Intubationsnarkose anästhesiert. Somit konnte eine gute Steuerung der Anästhesie und Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig geringer Kardiodepression erreicht werden. Aufgrund unterschiedlicher Anästhesieregimen und der damit verbundenen möglichen kardialen Beeinflussung der untersuchten EKG-Parameter wird der unmittelbare Vergleich der Experimente innerhalb dieser Studie allerdings erschwert. Darüber hinaus könnten die unterschiedlichen kardialen Effekte der Anästhetika divergente Ergebnisse der Teilstudien erklären. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise eine nicht zu vernachlässigende negativ chronotrope Wirkung des Avertins[®] zu nennen, welche Lorenz (2002) und auch Kass et al. (1998) beschreiben. Diese könnte zu den nicht repräsentativen Frequenzen von unter 400 bpm bei den EKG-Untersuchungen geführt haben (WT: 5/ HET: 4). Auf die Interpretation der Ergebnisse wird im Abschnitt der inhaltlichen Diskussion weiter eingegangen.

Möchte man die Ergebnisse dieser Studie mit weiteren Arbeiten in Zusammenhang mit dem Krankheitsmodell des Dravet-Syndroms vergleichen, gilt es mögliche Anästhesiewirkungen zu berücksichtigen. Beispielsweise wurden bei Kalume et al. (2013) EKG-Untersuchungen an nicht anästhesierten Mäusen nach Implantation von telemetriefähigen Geräten durchgeführt. Auch Auerbach et al. (2013) untersuchten in ihrer Arbeit telemetrische EKG-Aufzeichnungen von nicht anästhesierten Mäusen. Bei dem Vergleich dieser Untersuchungen mit der vorliegenden Studie ist das Fehlen von Anästhesie und damit möglicher kardialer Beeinflussung bei bewusstseinsklaren Mäusen zu beachten.

Bei der methodischen Diskussion sind weitere Punkte anzusprechen, welche das Ergebnis beeinflusst haben könnten, jedoch als kritische Variablen nur unzureichend erfasst werden können. Hierzu zählen zum einen mögliche kardiale Effekte durch den operativen Eingriff per se. Bei den Untersuchungen wurde der sogenannte *closed-chest* Zugang und somit eine minimal invasive Form des chirurgischen Zugangs gewählt. Dennoch sind vagale Reizung, hämodynamische Interaktionen, entzündungsmediatorvermittelte Effekte oder weitere operationsbedingte Stressoren und damit kardiale Beeinflussung denkbar. Zum anderen sind Faktoren der Maustierhaltung als kritische

Variable anzusehen, die nur unzureichend bestimmt werden können. Obwohl in den Versuchen übliche standardisierte Vorgehensweisen herangezogen wurden, reichen die Variablen dabei von individuellen Unterschieden in Nahrungs- und Wasseraufnahme, körperlichem Zustand bis hin zu individueller zirkadianer Rhythmik der Mäuse (Rao und Verkman, 2000; Berul et al., 2001).

4.1.3 Extrapolation des Mausmodells

Die Labormaus, *Mus musculus*, hat sich im Laufe der Zeit zu dem am weitesten verbreiteten Labormodell zur Erforschung menschlicher Erkrankungen etabliert. Dies umfasst ebenfalls die Erforschung unter kardiologischen Gesichtspunkten (Kaese und Verheule, 2012; Boukens et al., 2014). Die großen Vorzüge sind dabei nicht zuletzt die schnelle Reproduktionszeiten sowie die einfache Tierhaltung mit relativ geringem ökonomischen Aufwand (Gharib und Robinson-Rechavi, 2011). Vor allem die evolutionsbiologische Nähe dieses Säugetiermodells zum Menschen stellt eine wichtige Grundlage dar. Die starke genetische Homologie zwischen murinem und humanem Genom von 99% und die relativ einfache Möglichkeit der genetischem Rekombination durch etablierte Techniken machen die Nager zum bevorzugten Tiermodell (Smithies, 2001; Waterston et al., 2002; Schmouth et al., 2012). Doch trotz der Reihe an Vorteilen darf eine gewisse Vorsicht bei der Extrapolation der kardiologischen Ergebnisse mit der Übertragung auf den Menschen nicht fehlen. Es finden sich bedeutende spezies-spezifische Unterschiede. Unter anderem betreffen sie EKG-Morphologie, Aktionspotential oder auch die Genese von Arrhythmien. Zwei offensichtliche EKG-morphologische Unterschiede sind das Fehlen eines isoelektrischen ST-Segments und die unpräzise T-Wellen-Termination, die auf Unterschiede in der murinen Ventrikelre-polarisation hinweisen (Boukens et al., 2014). Auch das murine Aktionspotential weist wichtige morphologische Unterschiede auf. Es ist nicht nur um ein Vielfaches kürzer, um den hohen Frequenzen des Mäuseherzens zu entsprechen, sondern besitzt zudem keine Plateauphase vergleichbar mit der des Menschen, wodurch das ventrikuläre Aktionspotential eine dreiecksförmige Gestalt annimmt (Boukens et al., 2014). Elektrophysiologische Grundlage dieser Phänomene sind Unterschiede in den de- und repolarisierenden Ionenströmen. Dabei ist allerdings nicht die spezies-spezifische Ausstattung der evolutionsbiologisch hoch konservierten Ionenkanäle

ausschlaggebend. Vielmehr ist der unterschiedliche elektrophysiologische Beitrag der Kanäle für die jeweilige Morphologie der Aktionspotentiale und damit der EKGs verantwortlich (Kaese und Verheule, 2012; Boukens et al., 2014).

Bezüglich der Arrhythmogenese gibt es ebenfalls Aspekte, die bei der Übertragung von Mausstudien auf den menschlichen Organismus beachtet werden müssen. Die viel zitierte *critical mass theory* von Garrey (1914) weist auf einen wesentlichen Punkt hin – die geringe Gewebemasse des Mäuseherzens, die kreisende Erregungen in Atrium und Ventrikel als arrhythmogene Grundlage erschwert. Somit wurden anhaltende Tachyarrhythmien im Mäuseherzen lange Zeit für unmöglich gehalten. Das Mäuseherz schien zu klein zu sein, um zu flimmern (Kaese und Verheule, 2012). Obwohl dies inzwischen widerlegt wurde, scheint die geringe Herzmasse weiterhin ein Grund für die Schwierigkeit zu sein, atriale oder auch ventrikuläre Arrhythmien bei der Maus zu induzieren und lässt provozierte Arrhythmien üblicherweise nicht anhalten, sondern spontan terminieren (Dubin, 2001; Kaese und Verheule, 2012; Boukens et al., 2014). Dieser Gedanke ist bei der Interpretation der Arrhythmiescores zu berücksichtigen. Er gibt vor allem den induzierten Tachyarrhythmien höheren Grades und längerer Dauer mehr Gewicht. Gleichzeitig ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass keine der beobachteten Arrhythmien anhielt, um einen Arrhythmiescore von 5 Punkten zu erreichen.

4.2 Inhaltliche Aspekte

Nach der Diskussion unter methodischen Gesichtspunkten sollen im Folgenden inhaltliche Aspekte der Ergebnisse durchgeführter Experimente diskutiert und in den literarischen Zusammenhang gebracht werden.

4.2.1 EKG-Parameter

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate elektrokardiographischer Parameter dieser Studie besprochen und in den wissenschaftlichen Kontext der bestehenden Literatur eingeordnet. Dabei werden auch hierfür relevante EKG-Parameter berücksichtigt, die bei EPU- und Hyperthermie-Versuchen erhoben wurden.

Betrachtet man die kardiale Phänotypisierung der $Scn1a^{+/-}$ -Mäuse, lässt sich zunächst eine Auffälligkeit bezüglich der **Herzfrequenz** dieser Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe konstatieren. Während die genetisch veränderten Mäuse bei EKG-, EPU- und Hyperthermie-Versuchen unter Ruhebedingungen ähnliche Herzfrequenzen verglichen mit den WT-Mäusen aufwiesen, stieg die Frequenz der HET-Mäuse unter Stresseinfluss überproportional an. Sowohl unter pharmakologisch induziertem Stress mittels Isoproterenol ($p=0,0031$) als auch unter Hyperthermiestress ($p=0,00023$) stieg die Herzfrequenz signifikant über diejenige der Wildtypen. Respektive verringerten sich bei allen Versuchen die separat gemessenen Zeiten der RR- sowie PP-Abstände. Die Steigerung der Herzfrequenz bei den Heterozygoten lag dabei 3,05% (Isoproterenol) beziehungsweise 3,87% (Hyperthermie) über der Frequenzsteigerung der Kontrollgruppe. Unveränderte Frequenzen unter Ruhebedingungen lassen sich ebenfalls bei Telemetrieuntersuchungen eines anderen Dravet-Mausmodells von Auerbach et al. (2013) finden. Auch bei Maus-Telemetrieuntersuchungen von Kalume et al. (2013) und EKG-Untersuchungen von Dravet-Patienten bei Delogu et al. (2011) sind die Frequenzen nicht signifikant verändert. Allerdings ist hier bereits unter Ruhebedingungen der Trend zu höherer Herzfrequenz bei dem Dravet-Syndrom zu erkennen. Allen Studien ist gemeinsam, dass sowohl bei den Patienten als auch bei den Mausmodellen des DS der $Na_v1.1$ -Kanal ubiquitär betroffen ist. Das heißt, er ist gleichsam in Nervensystem und Herzen betroffen. Interessanterweise zeigt sich bei selektiv kardialen Knockout des $Na_v1.1$ bei Kalume et al. (2013) in gleicher Weise wie bei selektivem Blockieren des Kanals am Herzen mittels Tetrodotoxin bei Maier et al. (2003) ein konträres Bild. Wird der $Na_v1.1$ -Kanal, wie diese Studien zeigen, isoliert am Herzen ausgeschaltet, resultiert nicht etwa eine Steigerung, sondern im Gegensatz dazu eine Reduktion der Herzfrequenz. Aus der Gesamtschau der Studien lässt sich somit ableiten, dass der $Na_v1.1$ -Kanal in die Kontrolle des Herzrhythmus eingebunden ist. Für die Steigerung der stressbedingten Herzfrequenz bei dem Dravet-Syndrom scheinen allerdings nicht unmittelbar kardiale Ursachen durch den $Na_v1.1$ -Defekt ursächlich zu sein. Es werden vielmehr absteigende neuronale Effekte durch den Kanalausfall in proencephalischen GABAergen Interneuronen auf autonome Zentren des Hirnstammes verantwortlich gemacht, die das Herz indirekt beeinflussen (Kalume et al., 2013). Gesteigerte Herzfrequenzen bei Epilepsiepatienten sind mit einer erhöhten kardialen Mortalität assoziiert (Scattolini et al., 2013). Darüber hinaus gelten sie als genereller

Risikofaktor für einen plötzlichen Herztod (Priori et al., 2001). Unter diesen Aspekten könnte somit die beobachtete gesteigerte Herzfrequenz der $Nav1.1$ -negativen $Scn1a^{+/-}$ -Mäuse in Zusammenhang mit SUDEP gebracht werden.

Die Ergebnisse anderer Parameter wie PR-, Pdur-, QRS- und verschiedene QT-Zeiten sind dagegen inkonsistent. Das **PR**-Intervall repräsentiert die Reizleitung durch das Atrium und den AV-Knoten bis zum Beginn des Ventrikelaktionspotentials (Snyder et al., 2014). Es wurde bei den EKG-Versuchen unter Avertinnarkose bei DS-Mäusen verkürzt gemessen. In Ruhe ($p=0,0096$) und unter Isoproterenolstress ($p=0,000065$) lag es unter demjenigen der Kontrolltiere. Dahingegen wurde das PR-Intervall bei allen vier übrigen Messungen, einschließlich der EPU-Messungen, unter Isoflurannarkose tendenziell verlängert gemessen. Statistische Signifikanz zeigte dabei das verlängerte PR-Intervall unter Hyperthermiestress ($p=0,0011$). Welchen Einfluss hierbei die Wahl des Narkotikums oder das Mäusealter haben, bleibt ungeklärt. Eine Verlängerung des PR-Intervalls fördert die Entstehung von Tachyarrhythmien über *reentrant*-Mechanismen sowie Bradyarrhythmien über Blockade der Reizweiterleitung (Surges et al., 2009). In anderen Studien der bestehenden Literatur zeigte sich keine signifikante Veränderung des PR-Intervalls (Maier et al., 2003; Auerbach et al., 2013; Kalume et al., 2013), weshalb die Auswirkungen der divergenten Ergebnisse in vorliegender Studie nicht abschließend geklärt werden können. Die beschriebene gesteigerte Frequenz von AV-Blockierungen bei DS-Mäusen in der Studie von Kalume et al. (2013) deutet allerdings auf eine gewisse Vorhofpathologie hin, die in Einklang mit beobachteten EKG-Veränderungen der Vorhoferregung zu bringen wäre. In vorliegender Studie wurden ebenfalls AV-Blockbilder in geringem Ausmaß beobachtet. Drei der zwölf untersuchten HET-Mäuse (25%) zeigten bei der elektrophysiologischen Untersuchung AV-Blockbilder. Bei Hyperthermie-Versuchen wurden diese Störungen der Reizleitung dagegen nicht beobachtet. Ermittelte erhöhte Inzidenzen absoluter Arrhythmie bei den Knockout-Mäusen unterstützen den Aspekt einer Pathologie des Vorhofs. Zusammengefasst könnten daher Veränderungen der PR-Zeiten sowie der im Folgenden näher beschriebenen P-Dauer (Pdur) in Korrelation mit *AV-Blockbildern* und beobachteter erhöhter Inzidenz von *SVT* in vorliegender Studie stehen.

Die Dauer der Vorhoferregung **Pdur** zeigte unter Ruhebedingungen keinen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen. Unter Hyperthermiestress wurde sie bei

den KO-Mäusen dagegen signifikant verlängert gemessen ($p=0,0000000036$). Eine Verlängerung der P-Welle gilt als Risikofaktor für eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (Magnani et al., 2011; Snyder et al., 2014). Unter Stressbedingungen reduzierte sich mit steigender Herzfrequenz die Dauer der P-Welle bei allen Mäusen wie bei Irisawa and Seyama (1966) beschrieben. Auffällig war allerdings eine deutlich eingeschränkte Verkürzung der P-Welle bei den *Scn1a*^{+/-}-Mäusen. Während sich *Pdur* bei den WT-Mäusen im Hyperthermietest um 16,3% verkürzte, änderte sie sich bei den Mutanten lediglich um 1,78%. Unter Isoproterenolstress zeigte sich dieser Effekt ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß. Hier wurde eine Verkürzung von 13,3% bei den WT-Mäusen gegenüber lediglich 9,2% bei den Mutanten gemessen. Mit der eingeschränkten Verkürzung bei den *Nav1.1*-negativen Mäusen vergrößerte sich der Anteil der P-Welle an deren PR-Intervall. Nach neueren Studien ist dies mit erhöhter kardialer Mortalität assoziiert (Soliman et al., 2014). Ergul et al. (2012) fanden bei unverändertem PR-Intervall eine erhöhte P-Dispersion bei DS-Patienten, die als Zeichen autonomer Dysfunktion betrachtet wird. Kardiale autonome Dysfunktion wird als Risikofaktor für Arrhythmien und darüber hinaus als Risikofaktor für den plötzlichen Herztod gesehen (Ergul et al., 2012). Welchen genauen Einfluss die Veränderungen der P-Welle bei dem Dravet-Syndrom auf die Genese von SUDEP haben, ist damit jedoch nicht abschließend zu klären. Unter dem Aspekt der *Nav1.1*-Lokalisation innerhalb des Sinusknotens, wie bei Maier et al. (2003) beschrieben, ist allerdings eine mögliche Beteiligung des Kanalausfalls an supraventrikulären Rhythmusstörungen in Form von Sick-Sinus-Syndrom oder absoluter Arrhythmie denkbar. Unterstützt wird dies wiederum durch beobachtete erhöhte Inzidenzen supraventrikulärer Rhythmusstörungen wie *SVT*, *absolute Arrhythmie*, *SVES* oder auch beobachtete *AV-Blockbilder*.

Der **QRS**-Komplex bildet die Erregung der beiden Ventrikel ab. Die Erregung läuft dabei über die intraseptalen Tawara-Schenkel zur Herzspitze hin und von dort über die Purkinje-Fasern zurück zur Herzbasis. Bei den *Scn1a*^{+/-}-Mäusen war der QRS-Komplex gegenüber der Kontrollgruppe bei den Tests unter Isoflurannarkose sowohl in Ruhe ($p=0,0000014$) als auch unter Hyperthermie ($p=0,034$) signifikant verlängert. Dies spricht für eine Leitungsverzögerung innerhalb des Ventrikelsystems. Eine verlängerte QRS-Zeit gilt nach Desai et al. (2006) als unabhängiger Faktor erhöhter kardiovaskulärer Mortalität. Nach Surges et al. (2009) begünstigt dabei die verzögerte Ventri-

keldepolarisation das Auftreten von Arrhythmien tachykarder sowie bradykarder Natur. Bei Stressinduktion mittels Isoproterenol unter Avertinnarkose zeigte sich demgegenüber eine signifikant kürzere QRS-Zeit gegenüber den Kontrolltieren. Unüblicherweise wurde hierbei allerdings eine Verlängerung der QRS-Zeit bei Herzfrequenzanstieg in beiden Gruppen beobachtet, was generell als pathologisch anzusehen wäre (Scherf und Schaffer, 1952). Dieses Phänomen wurde allerdings gleichsam bei wildtypischen Mäusen und HETs beobachtet, weshalb diese Messung unter Vorbehalt zu betrachten und der Effekt unter Umständen den applizierten Pharmaka zuzuschreiben ist.

Die QT-Zeit repräsentiert die Zeit der Erregung bis hin zu vollständiger Repolarisation der Ventrikel. Bei Betrachtung der QT-Zeiten im Rahmen des Dravet-Syndroms zeigt sich sowohl in den Teilversuchen dieser Studie als auch in der wissenschaftlichen Literatur eine gewisse Inhomogenität bezüglich der Ergebnisse. Im Ruhe-EKG unter Avertinnarkose wiesen alle ermittelten QT-Zeiten (QT , QT^+ , QT_B , QT_F) eine statistisch hoch signifikante Verkürzung bei KO-Mäusen gegenüber dem Kontrollkollektiv auf. Unter Isoproterenolstress zeigte sich lediglich bei der QT^+ -Zeit eine statistische Signifikanz ($p=0,000082$), obgleich die Tendenz zur Verkürzung bei allen übrigen QT-Parametern erhalten blieb. Unter hyperthermen Bedingungen und Isoflurannarkose zeigte sich ebenfalls bei einer der QT-Zeiten, QT_F , eine signifikante Verkürzung ($p=0,0033$). In dem Ruhe-EKG des Hyperthermietests zeigte sich dagegen eine durchgehende Tendenz zu verlängerten QT-Zeiten, die bei QT_F statistische Signifikanz erhielt ($p=0,013$). Auffallend war eine unübliche Verlängerung der QT-Zeit unter stressbedingter Steigerung der Herzfrequenz über alle Teilversuche hinweg bei 7 der 16 ermittelten QT-Zeiten in beiden Kollektiven. Da sich dieses Phänomen nicht auf KO-Mäuse beschränkte, sondern gleichermaßen bei Wildtypen gefunden wurde, lässt sich hiermit nicht auf eine DS-spezifische Pathologie hindeuten. Die Inhomogenität der QT-Parameter in vorliegender Studie zeigt sich ebenfalls in der wissenschaftlichen Literatur. Kalume et al. (2013) beschreiben wie auch Delogu et al. (2011) keinerlei Änderungen der QT-Parameter auf Signifikanzniveau, wobei jedoch bei Letzteren eine Tendenz zur verkürzten QT-Zeit sichtbar wird. In der Studie von Ergul et al. (2012) zeigten untersuchte DS-Patienten gesteigerte QT-Dispersion bei ansonsten unveränderten QT-Zeiten. Dagegen wird bei den maustelemetrischen Untersuchungen von Auerbach et al. (2013) eine Verlängerung sowohl der unkorrigierten QT-Zeit als auch

nach der Frequenzkorrektur durch die Bazettformel beschrieben. An dieser Stelle sei noch einmal auf die bereits erwähnte Schwierigkeit hingewiesen, die Termination der T-Welle im murinen EKG zu bestimmen, welche divergente Ergebnisse bei der Bestimmung der QT-Zeiten erklären könnte. Auch die Validität der verschiedenen QT-Korrekturformeln wird in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert. Das Korrekturmodell nach Bazett wurde ursprünglich für Ruhfrequenzen des menschlichen Herzens bestimmt (Bazett, 1920). Beschrieben wird deshalb, dass es besonders bei kleinen Säugern mit hohen Herzfrequenzen wie etwa der Maus keine adäquaten Ergebnisse liefert (Richards et al., 1953; James et al., 1998). Darüber hinaus wird bei Boukens et al. (2014) und Speerschnieder et al. (2013) gewisse Vorsicht bei der Interpretation der korrigierten QT-Zeiten im Zusammenhang mit einer Narkose durch Isofluran geboten.

Aufgrund der großen Divergenz der Ergebnisse lässt sich keine sichere Aussage darüber treffen, inwiefern ein defekter $\text{Na}_v1.1$ -Kanal die ventrikuläre Depolarisation diesbezüglich beeinträchtigt. Sowohl QT-Dispersion als auch Verlängerung und Verkürzung von QT-Zeiten stellen Risikofaktoren für Tachyarrhythmien und plötzlichen Herztod dar (Surges et al., 2010b; Velagapudi et al., 2012). Es lässt sich dennoch nicht abschließend klären, inwiefern diese in Zusammenhang mit dem erhöhten Risiko von SUDEP bei DS-Patienten gebracht werden können.

4.2.2 EPU und Arrhythmogenität

Im Rahmen der inhaltlichen Diskussion werden im Folgenden die Resultate der elektrophysiologischen Untersuchungen der Studie erörtert. Dabei wird neben den EPU-Basisparametern, die nicht bereits im Abschnitt der EKG-Diskussion abgehandelt wurden, auf Aspekte der Arrhythmieeigung bei durchgeführten Tests eingegangen. Aufgrund des thematischen Bezugs werden an dieser Stelle wiederum relevante Ergebnisse der Hyperthermie-Versuche in die Diskussion mit eingebunden.

Bei der Betrachtung der **Sinusknotenerholzeiten** zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen. Dennoch fällt auf, dass bei 8 der 10 ermittelten SNRT-Werten eine Verlängerung unterschiedlichen Ausmaßes bei den HET-Tieren vorlag. Lediglich bei 2 der 10 ermittelten Werte war sie leicht verkürzt im Vergleich zu den Wildtypen. Eine Verlängerung der SNRT mit verspätetem Einsetzen des primären

Schrittmachers nach elektrischer Überstimulation weist auf eine gestörte Sinusknoten-funktion wie etwa dem Sick-Sinus-Syndrom hin (Narula et al., 1972). Obwohl eine Beteiligung des *brain-type* Nav1.1 an der Schrittmacherfunktion des Sinusknotens beschrieben wurde (Maier et al., 2003; Lei et al., 2004), lässt sich aufgrund der Ergebnisse bezüglich der SNRT in vorliegender Studie keine sichere Aussage zu einer Sinusknotenpathologie durch heterozygoten Knockout des Kanalgens bei Scn1a^{+/-}-Tieren treffen.

Die Untersuchung der **Arrhythmieneigung** des verwendeten Mausmodells wurde in vorliegender Studie nicht nur hinsichtlich der Quantität, sondern auch hinsichtlich der Qualität aufgetretener Arrhythmien untersucht. Die Ergebnisse beider Merkmale sprechen dabei für erhöhte Arrhythmogenese bei den Mäusen mit Knockout des Nav1.1-Kanalgens.

Gesteigerte Arrhythmieneigung der HET-Mäuse wird bei Betrachtung der **Quantität** aufgetretener Rhythmusstörungen besonders deutlich. Insgesamt wurden in der Studie 657 Arrhythmiereignisse ausgewertet. Davon wurden 461 Arrhythmien (70,17%) bei Nav1.1-modifizierten Mäusen beobachtet, während demgegenüber 196 (29,83%) in dem Kontrollkollektiv gesehen wurden. Somit wurden über alle Teilversuche hinweg mehr als doppelt so viele Ereignisse bei den heterozygoten KO-Mäusen erfasst. Dabei überwogen die aufgezeichneten Formen von Rhythmusstörungen in allen untersuchten Kategorien aufseiten der HETs. Über alle Teilversuche hinweg standen im Einzelnen 345 Extrasystolen (68%) bei den Nav1.1-modifizierten Mäusen 161 Extrasystolen (32%) der WT-Mäuse gegenüber. Somit wurden mehr als doppelt so viele Extrasystolen sowohl ventrikulärer als auch supraventrikulärer Art bei den HETs erfasst. Bezüglich supraventrikulärer Tachykardien betrug die Steigerung mit 23 (79%) *SVT* bei den HETs zu 6 (21%) bei den WTs sogar fast das Vierfache. Ebenso verhielt es sich mit 12 (80%) zu 3 (20%) ventrikulären Couplets zu Gunsten der HET-Tiere. Auch im Bereich der Arrhythmien höheren Schweregrades wiesen DS-Mäuse ein Vielfaches der Arrhythmiereignisse in der Kontrollgruppe auf. Ventrikuläre Triplets wurden mit 8 (80%) zu 2 (20%) viermal häufiger bei DS-Mäusen erfasst. Nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardien (*nsVT*) wurden darüber hinaus 7 Mal aufgezeichnet, wobei diese Form der Rhythmusstörung ausschließlich bei den heterozygoten Tieren beobachtet werden konnte.

Neben den quantitativen Aspekten konnte auch hinsichtlich der **Qualität** aufgetretener Rhythmusstörungen eine gesteigerte Arrhythmieeigung aufseiten der Nav1.1-defizienten Mäuse konstatiert werden. In der Gesamtschau der erfassten Arrhythmiescores wurden signifikant häufiger schwerwiegende Rhythmusstörungen bei der Gruppe mit Nav1.1-defizientem Genotyp dokumentiert ($p=0,012$; Chi-Quadrat-Test). Unter den 30 untersuchten Heterozygoten erreichten 70% der Tiere einen Arrhythmiescore von ≥ 2 als Ausdruck höhergradiger Arrhythmie. Damit zeigten sie doppelt so häufig schwerwiegendere Arrhythmieformen als das Kontrollkollektiv, bei dem lediglich 36% der Tiere einen Score ≥ 2 erreichten. In den verschiedenen Teilversuchen zeigte sich die gesteigerte Arrhythmieeigung aufseiten der Heterozygoten ebenfalls, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. In allen Teilabschnitten ließ sich der gleiche Trend zu gesteigertem Grad der Arrhythmien bei den Knockout-Tieren finden. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung überwog der Anteil höhergradiger Arrhythmien mit 83% unter den HETs gegenüber 45% unter den Wildtypen. Der Anteil malignerer Arrhythmien war demnach wieder doppelt so groß unter den Nav1.1-defizienten Mäusen ohne dabei Signifikanz zu zeigen ($p=0,09$). Bei den Hyperthermie-Versuchen zeigten beide Versuchsabschnitte sowohl unter Ruhebedingungen ($p=0,15$) als auch unter Hyperthermie ($p=0,62$) einen Trend zu gesteigerter Arrhythmogenität ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Fehlende Signifikanz könnte hierbei zum einen für einen nicht ausreichenden Effekt gesteigerter Arrhythmieeigung aufseiten der HETs sprechen. Zum anderen könnte sie auf eine zu geringe Stichprobengröße der Teilversuche gegenüber der Zusammenfassung der Stichproben bei dem Arrhythmiegesamtscore hindeuten. Aufschluss hierüber könnte eine Erweiterung der Stichprobengrößen in zukünftigen Experimenten geben.

Der Gedanke der *critical mass theory* von Garrey (1914) sei hier noch einmal aufgegriffen. Bei der Interpretation der Arrhythmiescores ist in diesem Sinne stets zu berücksichtigen, dass die Induktion von Rhythmusstörungen in kleinen Mäuseherzen zwar möglich, allerdings gleichzeitig oftmals limitiert ist. Vor allem induzierte Tachyarrhythmien höheren Grades und längerer Dauer bekommen hierdurch mehr Gewicht. So wurden beispielsweise insgesamt 12 der 30 untersuchten HET-Tiere (40%) den höhergradigen Arrhythmiegruppen 3 und 4 zugeordnet. Dies entsprach den höchsten erreichten Arrhythmiegruppen in vorliegender Studie. Demgegenüber wurden diesen Gruppen lediglich 3 der 25 Wildtypen (12%) zugeordnet. Auch die beschriebene

langanhaltende Form einer SVT von 1,5 Minuten über mehrere Stimulationsphasen hinweg bei einer HET-Maus bekommt hierdurch zusätzliche Bedeutung und spricht für eine erhöhte Neigung zu Rhythmusstörungen bei Nav1.1-Kanalknockout.

Der erwartete Alterseinfluss auf die Arrhythmogenität blieb bei kritischer Betrachtung in beiden Gruppen aus. Es wurde demnach keine gesteigerte Arrhythmieanfälligkeit bei den jüngeren Mäusen der Hyperthermie-Versuche (P40-45) gefunden, obwohl jüngeres Mäusealter bei Maguire et al. (2003) als arrhythmieanfällig gilt. Bei den älteren Mäusen der EPU (P70-80) wurde sogar ein leicht höherer Anteil beider Gruppen mit einem $AS \geq 2$ gefunden (WT: 45%; HET: 83%), gegenüber der jüngeren Mäuse bei den Hyperthermie-Versuchen (WT: 43% und 14%; HET: 67% und 56%). Da der arrhythmieerzeugende Effekt sowohl in der Gruppe der HETs als auch der Wildtypen ausblieb, lässt sich keine sichere Aussage über den Alterseinfluss auf erhöhte Arrhythmogenität bei jungen DS-Mäusen ableiten.

Einen weiteren Aspekt kritischer Betrachtung liefert die gezeigte Arrhythmogenität unter Temperatureinfluss. Hinsichtlich der Qualität beobachteter Rhythmusstörungen zeigte sich kein positiver Einfluss von Hyperthermie auf erhöhte Induzierbarkeit von Rhythmusstörungen in beiden Gruppen. Sowohl in der Gruppe der Wildtypen (Ruhe: 43% vs. Hyperthermie: 14%) als auch bei den HETs (Ruhe: 67% vs. Hyperthermie: 56%) verringerte sich der Anteil an einem $AS \geq 2$ unter Hyperthermie. Die in der Literatur angesprochene Temperatursensitivität vieler Natriumkanäle, die ebenfalls den Nav1.1-Kanal einschließt (Volkers et al., 2011; Volkers et al., 2013), blieb somit bezüglich der Qualität von Rhythmusstörungen aus. Der fehlende Anstieg der Arrhythmiescores bei HET und WT-Mäusen unter Hyperthermie lässt sich durch den Versuchsaufbau erklären. Die Stimulationsprotokolle erstreckten sich unter physiologischer Temperatur sowohl auf eine Durchführung bei intraatrialer als auch bei intraventrikulärer Lage. Unter Hyperthermie beschränkten sie sich dagegen nach dem Kathetervorschub ausschließlich auf die intraventrikuläre Lage. Durch diese Reduktion der atrialen Untersuchungsprotokolle war die gesamte Stimulationszeit unter Hyperthermie deutlich geringer und könnte zu fehlendem Anstieg der Scores bei erhöhter Temperatur in beiden Gruppen geführt haben. Deutlich wurde der arrhythmogene Effekt der Hyperthermie allerdings anhand der Quantität beobachteter Rhythmusstörungen. In den Hyperthermie-Versuchen stieg die Anzahl der Rhythmusstörungen trotz geringerer Untersuchungszeit

von 166 auf 288 Ereignissen in beiden Gruppen nach der Induktion von Hyperthermie. Mehr als doppelt so viele Ereignisse wurden somit unter Erhöhung der Körpertemperatur verzeichnet und sprechen für einen Hyperthermieeffekt.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass sich in der vorliegenden Studie sowohl der Schweregrad der induzierten Arrhythmien anhand des Arrhythmiescores als auch die Quantität der erfassten Ereignisse bei den DS-Mäusen gesteigert zeigten. Der relativ geringe Unterschied bezüglich des Arrhythmiescores verglichen mit der deutlichen quantitativen Steigerung lässt sich dahingehend erklären, dass viele Arrhythmien repetitiv vorlagen. Im Rahmen des Arrhythmie-Scores einer Maus schlugen solche wiederholten Ereignisse nicht zu Buche, da der Score lediglich durch die Arrhythmie mit maximaler Punktzahl bestimmt wurde. Im Hinblick auf quantitative Bewertung der Rhythmusstörungen wurde demgegenüber jedes einzelne Ereignis gezählt.

Konform mit den Ergebnissen beschreiben Auerbach et al. (2013) Hinweise erhöhter Arrhythmieeigung bei $Na_v1.1$ -negativen Mäusen. Bei isolierten Kardiomyozyten wurden erhöhte Erregbarkeit sowie eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer gefunden. In vivo Untersuchungen der gleichen Studie zeigten darüber hinaus ventrikuläre ektopische Foki als Ursache vorzeitig einsetzender ventrikulärer Schläge sowie Neigung zu idioventrikulären Rhythmen mit ventrikulärer Tachykardie (Auerbach et al., 2013). Dies geht zum einen konform mit den beobachteten gesteigerten Inzidenzen der VES, zum anderen mit den dokumentierten nsVT im HET-Kollektiv vorliegender Studie. Die bereits angesprochene Studie von Kalume et al. (2013) beschreibt zudem eine auffallend gesteigerte Frequenz von AV-Blockbildern neben Verringerung der Herzfrequenzvariabilität bei DS-Mäusen. AV-Blockbilder wurden ebenfalls in vorliegender Studie gefunden und zwar ausschließlich in der Gruppe der HET-Mäuse. Mit insgesamt drei von zwölf heterozygoten Tieren (25%), welche AV-Blöcke zeigten, war die Anzahl der Beobachtungen dennoch begrenzt. Die bereits beschriebenen elektrokardiographischen Veränderungen des Vorhofs (*PR*, *Pdur*) könnten diese Form der Rhythmusstörung allerdings begünstigen. Verringerte Herzfrequenzvariabilität als Grundlage potentieller Tachyarrhythmien wurde ebenfalls in Patientenstudien von Delogu et al. (2011) beschrieben. Stellt man die Ergebnisse der vorliegenden Studie in den Kontext der wissenschaftlichen Literatur, bestehen deutliche Hinweise auf erhöhte Arrhythmogenität bei $Na_v1.1$ -modifizierten Mäusen, die in

Zusammenhang mit gesteigertem SUDEP-Risiko bei DS-Patienten gebracht werden könnten.

4.3 Bedeutung der Studie und Ausblick

Zur Erforschung der Pathophysiologie des Dravet-Syndroms bietet das zur Verfügung gestellte Mausmodell von Yu et al. (2006) einzigartige Möglichkeiten. Viele klinische Gemeinsamkeiten wie etwa früher Krankheitsbeginn, spontane epileptische Anfälle, Ataxie, hohe Mortalitätsraten und SUDEP machen das $Na_v1.1$ -KO-Modell zu einem wichtigen Instrument in der Erforschung der Erkrankung. Dies gilt auch für die Erforschung hinsichtlich einer kardialen Beteiligung an dem bereits neurobiologisch gut untersuchten Epilepsie-Syndrom. In unterschiedlichsten Studien wurde belegt, dass neurologische Störungen kardialen Einfluss nehmen und darüber hinaus zu plötzlichem Herztod oder auch SUDEP führen können (Pinto et al., 2011; Finsterer und Wahbi, 2014). Allen voran Epilepsien, aber auch andere Störungen des Zentralnervensystems wie Schlaganfälle, Subarachnoidalblutungen oder Meningitiden können die Herzfunktion direkt oder auch indirekt beeinflussen (Finsterer und Wahbi, 2014). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen kardialen Phänotyp einer primär neurologischen Erkrankung im Mausmodell einer schweren Form der epileptischen Enzephalopathie – dem Dravet-Syndrom. Unter anderem wurden eine Steigerung der stressbedingten Herzfrequenz sowie eine erhöhte Arrhythmieanfälligkeit in Qualität und Quantität beobachteter Rhythmusstörungen festgestellt. Welche Pathomechanismen hierfür verantwortlich sind, ist bis dato allerdings nicht abschließend geklärt. Neben kardialen Aspekten selbst stehen besonders zentralnervöse Mechanismen wie autonome Regulationsstörungen im Verdacht, die kardialen Veränderungen zu bewirken. Als Indiz hierfür steht eine reduzierte Herzfrequenzvariabilität, die in mehreren Studien gefunden wurde und für autonome Dysbalance bei DS-Patienten spricht (Delogu et al., 2011; Kalume et al., 2013). Der Ausfall des $Na_v1.1$ in GABAergen Interneuronen des Hippocampus gilt als krankheitsverursachend für das Dravet-Syndrom. Wie genau dieser Ausfall allerdings über autonome Regulationsstörungen zu kardialer Beteiligung führt, ist nicht hinreichend erforscht. Auch welchen Beitrag die genannten Aspekte zu dem erhöhten SUDEP-Risiko bei Dravet-Patienten liefern, müssen weitere Studien zeigen.

Ansätze der Forschung liegen in der weiteren kardialen Charakterisierung mittels Dobutamin-Stressechokardiographie oder hämodynamischen Druckmessungen. Auch klinische Studien im internationalen Verbund, zum Beispiel im Rahmen des CURE-Programms (*Citizens United for Research in Epilepsy*), sind dabei sinnvoll. Der internationale und interdisziplinäre Zusammenschluss von Forschern, unter anderem Neurologen, Kardiologen, Physiologen, Genetiker und Molekularbiologen aus Deutschland, Frankreich und Italien ermöglicht es, ein größeres Patientenkollektiv zu akquirieren und zu erforschen. Dieser Weg hilft die Fülle der unterschiedlichen Nav-Kanalmutationen zu kategorisieren, deren kardiale Phänotypen zu charakterisieren und in Einklang mit den neurologischen Erkrankungen zu bringen. Dabei könnten weitere 24-Stunden-EKG-Messungen bis hin zu Langzeitmessungen mittels implantierten Telemetrieeräten wichtige Daten unter lebensnahen Bedingungen beim Menschen liefern. Somit könnte ein schärferes Bild der facettenreichen Erkrankung gezeichnet werden. Letztendlich könnten die gewonnenen Erkenntnisse zur Stratifizierung des SUDEP-Risikos bei Dravet-Patienten beitragen und Entwicklungen zu neuen Strategien hinsichtlich Prävention und Therapie anregen. Mögliche Maßnahmen reichen dabei von implantierbaren kardialen Schrittmachern und Defibrillatoren bis hin zu zielgerichteter pharmakologischer antiepileptischer Therapie im Rahmen des Dravet-Syndroms und auch darüber hinaus bei weiteren epileptischen Kanalopathien (Kalume et al., 2013; Scattolini et al., 2013).

5 Zusammenfassung

SUDEP bezeichnet den plötzlichen und unerwarteten Epilepsietod ohne offensichtliche kausale Todesursache. Junge Patienten, die an der schweren infantilen enzephalopathischen Epilepsieform des Dravet-Syndroms (*SMEI*) leiden, tragen besonderes Risiko an SUDEP zu versterben. Die pathophysiologische Ursache für das Dravet-Syndrom liegt in einem Defekt des *brain-type* Natriumkanals $\text{Na}_v1.1$. Neuere Studien zeigen, dass der ursprünglich als hirnspezifisch geltende Kanal nicht explizit in neuronalem Gewebe, sondern auch im Herzen exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen des $\text{Na}_v1.1$ -Defektes auf kardialer Ebene zu evaluieren, um eine mögliche Beteiligung von Herzrhythmusstörungen an der Ätiologie des SUDEP aufzudecken. Dazu wurde ein Knockout-Mausmodell hinsichtlich seines kardialen Phänotyps charakterisiert. Mit Hilfe elektrokardiographischer Untersuchungen (EKG) konnte eine gesteigerte Herzfrequenz unter Stressbedingungen festgestellt werden. Die Frequenz lag sowohl bei den Versuchen unter pharmakologischem Stress mittels Isoproterenol als auch unter induziertem Stress mittels Hyperthermie bei den Dravet-Syndrom-Mäusen höher als in dem wildtypischen Kontrollkollektiv. Elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) zeigten neben einem erhöhten Schweregrad der induzierbaren Arrhythmien, gemessen anhand eines Arrhythmie-Scores, auch eine erhöhte Quantität ausgelöster Herzrhythmusstörungen. Sowohl unter Ruhebedingungen als auch nach Induktion von Hyperthermie überwogen die aufgezeichneten Arrhythmien bei Dravet-Syndrom-Mäusen.

Die Erkenntnisse dieser Studie helfen die Rolle des $\text{Na}_v1.1$ -Defektes an einer kardialen Beteiligung im Rahmen von SUDEP bei Dravet-Patienten zu beschreiben. Sie zeigen verschiedene kardiale Auswirkungen bei Knockout des primär neuronalen Natriumkanalgens *SCN1A*. Weitere Einsichten in diesen Bereich werden angemessene Risikostratifizierung für Epilepsie-Patienten hinsichtlich Ihres SUDEP-Risikos ermöglichen und moderne Therapieansätze anregen.

Literaturverzeichnis

- Akiyama, M, Kobayashi, K, Ohtsuka, Y (2012). Dravet syndrome: a genetic epileptic disorder. *Acta Med Okayama*, 66, 369-76.
- Amin, A S, Klemens, C A, Verkerk, A O, Meregalli, P G, Asghari-Roodsari, A, de Bakker, J M, January, C T, Wilde, A A, Tan, H L (2010). Fever-triggered ventricular arrhythmias in Brugada syndrome and type 2 long-QT syndrome. *Neth Heart J*, 18, 165-9.
- Appleton, G O, Li, Y, Taffet, G E, Hartley, C J, Michael, L H, Entman, M L, Roberts, R, Khoury, D S (2004). Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *J Interv Card Electrophysiol*, 11, 5-14.
- Armstrong, C M, Bezanilla, F (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70, 567-90.
- Armstrong, C M, Hille, B (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20, 371-80.
- Arras, M, Autenried, P, Rettich, A, Spaeni, D, Rulicke, T (2001). Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med*, 51, 443-56.
- Auerbach, D S, Jones, J, Clawson, B C, Offord, J, Lenk, G M, Ogiwara, I, Yamakawa, K, Meisler, M H, Parent, J M, Isom, L L (2013). Altered cardiac electrophysiology and SUDEP in a model of Dravet syndrome. *PLoS One*, 8, e77843.
- Bateman, L M, Spitz, M, Seyal, M (2010). Ictal hypoventilation contributes to cardiac arrhythmia and SUDEP: report on two deaths in video-EEG-monitored patients. *Epilepsia*, 51, 916-20.
- Bazett, H C (1920). An Analysis of time-relations of the electrocardiogram. *Heart*, 2, 353-370.
- Benninghoff, A, Drenckhahn, D (2003). Anatomie Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Aufl. 16, München-Jena, Urban & Fischer Verlag, 164-166.
- Benninghoff, A, Drenckhahn, D (2004). Anatomie Band 2: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Aufl. 16, München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 41-70.
- Berkovic, S F, Heron, S E, Giordano, L, Marini, C, Guerrini, R, Kaplan, R E, Gambardella, A, Steinlein, O K, Grinton, B E, Dean, J T, Bordo, L, Hodgson, B L, Yamamoto, T, Mulley, J C, Zara, F, Scheffer, I E (2004). Benign familial

- neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol*, 55, 550-7.
- Berul, C I, Aronovitz, M J, Wang, P J, Mendelsohn, M E (1996). In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation*, 94, 2641-8.
- Berul, C I, Christe, M E, Aronovitz, M J, Seidman, C E, Seidman, J G, Mendelsohn, M E (1997). Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest*, 99, 570-6.
- Berul, C I, Christe, M E, Aronovitz, M J, Maguire, C T, Seidman, C E, Seidman, J G, Mendelsohn, M E (1998). Familial hypertrophic cardiomyopathy mice display gender differences in electrophysiological abnormalities. *J Interv Card Electrophysiol*, 2, 7-14.
- Berul, C I, McConnell, B K, Wakimoto, H, Moskowitz, I P, Maguire, C T, Semsarian, C, Vargas, M M, Gehrman, J, Seidman, C E, Seidman, J G (2001). Ventricular arrhythmia vulnerability in cardiomyopathic mice with homozygous mutant Myosin-binding protein C gene. *Circulation*, 104, 2734-9.
- Berul, C I (2003). Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol Genomics*, 13, 207-16.
- Bigger, J T, Jr., Weld, F M (1981). Analysis of prognostic significance of ventricular arrhythmias after myocardial infarction. Shortcomings of Lown grading system. *Br Heart J*, 45, 717-24.
- Boukens, B J, Rivaud, M R, Rentschler, S, Coronel, R (2014). Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of Mus musculus'. *J Physiol*, 592, 4613-26.
- Boyett, M R (2009). 'And the beat goes on.' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol*, 94, 1035-49.
- Brackenbury, W J, Isom, L L (2011). Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol*, 2, 53.
- Catterall, W A (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem*, 55, 953-85.
- Catterall, W A (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- Catterall, W A, Goldin, A L, Waxman, S G (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 397-409.
- Catterall, W A, Yu, F H (2006). Painful channels. *Neuron*, 52, 743-4.
- Catterall, W A, Cestele, S, Yarov-Yarovoy, V, Yu, F H, Konoki, K, Scheuer, T (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49, 124-41.

- Catterall, W A, Dib-Hajj, S, Meisler, M H, Pietrobon, D (2008). Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *J Neurosci*, 28, 11768-77.
- Catterall, W A, Kalume, F, Oakley, J C (2010). NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol*, 588, 1849-59.
- Chen, P S, Joung, B, Shinohara, T, Das, M, Chen, Z, Lin, S F (2010). The initiation of the heart beat. *Circ J*, 74, 221-5.
- Chockalingam, P, Rammeloo, L A, Postema, P G, Hruda, J, Clur, S A, Blom, N A, Wilde, A A (2011). Fever-induced life-threatening arrhythmias in children harboring an SCN5A mutation. *Pediatrics*, 127, e239-44.
- Clancy, C E, Kass, R S (2005). Inherited and acquired vulnerability to ventricular arrhythmias: cardiac Na⁺ and K⁺ channels. *Physiol Rev*, 85, 33-47.
- Curtis, M J, Walker, M J (1988). Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*, 22, 656-65.
- Delogu, A B, Spinelli, A, Battaglia, D, Dravet, C, De Nisco, A, Saracino, A, Romagnoli, C, Lanza, G A, Crea, F (2011). Electrical and autonomic cardiac function in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 55-8.
- Desai, A D, Yaw, T S, Yamazaki, T, Kaykha, A, Chun, S, Froelicher, V F (2006). Prognostic Significance of Quantitative QRS Duration. *Am J Med*, 119, 600-6.
- Desai, K H, Sato, R, Schauble, E, Barsh, G S, Kobilka, B K, Bernstein, D (1997). Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol*, 272, H1053-61.
- DeToledo, J C, DeToledo, M B, Lowe, M R (1999). Epilepsy and sudden death: notes from George Washington's diaries on the illness and death of Martha Parke-Custis (1756-1773). *Epilepsia*, 40, 1835-6.
- Doherty, M J (2004). The sudden death of Patsy Custis, or George Washington on sudden unexplained death in epilepsy. *Epilepsy Behav*, 5, 598-600.
- Dravet, C, Bureau, M, Oguni, H, Fukuyama, Y, Cokar, O (2005). Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv Neurol*, 95, 71-102.
- Dravet, C (2011a). The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 3-9.
- Dravet, C (2011b). Dravet syndrome history. *Dev Med Child Neurol*, 53 Suppl 2, 1-6.
- Dravet, C, Bureau, M, Dalla Bernardina, B, Guerrini, R (2011). Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome) 30 years later. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 1-2.
- Dubin, A M (2001). Of mice and men: in vivo electrophysiologic testing in genetically engineered mice. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 12, 1302-3.

- Duclohier, H (2005). Neuronal sodium channels in ventricular heart cells are localized near T-tubules openings. *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 1135-40.
- Elten, E v (2014). Altersabhängige Vulnerabilität für supraventrikuläre und ventrikuläre Arrhythmien bei Popdc2-Nullmutanten. [Dissertation], Würzburg, Julius-Maximilians-Universität.
- Ergul, Y, Ekici, B, Tatli, B, Nisli, K, Ozmen, M (2012). QT and P wave dispersion and heart rate variability in patients with Dravet syndrome. *Acta Neurol Belg*.
- Feld, G K (1999). Evolution of diagnostic and interventional cardiac electrophysiology: a brief historical review. *Am J Cardiol*, 84, 115R-124R.
- Ficker, D M, So, E L, Shen, W K, Annegers, J F, O'Brien, P C, Cascino, G D, Belau, P G (1998). Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy. *Neurology*, 51, 1270-1274.
- Finsterer, J, Wahbi, K (2014). CNS-disease affecting the heart: Brain-heart disorders. *J Neurol Sci*, 345, 8-14.
- Fozzard, H A, Hanck, D A (1996). Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev*, 76, 887-926.
- Fridericia, L S (1921). Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Medica Scandinavica*, 54, 17-50.
- Garrey, W E (1914). The nature of fibrillary contraction of the heart - its relation to tissue mass and form. *American Journal of Physiology* Vol. 33 no. 397-414
- Gehrmann, J, Frantz, S, Maguire, C T, Vargas, M, Ducharme, A, Wakimoto, H, Lee, R T, Berul, C I (2001). Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol*, 96, 237-50.
- George, A L, Jr. (2005). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest*, 115, 1990-9.
- Gharib, W H, Robinson-Rechavi, M (2011). When orthologs diverge between human and mouse. *Brief Bioinform*, 12, 436-41.
- Goldin, A L, Barchi, R L, Caldwell, J H, Hofmann, F, Howe, J R, Hunter, J C, Kallen, R G, Mandel, G, Meisler, M H, Netter, Y B, Noda, M, Tamkun, M M, Waxman, S G, Wood, J N, Catterall, W A (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28, 365-8.
- Goldin, A L (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 63, 871-94.
- Gordon, D, Merrick, D, Auld, V, Dunn, R, Goldin, A L, Davidson, N, Catterall, W A (1987). Tissue-specific expression of the RI and RII sodium channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 8682-6.

- Guerrini, R (2012). Dravet syndrome: the main issues. *Eur J Paediatr Neurol*, 16 Suppl 1, S1-4.
- Guy, H R, Seetharamulu, P (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 508-12.
- Hagendorff, A, Schumacher, B, Kirchhoff, S, Luderitz, B, Willecke, K (1999). Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation*, 99, 1508-15.
- Hartley, C J, Taffet, G E, Reddy, A K, Entman, M L, Michael, L H (2002). Noninvasive cardiovascular phenotyping in mice. *ILAR J*, 43, 147-58.
- Hassink, R J, Breur, J M, Loh, P (2014). Fever-induced atrial flutter associated with SCN5A mutation-a first report on successful catheter ablation in a very young child. *Int J Cardiol*, 171, e31-4.
- Ho, D, Zhao, X, Gao, S, Hong, C, Vatner, D E, Vatner, S F (2011). Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1, 123-139.
- Holland, A J (1973). Laboratory animal anaesthesia. *Can Anaesth Soc J*, 20, 693-705.
- Homanics, G E, Quinlan, J J, Firestone, L L (1999). Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacol Biochem Behav*, 63, 21-6.
- Horowitz, L N (1986). Clinical cardiac electrophysiology: history, rationale, and future. *Cardiol Clin*, 4, 353-64.
- Irisawa, H, Seyama, I (1966). The configuration of the P wave during mild exercise. *Am Heart J*, 71, 467-72.
- Isom, L L, De Jongh, K S, Patton, D E, Reber, B F, Offord, J, Charbonneau, H, Walsh, K, Goldin, A L, Catterall, W A (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, 256, 839-42.
- Isom, L L, De Jongh, K S, Catterall, W A (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*, 12, 1183-94.
- Isom, L L, Catterall, W A (1996). Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature*, 383, 307-8.
- Isom, L L (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, 7, 42-54.
- James, J F, Hewett, T E, Robbins, J (1998). Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res*, 82, 407-15.

- James, T N (1961). Morphology of the human atrioventricular node, with remarks pertinent to its electrophysiology. *Am Heart J*, 62, 756-71.
- Kaese, S, Verheule, S (2012). Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*, 3, 345.
- Kahlig, K M, Rhodes, T H, Pusch, M, Freilinger, T, Pereira-Monteiro, J M, Ferrari, M D, van den Maagdenberg, A M, Dichgans, M, George, A L, Jr. (2008). Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9799-804.
- Kalume, F, Westenbroek, R E, Cheah, C S, Yu, F H, Oakley, J C, Scheuer, T, Catterall, W A (2013). Sudden unexpected death in a mouse model of Dravet syndrome. *J Clin Invest*, 123, 1798-808.
- Kass, D A, Hare, J M, Georgakopoulos, D (1998). Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res*, 82, 519-22.
- Kaufmann, S G, Westenbroek, R E, Zechner, C, Maass, A H, Bischoff, S, Muck, J, Wischmeyer, E, Scheuer, T, Maier, S K (2010). Functional protein expression of multiple sodium channel alpha- and beta-subunit isoforms in neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 261-9.
- Kaufmann, S G, Westenbroek, R E, Maass, A H, Lange, V, Renner, A, Wischmeyer, E, Bonz, A, Muck, J, Ertl, G, Catterall, W A, Scheuer, T, Maier, S K (2013). Distribution and function of sodium channel subtypes in human atrial myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 61, 133-41.
- Keller, D I, Huang, H, Zhao, J, Frank, R, Suarez, V, Delacretaz, E, Brink, M, Osswald, S, Schwick, N, Chahine, M (2006). A novel SCN5A mutation, F1344S, identified in a patient with Brugada syndrome and fever-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*, 70, 521-9.
- Kim, D Y, Carey, B W, Wang, H, Ingano, L A, Binshtok, A M, Wertz, M H, Pettingell, W H, He, P, Lee, V M, Woolf, C J, Kovacs, D M (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol*, 9, 755-64.
- Kirchhoff, S, Nelles, E, Hagendorff, A, Kruger, O, Traub, O, Willecke, K (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol*, 8, 299-302.
- Knollmann, B C, Schober, T, Petersen, A O, Sirenko, S G, Franz, M R (2007). Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H614-21.
- Kovoor, P, Wickman, K, Maguire, C T, Pu, W, Gehrmann, J, Berul, C I, Clapham, D E (2001). Evaluation of the role of I(KACh) in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol*, 37, 2136-43.

- Kucera, J P, Rohr, S, Rudy, Y (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res*, 91, 1176-82.
- Lange, G (1965). Action of driving stimuli from intrinsic and extrinsic sources on in situ cardiac pacemaker tissues. *Circ Res*, 17, 449-59.
- Larsson, H P (2010). How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. *J Gen Physiol*, 136, 237-41.
- Le Gal, F, Korff, C M, Monso-Hinard, C, Mund, M T, Morris, M, Malafosse, A, Schmitt-Mechelke, T (2010). A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with SCN1A mutation. *Epilepsia*, 51, 1915-8.
- Le Pecq, J B, Paoletti, C (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem*, 17, 100-7.
- Lee, P, Morley, G, Huang, Q, Fischer, A, Seiler, S, Horner, J W, Factor, S, Vaidya, D, Jalife, J, Fishman, G I (1998). Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11371-6.
- Lei, M, Jones, S A, Liu, J, Lancaster, M K, Fung, S S, Dobrzynski, H, Camelliti, P, Maier, S K, Noble, D, Boyett, M R (2004). Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol*, 559, 835-48.
- Lieggi, C C, Artwohl, J E, Leszczynski, J K, Rodriguez, N A, Fickbohm, B L, Fortman, J D (2005). Efficacy and safety of stored and newly prepared tribromoethanol in ICR mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 44, 17-22.
- London, B (2001). Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 12, 1089-91.
- Lorenz, J N (2002). A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282, R1565-82.
- Lown, B, Wolf, M (1971). Approaches to sudden death from coronary heart disease. *Circulation*, 44, 130-42.
- Luderitz, B (2003). Historical perspectives on interventional electrophysiology. *J Interv Card Electrophysiol*, 9, 75-83.
- Lüllmann-Rauch, R (2006). Taschenlehrbuch Histologie, Aufl. 2, Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag, 31-39, 209-234.
- Magnani, J W, Gorodeski, E Z, Johnson, V M, Sullivan, L M, Hamburg, N M, Benjamin, E J, Ellinor, P T (2011). P wave duration is associated with cardiovascular and all-cause mortality outcomes: the National Health and Nutrition Examination Survey. *Heart Rhythm*, 8, 93-100.

- Maguire, C T, Wakimoto, H, Patel, V V, Hammer, P E, Gauvreau, K, Berul, C I (2003). Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. *Physiol Genomics*, 15, 84-91.
- Maier, S K, Westenbroek, R E, Schenkman, K A, Feigl, E O, Scheuer, T, Catterall, W A (2002). An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4073-8.
- Maier, S K, Westenbroek, R E, Yamanushi, T T, Dobrzynski, H, Boyett, M R, Catterall, W A, Scheuer, T (2003). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3507-12.
- Maier, S K, Westenbroek, R E, McCormick, K A, Curtis, R, Scheuer, T, Catterall, W A (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*, 109, 1421-7.
- Malhotra, J D, Kazen-Gillespie, K, Hortsch, M, Isom, L L (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem*, 275, 11383-8.
- Malhotra, J D, Chen, C, Rivolta, I, Abriel, H, Malhotra, R, Mattei, L N, Brosius, F C, Kass, R S, Isom, L L (2001). Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation*, 103, 1303-10.
- Mandel, W, Hayakawa, H, Danzig, R, Marcus, H S (1971). Evaluation of sino-atrial node function in man by overdrive suppression. *Circulation*, 44, 59-66.
- Mantegazza, M, Gambardella, A, Rusconi, R, Schiavon, E, Annesi, F, Cassulini, R R, Labate, A, Carrideo, S, Chifari, R, Canevini, M P, Canger, R, Franceschetti, S, Annesi, G, Wanke, E, Quattrone, A (2005). Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18177-82.
- Marionneau, C, Couette, B, Liu, J, Li, H, Mangoni, M E, Nargeot, J, Lei, M, Escande, D, Demolombe, S (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*, 562, 223-34.
- Mashimo, T, Ohmori, I, Ouchida, M, Ohno, Y, Tsurumi, T, Miki, T, Wakamori, M, Ishihara, S, Yoshida, T, Takizawa, A, Kato, M, Hirabayashi, M, Sasa, M, Mori, Y, Serikawa, T (2010). A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neurosci*, 30, 5744-53.
- Meisler, M H, Kearney, J A (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*, 115, 2010-7.

- Miller, L E, Hosick, P A, Wrieden, J, Hoyt, E, Quindry, J C (2012). Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc*, 44, 435-41.
- Moore, E N, Spear, J F (1975). Ventricular fibrillation threshold; its physiological and pharmacological importance. *Arch Intern Med*, 135, 446-53.
- Mullen, S A, Scheffer, I E (2009). Translational research in epilepsy genetics: sodium channels in man to interneuronopathy in mouse. *Arch Neurol*, 66, 21-6.
- Mulley, J C, Scheffer, I E, Petrou, S, Dibbens, L M, Berkovic, S F, Harkin, L A (2005). SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat*, 25, 535-42.
- Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- Nabbout, R (2008). Can SCN1A mutations account for SUDEP?--Commentary on Hindocha et al. *Epilepsia*, 49, 367-8.
- Narula, O S, Samet, P, Javier, R P (1972). Significance of the sinus-node recovery time. *Circulation*, 45, 140-58.
- Nashef, L (1997). Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*, 38, S6-8.
- Nashef, L, So, E L, Ryvlin, P, Tomson, T (2012). Unifying the definitions of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia*, 53, 227-33.
- Noujaim, S F, Kaur, K, Milstein, M, Jones, J M, Furspan, P, Jiang, D, Auerbach, D S, Herron, T, Meisler, M H, Jalife, J (2012). A null mutation of the neuronal sodium channel NaV1.6 disrupts action potential propagation and excitation-contraction coupling in the mouse heart. *FASEB J*, 26, 63-72.
- Oakley, J C, Kalume, F, Yu, F H, Scheuer, T, Catterall, W A (2009). Temperature- and age-dependent seizures in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3994-9.
- Pinto, K G, Scorza, F A, Arida, R M, Cavalheiro, E A, Martins, L D, Machado, H R, Sakamoto, A C, Terra, V C (2011). Sudden unexpected death in an adolescent with epilepsy: all roads lead to the heart? *Cardiol J*, 18, 194-6.
- Priori, S G, Aliot, E, Blomstrom-Lundqvist, C, Bossaert, L, Breithardt, G, Brugada, P, Camm, A J, Cappato, R, Cobbe, S M, Di Mario, C, Maron, B J, McKenna, W J, Pedersen, A K, Ravens, U, Schwartz, P J, Trusz-Gluza, M, Vardas, P, Wellens, H J, Zipes, D P (2001). Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 22, 1374-450.
- Qiagen-GmbH (2006). DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006.

- Ragsdale, D S (2008). How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy? *Brain Res Rev*, 58, 149-59.
- Rao, S, Verkman, A S (2000). Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1-C18.
- Richards, A G, Simonson, E, Visscher, M G (1953). Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn mice in normal conditions and under the effect of cooling, hypoxia and potassium. *Am J Physiol*, 174, 293-8.
- Römer, D (2003). Untersuchungen zur künstlichen Beatmung bei der Maus (Mus musculus) mit dem UNO Micro-Ventilator®. [Dissertation], München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Roth, D M, Swaney, J S, Dalton, N D, Gilpin, E A, Ross, J, Jr. (2002). Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H2134-40.
- Saba, S, Wang, P J, Estes, N A, 3rd (2000). Invasive cardiac electrophysiology in the mouse: techniques and applications. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 122-32.
- Saiki, R K, Gelfand, D H, Stoffel, S, Scharf, S J, Higuchi, R, Horn, G T, Mullis, K B, Erlich, H A (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- Sastry, A, Arnold, E, Gurji, H, Iwasa, A, Bui, H, Hassankhani, A, Patel, H H, Feramisco, J R, Roth, D M, Lai, N C, Hammond, H K, Narayan, S M (2006). Cardiac-directed expression of adenylyl cyclase VI facilitates atrioventricular nodal conduction. *J Am Coll Cardiol*, 48, 559-65.
- Satin, J, Kyle, J W, Chen, M, Bell, P, Cribbs, L L, Fozzard, H A, Rogart, R B (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, 256, 1202-5.
- Savio-Galimberti, E, Gollob, M H, Darbar, D (2012). Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol*, 3, 124.
- Scattolini, M, Scorza, C A, Cavalheiro, E A, de Almeida, A C, Scorza, F A (2013). Tachycardia and SUDEP: reassuring news about beta blockers. *Epilepsy Behav*, 27, 510-2.
- Scheffer, I E, Berkovic, S F (1997). Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*, 120 (Pt 3), 479-90.
- Scheinman, R I, Auld, V J, Goldin, A L, Davidson, N, Dunn, R J, Catterall, W A (1989). Developmental regulation of sodium channel expression in the rat forebrain. *J Biol Chem*, 264, 10660-6.

- Scherf, D, Schaffer, A I (1952). The electrocardiographic exercise test. *Am Heart J*, 43, 927-46.
- Schmidt, R F, Lang, F, Thews, G (2005). Physiologie des Menschen, Aufl. 29, Heidelberg, Springer Medizin Verlag, S. 57-84, 554-589.
- Schmuth, J F, Bonaguro, R J, Corso-Diaz, X, Simpson, E M (2012). Modelling human regulatory variation in mouse: finding the function in genome-wide association studies and whole-genome sequencing. *PLoS Genet*, 8, e1002544.
- Schünke, M, Schulte, E, Schumacher, U, Voll, M, Wesker, K (2005). Prometheus Lernatlas der Anatomie, Aufl. 1, Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag, 110.
- Schwarte, L A, Zurbier, C J, Ince, C (2000). Mechanical ventilation of mice. *Basic Res Cardiol*, 95, 510-20.
- Scisense-Inc (2015). Octapolar Electrophysiology Catheter [Internetseite]. <http://scisense.cn/products/Electrophysiology.pdf>, [aufgerufen am 10.05.2015]
- Scorza, F A, Arida, R M, Mendonca, P R, Cavalheiro, E A, Leite, J P (2012). Neurocysticercosis: a new trend in SUDEP research? *Rev Soc Bras Med Trop*, 45, 280.
- Seyal, M (2015). Pathophysiological mechanisms in sudden unexpected death in epilepsy: current state of knowledge and future directions. *J Clin Neurophysiol*, 32, 3-4.
- Sharp, P A, Sugden, B, Sambrook, J (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 12, 3055-63.
- Shepard, R K, Wood, M A, Dan, D, Clemo, H F, Gilligan, D M, Ellenbogen, K A (1999). Induction of ventricular fibrillation by T wave shocks: observations from monophasic action potential recordings. *J Interv Card Electrophysiol*, 3, 335-40.
- Smithies, O (2001). Forty years with homologous recombination. *Nat Med*, 7, 1083-6.
- Snyder, M L, Soliman, E Z, Whitsel, E A, Gellert, K S, Heiss, G (2014). Short-term repeatability of electrocardiographic P wave indices and PR interval. *J Electrocardiol*, 47, 257-63.
- Soliman, E Z, Cammarata, M, Li, Y (2014). Explaining the inconsistent associations of PR interval with mortality: the role of P-duration contribution to the length of PR interval. *Heart Rhythm*, 11, 93-8.
- Speerschneider, T, Grubb, S, Metoska, A, Olesen, S P, Calloe, K, Thomsen, M B (2013). Development of heart failure is independent of K⁺ channel-interacting protein 2 expression. *J Physiol*, 591, 5923-37.

- Srinivasan, J, Schachner, M, Catterall, W A (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15753-7.
- Starmer, C F (2006). The role of intrinsic and induced vulnerability in electrically induced cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17, 1369-70.
- Stuhmer, W, Conti, F, Suzuki, H, Wang, X D, Noda, M, Yahagi, N, Kubo, H, Numa, S (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339, 597-603.
- Surawicz, B (1971). Ventricular fibrillation. *Am J Cardiol*, 28, 268-87.
- Surges, R, Thijs, R D, Tan, H L, Sander, J W (2009). Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. *Nat Rev Neurol*, 5, 492-504.
- Surges, R, Adjei, P, Kallis, C, Erhuero, J, Scott, C A, Bell, G S, Sander, J W, Walker, M C (2010a). Pathologic cardiac repolarization in pharmaco-resistant epilepsy and its potential role in sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. *Epilepsia*, 51, 233-42.
- Surges, R, Taggart, P, Sander, J W, Walker, M C (2010b). Too long or too short? New insights into abnormal cardiac repolarization in people with chronic epilepsy and its potential role in sudden unexpected death. *Epilepsia*, 51, 738-44.
- Surges, R, Sander, J W (2012). Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention. *Curr Opin Neurol*, 25, 201-7.
- Thermo-Fisher-Scientific-Inc (2014). GeneRuler DNA Ladder Mix [Internetseite]. <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-dna-ladder-mix/>, [aufgerufen am 06.10.2014]
- Tomson, T, Walczak, T, Sillanpaa, M, Sander, J W A S (2005). Sudden unexpected death in epilepsy: A review of incidence and risk factors. *Epilepsia*, 46, 54-61.
- Tomson, T (2008). Genetic screening for SUDEP?--Commentary on Hindocha et al. *Epilepsia*, 49, 368-9.
- Tomson, T, Nashef, L, Ryvlin, P (2008). Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol*, 7, 1021-31.
- Velagapudi, P, Turagam, M, Laurence, T, Kocheril, A (2012). Cardiac arrhythmias and sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Pacing Clin Electrophysiol*, 35, 363-70.
- Volkers, L, Kahlig, K M, Verbeek, N E, Das, J H, van Kempen, M J, Stroink, H, Augustijn, P, van Nieuwenhuizen, O, Lindhout, D, George, A L, Jr., Koeleman, B P, Rook, M B (2011). Nav 1.1 dysfunction in genetic epilepsy with febrile seizures-plus or Dravet syndrome. *Eur J Neurosci*, 34, 1268-75.

- Volkers, L, Kahlig, K M, Das, J H, van Kempen, M J, Lindhout, D, Koeleman, B P, Rook, M B (2013). Febrile temperatures unmask biophysical defects in Nav1.1 epilepsy mutations supportive of seizure initiation. *J Gen Physiol*, 142, 641-53.
- Wakimoto, H, Maguire, C T, Kovoor, P, Hammer, P E, Gehrman, J, Triedman, J K, Berul, C I (2001). Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res*, 50, 463-73.
- Walker, M J, Curtis, M J, Hearse, D J, Campbell, R W, Janse, M J, Yellon, D M, Cobbe, S M, Coker, S J, Harness, J B, Harron, D W, et al. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 22, 447-55.
- Washington, G (1773). Diary entry: 19 June 1773. *The Diaries of George Washington, vol. 3, 1 January 1771–5 November 1781*. Jackson, D, Twohig, D (Hrsg.), Charlottesville, University Press of Virginia, 1978, S. 188, via Founders Online, National Archives, <http://founders.archives.gov/documents/Washington/01-03-02-0003-0012-0019> [aufgerufen am 02.11.2015].
- Waterston, R H, Lindblad-Toh, K, Birney, E, Rogers, J, Abril, J F, Agarwal, P, Agarwala, R, Ainscough, R, Alexandersson, M, An, P, Antonarakis, S E, Attwood, J, Baertsch, R, Bailey, J, Barlow, K, Beck, S, Berry, E, Birren, B, Bloom, T, Bork, P, Botcherby, M, Bray, N, Brent, M R, Brown, D G, Brown, S D, Bult, C, Burton, J, Butler, J, Campbell, R D, Carninci, P, Cawley, S, Chiaromonte, F, Chinwalla, A T, Church, D M, Clamp, M, Clee, C, Collins, F S, Cook, L L, Copley, R R, Coulson, A, Couronne, O, Cuff, J, Curwen, V, Cutts, T, Daly, M, David, R, Davies, J, Delehaunty, K D, Deri, J, Dermitzakis, E T, Dewey, C, Dickens, N J, Diekhans, M, Dodge, S, Dubchak, I, Dunn, D M, Eddy, S R, Elnitski, L, Emes, R D, Eswara, P, Eyras, E, Felsenfeld, A, Fewell, G A, Flicek, P, Foley, K, Frankel, W N, Fulton, L A, Fulton, R S, Furey, T S, Gage, D, Gibbs, R A, Glusman, G, Gnerre, S, Goldman, N, Goodstadt, L, Grafham, D, Graves, T A, Green, E D, Gregory, S, Guigo, R, Guyer, M, Hardison, R C, Haussler, D, Hayashizaki, Y, Hillier, L W, Hinrichs, A, Hlavina, W, Holzer, T, Hsu, F, Hua, A, Hubbard, T, Hunt, A, Jackson, I, Jaffe, D B, Johnson, L S, Jones, M, Jones, T A, Joy, A, Kamal, M, Karlsson, E K, et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-62.
- Wehrens, X H, Kirchhoff, S, Doevendans, P A (2000). Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. *Cardiovasc Res*, 45, 231-7.
- Weiss, J, Zimmermann, F (1999). Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Lab Anim*, 33, 192-3.
- Wellens, H J (2008). Forty years of invasive clinical electrophysiology: 1967-2007. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 1, 49-53.
- Westenbroek, R E, Bischoff, S, Fu, Y, Maier, S K, Catterall, W A, Scheuer, T (2013). Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J Mol Cell Cardiol*, 64, 69-78.

- Whalen, E J, Bates, J N, Johnson, A K, Lewis, S J (2006). Downregulation of propranolol-sensitive beta-adrenoceptor signaling after inhibition of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*, 147, 755-64.
- Whitaker, W R, Clare, J J, Powell, A J, Chen, Y H, Faull, R L, Emson, P C (2000). Distribution of voltage-gated sodium channel alpha-subunit and beta-subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J Comp Neurol*, 422, 123-39.
- Wu, Y, Temple, J, Zhang, R, Dzhura, I, Zhang, W, Trimble, R, Roden, D M, Passier, R, Olson, E N, Colbran, R J, Anderson, M E (2002). Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, 106, 1288-93.
- Xiao, Z C, Ragsdale, D S, Malhotra, J D, Mattei, L N, Braun, P E, Schachner, M, Isom, L L (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem*, 274, 26511-7.
- Yu, F H, Westenbroek, R E, Silos-Santiago, I, McCormick, K A, Lawson, D, Ge, P, Ferriera, H, Lilly, J, DiStefano, P S, Catterall, W A, Scheuer, T, Curtis, R (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci*, 23, 7577-85.
- Yu, F H, Yarov-Yarovoy, V, Gutman, G A, Catterall, W A (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57, 387-95.
- Yu, F H, Mantegazza, M, Westenbroek, R E, Robbins, C A, Kalume, F, Burton, K A, Spain, W J, McKnight, G S, Scheuer, T, Catterall, W A (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci*, 9, 1142-9.
- Zakon, H H (2012). Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 Suppl 1, 10619-25.

Appendix

Tab. 20: PCR-Materialien und Chemikalien

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
Eppendorfgefäß	Safe-Lock Tubes 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Thermogerät	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus Fresco17 Centrifuge	Thermo Electron Corporation/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ethanol 96-100%	≥ 99,5% Ph. Eur., reinst 2,5 l	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Schüttelgerät	IKA MS 3 digital	Faust Laborbedarf AG, Schaffhau- sen, Schweiz
Pipetten	VWR Einkanalpipetten	VWR International GmbH, Darm- stadt
PCR-Thermocycler	Primus advanced® Thermo- cyclers (modifiziert)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Taq-Polymerase	DREAMTAQ EP0704 DNA Polymerase	Fermentas/Thermo Fisher Scien- tific Inc., Waltham, MA, USA
Primer	268 for, 269 rev, 316 rev	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Desoxyribonukleosidtriphosphate	dNTP Mix 10 mM	Fermentas/Thermo Fisher Scien- tific Inc., Waltham, MA, USA
Marker	GeneRuler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl	Fermentas/Thermo Fisher Scien- tific Inc., Waltham, MA, USA
TAE-Puffer (50× bzw 1×)	Rothiphorese®	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
TRIS-Puffer	TRIS-Hydrochlorid Pufferan® > 99% p.a.	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
EDTA	EDTA Dinatriumsalz- Dihydrat ≥ 99%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Gelelektrophoreseapparatur	Eigenbau	Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg
Ethidiumbromid	EtBr, BioReagent for molecu- lar biology, powder	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Universal Agarose frei von RNAsen, DNAsen und Enzy- minhibitoren	Bio&SELL e.K, Feucht bei Nürn- berg
Software Geldokumentation	Kodak Molecular Imaging Software 4.03	Kodak GmbH, Stuttgart
UV-Fotogerät	Gel Logic 100 Molecular Imaging System	Kodak GmbH, Stuttgart
Magnetrührer	VMS-C4	VWR International GmbH, Darm-

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug stadt
Spannungsgerät PCR	Consort EV series power supplies	Consort bvba, Turnhout, Belgien
PCR-Tubes	PCR-Tubes 0,2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schutzbrille		UVEX ARBEITSSCHUTZ GmbH Fürth
Einmalhandschuhe	Kolibri Nitril puderfrei	IGEFA Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Ahrensfelde OT Blumberg
Elektrophorese Ladepuffer	DNA Loading Dye	Fermentas/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tab. 21: Inhalt DNeasy® Blood & Tissue Kit

DNeasy® Blood & Tissue Kit	Catalog no 69506	QIAGEN GmbH-Germany, Hilden
DNeasy® Mini Spin Columns		
Collection Tubes 2 ml		
ATL-Puffer		
AL-Puffer		
AW1-Puffer		
AW2-Puffer		
AE-Puffer		
Proteinkinase K		

Tab. 22: Chemikalien und Laborbedarf EKG

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
Isoproterenol-Hydrochlorid	Prod.nr. I6504	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol 96-100%	≥ 99,5% Ph. Eur., reinst 2,5 l	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
2,2,2-Tribromethanol	Cat.: T48402-5G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Tert-Amylalkohol >99%	Cat.: 24,048-6 (2-Methyl- 2-butanol)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid 0,9%	Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg v.d.H.
Feindosierungsspritze 1ml	Injekt®-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glaspipette 10 ml		witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Reagenzgefäß 50 ml		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
Analysenwaage	R 160 P Electronic Semi Microbalance	Sartorius AG, Göttingen
Klebestreifen	Leukosilk®	BSN medical GmbH, Hamburg

Tab. 23: Software/Hardware EKG

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
EKG-Aufzeichnung Hardware	Powerlab 16/30	ADInstruments , Dunedin, New Zealand
Verstärker	BIOamp	ADInstruments , Dunedin, New Zealand
Elektroden	Needle Electrodes 29 G	ADInstruments , Dunedin, New Zealand
EKG-Aufzeichnung Software	LabChart 7.3	ADInstruments , Dunedin, New Zealand
EKG-Auswertung Software	ecgAuto	emka TECHNOLOGIES S.A.S., Paris, Frankreich
Temperaturkontrollmodul mit Wärmeplatte und Rektalsensor	TKM 0904	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach

Tab. 24: Chemikalien und Laborbedarf EPU

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
Isofluran	Isofluran CP®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf
Sauerstoff	GA 201	Linde AG, Gases Division Germany, Pullach
Narkosekammer	Eigenbau	Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg
Schermaschine/Rasierer	Contura	Wella/Procter & Gamble GmbH, Schwalbach am Taunus
Mikrochirurgisches Besteck	Präzisionsinstrumente	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Ligaturfaden	USP 8/0, geflochten, steril	Gottfried Vömel KG, Kronberg
Desinfektionsspray	Kodan® Tinktur forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

Tab. 25: Software/Hardware EPU

Material	Bezeichnung	Hersteller/Bezug
Stimulationsssoftware	MC Stimulus V. 2.1.5	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen
Stimulusgenerator	STG 1001	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen
Anästhesiegassystem	Vapor [®] 2000	Dräger Medical GmbH, Lübeck
Beatmungspumpe/Respirator	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Stereomikroskop	SZ 40	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Kaltlicht Illuminator	KL 1500	Schott AG, Mainz
EPU Katheter	1.1French Octapolar Catheter FTS 1113A-0518	Scisense Inc., London, Ontario, Kanada

Danksagung

Ohne die Unterstützung vieler Personen wäre diese Arbeit selbstverständlich nicht zustande gekommen. An dieser Stelle möchte ich deshalb die Gelegenheit nutzen denjenigen zu danken, die zu dem Gelingen maßgeblich beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. S. Maier verdanke ich das interessante Thema im Rahmen meiner Dissertation bearbeiten zu können. Nicht nur hierfür, sondern auch für Erfahrungen und Unterstützung im Hinblick meines Postervortrags bei dem Retreat des *Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz* sowie die schönen Tage auf und abseits der Skipiste möchte ich Ihnen herzlich danken.

Dr. Susann Walz gebührt mein großer Dank für die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit. Danke dir Susann für konstruktive Gespräche und deine Geduld mit all meinen bohrenden Fragen.

Für die vielen Stunden im Labor möchte ich dem Team um Prof. Kai Schuh am Physiologischen Institut der Universität Würzburg danken. Herzlichen Dank Herr Prof. Schuh für die freundliche Atmosphäre, die aufgenommene Mühe und die viele Zeit, die sie sich jederzeit für mich genommen haben. Besonderer Dank gilt nicht zuletzt Marco Abesser. Vielen lieben Dank für deine unermüdliche Hilfsbereitschaft, deine Ausdauer und die Fülle deiner praktischen Tipps im elektrophysiologischen Labor.

Dr. Massimo Mantegazza (Universität Nizza-Sophia-Antipolis) sowie Frau Benedetta Terragni (Istituto Neurologico Carlo Besta, Mailand) möchte ich gerne für die internationale Zusammenarbeit danken. Im internationalen Verbund von *Citizens United for Research in Epilepsy* und der *Dravet Syndrome Foundation* konnte das transgene Mausmodell zur Verfügung gestellt und die Versuche koordiniert werden.

Abschließend möchte ich meinem persönlichen Umfeld tiefen Dank aussprechen. Euch habe ich so vieles zu verdanken. Für euren ausdauernden moralischen Beistand und eure Stütze danke ich euch von ganzem Herzen. Meiner Mutter möchte ich für weitaus mehr

als den Rückhalt während dieser Arbeit danken. Nouschin Vahedi danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Verständnis und ihren immerwährenden Zuspruch. Für die Ermöglichung und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums möchte ich meinen Eltern und meinem Großvater an dieser Stelle herzlich danken. Eva und Toni, danke für euer stets offenes – auch „naturwissenschaftliches“- Ohr. Kurz, ich bin wirklich froh, euch alle zu haben.

Curriculum Vitae

Name, Vorname	Kaiser, Markus Leonhard
Geburtsdatum	02.04.1987
Geburtsort	Würzburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulbildung	
1993–1997	Grundschule Lengfeld
1997–2006	Städtisches Mozart-Schönborn-Gymnasium Würzburg Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,1)
Hochschulbildung	
04/2008–06/2014	Studium der Humanmedizin – Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1. Staatsexamen 03/10 „sehr gut“ (1,5) 2. Staatsexamen 05/14 „sehr gut“ (1,5) Approbation als Arzt 05/14
Praktisches Jahr	
02–04/2013	Innere Medizin – Tygerberg Academic Hospital, University of Stellenbosch, Kapstadt/ Südafrika
04–06/2013	Innere Medizin – Klinikum Aschaffenburg
06–10/2013	Chirurgie – Stadtpital Triemli, Zürich/ Schweiz
10/2013–01/2014	Radiologie/Neuroradiologie/Intervent. Radiologie – Klinikum Aschaffenburg
Famulaturen	
09–10/2010	Allgemein-/Viszeralchirurgie – Hochtaunuskliniken, Bad Homburg v.d.H.
03–04/2011	Orthopädie/Sportmedizin – Praxisklinik Rennbahn AG, Swiss Olympic Medical Center, Muttenz, Basel/ Schweiz
03–04/2012	Internist. Notfallambulanz/Intensivstation – Universitätsklinikum Würzburg, Zentrum Innere Medizin (ZIM)
08–09/2012	Plastische-/Ästhetische-/Rekonstruktive Chirurgie – Gemeinschaftspraxis mit Belegklinik Dres. Holle und Peek, Frankfurt am Main
Berufliche Tätigkeit	
ab 04/2016	Assistenzarzt für Plastische-, Hand- und Rekonstruktive Chirurgie, Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Krankenhaus Bad Soden

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Ort, Datum, Unterschrift