

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

Direktor: Univ.- Professor Dr. med. Georg Ertl

Elektrophysiologische Charakterisierung von STIM2-Knock-Out-Mäusen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Vetter

aus Nürnberg

Würzburg, Juni 2012

Referent: APL-Prof. Dr. med. Sebastian Maier

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Nieswandt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2013

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 PLÖTZLICHER HERZTOD	1
1.2 ELEKTROPHYSIOLOGIE DES HERZENS	2
1.3 ABLEITUNG DER HERZSTRÖME	4
1.4 STROMAL INTERACTION MOLECULE 2 (STIM2)	6
1.5 FRAGESTELLUNG	11
2. METHODIK	12
2.1 KOLLEKTIVBESCHREIBUNG	12
2.2 ELEKTROKARDIOGRAMM (EKG)	13
2.2.1 PRÄPARATION UND NARKOSE DER TIERE	13
2.2.2 RUHE- UND STRESS- EKG	14
2.2.3 TELEMETRIE	17
2.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG (EPU)	20
2.3.1 ALLGEMEINE PRÄPARATION	20
2.3.2 KATHETER UND VOREINSTELLUNGEN	22
2.3.3 STIMULATIONSPROTOKOLLE	23
2.3.3.1 Stimulation des rechten Vorhofes	23
2.3.3.2 Stimulation der rechten Kammer	31
2.4 STATISTIK	31
3. RESULTATE	32
3.1 ELEKTROKARDIOGRAMM	32
3.1.1 RUHE- UND STRESS-EKG	32
3.1.2 TELEMETRIE	40
3.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	44
4. DISKUSSION	47
4.1 EINFÜHRUNG	47
4.2 ELEKTROKARDIOGRAMM	47
4.3 TELEMETRIE	50

4.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	51
5. ZUSAMMENFASSUNG	52
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. ANHANG	63
7.1 CHEMIKALIEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE PRODUKTE	63
7.2 VERWENDETE SOFTWARE, GERÄTE UND EINMALARTIKEL	63

Danksagung und Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Plötzlicher Herztod

Schätzungen gehen davon aus, dass 50% aller Todesfälle durch eine Erkrankung des Herzens plötzlich und unerwartet geschehen [1]. Man spricht dabei von einem plötzlichen Herztod (engl. sudden cardiac death, SCD), wenn es innerhalb von einer Stunde nach Symptombeginn zu einem natürlichen Tod durch Herzstillstand kommt [2, 3].

In Deutschland sterben etwa 150.000 Menschen/Jahr [2], in den USA etwa 200.000 bis 450.000 Menschen/Jahr am plötzlichen Herztod [1, 4]. Die Inzidenz des SCD ist hierbei streng altersabhängig. Im Allgemeinen ist sie mit 1 Todesfall pro 100.000/Jahr in jüngeren Lebensjahren eher gering. Ab dem 30. Lebensjahr steigt die Inzidenz des SCD jedoch an und erreicht in der Altersgruppe der 45-75-jährigen ca. 1-2 pro 1.000 Einwohner/Jahr [1].

Die Ursachen des plötzlichen Herztodes sind dabei vielfältig und stehen ebenfalls in Relation zum Alter. Bei Adoleszenten und jungen Erwachsenen sind dies vor allem angeborene genetische Veränderungen von kardialen Strukturproteinen (z.B. bei der Hypertrophen Kardiomyopathie) oder von Kanalproteinen (z.B. bei Long-QT- oder Brugada-Syndrom). Im Erwachsenenalter liegt dem SCD zumeist eine koronare Herzkrankheit (ca. 80% der Fälle) oder eine Kardiomyopathie zugrunde [1, 5, 6]. Da die Inzidenz in jungen Jahren gering ist, werden die absoluten Zahlen des SCD durch die Krankheiten des Erwachsenenalters bestimmt.

Beim SCD liegt ein plötzlicher Stillstand der kardialen Aktivität mit Zusammenbruch des Kreislaufs auf Basis von Herzrhythmusstörungen vor, wobei zumeist ein Kammerflimmern (VF), selten auch eine primäre Bradykardie, Asystolie oder pulslose elektrische Aktivität vorliegt [1, 3, 5].

Auslöser für ventrikuläre Tachykardien bzw. Fibrillationen können beispielsweise myokardiale Ischämien, Alterationen der Hämodynamik sowie des autonomen Nervensystems, Medikamenteninteraktionen, körperliche Betätigung oder Veränderungen des Elektrolythaushalts sein [4, 7, 8].

In etwa 2/3 der Fälle stellt der plötzliche Herztod das erste kardiale Ereignis in der Krankengeschichte der Patienten dar oder geschieht bei einer bestehenden Herzerkrankung, die jedoch mit einem niedrigen Risiko für Arrhythmien bewertet wird [1].

Zur Prävention des plötzlichen Herztodes ist es daher notwendig, Patienten mit einem erhöhten Risiko zu erkennen und herauszufiltern. Zur Risikostratifizierung sind neben der kardialen Bildgebung, die Analyse der elektrischen Erregungsbildung, -ausbreitung und -rückbildung sowie die Rhythmusdiagnostik entscheidend. Hierzu haben sich als Untersuchungsmethoden das Elektrokardiogramm (EKG), das Langzeit-EKG (auch Holter-EKG oder 24h-EKG) und die elektrophysiologische Untersuchung (EPU) im klinischen Alltag etabliert [2, 4, 5].

Auch in der tierexperimentellen Grundlagenforschung werden diese Untersuchungsmethoden eingesetzt.

1.2 Elektrophysiologie des Herzens

Der größte Anteil der Kardiomyozyten wird dem Arbeitsmyokard zugerechnet. Nach der Depolarisation dieser Zellen kommt es zu einem Einstrom von Calcium und nachfolgend zu einer Kontraktion durch das Ineinandergreifen von Aktin- und Myosinfilamenten [9]. Der weit kleinere Teil der Kardiomyozyten ist spezialisiert auf die Reizgenerierung und Reizweiterleitung.

Eine reguläre Erregung entsteht im Sinusknoten (Nodus sinuatrialis). Diese setzt sich über das Vorhofmyokard, den AV-Knoten (Nodus atrioventricularis) und das His-Bündel fort. Von dort gelangt sie über die im Septum laufenden Tawara-Schenkel in die rechte und linke Herzkammer, um letztlich von den Purkinje-Fasern auf das Kammermyokard übertragen zu werden [10].

Die Erregungsausbreitung innerhalb des Arbeitsmyokards wird durch die spezielle Zellphysiologie der Kardiomyozyten ermöglicht. Das normale Ruhemembranpotential (transmembranäre Spannung, siehe Abb. 1: Phase 4) eines Kardiomyozyten beträgt etwa -90mV.

Erfolgt ein elektrischer Impuls (Stimulus), wird ein Kardiomyozyt auf Grund des Einstroms von Natrium durch spannungsabhängige Natriumkanäle auf Werte bis +20mV depolarisiert (siehe Abb. 1: Aufstrich, initiale Spitze, Phase 0 und Phase 1). Dies entspricht im EKG, je nach Lage der Kardiomyozyten im Vorhof bzw. in der Kammer, der

P-Welle bzw. dem QRS-Komplex [11]. Daran schließt sich die für das Myokard typische lange Plateauphase an. Darin besteht ein Gleichgewicht zwischen dem langsamen Calciumeinstrom durch L-Typ-Kanäle und dem Kalium-Ausstrom durch spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K_v -Kanäle). Im EKG spiegelt das die ST-Strecke wider [11].

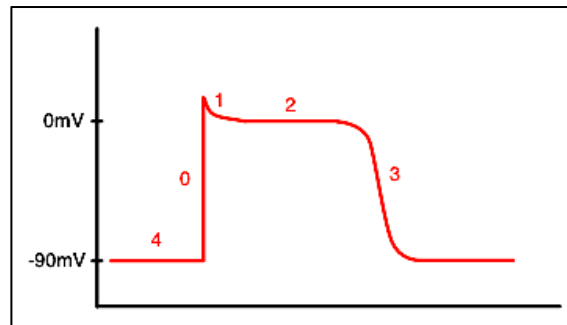


Abb. 1: Aktionspotential Kammermyokard mit den Phasen 0-4, eigene Abb.

In der Phase 3, der Repolarisation, kommt es zu einer Inaktivierung der Calcium-Kanäle. Der nun überwiegende Kalium-Ausstrom führt zur Rückkehr zum Ruhemembranpotential. Diese Phase wird im EKG durch die T-Welle abgebildet [11].

Während der Plateauphase ist das Arbeitsmyokard absolut refraktär. Ab einem Membranpotential von etwa -40mV sind die schnellen Natrium-Kanäle wieder teilweise aktivierbar. So ausgelöste Aktionspotentiale werden frühe Nachdepolarisationen genannt und treten häufig im Rahmen einer langen Aktionspotentialdauer, eines Long-QT-Syndroms oder einer Bradykardie auf. Man geht davon aus, dass die Ursache dafür eine Reaktivierung von Calcium-Strömen ist [12]. Das Auftreffen von Aktionspotentialen auf schon wieder erregbare Bereiche des Myokards kann zu einer kreisenden Erregung führen [13]. Man spricht dabei auch von der vulnerablen Phase [10].

Späte Nachdepolarisationen finden während der Phase 4 statt und sind ebenfalls auf einen gestörten intrazellulären Calcium-Haushalt zurückzuführen. Dabei kommt es zu einer spontanen Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum (SR), wodurch es zu einer Auslösung eines Aktionspotentials kommen kann [12].

Eine weitere Funktion hat Calcium bei der elektromechanischen Kopplung in den Zellen des Arbeitsmyokards. In diesem Prozess wird die elektrische Erregung in eine Kontraktion der Zelle umgesetzt.

Während der Plateauphase des Aktionspotentials der Kardiomyozyten strömt über L-Typ-Calciumkanäle (auch Dihydropyridin-Rezeptor) Calcium ein. Dieser „Trigger“ führt zum Ausstrom von Calcium durch Ryanodin-Rezeptoren (RYR) des SR, welches als intrazellulärer Calciumspeicher dient. Das Calcium kann so an das Regulatorprotein Troponin C binden, was zu einer Kontraktion führt [9, 12, 14, 15].

Zur Relaxation kommt es durch das Zurückpumpen des Calcium durch SERCA (sarko-endoplasmatische-Retikulum-ATPase; Ca^{2+} -Pumpe) in das SR und in den Extrazellularraum über Na/Ca-Austauscher. So dissoziiert Calcium von Troponin C und es kommt zu einer Relaxation [9, 14, 15].

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration eines Kardiomyozyten unterliegt großen Schwankungen von $0,1\mu\text{M}$ während der Diastole bis zu $1-10\mu\text{M}$ während der Systole [16]. Kommt es dagegen zu einer Dysbalance der Calcium-Homöostase, z. B. im Rahmen einer Ischämie, einer chronischen Herzinsuffizienz oder durch eine angeborene Mutation im RYR2-Gen, kann dies unter anderem in frühen und späten Nachdepolarisationen, Reentry-Arrhythmien als auch in einer irregulären elektromechanischen Kopplung resultieren [9, 15, 17]. Diese Arrhythmien besitzen das Potential in eine ventrikuläre Fibrillation überzugehen, was letztlich einem plötzlichen Herztod gleich kommt [17].

1.3 Ableitung der Herzströme

Diese eben genannten De- und Repolarisationsvorgänge in den Kardiomyozyten sind die Grundlage für die Registrierung eines Elektrokardiogramms. Während der Depolarisation kommt es zu Kationenströmen in das Zellinnere, wodurch die Zelloberfläche negativ geladen wird. Eine noch nicht erregte Zelle besitzt dagegen eine relativ positiv geladene Zelloberfläche. Diese Potentialunterschiede lassen ein elektromagnetisches Feld entstehen, welches messbar ist [10, 11].

Die einzelnen elektromagnetischen Felder addieren sich zu einem Summationsvektor, der über Elektroden an der Körperoberfläche in Form eines EKGs abgeleitet werden kann.

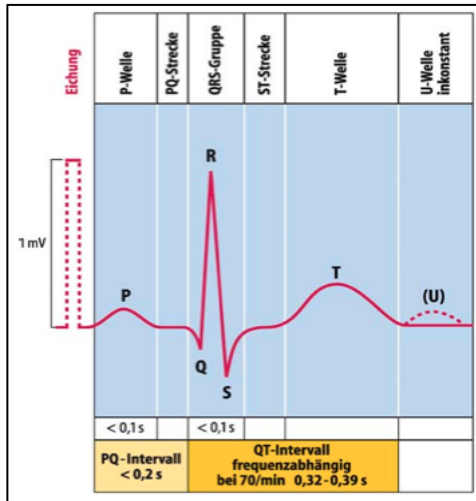


Abb. 2: EKG-Nomenklatur und Zeitdauer der Abschnitte, aus Schmidt-Thews [10]

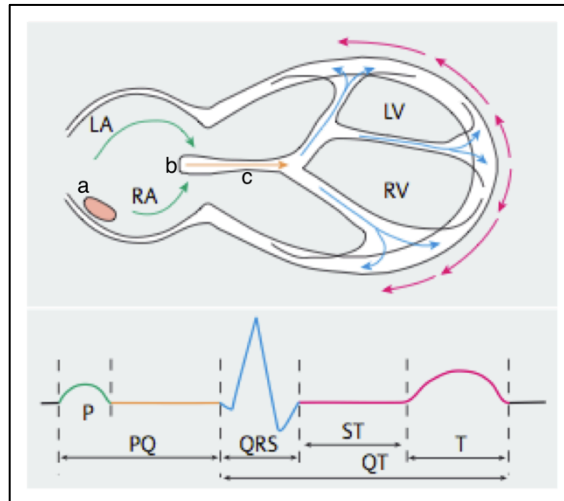


Abb. 3: Erregungsausbreitung und Widerpiegelung im EKG, a: Sinusknoten, b: AV-Knoten, c: His-Bündel, modifiziert nach Schuster [18]

Je nach Lokalisation der Erregungsausbreitung ergibt sich eine unterschiedliche Morphologie der registrierten elektrischen Potentiale (siehe Abb. 2 und 3).

Das EKG ist ein wichtiger Bestandteil der klinischen Diagnostik, wobei das Ruhe-EKG bei auf dem Rücken liegenden Patienten am häufigsten durchgeführt wird.

Belastungsinduzierte Arrhythmien wie z.B. eine katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie können durch ein Belastungs-EKG detektiert werden [2, 19], ebenso eine pathologische Bradykardie, ischämie-induzierte Herzrhythmusstörungen und frequenzkorrelierte Arrhythmien [19, 20].

Beim Langzeit-EKG wird über eine längere Dauer, meist von 24 Stunden, ein EKG registriert und kann anschließend auf sporadische Herzrhythmusstörungen untersucht und nach verschiedenen Parametern, wie z.B. der Herzfrequenzvariabilität (HRV), -turbulenz und der ST-Streckenvermessung, beurteilt werden [20].

Bei der Risikostratifizierung eines SCD können Parameter wie die HRV, welche ein Marker für die Sympathikus- bzw. Parasympathikusaktivität ist, hilfreich sein. Der Zusammenhang zwischen einer veränderten Aktivität des autonomen Nervensystems und der kardiovaskulären Mortalität ist belegt. So können ein erhöhter Sympathikotonus bzw. ein reduzierter Vagotonus bei Risikopatienten (Herzinsuffizienzpatienten, Patien-

ten nach akutem Herzinfarkt) mit einer erhöhten Neigung zu relevanten kardialen Arrhythmien einhergehen [21-24].

Mittels der von Scherlag et al. [25] 1969 erstbeschriebenen elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) lassen sich intrakardial elektrische Potentiale ableiten. Hierzu werden über das venöse Gefäßsystem Katheter in das Herz eingebracht. Mit diesen lassen sich punktgenau in ausgewählten Arealen des Herzens Herzströme ableiten. Durch Abgabe elektrischer Impulse an das Herzgewebe ist es möglich Erregungsabläufe zu manipulieren. Auf diese Weise induzierte Arrhythmien lassen oft Rückschlüsse auf die Genese der Arrhythmien zu und können im Rahmen der Risikostratifikation des SCD helfen.

1.4 Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2)

Calcium (Ca^{2+}) dient ubiquitär als ein intrazellulärer Botenstoff. Im Normalzustand der Zelle beträgt die Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ etwa $0,1\mu\text{mol/l}$. Das sind etwa das 10000-fache weniger als extrazellulär. Bei Aktivierung einer Zelle durch einen äußeren Reiz kann dieser intrazelluläre Wert jedoch innerhalb von Millisekunden auf das 10-fache gesteigert werden. Dieses Signal reguliert eine Vielzahl von Prozessen in den verschiedensten Zellen wie Kontraktion, epithelialen Transport, Hormon- bzw. Transmitterausschüttung und Stoffwechselprozesse, Expression von Genen, Zellmigration, -proliferation und -tod etc.. Ca^{2+} erfüllt daher in der Zelle eine Funktion als second messenger [26].

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wird bei Aktivierung sowohl durch Freisetzung aus dem bedeutendsten intrazellulären Speicher, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER; in Muskelzellen sarkoplasmatisches Retikulum genannt, SR), als auch durch Einstrom aus dem Extrazellulärraum über spezielle Transporter in der Zellmembran erhöht. Diese Transporter können nach ihrem Kontrollmechanismus in drei Kategorien eingeteilt werden. Kanäle, die durch

- Spannungsänderungen (VOCs, voltage-operated Ca^{2+} -channels),
- Rezeptor-Liganden-Bindung (ROCs, receptor-operated Ca^{2+} -channels) oder
- vorhergehende Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (SOCs, store-operated Ca^{2+} -channels)

aktiviert werden [27].

SOCs sind eine heterogene Gruppe von nicht-selektiven Ca^{2+} -Kanälen, deren wichtigsten Mitglieder die Orai- und die TRP-Familie sind [28].

SOCs und deren Wirkung auf die Calciumhomöostase spielen insofern für diese Arbeit eine Rolle, da sie mit STIM-Proteinen interagieren und so zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle führen [29].

Diese Proteine, STIM1 und STIM2, werden je von dem gleichnamigen Gen kodiert [30]. Das humane STIM2-Gen besitzt dabei 12 Exons und 11 Introns und befindet sich auf dem humanen Chromosom 4p15.1.

Die durch die STIM-Gene kodierten Proteine sind Transmembranproteine und wurden in nahezu allen Geweben gefunden [30], u.a. auch im Herzen [31]. STIM1 ist dabei sowohl in der Zellmembran als auch im ER lokalisiert, STIM2 nur im ER [32].

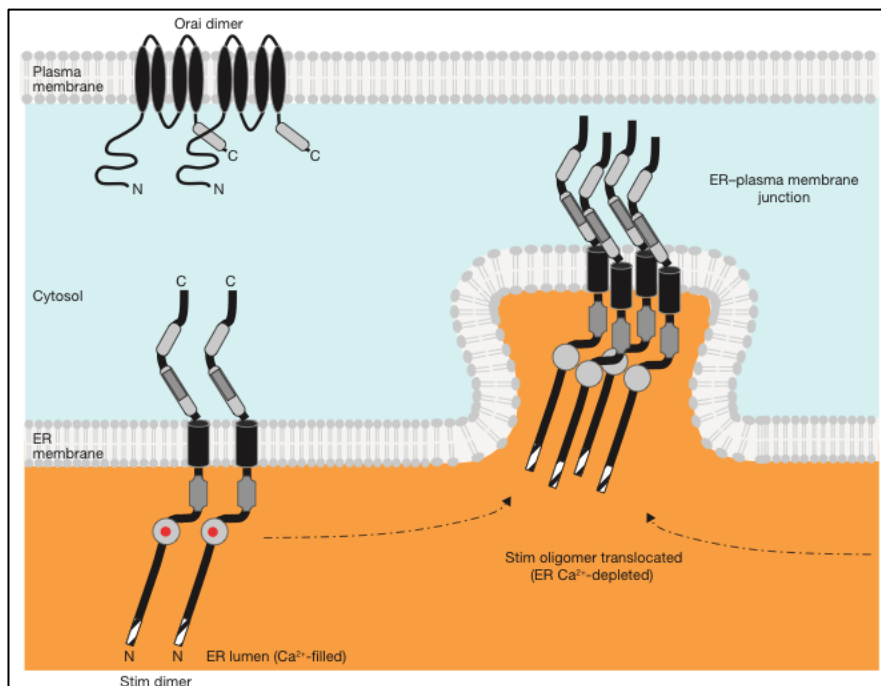


Abb. 4:

links: ER-Lumen mit Calcium gefüllt: STIM-Proteine im Ruhestatus: Die EF-Hand-Domäne hat Calcium (• roter Punkt) gebunden
rechts: Aktivierung von STIM-Proteinen durch Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER führt zur Bildung von Oligomeren, die sich der Zellmembran annähern;
oben: Orai-Dimer: nicht leitende Untereinheiten
aus Cahalan [29]

Durch ihren Aufbau dienen STIM-Proteine als eine Art Calcium-Sensor für die intrazellulären Calcium-Speicher. Hierzu binden sie an einer speziellen Region (EF-Hand-Region) Calcium innerhalb des ER. Vermindert sich der Calcium-Gehalt in den intrazellulären Speichern, werden die STIM-Proteine durch die Dissoziation der Ca^{2+} -Ionen aus der EF-Hand-Bindungsstelle aktiviert. Dabei bilden die STIM-Proteine Oligomere und bewegen sich innerhalb der ER-Membran in die Nähe von Orai-Proteinen. Durch eine Interaktion mit den in der Zellmembran befindlichen Orai-Proteinen entsteht ein Orai-vermittelter Calcium-Einstrom in die Zelle [29] (s. Abb. 4). Dieser Strom stellt somit einen „Store-operated calcium entry“ (SOCE) dar.

Die Interaktion von STIM- und Orai-Proteinen führt bei einer niedrigen Calcium-Konzentration des endoplasmatischen Retikulums zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle.

Die Rolle von STIM2 ist bei diesen Vorgängen weniger klar, denn es haben sich die meisten Studien auf STIM1 konzentriert [33].

Zu Beginn zeigten einige Studien, dass lediglich STIM1 signifikant zu einem SOCE beitragen würde [34-38]. Liou et al. [39] zeigten hingegen, dass auch STIM2 zu einem leichten SOCE beitragen würde. Später wurde postuliert, dass STIM2 ein Inhibitor der STIM1-Oligomerisation sei und so auch ein Inhibitor eines SOCE [32], eine Überexpression von Orai1 und STIM2 würde jedoch zu einem speicherunabhängigen Calcium-Einstrom führen [40].

Im Gegensatz dazu schlugen Brandman et al. [41] vor, dass STIM2 als Regulator arbeite, der die basale Calcium-Konzentration im Zytosol und im Endoplasmatischen Retikulum stabilisieren würde. Dabei wurde festgestellt, dass STIM2 viel sensitiver auf eine Ca^{2+} -Änderung reagieren würde als STIM1 [41]. Unterstützt wurde diese Theorie durch die langsamere Kinetik der Oligomerisation und der erhöhten Stabilität des STIM2-EF-SAM-Komplexes im Vergleich zum entsprechenden STIM1-Komplex. Denn dies würde eine erhöhte Grundaktivität von STIM2 als auch eine unbedeutendere Rolle bei einem durch Leerung der intrazellulären Calcium-Speicher getriggerten SOCE vermuten lassen [42]. Parvez et al. [40] entdeckten bei perfundierten HEK293-Zellen in Patch-Clamp-Versuchen zusätzlich zu einem SOCE einen Calcium-Einstrom in die Zelle, der durch die Interaktion von STIM2 und Orai1 zustande kommt. Dieser Strom würde im normalen Zustand der Zelle durch einen intrazellulären Faktor unterbunden, der wahr-

scheinlich Calmodulin sei und spezifisch auf STIM2 wirke, nicht auf STIM1. Zudem würde Calmodulin auch die InsP_3 -Rezeptor-Aktivität verringern und so einen SOCE verhindern.

Auf diesem Gebiet müssen letztlich noch weitere Untersuchungen stattfinden um die physiologischen Funktionen von STIM2 umfassender zu klären.

Im Moment geht man zusammenfassend davon aus, dass STIM1 erst durch den Ausstrom von Calcium aus dem ER aktiviert wird, währenddessen die STIM2-Aktivität schon unter ruhenden Bedingungen zu einem SOCE durch Interaktion mit Orai-Proteinen führt. Dies könnte jedoch abhängig vom Zelltyp sein und bei einem Fehlen von STIM2 in diesen Zellen teilweise durch STIM1 kompensiert werden [43]. STIM2 könnte ebenso an einem speicherunabhängigen Calcium-Einstrom beteiligt sein, der möglicherweise von Calmodulin reguliert wird.

Das murine Gen von STIM2 zeigt über 96% der kodierenden Region eine 93%ige Identität der Aminosäuresequenz mit dem humanen STIM2-Gen [30] und über die gesamte Sequenz eine 92%ige Übereinstimmung nach der paarweisen Anlagerung durch BLAST [31]. Deshalb geht man davon aus, dass die Resultate aus Versuchen mit STIM2-Knockout-Mäusen auch für die Humanmedizin Relevanz haben.

Bei Versuchen mit Knockdown-Mäusen konnten Berna-Erro et al. zeigen, dass die STIM2-Aktivität in ischämischen Neuronen zu einem SOCE führt. Der daraus resultierende Calcium-Anstieg führte zur Apoptose von Neuronen [44]. In diesen Versuchen konnte auch die Beteiligung von STIM2 beim SOCE in CD4^+ -T-Zellen nachgewiesen werden. Passend zu diesen Ergebnissen zeigten Oh-Hora et al. [45], dass eine selektive Entfernung von STIM1 und STIM2 in CD4^+ -T-Zellen (CD4-cre Mäuse) zu einem lymphoproliferativen Syndrom führte. Somit wurde postuliert, dass STIM2 eine Rolle in der Regulation von CD4^+ -T-Zellen spielt [45].

Bei diesen Versuchen mit zwei unterschiedlich gentechnisch generierten STIM2-defizienten Mauslinien von Oh-Hora et al. [45] und Berna-Erro [31] stellten beide Gruppen jeweils eine reduzierte Lebensdauer fest (s. Abb. 5 und 6).

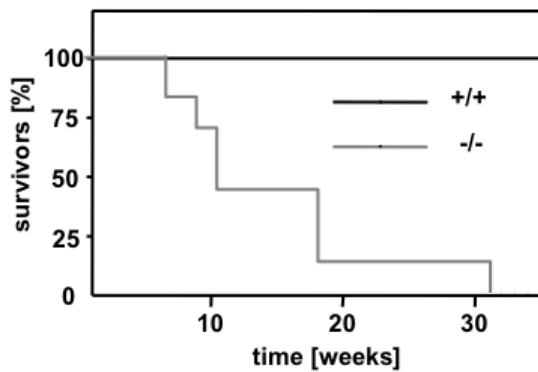


Abb. 5: Kaplan-Meier-Plot; +/+ wildtyp; -/- STIM2-K.O. (homozygot), aus Berna-Errò [31]

Stim2^{fl}CMV-Cre (B6 background)

Day	Genotype	Total (alive)		
		+/+	+/-	-/-
Postnatal	P28	38	90	25
	P35	38	90	1

Abb. 6: Anzahl der überlebenden Tieren nach Tagen postpartal und nach Genotyp: +/+ für wildtyp (homozygot; STIM2-positiv); +/- heterozygot für das STIM2-Allel; -/- homozygot für STIM2-Defizienz, aus Oh-Hora [45]

In der von Berna-Errò generierten STIM2-defizienten Population erlagen die Mäuse ab der 8. Woche post partum ausgeprägt oft einem plötzlichen Tod. In der STIM2-K.O.-Population von Oh-Hora starben die meisten Tiere schon nach vier bis fünf Wochen. Bei der Suche nach den Ursachen für das plötzliche Versterben der K.O.-Tiere stellte der plötzliche Herztod eine wichtige Differentialdiagnose dar.

Eine zellphysiologische Grundlage für diese Differentialdiagnose liegt in der Rolle von STIM2 als ubiquitärer Regulator des basalen zellulären Calcium-Haushalts. Dabei ist die vielfältige und bedeutende Rolle von Calcium in der Entstehung von Arrhythmien [9, 12], welche zu einem SCD führen können, hervorzuheben. Eine weitere physiologische Option für eine mögliche Entstehung von Arrhythmien in STIM2-defizienten Tieren stellte für uns der Nachweis eines store-operated Calcium entry (SOCE) in Herzmuskelzellen [46, 47] dar. Dabei konnte eine Wirkung dieses SOCE in neonatalen Kardiomyozyten nachgewiesen werden. In weitergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reaktivierung eines STIM1-vermittelten SOCE im Rahmen der Entstehung einer kardialen Hypertrophie in adulten Zellen kam und bei STIM1-K.O.-Tieren [48, 49] bzw. durch Gen-Silencing von STIM1 [50] eine Hypertrophie, die über den NFAT-Signalweg reguliert wurde, signifikant reduziert war. Zudem wurde von Ju et al. gezeigt, dass ein SOCE die spontane Depolarisationsfrequenz der Zellen des Sinusknotens beeinflussen könnte [51].

Ein kardialer SOCE könnte folglich auch durch STIM2 beeinflusst werden.

Letztlich gibt es bis dato keine uns bekannte veröffentlichte Untersuchung zu einer möglichen kardialen Funktion vom STIM2.

Unser Ziel war es daher eine elektrophysiologische Charakterisierung STIM2-defizienter Mäuse durchzuführen, um mögliche kardiale Interaktionen dieses Gens zu detektieren.

1.5 Fragestellung

Das STIM2-Protein ist als ubiquitäres transmembranäres Protein des endoplasmatischen Retikulums ein Calcium-Sensor und Regulator der Calcium-Homöostase der Zellen. In Versuchen mit STIM2-Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass diese Tiere plötzlich und unerwartet starben.

Das Ziel dieser Arbeit war es anhand eines Knockout-Mausmodells Auswirkungen des STIM2-Gens auf die kardiale Elektrophysiologie zu überprüfen und so einen eventuellen Zusammenhang mit dem verfrühten Tod der STIM2-K.O.-Tiere herstellen zu können.

Hierzu wurden 15 homozygote STIM2-defiziente Mäuse 15 Wildtyp-Mäusen gegenübergestellt.

Als Untersuchungsmethoden wurden dabei das Ruhe-EKG, das „Stress-EKG“ mit intraperitonealer Verabreichung von Isoprenalin, die telemetrische Langzeit-EKG-Erfassung, sowie die elektrophysiologische Untersuchung gewählt.

2. Methodik

Eine Auflistung der im Methodenteil verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien befindet sich im Anhang.

2.1 Kollektivbeschreibung

Verwendet wurden STIM2-knockout-Mäuse (K.O.-Mäuse), welche von Alejandro Berna-Erro [31] und Dr. Attila Braun (AG Nieswandt des Rudolf-Virchow-Zentrums in Würzburg) generiert wurden. Dabei wurde das STIM2-Gen in embryonalen Stammzellen der Mauslinie 129Sv mit Hilfe eines pBluescript-KS-minus-Vektors ausgeschaltet, der mittels Elektroporation eingebracht wurde. Der Vektor ersetzte dabei größtenteils eine STIM2-Gen-Region zwischen den Exonen 4 und 7 (s. Abb. 7) durch eine IRES-Neo-LacZ-Kassette, die ein Neomycin-Resistenzgen (Neo) und ein β -Galactosidase-Gen (Lac) enthielt. In den durch Applikation von Genetecin selektierten Klonen führte die Deletion der Exone 4-7 zu einer Frameshift-Mutation. Zudem wurde durch das Einfügen des Vektors eine Terminationssequenz im nächsten Exon kreiert, welche zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führte [31].

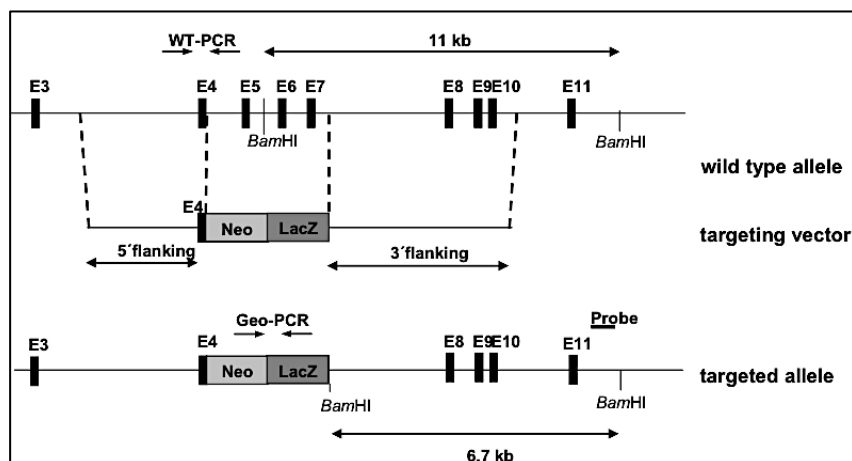


Abb. 7: Vektor (targeting vector) führt größtenteils zur Deletion der Gen-Region zwischen den Exonen 4 und 7 (E4, E7) im Wildtyp-Allel und fügt eine fremde DNA-Sequenz (Neo-LacZ-Kassette) in das Wildtyp-Allel ein, aus Berna-Erro [31].

Die so gewonnenen klonalen Stammzellen waren heterozygot für das STIM2-Allel ($STIM2^{+/-}$) und wurden anschließend in Blastozysten der C57BL/6 Mauslinie injiziert.

Die so gewonnenen chimären Mäuse wurden einmal mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt. Die nun für das STIM2-Allel heterozygoten Mäuse wurden untereinander gekreuzt um STIM2-K.O.-Mäuse (homozygot für das STIM2 Nullallel; $STIM2^{-/-}$) gemäß einer Mendel'schen Verteilung zu erhalten. Die Genotypen der Mäuse wurden anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Southern Blot verifiziert [31].

Insgesamt wurden in unserer Studie 15 STIM2-defiziente Mäuse und 15 Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) untersucht.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 10-17 Wochen alt. Bei allen 30 Mäusen wurden eine Ruhe-EKG- sowie gleich anschließend eine Stress-EKG-Untersuchung durchgeführt. Zudem wurden bei fünf bzw. sechs K.O.- und bei je fünf Wildtyp-Mäusen eine telemetrische EKG-Untersuchung bzw. eine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt (s. Tab. 1).

	Anzahl	EKG	Telemetrie	EPU
STIM2-K.O.	15	15	5	6
Wildtyp	15	15	5	5
Gesamt	30	30	10	11

Tabelle 1: Anzahl der Tiere und durchgeführte Untersuchungen

Während dem Untersuchungszeitraum waren die Tiere im Tierstall der Universitätsklinik untergebracht, in dem eine konstante Temperatur von etwa 23°C bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 50 % herrschte. Die durch eine Beleuchtungsanlage kreierte Tages- und Nachtrhythmik betrug 12:12 Stunden. Die verwendeten Käfige entsprachen den Regularien durch die Tierschutzgesetze. Dabei wurden maximal sechs Tiere in einem Standardlaborkäfig mit Holzgranulatstreu gehalten. Die Mäuse hatten ständig freien Zugang zu Mausfutter sowie zu Wasser mittels einer Trinkflasche.

2.2 Elektrokardiogramm (EKG)

2.2.1 Präparation und Narkose der Tiere

Während der Ableitung des EKGs und der operativen Anbringung des Telemetrie-Radiotransmitters wurden die Mäuse mit Avertin narkotisiert. Zur Herstellung von

Avertin wurde eine 97%ige 2,2,2-Tribromethanol-Lösung zu einem 98%igen Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 1g:1ml hinzugefügt und mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt. Um eine 2,5%ige Avertinlösung zu erhalten, wurde dies noch im Verhältnis von 1:40 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Die jeweilige intraperitoneale Injektionsdosis betrug bei allen Versuchen 100µl pro 10g Körpergewicht. Bei dieser Dosis erfolgte die Respiration spontan.

2.2.2 Ruhe- und Stress- EKG

Die elektrokardiographische Untersuchung setzte sich aus einer EKG-Ableitung in Ruhe und einer Ableitung unter pharmakologischen Stress zusammen. Das Alter der Tiere betrug hierbei jeweils 10-11 Wochen.

Die Tiere wurden zuerst mit Avertin in oben genannter Dosierung anästhesiert. Anschließend erfolgte eine Fixation der Mäuse mit Klebestreifen auf einer Heizplatte (Föhr Medical Instruments), deren Temperatur mit Hilfe einer Rektalsonde so reguliert wurde, dass die Körpertemperatur bei 37° Celsius lag. Hiermit sollte eine Beeinflussung der Herzfrequenz und der kardialen Funktion durch eine Erniedrigung der Körpertemperatur vermieden werden [52-54]. Zur Ableitung der Herzströme an den Extremitäten nach Einthoven I und II wurden vier Wurzelkanalinstrumente aus der Dentalchirurgie (Vereinigte Dentalwerke) subkutan eingeführt und mit dem Verstärker sowie dem Datenerfassungsgerät (beide ADInstruments) über Koaxialkabel verbunden (s. Abb. 8 und 9).

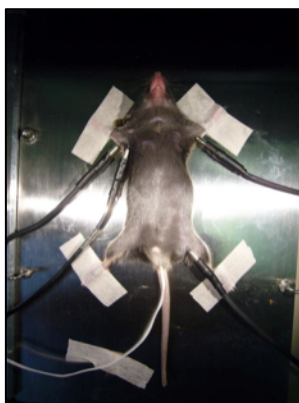
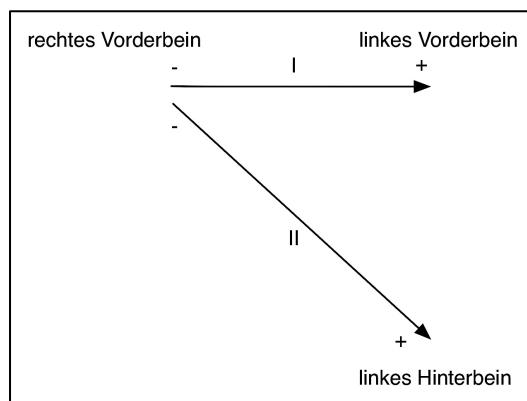


Abb. 8: Ableitung des EKGs an einer Maus, eigene Abb.



schematische Darstellung der Extremitätenableitungen I und II nach Einthoven, eigene Abb.

Zunächst wurde über zwei Minuten ein Ruhe-EKG aufgezeichnet. Die Datenspeicherung erfolgte mit Hilfe des Programms „Chart 5 für Windows“ (ADInstruments). Um im gleichen Versuchsaufbau ein Stress-EKG zu generieren, wurde den Tieren im Anschluss an das Ruhe-EKG Isoprenalin in einer Dosis von 1,5µg pro Gramm Körpergewicht injiziert. Die folgenden fünf Minuten wurden die Auswirkungen des Sympathomimetikums in einer EKG-Aufzeichnung registriert. Somit ergab sich eine Aufzeichnungszeit von 7 Minuten.

Um die Resultate aus dem Ruhe- mit dem Stress-EKG vergleichen zu können, wurde aus dem Stress-EKG ebenfalls eine Zeitspanne von zwei Minuten verwendet. Hierfür wurde die Zeitspanne zwischen Minute 4 und Minute 6 der Aufzeichnungszeit ausgewählt. Dadurch wurde nach der intraperitonealen Applikation des Sympathomimetikums eine Latenz von zwei Minuten gewährt, um eine entsprechende Anflutung und Wirkung des Medikaments zu gewährleisten. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet.

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies). Die Morphologie eines humanen EKGs unterscheidet sich deutlich von der eines murinen EKGs.

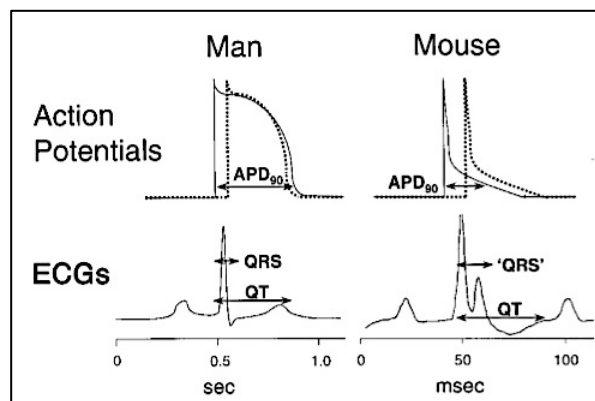


Abb. 10:

oben: Aktionspotentiale im Vergleich; durchgezogene Linie: Depolarisation der ersten Zellen im Ventrikel; gepunktete Linie: Depolarisation der letzten Zellen; APD₉₀: Zeit bis 90% der Zelle repolarisiert sind.

unten: Vergleich der EKGs; beachte: QRS-Komplex der Maus umfasst Depolarisation und frühe Phase der Repolarisation der Ventrikelzellen (Mensch: nur ventrikuläre Depolarisation)

aus London [55]

Daher wurde eine Datenbank mit Muster-EKGs erstellt, bei denen die Wellen, Strecken und Intervalle für diese Muster-Datenbank nach der Vorlage von London [55] manuell definiert (s. Abb. 10) wurden. Diese Datenbank diente der Software als Vorlage zur automatisierten EKG-Auswertung.

Die Aufzeichnungen wurden zu Blöcken à 15 Sekunden zusammengefasst. Es ergaben sich somit aus dem Ruhe- und dem Stress-EKG je acht Blöcke, innerhalb welcher folgende Parameter bestimmt wurden:

Parameter	Kurzbeschreibung
HR in pro Minute	Heart rate; Herzfrequenz
RR-Intervall in ms	Zeitdauer zwischen zwei aufeinanderfolgenden R-Zacken
Pdur in ms	Zeitdauer der P-Welle
PP-Zeit in ms	Zeitdauer zwischen zwei aufeinanderfolgenden P-Wellen
PR-Zeit in ms	Zeitdauer zwischen Beginn der P-Welle und der R-Zacke
QRS-Zeit in ms	Zeitdauer des QRS-Komplexes
QT-Zeit in ms	Zeitdauer des QT-Intervalls
QT+-Zeit in ms	Zeitdauer zwischen Beginn der Q-Zacke und des Maximums der T-Welle

Tabelle 2: Parameter der EKG-Auswertung

Da die QT-Zeiten frequenzabhängig sind, wurden für sie mehrere Korrekturberechnungen vorgenommen. Die Korrekturen nach Bazett [56] und Friderica [57] wurden aus der Humanmedizin abgeleitet und sind Routine im klinischen Alltag. Die Korrektur nach Mitchell et al. ($QT_0 = QT_c(RR/100)^y$; [58]) wurde speziell für Mäuse entwickelt. Zur Berechnung letzterer wurde der natürliche Logarithmus der QT-Zeit ($\ln QT_0$) gegen den natürlichen Logarithmus des durch 100 dividierten RR-Intervalls ($\ln RR_0/100$) aufgetragen. Die daraus abgeleitete Regressionsgerade entspricht der Formel $\ln QT_0 = \ln QT_c + y \ln(RR_0/100)$. Der Schnittpunkt der y-Achse stimmt folglich mit dem natürlichen Logarithmus von QT_c überein. Die korrigierte QT-Zeit nach Mitchell errechnet sich somit aus der natürlichen Exponentialfunktion dieses Schnittpunktes ($QT_c = e^{\ln QT_c}$).

QT-Korrektur nach	Formel
Bazett [56]	$QT_c = QT_0 / (RR)^{1/2}$
Friderica [57]	$QT_c = QT_0 / (RR)^{1/3}$
Mitchell [58]	$QT_c = QT_0 / (RR_0 / 100)^y$

Tabelle 3: Korrekturformeln der QT-Zeit nach deren Erstbeschreiber

Anschließend wurde das arithmetische Mittel der jeweiligen Parameter aus den Auswertungsblöcken für die gesamte Versuchsgruppe errechnet und

2.2.3 Telemetrie

Um eine ambulante Langzeit-EKG-Analyse zu ermöglichen, wurde 10 Tieren (5 K.O.-Tiere, 5 WT-Tiere) ein Sendermodul (Data Sciences International) in steriler Technik implantiert, wie sie Kramer et al. erstmals beschrieben hat [59]. Die Tiere waren dabei 15 Wochen alt.

Nach einer intraperitonealen Anästhesie der Mäuse in o.g. Dosis folgte die Inzision in der Mittellinie. Ein implantierbarer 7,25g schwerer schnurloser Radiofrequenz-Transmitter (Data Sciences International) wurde intraperitoneal eingeführt, die Drähte mit den Elektroden subcutan in beiden Axillae der Mäuse eingelegt und mit Einzelknopfnähten fixiert (USP 6/0, metric 0,7). Dementsprechend wurde eine Ableitung I nach Einthoven erzielt (s. Abb. 11). Darauf folgte die Naht (USP 6/0, metric 0,7) der Inzision. Während des Eingriffes war die Maus, wie bereits oben gezeigt, mit Klebestreifen auf einer Temperatur-regulierten Wärmeplatte fixiert.

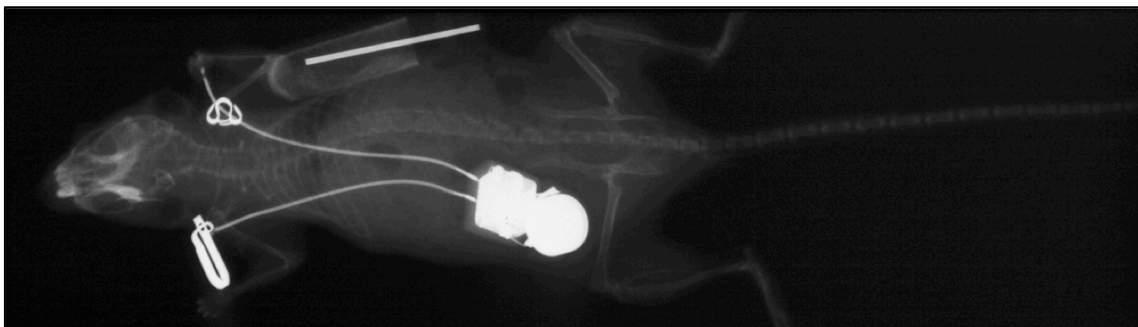


Abb. 11: Röntgen-Bild einer Maus mit eingebautem Radiotransmitter; zusätzlich ist oben noch eine osmotische Pumpe zu sehen, die jedoch in diesem Setting nicht implantiert wurde, eigene Abb.

Die Mäuse wurden einzeln in Tierkäfigen gehalten, unter welche der Receiver (Data Sciences International) platziert war (s. Abb. 12 und 13). Die Verbindung zum PC mit der Auswertungssoftware Dataquest A.R.T. Version 3.1 (Data Sciences International) wurde über eine „Data Exchange Matrix“ (Data Sciences International) hergestellt.

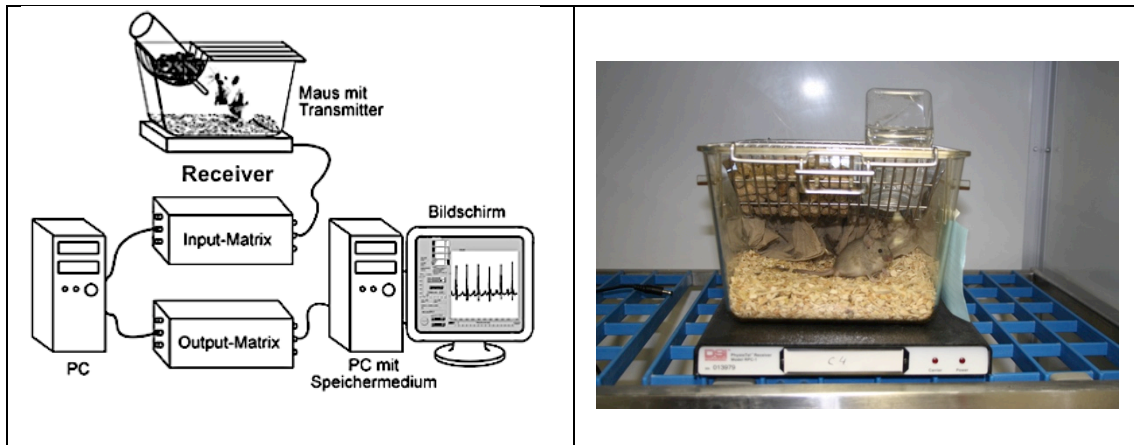


Abb. 12: schematischer Aufbau einer Telemetrie-Einheit, aus Liebig [60]

Abb. 13: Mausekäfig auf Receiver, eigene Abb.

Die Aufzeichnung begann vier bis sechs Tage nach der operativen Transmitterimplantation und erfolgte über 24h im Tierstall der Universitätsklinik Würzburg. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Transmitter explantiert.

Die Auswertung der Daten fand durch ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies) statt.

Hierzu wurde jeder QRS-Komplex detektiert und so genannte normal-to-normal(NN)-Intervalle gebildet. Das sind Intervalle von aufeinander folgenden QRS-Komplexen, die aus regulären Sinusknotendepolarisationen resultieren [61]. Hierbei wurden für jede Minute ab Aufzeichnungsbeginn Mittelwerte gebildet, welche für die Vergleiche von WT- und K.O.-Mäusen verwendet wurden. Die Herzfrequenz (Einheit: Schläge pro Minute) errechnet sich aus dem reziproken RR-Intervall (Einheit Millisekunden).

Zur Quantifizierung der Herzfrequenzvariabilität wurden die in Tabelle 4 genannten Parameter mit Hilfe der Software ECG Auto berechnet.

Paramter (Einheit)	Kurzbeschreibung
SDNN	Standardabweichung aller NN-Intervalle
RMSSD	Quadratwurzel der mittleren quadrierten Differenzen von sukzessiven NN-Intervallen
pNNx (%)	Anzahl der Paare benachbarter NN-Intervalle, die mehr als x Millisekunden voneinander abweichen, dividiert durch die totale Anzahl von NN-Intervallen; $x \in [-5;5]$
pNNabsx (%)	absolute Werte von x ohne Vorzeichen/Richtungsangabe; $x \in [1;5]$

Tabelle 4: Parameter der Analyse der Herzfrequenzvariabilität

Beim Menschen ist der pNN50-Wert Teil der Standardauswertung eines Langzeit-EKG. Eine signifikante Abweichung vom NN-Intervall, bezogen auf eine regelhafte Ruhefrequenz von 60-80/min (RR-Intervall von 750 – 1000ms), wird somit bei 50ms gesehen. Dies entspricht einer Abweichung von 5-6%.

Da die Ruheherzfrequenz von Mäusen bei etwa 600/min (RR-Intervall von 100ms) liegt, muss diese Abweichung absolut gesehen kürzer gewählt werden. Es wurden daher Abstände vom NN-Intervall in Höhe von 1-5ms gewählt und analysiert. Die Abweichungen wurden somit in einer Spanne von etwa 1-5% von einem NN-Intervall festgelegt.

Der ebenfalls bestimmte HRV-Triangle-Index stellt eine geometrische Berechnungsmethode der Herzfrequenzvariabilität.

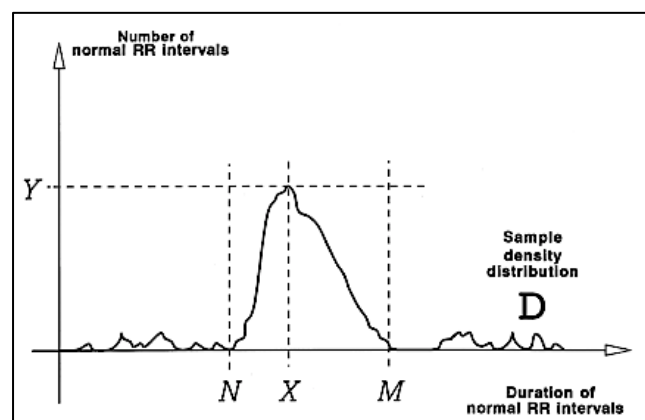


Abb. 14: HRV-Triangle-Index; x-Achse: Dauer normaler RR-Intervalle; y-Achse: Anzahl normaler RR-Intervalle; D: Dichteverteilung; X: häufigste NN-Intervalldauer; Y: Maximum der Dichteverteilung, $Y=D(X)$, aus Malik [61]

Dabei wird das Integral der Dichteverteilung (dies entspricht der Anzahl aller NN-Intervalle; siehe auch Abb. 14) durch das Maximum der Dichteverteilung (s. Abb. 14: Y) dividiert [61].

Anhand von Abb. 14 ausgedrückt: HRV-Triangle-Index = (Gesamtanzahl der NN-Intervalle)/Y

2.3 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Fast 40 Jahre nach deren Erstbeschreibung wurde die EPU mittels epikardialer Elektroden als Untersuchungsmethode bei Mäusen etabliert [62] und letztlich auch technisch bis zu einem mit dem aus der Humanmedizin vergleichbaren intravasalen Zugang weiterentwickelt [63, 64].

Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit bei 11 Tieren, davon sechs K.O.-Mäuse und fünf Wildtyp-Mäuse (s. Tab. 1), eingesetzt.

Hierfür wurden spezielle Stimulations-Protokolle für den Vorhof und die Kammer entwickelt, die von klinischen Stimulations-Protokollen aus der Humanmedizin abgeleitet wurden.

Die Aufzeichnung fand mit Chart 5 für Windows (ADInstruments) statt und die Auswertung erfolgte im Programm ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies). Die einzelnen Blöcke wurden dabei u.a. nach induzierten Arrhythmien untersucht.

2.3.1 Allgemeine Präparation

Vor jeder elektrophysiologischen Untersuchung wurde an den Mäusen eine kleine Operation durchgeführt um den Katheter intrakardial zu platzieren. Die ca. 17 Wochen alten Tiere waren dabei intubiert und volumenkontrolliert beatmet sowie mittels Oberflächen-EKG überwacht.

Im ersten Schritt wurden die Mäuse in einen geschlossenen Plastikbehälter gesetzt und über ein Schlauchsystem an einen Isofluran-Vaporisator angeschlossen (s. Abb. 15). Die inspiratorische Isofluran-Konzentration betrug hierbei 4%. Sobald das Tier ausreichend anästhesiert war, erfolgte die Fixation auf einer temperaturgeregelten Heizplatte.

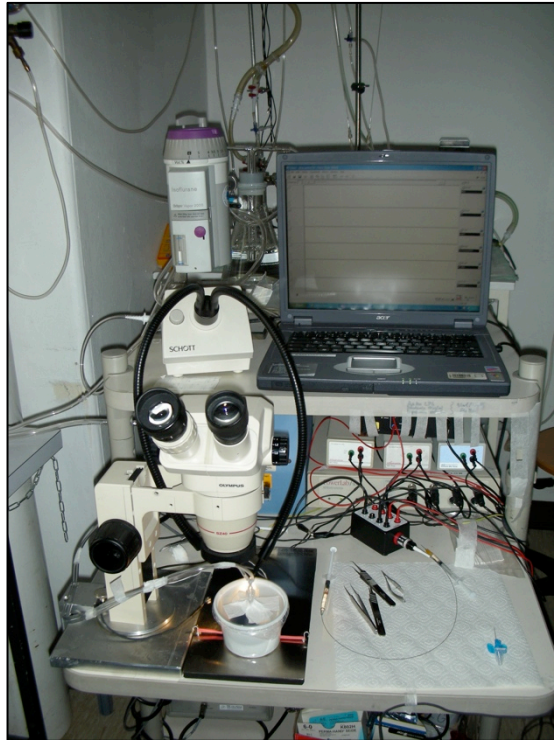


Abb. 15: EPU-Versuchsaufbau vor Intubation; Einleitung von Isofluran in den Plastikbehälter, eigene Abb.

Im zweiten Schritt erfolgte die Intubation. Zur Verbesserung der Sicht auf die Glottis wurde die Zunge mit einer Klemme gefasst und zu Seite geschoben. Daraufhin wurde eine Venenverweilkanüle in die Trachea als Tubus eingeführt. Nach Sicherstellung einer erfolgreichen Intubation und Fixation des Tubus begann die Beatmung mit einem inspiratorischen Isofluran-Anteil von 1,5% bei einer Atemfrequenz von 120/min und einem Atemzugsvolumen von 1ml (s. Abb. 16). Daraufhin erfolgten die Rasur des Halses und die Anbringung der EKG-Elektroden an den Extremitäten analog zum Versuchsaufbau zur EKG-Registrierung.

Nach großzügiger Desinfektion mit Kodan Spray wurde der Hals vorsichtig mit einer Mikroschere eröffnet und stumpf die rechte Vena jugularis freipräpariert. Nun wurden unter die Vene zwei Fäden (USP 8/0, metric 0,4) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Fäden wurde die Vene kranial vollständig ligiert und proximal eingeeengt. Zwischen den Ligaturen wurde die Vene der Länge nach inzidiert und über diesen Zugang der Katheter eingeführt (s. Abb. 17).

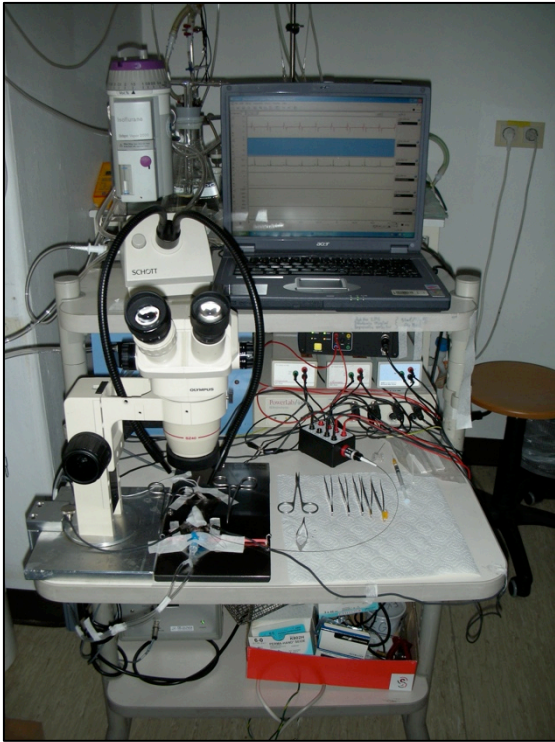


Abb. 16: Potentialableitung bei intubierter Maus, eigene Abb.



Abb. 17: Eingebrachter Katheter nach Präparation des Halses, eigene Abb.

Zur Lokalisationsbestimmung des Katheters dienten die Abgabe von elektrischen Impulsen und die simultane Beurteilung des abgeleiteten des Oberflächen-EKG. Erfolgte durch die Stimulation eine Vorhoferregung (P-Welle) bzw. eine Kammerdepolarisation (QRS-Komplex), so konnte eine Lage im Vorhof bzw. der Kammer bestätigt werden. Nach Durchführung aller Studienprotokolle folgte die Euthanasie.

2.3.2 Katheter und Voreinstellungen

Der Katheter (Scisense) besitzt acht Pole (octapolar) mit einem Interelektrodenabstand von 0,5mm (s. Abb. 18). Somit ist es möglich über die proximalen Elektroden Potentiale im rechten Atrium per Stimulation zu generieren, als auch diese über die distaler gelegenen Elektroden simultan in Vorhof und Kammer zu registrieren.

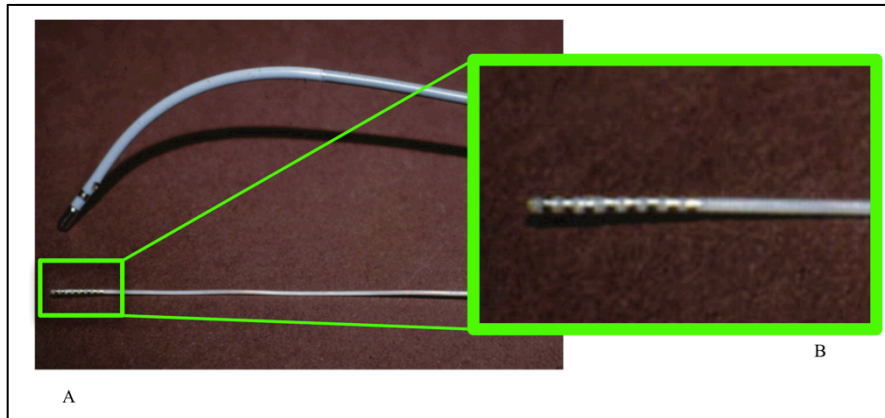


Abb. 18: A: Katheter im Größenvergleich, oben: Katheter in der Humanmedizin, unten: Maus-Katheter; B: Vergrößerung der Elektroden, modifiziert nach Berul [65]

Der BioAmp-Verstärker zeichnete die Signale der Elektroden in einem Frequenzbereich von 0,3 bis 500Hz ab einem Ausschlag von 2mV auf. Lediglich die Frequenz von 50Hz wurde aus diesem Bereich herausgefiltert, um Störungen aus dem Stromnetz zu vermeiden.

Jeder Stimulus wurde mit einer Spannung von 1000mV über eine Impulsdauer von 500 μ s durchgeführt. Das Intervall bezeichnet die Zeitdauer zwischen zwei Stimuli.

2.3.3 Stimulationsprotokolle

2.3.3.1 Stimulation des rechten Vorhofes

Die Vorhofstimulation diente der Verifizierung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Sinusknotens und des AV-Knotens.

Sinusknotenerholzeit

Durch intrakardiale Ableitung aus dem Vorhof in Ruhe wurde die Basiszykluslänge des Sinusknotens bestimmt. Diese entspricht im Allgemeinen dem Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden P-Wellen. Dazu erfolgte die Mittelwertbestimmung aus 10 manuell durchgeführten Messungen der Basiszykluslänge mittels des Programms ECG Auto Version 2.5.0.3 (emka Technologies).

Um eventuelle Funktionsstörungen des Sinusknoten zu identifizieren, wurde die Sinusknotenerholzeit (SNRT, sinus node recovery time) ermittelt. Hierzu wurde eine Over-

drive-Stimulation des Vorhofes durchgeführt, die knapp über der Eigenfrequenz des Sinusknotens lag. Die Zeitspanne zwischen dem letzten Stimulus und dem Einsetzen des Spontanrhythmus spiegelt die SNRT wider. Um die Abhängigkeit der SNRT von der spontanen, durch das autonome Nervensystem regulierten, Sinusfrequenz zu berücksichtigen, wurde die korrigierte Sinusknotenerholzeit (cSNRT, corrected SNRT) verwendet, die sich aus der SNRT abzüglich der Basiszykluslänge (s. Abb. 19) ergibt [66].

Das verwendete Stimulationsprotokoll bestand aus drei Stimulationsblöcken à 10 Sekunden Dauer mit je 10 Sekunden Pause zwischen den Blöcken. Die Dauer der Intervalle betrug 100ms, 85ms sowie 75ms. Die Anzahl der Stimuli pro Stimulationsblock ergibt sich somit aus der Formel $10000\text{ms}/\text{Intervalldauer}$.

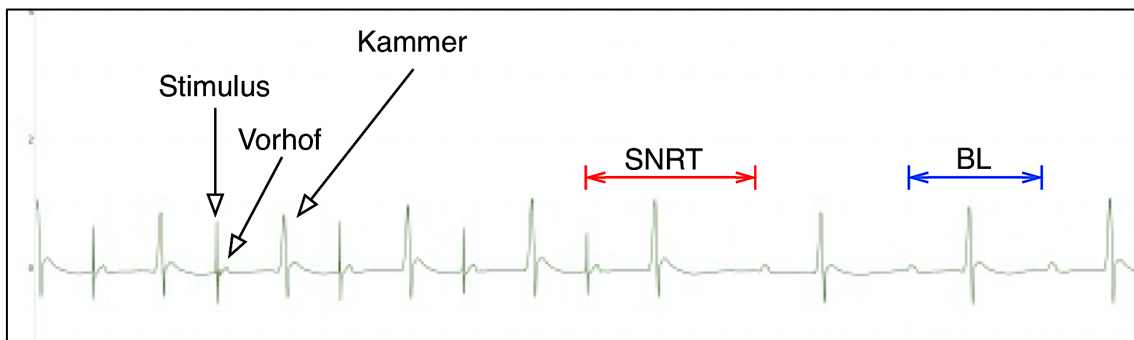


Abb. 19: Screenshot aus Chart-Software, Stimulus sowie Vorhof- und Kammerpotential, rot: SNRT für Sinusknotenerholzeit, blau: BL für Basiszykluslänge, eigene Abb.

Bestimmung des Wenckebach-Punktes

Mittels einer EPU lässt sich die Physiologie der AV-Überleitung verifizieren. Der AV-Knoten fungiert als Pfortner und kann so die Weiterleitung des elektrischen Impulses auf den Vorhof verzögern oder gar blockieren, sollte der Vorhof beispielsweise unkontrolliert flimmern. Diese Funktion kann jedoch auch pathologisch verstärkt sein, so dass eine normale Überleitung verzögert oder komplett inhibiert wird. Man spricht dann von einem AV-Block, der in drei verschiedene Grade eingeteilt wird:

AV-Block I°:

Atrioventrikuläre Überleitung jeder Sinusknotendepolarisation, bei jedoch prolongiertem PQ-Intervall.

AV-Block II°:

Ausfall der atrioventrikulären Überleitung einzelner Sinusknotendepolarisationen:

- *II a (Wenckebach-Block, Mobitz Typ I):*
Ausfall der atrioventrikulären Überleitung nach einer von Schlag zu Schlag progressiven Verlängerung des PQ-Intervalls.
- *II b (Mobitz-Block, Mobitz Block Typ II):*
Bei konstantem PQ-Intervall kommt es einer regelmäßigen Rhythmik folgend zu Ausfällen der atrioventrikulären Überleitung. Die Überleitung kann beispielsweise im festen 2:1 Rhythmus verlaufen.

AV-Block III°:

Kompletter Ausfall der atrioventrikulären Überleitung.

Blockierungen oberhalb des His-Bündels manifestieren sich meist als AV-Block I° oder II° a. Weiter distal liegende Pathologien führen dagegen größtenteils zu höhergradigen AV-Blöcken [67-69].

Im vorliegenden Experiment wurde ein sogenannter Wenckebach-Test durchgeführt. Dabei wurde der Katheter im Vorhof platziert und dieser stimuliert. Die Stimulationen erfolgten zu Beginn mit einem Intervall von 100ms. Nach einem Block von jeweils 30 Stimuli wurde das Intervall von Block zu Block um jeweils 2ms reduziert bis eine Intervalldauer von 50ms erreicht wurde. Die Blöcke wurden kontinuierlich ohne Zwischenpause durchgeführt.

Mit abnehmender Länge der Stimulationsintervalle resultierte dabei ein AV-Block vom Typ Wenckebach. Das letzte stimulierte Intervall, bei dem eine atrioventrikuläre Überleitung noch erfolgte, bezeichnet den Wenckebach-Punkt [68] (s. Abb. 20).



Abb. 20: Bestimmung des Wenckebachpunkts; modifizierter Screenshot aus Chart, eigene Abb.

Programmierte Vorhofstimulation (PVS)

Ziel der programmierten Vorhofstimulation war es supraventrikuläre Rhythmusstörungen zu induzieren.

Dabei wurde in einem Grundintervall stimuliert, das von der Herzfrequenz der Mäuse abhängig war. Das vorgegebene und stimulierte Grundintervall war jeweils kleiner als die Herzzykluslänge im Spontanrhythmus der Tiere. Vereinfacht lässt sich sagen: Je kürzer das Intervall desto aggressiver ist die Stimulation und desto wahrscheinlicher ist es Arrhythmien auszulösen. Um dies noch zu verstärken wurden zusätzlich zu einer Stimulation in einem festen Grundintervall weitere Protokolle mit alternierenden Stimuli entwickelt und angewandt.

S1-Protokolle:

Bei einem S1-Protokoll (s. Abb. 21) fand eine vorzeitige Ankopplung des letzten Stimulus statt. Beispielsweise erfolgten im ersten Stimulationsblock bei einem Grundintervall von 100ms 31 Stimuli. Im zweiten Block wurde der letzte Stimulus, der S1-Stimulus, nach einem Intervall von 95ms, also 5ms früher angekoppelt. Dies wurde bis zu einem S1-Intervall von 25ms fortgesetzt. Dieses Verfahren fand auch bei Grundintervallen von 85ms bzw. 75ms Anwendung.

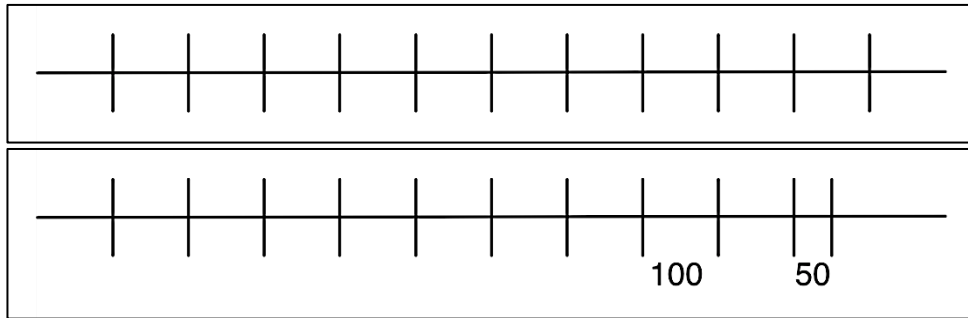


Abb. 21: schematischer Vergleich von Grundintervall mit S1-Protokoll; *oben*: Grundintervall mit 100ms, *unten*: S1-Protokoll „100“ mit einem Grundintervall von 100ms, letzter Stimulus (S1) mit einem S1-Intervall von 50ms, eigene Abb.

S2-Protokoll:

Bei den S2-Protokollen kam es zu einer Variation des vorletzten und des letzten Intervalls. Dabei wurde nach dem S1-Stimulus ein weiterer vorgezogener Stimulus (S2) gesetzt. Beide Intervalle wurden voneinander unabhängig verändert, wobei pro Protokoll das S1-Intervall kürzer als das Grundintervall sowie konstant war und nur das S2-Intervall variiert wurde. Dies sah beispielsweise bei dem „100+50“-Protokoll folgendermaßen aus: Grundintervall mit 100ms, S1 nach 50ms. S2 entsprach bei jedem Protokoll zunächst wieder dem Grundintervall und wurde in Schritten von 5ms bis auf 25ms reduziert (s. auch Abb. 22).

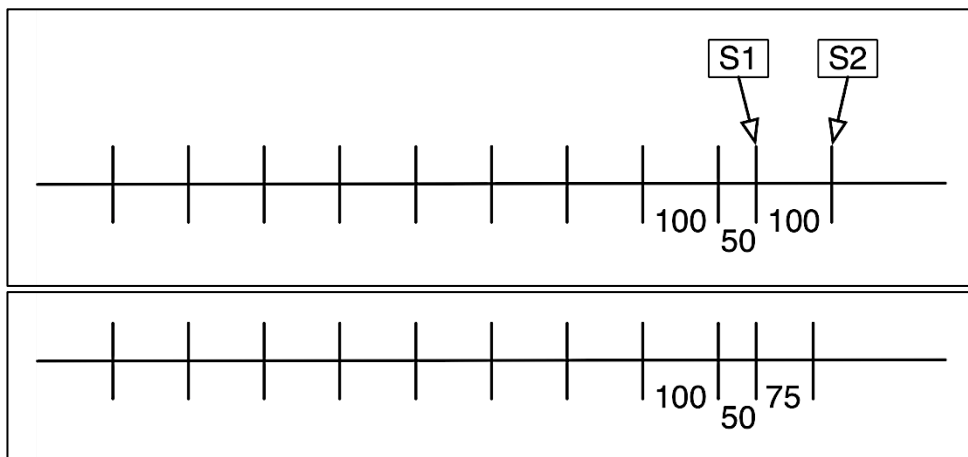


Abb. 22: schematische Darstellung des S2-Protokolls „100+50“: *oben* fixes S1-Intervall von 50ms, S2-Intervall von 100ms (= Grundintervall) zu Beginn; *unten*: S2-Intervall auf 75ms reduziert, S1- und Grundintervall weiterhin unverändert, eigene Abb.

Es wurden insgesamt folgende Protokolle angewandt und wie folgt benannt: Im Schema „a+b“ steht a für die Dauer des Grundintervalls in Millisekunden (ms) und b für die Dauer des S1-Intervalls in Millisekunden. Das S1-Intervall wurde um jeweils 5ms bis auf die in Tabelle 3 angegebenen Endwerte (b_x) reduziert.

	100+b	85+b	75+b
b_1	90	80	70
b_2	85	75	65
...
b_x	45	45	40

Tabelle 5: Nomenklatur der S2-Protokolle der elektrophysiologischen Untersuchungen für die Grundintervalle 100ms, 85ms und 75ms, b_1 : längstes S1-Intervall, b_x : kürzestes S1-Intervall

Ein Stimulationsblock bestand aus 31 Stimulationen (29 x Grundintervall, S1, S2). Zwischen den Blöcken bestand eine stimulationsfreie Zeit von 10 Sekunden.

S3-Protokoll:

In Analogie zum Grundprinzip der S2-Protokolle bestand ein S3-Protokoll aus einem Grundintervall mit anschließend fix gewählten S1- und S2-Intervallen, die jedoch kürzer als das Grundintervall waren und einem letzten vorgezogenen Stimulus (S3) mit variablem Intervall. Das S3-Intervall begann pro Protokoll erneut mit der Länge des Grundintervalls und wurde analog zu den S2-Protokollen sukzessive um 5ms bis auf 25ms reduziert (s. a. Abb. 23)

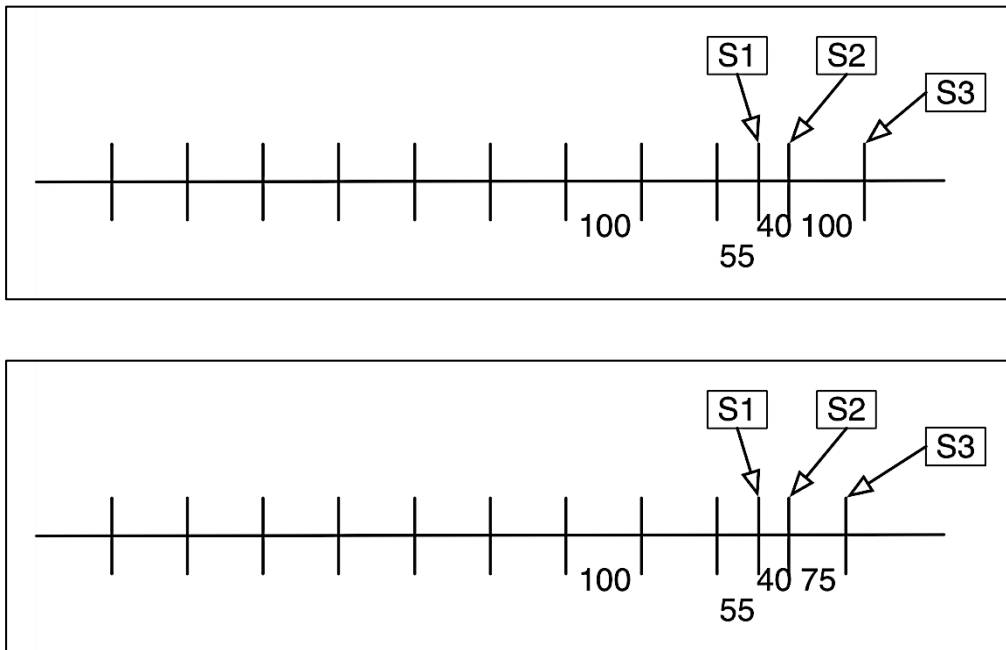


Abb. 23: schematischer Auszug aus dem S3-Protokoll „100+55+40“: *oben* fixes S1-Intervall von 55ms, fixes S2-Intervall von 40ms, S3-Intervall von 100ms(= Grundintervall) zu Beginn; *unten*: S3-Intervall auf 75ms reduziert; Grund-, S1- sowie S2-Intervall weiterhin unverändert, eigene Abb.

Die genauen Protokolle wurden folgendermaßen zusammengestellt: Beschriftung mit „a+b+c“, wobei a erneut für das Grundintervall steht, b für das S1-Intervall und c für das S2-Intervall. Die Einheit ist jeweils Millisekunden (ms).

Grundintervall 100ms:

	100+85	100+80	100+75	100+70	100+65	100+60	100+55	100+50	100+45
	+c	+c	+c	+c	+c	+c	+c	+c	+c
c ₁	75	70	80	85	90	60	60	45	35
c ₂			70	70	70	55	55	40	
c ₃					65		50		
...
c _x	75	70	70	60	50	55	40	40	35

Tabelle 6: S3-Protokolle mit einem Grundintervall von 100ms; c₁ längstes S3-Intervall, c_x: kürzestes S3-Intervall

Grundintervall 85ms

	85+80+c	85+75+c	85+70+c	85+65+c	85+60+c	85+55+c	85+50+c	85+45+c
c_1	75	80	70	60	65	55	60	40
c_2		75	65		60	45	50	
c_3		70	60		55		40	
...
c_x	75	60	60	60	50	45	40	40

Tabelle 7: S3-Protokolle mit einem Grundintervall von 85ms; c_1 längstes S3-Intervall, c_x : kürzestes S3-Intervall

Grundintervall 75ms:

	75+70+c	75+65+c	75+60+c	75+55+c	75+50+c	75+45+c
c_1	70	65	60	55	50	45
...
c_x	70	65	50	55	50	40

Tabelle 8: S3-Protokolle mit einem Grundintervall von 75ms; c_1 längstes S3-Intervall, c_x : kürzestes S3-Intervall

Ein Stimulationsblock setzte sich bei den S3-Protokollen aus 32 Stimuli (29x Grundintervall, S1, S2, S3) zusammen. Zwischen den einzelnen Blöcken wurde eine Pause von 10 Sekunden festgelegt.

Atrialer Burst

Neben der PVS wurde im Vorhof eine atriale Burst-Stimulation durchgeführt, deren Indikation ebenfalls die Induktion von Arrhythmien darstellte. Dabei fand lediglich die Stimulation mit einem Grundintervall Anwendung. Die einzelnen Stimulationsblöcke waren im Vergleich zur PVS mit einer Dauer von fünf Sekunden deutlich länger. Beginnend mit einem Intervall von 50ms und 100 Stimulationen, wurden ebenfalls Blöcke mit den Intervallen 33ms, 25ms und 20ms und 125, 200 bzw. 250 Stimulationen verwendet. Die Pause zwischen den Blöcken wurde mit 15 Sekunden definiert.

2.3.3.2 Stimulation der rechten Kammer

Die Programme unterschieden sich nicht von denen des Vorhofs. Der Ort der Stimulation lag lediglich in der Kammer.

Programmierte Kammerstimulation (PKS)

Ziel war hierbei die Induktion von ventrikulären Arrhythmien. Die verwendeten Protokolle entsprachen denen der oben beschriebenen programmierten Vorhofstimulation.

Kammerstimulationstest

Dieses Programm war ähnlich der atrialen Burst-Stimulation aufgebaut. Ausgangspunkt war ein Grundintervall von 50ms, welches sukzessive um 5ms bis auf 20ms reduziert wurde. Ein Block bestand aus 15 Stimuli gefolgt von einer Pause von 10 Sekunden.

2.4 Statistik

Zur statistischen Datenauswertung und -darstellung dienten die Programme „Microsoft Excel“ in den Versionen 2007, 2010 und 2011 sowie IBM SPSS Statistics Version 19.

Für alle Versuche galt folgende Nullhypothese:

Zwischen den erhobenen Parametern der Wildtyp-Tiere und der Knockout-Tiere besteht kein Unterschied.

Die Alternativhypothese lautete:

Zwischen den erhobenen Parametern ist ein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren festzustellen.

Es wurde für jeden Parameter das arithmetische Mittel für die Gruppe der Wildtyp-Mäuse und ebenso für die Gruppe der K.O.-Mäuse in Excel berechnet.

Die Vergleiche der Mittelwerte anhand des Student T-Tests fanden mit dem Programm SPSS Statistics statt. Dabei wurde von einem Mittelwertvergleich bei unabhängigen Stichproben ausgegangen. Mit Hilfe des standardmäßig durchgeführten Levene-Tests wurden die Varianzen auf ihre Gleichheit geprüft und dementsprechend die Resultate der T-Teste für homogene bzw. heterogene Varianzen verwendet. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert, P-Werte $<0,01$ als hoch signifikant.

3. Resultate

3.1 Elektrokardiogramm

3.1.1 Ruhe- und Stress-EKG

Es wurden 15 STIM2-K.O.-Mäuse und 15 Wildtyp-Mäuse mittels Ruhe- und Stress-EKG untersucht und die Daten miteinander verglichen (s. Abb. 24).

Die Resultate der Ruhe-EKG-Aufzeichnungen sind in unten stehender Tabelle zusammengefasst:

Ruhe-EKG			
	Wildtyp	STIM2-K.O.	p-Werte
Anzahl n	15	15	
HR in pro Minute	<i>551,98±2,10**</i>	<i>526,25±2,23**</i>	<i>1,1x10⁻¹²**</i>
RR-Intervall in ms	<i>109,44±0,35**</i>	<i>117,81±0,48**</i>	<i>7,8x10⁻¹⁵**</i>
Pdur in ms	<i>14,61±0,11*</i>	<i>14,76±0,12*</i>	<i>0,023*</i>
PP-Zeit in ms	<i>109,44±0,47**</i>	<i>117,63±0,53**</i>	<i>1,3x10⁻¹⁴**</i>
PR-Zeit in ms	<i>36,97±0,24**</i>	<i>39,83±0,09**</i>	<i>1,5x10⁻¹⁰**</i>
QRS-Zeit in ms	<i>12,51±0,02**</i>	<i>12,14±0,08**</i>	<i>1,8x10⁻⁶**</i>
QT-Zeit in ms	<i>37,57±0,35**</i>	<i>38,86±0,59**</i>	<i>1,3x10⁻⁴**</i>
QT+-Zeit in ms	<i>23,04±0,29**</i>	<i>25,63±0,42**</i>	<i>7,9x10⁻¹⁰**</i>
QTc nach Bazett	113,51±0,97	113,83±1,46	0,61
QTc nach Friderica	<i>78,50±0,69*</i>	<i>79,48±1,08*</i>	<i>0,049*</i>
QTc nach Mitchell	34,43±8,79	47,26±24,27	0,067

Tabelle 9: Ergebnisse der Ruhe-EKG-Messungen beider Serien; Parameter als Mittelwerte ± Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01

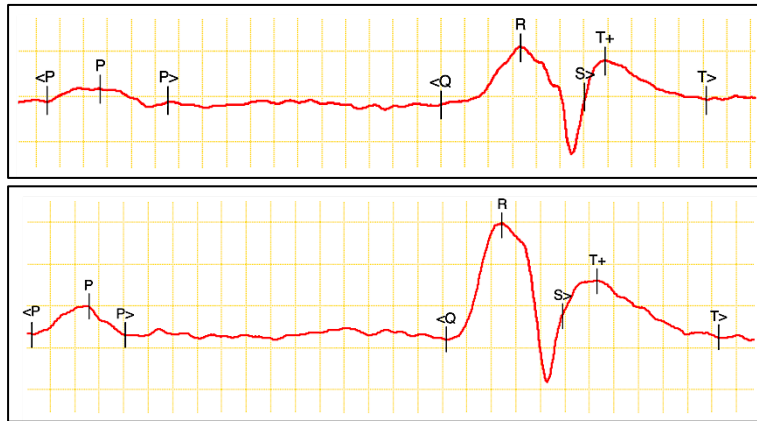


Abb. 24: Exemplarischer Vergleich eines Ruhe-EKGs einer Wildtyp-Maus (oben) und einer Knockout-Maus (unten); modifizierter Screenshot aus Chart, eigene Abb.

Wie aus obiger Tabelle 9 zu entnehmen ist, war die mittlere Herzfrequenz der STIM2-defizienten Mäuse gegenüber den Wildtyp-Tieren leicht erniedrigt ($526,25 \pm 2,38$ vs. $551,98 \pm 2,10$ Schläge pro Minute, p-Wert: $1,1 \times 10^{-12}$).

Auch das PR-Intervall war bei den STIM2-K.O.-Mäusen mit $39,82 \pm 0,09$ ms länger als das der Wildtyp-Tiere mit $36,97 \pm 0,24$ ms (statistisch hoch signifikant, p-Wert: $1,5 \times 10^{-10}$).

Die QRS-Dauer der STIM2-defizienten Mäuse war gegenüber den Wildtyp-Tieren reduziert, die absolute QT-Zeit sowie die Auswertung der QT+-Zeit zeigte bei den Knockout-Tieren jedoch eine hoch signifikante Verlängerung.

Bei der korrigierten QT-Zeit nach Bazett wurde im Ruhe-EKG bei Werten von $113,51 \pm 0,96$ ms bei den Wildtyp-Tieren sowie von $113,83 \pm 1,46$ ms in der Knockout-Gruppe kein statistisch signifikanter (p-Wert: 0,61) Unterschied verzeichnet.

Die Korrektur der QT-Zeit nach Friderica zeigte sich dagegen bei den K.O.-Mäusen mit einem p-Wert von 0,049 statistisch signifikant verlängert (s. Tab. 9).

Bei den Resultaten der Mitchell-Analyse wurden bei den Wildtyp- als auch bei den Knockout-Tieren der Maximal- und der Minimalwert gestrichen und anschließend die Mittelwerte berechnet. Im Ruhe EKG zeigte dabei die nach Mitchell angewandte Frequenzkorrektur der QT-Zeit eine statistisch nicht signifikante Verlängerung bei den STIM2-K.O.-Mäusen.

Bei allen aufgezeichneten EKG-Ableitungen in Ruhe wurden keine Arrhythmien im manuellen Screening detektiert.

In der folgenden Tabelle 10 sind die Werte aus den Stress-EKGs verzeichnet (s.a. Abb. 25).

Stress-EKG

	Wildtyp	STIM2-K.O.	p-Werte
Anzahl n	15	15	
HR in pro Minute	637,62±1,90	639,14±1,26	0,072
RR-Intervall in ms	94,26±0,29	94,09±0,14	0,16
Pdur in ms	15,42±0,25**	16,41±0,16**	1,8x10 ⁻⁷ **
PP-Zeit in ms	94,29±0,40	94,16±0,21	0,43
PR-Zeit in ms	34,38±0,14**	36,45±0,14**	4,5x10 ⁻¹⁴ **
QRS-Zeit in ms	13,53±0,11**	12,64±0,16**	3,7x10 ⁻⁹ **
QT-Zeit in ms	37,08±0,49**	42,74±0,49**	1,6x10 ⁻¹² **
QT+-Zeit in ms	22,64±0,22**	25,56±0,35**	9,9x10 ⁻¹² **
QTc nach Bazett	120,80±1,71**	139,59±1,73**	3,3x10 ⁻¹² **
QTc nach Friderica	81,48±1,13**	94,08±1,38**	2,6x10 ⁻¹² **
QTc nach Mitchell	41,20±10,09	40,79±14,33	0,93

Tabelle 10: Ergebnisse der Stress-EKG-Messungen beider Serien; Parameter als Mittelwerte ± Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei p<0,05; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei p<0,01

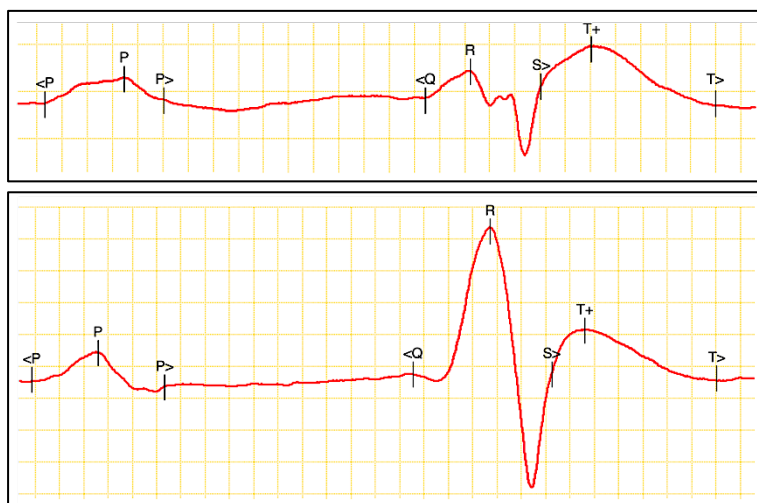


Abb. 25: Exemplarischer Vergleich eines Stress-EKGs einer Wildtyp-Maus (oben) und einer Knockout-Maus (unten); modifizierte Screenshots aus Chart, eigene Abb.

Im Vergleich zum Ruhe-EKG lässt sich festhalten, dass die mittlere Herzfrequenz in beiden Gruppen hoch signifikant, im Mittel um 85,63 bzw. 112,89 Schläge pro Minute, angestiegen ist und die Werte sich deutlich annäherten. So ergab sich, im Gegensatz zum Ruhe-EKG, kein signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,071) zwischen den Gruppen (s. Abb. 26).

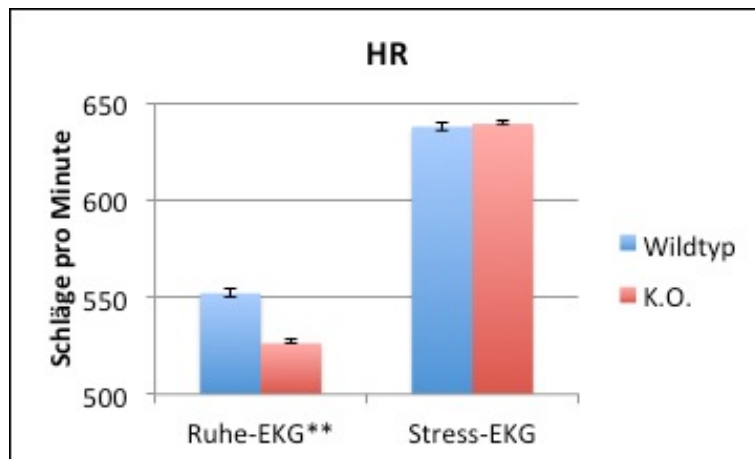


Abb. 26: Herzfrequenz-Werte in Schläge pro Minute als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

In Analogie zur Herzfrequenz glichen sich die mittleren Längen der RR-Intervalle der beiden Gruppen im Stress-EKG zunehmend, auf $94,26 \pm 0,28$ ms bei den Wildtyp-Tieren und $94,09 \pm 0,14$ ms bei den STIM2-K.O.-Tieren, an (s. Abb. 28). Damit bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,17). Ebenso konnte in beiden Gruppen eine hoch signifikante Verkürzung (p-Werte: WT: $4,5 \times 10^{-21}$ und K.O.: $3,5 \times 10^{-23}$) der Dauer der RR-Intervalle, verglichen zum Ruhe-EKG, registriert werden (s. Tab. 9 und 10).

Bei der Pdur-Zeit konnte eine weitere Divergenz der mittleren Dauer festgestellt werden. Die längere Dauer von $16,41 \pm 0,16$ ms bei der K.O.-Gruppe wich im Stress-EKG hoch signifikant (p-Wert: $1,9 \times 10^{-7}$) von der Wildtyp-Gruppe ($14,61 \pm 0,11$ ms) ab. In beiden Gruppen verlängerte sich die Dauer der P-Welle nach Gabe des Sympathomimetikums im Vergleich zur Aufzeichnung in Ruhe hoch signifikant (p-Werte: WT: $9,3 \times 10^{-7}$ und K.O.: $1,3 \times 10^{-12}$).

Das PR-Intervall unterschied sich im Stress-EKG zwischen den Gruppen ebenso hoch signifikant (p -Wert: $4,9 \times 10^{-14}$; s. Tab. 10 und Abb. 27) wie unter Ruhe-Bedingungen. Zudem verkürzte es sich hoch signifikant durch die Gabe von Isoprenalin im Vergleich zur Ruhe innerhalb beider Gruppen (p -Wert für WT: $1,8 \times 10^{-11}$ und für K.O.: $1,5 \times 10^{-11}$).

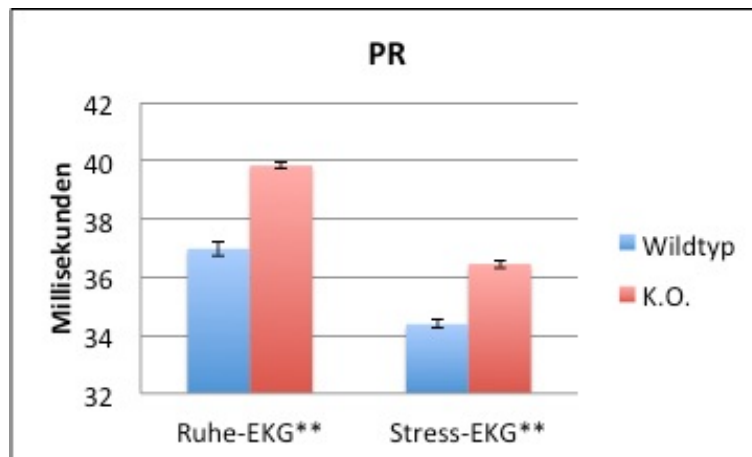


Abb. 27: PR-Werte in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Das QRS-Intervall der Knockout-Tiere zeigte im Stress-EKG mit $12,64 \pm 0,16$ ms eine noch größere Abweichung zur Kontrollgruppe ($13,53 \pm 0,11$ ms) als in der Ruhe-Ableitung (s. Tab. 9 und 10; s. Abb. 28). Beide Gruppen unterschieden sich dabei mit einem p -Wert von $3,50 \times 10^{-9}$ hoch signifikant. Bei den Wildtyp- (p -Wert: $1,5 \times 10^{-8}$) sowie bei den K.O.-Mäusen (p -Wert: $1,5 \times 10^{-5}$) konnte zudem eine statistisch hoch signifikante Verlängerung der QRS-Dauer im Stress-EKG, verglichen zum Ruhe-EKG, registriert werden.

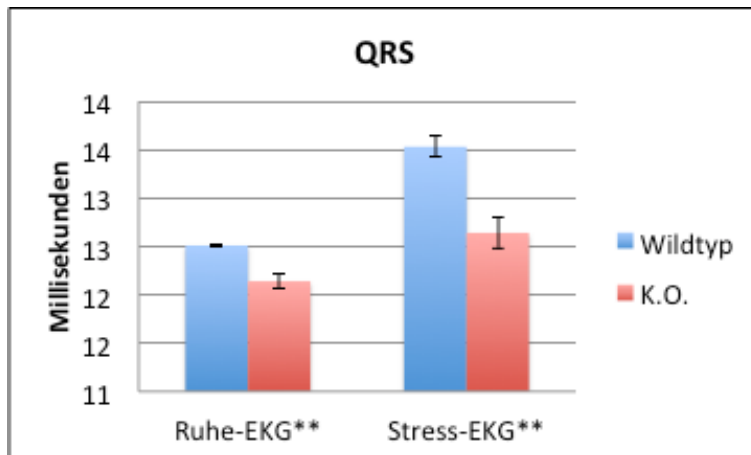


Abb. 28: QRS-Werte in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Die QT-Zeit der STIM2-defizienten Mäuse manifestierte sich im Stress-EKG mit $42,74 \pm 0,49$ ms gegenüber $37,07 \pm 0,49$ ms statistisch hoch signifikant prolongiert (p-Wert: $1,6 \times 10^{-12}$). Die Unterschiede wurden im Vergleich zum Ruhe-EKG deutlich ausgeprägter (s. Abb. 29). In der Gruppe der Wildtyp-Tiere verkürzte sich die Dauer des Intervalls im Stress-EKG im Vergleich zum Ruhe-EKG bei einem p-Wert von 0,035 statistisch signifikant. Dagegen zeigten die gentechnisch veränderten Tiere im Stress-EKG eine hoch signifikante Verlängerung (p-Wert: $1,0 \times 10^{-9}$) der QT-Zeit, wenn man die Zeit im Ruhe-EKG gegenüberstellt.

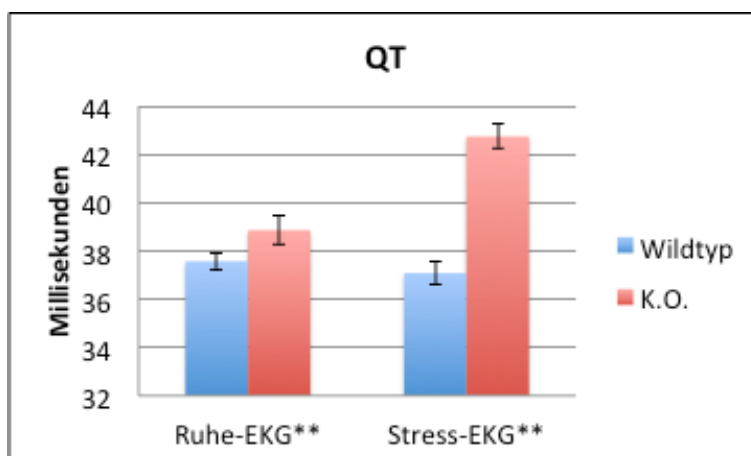


Abb. 29: QT-Werte in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Die QT+-Zeit ergab analog zum Ruhe-EKG eine statistisch hoch signifikante Verlängerung (p-Wert: $1,1 \times 10^{-11}$) bei den Knockout-Tieren gegenüber den Wildtyp - Mäusen ($25,56 \pm 0,35$ ms zu $22,64 \pm 0,22$ ms). In Relation zum Ruhe-EKG verkürzte sich dieser Parameter bei den Wildtyp-Tieren hoch signifikant (p-Wert: 0,0066), wohingegen bei den Knockout-Tieren keine statistisch signifikante Veränderung (p-Wert: 0,72) festzustellen war (s. Tab. 9 und 10).

Die korrigierte QT-Zeit nach Bazett der STIM2-defizienten Mäuse erwies sich mit einer Länge von $139,59 \pm 1,73$ ms (Wildtyp-Tiere: $120,80 \pm 1,71$ ms) konträr zum Ruhe-EKG hoch signifikant (p-Wert: $3,3 \times 10^{-12}$) prolongiert (s. Abb. 30). Bei den Daten aus dem Stress-EKG konnte zudem in beiden Gruppen eine (hoch) signifikante Verlängerung (p-Werte: Wt: $5,2 \times 10^{-8}$ bzw. K.O.: $1,6 \times 10^{-14}$) der QTc-Zeit nach Bazett in Relation zum Ruhe-EKG verzeichnet werden.

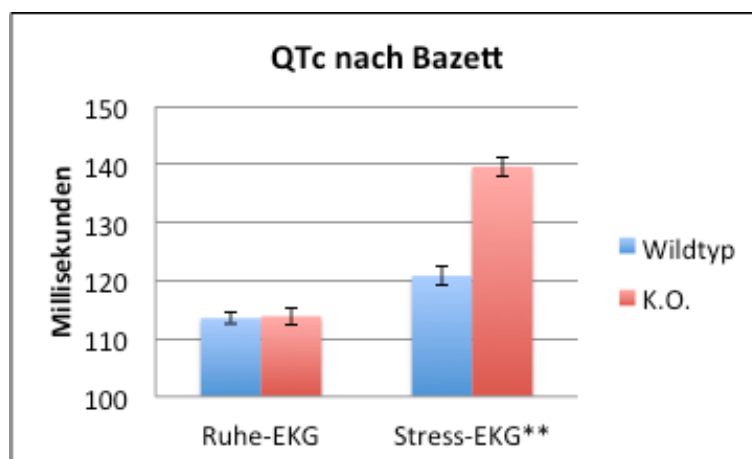


Abb. 30: QTc nach Bazett in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Die Korrektur der QT-Zeit nach Friderica zeigte sich bei den K.O.-Mäusen in Relation zur Wildtyp-Gruppe, analog zum Ruhe-EKG, statistisch hoch signifikant (p-Wert von $2,6 \times 10^{-13}$) verlängert (s. Tab. 10 und Abb. 32). Beim Vergleich Ruhe- zu Stress-EKG ergab sich für die Wildtypiere ein Anstieg (p-Wert: $1,8 \times 10^{-5}$) von 78,5ms auf 81,48ms (s. Tab. 9 und 10, Abb. 31). Das Untersuchungskollektiv der STIM2-defizienten Tiere zeigte einen Anstieg von 79,48ms auf 94,08ms, der sich mit einem p-Wert von $2,5 \times 10^{-13}$ ebenfalls als statistisch hoch signifikant erwies.

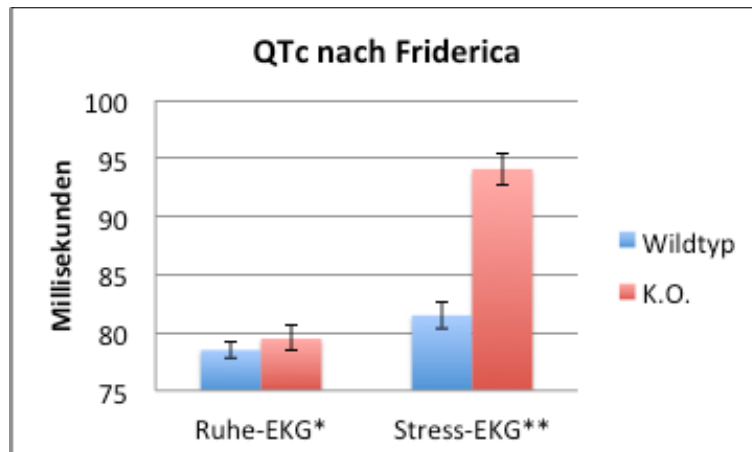


Abb. 31: QTc nach Friderica in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Nach Isoprenalin-Gabe waren die nach dem Vorschlag von Mitchell et al. [58] transformierten QT-Zeiten annähernd gleich lang (siehe Tab. 10 und Abb. 32). Vergleicht man die Werte innerhalb der Gruppen, so zeigt sich in der Gruppe der Wildtyp-Tiere ein nicht signifikanter Anstieg (p-Wert: 0,060) der QTc. Das Kollektiv der Knock-out-Mäuse zeigte konträr zu den Korrekturen nach Bazett und Friderica in der nach Mitchell korrigierten QT-Zeit eine statistisch nicht signifikante Verkürzung (p-Wert 0,42) im Stress-EKG, in Relation zum Ruhe-EKG.

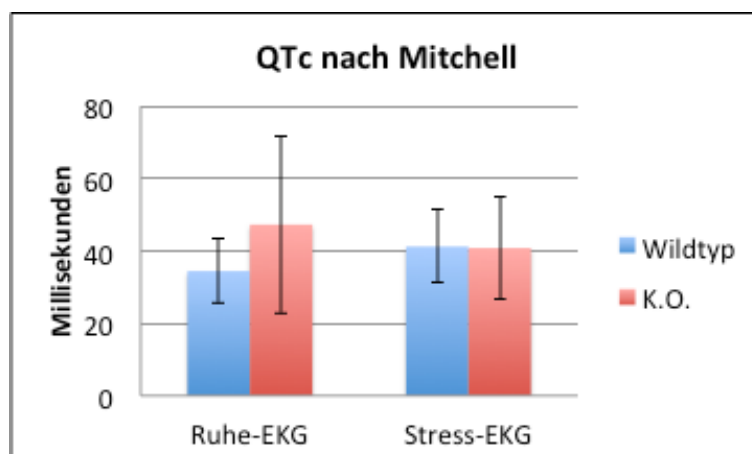


Abb. 32: QTc nach Mitchell in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Ebenso, wie bei den Aufzeichnungen in Ruhe, konnte bei der Auswertung der Daten des Stress-EKGs bei manuellen Screenings keine anhaltenden Arrhythmien gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Herzfrequenz bzw. das RR-Intervall der Knockout-Tiere in Ruhe signifikant reduziert bzw. verlängert waren. Im Stress-EKG waren diese Unterschiede jedoch nicht mehr statistisch signifikant nachweisbar. Ebenso verhielt es sich mit dem in Ruhe verlängerten PP-Intervall der STIM2-defizienten Tiere. Die korrigierte QT-Zeit nach Bazett der K.O.-Mäuse war hingegen lediglich im Stress-EKG signifikant verlängert. Alle anderen reduzierten bzw. prolongierten Parameter der STIM2-Knockout-Mäuse waren sowohl im Ruhe-EKG als auch im Stress-EKG signifikant unterschiedlich. Der Trend der jeweiligen Divergenz war dabei im Stress-EKG der gleiche wie im Ruhe-EKG. Alle in Ruhe statistisch signifikanten Divergenzen, außer jene des PR-Intervalls, wurden bei der EKG-Registrierung unter Stress-Bedingungen ausgeprägter. Die nach Mitchell korrigierten Werte der QT-Zeiten des STIM2-defizienten Kollektivs zeigten in Ruhe eine nicht signifikante Verlängerung. Im Stress-EKG dagegen zeigte sich eine Angleichung der Werte. Dies geschah analog zu dem in der Formel einbezogenen RR-Intervall.

3.1.2 Telemetrie

Es wurden je fünf Wildtyp und fünf STIM2-K.O.-Tiere telemetrisch untersucht. Alle Tiere überlebten die Aufnahmedauer von 24h und konnten so vollständig analysiert werden. Die Tabelle 11 spiegelt die Ergebnisse zusammengefasst wider.

Telemetrie: Auswertung über 24h

	Wildtyp	STIM2-K.O.	p-Werte
Anzahl n	5	5	
NN-Intervall in ms	131,96±6,23	133,98±2,51	0,53
SDNN in ms	20,60±6,37	23,85±3,54	0,35
RMSSD in ms	7,65±3,83	15,50±9,58	0,15
HRV Triangle Index	1,46±0,29	1,56±0,32	0,61
pNN+1 in %	25,83±4,27**	34,09±2,33**	0,0052**

pNN-1 in %	<i>29,88±5,33*</i>	<i>38,51±3,11*</i>	<i>0,014*</i>
pNNabs1 in %	<i>55,71±9,57**</i>	<i>72,60±5,28**</i>	<i>0,0086**</i>
pNN+2 in %	<i>18,81±5,08**</i>	<i>28,57±2,51**</i>	<i>0,0049**</i>
pNN-2 in %	<i>20,71±6,38*</i>	<i>31,79±3,79*</i>	<i>0,010*</i>
pNNabs2 in %	<i>39,52±11,43**</i>	<i>60,36±6,26**</i>	<i>0,0072**</i>
pNN+3 in %	<i>14,37±5,18**</i>	<i>24,40±2,76**</i>	<i>0,0051**</i>
pNN-3 in %	<i>14,97±6,50**</i>	<i>26,76±4,18**</i>	<i>0,0092**</i>
pNNabs3 in %	<i>29,35±11,66**</i>	<i>51,16±6,93**</i>	<i>0,0070**</i>
pNN+4 in %	<i>11,32±4,87**</i>	<i>21,06±3,03**</i>	<i>0,0053**</i>
pNN-4 in %	<i>11,19±5,95**</i>	<i>22,70±4,48**</i>	<i>0,0087**</i>
pNNabs4 in %	<i>22,52±10,82**</i>	<i>43,75±7,51**</i>	<i>0,0069**</i>
pNN+5 in %	<i>9,12±4,42**</i>	<i>18,28±3,30**</i>	<i>0,0059**</i>
pNN-5 in %	<i>8,58±5,17**</i>	<i>19,34±4,73**</i>	<i>0,0089**</i>
pNNabs5 in %	<i>17,70±9,58**</i>	<i>37,62±8,02**</i>	<i>0,0074**</i>

Tabelle 11: Ergebnisse der telemetrischen EKG-Untersuchung; Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$

Die mittlere Dauer eines NN-Intervalls zeigte zwischen den beiden Vergleichsgruppen Wildtyp- und Knockout-Maus mit $131,96 \pm 6,23$ zu $133,98 \pm 2,51$ keinen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,53).

Ebenso erwies sich die Standardabweichung aller NN-Intervalle (SDNN) der Wildtyp-Tiere ($20,60 \pm 6,37$) als nicht statistisch signifikant von dem Wert der K.O.-Gruppe ($23,85 \pm 3,54$) divergierend.

Der Mittelwerte der Gruppen für die Quadratwurzel aus den quadrierten Differenzen von aufeinanderfolgenden NN-Intervallen, der RMSSD-Wert, wichen ebenso nicht signifikant (p-Wert 0,15) voneinander ab.

Der Student T-Test für die errechneten Werte des HRV-Triangle-Index von $1,46 \pm 0,29$ (Wildtyp) und $1,56 \pm 0,32$ (K.O.) zeigte mit einem p-Wert von 0,61, dass die Differenz der Mittelwerte der Vergleichsgruppen nicht dem vorausgesetzten Signifikanzniveau entsprach.

Aus obiger Tabelle 11 wird zudem ersichtlich, dass die Anteile aller NN-Intervalle, deren Dauer sich von der mittleren Dauer eines NN-Intervalls zwischen einer und fünf Millisekunden unterscheidet, unabhängig von der Richtung der Abweichung bei den gentechnisch veränderten STIM2-defizienten Mäusen mindestens statistisch signifikant erhöht war.

Genauer betrachtet lieferte die Auswertung der pNN-Werte für die Abweichung um eine Millisekunde für pNN+1 (WT: $25,83 \pm 4,27$; K.O.: $34,09 \pm 2,33$; p-Wert: 0,0052) sowie für eine absolute Abweichung um eine Millisekunde (pNNabs1; WT: $55,71 \pm 9,57$; K.O.: $72,60 \pm 5,28$; p-Wert: 0,0086) jeweils eine statistisch hoch signifikante Erhöhung bei den STIM2-defizienten Tieren. Der jeweilige Anteil der NN-Intervalle, die mindestens eine Millisekunde kürzer als das mittlere NN-Intervall waren (pNN-1), war bei den K.O.-Mäusen signifikant erhöht. (s. Tab. 11 und Abb. 33).

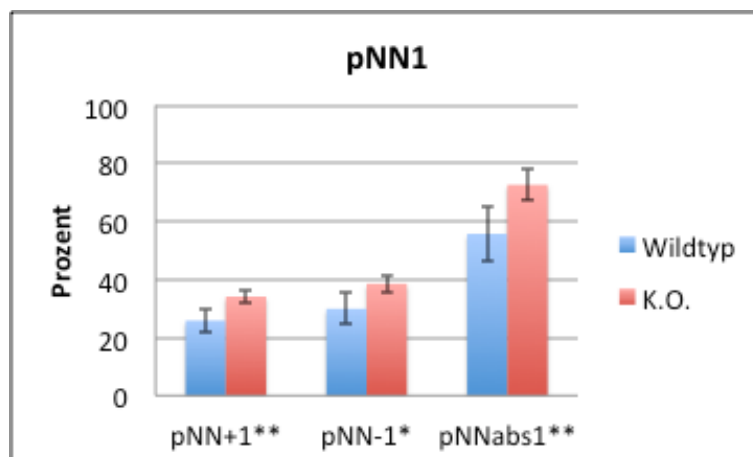


Abb. 33 pNN1-Werte in Prozent als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

Eine Prolongation des NN-Intervalls von mindestens zwei Millisekunden im Vergleich zum arithmetischen Mittel (pNN+2; WT: $18,81 \pm 5,08$; K.O.: $28,57 \pm 2,51$; p-Wert: 0,0049) trat bei den Knockout-Mäusen ebenso häufiger auf, wie eine Abwei-

chung unabhängig von der Richtung (pNNabs2; WT: $39,52 \pm 11,43$; K.O.: $60,36 \pm 6,26$; p-Wert: 0,0072). In beiden Fällen war dies statistisch hoch signifikant. Der Anteil, der um zwei Millisekunden kürzeren NN-Intervalle (pNN-2; WT: $20,71 \pm 6,38$; K.O.: $31,79 \pm 3,79$; p-Wert: 0,010) war bei den Wildtyp-Tieren signifikant erniedrigt.

Die Werte der STIM2-defizienten Tiere, bezüglich einer Abweichung eines NN-Intervalls um drei Millisekunden vom Mittelwert aller NN-Intervalle (pNN+3, pNN-2, pNNabs3), waren alle zur Vergleichsgruppe der Wildtyp-Mäuse statistisch hoch signifikant erhöht.

Dies gilt ebenso für die ermittelten pNN4-Werte. Alle Parameter der gentechnisch modifizierten Knockout-Mäuse waren statistisch hoch signifikant erhöht (s. Tab. 11).

Für eine erhöhte Varianz der Länge der NN-Intervalle bei den Knockout-Mäusen sprachen auch die pNN5-Werte. Die Resultate für pNN+5, pNN-5 sowie pNNabs5 (s. Tab. 12 sowie Abb. 34) zeigten dementsprechend einen statistisch hoch signifikanten höheren Anteil der regulären NN-Intervalle, die mindestens fünf Millisekunden vom Mittelwert abweichen.

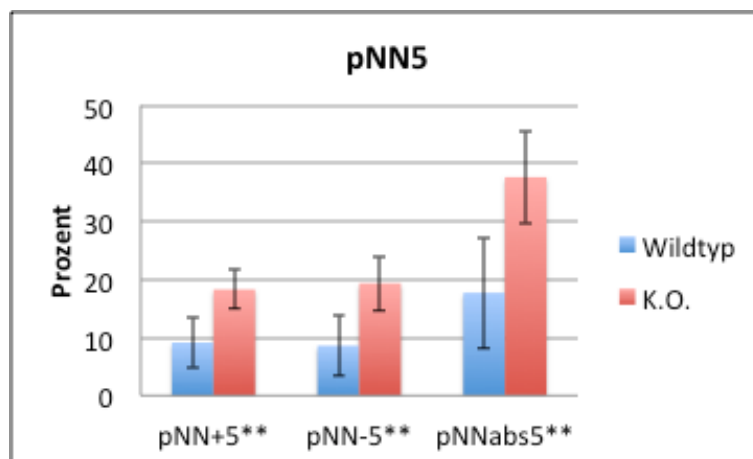


Abb. 34: pNN5-Werte in Prozent als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** statistisch hoch signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$, eigene Abb.

3.2 Elektrophysiologische Untersuchung

Es wurden fünf Wildtyp-Tiere und sechs K.O.-Tiere elektrophysiologisch untersucht (s. Abb.35). Eine Wildtyp-Maus starb dabei.

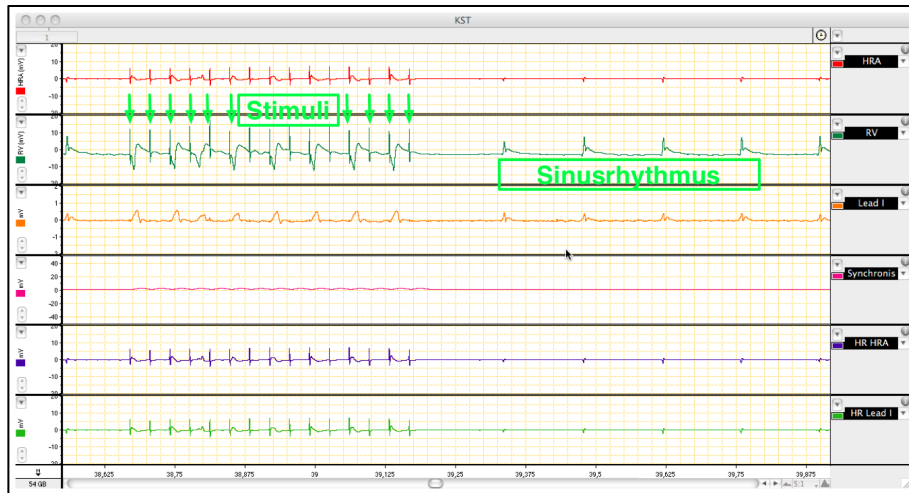


Abb. 35: Modifizierter Ausschnitt aus dem programmierten Kammerstimulation einer STIM2-KO-Maus, eigene Abb.

Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammen gefasst:

EPU			
	Wildtyp	STIM2-K.O.	p-Werte
Anzahl n	5	6	
Zykluslänge in ms	141,27±11,20	140,85±10,61	0,948
Wenckebachpunkt in ms	84,80±9,01	80,67±5,47	0,35
SNRT 100 in ms	181,80±28,0	157,40±8,95	0,10
cSNRT 100 in ms	40,53±32,44	16,51±9,20	0,15
SNRT 85 in ms	199,60±21,49*	163,35±15,24*	0,015*
cSNRT 85 in ms	58,33±18,03	22,46±11,82	0,06
SNRT 75 in ms	188,94±23,20	164,30±14,96	0,094
cSNRT 75 in ms	50,73±30,18	23,41±11,42	0,10

Tabelle 12: EPU-Ergebnisse; SNRT x: x steht für die Dauer der Stimulationsintervalle mit denen getestet wurde; Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung; * statistisch signifikant bei $p < 0,05$, ** statistisch hoch signifikant für $p < 0,01$

Bei der manuellen Auswertung der elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte das STIM2-defiziente Kollektiv eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Zykluslänge sowie des Wenckebachpunktes.

Bei den erfassten Werten für die Sinusknotenerholzeit, zeigte sich lediglich bei einem Stimulationsintervall von 85ms eine statistisch signifikante Reduktion der reinen SNRT in der Gruppe der STIM2-defizienten Tiere (p-Wert 0,015). Die korrigierte Erholungszeit des Sinusknotens zeigte sich bei den K.O.-Tieren zwar in allen Intervallen erniedrigt. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Bei den übrigen Stimulationsintervallen lässt sich ebenfalls dieser Trend der statistisch nicht signifikanten Reduktion der Werte für die gentechnisch modifizierten Tiere ableiten (s. Tabelle 14 und Abb. 36).

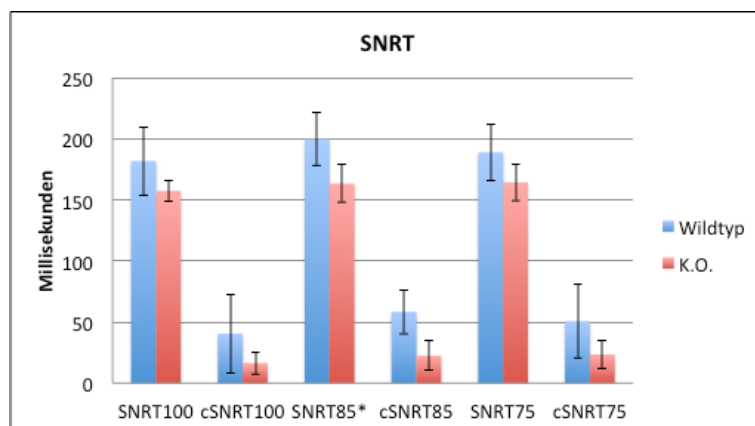


Abb. 36: SNRT-Werte in Millisekunden als Mittelwerte \pm Standardabweichung; * statistisch signifikant bei $p < 0,05$, ** statistisch hoch signifikant für $p < 0,01$, eigene Abb.

Ein Wildtyp-Tier zeigte unmittelbar nach dem Pacing bei einem Stimulationsintervall von 75ms eine nicht anhaltende Arrhythmie (s. Abb. 37) und konnte daher nicht in der Auswertung berücksichtigt werden.

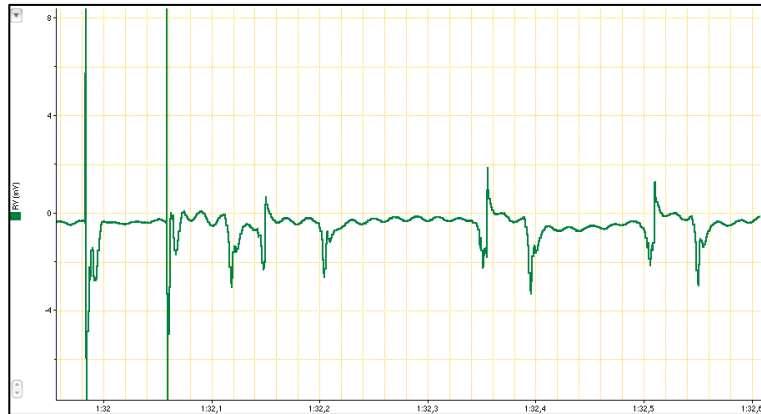


Abb. 37: Arrhythmie einer Wildtyp-Maus unmittelbar nach dem letzten Stimulus im SNRT 75-Protokoll und die ersten zwei regulären Herzschläge im Anschluss; Screenshot aus Chart, eigene Abb.

Bei keinem der Tiere konnten nennenswerte, andauernde Arrhythmien, weder im Vorhof noch in der Kammer, durch die speziellen Stimulationsprogramme induziert werden.

Eine Wildtyp-Maus wurde während den Versuchen bradykard und starb anschließend.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Berna-Erro [31] und Oh-Hora et al. [45] zeigten in ihren Arbeiten mit STIM2-K.O.-Mäusen, dass diese Tiere ungewöhnlich früh und unerwartet starben.

Das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierte STIM2-Protein wird als Regulator des basalen Calcium-Haushaltes angesehen [41, 42], in dem es zu einem sogenannten „Store-operated Calcium Entry“ (SOCE) führt. Das Protein kommt ubiquitär vor und ließ sich so auch im Herzen nachweisen [30, 31]. Calcium spielt als intrazellulärer Transmitter eine bedeutende Rolle für diverse Prozesse innerhalb von Zellen [26]. In Kardiomyozyten hat es zudem eine tragende Rolle bei der Reizentstehung, der Depolarisation der Kardiomyozyten als auch bei der elektromechanischen Kopplung [10, 13]. Eingriffe in die Calcium-Homöostase der Kardiomyozyten können Arrhythmien auslösen und einen Herztod bedingen [9, 17].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine systematische elektrophysiologische Charakterisierung von STIM2-Knockout-Mäusen durchgeführt. Eine erhöhte Vulnerabilität für relevante Arrhythmien oder relevante EKG-Auffälligkeiten konnten bei den STIM2-Knockout-Mäusen nicht gefunden werden.

4.2 Elektrokardiogramm

Einige EKG-Parameter gelten als unabhängige Risikofaktoren für das Erleiden eines plötzlichen Herztodes bzw. für eine erhöhte kardiale Mortalität, so zum Beispiel eine erhöhte Herzfrequenz, ein verlängertes QT-Intervall, eine ST-Strecken-Senkung oder auch eine Veränderung der T-Welle [70].

Alle Tiere wurden mittels eines Ruhe-EKGs unter Anästhesie untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass das verwendete Anästhetikum Avertin eine gewisse kardiodepressive Wirkung aufweist [71]. Diese ist jedoch in der von uns verwendeten Dosierung deutlich weniger ausgeprägt als bei anderen vergleichbaren Injektionsanästhetika wie Xylazin-Ketamin bzw. Midazolam-Ketamin [72, 73].

Um elektrophysiologische Anomalien zu detektieren, die in Ruhe nicht auftreten, wurde zudem ein Stress-EKG mit Injektion des β -Sympathomimetikums Isoprenalin durchgeführt.

Die mittlere Herzfrequenz der Wildtyp-Mäuse wich in Ruhe mit $551,98 \pm 2,10$ von den gemessenen $526,25 \pm 2,23$ der STIM2-Tiere ab. Da die Differenz zwar statistisch hoch signifikant war, sich die Werte im Stress-EKG jedoch nahezu angeglichen (WT: $637,62 \pm 1,90$; K.O.: $639,14 \pm 1,26$), ist davon auszugehen, dass dies keine elektrophysiologisch gravierende oder gar hämodynamisch relevante Divergenz ist. Die Dauer der P-Welle lässt Rückschlüsse über die atriale Erregungsausbreitung zu. Die Zeiten der STIM2-defizienten hierfür zeigten sich in Ruhe signifikant und im Stress-EKG hoch signifikant erhöht (s. Tab. 10 und 11), absolut gesehen fielen die Unterschiede der Mittelwerte mit $0,15$ ms in Ruhe bzw. Stress-getriggerten $0,99$ ms aus. Dies spräche für eine verzögerte Erregungsausbreitung im Vorhof der STIM2-K.O.-Mäuse.

Die Gruppe der K.O.-Mäuse zeigte zudem eine in Ruhe und unter Stress verlängerte Dauer des PR-Intervalls (s. Tab. 10 und 11). Dafür kann es verschiedene Gründe geben, wie beispielsweise eine durch den AV-Knoten verzögerte atrioventrikuläre Überleitung. Die Impulsausbreitung entlang der intraseptal verlaufenden Tawara-Schenkel über die Herzspitze zur Herzbasis wird im QRS-Komplex abgebildet. Die Zeitdauer dieses Komplexes war im Kollektiv der Knockout-Mäuse sowohl in Ruhe als auch unter Stress-Bedingungen statistisch hoch signifikant reduziert, wobei die Differenz sich unter Stress noch vergrößerte. Auffällig ist dabei, dass die Dauer des QRS-Komplexes, entgegen den Erwartungen, in beiden Gruppen unter Stress zunahm. Dies wird in der Literatur als Risikoprädiktor für eine Ischämie [74-76] oder für eine ventrikuläre Tachykardie bzw. Fibrillation [77] gesehen. Da dieses Phänomen auch bei den Wildtyp-tieren beobachtet wurde, sehen wir hierin kein Hinweis für eine erhöhte Arrhythmieeigung bei den STIM2-K.O.-Mäusen. Insbesondere muss darauf hingewiesen werden, dass die Bestimmung des Endes des QRS-Komplexes im EKG der Maus als besonders schwierig gilt und dadurch ein großes Unsicherheitspotential für die Bestimmung der QRS-Dauer birgt.

Die Knockout-Tiere hatten darüber hinaus in Ruhe sowie unter Stress statistisch hoch signifikant prolongierte QT- (Ruhe: WT: $37,57 \pm 0,35$; K.O.: $38,86 \pm 0,59$; Stress: WT: $37,08 \pm 0,49$; K.O.: $42,74 \pm 0,49$) und QT+-Zeiten (Ruhe: WT: $23,04 \pm 0,29$ K.O.:

25,63±0,42; Stress: WT: 22,64±0,22; K.O.: 25,56±0,35). Absolut gesehen fielen die Abweichungen der QT-Zeit unter Ruhe-Bedingungen mit 1,29 ms nur sehr gering aus. Die Differenz vergrößerte sich jedoch im Stress-EKG auf 5,66ms bei fast identischen Herzfrequenzen. Dies entspricht einer Steigerung von etwa 15,3%. Passend dazu zeigte bei den frequenz-korrigierten QT-Zeiten lediglich die Korrektur nach Friderica eine statistisch signifikante Verlängerung bei STIM2-defizienten Tieren. Unter Stress-Bedingungen waren dagegen die QT-Zeit-Korrekturen nach Bazett und Friderica im gentechnisch modifizierten Kollektiv statistisch hoch signifikant verlängert (s. Tab. 9 und 10). Die nach Mitchell korrigierten Zeiten unterschieden sich nicht signifikant, zeigten bei den K.O.-Mäusen in Ruhe die Tendenz einer Verlängerung (s. Tab. 9 und 10). Unter Stress glichen sich die Zeiten an. Eine verlängerte QT-Zeit gilt als Risikoprädiktor für eine kardiale sowie eine nicht-kardiale Mortalität [78-81], dies gilt auch für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes [82-84]. Zieht man die in Ruhe und unter Stress verlängerte QTc nach Friderica sowie die unter Stress verlängerte QTc nach Bazett der STIM2-defizienten Mäuse in Betracht, könnten diese bei unseren Tieren auf die von Oh-Hora et al. [45] und Berna-Erro [31] beschriebene erhöhte Mortalität des Knockout-Kollektivs hinweisen. Vergleicht man die QTc-Zeiten in Ruhe mit denen unter Stress, so lässt sich in beiden Gruppen eine Prolongation unter Stress feststellen, wobei normalerweise bei steigender Herzfrequenz eine Verkürzung der QTc zu erwarten wäre [85]. Eine Verlängerung der QTc-Zeit bei steigender Herzfrequenz kann bei Patienten ein Hinweis auf eine koronare Herzkrankheit sein [76, 86, 87]. O'Sullivan et al. [76] zeigten eine Korrelation zwischen einer verlängerten QTc unter Stress-Bedingungen und einer diastolischen Dysfunktion des linken Ventrikels. Da die stressbedingte Verlängerung der QTc-Zeit sowohl bei den WT- als auch K.O.-Tieren zu beobachten war, halten wir dies für ein unspezifisches Phänomen. Betrachtet man alle Zeiten der verwendeten QT-Korrekturen (s. Tab. 9 und 10), so lässt sich in Ruhe der Trend der Prolongation bei den K.O.-Tieren ablesen, was für eine verlängerte Repolarisation sprechen würde. Unter Stress-Bedingungen zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede. Die Korrekturen nach Bazett und Friderica waren beide in der Gruppe der STIM2-defizienten Tiere statistisch hoch signifikant verlängert. Beide Korrekturen weisen dabei bekannte Limitationen bei hohen Herzfrequenzen auf und basieren auf einer Ruhefrequenz von 60/min [88-90]. Die Korrektur nach Mitchell et al. [58] produzierte

eine beinahe Angleichung der Werte unter Stress-Bedingungen zwischen den Gruppen, ähnlich wie es beim RR-Intervall zu beobachten war. Dabei ist anzumerken, dass sich die RR-Werte der beiden Gruppen unter Stress zwar auf fast identische Werte annäherten, die unkorrigierten QT-Zeiten jedoch eine größere Differenz als in Ruhe aufwiesen. Welche Korrektur nun am exaktesten für unseren Fall ist, bleibt somit ungeklärt, nicht zuletzt da Mitchell et al. in ihrer Originalarbeit von einer suffizienten Korrektur mittels einer in der Bazett-Korrektur enthaltenen Wurzel-Funktion ausgehen [58]. Zudem stellt die exakte Bestimmung des QT-Intervalls im Maus-EKG eine bekannte Herausforderung [91] und Fehlerquelle dar.

4.3 Telemetrie

Störungen im Gleichgewicht des autonomen Nervensystems mit Erniedrigung des vagalen Tonus bzw. verstärkten Sympathikotonus erhöhen das Risiko an einer kardialen Ursache zu versterben [92, 93]. Als Marker für eine solche Unausgewogenheit hat sich unter anderem eine verringerte Herzfrequenzvariabilität herausgestellt [94-96].

Eine verringerte HRV wurde als Prädiktor für eine erhöhte Mortalität nach einem akuten Herzinfarkt [23, 97-100], für einen plötzlichen Herztod im Rahmen einer Herzinsuffizienz [21, 24, 101-103] als auch für Arrhythmien [7, 22, 104-106] identifiziert.

Gehrmann et al. [107] führten eine solche Bestimmung der HRV bei Mäusen ein. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse der HRV, basierend auf den Aufzeichnungen des implantierten Radiotelemetrie-Senders, nach Kramer et al. [59] durchgeführt. Des Weiteren wurden die telemetrischen Aufzeichnungen nach spontan auftretenden Arrhythmien untersucht.

Im konventionell-visuellen Screening der telemetrischen EKG-Spuren konnte kein Anhalt für eine supraventrikuläre oder ventrikuläre Ektopieneigung oder höhergradige Arrhythmien bei den STIM2-defizienten Tieren gefunden werden.

In der Analyse der 24h-Herzfrequenz und deren Variabilität zeigten die transgenen Tiere für die von uns gewählten pNN-Parameter bis auf pNN-1 und pNN-2 einen hoch signifikant erhöhten Anteil an NN-Intervallen, die bis zu 5ms von der mittleren Dauer der NN-Intervalle abweichen (s. Tabelle 11). Diese Werte sprechen für eine erhöhte Herzfrequenzvariabilität der STIM2-defizienten Tiere. Eine Publikation erwähnt hierfür eine, wie bei einer erniedrigten HRV, erhöhte kardiale Mortalität [108]. Bei der Fülle der

Publikationen, die lediglich bei einer herabgesetzten HRV von einer Auswirkung auf das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko ausgehen, stellt die Studie von De Bruyne et al. einen interessanten neuen Aspekt dar. Die erhöhte Herzfrequenzvariabilität bei den K.O.-Mäusen sollte somit keinesfalls automatisch als möglicher kardioprotektiver Marker angesehen werden.

Zusammenfassend muss der deskriptive Charakter dieser Arbeit betont werden.

4.4 Elektrophysiologische Untersuchung

Durch die invasive elektrophysiologische Untersuchung sollten die Tiere auf Veränderungen der Sinusknoten- und AV-Knoteneigenschaften sowie auf die Induzierbarkeit von Arrhythmien getestet werden.

Trotz einer Vielzahl von Stimulationsprogrammen, die von humanen und klinisch etablierten Protokollen abgeleitet wurden, gelang es uns nicht, bei den STIM2-K.O.-Mäusen Arrhythmien zu induzieren.

In den manuell abgeleiteten Parametern erwies sich die absolute Sinusknotenerholzeit bei einem Stimulationsintervall von 85ms (SNRT 85, s. Tab. 12) der Knockout-Gruppe als statistisch signifikant verkürzt gegenüber der WT-Gruppe. Die anderen erfassten Sinusknotenerholzeiten mit den Stimulationsintervallen von 100 und 75ms zeigten weder in der absoluten noch in der korrigierten Version einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Maus-Kollektiven. Die Werte des Knockout-Kollektivs waren in allen Messreihen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell verkürzt. Dabei stellt lediglich eine verlängerte SNRT ein Hinweis auf eine Sinusknoten-Pathologie, z. B. im Sinne eines Sick Sinus Syndrom, dar [109-111]. Obwohl man mit der geringen Sensitivität der cSNRT für eine Sinusknotendysfunktion von ca. 70% [112] argumentieren könnte, geben unsere Resultate in keinem der durchgeführten Untersuchungen einen Anhalt für eine elektrophysiologisch relevante Pathologie des Sinusknotens.

Letztlich gab es anhand dieser speziellen und komplexen Untersuchungstechnik für die Gruppe der STIM2-K.O.-Mäuse keine Hinweise auf eine erhöhte Arrhythmogenität oder auf eine Dysfunktion des Sinusknotens bzw. des AV-Knotens.

5. Zusammenfassung

Die physiologische Rolle von STIM2 ist auch eine Dekade nach dessen Entdeckung nicht vollständig geklärt. Insbesondere sind die kardiale Funktion und eine mögliche Beeinflussung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens durch das STIM2-Gen unklar.

Unsere Untersuchungen zeigten, trotz der möglichen Bedeutung von STIM2 für die zelluläre Calcium-Homöostase, keinen Anhalt für eine relevante kardiale elektrophysiologische Dysfunktion der STIM2-Knockout-Mäuse. Auch unter pharmakologischen Stress und durch aggressive Stimulationsprotokolle war keine Vulnerabilität der STIM2-K.O.-Tiere für relevante supraventrikuläre oder ventrikuläre Arrhythmien zu erkennen und es ergaben sich keine Hinweise für spontane Arrhythmien in den Holter-EKG-Aufzeichnungen. Bradykarde Herzrhythmusstörungen im Sinne einer Störung der Impulsbildung und Impulsweiterleitung konnten ebenfalls nicht detektiert werden.

Eine kardial-rhythmologische Ursache für die beobachteten plötzlichen und unerwarteten Todesfälle der STIM2-defizienten Tiere ab der 8. Woche post partum konnte nicht nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Myerburg, RJ and Castellanos, A, Cardiovascular Collapse, Cardiac Arrest, and Sudden Cardiac Death in Harrison's Principles of Internal Medicine. Fauci, AS, et al. (eds). 2008, 17th edn, New York: McGraw-Hill Professional; 2008: p. 1707-13.
- [2] Erdmann, E, Klinische Kardiologie. 7th edn, Berlin: Springer Verlag; 2008: p. 103-10.
- [3] Myerburg, RJ and Castellanos, A, Cardiac Arrest and Sudden Cardiac Death in Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Libby, P, et al. (eds). 2008, 8th edn, Philadelphia, PA: Saunders; 2008: p. 933-74.
- [4] Goldberger, JJ, et al., American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 2008. **118**(14): p. 1497-1518.
- [5] Huikuri, HV, Castellanos, A, and Myerburg, RJ, Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med*, 2001. **345**(20): p. 1473-82.
- [6] Zipes, DP, et al., ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 2006. **114**(10): p. e385-484.
- [7] Huikuri, HV, Heart rate dynamics as a marker of vulnerability to atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 2008. **19**(9): p. 913-4.
- [8] Zipes, DP and Wellens, HJ, Sudden cardiac death. *Circulation*, 1998. **98**(21): p. 2334-51.
- [9] Ter Keurs, HE and Boyden, PA, Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev*, 2007. **87**(2): p. 457-506.

- [10] Schmidt, RF, Lang, F, and Thews, G, Physiologie des Menschen. 29th edn, Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2004: p. 566-92.
- [11] Gertsch, M, Das EKG. 2nd edn, Berlin: Springer Medizin Verlag; 2008: p. 5-48; 337-42.
- [12] Bers, DM, Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
- [13] Silbernagl, S and Despopoulos, A, Taschenatlas Physiologie. 3rd edn, Stuttgart: Thieme; 2003: p. 436.
- [14] Berridge, MJ, Cardiac calcium signalling. Biochemical Society transactions, 2003. **31**(Pt 5): p. 930-3.
- [15] Wehrens, XH, Lehnart, SE, and Marks, AR, Intracellular calcium release and cardiac disease. Annual review of physiology, 2005. **67**: p. 69-98.
- [16] Bers, DM, Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circulation research, 2000. **87**(4): p. 275-81.
- [17] Clusin, WT, Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. Critical reviews in clinical laboratory sciences, 2003. **40**(3): p. 337-75.
- [18] Schuster, H-P and Trappe, H-J, EKG Kurs für Isabel. 5th edn, Stuttgart: Thieme; 2009: p. 3.
- [19] Sung, RJ, Kuo, CT, and Lai, WT, Exercise-induced Cardiac Arrhythmias in Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside. Zipes, DP and Jalife, J (eds). 2004, 4 edn, Philadelphia, PA: Saunders; 2004: p. 765-71.
- [20] Lewalter, T and Lüderitz, B, Herzrhythmusstörungen: Diagnostik und Therapie. 6th edn, Heidelberg: Springer Verlag; 2010: p. 62-87.
- [21] Galinier, M, et al., Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. European heart journal, 2000. **21**(6): p. 475-82.
- [22] Huikuri, HV, Heart rate dynamics and vulnerability to ventricular tachyarrhythmias. Ann Med, 1997. **29**(4): p. 321-5.
- [23] Kleiger, RE, et al., Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. The American journal of cardiology, 1987. **59**(4): p. 256-62.

- [24] La Rovere, MT, et al., Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. *Circulation*, 2003. **107**(4): p. 565-70.
- [25] Scherlag, BJ, et al., Catheter technique for recording His bundle activity in man. *Circulation*, 1969. **39**(1): p. 13-8.
- [26] Berridge, MJ, Bootman, MD, and Roderick, HL, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2003. **4**(7): p. 517-29.
- [27] Carafoli, E, et al., Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2001. **36**(2): p. 107-260.
- [28] Potier, M and Trebak, M, New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2008. **457**(2): p. 405-15.
- [29] Cahalan, MD, STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nature cell biology*, 2009. **11**(6): p. 669-77.
- [30] Williams, RT, et al., Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 3): p. 673-85.
- [31] Berna-Erro, A, Generation and Characterization of Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2)-deficient Mice, Graduate School of Life Sciences, Section Biomedicine, Universität Würzburg, 2009
- [32] Soboloff, J, et al., STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca₂₊ Entry. *Curr Biol*, 2006. **16**(14): p. 1465-70.
- [33] Roberts-Thomson, SJ, et al., ORAI-mediated calcium entry: mechanism and roles, diseases and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 2010. **127**(2): p. 121-30.
- [34] Luik, RM, et al., The elementary unit of store-operated Ca₂₊ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology*, 2006. **174**(6): p. 815-25.
- [35] Roos, J, et al., STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca₂₊ channel function. *The Journal of cell biology*, 2005. **169**(3): p. 435-45.

- [36] Spassova, MA, et al., STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(11): p. 4040-5.
- [37] Wu, MM, et al., Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. The Journal of cell biology, 2006. **174**(6): p. 803-13.
- [38] Zhang, SL, et al., STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. Nature, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
- [39] Liou, J, et al., STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
- [40] Parvez, S, et al., STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2008. **22**(3): p. 752-61.
- [41] Brandman, O, et al., STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. Cell, 2007. **131**(7): p. 1327-39.
- [42] Stathopoulos, PB, Zheng, L, and Ikura, M, Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(2): p. 728-32.
- [43] Berna-Erro, A, Redondo, PC, and Rosado, JA, Store-operated ca²⁺ entry. Advances in experimental medicine and biology, 2012. **740**: p. 349-82.
- [44] Berna-Erro, A, et al., STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. Sci Signal, 2009. **2**(93): p. ra67.
- [45] Oh-Hora, M, et al., Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. Nature immunology, 2008. **9**(4): p. 432-43.
- [46] Ju, YK, et al., Store-operated Ca²⁺ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1605-14.
- [47] Uehara, A, et al., Store-operated Ca²⁺ entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. Cell Calcium, 2002. **31**(2): p. 89-96.

- [48] Hulot, JS, et al., Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*, 2011. **124**(7): p. 796-805.
- [49] Ohba, T, et al., Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. **389**(1): p. 172-6.
- [50] Voelkers, M, et al., Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010. **48**(6): p. 1329-34.
- [51] Ju, YK and Allen, DG, Store-operated Ca²⁺ entry and TRPC expression; possible roles in cardiac pacemaker tissue. *Heart Lung Circ*, 2007. **16**(5): p. 349-55.
- [52] Hartley, CJ, et al., Noninvasive cardiovascular phenotyping in mice. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 2002. **43**(3): p. 147-58.
- [53] Appleton, GO, et al., Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing*, 2004. **11**(1): p. 5-14.
- [54] Richards, AG, Simonson, E, and Visscher, MG, Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn mice in normal conditions and under the effect of cooling, hypoxia and potassium. *The American journal of physiology*, 1953. **174**(2): p. 293-8.
- [55] London, B, Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 2001. **12**(9): p. 1089-91.
- [56] Bazett, HC, An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*, 1920. **7**: p. 353-370.
- [57] Friderica, LS, Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Med Scand*, 1920. **53**: p. 469-486.
- [58] Mitchell, GF, Jeron, A, and Koren, G, Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *The American journal of physiology*, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H747-51.
- [59] Kramer, K, et al., Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 1993. **30**(4): p. 209-15.

- [60] Liebig, S, POP1A, ein Gen der Popeye Familie, ist notwendig für die Herzfrequenz-Adaption nach Belastung, Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2008
- [61] Malik, M, Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. European heart journal, 1996(3): p. 354-81.
- [62] Berul, CI, et al., In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. Circulation, 1996. **94**(10): p. 2641-8.
- [63] Saba, S, Wang, PJ, and Estes, NA, 3rd, Invasive cardiac electrophysiology in the mouse: techniques and applications. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(3): p. 122-32.
- [64] VanderBrink, BA, et al., Assessment of atrioventricular nodal physiology in the mouse. J Interv Card Electrophysiol, 1999. **3**(3): p. 207-12.
- [65] Berul, CI, Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. Physiological genomics, 2003. **13**(3): p. 207-16.
- [66] Miller, JM and Zipes, DP, Diagnosis of Cardiac Arrhythmias in Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Libby, P, et al. (eds). 2008, 8th edn, Philadelphia, PA: Saunders; 2008: p. 763-78.
- [67] Renz-Polster, H, Krautzig, S, and Braun, J, Basislehrbuch Innere Medizin. 2nd edn: Urban & Fischer Verlag; 2006: p. 111.
- [68] Thamasett, S, Elektrophysiologische Techniken in Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie. Hombach, V (eds). 2001, 1 edn, Stuttgart: Schattauer; 2001: p. 141-63.
- [69] Schwartzman, D, Atrioventricular Block and Atrioventricular Dissociation in Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside. Zipes, DP and Jalife, J (eds). 2004edn, Philadelphia, PA: Saunders; 2004: p. 485-89.
- [70] Priori, SG, et al., Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. European heart journal, 2001. **22**(16): p. 1374-450.
- [71] Lorenz, JN, A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2002. **282**(6): p. R1565-82.

- [72] Hart, CY, Burnett, JC, Jr., and Redfield, MM, Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2001. **281**(5): p. H1938-45.
- [73] Roth, DM, et al., Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2002. **282**(6): p. H2134-40.
- [74] Cantor, A, et al., QRS prolongation measured by a new computerized method: a sensitive marker for detecting exercise-induced ischemia. Cardiology, 1997. **88**(5): p. 446-52.
- [75] Michaelides, A, et al., Exercise-induced QRS prolongation in patients with coronary artery disease: a marker of myocardial ischemia. American heart journal, 1993. **126**(6): p. 1320-5.
- [76] O'Sullivan, CA, et al., Abnormal ventricular activation and repolarisation during dobutamine stress echocardiography in coronary artery disease. Heart, 1998. **79**(5): p. 468-73.
- [77] Berntsen, RF, Gjestvang, FT, and Rasmussen, K, QRS prolongation as an indicator of risk of ischemia-related ventricular tachycardia and fibrillation induced by exercise. American heart journal, 1995. **129**(3): p. 542-8.
- [78] Algra, A, et al., QT interval variables from 24 hour electrocardiography and the two year risk of sudden death. British heart journal, 1993. **70**(1): p. 43-8.
- [79] Elming, H, et al., The prognostic value of the QT interval and QT interval dispersion in all-cause and cardiac mortality and morbidity in a population of Danish citizens. European heart journal, 1998. **19**(9): p. 1391-400.
- [80] de Bruyne, MC, et al., Prolonged QT interval predicts cardiac and all-cause mortality in the elderly. The Rotterdam Study. European heart journal, 1999. **20**(4): p. 278-84.
- [81] Schouten, EG, et al., QT interval prolongation predicts cardiovascular mortality in an apparently healthy population. Circulation, 1991. **84**(4): p. 1516-23.
- [82] Algra, A, et al., QTc prolongation measured by standard 12-lead electrocardiography is an independent risk factor for sudden death due to cardiac arrest. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1888-94.
- [83] Puddu, PE and Bourassa, MG, Prediction of sudden death from QTc interval prolongation in patients with chronic ischemic heart disease. Journal of electrocardiology, 1986. **19**(3): p. 203-11.

- [84] Straus, SM, et al., Prolonged QTc interval and risk of sudden cardiac death in a population of older adults. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **47**(2): p. 362-7.
- [85] Tavel, ME, Stress testing in cardiac evaluation : current concepts with emphasis on the ECG. Chest, 2001. **119**(3): p. 907-25.
- [86] Egloff, C, et al., Sensitivity, specificity and predictive accuracy of Q wave, QX/QT ratio, QTc interval and ST depression during exercise testing in men with coronary artery disease. The American journal of cardiology, 1987. **60**(13): p. 1006-8.
- [87] Macieira-Coelho, E, et al., Postexercise changes of the QTc interval in patients with recent myocardial infarction. Journal of electrocardiology, 1993. **26**(2): p. 125-9.
- [88] Desai, M, et al., Variability of heart rate correction methods for the QT interval. British journal of clinical pharmacology, 2003. **55**(6): p. 511-7.
- [89] Funck-Brentano, C and Jaillon, P, Rate-corrected QT interval: techniques and limitations. The American journal of cardiology, 1993. **72**(6): p. 17B-22B.
- [90] Luo, S, et al., A comparison of commonly used QT correction formulae: the effect of heart rate on the QTc of normal ECGs. Journal of electrocardiology, 2004. **37 Suppl**: p. 81-90.
- [91] Wehrens, XH, Kirchhoff, S, and Doevendans, PA, Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. Cardiovascular research, 2000. **45**(1): p. 231-7.
- [92] La Rovere, MT, et al., Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. Circulation, 2001. **103**(16): p. 2072-7.
- [93] Schwartz, PJ, The autonomic nervous system and sudden death. European heart journal, 1998. **19 Suppl F**: p. F72-80.
- [94] Kleiger, RE, Stein, PK, and Bigger, JT, Jr., Heart rate variability: measurement and clinical utility. Annals of noninvasive electrocardiology : the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc, 2005. **10**(1): p. 88-101.
- [95] Algra, A, et al., Heart rate variability from 24-hour electrocardiography and the 2-year risk for sudden death. Circulation, 1993. **88**(1): p. 180-5.

- [96] Stein, PK, et al., Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. American heart journal, 1994. **127**(5): p. 1376-81.
- [97] Kop, WJ, et al., Changes in heart rate and heart rate variability before ambulatory ischemic events(1). Journal of the American College of Cardiology, 2001. **38**(3): p. 742-9.
- [98] Malik, M, et al., Heart rate variability in relation to prognosis after myocardial infarction: selection of optimal processing techniques. European heart journal, 1989. **10**(12): p. 1060-74.
- [99] Odemuyiwa, O, et al., Multifactorial prediction of arrhythmic events after myocardial infarction. Combination of heart rate variability and left ventricular ejection fraction with other variables. Pacing and clinical electrophysiology : PACE, 1991. **14**(11 Pt 2): p. 1986-91.
- [100] Wolf, MM, et al., Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. The Medical journal of Australia, 1978. **2**(2): p. 52-3.
- [101] Guzzetti, S, et al., Different spectral components of 24 h heart rate variability are related to different modes of death in chronic heart failure. European heart journal, 2005. **26**(4): p. 357-62.
- [102] Lombardi, F and Mortara, A, Heart rate variability and cardiac failure. Heart, 1998. **80**(3): p. 213-4.
- [103] Nolan, J, et al., Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-heart). Circulation, 1998. **98**(15): p. 1510-6.
- [104] Hartikainen, JE, et al., Distinction between arrhythmic and nonarrhythmic death after acute myocardial infarction based on heart rate variability, signal-averaged electrocardiogram, ventricular arrhythmias and left ventricular ejection fraction. Journal of the American College of Cardiology, 1996. **28**(2): p. 296-304.
- [105] Lombardi, F, Chaos theory, heart rate variability, and arrhythmic mortality. Circulation, 2000. **101**(1): p. 8-10.
- [106] Lombardi, F, et al., Heart rate variability patterns before ventricular tachycardia onset in patients with an implantable cardioverter defibrillator. Participating Investigators of ICD-HRV Italian Study Group. The American journal of cardiology, 2000. **86**(9): p. 959-63.

- [107] Gehrmann, J, et al., Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2000. **279**(2): p. H733-40.
- [108] de Bruyne, MC, et al., Both decreased and increased heart rate variability on the standard 10-second electrocardiogram predict cardiac mortality in the elderly: the Rotterdam Study. American journal of epidemiology, 1999. **150**(12): p. 1282-8.
- [109] Narula, OS, Samet, P, and Javier, RP, Significance of the sinus-node recovery time. Circulation, 1972. **45**(1): p. 140-58.
- [110] Mandel, W, et al., Evaluation of sino-atrial node function in man by overdrive suppression. Circulation, 1971. **44**(1): p. 59-66.
- [111] Ferrer, MI, The sick sinus syndrome. Circulation, 1973. **47**(3): p. 635-41.
- [112] Lin, D and Callans, DJ, Sinus Rhythm Abnormalities in Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside. Zipes, DP and Jalife, J (eds). 2004, 4 edn, Philadelphia, PA: Saunders; 2004: p. 479-84.

7. Anhang

7.1 Chemikalien und molekularbiologische Produkte

Chemikalien	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
2,2,2-Tribromethanol	Cat.: T4,840-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol 98%	Cat.:W20,571-0-K	SAFC, Hamburg
Isofluran	Forene B506	Abbott, Schweiz
Isoproterenol Hydrochlorid	CAS 5984-95	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sauerstoff	GA 201	Linde Gas GmbH, Stadl-Paura

7.2 Verwendete Software, Geräte und Einmalartikel

Software	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Aufzeichnung von Herzströmen aus EKG und EPU	Chart 5 für Windows	ADInstruments, Australien
Aufzeichnung von Herzströmen aus Telemetrie	Dataquest A.R.T Version 3.1	Data Sciences International, St. Paul, MN USA
Auswertung	ECG Auto Version 2.5.0.3	emka Technologies, Frankreich
Geräteart	Modellbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Analysewaage	TE 214S	Sartorius, Göttingen
Datenerfassungsgerät	PowerLab/4SP	ADInstruments, Australien
Digitalkamera	Coolpix 450	Nikon
EPU-Herzkatheter	1.1F Mouse Octapolar EP Catheter, FTS-1113A-0518	Scisense, Kanada
Heizplatte, 24 V, 37 W	EHE-3501/140	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
Kaltlicht	KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz

Koaxialkabel		
Wurzelkanalinstrument	Antaeos Länge 021, Size 460	Vereinigte Dentalwerke, München
Notebook	Dell	Dell, Deutschland
Präparationsbesteck		Aesculap, Tuttlingen
Respirator	Rodent Ventilator TYP 7025	UGO Basile, Italien
Schermaschine	GT104	Aesculap AG, Tuttlingen
Stereo Mikroskop	SZ 40	Olympus, Hamburg
Temperatur-Kontroll-Modul	TKM-0902	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beer- bach
Telemetrie-Transmitter	TA-F40	Data Sciences International, St. Paul, MN USA
Telemetrie-Receiver	RPC-1	Data Sciences International, St. Paul, MN USA
Telemetrie-Exchange-Matrix	DSI Data Exchange Matrix	Data Sciences International, St. Paul, MN USA
Vaporisator	Vapor 2000	Dräger, Lübeck
Verstärker	Animal Bio Amplifier ML136	ADInstruments, Australien
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Einmalartikel	Modellbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Desinfektionsspray	Cutasept F	Bode Chemie, Hamburg
Desinfektionsspray	Kodan	Schülke & Mayr, Norderstedt
Einmal-Feindosierungsspritze	Omnifix-F 1ml	Braun, Melsungen
Einmalspritze	Mikroliterspritze	Hamilton, Schweiz
Klebeband	Micropore	3M, Neuss
Klemme	Wundrandklemme	
Nahtmaterial	Prolene USP 6/0, metric 0,7	Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial	Perma-Hand*Seide 6-0	Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial	USP 8/0, metric 0,4	Ethicon, Norderstedt
Nierenschale	Edelstahl, 25 cm	Brinkmann Med. Dr. Jungh, Deutschland
Polyethylen-Faser-Faden	Fireline 0,12mm	Berkley, USA

Anhang

Röhrchen	Volumen 14ml	Greiner Holding AG, Österreich
Venenverweilkanüle	G22-1 blau	Braun, Melsungen
Watte	Pur-Zellin 4cmx5cm	Hartmann, Heidenheim

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Maier für die Überlassung des Themas, die äußerst kompetente und freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotion.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Nieswandt dankend exponieren. Die in seiner Arbeitsgruppe generierten und mir anvertrauten STIM2-defizienten Mäuse, ermöglichten erst meine Arbeit auf diesem spannenden Gebiet.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. Jan Becher bedanken, der mir immer äußerst freundlich und hilfsbereit bei der Interpretation der Daten als auch bei der Fertigstellung der Arbeit zur Seite stand und mich dabei immer wieder mit konstruktiver Kritik und Aufmunterungen unterstützte.

Ich danke ebenfalls Herrn Marco Abeßer, der mich im Labor in alle nötigen Techniken eingearbeitet und der dank seiner außerordentlichen technischen Begabung für jedes Problem eine Lösung parat hatte. Seinem stets geduldigen, hilfsbereiten und freundlichen Wesen verdanke ich das Gelingen meiner experimentellen Arbeit.

Mir liegt es zudem am Herzen die AG Maier in ihrer Gesamtheit, mit den noch nicht erwähnten Frau Jenny Ormanns und Frau Dr. med. Susann Kaufmann, eigens zu erwähnen. Ich danke euch für die schöne und erfolgreiche Zeit im Labor als auch für diverse Treffen und Ausflüge außerhalb des Labors, an die ich gerne zurückdenke.

Nicht zuletzt möchte ich meine Eltern und meine Freundin Eva-Maria besonders hervorheben. Ihr habt mich auf den Höhen und Tiefen bei der Fertigstellung der Arbeit allzeit umsorgend begleitet. Ohne eure aufbauende Hilfe wäre diese Arbeit wohl noch nicht fertig.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname

Vetter, Sebastian

Geburtsdatum, -ort

17.05.1985, Karlstadt/Main

Schulausbildung

Sept. 1995 bis Juni 2004

Friedrich-List-Gymnasium, Gemünden

Hochschulausbildung:

Okt. 2004 bis Nov. 2010

Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Facharztausbildung:

Seit 1. Okt. 2011

Assistenzarzt am Institut für Radiologie und Neuroradiologie Süd, Klinikum Nürnberg

Sebastian Vetter