

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Experimental and Clinical Research Center  
einer Kooperation der Charité-Universitätsmedizin Berlin  
und des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin

---

**Antiarrhythmische Wirkung  
einer transgenen Überexpression des humanen CYP2J2  
in Mausmodellen der Herzhypertrophie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Bastian Spallek  
Tierarzt aus Borken (Westf.)

Berlin 2012  
Journal-Nr.: 3560

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Achim D. Gruber Ph.D. (Cornell Univ.)  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dominik Müller  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heidrun Fink

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Cardiovascular diseases, mice, animal models, transgenic animals, hypertrophy,  
cytochromes, eicosanoids, electrophysiology, arrhythmia

Tag der Promotion: 27.07.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-201-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literatur</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Herzinsuffizienz</b> .....	<b>3</b>
2.2.1 Myokardhypertrophie .....	3
2.2.2 Extrazelluläre Matrix .....	4
<b>2.3 Der Herzzyklus</b> .....	<b>5</b>
2.3.1 Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens.....	5
2.3.2 Regulation der Herzfähigkeit .....	8
2.3.3 Kommunikation der Kardiomyozyten .....	8
<b>2.4 Arrhythmien</b> .....	<b>10</b>
2.4.1 Supraventrikuläre Tachykardien .....	10
2.4.2 Ventrikuläre Tachykardien .....	12
2.4.3 Pathophysiologie der Arrhythmien .....	13
<b>2.5 Arachidonsäure Metabolismus</b> .....	<b>14</b>
2.5.1 CYP-Epoxygenasen .....	15
2.5.2 Wirkungen der Epoxyeicosanoide .....	16
<b>3 Zielstellung</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Arbeitsaufgaben .....	18
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Tiere</b> .....	<b>23</b>
4.2.1 Kardiomyozytenspezifische Überexpression des humanen CYP2J2 .....	23
4.2.2 Genotypisierung .....	24
<b>4.3 Versuchsdesign der kardialen Hypertrophie durch chronische     Druckbelastung (TAC)</b> .....	<b>25</b>

<b>4.4</b>	<b>Versuchsdesign der kardialen Hypertrophie durch chronische <math>\beta</math>-adrenerge Stimulation (Iso)</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Tierexperimentelles Arbeiten</b> .....	<b>27</b>
4.5.1	Transversale Aortenkonstriktion.....	27
4.5.2	Implantation der osmotischen Minipumpen.....	27
4.5.3	Echokardiografie .....	28
4.5.4	Elektrokardiografie .....	29
4.5.5	<i>In vivo</i> , die electrophysiologische Untersuchung .....	30
4.5.6	Organentnahme .....	34
<b>4.6</b>	<b>Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff</b> .....	<b>35</b>
4.6.1	Das Prinzip .....	35
4.6.2	Vorbereitung und Präparation .....	36
4.6.3	Das Protokoll.....	37
<b>4.7</b>	<b>Genexpressionsanalysen</b> .....	<b>38</b>
4.7.1	Isolation von RNS .....	38
4.7.2	Nukleinsäuremessung .....	38
4.7.3	Reverse Transkription .....	39
4.7.4	Primer- und Sondendesign .....	40
4.7.5	<i>Real Time</i> RT-PCR .....	42
<b>4.8</b>	<b>Histologie</b> .....	<b>43</b>
4.8.1	Gewebeeinbettung in Paraffin .....	44
<b>4.9</b>	<b>Deparaffinisierung und Rehydrierung</b> .....	<b>44</b>
4.9.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	45
4.9.2	Sirius Rot Färbung .....	45
4.9.3	Immunfärbung von Paraffinschnitten .....	45
<b>4.10</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der Überexpression des humanen CYP2J2 auf kardiales Remodelling und Arrhythmieentwicklung im Modell der chronischen Druckbelastung</b> .....	<b>48</b>
5.1.1	CYP2J2 Überexpression verbesserte Mortalität und systolische Funktion ohne Einfluss auf Herzhypertrophie .....	48
5.1.2	Die vermehrte mRNA-Expression profibrotischer Gene während der chronischen Druckbelastung wurde in geringem Maße durch CYP2J2 Überexpression beeinflusst. ....	51

5.1.3	TAC induzierte QRS-Komplex Verbreiterung und Anstieg der HR wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert .....	52
5.1.4	CYP2J2 Überexpression verhinderte ventrikuläre Arrhythmien .....	53
5.1.5	VERP wurde durch CYP2J2 Überexpression verlängert.....	55
5.1.6	CYP2J2 Überexpression verhinderte Cx43 Dislokation nach chronischer Druckbelastung.....	57
5.1.7	Ventrikuläre Arrhythmien wurden <i>ex vivo</i> durch CYP2J2 Überexpression und Diazoxid gesenkt.....	58
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der Überexpression des humanen CYP2J2 auf kardiales Remodelling und Arrhythmieentwicklung im Modell der chronischen <math>\beta</math>-adrenergen Stimulation.....</b>	<b>60</b>
5.2.1	CYP2J2 Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Herzhypertrophie .....	60
5.2.2	Die systolische Funktion wurde nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation durch CYP2J2 Überexpression verbessert .....	61
5.2.3	QRS- und QTc-Verkürzung nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert .....	61
5.2.4	CYP2J2 Überexpression verringerte Induktion und Länge von AF nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	62
5.2.5	Eine Iso induzierte AERP Verkürzung wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert. ....	65
5.2.6	Cx40 Degradation nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert .....	67
5.2.7	CYP2J2 Überexpression senkte RNS-Expression profibrotischer Gene nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	68
5.2.8	Gesteigerte interzelluläre Kollagenexpression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert .....	70
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1</b>	<b>Der Einfluss von kardialer CYP2J2 Überexpression auf die chronische Druckbelastung durch TAC.....</b>	<b>72</b>
6.1.1	TAC induzierte kardiales Hypertrophie in WT und CYP2J2 Tieren gleichermaßen.....	72
6.1.2	CYP2J2 Überexpression senkte die Mortalität nach TAC signifikant und verbesserte die systolische Funktion des Herzes. Verbesserungen im strukturellen und elektrischen Remodelling könnten ursächlich gewesen sein. ....	73
6.1.3	Das strukturelle Remodelling wurde durch CYP2J2 nur geringfügig beeinflusst.....	74

6.1.4	Ventrikuläre Arrhythmien wurden durch Minderung des elektrischen Remodellings bei CYP2J2 Mäusen verhindert.....	74
6.1.5	TAC induzierte Cx43 Delokalisation wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert.....	77
6.1.6	CYP2J2 abhängige EETs agierten über die Öffnung des mitochondrialen K <sub>ATP</sub> -Kanals.....	79
<b>6.2</b>	<b>Einfluss kardialer CYP2J2 Überexpression auf die chronische <math>\beta</math>-adrenerge Stimulation durch Iso.....</b>	<b>80</b>
6.2.1	CYP2J2 Überexpression hatte nur einen geringen Einfluss auf die Iso induzierte kardiale Hypertrophie und Funktion.....	80
6.2.2	Iso induziertes strukturelles Remodelling war durch CYP2J2 gemindert.....	81
6.2.3	AF wurde durch Minderung des elektrischen Remodellings bei CYP2J2 Mäusen verhindert.....	82
6.2.4	CYP2J2 Überexpression verhinderte Iso induzierte Cx40 Degradation.....	85
<b>6.3</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>86</b>
<b>6.4</b>	<b>Limitation der Arbeit.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Summary.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>
<b>14</b>	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
Acc	<i>Accession</i>
AERP/ <i>atrial effective refractory period</i>	atriale effektive Refraktärzeit
AF/ <i>atrial fibrillation</i>	Vorhofflimmern
AK	Antikörper
AngII	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
APD/ <i>action potential duration</i>	Aktionspotentiallänge
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikular Knoten
AVNERP	Refraktärzeit des Atrioventrikular Knoten
bp	Basenpaar
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cAMP/ <i>cyclic adenosine monophosphate</i>	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCS/ <i>cardiac conduction system</i>	Erregungsbildungs- und Leitungssystem
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTGF/ <i>connective tissue growth factor</i>	Bindegewebswachstumsfaktor
CV/ <i>conduction velocity</i>	Leitungsgeschwindigkeit
Cx	Connexine
CYP	Cytochrom P450
CYP2J2	Cytochrom P 450 Subfamilie 2J polypeptide 2n
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECRC	<i>Experimental and Clinical Research Centers</i>
EET	Epoxyeicosatriensäure
EF	Ejektionsfraktion
EG	Elektrogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
ERP/ <i>effective refractory period</i>	effektive Refraktärphase
ES	Extrastimulus

EZM	extrazelluläre Matrix
Fw	Forward Primer
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF/ heart failure	Herzinsuffizienz
HR	Herzrate
i. p.	Intraperitoneal
Iso	Isoproterenol
K <sup>+</sup>	Kalium-Ionen
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzerkrankung
Ko	<i>Knockout</i>
Kol	Kollagen
LTCC/ <i>L-type calcium channel</i>	L-Typ-Kalzium-Kanal
mA	Milliampere
MH	Myokardhypertrophie
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNS	mitochondriale Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr	Nummer
OP	Operation
PBS/ <i>phosphate buffered saline</i>	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR/ <i>polymerase chain reaction</i>	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PLA2	Phospholipase A2
PUFA/ <i>polyunsaturated fatty acid</i>	mehrfach ungesättigte Fettsäure
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> PCR
RA EG/ <i>right atrial electrogram</i>	Elektrogramm des rechten Atriums

Ref/ <i>reference</i>	Referenz
Rev	Reverse Primer
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RV EG	Elektrogramm des rechten Ventrikels
s	Sekunde
SA-Knoten	Sinusknoten
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
Seq/ <i>sequence</i>	Sequenz
Sham	Schein TAC operiert
Son	Sonde
TAC/ <i>transverse aortic constriction</i>	transversale Aortenkonstriktion
TGF $\beta$ / <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
UpM	Umdrehungen pro Minute
VERP	ventrikuläre effektive Refraktärzeit
VES	ventrikuläre Extrasystole
VT	ventrikuläre Tachykardie
WBP	Wenckebachpunkt
WHO/ <i>world health organisation</i>	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
$\beta$ -MHC/ <i><math>\beta</math>-myosin heavy chain</i>	schwere Myosinkette beta
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer



# 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen.<sup>1</sup> Ein wichtiger Bestandteil der ihnen zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen sind Umbauprozesse des Herzmuskels, das sogenannte kardiale Remodelling. Dieses stellt einen Risikofaktor für koronare Herzerkrankung (KHK), Schlaganfall, Arrhythmien, Herzinsuffizienz (HF) und kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar.<sup>2-4</sup>

Das kardiale Remodelling umfasst strukturelle und elektrische Umbauprozesse, die eine komplexe, adaptive Antwort auf mechanische und neurohumorale Stimuli sind. Damit einhergehende subzelluläre Veränderungen assoziiert mit kardialer Hypertrophie können kurzfristig förderlich, jedoch langfristig maladaptiv sein und führen zudem zur funktionellen Dekompensation.<sup>5</sup> Wesentlich dabei ist ein erhöhtes Risiko für Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien (VT) und Vorhofflimmern (AF).

Verantwortlich für das erhöhte Arrhythmierisiko ist vor allem das elektrische Remodelling des Herzens. Die elektrische Impulsweiterleitung wird durch Veränderungen der Erregbarkeit, elektrischen Kopplung und Gewebearchitektur gestört.<sup>6</sup> Neben Funktionsstörungen von Ionenkanälen sind zur interzellulären Kommunikation wichtige *gap junction* formende Connexine für die geregelte Ausbreitung der elektrischen Erregung von hoher Bedeutung.

Cytochrom P450 (CYP) abhängige Metabolite der Arachidonsäure (AA) wie Epoxyeicosatriensäuren (EETs) und 20-Hydroxyeicosatetraensäure dienen als *second messenger* verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren und spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation vaskulärer, renaler und kardialer Funktionen.<sup>7-10</sup>

Bekannte protektive Eigenschaften der EETs umfassen antiinflammatorische,<sup>11,12</sup> antithrombotische, vasodilatatorische<sup>8,13</sup> und fibrinolytische Effekte.<sup>14</sup> Darüber hinaus ist der Einfluss von EETs auf verschiedene Ionenkanäle wie Natrium (Na<sup>+</sup>) - und Kalium (K<sup>+</sup>) - Kanäle sowie den L-Typ-Kalzium-Kanal (LTCC) bekannt,<sup>15, 16</sup> wodurch ein wesentlicher Einfluss auf die elektrische Aktion des Herzens gewährleistet wird.

Direkte Hinweise auf eine antiarrhythmische Potenz von EETs gaben Studien mit einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC) induzierten Herzhypertrophie und pharmakologischer Inhibierung des Abbaus von EETs durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) und

daraus resultierender Akkumulation von EETs.<sup>17</sup> Diese antiarrhythmische Potenz der EETs konnte im sEH *Knockout* (Ko) Modell und Angiotensin II induzierter Herzhypertrophie bestätigt werden.<sup>18</sup>

Diese vielversprechenden Daten gaben Anlass in der vorliegenden Arbeit das antiarrhythmische Potential anhand direkter Steigerung der EET Produktion durch kardio-myozytenspezifische Überexpression des humanen CYP Subfamilie 2J Polypeptid 2 (CYP2J2) zu testen.

Dazu wurde in männlichen CYP2J2 transgenen Mäusen und korrespondierenden Wildtyp Tieren (WT) kardiale Hypertrophie auf zwei Wegen induziert: Zum einen durch chronische Druckbelastung nach TAC, und zum anderen durch die chronische beta-adrenerge Stimulation durch Isoproterenol.

Unerwartet konnte in letzterem ein bisher unbekanntes Mausmodell zur Erforschung von AF etabliert werden. Zudem konnte in beiden Herzhypertrophie-modellen das antiarrhythmische Potential der CYP2J2 abhängigen EETs auf atriale und ventrikuläre Arrhythmien bestätigt werden.

In einer anstehenden Firmenausgründung zur Entwicklung von EET ähnlichen Medikamenten zur Behandlung und Prävention von AF wird diese Arbeit wichtige Grundlagen liefern.

## 2 Literatur

### 2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Im Jahr 2010 forderten Herz-Kreislauf-Erkrankungen mehr als 17,3 Millionen Menschenleben.<sup>19</sup>

Der Begriff der Herz-Kreislauf-Erkrankung ist nicht einheitlich definiert. Jedoch wird dieser durch die Auflistung im Kapitel IX der „*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*“ (ICD10) der *World Health Organisation (WHO)* näher beschrieben und wird so in der Epidemiologie und Statistik angewendet.<sup>20</sup> Im weitesten Sinne umfasst er sämtliche Krankheiten des Herzens und des Blutkreislaufs.

### 2.2 Herzinsuffizienz

Meist ist die HF die finale Konsequenz einer Vielzahl von Ätiologien wie KHK, Myokardinfarkt (MI), Hypertension, virale Myokarditis, genetische Kardiomyopathie und Arrhythmie.<sup>21</sup>

Obwohl es in den letzten Dekaden beachtliche Fortschritte in der konservativen und invasiven Therapie von HF gab, bleibt die Mortalität in HF Patienten hoch. Überdies steigen Inzidenz und Prävalenz von HF in der alternden Gesellschaft.<sup>22</sup>

Ein wesentlicher Bestandteil bei der Pathogenese von HF sind kardiale Umbauprozesse als Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli wie Ischämie, MI, Infektion sowie Druckbelastung und chronischer Stress. Als Antwort kommt es neben Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Myokardfibrose, Inflammation und neurohumoraler Aktivierung, welche in einer Vielzahl zellulärer und struktureller Veränderungen resultieren, was zu einem progressiven Abfall der Herzaktion führt.<sup>21</sup>

#### 2.2.1 Myokardhypertrophie

Der HF geht häufig eine Myokardhypertrophie (MH) voraus, die von multiplen, progressiven Veränderungen in Volumen und Struktur des Herzens gekennzeichnet ist. Diese stellen sich aus histologischer Sicht als eine Kombination aus Myozytenhypertrophie, Myofibroblastenproliferation, interstitieller Fibrose und Apoptose dar.<sup>23,24</sup>

Die MH entsteht als adaptive Stressantwort auf eine Vielzahl mechanischer oder neurohumoraler Stimuli wie z.B. Epinephrin und Norepinephrin.<sup>5,25</sup> Subzelluläre Veränderungen, die mit kardialer Hypertrophie assoziiert sind, können kurzfristig förderlich, jedoch langfristig maladaptiv sein und führen zudem zur funktionellen Dekompensation.<sup>5</sup> Bei zunächst kompensatorischer Anpassung erfolgt die Verdickung der Wände. Nach dieser adaptiven Hypertrophie und weiter anhaltenden Stimuli kann es zu einer Dilatation kommen, die mit einem Verlust der systolischen Funktion einhergeht.<sup>22,26</sup>

### 2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM), welche vornehmlich aus Strukturproteinen, den Kollagenen, besteht, bildet ein dreidimensionales Netzwerk aus, das einzelne Myozyten oder deren Faszien umgibt.<sup>27,28</sup>

Nach heutiger Definition stellt die EZM die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden, dar.<sup>29</sup> Zum einen erfüllt sie wesentliche Stützfunktion, und zum anderen stellt sie ein Reservoir an bioaktiven Makromolekülen wie z.B. Angiotensin II (AngII) und Endothelin-1<sup>30</sup> sowie Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle, die die Synthese und Degradation der EZM beeinflussen.

Kommt es aufgrund anhaltender mechanischer oder neurohumoraler Stimuli zu Veränderungen wie der MH, erfolgt der Umbau der EZM durch die Initiierung der Fibroblastenproliferation mit einhergehender, erhöhter Kollagensynthese. Dieser Vorgang wird als kardiales Remodelling bezeichnet.<sup>31</sup>

Die zunehmende kardiale Fibrosierung und Kollagenakkumulation führen zu einer Einschränkung der linksventrikulären Funktionalität,<sup>32</sup> deren Ursache in der progressiven Versteifung, in Störungen der Erregungsleitung<sup>33</sup> und in einer Minderperfusion der Myozyten zu suchen ist.<sup>34</sup>

Einen wichtigen Vertreter zur Induktion von Zellproliferation und -differenzierung stellt der zu den Zytokinen zählende *transforming growth factor  $\beta$*  (*TGF $\beta$* ) dar.<sup>35</sup> Dieser induziert die Kollagensynthese und Regulatoren der Myofibroblastendifferenzierung, zu denen u. a. der *connective tissue growth factor* (*CTGF*) gehört.<sup>36,37</sup>

Während kardialer Umbauprozesse bewirkt die Induktion von *CTGF* durch *TGF $\beta$*  oder Endothelin-1 eine Herunterregulierung seiner Induktoren.<sup>36</sup>

*CTGF* stellt für die Fibrosierung einen wichtigen Bestandteil bei der *TGF $\beta$*  induzierten Fibronektin- und Kollagen 1 Synthese dar.<sup>38-40</sup>

## 2.3 Der Herzzyklus

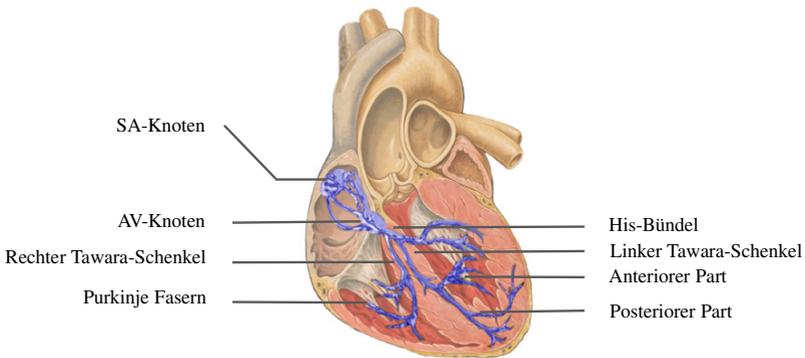
Um den Körper optimal zu versorgen, besteht die Hauptaufgabe des Herzens darin, den Bedürfnissen entsprechend, das Blut durch ununterbrochenes, regelmäßiges Pumpen durch den Lungen- und Körperkreislauf zu befördern. Erreicht wird dies durch die Erzeugung einer pulsartigen, gerichteten Strömung durch Einlass- (Atrioventrikularklappen) und Auslassventile (Semilunarklappen).

Atrien und Ventrikel arbeiten dabei im ständigen Wechsel von Systole und Diastole wobei sie zeitlich exakt aufeinander abgestimmt sind.

Während der Diastole wird eine Sogwirkung durch passive Erschlaffung der Ventrikelmuskulatur erzielt. Dabei fließt das Blut aus den Vorhöfen durch die geöffneten Atrioventrikularklappen in die Kammern. Im Anschluss kontrahieren die Atrien, um am Ende der Ventrikeldiastole zusätzlich aktiv Blut in die Kammern zu befördern, bis sich aufgrund des ansteigenden intraventrikulären Drucks die Atrioventrikularklappen wieder schließen. Die sich anschließende Systole unterteilt sich in Anspannungs- und Austreibungsphase, bei der sich durch weitere Erhöhung des intraventrikulären Druckes die Aorten- bzw. Pulmonalklappen öffnen, und das Blut in den Körper- bzw. Lungenkreislauf gelangt.<sup>41, 42</sup>

### 2.3.1 Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens

Das kardiale Erregungsbildungs- und Leitungssystem (CCS) besteht aus einer Folge hochspezialisierten Gewebes, das für die Initiierung und Koordinierung des Herzschlages verantwortlich ist. Im Wesentlichen besteht es aus fünf Bestandteilen: Dem Sinusknoten (SA-Knoten), dem Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), dem His-Bündel, dem linken und rechten Tawara-Schenkel, wobei sich der Linke in einen Anterioren und Posterioren aufteilt, und den Purkinje Fasern (Abbildung 1).<sup>43</sup>



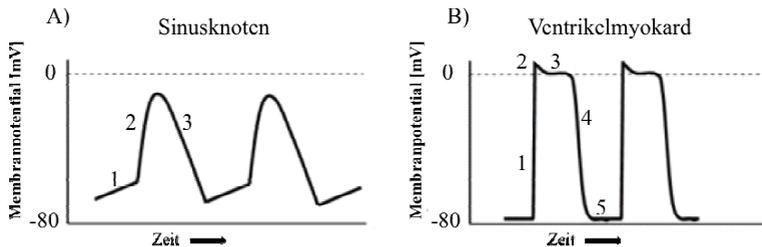
**Abbildung 1: Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens; adaptiert<sup>44</sup>**

Dargestellt sind die fünf Bestandteile des Erregungsbildungs- und Leitungssystems des Herzens: Der Sinusknoten (SA-Knoten) im rechten Vorhof; der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) am rechten Vorhof bei der Einmündung des Sinus Koronarius; das His-Bündel beim Durchtritt durch das Herzskelett im Septum; Linker und rechter Tawara Schenkel ziehen entlang des Septums, um in den Purkinje Fasern zu münden.

Der SA-Knoten ist der Schrittmacher des Herzens oder auch nomotopes Erregungsbildungszentrum und ist verantwortlich für die Initiierung des kardialen Aktionspotentials (AP), das nun über die Vorhöfe zum AV-Knoten und über His-Bündel, Tawara-Schenkel und schließlich über die Purkinje Fasern weitergeleitet wird.<sup>43</sup> Da Atrien und Ventrikel über einen fibrösen Ring elektrisch isoliert sind, bleibt als einzige Überleitung der AV-Knoten. In diesem erfolgt eine Verlangsamung der Leitung, um eine Füllung der Ventrikel durch Kontraktion der Atrien zu gewährleisten. Zudem hat der AV-Knoten eine wichtige Funktion als *backup pacemaker* und als Blockade, wenn der Vorhof z. B. im Falle von Vorhofflimmern zu schnell schlägt. His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje Fasern haben vor allem die Aufgabe, das AP schnell zu beiden Ventrikeln weiter zu leiten, damit beide gleichzeitig kontrahieren.<sup>43</sup>

In den Reizbildungszentren wie dem SA-Knoten kommt es aufgrund von Leckströmen zu potentialabhängigem Einwandern von  $\text{Na}^+$ -Ionen durch die *funny channels* und von Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) über die T-Typ-Kalzium-Kanäle, die einen langsamen Anstieg des Ruhepotentials, dem so genannten Präpotential, bewirken (Abbildung 2 A, 1). Obwohl  $\text{K}^+$ -Ionen entsprechend dem Konzentrationsgradienten die Zelle verlassen, kommt es aufgrund des überwiegenden Nettokationeneinstroms zur langsamen Depolarisation. Die langsam abnehmende Kaliumpermeabilität unterstützt den depolarisierenden Effekt der

einströmenden  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Nach Überschreiten des Schwellenwertes, ca.  $-40$  mV, erfolgt die Depolarisation v. a. über Öffnung der spannungsabhängigen LTCC und der T-Typ-Kalzium-Kanäle (Abbildung 2 A, 2). Aufgrund des Fehlens des schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstroms fällt die Depolarisation schwächer als im Myokard aus. An die Depolarisation schließt sich in den Schrittmacherzellen unmittelbar die Repolarisation an (Abbildung 2 A, 3). Diese beruht auf der Öffnung von  $\text{K}^+$ -Kanälen, die während der Depolarisation langsam aktiviert werden, um im Verlauf der Repolarisation wieder schrittweise inaktiviert zu werden. Zudem klingt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom rasch ab, wobei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über den  $3 \text{ Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wieder nach außen befördert werden.<sup>45,41</sup> Die Steilheit des Präpotentials nimmt vom SA-Knoten über AV-Knoten bis hin zu den Purkinjefasern ab, wodurch die Vorreiterstellung des SA-Knotens gesichert wird.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Aktionspotentials A) des Sinusknotens und B) des Ventrikelmyokards; adaptiert<sup>46</sup>**

**A) 1:** Potentialabhängiges Einwandern von Kationen liegt dem Präpotential zu Grunde; **2:** Bei Überschreiten des Schwellenpotentials kommt es durch Öffnung spannungsabhängiger Kanäle zur Depolarisation; **3:** Durch Ausstrom der  $\text{K}^+$ -Ionen erfolgt die Repolarisation

**B): 1:** In den Kardiomyozyten erfolgt als Antwort auf einen ankommenden Reiz die Depolarisation durch Öffnung von potential- und zeitgesteuerten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen; **2:** Über den schnell inaktivierbaren Kationenkanal erfolgt die initiale Repolarisation; **3:** Der für die Kardiomyozyten typischen Plateauphase liegt der  $3 \text{ Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und der kompensatorische Effekt des Kaliumausstroms zugrunde; **4:** Der  $\text{K}^+$ -Ausstrom verursacht die Repolarisation; **5:** Während des Ruhepotentials erfolgt keine Nettoladungsverschiebung.

Die Depolarisation des Ventrikelmyokards (Abbildung 2 B, 1) hingegen erfolgt durch das potential- und zeitgesteuerte  $\text{Na}^+$ -System sowie dem LTCC nach eintreffender Erregung. Nach überschießender Depolarisation findet durch den schnell inaktivierbaren Kationenkanal  $\text{T}_o$ , der für  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen gleichermaßen durchlässig ist, die initiale Depolarisation statt (Abbildung 2 B, 2). In der für das Myokard typischen Plateauphase ist die Nettoladungsverschiebung gleich Null (Abbildung 2 B, 3). Sie beruht auf dem

3  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, wobei sein depolarisierender Effekt durch einen Kaliumausstrom kompensiert wird. Durch verzögerte Aktivierung potential- und zeitgesteuerter Kaliumkanäle schließt sich die Repolarisation an (Abbildung 2 B, 4). Während des Ruhepotentials (Abbildung 2 B, 5), einem Kaliumgleichgewichtspotential, erfolgt keine Nettoladungsverschiebung.<sup>41</sup>

### 2.3.2 Regulation der Herztätigkeit

Die Pumpleistung des Herzens muss durch intra- und extrakardiale (nervale und humorale) Einflüsse den Bedürfnissen entsprechend angepasst werden.

Im Herzen liegende, autoregulatorische Mechanismen zur Anpassung der Herzleistung wurden erstmals von Otto Frank und E. H. Starling beschrieben, nach denen der Mechanismus zur Erhöhung der Pumpleistung bei Beibehaltung der Herzfrequenz auch benannt wurde.

Des Weiteren wird das Herz wesentlich über extrakardiale Mechanismen reguliert, bei denen neben der Pumpleistung auch die Herzfrequenz verändert wird. Das autonome Nervensystem, bestehend aus Sympathikus und Parasympathikus, wirkt über deren Transmitter, Noradrenalin und Adrenalin sowie Acetylcholin.

Die sympathische Wirkung auf die Schrittmacherzellen ist dabei positiv chrono-, ino-, und dromotrop. Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, v. a.  $\beta_1$ -Rezeptoren, die zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, führen über Aktivierung der zytosolischen Adenylatzyklase zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP), welches wiederum die Proteinkinase A (PKA) stimuliert. Dies resultiert in der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischem Retikulum, und zur Öffnung von LTCC mit entsprechendem Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die nun in großen Mengen verfügbaren freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermöglichen die Kontraktion der Myofilamente.

Im Gegensatz dazu wirkt der parasympathische Transmitter Acetylcholin antagonistisch. Durch inhibitorische G-Proteine bewirkt er eine Hemmung der Adenylatzyklase.<sup>42,41</sup>

### 2.3.3 Kommunikation der Kardiomyozyten

Die Herzmuskulatur besteht aus verzweigten quergestreiften Muskelzellen, die morphologisch in vielerlei Hinsicht den Skelettmuskelzellen ähneln, sich aber funktionell deutlich von ihnen unterscheiden und hier eher den glatten Muskelzellen ähneln.

Untereinander sind die Kardiomyozyten über Glanzstreifen (*intercalated discs*), bestehend aus Desmosomen (*Maculae adhaerentes*), Adhärenzkontakten (*Fasciae adhaerentes*) und großen Nexus (*gap junctions*), verbunden.<sup>47</sup>

*Gap junctions* sind Kommunikationsverbindungen, die einen direkten Austausch von chemischen oder elektrischen Signalen zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Sie sind weit verbreitet, vorzugsweise aber in Epithelien, glattem Muskelgewebe, im Herzmuskel und Nervengewebe.<sup>48</sup>

*Gap junctions* sind im adulten Herz an den *intercalated discs* zwischen Desmosomen und Adhärenzkontakten und nur im geringen Anteil an der lateralen Membran lokalisiert. Diese polare Verteilung und der geringe elektrische Widerstand der *gap junctions* führen zur longitudinalen Ausbreitung der elektrischen Erregung und synchronisieren die Kontraktion des Myokards.<sup>49, 50</sup>

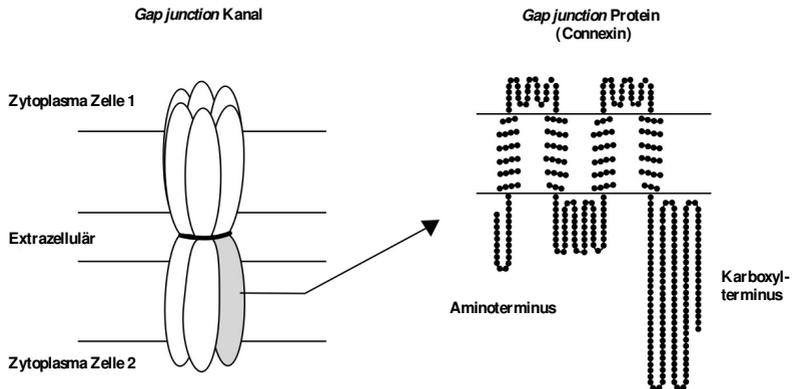
Ein *gap junction* Kanal besteht aus zwei Hemikanälen, den Connexonen (Abbildung 3), wobei jeder Bestandteil einer anderen Zelle ist. Ein Connexon besteht wiederum aus sechs Connexinmolekülen, die einen Tunnel bilden. Generell weisen die unterschiedlichen Isoformen der Connexine (Cx) eine hohe strukturelle Homologie auf und bestehen aus vier transmembranen Domänen mit einem intrazellulär lokalisierten Amino- und Karboxylterminus.<sup>49</sup>

Für mehr als eine Dekade wurde angenommen, dass Cx40, Cx43 und Cx45 allein für die Weiterleitung des elektrischen Impulses im Herzen verantwortlich sind. Seit kurzem ist nun auch Cx30.2 als viertes kardiales Cx beschrieben worden, welches vornehmlich im SA- und AV-Knoten lokalisiert ist.<sup>51, 52</sup>

Nach Cx43 ist Cx40 das zweithäufigste *gap junction* Protein des Herzkreislaufsystems und vorrangig in den Vorhöfen, den Endothelzellen und dem Reizleitungssystem lokalisiert, hierbei vor allem im His-Bündel und in den Purkinje Fasern. Cx43 ist in hohem Maße außerhalb des Erregungsleitungssystems im atrialen und ventrikulären Myokard exprimiert.<sup>49</sup> Cx45 ist hauptsächlich im SA- und AV-Knoten vertreten.

Die Cx-Isoformen weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Im Leitungssystem lokalisierte Connexine (45 und 30.2) zeichnen sich durch eine geringe Leitfähigkeit aus, um eine retrograde Erregung von den Ventrikeln zu den Atrien zu unterbinden. Um hingegen eine rasche Erregung und Kontraktion der atrialen und ventrikulären

Kardiomyozyten zu sichern, weisen Cx40 und Cx43 hingegen eine hohe Leitfähigkeit auf.<sup>51</sup>



**Abbildung 3: Aufbau eines gap junction Kanals; adaptiert<sup>49</sup>**

Schematische Darstellung eines gap junction Kanals. Er besteht aus zwei Connexonen, die wiederum aus sechs Connexinen bestehen. Diese wiederum enthalten vier transmembrane Domänen und einen intrazellulären Amino- und Karboxylterminus.

## 2.4 Arrhythmien

Einer physiologischen Herzaktion liegt ein normofrequenter, regelmäßiger Sinusrhythmus zugrunde und sie ist elektrokardiografisch von normal konfigurierten P-Wellen, PQ-Strecken und QRS-Komplexen sowie T-Wellen gekennzeichnet (siehe auch 4.5.4).<sup>53</sup> Bei Nichterfüllung dieser Kriterien liegt eine Arrhythmie vor. Für deren Entstehung können Störungen in der Erregungsbildung und -leitung ursächlich sein und zu einer abweichenden Depolarisationskaskade in Atrien und Ventrikeln führen.<sup>54</sup>

In einer entsprechenden Systematik können bradykarde von tachykarden Arrhythmien nach supraventrikulären und ventrikulären Erregungsbildungsstörungen differenziert werden.

### 2.4.1 Supraventrikuläre Tachykardien

In dieser Gruppe werden verschiedene Herzrhythmusstörungen zusammengefasst, die ihren Ursprung oberhalb der Ventrikel haben. Die Zuordnung wird nicht einheitlich

gehandhabt. Sie können jedoch nach Länge des Auftretens, Frequenz und Regelmäßigkeit unterteilt werden:

#### Atriale Extrasystolen

Sie entstehen durch vorzeitige Impulse innerhalb der Atrien, die denen des SA-Knotens zuvorkommen. Ein daraus resultierender unregelmäßiger Herzrhythmus und polymorphe, verbreiterte P-Wellen sind im EKG auffällig. Im weiteren Verlauf können Extrasystolen in atriale Tachykardien wie Flattern und Flimmern übergehen.<sup>55</sup>

#### Vorhofflattern

Beim Vorhofflattern schlagen die Atrien in einer regelmäßigen, stark erhöhten Frequenz, wobei nicht jeder Schlag von einer ventrikulären Kontraktion beantwortet wird. Die Episoden können paroxysmal oder permanent auftreten. Neben intraatrial generierten Impulsen sind auch ektopische Foki, die außerhalb der Atrien in den Vv. pulmonales lokalisiert sind, ursächlich.<sup>55,56</sup>

#### Vorhofflimmern (AF)

AF zeichnet sich durch eine extrem hohe und unregelmäßige Frequenz aus. Im Oberflächen-EKG ist kein physiologisches P mehr zu erkennen. Anstelle dessen zeichnet sich eine undulierende, teilweise sägeblattähnliche, isoelektrische Linie ab. AF ist die häufigste kardiale Arrhythmie mit einer Prävalenz von 0,4-1 % in der Bevölkerung.<sup>57</sup> Meist sind ältere Menschen betroffen. So sind es 4,6 % der über 65 Jährigen und 7,1 % der Menschen, die älter als 85 Jahre sind.<sup>58</sup> In der Framingham-Studie wurden zwischen 1968 und 1999 knapp 9.000 Menschen in einer Feldstudie auf die Entstehung von AF hin untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass Männer und Frauen  $\geq 40$  Jahre ein 25 %iges Risiko haben, im Laufe ihres Lebens AF zu entwickeln.<sup>59</sup>

Neben AF bei Hypertension, KHK, Klappenanomalien, Thoraxoperationen, Inflammation, infiltrativen Prozessen, endokrinologische Erkrankungen und Drogenmissbrauch wird idiopathisches AF in ca. 30 % der Patienten diagnostiziert.<sup>57</sup> Zusätzlich bilden Cx40 Genmutationen oder -polymorphismen und daraus resultierend veränderte Expressionsmuster im Atrium eine erhöhte Prädisposition, gezeigt in Studien mit familiärer Häufung von AF.<sup>60-62</sup>

AF gilt als eine selbst perpetuierende, progressive Erkrankung, bei der längere Episoden zu einem elektrischen und strukturellen Remodelling führen, das seinerseits ein Wieder-

auftreten und eine fortlaufende Verschlechterung von AF initiiert. Persistierendes AF folgt dem paroxysmalen und wird mit zunehmenden Veränderungsprozessen zum permanenten AF.

Zum elektrischen Remodelling der Atrien zählen vor allem Veränderungen in Ionenkanal- und *gap junction* Expressionen, die mit Änderungen in der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP) einhergehen.<sup>63-66</sup> Der später auftretende, strukturelle Umbau beinhaltet Veränderungen in der Größe der Mitochondrien, Untergang des sarkoplasmatischen Retikulums auf dem subzellulären Level, Myokardhypertrophie, Muskelfaserumordnung und Fibrosierung.<sup>63</sup>

Zusätzlich ist bekannt, dass auch das autonome Nervensystem mit beiden Anteilen, dem sympathischen<sup>67</sup> und dem parasympathischen,<sup>68</sup> einen großen Einfluss auf die Entstehung von AF hat.

#### **2.4.2 Ventrikuläre Tachykardien**

Herzrhythmusstörungen, deren Ursprung im Ventrikel zu suchen sind, können ebenfalls durch die Länge des Auftretens, Frequenz und Regelmäßigkeit unterteilt werden

##### Ventrikuläre Extrasystolen (VES)

Eine VES ist eine zusätzliche Erregung des Ventrikels außerhalb des Sinusrhythmus. Ihr liegt ebenfalls ein ektopischer Fokus zugrunde. Durch veränderte Lokalisation des elektrischen Impulses und verlangsamter Leitung erscheint ein verbreiteter und verzerrter QRS-Komplex im EKG. Ursächlich hierfür können z.B. Hypoxie, Anämie, Stauungsinsuffizienzen oder Infarkte sein.<sup>55</sup>

##### Kammertachykardien und -flattern

Kammertachykardien sind durch eine schnelle Folge regelmäßiger, ventrikulärer Aktivität gekennzeichnet. Ab einem Zeitraum von 30 Sekunden (s) spricht man von anhaltenden Kammertachykardien, kürzere Episoden werden als nicht-anhaltend bezeichnet. Die initiierenden Impulse kommen aus dem Ventrikel, wobei die Arrhythmie meist auf einem Reentry-Mechanismus basierend aufrechterhalten wird. Ventrikuläre Tachykardien mit besonders hoher, aber noch regelmäßiger Herzfrequenz nennt man Kammerflattern.

### Kammerflimmern

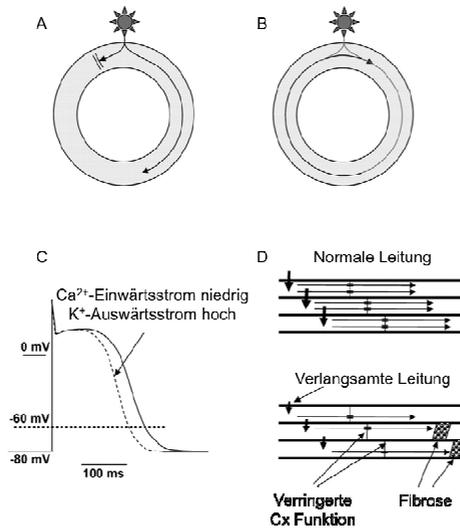
Eine extrem hohe Frequenz mit unregelmäßiger und unkoordinierter Aktivität des Ventrikels wird als Kammerflimmern bezeichnet. Im Oberflächen-EKG ist lediglich eine undulierende Nulllinie ohne physiologische Parameter zu erkennen. Erfolgt nicht innerhalb kürzester Zeit eine Defibrillation, führt dieser Zustand unmittelbar zum Tod.<sup>55</sup>

### **2.4.3 Pathophysiologie der Arrhythmien**

Laut dem 2009 veröffentlichten Jahresbericht der *WHO* bleiben kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache. Der plötzliche Herztod, dem meist ein tachysystolisches akutes Herzversagen zugrunde liegt,<sup>69</sup> gehört dabei zu einer der häufigsten Ursachen.

Nach Coumel et al.<sup>70</sup> bestimmen drei Faktoren die Arrhythmieeignung: das arrhythmogene Substrat, der initiiierende Trigger und ein modulierender Faktor. Reduzierte Kopplung erhöht dabei v. a. das arrhythmogene Substrat und fördert Reentrytachykardien.<sup>71</sup> Die Verkürzung der Leitungsgeschwindigkeit (CV) und der effektiven Refraktärphase (ERP) sind die Hauptfaktoren der Arrhythmogenese. Ihr kombinierter Effekt wird dabei als Wellenlänge beschrieben.<sup>72</sup> Eine Reduktion von CV oder ERP verringert die Wellenlänge, das wiederum die Wahrscheinlichkeit für Reentrytachykardien erhöht.

Die bestimmenden Faktoren für die Entstehung von Reentrytachykardien werden in Abbildung 4 zusammengefasst. Bei langsamer Leitung durch unterbrochene Zell-Zell-Kopplung und Fibrosierung (Abbildung 4 D) trifft die Erregung auf bereits postrefraktäres Gewebe (Abbildung 4 B), das zur Wiedererregung führt. Der Mechanismus wird durch Verkürzung der Refraktärphase bei erniedrigtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom und erhöhtem  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom unterstützt (Abbildung 4 C). Dies wiederum geschieht als Reaktion auf den getriggerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus intrazellulären Speichern durch die gesteigerte Exzitationsrate, um dem zytotoxischen Effekt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung entgegenzuwirken.<sup>73</sup>



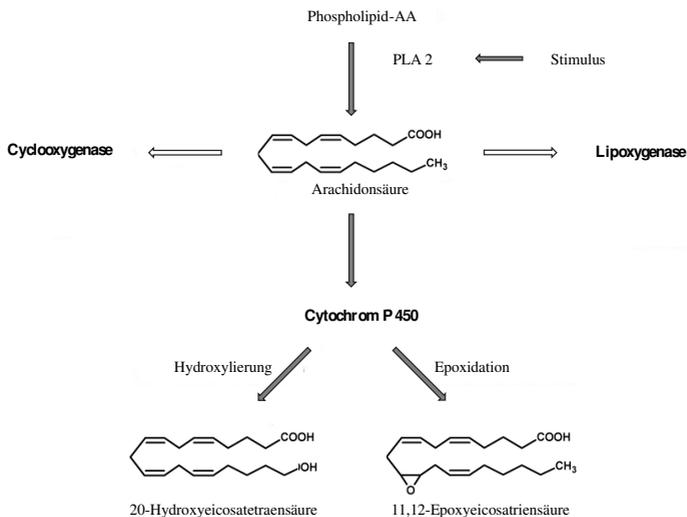
**Abbildung 4: Arrhythmieentstehung und deren Forcierung durch kardialen Umbau; adaptiert<sup>73</sup>**  
**A)** Der frühzeitige Impuls wird durch refraktäres kardiales Gewebe auf der einen Seite geblockt, auf der anderen erfolgt die Weiterleitung desselben durch postrefraktäres Gewebe. **B)** Bedingungen, die für die Erhaltung von Reentrytachykardien sorgen: kurze Refraktärphasen, langsame Leitung und langer Weg. **C)** Mechanismen, die in die Verkürzung der Refraktärphase involviert sind. **D)** Elektrisches und strukturelles Remodelling induzieren CV Verlangsamung.

## 2.5 Arachidonsäure Metabolismus

AA, die wichtigste mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA), bildet einen wichtigen Bestandteil von Membranphospholipiden und dient als Substrat verschiedener Enzyme (Abbildung 5). Da AA nicht *de novo* synthetisiert werden kann, muss sie direkt mit Fleisch und Milch aufgenommen oder aus Linolsäure, als Bestandteil von Pflanzenölen, synthetisiert werden.<sup>10</sup>

Stress induzierte Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) z. B. im Rahmen einer Ischämie setzt AA aus den Membranspeichern frei, wodurch AA nun als Substrat für einen der drei metabolischen Hauptwege zur Verfügung steht (Abbildung 5).<sup>74</sup> Cyclooxygenasen produzieren Prostaglandine, und Lipxygenasen metabolisieren AA zu Monohydroxiden und Leukotrienen.<sup>21</sup> Diese Enzyme bilden bereits seit langem bekannte, potente Angriffspunkte für Pharmaka wie den Cyclooxygenase-Antagonisten zur Analgesie und Entzündungshemmung sowie Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten in der Behandlung von Asthma.

Den dritten Weg zur Metabolisierung von AA bilden CYP Enzyme, die als Monooxygenasen agieren und je nach Subfamilie hydroxilieren, epoxidieren oder allylisch oxidieren. Entstandene AA Metabolite wie z. B. EET und 20-Hydroxyeicosatetraensäure fungieren als sekundärer Botenstoff für eine Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation vaskulärer, renaler und kardialer Funktionen.<sup>10</sup>



**Abbildung 5: Bioaktivierung von Arachidonsäure; adaptiert<sup>10</sup>**

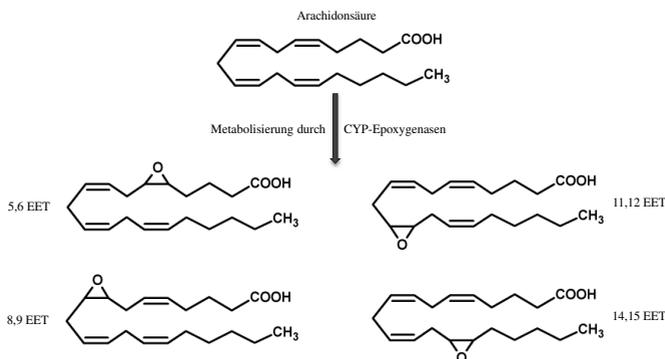
Freisetzung von Arachidonsäure (AA) durch Phospholipase A2 (PLA2) und deren Metabolisierung durch Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochrom P 450 Enzyme. Der Subfamilie entsprechend hydroxilieren oder epoxidieren diese AA.

### 2.5.1 CYP-Epoxygenasen

Studien der letzten 50 Jahre ergaben, dass die Menge und die Qualität des alimentären Fettes einer der wichtigsten modifizierbaren Risikofaktoren bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen ist.<sup>75, 76</sup> Neuste Daten indizieren, dass der CYP Zweig des AA Metabolismus vielversprechende Möglichkeiten zur Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung bietet.

AA metabolisierende CYP-Isoformen gehören größtenteils den Subfamilien CYP2C und 2J an und sind v. a. am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Sie fügen eine Epoxy-

Gruppe an eine der vier Doppelbindungen der AA an, und formen so vier mögliche regioisomere EETs (Abbildung 6).<sup>77</sup>



#### Abbildung 6: Epoxyeicosatriensäure Regioisomere

Je nach Position der angefügten Epoxy-Gruppe durch CYP-Epoxygenasen an die Arachidonsäure entstehen vier mögliche Regioisomere der Epoxyeicosatriensäuren (EETs).

Die Epoxy-Gruppe kann in zwei verschiedenen Konfigurationen an die Doppelbindung angefügt werden, so dass jeder der vier Regioisomere als R/S- und S/R-Enantiomer vorhanden sein kann. Jedes CYP-Isozym unterscheidet sich in Regio- und Stereoselektivität.<sup>78</sup> So generiert das CYP2J2, das im Endothel und v. a. im menschlichen Herzen exprimiert ist, zu 40 % 14,15-EET, wobei 76 % davon als 14(R),15(S)-EET vorliegen.<sup>10</sup>

### 2.5.2 Wirkungen der Epoxyeicosanoide

EETs sind autokrine und parakrine Mediatoren, die hauptsächlich auf das kardiovaskuläre und renale System wirken.<sup>7-9</sup> Dennoch widmete man ihnen bis zur Mitte der 1990er Jahre wenig Aufmerksamkeit. Dies änderte sich mit der Entdeckung, dass sie im Koronar-endothel synthetisiert werden und als endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (EDHF) wirken.<sup>79, 80</sup> Als Antwort auf vasodilatatorische Hormone wie Bradykinin und Acetylcholin werden sie synthetisiert und führen durch Aktivierung des großen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $BK_{(Ca)}$ -channel) zur Hyperpolarisierung und damit zur Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen mit resultierender Vasodilatation und Hypotension.

Weitere wesentliche Effekte der EETs sind antiinflammatorische, durch Inhibierung der zytokininduzierten NF-kappaB Transkription,<sup>11</sup> und fibrinolytische, über gesteigerte Transkription des *tissue plasminogen activator* (t-PA) Gens durch Aktivierung des cAMP-sensitiven Promoters.<sup>14</sup> Ebenso wurden mitogene, angiogenetische,<sup>81, 82</sup> bronchodilatatorische Eigenschaften von EETs und verringerte Adhäsion von Thrombozyten beschrieben.<sup>83</sup>

Für das kardiovaskuläre System wichtige Ionenkanäle scheinen nach neusten Erkenntnissen ebenfalls durch EETs in ihrer Aktivität reguliert zu werden. So werden eine gesenkte Öffnungsbereitschaft des myokardialen Na<sup>+</sup>-Kanals<sup>84</sup> und eine Modulation des LTCC beschrieben.<sup>15, 16</sup> Durch gesenkte Sensitivität zu Adenosintri-phosphat (ATP) wird der myokardiale K<sub>ATP</sub>-Kanal aktiviert<sup>85,86</sup> und schützt das Myokard gegen Ischämie/Reperfusionsschaden.<sup>87</sup> Durch diese Wirkungen ist ein wesentlicher Einfluss auf die elektrische Aktion des Herzens gewährleistet.

Eine verringerte EET Produktion wurde als mögliche Ursache für erhöhte kardiovaskuläre Erkrankungs-raten diskutiert,<sup>13</sup> weil ein Polymorphismus des humanen CYP2J2 Gens, welches im Herz in hohem Maße exprimiert und maßgeblich in der Biosynthese von EETs involviert ist, mit einem erhöhten Risiko an Erkrankungen der Koronargefäße assoziiert wurde.<sup>88</sup>

In Versuchen mit CYP2J2 transgenen Mäusen, die auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, konnte von D. C. Zeldin und J. Seubert eine verbesserte Erholung nach Ischämie/Reperfusion am isoliert perfundierten Herz nach Langendorff unter Beteiligung des mitochondrialen ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanals und des p42/p44 mitogen aktivierten Proteinkinase Signalwegs (MAPK)<sup>87</sup> sowie eine Protektion gegen Doxorubicin induzierte Kardiotoxizität gezeigt werden.<sup>89</sup> Des Weiteren konnte in isolierten Kardiomyozyten von CYP2J2 transgenen Mäusen eine Verkürzung des APs aufgrund eines erhöhten K<sup>+</sup>-Auswärtsstroms beschrieben werden.<sup>16</sup> Im Gegensatz zu dem inhibierenden Effekt von EETs auf den porzinen LTCC wurde in der CYP2J2 transgenen Maus eine gesteigerte LTCC-Aktivität aufgrund erhöhter Phosphorylierung nach Aktivierung des cAMP/PKA Systems beschrieben.<sup>90</sup> Die teils kontroversen Aussagen leiten sich wahrscheinlich von dem Faktum ab, dass regio- und enantiomer bedingte unterschiedliche Wirkungen außer Acht gelassen wurden.

### 3 Zielstellung

EETs regulieren  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle<sup>15, 16</sup> und nehmen dadurch Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften des Herzens. In kardialen Hypertrophie-Modellen konnte bereits durch pharmakologische Inhibierung der sEH und in sEH Ko Modellen mit resultierender Akkumulation von EETs der antiarrhythmische Effekt der EETs gezeigt werden.<sup>17, 18</sup>

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine erhöhte EET Produktion durch eine kardiale Überexpression des humanen CYP2J2 in zwei unterschiedlichen kardialen Hypertrophie-Modellen der Maus auf deren antiarrhythmischen Effekt hin zu untersuchen. Als Nachahmung pathologischer Hypertrophie des Menschen in der Maus wurde zum einen das häufig genutzte Modell der chronischen Druckbelastung nach transversaler Aortenkonstriktion, und zum anderen die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol genutzt. Für den Menschen ist bekannt, dass beide Bedingungen mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Tachykardien und AF einhergehen. Insbesondere für letzteres gibt es bisher kein etabliertes und leicht verfügbares Modell der Maus, so dass ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit der Untersuchung der Frage diente, ob nach chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Maus AF induziert werden kann.

Insbesondere sollte untersucht werden, welchen Effekt eine kardiospezifische Überexpression des CYP2J2 auf strukturelles und elektrisches Remodelling in der kardialen Hypertrophie hat und welche molekularen Mechanismen an der antiarrhythmischen Wirkung beteiligt sind.

#### 3.1.1 Arbeitsaufgaben

Im Detail sollen folgende Arbeiten zur Beantwortung obiger Fragen durchgeführt werden:

- I. Etablierung des Hypertrophie-Modells der chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Hilfe von osmotischen Minipumpen.
- II. Charakterisierung von Hypertrophie und Herzfunktion in den Modellen der transversalen Aortenkonstriktion und chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation von CYP2J2 Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren mittels Echokardiografie und Auswertung von Herzgewichten.

- III. Erforschung des strukturellen Remodellings in beiden Hypertrophie-modellen durch Untersuchung der Fibrose in Histologie und Immunhistologie sowie der RNS-Expression relevanter Proteine der EZM.
- IV. Untersuchung des elektrischen Remodellings beider Hypertrophie-modelle in der Histologie und Immunhistologie sowie entsprechender Expression auf RNS-Level relevanter Ionenkanäle und Connexine. Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch *in vivo* EKGs und elektrophysiologische Untersuchungen (EPU).
- V. Exploration der Induktion atrialer und ventrikulärer Arrhythmien mittels programmierter *in vivo* EPU beider Hypertrophie-modelle.
- VI. *Ex vivo* Analyse von Arrhythmien im isoliert perfundierten Herz nach Langendorff zur Erlangung neuer Erkenntnisse zur Wirkungsweise von EETs.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

**Tabelle 1: Übersicht über verwendete Materialien für das tierexperimentelle Arbeiten**

Verbrauchsmaterialien	
Augensalbe; Regepithel	Alcon Pharma
Enthaarungscreme	Veet
Nadel-Faden-Kombination 3.0	Ethicon
Osmotische Minipumpen; Modell 1004	Alzet
Reaktionsgefäße	Eppendorf

Chemikalien und Reagenzien	
(+) (-)-Isoproterenol Hydrochlorid	Sigma Aldrich
2-Methylbutan	Roth
Diazoxid; D9035	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich
Formaldehydlösung	Merck
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm
Isofluran	Abott
Natrium-Chlorid Lösung, 0,9 %ig	Braun
Xylocain-Gel 2% ig	AstraZeneca

Elektrische Geräte	
Portable Elektrophysiologie Einheit; EP Tracer	Cardio Tek
Elektrophysiologischer Katheter, 2F	NuMed Inc.
HSE <i>Data Aquisition Hardware</i> , Plugsy	Harvard Apparatus
Kaltlichtlampe	Schott KL 1500 electronic
Mikroskop SM33	Hund Wetzlar
Mikroskop; Technival 2	Carl Zeiss Jena
Narkoseeinheit	Univentor 400
Perfusor; MA1 70-2208, Modell 11 Plus	Harvard Apparatus
Präzisionswaage	Sartorius

Elektrische Geräte	
Rollenpumpe; Modell ISM 834C	Ismatic
Setup für das isolierte Herz nach Langendorff	Hugo Sachs Elektronik; Harvard Apparat
Ultraschallgerät; Vevo 770 Version 1.2.0	Visual Sonics
Wärmepumpe; Lauda E 100	Ecoline Staredition
Wärmetisch mit rektaler Temperaturkontrolle	Harvard Apparat

**Tabelle 2: Übersicht über verwendete Materialien für Genexpressionsanalysen**

Verbrauchsmaterialien	
2,8 mm Precellys-Keramikkügelchen	Peqlab
High-Capacity cDNS Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

Chemikalien und Reagenzien	
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Chloroform	Merck
DNase Set	Qiagen
Ethanol	Carl Roth
QIAzol Lysepuffer	Qiagen
RNS-, DNS-, RNase- und DNase freies Wasser	Fluka Chemie
RNase Away®	Molecular Bio Products

Elektrische Geräte	
DNS Thermocycler	Perkin Elmer
Homogenisator	Precellys
Spectrophotometer; NanoDrop 100	PeqLab
TaqMan 7.500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

**Tabelle 3: Übersicht über verwendete Materialien für die Histologie**

Verbrauchsmaterialien	
Einbettkassetten	Roth
Objektträger; Superfrost Plus	Thermo Scientific
Roti Histokitt	Roth

Chemikalien und Reagenzien	
Aceton	Mallinckroth Baker
Ethanol	Carl Roth
Eosin	Sigma Aldrich
Essigsäure	Merck
Meyers Haemalaun-Lösung	Sigma Aldrich
Natriumcitratpuffer	Merck
Paraffin	Sherwood Medical
Phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco
Pikrinsäure	Sigma Aldrich
Sirius Rot	Sigma Aldrich
Toluol	Sigma Aldrich
Weigert's Eisenhämatoxylin	Dr. K. Hollborn&Söhne
Xylol	Sigma Aldrich

Elektrische Geräte	
Axioplan-2 Imaging Mikroskop	Carl Zeiss
Dampfkocher; Vitacuisine	Tefal
Gewebeeinbett-Automat; Techno Tec 1	Pathotec GmbH
Rotationsmikrotom; HM 355S	Microm

Verbrauchsmaterialien für die Immunhistochemie	
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Vector Labs
Anti-IgG, Cy 3 conjugated (donkey anti-m)	Jackson
Esel Serum	Dianova
Vectashield® Mounting Medium mit DAPI	Vector Labs

## 4.2 Tiere

Tierart:	Maus, 8 Wochen
Stamm:	Kardiomyozytenspezifisch überexprimierende CYP2J2 transgene Tiere (siehe 4.2.1) und Wildtyp C57BL/6N Wurfgeschwister
Geschlecht:	männlich

Die für die Experimente benötigten, transgenen Mäuse wurden von Dr. Darryl. C. Zeldin (*NIH/NIEHS, North Carolina*) entwickelt und uns zur Zucht und zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für die Versuchsvorhaben, G0360/06 und G0374/09, die vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt wurden.

Die Mäuse wurden seit März 2008 in IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*) in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums (MDC) Berlin gehalten und gezüchtet. Sie erhielten autoklaviertes Wasser und Futter (Tabelle 4, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) ad libitum und hatten einen 12 h Tag/Nacht Rhythmus.

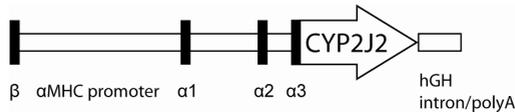
**Tabelle 4: Zusammensetzung der Alleinfuttermittel zur Zucht und Haltung von Mäusen**

Artikelbezeichnung	Futter zur Zucht von Mäusen V112x M-Z autoklavierbar	Futter zur Haltung von Mäusen V153x R/M-H autoklavierbar
Rohprotein, XP [%]	22	19
Rohfett, XL [%]	4,5	3,3
Rohfaser, XF [%]	3,9	4,9
ME [MJ/kg]	13,6	12,9
XP/ME [g/MJ]	16,2	14,7

### 4.2.1 Kardiomyozytenspezifische Überexpression des humanen CYP2J2

Zur Untersuchung des hauptsächlich im menschlichen Herzen und Endothel vorkommenden CYP2J2 auf wissenschaftlich und klinisch relevante Fragestellungen hin generierte Dr. Darryl. C. Zeldin (*NIH/NIEHS, North Carolina*) eine transgene Maus mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des humanen CYP2J2.<sup>87</sup> Die Vorarbeit zur Klonierung des humanen CYP2J2 lieferten Wu et al.<sup>91</sup> Um eine kardiomyozytenspezifische Überexpression zu erreichen, wurde die cDNS in den pBS- $\alpha$ MHC-hGH Vektor kloniert (Abbildung 7), der von Dr. Jeffrey Robbins (*University of Cincinnati, Ohio*) zur

Verfügung gestellt wurde. Um die transgene mRNS-Stabilität zu erhöhen, wurde eine menschliche Wachstumshormon-(hGH)/polyA-Sequenz eingefügt.<sup>92</sup>

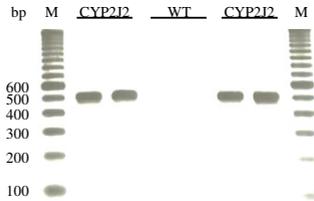


**Abbildung 7:  $\alpha$  MHC Promoter zur kardiomyozytenspezifischen Überexpression des CYP2J2**

Das linearisierte Transgen wurde in Pronuklei der Einzelzellen von C57BL/6N Maus-embryonen (Taconic, *Germantown, New York*) mikroinjiziert und in scheinchwangere Mäuse implantiert. *Founder* wurden durch eine Kombination aus Polymerase Kettenreaktion (PCR) und *Southern Blot* der genomischen DNA identifiziert.<sup>93</sup> Transgene Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des menschlichen CYP2J2 wurden daraufhin mit C57BL/6N Tieren gekreuzt. In der weiteren Zucht wurden nur heterozygote Tiere verpaart und zu Forschungszwecken verwandt.

#### 4.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde von der technischen Angestellten Frau Christel Andree (MDC Berlin) durchgeführt. Dazu entfernte sie Mäusen im Alter von vier Wochen ein Stück der Schwanzspitze. Aus dieser wurde die genomische DNS durch Proteinase K-Verdau isoliert und mittels PCR mit dem PCR Master Mix Y (Peqlab) amplifiziert. Dafür wurden spezielle CYP2J2 Primer verwendet. Die Sequenzen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die Auswertung des Amplifikats erfolgte nach der Gelelektrophorese mit einem Agarosegel (2 % in TAE-Puffer) bei 100 V für 30 min. Das Ergebnis wurde fotografisch festgehalten. Der Genotyp der Maus konnte anhand der Länge des Amplifikats, ca. 500 Basenpaar (bp), klar definiert werden. Da das CYP2J2 Gen humanen Ursprung hat, wurde bei den WT Tieren keine Bande entwickelt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Gelelektrophoresebild des CYP2J2 Amplifikats**

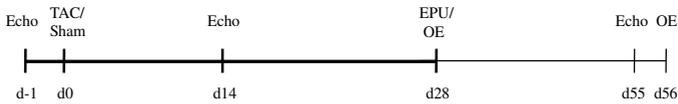
Zur Genotypisierung der Mäuse im Alter von vier Wochen wurde nach Isolierung der genomischen DNS aus der Schwanzspitze und anschließender PCR eine Gelelektrophorese mit CYP2J2 Primern durchgeführt. CYP2J2 Mäuse zeigten eine Bande im Bereich von 500 Basenpaaren (bp), welche durch die beidseitig mitgelaufenen Marker (M) definiert werden konnte. WT Tiere wiesen keine Bande auf.

**Tabelle 5: Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintriphosphat, (G) Desoxyguanosintriphosphat, (C) Desoxycytosintriphosphat, (T) Desoxythymidintriphosphat**

Gen	Primersequenz 5'→3'	Amplikon- länge
<i>CYP2J2</i>	Fw: GGC ACT CTT AGC AAA CCT CAG G	ca. 500
	Rev: AGC CAG TAA TAA GAA CTG CAG A	

### 4.3 Versuchsdesign der kardialen Hypertrophie durch chronische Druckbelastung (TAC)

Um den Einfluss kardiomyozytenspezifischer Überexpression des humanen CYP2J2 auf die chronische Druckbelastung im Tierexperiment zu untersuchen, wurde von Dr. Christina Westphal (MDC Berlin) an acht Wochen alten, männlichen Mäusen eine TAC OP durchgeführt und mir für den weiteren Versuch zur Verfügung gestellt (Abbildung 9). Die Kontrollgruppen wurden nur Schein TAC operiert (Sham). Dabei fanden CYP2J2 transgene und WT Tiere Verwendung. Zur Erhebung basaler morphologischer und funktioneller Parameter des Herzens wurden die Tiere echokardiografisch untersucht. Zur Verlaufskontrolle wurden die Tiere 14 Tage nach Induktion der chronischen Druckbelastung erneut untersucht. Am Tag 28 erfolgte die elektrophysiologische Untersuchung der Tiere, nach welcher sie durch zervikale Dislokation getötet wurden, um Organe zur weiteren molekularbiologischen und histologischen Untersuchung zu gewinnen.



**Abbildung 9: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierexperiments der chronischen Druckbelastung durch TAC**

Echokardiografie (Echo), elektrophysiologische Untersuchung (EPU), Organentnahme (OE), transversale Aortenkonstriktion (TAC).

Um den längerfristigen Verlauf der chronischen Druckbelastung zu untersuchen, wurden die Tiere in einer vorherigen Studie durch eine zusätzliche, echokardiografische Untersuchung an Tag 55 post TAC charakterisiert und am 56. Tag getötet, und Organe zur weiteren Aufbereitung entnommen.

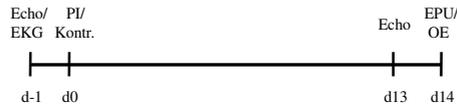
**Tabelle 6: Übersicht über die Gruppenverteilung**

Genotyp	Behandlung	Tierzahl
WT	Sham	7
CYP2J2	Sham	6
WT	TAC	5
CYP2J2	TAC	6

#### 4.4 Versuchsdesign der kardialen Hypertrophie durch chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation (Iso)

In einem zweiten Hypertrophiemodell wurde von mir der Einfluss der kardiomyozyten-spezifischen Überexpression des humanen CYP2J2 auf die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol (Iso) getestet. In diesem Versuchsteil fanden dieselben Tiere wie unter Punkt 4.2 bereits beschrieben Verwendung, jedoch gingen diese erst im Alter von 11 Wochen in den Versuch ein (Abbildung 10). Zur basalen Charakterisierung morphologischer und funktioneller Parameter des Herzens wurden die Tiere vor der Implantation der Minipumpen echokardiographisch und elektrokardiografisch untersucht. Diese Untersuchung wurde nach 13 tägiger Infusion von Iso (40 mg/kg/d; Isoproterenol Hydrochlorid; Sigma Aldrich) erneut durchgeführt. Nach zweiwöchiger, chronisch beta-adrenerger Stimulation erfolgte eine elektrophysiologische und elektrokardiografische Untersuchung sowie die Entnahme der Organe nach zervikaler Dislokation für weitere molekularbiologische und histologische Untersuchungen.

Bei entsprechenden Kontrollgruppen wurden die osmotischen Minipumpen mit NaCl-Lösung gefüllt.



**Abbildung 10: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierexperiments der chronischen beta-adrenergen Stimulation durch Iso**

Echokardiografie (Echo), Elektrokardiogramm (EKG), elektrophysiologische Untersuchung (EPU), Organentnahme (OE), Pumpenimplantation (PI), transversale Aortenkonstriktion (TAC).

**Tabelle 7: Übersicht über die Gruppenverteilung**

Genotyp	Behandlung	Tierzahl
WT	Vehikel	8
CYP2J2	Vehikel	5
WT	Iso	9
CYP2J2	Iso	8

## 4.5 Tierexperimentelles Arbeiten

### 4.5.1 Transversale Aortenkonstriktion

Die TAC OP der Mäuse wurde von Frau Dr. Christina Westphal (MDC Berlin) durchgeführt. Die chronische Druckbelastung wurde durch Ligation der Aorta zwischen der A. carotis communis sinistra und dem Truncus brachiocephalicus induziert. Die Standardisierung des Durchmessers erfolgte unter Zuhilfenahme einer 26 Gauge Nadel auf 0,46 mm. Anschließend wurden mir die Tiere zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt.

### 4.5.2 Implantation der osmotischen Minipumpen

Als experimentelles Hypertrophiemodell wurde bereits häufig die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Iso beschrieben. Innerhalb von zwei Wochen erzeugte diese eine deutliche kardiale Hypertrophie, Abnahme der Kontraktilität und Dilatation. Da zwischen dem Einsatz von 30 mg/kg/d und 60 mg/kg/d kein wesentlicher Unterschied in der Hypertrophie, jedoch in der Mortalität beschrieben wurde,<sup>94, 95</sup> ist in der vorliegenden Arbeit eine Dosierung von 40 mg/kg/d angewendet worden.

Um eine kontinuierliche Infusion zu erreichen, wurden von mir osmotische Minipumpen (Modell 1004; Alzet) verwendet. Durch osmotische Druckdifferenz und resultierender

Diffusion der Gewebeflüssigkeit in die Pumpe durch eine semipermeable Membran wird eine innenliegende Kavität komprimiert und darin enthaltene Lösungen werden kontinuierlich infundiert.

Dazu wurden am Abend vor der Implantation die Pumpen mit einem Fassungsvermögen von 100 µl mit einer NaCl-Iso-Lösung gefüllt und zur Aktivierung für 12 h in eine 0,9 %ige NaCl-Lösung verbracht. Am nächsten Tag wurden die Mäuse zur Implantation mit 2 % Isofluran (Abott) in einer Kammer (Univentor 400) narkotisiert, wobei die Tiefe durch Überprüfung der Pupillen- und Zwischenzehenreflexe überprüft wurde. Nach Ausfall der Reflexe wurden sie auf einem Wärmetisch mit rektaler Temperaturkontrolle verbracht (*Homeothermic Blanket Control Unit*; Harvard Apparatus) und die Narkose auf 1,5 % Isofluran und 360 ml Luft/min herunterreguliert. Für die Dauer der OP wurde eine schützende Augensalbe (Regepithel; Alcon Pharma) aufgetragen. Nach Enthaarung (Vee) wurde im Bereich des Nackens ein Hautschnitt gesetzt, mit einer Schere subkutan und stumpf bis zur rechten Flanke präpariert und eine am Tag vorher gefüllte Alzet-Minipumpe mit einer Pinzette in der entstandenen Hauttasche positioniert. Die Wunde wurde durch zwei Einzelhefte mit einer 3.0 Nadel-Faden-Kombination (Ethicon) verschlossen. Eine lokale Schmerzbehandlung erfolgte durch das Auftragen von Xylocain-Gel. Die gesamte Operation dauerte etwa 15 Minuten.

#### **4.5.3 Echokardiografie**

Zur nichtinvasiven, morphologischen und funktionellen Untersuchung des Herzens bietet die Echokardiografie optimale Voraussetzungen am lebenden Tier. Die Untersuchung wurde von erfahrenen Mitarbeitern der *corefacility*-Ultraschall am MDC Berlin durchgeführt. Sie verwendeten ein Schallgerät von Visual Sonics (*Visual Sonics*, Vevo 770 Version 1.2.0) mit dem Schallkopf RMV710 (*Visual Sonics*).

Dabei wurden die Tiere eigenständig zur Narkose vorbereitet und mit 2 % Isofluran über eine Narkoseeinheit betäubt, wobei die Tiefe durch Pupillen- und Zwischenzehenreflexe überprüft wurde. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf einen Wärmetisch mit rektaler Temperaturkontrolle verbracht, der Thorax enthaart und die Narkose auf 1,5 % herunterreguliert.

Die ungefähr zweiminütige echokardiografische Untersuchung wurde von Mitarbeitern der *core facility* Ultraschall durchgeführt. Dabei erfolgte die Darstellung des Herzens in

der parasternalen Achse im M- und B-Modus. Der M-Modus beschreibt dabei die zeitliche Veränderung der Position der unterschiedlichen Herzstrukturen. Der B-Modus hingegen beschreibt ein zweidimensionales Bild über die Tiefen- und Längenausdehnung des Gewebes.

Durch Anfertigung eines EKGs über die bipolare Extremitätenableitung nach Einthoven wurde die Herzaktivität überwacht.

Die Auswertung einer repräsentativen, 10 s langen Aufnahme sowie Interpretation und Darstellung der Daten wurde im weiteren Verlauf in Eigenarbeit durchgeführt.

#### 4.5.4 Elektrokardiografie

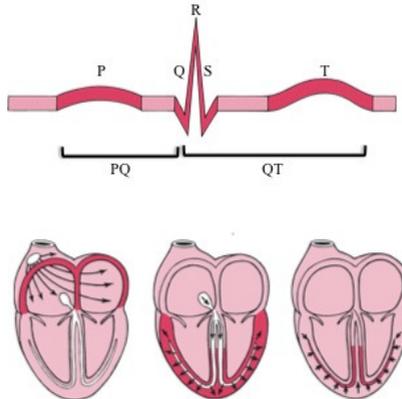
Die Ableitung der elektrischen Herzaktivität erfolgt durch das Oberflächen-EKG. Grundlage dafür bilden die Aktionspotentiale des Herzens, die einen elektrischen Dipol ausbilden und als Summe (Integralvektor) an der Hautoberfläche als Spannungs-Zeit-Kurve messbar sind. Die Ableitung zur Aufzeichnung von drei bipolaren EKGs (I, II, III) wurde von Einthoven standardisiert. Neben diesen hat Goldberger auch unipolare Ableitungen entwickelt, bei denen jeweils eine der drei Ableitelektroden über einen hochohmigen Widerstand zu einer indifferenten Elektrode, der Erdungselektrode, verbunden wird. So ergeben sich weitere drei Ableitungen (aVR, aVL, aVF).<sup>41</sup>

Für die eigenständig durchgeführte Untersuchung wurden die Mäuse mit 2 % Isofluran narkotisiert. Nach Ausfall der Reflexe wurden sie auf einen Wärmetisch mit rektaler Temperaturkontrolle verbracht und die Narkose auf 1,5 % Isofluran und 360 ml Luft/min herunterreguliert. Im Folgenden wurden nun vier Stechelektroden an den Extremitäten angebracht und das EKG für eine Minute aufgenommen (*EP Tracer*; Cardio Tek).

Im Oberflächen-EKG beschreiben EKG-Zacken die Erregungsausbreitung und -rückbildung (Abbildung 11). Die intraatriale Erregungsausbreitung wird durch die Länge der P-Welle beschrieben. Das PQ-Intervall gibt hingegen Aussagen über die atrioventrikuläre Überleitungszeit. Der sich anschließende QRS-Komplex zeigt die intraventrikuläre Erregungszeit an. Die Länge der T-Welle am Ende eines Erregungszyklus gibt Auskunft über die Repolarisation des Ventrikels, wobei die QT-Strecke die gesamte ventrikuläre Erregung und Repolarisation angibt. Da diese natürlich auch frequenzabhängig ist, wurde die frequenzorientierte QT-Zeit nach Bazett mit der Formel  $QTc = QT\text{-Zeit}/\sqrt{RR\text{-Abstand}}$  berechnet. Routinemäßig erfolgte die Auswertung repräsentativer, 10 s langer Abschnitte

des EKGs über die II. Extremitätenableitung. Die Daten wurden als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) angegeben.

Neben den bereits genannten Parametern wurde ebenfalls das RR-Intervall zur Errechnung der Herzfrequenz mit der Formel  $60.000/\text{RR-Intervall}$  gemessen.



**Abbildung 11: Komponenten des Oberflächen-EKGs; adaptiert<sup>96</sup>**

Der P-Welle entspricht die intraatriale Erregungsausbreitung. Die Herzkammererregung wird durch den QRS-Komplex beschrieben. Die T-Welle repräsentiert die ventrikuläre Repolarisationszeit. Das PQ-Intervall definiert die atrioventrikuläre Überleitungszeit, während die QT-Zeit die gesamte ventrikuläre Erregungszeit mit anschließender Repolarisation umfasst.

#### 4.5.5 *In vivo*, die elektrophysiologische Untersuchung

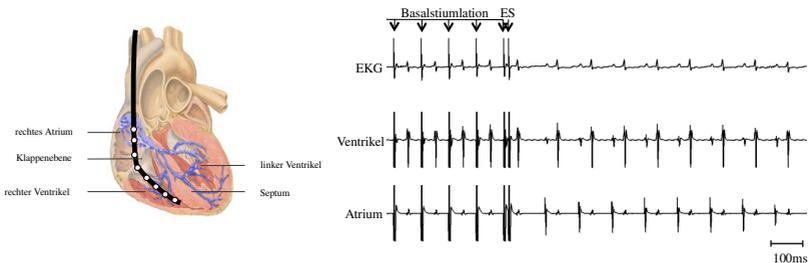
Die eigenständig durchgeführte EPU ist der internationale Goldstandard zur Charakterisierung der Erregungsbildungs- und Leitungseigenschaften des Herzens. Neben Aussagen über Parameter wie Refraktärzeiten des Myokards und des Leitungssystems, ist es möglich, über etablierte Stimulationsprotokolle die Induktion von Herzrhythmusstörungen zu untersuchen. Beim Menschen stellt sie mittlerweile klinische Routinediagnostik dar und wurde 1997 von Berul et al.<sup>97</sup> in der Wissenschaft bei der Maus etabliert.

Nach Einleitung der Narkose wurden die Mäuse auf dem Rücken liegend über eine Gasmaske kontinuierlich mit einem 2 %igen Isofluran-Luft-Gemisch begast. Zur Ableitung des Oberflächen-EKGs wurden vier Stechelektroden angebracht (siehe 4.5.4).

Nach ausreichender Ausleuchtung (Schott KL 1500 electronic) wurde im Folgenden die V. jugularis dextra externa mit Schere und Pinzette (Fine Science Tools) freipräpariert und

im kranialen Bereich mit einem Seidenfaden (4-0 *Silk Braided Black*; SMI) abgebunden und gestrafft. Um den kaudalen Bereich wurde ein zweiter Knoten angebracht, der jedoch noch nicht zugezogen wurde. Unter dem Mikroskop (SM33; Hund Wetzlar) wurde eine an der Spitze angewinkelte 23 Gauge Kanüle in die Vene eingeführt und angehoben. Durch die entstehende Öffnung wurde ein 2F elektrophysiologischer Katheter (NuMed Inc.) mit acht Ringlelektroden in die V. jugularis dextra externa und die sich anschließende V. subclavia dextra in das rechte Atrium und weiter in den rechten Ventrikel vorgeschoben.

Die Positionierung des Katheters erfolgte so, dass die apikalen vier Elektroden im Ventrikel lagen, was an kräftigen, mit dem QRS-Komplex aus dem Oberflächen-EKG zusammenfallenden Ausschlägen festzustellen war (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Katheterpositionierung im rechten Ventrikel mit entsprechender elektrophysiologischer Aufzeichnung, adaptiert<sup>44</sup>**

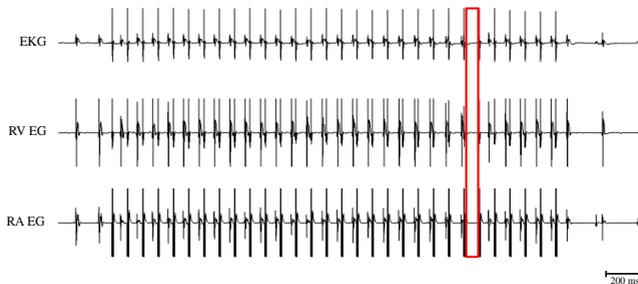
Bei der vorliegenden Aufzeichnung aus eigenen Untersuchungen an Sham operierten WT Mäusen sind neben der Ableitung II des Oberflächen-EKGs auch intrakardiale Elektrogramme aus Ventrikel und Atrium zu sehen. Basisstimulation und Extrastimulus (ES) erfolgten aus dem distalen Elektrodenpaar, da jeder Stimulus mit einer P-Welle und sich anschließendem QRS-Komplex beantwortet wird.

Die distalen vier Elektroden wurden im Atrium bzw. der Klappenebene positioniert, welches aus kräftigen Vorhofsignalen und zeitlicher Übereinstimmung mit der P-Welle aus dem Oberflächen-EKG ersichtlich wurde.

Aufgrund der bipolaren Ableitung konnten insgesamt vier intrakardiale Signale aufgezeichnet werden, wobei zwei atrialen und zwei ventrikulären Ursprungs waren. Der Katheter wurde durch den kaudalen Seidenfaden fixiert.

Neben der intrakardialen EKG-Aufnahme waren die Elektroden des Katheters auch zur gezielten elektrischen Stimulierung befähigt (*EP Tracer*; Cardio Tek). Diese erfolgte mit einer Dauer von 1,5 Millisekunden (ms) und einer Stromstärke von 2 Milliampere (mA).

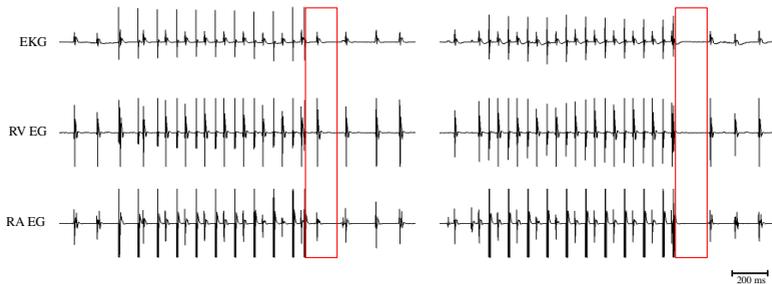
Über etablierte Stimulationsprotokolle erfolgte die Messung physiologischer Parameter. Im Atrium wurde mit der Bestimmung des Wenckebachpunktes (WBP) begonnen. Hierzu wurden 30 aufeinanderfolgende Stimuli abgegeben, was nach 3 s Pause mit einem 2 ms kürzeren Intervall wiederholt wurde (Abbildung 13). Die PQ-Strecke wurde dabei stetig länger, bis schließlich ein QRS-Komplex ausfiel, was den WBP definiert. Die Verkürzung der Intervalllänge der 30 Schläge wurde bis zur 2:1 Überleitung fortgesetzt, bei der nur noch jeder zweite Stimulus im Atrium mit einem QRS-Komplex beantwortet wurde.



**Abbildung 13: Bestimmung des Wenckebachpunktes (WBP)**

Darstellung eigener Daten aus Untersuchungen von Sham operierten WT Mäusen. Neben der Ableitung II des Oberflächen-EKGs sind intrakardiale Elektrogramme des rechten Ventrikel (RV) und des rechten Atriums (RA) aufgeführt. Bei der Bestimmung des WBP wurden in der *in vivo* EPU im Atrium 30 aufeinanderfolgende Stimuli abgegeben und der Abstand der einzelnen Stimuli nach 3 s Pause um 2 ms verkürzt. Ab einer bestimmten Intervalllänge blockte der AV-Knoten die Überleitung. Dieser wurde als WBP bezeichnet und in ms angegeben.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der effektiven Refraktärzeit des Atrioventrikular-Knotens (AVNERP). Dazu wurde im Atrium einem definierten Protokoll folgend stimuliert: Ein Zyklus bestand aus einer Basisstimulation von 10 Stimuli mit einem Intervall von 100 ms, einem Extrastimulus (ES) und 3 s Pause (Abbildung 14). Beim nächsten Zyklus wurde der ES um 2 ms verkürzt, bis auf die P-Welle kein QRS-Komplex mehr folgte. Diesem Prozedere folgend wurde mit einer Basisstimulation von 90 und 80 ms wiederholt. Gleichermaßen wurde auch bei der Bestimmung der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP) und der ventrikulären effektiven Refraktärzeit (VERP) verfahren. Bei letzterer wurde aus einer im Ventrikel liegenden Elektrode stimuliert. Die Bestimmung aller Parameter wurde dreifach wiederholt und deren Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) angegeben.



**Abbildung 14: Bestimmung der effektiven Refraktärzeit des Atrioventrikular-Knotens (AVNERP)**

Darstellung eigener Daten aus Untersuchungen von Sham operierten WT Mäusen. Neben der Ableitung II des Oberflächen-EKGs sind intrakardiale Elektrogramme des rechten Ventrikel (RV) und des rechten Atriums (RA) aufgeführt. Zur Bestimmung der AVNERP wurde im Atrium mit einer Basisstimulation von 10 Impulsen stimuliert und anschließend ein Extrastimulus (ES) angefügt, auf den eine Erregung des Ventrikels folgte (QRS im EKG). Nach 3 s Pause erfolgte bei gleicher Basisstimulierung der ES mit 2 ms kürzerem Intervall. Fiel die Erregung des Ventrikels aus, war die Refraktärphase erreicht. Sie wurde in ms angegeben.

Im Folgenden wurde nun auf die Induktion von Arrhythmien geachtet.

Auch hier erfolgte eine Basisstimulierung mit 10 Stimuli im Abstand von 100 ms und einem Extrastimulus, der mit jedem neuen Zyklus um 5 ms verringert wurde bis er keine Erregung mehr auslöste. Das Myokard war absolut refraktär. Nun wurde der erste ES um 15 ms über der Refraktärphase, der vulnerablen Phase, eingestellt und ein zweiter Zusatzstimulus mit 100 ms hinzugefügt. Dem Protokoll folgend wurde dieser ebenfalls mit jedem Zyklus um 5 ms erniedrigt, bis er nicht mehr beantwortet wurde. Auch dieser wurde nun 15 ms über der Refraktärphase eingestellt und ein dritter und letzter Zusatzstimulus mit 100 ms hinzugefügt und um 5 ms pro Zyklus erniedrigt. Im Ganzen wurden also 10 Basisstimuli mit 100 ms und bis zu drei Extrastimuli eingesetzt. Dieses Verfahren wurde mit einer Basisstimulierung von 90 und 80 ms im Ventrikel und Atrium wiederholt.

Im Anschluss erfolgte die Burststimulierung, bei der im Atrium 30 s mit einer Zykluslänge von 40, 30 und 20 ms stimuliert wurde. Im Ventrikel erfolgte dies für 20 s bei einer Zykluslänge von 80, 70 und 60 ms.

Traten fünf oder mehr ventrikuläre Extrasystolen wiederholbar in einem Protokoll auf, wurde dies als arrhythmisches Ereignis gewertet. Im Atrium wurde ein wiederholbares, mehr als 350 ms langes Flattern oder Flimmern als arrhythmisches Ereignis gewertet. Zur Auswertung der Arrhythmieinduktion wurden die drei Zusatzstimulationsprotokolle pro

Tier ausgewertet. Bei der Beurteilung der Länge der Arrhythmien wurden neben den Zusatzstimulationsprotokollen auch die Burstprotokolle hinzugezogen.

Um weitere Dysfunktionen des Herzens zu demaskieren, erfolgte das Zusatzstimulationsprotokoll mit 90 ms Basisintervall und alle Burststimulationen auch nach intraperitonealer Injektion von Iso (2 mg/kg).

Die gesamte Untersuchung dauerte ungefähr 60 min. Anschließend erfolgte die Tötung durch Organentnahme.

#### **4.5.6 Organentnahme**

Am Ende der EPU wurde der Katheter entfernt, der Thorax eröffnet, das noch schlagende Herz mit Schere und Pinzette entnommen und in eine 0,9 %ige Natriumchloridlösung (NaCl; Braun) überführt. Durch die fortwährende Herzaktion wurde das Blut in Ventrikeln, Atrien und Koronarien ausgestoßen und durch die NaCl-Lösung ersetzt. Das Bindegewebe wurde entfernt und das Herzgewicht über eine Präzisionswaage (Sartorius) ermittelt. Anschließend wurde ein ca. 30 mg schweres Stück der Herzspitze entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, um dann in flüssigen Stickstoff bei ca. -196 °C eingefroren zu werden. Das verbleibende Herz, Ventrikel und Atrien, wurde für die Histologie entweder in -40 °C kaltes 2-Methylbutan (Roth) vorgekühlt, um anschließend aus diesem in flüssigen Stickstoff überführt zu werden oder ohne Kühlung direkt in ein 15 ml Röhrchen (Falcon) mit 4 %iger Formaldehydlösung für die Histologie (Merck) verbracht. Die Lunge wurde freipräpariert, das Blut durch Abtupfen entfernt, gewogen und ebenfalls in 4 %ige Formaldehydlösung in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Für gegebenenfalls erforderliche Nachgenotypisierungen wurde die Schwanzspitze abgetrennt, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

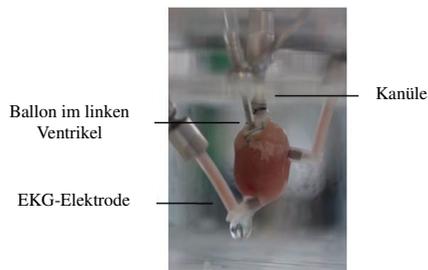
Um das Herzgewicht neben dem Körpergewicht auch mit einer weiteren Größe ins Verhältnis zu setzen, wurde die Tibia freipräpariert, von Muskeln, Fett und Sehnen befreit und die Länge exakt ausgemessen. Anschließend wurde die Tibia verworfen.

## 4.6 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

### 4.6.1 Das Prinzip

Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff ist seit gut 100 Jahren in der biochemischen, physiologischen und pharmakologischen Forschung etabliert. In diesem *ex vivo* Verfahren ist es möglich, Parameter wie z.B. intraventrikulären Druck, Kontraktionsgeschwindigkeit, Koronarfluss, Herzrate (HR) und EKG direkt am Herzen zu messen. Großen Vorteil bietet die Applikation einer Testsubstanz und die Untersuchung der direkten Wirkung am Herzen ohne *firstpass*- oder *feedback*-Effekten sowie anderen hormonellen oder neuralen Kontrollen von außerhalb des Herzens.

Die Perfusion isolierter Herzen nach Langendorff folgt einem einfachen Prinzip. Durch Kanülierung der Aorta wird das Herz an die Apparatur angebracht und mit temperiertem und oxygeniertem Puffer (modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung; Tabelle 8) retrograd perfundiert (Abbildung 15). Dieser trifft auf die geschlossenen Aortenklappen, nimmt seinen Weg über die Koronararterien bis hin zu den funktionellen Endarterien und versorgt den Herzmuskel. Nachdem der Puffer das vaskuläre Koronarsystem durchlaufen hat, wird er über den Koronarsinus in das rechte Atrium befördert und nach erneuter Herzaktion über die Pulmonalarterien ausgeworfen. Der Perfusionsfluss ist in dem hier verwendeten Modell des konstanten Drucks über einen hydrostatischen Druck reguliert.



**Abbildung 15: Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff**

Das Bild zeigt ein durch transversale Aortenkonstriktion hypertrophiertes Herz einer WT Maus, das an der Kanüle im Langendorff *setup* fixiert und retrograd mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert wurde. Über einen im linken Ventrikel eingeführten Ballon mit Verbindung zu einem Transducer war es möglich den intraventrikulären Druck zu messen. Über zwei Elektroden an der Oberfläche des Herzens konnte das EKG abgeleitet werden.

Im vorliegenden Experiment wurde das *isolated heart setup* von Hugo Sachs Elektronik (Harvard Apparatus) benutzt. Wesentliche Anteile bildeten die Wärmepumpe (Lauda E 100; *Ecoline Staredition*), die Rollenpumpe (Modell ISM 834C, Ismatic) zur Beförderung des Puffers, der Perfusor (MA1 70-2208, Modell 11 Plus; Harvard Apparatus), das doppelwandige Vorratsgefäß mit Fritte zur Begasung, die Herzkammer mit Kanüle, EKG-Elektroden, Stimulationselektrode, Überdruckventil, Steuer- und Aufnahmeeinheit (HSE *Data Aquisition Hardware*, Plugsy; Harvard Apparatus, PC mit *Isoheart Software*).

#### 4.6.2 Vorbereitung und Präparation

Zu Beginn wurde der modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer hergestellt. Dazu wurden vier Stammlösungen separat angesetzt und anschließend gemischt (Tabelle 8). Anschließend wurde der Puffer filtriert und in das doppelwandige 2 Liter Vorratsgefäß gefüllt. Über eine Fritte wurde der Puffer mit Karbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) mindestens 30 min vor Versuchsbeginn begast. Dies diente zur Einstellung des pH-Wertes und zur Oxygenierung. Temperiert wurde der Puffer und das gesamte Langendorffsystem über eine Wärmepumpe, die auf 39 °C eingestellt war. Aufgrund des Wärmeverlustes des Schlauchsystems war so eine Temperatur von 37 °C in der Herzkammer gesichert.

Um Thrombosierungen der Koronararterien post mortem zu verhindern, wurden die Mäuse 10 min vor der Tötung mit 200 internationalen Einheiten heparinisiert (Heparin-Natrium 25.000; Ratiopharm, 1:25 Verdünnung in *phosphate buffered saline (PBS)*). Nach zervikaler Dislokation erfolgte die Eröffnung des Thorax, Freilegung des Herzens aus Perikard und Bindegewebe, Durchtrennung der Aorta kaudal des Aortenbogens und Überführung in eiskalten, begasten Puffer. Nach dem Wiegen wurde das Herz in eine weitere Schale mit eiskaltem Puffer überführt. Unter dem Mikroskop (Technival 2; Carl Zeiss Jena) wurde die Aorta mit zwei Pinzetten über die Kanüle gezogen und mit einem Bindfaden (Schlüsselgarn; Ackermanns) fixiert. Nun wurde die Kanüle mit dem Herzen an das Langendorffsystem gehängt und mit warmen Puffer in der beheizten Kammer (37 °C) erwärmt, wobei es selbständig wieder zu schlagen begann. Durch einen winzigen Schnitt im linken Ventrikel erfolgte das Einführen eines Miniballons, der mit entgastem Wasser gefüllt und über ein Schlauchsystem mit einem zweiten Transducer zur Druckaufnahme verbunden war. Der Ballon wurde auf 10 Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg) diastolischen Drucks aufgeblasen. Die EKG-Elektroden wurden im Bereich des linken

Herzohrs und der Herzspitze angebracht und die Pacelektrode am linken Ventrikel platziert. Der Aortendruck wurde als konstanter Druck auf 60 mmHg eingestellt.

**Tabelle 8: Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer**

Stammlsg.	Substanz	Molargewicht	Einwaage(g/l)	Endkonz.(mM)	Hersteller
1	MgSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O	246,48	5,18	2,1	Merck
	NaCl	58,44	69	118	Serva
	KCl	74,56	3,5	4,7	Roth
	EDTA	372,2	0,22	0,06	Serva
2	NaHCO <sub>3</sub>	84	41,4	24,7	Roth
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	135,1	21	0,23	Sigma
4	CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	146,9	8,82	1,5	Merck

#### 4.6.3 Das Protokoll

Während einer 20-minütigen Adaptationsphase erfolgte die Infusion von 100 µM Diazoxid (Sigma Aldrich), einem mitochondrialen K<sub>ATP</sub>-Öffner oder Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich) als Kontrollsubstanz im Nebenstrom. Die Rate betrug 1/10 des Koronarflusses und konnte über einen Perfusor exakt reguliert werden. Nun erfolgte ein Stimulationsprotokoll, das aus der *in vivo* EPU übernommen wurde (4.5.5). Stimuliert wurde wieder mit 1,5 ms und 2 mA. Nach Bestimmung der VERPs in einer Basisstimulierung von 10 Schlägen mit 100, 90 und 80 ms Abstand, wurde die Induktion von ventrikulären Tachykardien im Zusatzstimulationsprotokoll überprüft. Auch hier fanden wieder Basisstimulierungen von 100, 90 und 80 ms und bis zu drei Zusatzstimuli Anwendung (siehe 4.5.5). Die Bestimmung aller Parameter wurde dreifach wiederholt und deren Mittelwerte (S.E.M. ±) angegeben. Nach Beendigung wurde die Infusion über den Perfusor gewechselt. Wurde zuvor Diazoxid infundiert, kam nun die Kontrollsubstanz DMSO zum Einsatz. Nach weiteren 20 min wurde das Stimulationsprotokoll wiederholt.

Die Daten aus dem Langendorff Versuch, linksventrikulärer Druck, Koronarfluss, Kontraktionsgeschwindigkeit, Herzrate und EKG, wurden mit der Software *Isoheart* ausgewertet. Als reproduzierbare Arrhythmien wurden  $2 \times \geq 5$  ventrikuläre Tachykardien in einem Protokoll gewertet.

## 4.7 Genexpressionsanalysen

### 4.7.1 Isolation von RNS

Das im  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  Tiefkühler aufbewahrte Herzgewebe wurde in ein Reaktionsgefäß mit sechs Keramikkügelchen (Peqlab),  $700\text{ }\mu\text{l}$  QIAzol Lysepuffer und  $10\text{ }\mu\text{l}$  2-Mercaptoethanol überführt. Im Folgenden wurde das Gemisch für  $2 \times 15\text{ s}$  bei  $5.500$  Umdrehungen pro min (UpM) homogenisiert (Precellys-Homogenisator) und danach bei Raumtemperatur (RT) für  $5\text{ min}$  inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit  $150\text{ }\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, gemischt und erneut für  $3\text{ min}$  bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation für  $15\text{ min}$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $12.000 \times g$ , das zur Trennung der oberen, wässrigen, RNS-haltigen Phase, einer Interphase denaturierter Proteine, und der unteren, organischen Phenol-Chloroform Phase führte.

Nach dem Abpipettieren der RNS-haltigen Phase wurde diese mit  $70\%$  Ethanol gleichen Volumens präzipitiert. Das Gemisch wurde auf die RNeasy® Mini Säule geladen und für  $15\text{ s}$  bei  $8.000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule, an der nun die RNS gebunden war, mit  $350\text{ }\mu\text{l}$  RNeasy® RW 1 Puffer gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Um auch eventuelle Reste genomischer DNS zu entfernen, wurde diese durch zugesetzte DNasen abgebaut. Dazu wurde das RNase-freie DNase Set verwendet und  $10\text{ }\mu\text{l}$  DNase sowie  $70\text{ }\mu\text{l}$  RDD Puffer auf jede Säule gegeben und anschließend bei RT für  $15\text{ min}$  inkubiert. Die verdauten DNS wurde durch erneute Zugabe von RW 1 Puffer und kurzer Abzentrifugation von der Säule gewaschen.

Zwei abschließende Waschschriffe unter Einsatz von  $500\text{ }\mu\text{l}$  RPE-Puffer/Ethanol und anschließender Zentrifugation bei RT und  $17.900 \times g$  für  $15\text{ s}$  bzw.  $2\text{ min}$  führten neben der Reinigung der Säulenmatrix auch zur Trocknung. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Eluierung wurde auf die Säule  $30\text{ }\mu\text{l}$  RNS-, DNS-, DNase- und RNase-freies Wasser gegeben und bei RT und  $12.900 \times g$  für eine Minute zentrifugiert. Die RNS, ein Gemisch u. a. aus ribosomaler-, transfer und *messenger*-RNS, befand sich nun im Durchfluss, wurde in ein  $0,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bis zur Nukleinsäuremessung auf Eis gestellt.

### 4.7.2 Nukleinsäuremessung

Zur Bestimmung der Quantität und Qualität der isolierten RNS fand ein Spectrophotometer (NanoDrop 100; PeqLab) Verwendung. Am Beginn jeder Messung wurde der

Blankwert durch Auftragen von 1  $\mu\text{l}$  Wasser auf die Linse des Spectrophotometers ermittelt. Die sich anschließende Konzentrationsbestimmung der RNS in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  wurde standardmäßig mit einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm) durchgeführt. Darüber hinaus wurden Verunreinigungen der Proben wie z.B. durch Phenolate oder Thiocyanate bei einer Wellenlänge von 230 nm und Proteinverunreinigungen im Bereich von 280 nm ermittelt. Im weiteren Verlauf wurden automatisch Quotienten zur Qualitätsbestimmung ermittelt und angegeben. Die Ratio aus der Absorption bei 260 und 280 nm wird genutzt, um die Reinheit der RNA zu bestimmen. Werte im Bereich 2 gelten bei RNA dabei als rein. Die Ratio zwischen 260 und 230 nm dient dabei als zweite Messung der Nukleinsäure-Reinheit, wobei Werte zwischen 2-2,2 eine reine RNA-Probe definieren.

### 4.7.3 Reverse Transkription

Zur Durchführung einer quantitativen *Real time* PCR war es notwendig, die RNS in einzelsträngige cDNS umzuschreiben. Dazu wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit verwendet. Zur Umschreibung wurden 2  $\mu\text{g}$  RNS eingesetzt und laut den Angaben des Kits verfahren (Tabelle 9). Neben , RT Puffer, Nukleotiden und reverser Transkriptase wurden auch Random Primer aus kurzen Oligonukleotiden hinzugefügt, die alle möglichen Kombinationen der vier Basen enthielten, und so das Umschreiben der gesamten RNS gewährleisten. Jeder Probenansatz wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 20 $\mu\text{l}$  Endvolumen aufgefüllt und dann im Programm 14 des DNS Thermocyclers (Perkin Elmer) umgeschrieben (Tabelle 10). Zur Qualitätskontrolle der Umschreibung wurde stets eine Negativprobe ohne RNS mitgeführt. Nach Aliquotierung wurden die Proben bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 9: Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Angaben entsprechen einem Ansatz)**

Komponenten	Konzentration	Volumen
10 X RT Buffer		2 $\mu\text{l}$
25 X dNTP Mix	4 mM	0,8 $\mu\text{l}$
10 X RT Random Primer		2 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase		1 $\mu\text{l}$
Proben-RNS	100 $\text{ng}/\mu\text{l}$	x $\mu\text{l}$
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O		ad 20 $\mu\text{l}$

**Tabelle 10: Unter Verwendung des DNS Thermocycler erfolgte die reverse Transkription unter folgende Bedingungen.**

Zyklusschritt	Zyklusschleifen	Temperatur	Zeit
Annealing	1 x	25 °C	10 min
Amplifizierung	1 x	37 °C	120 min
Denaturierung	1 x	85 °C	5 min
Kühlung	1 x	4 °C	∞

#### 4.7.4 Primer- und Sondendesign

Um die Transkription der gewünschten Zielgene zu detektieren, war es nötig Primer und Sonden zu designen. Um eine hohe Spezifität zu erzielen, wurden diese mit dem Programm Primer Express<sup>®</sup> möglichst exonüberspannend generiert und bei der Firma Biotex in Berlin Buch generiert.

**Tabelle 11: Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintriphosphat, (G) Desoxyguanosintriphosphat, (C) Desoxycytosintriphosphat, (T) Desoxythymidintriphosphat**

Gen	Primer- und Sondensequenz 5'→3'	Amplikon- länge	NCBI Ref. Seq. Acc. Nr
<i>ANP</i>	Fw: AGGAGAAGATGCCGGTAGAAGA	67	NM_0087 25
	Rev: GCTTCCTCAGTCTGCTCACTCA		
	Son: AGGTCATGCCCCGCAGGC		
<i>BNP</i>	Fw: GCCAGTCTCCAGAGCAATCA	72	NM_0087 26
	Rev: GGGCCATTCCTCCGACTT		
	SYBR		
<i>Connexin 40</i>	Fw: GGAGGAGGAAAGGAAGCAGAA	71	NM_0081 21.2
	Rev: AGATGGGTGACTGGAGCTTCC		
	Son: TCGGCTCGTCTCTACTCTTGGC		
<i>Connexin 43</i>	Fw: TGAAGGGAAGAAGCGATCCTT	70	NM_0102 88
	Rev: TCCAAAGACTGCGGATCTCC		
	Son: ACGCCACCACCGGCCACT		

**Tabelle 11 (fortgeführt): Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintriphosphat, (G) Desoxyguanosintriphosphat, (C) Desoxycytosintriphosphat, (T) Desoxythymidintriphosphat**

Gen	Primer- und Sondensequenz 5' → 3'	Amplikonlänge	NCBI Ref. Seq. Acc. Nr
<i>Kollagen 1</i>	Fw: C T A C T G G T G A A A C C T G C A T C C	69	BC007158
	Rev: G G G C G C G G C T G T A T G A G		
	SYBR		
<i>Kollagen 3</i>	Fw: C T C A C C C T T C T T C A T C C C A C T C T T A	117	NM_0099 30
	Rev: A C A T G G T T C T G G C T T C C A G A C A T		
	SYBR		
<i>CYP2J2</i>	Fw: A G A C T T A G A G G A A C G C A T T C A G	81	NG_00793 1
	Rev: G G T C A A A A G G C T G T C C G T T C T		
	Son: A G G C C C A A C A C C T C A C T G A A G C A A T A A A A G		
<i>Fibronektin</i>	Fw: G G A C C T G C A A C C T A T A G C T G A G A	68	BC138421
	Rev: C T C C C C C A C G A C G T A G G A		
	Son: T G T T T T G A T C A T G C T G C T G G G		
<i>GAPDH</i>	Fw: T G T G T C C G T C G T G G A T C T G A	76	XR_14182 1.1
	Rev: C C T G C T T C A C C A C T T C T T G A		
	Son: T G C C G C C T G G A G A A A C C T G C C		
<i>HPRT</i>	Fw: G C T T C C C T G G T T A A G C A G T A C A	79	NM_0135 56.2
	Rev: A C A C T T C G A G A G G T C C T T T T C A C		
	SYBR		
<i>K<sup>+</sup>-Kanal KCNE1</i>	Fw: T G A G C C T G C C C A A T T C C A	73	NM- 008424
	Rev: C C G C C C T G T T C A G C T G T C T		
	Son: T T C T G C C C T T T C T G G C C A G G C T G T		
<i>K<sup>+</sup>-Kanal KCNE3</i>	Fw: A C G G G A C T G A G A C C T G G T A C A	65	NM_0205 74.4
	Rev: A G C A A G T G A C T G T G A A G G G T T G T		
	Son: C C T C C A T G C T G T G C T G A A G G C T C T G		

**Tabelle 11 (fortgeführt):** Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintri-phosphat, (G) Desoxyguanosintri-phosphat, (C) Desoxycytosintri-phosphat, (T) Desoxythymidintri-phosphat

Gen	Primer- und Sondensequenz 5'→3'	Amplikon- länge	NCBI Ref. Seq. Acc. Nr
<i>K<sup>+</sup>-Kanal KCNQ1</i>	Fw: CCTGGGCTCTGTAGTCTTCATC	61	NM_0084 34.2
	Rev: GGCCAGAAAGCCAATGTAC		
	Son: CCGCCAGGAGCTGATCACCACC		
<i>LTCC</i>	Fw: AGCGTGTCCCTCATCTCCTTT	70	NM_0011 59535.1
	Rev: GCAGCACTCGTAAAATCTTCACA		
	Son: CATCCAGTCCAGCGGATCAACG		
<i>18 S</i>	Fw: ACATCCAAGGAAGGCAGCAG	65	FJ710866
	Rev: TTTCGTCACTACCTCCCGG		
	Son: CGCGCAAATTACCACTCCCGAC		

#### 4.7.5 Real Time RT-PCR

Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde eine RT-PCR durchgeführt (TaqMan 7.500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems) bei dem eine Quantifizierung während der Amplifikation stattfindet. Die Grundlage bilden eine Halogen-Lampe und eine *Charge-Coupled Device*-Kamera sowie spezifische, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Nach diesem Prinzip trifft eine Taq-Polymerase mit einer 5',3'-Exonuklease Aktivität während der Amplifikation auf die an der cDNS hybridisierte, fluoreszenzmarkierte Sonde. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Farbstoff unterbrochen, das zum Fluoreszenzsignal führt. Dieses wird noch während der laufenden Amplifikation detektiert und quantifiziert.

Weitere Möglichkeit zur Quantifizierung bot *SYBR Green 1*, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der zum Nachweis doppelsträngiger DNS genutzt wurde. Gebunden absorbierte er blaues und emittierte grünes Licht. Im Anschluss an die cDNS-Amplifikation wurden zudem noch Schmelzkurven bestimmt, um die Spezifität des Reaktionsproduktes zu bestätigen.

Die Bestimmungen ausgewählter Zielgene erfolgten als Triplikate in einer 96-Lochplatte. Eine Standardreihe bestand aus fünf Verdünnungen. Als Negativkontrolle (*non template control, NTC*) wurde eine Probe ohne cDNA mitgeführt. Um die Expression verschiedener Zielgene zu bewerten, war es wichtig, die Mengen der Proben auf ein invariables *house-keeping* Gen zu normalisieren. Aufgrund der im Labor langjährig etablierten Protokolle zu Genexpressionsanalysen im Bereich des hypertoniebedingten Endorganschadens und der Nutzung von 18 S zur Normalisierung, wurde dieses *housekeeping* Gen auch in der vorliegenden Studie genutzt. Ein Vergleich auf weitere *housekeeping* Gene (HPRT, GAPDH) wiesen dabei keine Unterschiede zu den auf 18 S normalisierten Daten auf.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mittels Standardkurven-Methode.<sup>98</sup>

**Tabelle 12: Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Angaben entsprechen einem Ansatz)**

Komponenten	Konzentration	Volumen
Forward Primer	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
Reverse Primer	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
Sonde	5 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
cDNS	4 ng	0,4 $\mu$ l
Aqua bidest		3,7 $\mu$ l
Puffer		5 $\mu$ l

**Tabelle 13: Unter Verwendung des *TaqMan Fast Universal PCR Mastermix* für das *7.500 Fast System* wurden folgende Bedingungen zur cDNS-Amplifikation verwendet**

Zyklusschritt	Zyklusschleifen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1 x	95 °C	2 min
Denaturierung	45 x	95 °C	3 s
Amplifizierung	45 x	60 °C	20 s
Kühlung	1 x	4 °C	$\infty$

## 4.8 Histologie

Alle histologischen Arbeiten wurden selbstständig in den Histologielaoren des *Experimental and Clinical Research Centers* (ECRC) Berlin Buch durchgeführt. Unter meiner Supervision wurden teilweise unterstützende Arbeiten bei der Gewebeeinbettung, der Herstellung von histologischen Schnitten und der Färbung der Präparate von der technischen Angestellten May-Britt Köhler (ECRC Berlin) übernommen.

#### 4.8.1 Gewebeeinbettung in Paraffin

Vor der Einbettung in Paraffin wurde das Herzgewebe mindestens 24 Stunden in 4 % gepuffertes Formalin (Merck) für die Histologie fixiert, um anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert zu werden.

**Tabelle 14: Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe**

Schritt	Reagenz	Zeit	Wiederholungen
1	30 % Ethanol	45 min	1 x
2	50 % Ethanol	45 min	1 x
3	70 % Ethanol	45 min	4 x
4	96 % Ethanol	45 min	2 x
5	100 % Ethanol	45 min	2 x

Um das Ethanol wieder aus der Probe zu entfernen, wurden die Präparate für 2 x 1,5 h in Toluol inkubiert. Im Anschluss wurden sie 2 x 2 h in 56 °C warmes Paraffin eingelegt (Techno-Tec 1), um anschließend endgültig in Einbettkassetten (Roth) im Paraffinblock auf RT abzukühlen.

#### 4.9 Deparaffinisierung und Rehydrierung

Aus dem im Paraffinblock eingebetteten Gewebe wurden unter Kühlung mit dem Rotationsmikrotom (HM 355S, Microm) 2 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem 42 °C temperierten Wasserbad aufgefangen und dann auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo) aufgezoogen. Das Paraffin wurde in drei Schritten für je 5 min mit Xylol entfernt. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe hydratisiert.

**Tabelle 15: Protokoll der absteigenden Alkoholreihe**

Schritt	Reagenz	Zeit	Wiederholungen
1	100 % Ethanol	3 min	3 x
2	96 % Ethanol	2 min	2 x
3	70 % Ethanol	1 min	1 x

Am Schluss wurden die histologischen Präparate mit destilliertem Wasser abgespült.

#### 4.9.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung dar, bei der Zellkerne durch den Farbstoff Hämatoxylin blau und das Zytoplasma durch Eosin rot gefärbt wird.

Hierzu wurden die deparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte für 8 min in Meyers Haemalaun-Lösung (Sigma Aldrich) inkubiert und anschließend für 10 min unter fließendem Wasser gebläut. Dieser Färbeprozess wurde mit destilliertem Wasser gestoppt, um direkt danach für 30 s einen weiteren mit Eosin (Roth) anzuschließen. Nun wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (70 %, 90 %, 100 % für je 20 s) und mit Roti Histokitt (Roth) eingedeckt.

#### 4.9.2 Sirius Rot Färbung

Zur Bestimmung des interstitiellen Gesamtkollagengehaltes wurden Längsschnitte von Herzpräparaten angefertigt und mit Sirius Rot gefärbt. Hierdurch wird die natürliche Doppelbrechung von kollagenen Bindegewebsfasern verstärkt.<sup>99</sup> Das Gesamtkollagen wird rot, das übrige Gewebe gelb gefärbt. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Trichrom Färbung nach Masson den Vorteil, dass variable Färbeergebnisse ausbleiben.

Dazu wurden die Präparate über eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) jeweils für 10 min rehydriert. Währenddessen wurde eine 0,1 %ige Sirius Rot Färbelösung vorbereitet. Hierzu wurde 0,2 g Sirius Rot Pulver (Sigma Aldrich) in 1,2 %iger, gesättigter, wässriger Pikrinsäure (Sigma Aldrich) gelöst. Die rehydrierten Schnitte wurden nun für 60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit 0,1 %iger Essigsäure gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 min dehydriert (70 %, 80 %, 96 %, 100 %). Der Prozess wurde durch eine 2-minütige Inkubation in Xylol abgeschlossen. Zur besseren Haltbarkeit wurden sie mit Roti Histokitt eingedeckt.

#### 4.9.3 Immunfärbung von Paraffinschnitten

Immunologische Reaktionen zwischen dem nachzuweisenden Antigen und einem spezifischen primären Antikörper (AK) stellen das Grundprinzip der histologischen Immunfärbung dar. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wird eine Farbreaktion induziert oder ein zweiter, fluoreszenzmarkierter AK verwendet. Der sekundäre AK erkennt dabei tierartsspezifische Teile des primären AKs.

Durch vorangegangene Formalinfixierungen werden Antigene häufig verändert, was eine Vorbehandlung zur Demaskierung notwendig macht.<sup>100</sup> Deparaffinisierte und rehydrierte Schnitte wurden hierzu mit 10 mM Natriumcitratpuffer, pH 6,0 (Thermo) versetzt. Im Dampfkocher (Vitacuisine; Tefal) wurden die Schnitte nun für 10-12 min gekocht und anschließend 5 min ruhen gelassen. In den folgenden 45-60 min erfolgte das Abkühlen auf RT.

Nach 5-minütigem Waschen mit *PBS* wurden die Präparate in eine feuchte Kammer überführt und zur Minimierung unspezifischer Bindungen mit 10 % Esel Serum für 30 min geblockt. Der erste Antikörper, spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen, wurde im Verhältnis 1:100 mit *PBS* verdünnt. Davon wurden 50 µl auf den Schnitt verbracht und im Dunkeln bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte dreimaliges Waschen mit *PBS* für jeweils 5 min. Nun wurden 50 µl einer 1:500 Verdünnung des mit *Cyanine Dye 3* markierten, zweiten Antikörpers (Anti-IgG; Jackson) auf die Schnitte verbracht und für 2 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem, erneuten Waschen der Schnitte (3 x 10 min mit *PBS*) wurden AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNS, welche vorrangig im Zellkern anzutreffen ist, mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Zum Abschluss wurden die Präparate mit *Vectashield® Mounting Medium* eingedeckt.

Die Auswertung aller Schnitte erfolgte blind von mir und unabhängig davon auch von einer zweiten Person (Frau Dr. Fatimunissa Qadri, MDC Berlin) am *Axioplan-2 Imaging* Mikroskop unter Verwendung des Programms *Axio Vision 4.6*.

**Tabelle 16: Verwendete primäre Antikörper (AK) in der Immunhistochemie**

1. AK	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Cx43	K	H, M, ME, R	1:100	Sigma
Cx40	K	M	1:100	Life Span
Kollagen 1	Z	M, ME	1:500	S. Biotech
Kollagen 3	K	M, MA, ME, R	1:500	S. Biotech
Fibronectin	K	M, ME	1:100	Abcam

H: Huhn; K: Kaninchen; MA: Marmosetten; M: Maus; ME: Mensch; R: Ratte; Z: Ziege

**Tabelle 17: Verwendete sekundäre Antikörper (AK) in der Immunhistochemie**

2. AK	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ -rabbit Cy3	E	K	1:400	Jackson
$\alpha$ -goat Cy3	E	Z	1:300	Jackson

E: Esel; K: Kaninchen; Z: Ziege

#### 4.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die *Prism 5.0-Software* (*GraphPad Software Inc.*) und das Statistikpaket *PASW 18.0* verwendet. Zu Beginn der Auswertung wurde durch den Chi-Quadrat-Test auf Normalverteilung der Daten hin überprüft. Konnte diese bestätigt werden, fand der einfaktorielles ANOVA Test (*analysis of variance*) Anwendung. Diesem wurde ein Tukey post Hoc Test nachgeschaltet.

Zur statistischen Auswertung der Überlebenszeitanalyse wurde der Log-Rank-Test verwendet.

Zur Beurteilung des Effekts von Iso auf die HR innerhalb einer Gruppe fand nach Testung der Werte auf Normalverteilung durch den Chi-Quadrat-Test der gepaarte T-Test zum Vergleich abhängiger Werte Anwendung.

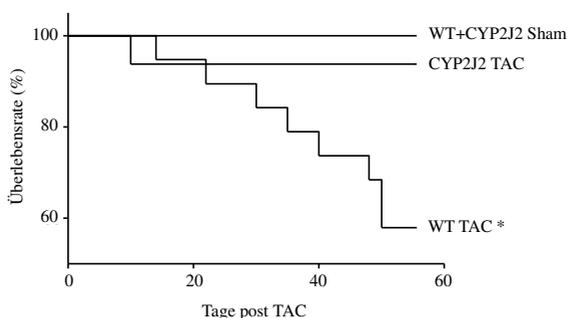
Die Darstellung der Werte erfolgte in Balkendiagrammen, in denen Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben wurden. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss der Überexpression des humanen CYP2J2 auf kardiales Remodelling und Arrhythmieentwicklung im Modell der chronischen Druckbelastung

#### 5.1.1 CYP2J2 Überexpression verbesserte Mortalität und systolische Funktion ohne Einfluss auf Herzhypertrophie

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss kardiomyozytenspezifischer Überexpression des CYP2J2 in einer Überlebenszeitanalyse acht Wochen post TAC untersucht. Dabei war ein Genotypen abhängiger Unterschied im Überleben auffällig (Abbildung 16). Männliche WT Mäuse begannen ab Tag 10 zu sterben, wobei 60 Tage nach Induktion der chronischen Druckbelastung nur noch 58 % der WT Tiere lebten. Bei den CYP2J2 Mäusen konnte nur ein postoperativ verstorbenes Tier beobachtet werden, so dass nach 60 Tagen noch 94 % der Tiere vital waren, was einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zu den WT TAC Tieren entsprach. Sham operierte WT und CYP2J2 Tiere überlebten zu 100 % im Untersuchungszeitraum. Das Überleben der Sham Tiere zu dem der CYP TAC Tiere unterschied sich in statistischen Berechnungen nicht.



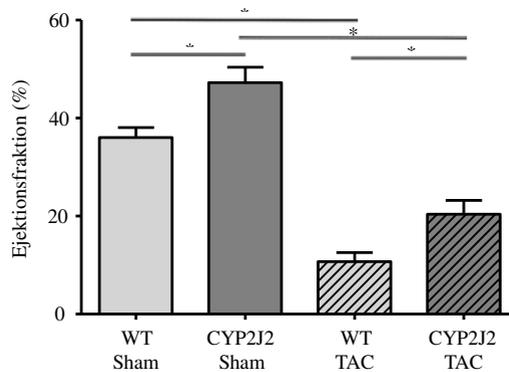
**Abbildung 16: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier**

Transversale Aortenkonstriktion (TAC) induzierte Hypertrophie konnte mit einer progressiven Mortalität assoziiert werden. Diese wurde durch eine kardiomyozytenspezifische Überexpression des humanen CYP2J2 signifikant reduziert. WT Sham, n=14; CYP2J2 Sham, n=14; WT TAC, n=19; CYP2J2 TAC, n=16; \*p<0,05.

Maßgeblichen Einfluss auf das Versuchsdesign der vorliegenden Arbeit hatten ebenfalls Untersuchungen zur HF durch die Echokardiografie acht Wochen post TAC.

Die Ejektionsfraktion (EF) charakterisiert die systolische Funktion des Herzens und bezeichnet das vom Herzen bei einer Kontraktion ausgeworfene Blut als prozentualen Anteil vom Gesamtblutvolumen der Kammer. Sie stellt eine berechnete Größe aus Wanddicke und Durchmesser während der Systole und Diastole des linken Ventrikels dar und wird als relativer Wert in Prozent angegeben.<sup>101</sup> Bei einer maladaptiven Hypertrophie wird diese vermindert.

Bereits bei den Sham Tieren konnte eine signifikant erhöhte EF der CYP2J2 Tiere gegenüber den WT Tieren ( $48\pm 0,5\%$  vs.  $38\pm 0,5\%$ ) festgestellt werden (Abbildung 17). Durch eine TAC OP wurde die EF bei den WT und CYP2J2 Tieren signifikant reduziert. Dennoch konnte die hochgradige Reduktion der EF auf  $12\pm 0,5\%$  der WT Tiere, was auf eine hochgradige HF hindeutete, durch eine Überexpression des CYP2J2 signifikant gemildert ( $20\pm 0,5\%$ ) werden.



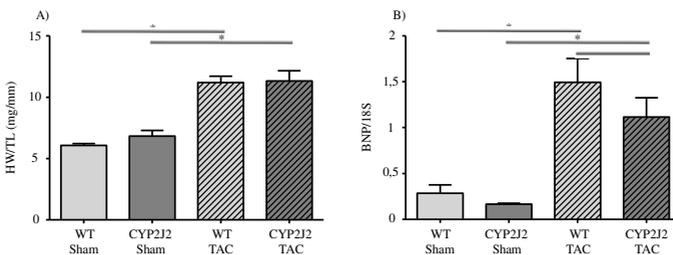
**Abbildung 17: Ejektionsfraktion acht Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

CYP2J2 Überexpression führte in den Sham Tieren zu einer signifikant erhöhten Ejektionsfraktion (EF). Durch die transversale Aortenkonstriktion (TAC) wurde die EF in beiden Gruppen reduziert. Dieser Effekt wurde durch CYP2J2 signifikant gemildert. Daten wurden pro Tier über eine Minute aufgezeichnet, analysiert und als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Sham, n=17; CYP2J2 Sham, n=11; WT TAC, n=10; CYP2J2 TAC, n=12; \*p<0,05.

Aufgrund der stark erhöhten Mortalität der WT TAC Tiere ab dem 30. Tag und der hochgradigen HF acht Wochen post TAC wurden alle folgenden Untersuchungen 28 Tage nach der TAC OP durchgeführt.

Zur Verifizierung der Hypertrophieinduktion durch TAC wurde das Herzgewicht auf die Tibiallänge normalisiert (Abbildung 18 A). Da diese konstanter ist als das stark schwankende Körpergewicht innerhalb einer Gruppe, bot dieser etablierte Vergleich mehr Sicherheit. Vier Wochen nach chronischer Druckbelastung durch TAC wiesen die Herzen eine signifikante Erhöhung des Wertes aus Herzgewicht (HW)/ Tibiallänge (TL) auf. Dabei wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen, weder bei den Sham, noch bei den TAC operierten, festgestellt.

Die Messung der Induktion bestimmter Gene wie das atriale natriuretische Peptid (ANP), natriuretische Peptid Typ B (BNP) und die schwere Myosinkette beta ( $\beta$ -MHC) gelten *in vivo* und *in vitro* Modellen von Nagern als etablierte Marker pathologischer kardialer Hypertrophie.<sup>145</sup> Im gesunden adulten Herzen oder Myozyten sind diese gering oder gar nicht exprimiert und werden erst im Laufe der Hypertrophie vermehrt abgelesen.<sup>102</sup> BNP wurde in Taqman Analysen auf 18 S normalisiert und bei den Sham operierten Tieren erwartungsgemäß in sehr geringem Maße nachgewiesen (Abbildung 18 B). Durch die vierwöchige TAC Behandlung wurde in den WT Tieren ein etwa fünffacher Anstieg des BNP verzeichnet. Auch bei den CYP2J2 Tieren stieg die BNP Expression stark an, jedoch wies diese eine Tendenz geringerer Expremierung gegenüber den WT TAC Tieren auf.



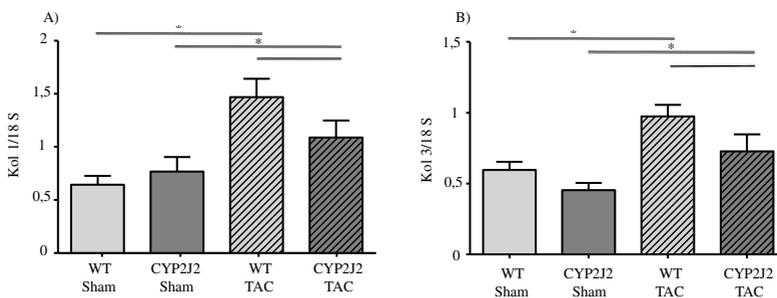
**Abbildung 18: Hypertrophieindizes vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

A) Der Hypertrophieparameter Herzgewicht/Tibiallänge (HW/TL) stieg bei WT und CYP2J2 Tieren post TAC gleichermaßen an. B) Auch der Hypertrophiemarker natriuretisches Peptid Typ B (BNP) war post TAC signifikant erhöht. Hierbei zeigte sich bei den CYP2J2 Tieren lediglich eine Tendenz zur geringeren Expression. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6; \*p<0,05; -- p<0,1(Tendenz).

### 5.1.2 Die vermehrte mRNA-Expression profibrotischer Gene während der chronischen Druckbelastung wurde in geringem Maße durch CYP2J2 Überexpression beeinflusst.

Da Kollagen 1 und 3 den mengenmäßig bedeutendsten Anteil an der EZM bilden und eine wichtige Rolle beim strukturellen Umbau haben, wurde die Expression ihrer mRNA quantifiziert. Durch die TAC induzierte Herzhypertrophie wurde die mRNA-Expression von Kollagen 1 (Abbildung 19 A) bei den WT Tieren nahezu verdreifacht und bei den CYP2J2 Tieren verdoppelt. Der Anstieg post TAC war signifikant, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Hervorzuheben ist jedoch ein Trend zur geringeren Expression der Kollagen 1 mRNA bei den CYP2J2 Tieren nach TAC.

Auch die Kollagen 3 mRNA Expression (Abbildung 19 B) war nach der TAC OP um das ca. zweifache erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen wurde nicht beobachtet. Lediglich ein Trend zur geringeren Expression bei CYP2J2 Tieren nach TAC war zu verzeichnen.



**Abbildung 19: Kollagen 1 und 3 mRNA Expression post transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

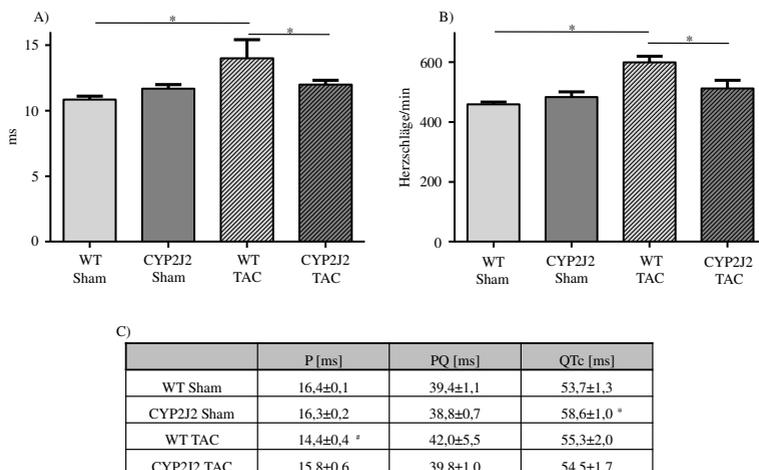
A) Kollagen 1 zu 18 S Quotient. Post TAC war eine signifikant erhöhte Genexpression zu verzeichnen. Zwischen den Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein Trend zur geringeren Expression bei CYP2J2 Tieren war nach TAC jedoch auffällig. B) Kollagen 3 zu 18 S Quotient. Post TAC war eine signifikant erhöhte Expression zu verzeichnen. In CYP2J2 Tieren war ein Trend zur geringeren Expression, basal und nach TAC, zu beobachten. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6. \*p<0,05; --p<0,1 (Tendenz).

In der Immunhistochemie und in der Sirius-Rot Färbung konnten diese Daten auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Hierbei war schon ein hoher Kollagengehalt bei Sham Tieren und eine starke Streuung bei TAC operierten Tieren auffällig.

### 5.1.3 TAC induzierte QRS-Komplex Verbreiterung und Anstieg der HR wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert

Als nicht-invasive Methode zur Aufzeichnung der elektrischen Aktivität des Herzens bildet das EKG den etablierten Goldstandard. Vier Wochen nach OP war der QRS-Komplex der WT Tiere von durchschnittlich 10,7 ms vor auf 14 ms nach TAC OP signifikant verbreitert (Abbildung 20 A). CYP2J2 Tiere wiesen diese QRS-Verbreiterung nach TAC OP nicht auf.

Auffällig war ebenfalls die starke Erhöhung der Herzfrequenz der WT Tiere nach TAC um 140 Schläge pro min im Vergleich zu den Sham operierten Tieren. CYP2J2 Mäuse zeigten diesen Anstieg post TAC nicht (Abbildung 20 B). Die HR der CYP2J2 TAC Tiere war mit durchschnittlich 511,8 Schläge pro min signifikant niedriger als die der WT TAC Tiere (599,3).



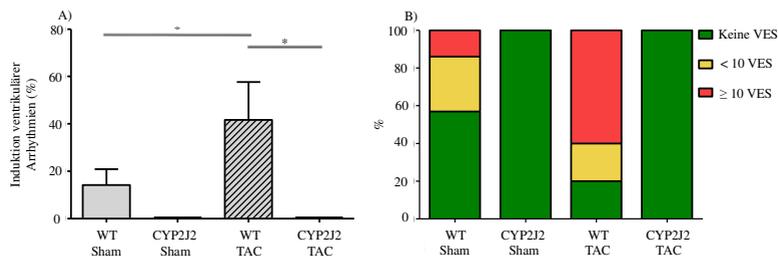
**Abbildung 20: EKG Parameter vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

A) Der QRS-Komplex war nach TAC in den WT Tieren signifikant verbreitert. CYP2J2 Tiere zeigten diese Veränderungen nicht. B) Ebenso stieg die Herzrate (HR) der WT Tiere nach TAC stark an. Bei den CYP2J2 Tieren war dieser positiv chronotrope Effekt nicht zu beobachten. Die HR war gegenüber den WT Tieren signifikant reduziert. C) Die EKG Parameter P, PQ und QTc zeigten geringe Unterschiede. In den WT Tieren verringerte sich die Länge der P-Welle post TAC leicht. Bei den CYP2J2 Sham Tieren war die korrigierte QT Zeit geringfügig verlängert. Die Daten wurden pro Tier über eine Minute aufgezeichnet, analysiert und als Mittelwerte (S.E.M. ±) dargestellt. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6; \*p<0,05.

Im Gegensatz dazu konnten nur geringe Unterschiede der gemessenen Parameter P, PQ und QTc zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 20 C). TAC operierte WT Tieren wiesen eine Verkürzung der P-Welle um 2 ms gegenüber den Sham Tieren auf. Außerdem war die korrigierte QT Zeit der CYP2J2 Sham Tiere mit durchschnittlich 58,6 ms um 4,9 ms länger als die der WT Tiere.

#### 5.1.4 CYP2J2 Überexpression verhinderte ventrikuläre Arrhythmien

Um zu klären, ob neben den geringen Differenzen im strukturellen Remodelling das elektrische Remodelling ursächlich für die verbesserte Mortalität nach TAC durch CYP2J2 Überexpression war, wurde die invasive EPU durchgeführt. Ziel der Zusatzstimulationsprotokolle war es, die Induktion von Arrhythmien zu analysieren (Abbildung 21 A). In den Sham WT Tieren gelang dies in durchschnittlich 14,3 % aller Protokolle. In den hypertrophierten Herzen der WT Tiere nach TAC wurden 46,7 % der Protokolle reproduzierbar mit  $\geq$  fünf VES ausgelöst. Die Erhöhung der Induktion der VES war signifikant. Bei Sham und TAC operierten CYP2J2 Tieren konnte hingegen in keinem der Protokolle reproduzierbare VES ausgelöst werden. Dabei war die Nicht-Induktion der CYP2J2 TAC Tiere gegenüber den WT TAC Tieren signifikant. AF wurde in keiner Gruppe vermehrt induziert.



**Abbildung 21: Induktion von ventrikulären Arrhythmien**

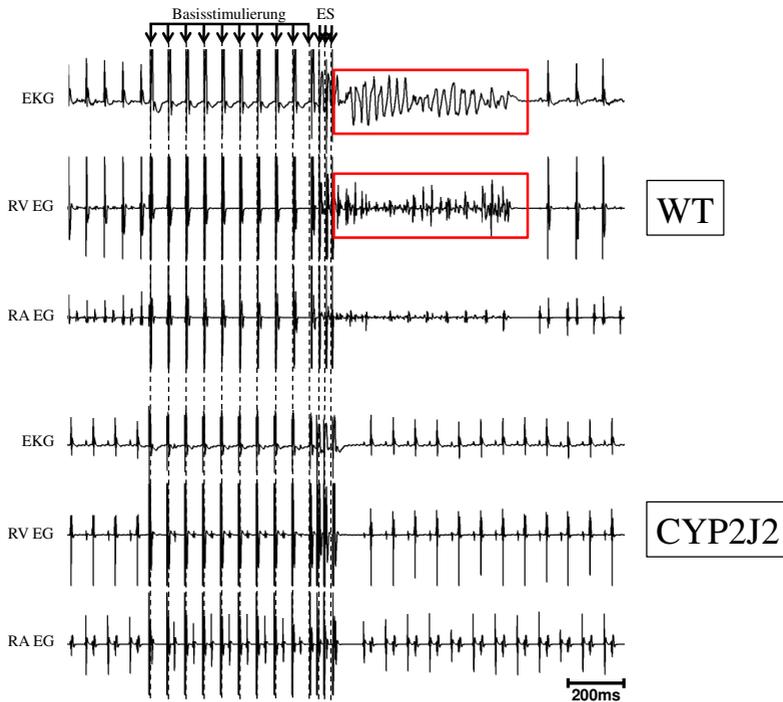
A) Die Induktion von Arrhythmien in Prozent aller Protokolle wurde durch die chronische Druckbelastung bei den WT Tieren signifikant erhöht. Bei CYP2J2 Tieren wurden in keinem Stimulationsprotokoll reproduzierbare Arrhythmien verzeichnet. B) Die Länge induzierter Arrhythmien nahm durch die transversale Aortenkonstriktion (TAC) induzierte Hypertrophie bei den WT Tieren signifikant zu. So waren anhaltende ventrikuläre Extrasystolen (VES) ( $\geq$  10) in 60 % der WT TAC Tiere zu verzeichnen. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. n=3 Wiederholungen pro Messung. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6; \*p<0,05.

Da nicht nur das Auftreten, sondern auch die Länge der Episoden von VES für den klinischen Verlauf und für die Prognose von Interesse ist, wurde der Schweregrad in

nicht-anhaltend ( $< 10$  VES) und anhaltend ( $\geq 10$  VES) unterteilt (Abbildung 21 B). Bei den WT Sham zeigten 57 % der Tiere keine reproduzierbaren Arrhythmien. 29 % aus dieser Gruppe wiesen kurze, nicht-anhaltende, Episoden von VES auf und bei 14 % waren anhaltende VES induzierbar. Durch die TAC induzierte Herzhypertrophie traten nicht nur signifikant häufiger Arrhythmien auf, sondern auch in wesentlich längeren Episoden. So wurden in 60 % der WT TAC Tiere anhaltende VES induziert. In Sham und TAC operierten CYP2J2 Tieren waren zu keiner Zeit Arrhythmien reproduzierbar auslösbar.

In Abbildung 22 ist eine repräsentative Aufzeichnung einer EPU vom WT und CYP2J2 Tier dargestellt. Es wurde in der Kammer stimuliert, was daran zu sehen ist, dass auf jeden Stimulus eine Erregung des Ventrikels folgt. Nach der Basisstimulierung und drei ES sind polymorphe VES (rote Umrandung) bei dem WT Tier im Oberflächen-EKG und dem Elektrogramm aus dem rechten Ventrikel (RV EG) zu sehen. Aufgrund der elektrischen Isolierung der Ventrikel zu den Atrien sind die ventrikulären Arrhythmien im Elektrogramm des rechten Atriums (RA EG) nur marginal sichtbar. Nach einer kompensatorischen Pause folgt der Herzschlag wieder dem Sinusrhythmus.

Im unteren Teil der Abbildung 22 folgen bei dem CYP2J2 Tier bei gleichem Stimulationsprotokoll (10 Basisstimuli + 3 ES) keine Arrhythmien. Nach einer kompensatorischen Pause setzt der Sinusrhythmus ein, wobei nach einer Vorhoferregung die ventrikuläre Erregung folgt.



**Abbildung 22: Repräsentativer Trace einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

Neben dem Oberflächen-EKG wurden in der EPU auch intrakardiale Elektrogramme (EGs) aufgezeichnet. Apikale Elektroden zeichneten das EG des rechten Ventrikels (RV EG) auf, distale das EG des rechten Atriums (RA EG). Im Anschluss an die Basisstimulierung erfolgten bis zu drei Extrastimuli (ES). Bei WT Tieren konnten so reproduzierbar ventrikuläre Extrasystolen ausgelöst werden. Bei CYP2J2 Tieren wurden diese niemals reproduzierbar induziert. n=3 Wiederholungen pro Messung. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6.

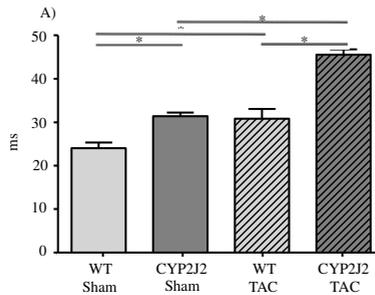
### 5.1.5 VERP wurde durch CYP2J2 Überexpression verlängert

Neben der Untersuchung auf Induktion von Arrhythmien ist es in der *in vivo* EPU möglich, Erregungsbildungs- und Leitungseigenschaften des Herzens weiter zu charakterisieren (4.5.5).

Im Ventrikel bestand der zu untersuchende, physiologische Parameter aus der effektiven Refraktärphase (VERP). Diese beschreibt das minimale Zeitintervall, das benötigt wird, um den Ventrikel erneut zu erregen. Nach TAC wurde eine signifikante Erhöhung der VERP beobachtet (Abbildung 23 A). So stieg bei den WT Tieren nach TAC

die VERP von 24 auf 30,9 ms und bei den CYP2J2 Tieren von 31,4 auf 45,6 ms. Zudem waren auch die erhöhten VERP Zeiten der CYP2J2 Tiere gegenüber den WT Tieren innerhalb einer Behandlungsgruppe hoch signifikant.

Routinemäßig wurden bei jeder Untersuchung ebenfalls im Atrium definierte physiologische Parameter untersucht. Diese bestanden aus dem WBP, 2:1 Überleitung, AVNERP und der AERP. Diese Parameter wiesen zwischen Sham und TAC operierten sowie zwischen WT und CYP2J2 Tieren nur geringe Unterschiede auf (Abbildung 23 B). Auffällig war lediglich eine signifikante Verkürzung der AERP der CYP2J2 Sham Tiere gegenüber den WT Sham Tieren. Dieser Unterschied war jedoch in herzhypertrophierten Tieren nicht mehr vorhanden. AF konnte in keiner Gruppe vermehrt induziert werden.



B)

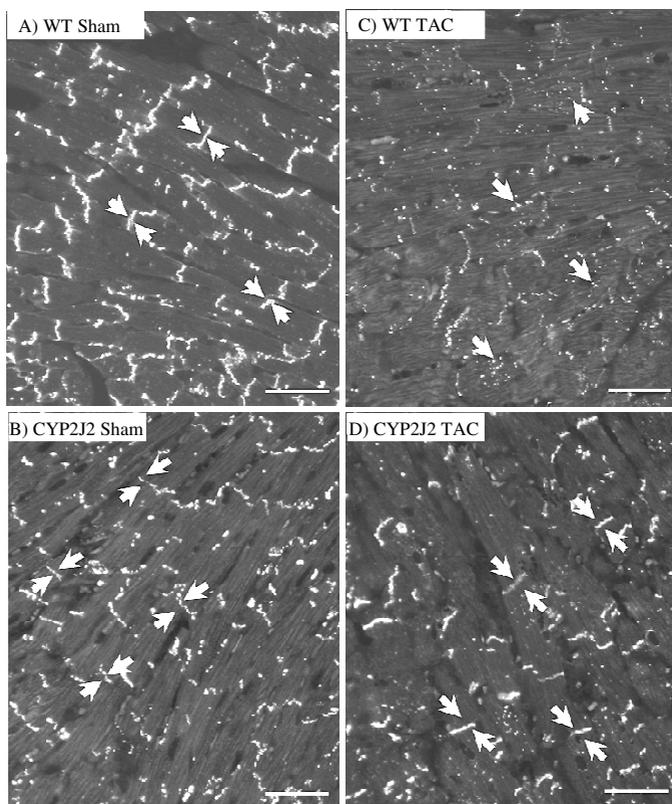
	WBP [ms]	2:1 [ms]	AVNERP [ms]	AERP [ms]	AF
WT Sham	73,1±3,4	52,0±1,6	50,2±1,6	20,3±1,0	-
CYP2J2 Sham	73,7±1,6	52,0±1,0	48,0±1,0	14,7±0,6 *	-
WT TAC	69,6±1,9	53,6±1,2	44,3±1,8	16,7±1,4 #	-
CYP2J2 TAC	69,2±2,4	50,4±2,7	45,6±0,8	18,4±1,4 §	-

**Abbildung 23: Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC)**

A) Die ventrikuläre effektive Refraktärphase (VERP) in ms war durch die TAC induzierte Herzhypertrophie statistisch signifikant erhöht. Zudem wiesen CYP2J2 Tiere im Vergleich zu den WT Tieren bei Sham und TAC operierten Mäusen eine signifikant erhöhte VERP auf. B) Wenckebachpunkt (WBP), 2:1 Überleitung und die Refraktärzeit des Atrioventrikular Knotens (AVNERP) unterschieden sich nicht. CYP2J2 Shams hatten eine signifikant verkürzte atriale effektive Refraktärphase (AERP) gegenüber WT Sham Tieren (\*) und CYP2J2 TAC Tieren (§). WT TAC Tiere wiesen eine verkürzte AERP gegenüber WT Sham Tieren auf (#). CYP TAC und WT TAC unterschieden sich nicht in der AERP. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M. ±) dargestellt. n=3 Wiederholungen pro Messung. WT Sham, n=7; CYP2J2 Sham, n=6; WT TAC, n=5; CYP2J2 TAC, n=6; \*p<0,05.

### **5.1.6 CYP2J2 Überexpression verhinderte Cx43 Dislokation nach chronischer Druckbelastung**

Neben Änderungen der elektrischen Erregbarkeit der Kardiomyozyten ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregungswelle entscheidend in der Entstehung von Arrhythmien. Diese wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch sogenannte *gap junctions* bestimmt. Cx43 bildet den mengenmäßig größten Anteil von *gap junction* Proteinen im Herzen und ist überwiegend im Ventrikel exprimiert. Die Lokalisation an den Glanzstreifen als interzelluläre Verbindung gewährleistet, neben dem Stoffaustausch, die gerichtete elektrische Impulsausbreitung. In den Sham Tieren konnte Cx43 weiterhin an den *intercalated discs* auffindig gemacht werden (Abbildung 24 A) B), wobei nur ein geringer Anteil lateralisiert erschien. In den TAC operierten WT Tieren wurde hingegen nur eine geringe Expression des Cx43 an den *intercalated discs* beobachtet. Der weitaus größte Anteil war delokalisiert und dabei entweder lateralisiert oder internalisiert (Abbildung 24 C). Dem Phänomen der Delokalisation nach TAC wurde durch die kardiospezifische Überexpression des CYP2J2 vorgebeugt. So ist das Cx43 weiterhin an den *intercalated discs* exprimiert (Abbildung 24 D). Bei WT und CYP2J2 Tieren ist gleichermaßen die Hypertrophie der Kardiomyozyten post TAC zu erkennen.



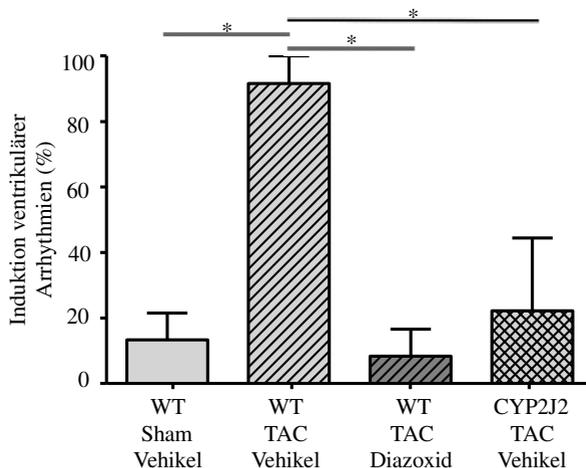
**Abbildung 24: Immunhistochemische Aufnahme der ventrikulären Connexin 43 (Cx43) Lokalisation**

A) B) In den Sham WT und CYP2J2 Tieren war Cx43 an den Glanzstreifen exprimiert. C) Hingegen war Cx 43 vier Wochen nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) bei den WT Tieren delokalisiert. D) Diese Lateralisierung und Internalisierung wurde durch die kardiomyozytenspezifische Überexpression des CYP2J2 stark gemildert. Cx43 blieb zum größten Teil an den *intercalated discs* lokalisiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Balken = 100 µm.

### 5.1.7 Ventrikuläre Arrhythmien wurden *ex vivo* durch CYP2J2 Überexpression und Diazoxid gesenkt

Um Hinweise auf die Wirkungsweise des CYP2J2 Enzyms bzw. seiner Produkte und Involvierung möglicher Signaltransduktionswege zu erhalten, fand das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff Anwendung. In diesem ist es möglich, den direkten Einfluss einer Testsubstanz ohne *firstpass* oder *feedback* Effekte und andere,

extrakardiale, hormonelle oder neurale Einflüssen zu untersuchen. In Kombination mit der Stimulation entsprechend der *in vivo* EPU wurde die Auslösbarkeit von Arrhythmien untersucht. Bei den Sham, Vehikel infundierten WT Tieren lag diese im Durchschnitt bei 13,3 % (Abbildung 25). Nach vier Wochen TAC wurden in 91,6 % der Protokolle reproduzierbare Arrhythmien ausgelöst, das eine signifikante Erhöhung darstellt. In CYP2J2, Vehikel infundierten Tieren wurde die Auslösbarkeit signifikant auf 22,2 % erniedrigt. Nach Infusion von Diazoxid, einem mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner, für 20 min in die Herzen der WT TAC Tiere wurde die Auslösbarkeit signifikant auf 8,3 % reduziert, was der Induktion der Sham Tiere entsprach.



**Abbildung 25: Auslösbarkeit von ventrikulären Arrhythmien im isoliert perfundierten Herz nach Langendorff**

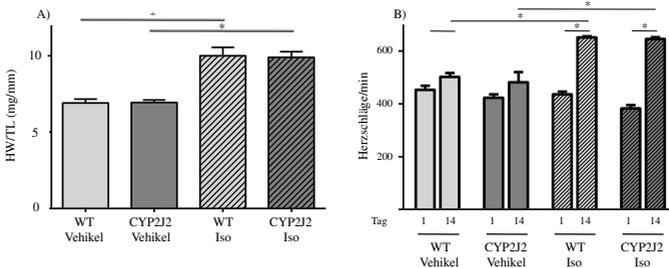
Die geringe Induktion von ventrikulären Arrhythmien in den WT Sham Tieren wurde durch eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) induzierte Herzhypertrophie signifikant erhöht. Durch Überexpression des CYP2J2 wurde die Induktion signifikant erniedrigt. Nach Infusion von Diazoxid, einem mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner, in WT TAC Herzen konnte nur noch in 8,3 % der Protokolle ventrikuläre Arrhythmien ausgelöst werden. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. n=3 Wiederholungen pro Messung. WT Sham Vehikel, n=4; CYP2J2 WT TAC Vehikel, n=4; WT TAC Diazoxid, n=4; CYP2J2 TAC Vehikel, n=4; \*p<0,05.

## 5.2 Einfluss der Überexpression des humanen CYP2J2 auf kardiales Remodelling und Arrhythmieentwicklung im Modell der chronischen $\beta$ -adrenergen Stimulation

### 5.2.1 CYP2J2 Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Herzhypertrophie

Zur Bestimmung der Induktion einer Hypertrophie durch Iso wurde auch hier das Herzgewicht auf die Tibiallänge normalisiert (Abbildung 26 A). Nach der zweiwöchigen Infusion von Iso wiesen die Herzen eine signifikante Erhöhung des Quotienten aus Herzgewicht (HW)/ Tibiallänge (TL) auf. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen, weder bei den Kontrolltieren noch bei den Iso behandelten Tieren, festgestellt.

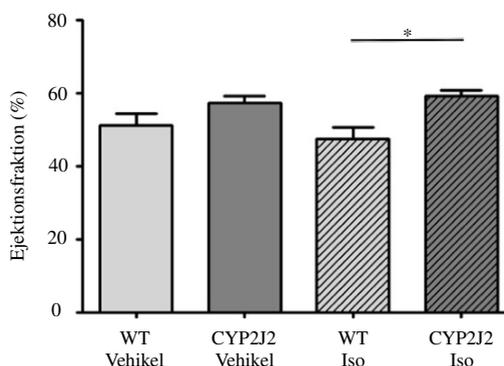
Zur Verifizierung der erfolgreichen, zweiwöchigen Infusion von Iso über osmotische Minipumpen wurde der positiv chronotrope Effekt anhand des EKGs bestimmt (Abbildung 26 B). Am Tag der Implantation konnte unter Narkose in allen vier Gruppen eine Herzfrequenz von ca. 400 Schlägen/min ohne Unterschiede zwischen Genotypen bestimmt werden. Nach zweiwöchiger Infusion von Iso stieg die Herzfrequenz bei WT und CYP2J2 Tieren signifikant auf 651 bzw. 646 Schläge/min an. Auch bei den Kontrolltieren kam es zu einem Anstieg auf 502 bzw. 482 Schlägen pro min. Dies konnte auf die Benutzung einer zweiten Wärmeplatte bei der zweiten Messung und ggf. differierender Narkosetiefe zurückgeführt werden. Dennoch war der positiv chronotrope Effekt von Iso gegenüber der Kontrollgruppe hoch signifikant.



**Abbildung 26: Effekt der chronischen Infusion von Iso auf A) Hypertrophie und B) Chronotropie**  
 A) Herzgewicht/Tibiallänge (HW/TL) in mg/mm. Isoproterenol (Iso) induzierte eine signifikante Hypertrophie, wobei keine Unterschiede zwischen den Genotypen vorhanden waren. B) Nach 14 Tagen Iso Infusion war eine signifikant positiv chronotrope Wirkung zu verzeichnen. WT und CYP2J2 Tiere wiesen keinen Unterschied auf. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \*p<0,05, -- p<0,1(Tendenz).

### 5.2.2 Die systolische Funktion wurde nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation durch CYP2J2 Überexpression verbessert

Zur Charakterisierung der systolischen Funktion des Herzens dient die EF, die bei einer sonografischen Untersuchung routinemäßig ermittelt wird. Bei einer maladaptiven Hypertrophie ist sie vermindert. Bei den Vehikel infundierten Tieren wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt. Nach der zweiwöchigen Infusion hingegen lag die EF der CYP2J2 Tiere bei  $59 \pm 2$  % und war somit gegenüber den WT Tieren mit  $47 \pm 3$  % signifikant erhöht.



#### Abbildung 27: Ejektionsfraktion (EF) nach chronischer Infusion von Isoproterenol (Iso)

Bei Vehikel infundierten Tieren wurde kein Unterschied zwischen WT und CYP2J2 Tieren festgestellt. Hingegen war die EF nach chronischer Iso Infusion bei den CYP2J2 Tieren gegenüber den WT Tieren signifikant erhöht. Die Daten wurden pro Tier über eine Minute aufgezeichnet, analysiert und als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \*p<0,05.

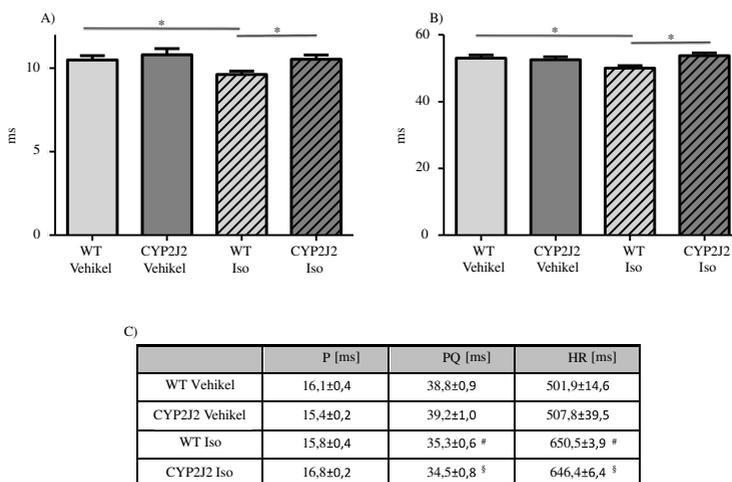
### 5.2.3 QRS- und QTc-Verkürzung nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert

Aufgrund der im TAC Modell erlangten Erkenntnis zur Modulation elektrophysiologischer Parameter durch CYP2J2 Überexpression wurde zur Grundcharakterisierung der elektrischen Aktivität des Herzens eine elektrokardiografische Untersuchung durchgeführt.

Unter basalen Bedingungen wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen verzeichnet. Jedoch verkürzte sich der QRS-Komplex und die QTc Zeit der WT Tiere

nach Iso signifikant (Abbildung 28 A und B). Dieser Effekt war in den CYP2J2 Tieren nicht zu beobachten.

Aufgrund der chronischen Infusion von Iso kam es in beiden Genotypen gleichermaßen zur signifikanten Verkürzung der PQ Zeit auf 35 ms und zu einem starken Anstieg der HF auf knapp 650 Schläge/min (Abbildung 28 C). Die Länge der P-Welle wurde weder durch Iso noch durch den Genotyp verändert.



**Abbildung 28: EKG Parameter zwei Wochen nach Infusion von Isoproterenol (Iso) oder der Kontrollsubstanz NaCl**

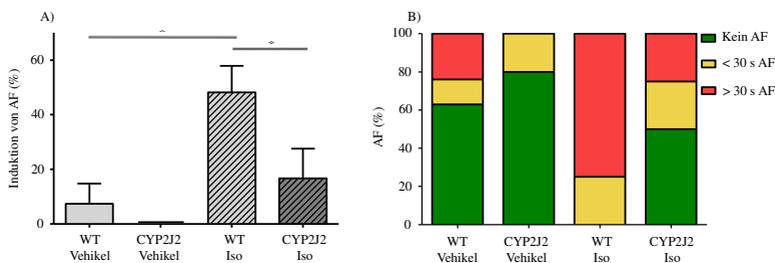
A) Durch chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation verkürzte sich der QRS-Komplex der WT Tiere. CYP2J2 Tiere zeigten diese Verkürzung nicht. B) Ebenso wiesen WT Tiere nach Iso Infusion eine verkürzte QTc Zeit auf, die in den CYP2J2 Tieren nicht zu beobachten war. C) Basale Unterschiede der EKG Parameter P, PQ, und HR zwischen den Genotypen waren nicht zu verzeichnen. Nach Iso Infusion wiesen WT (#) und CYP2J2 Tiere (§) gleichermaßen verkürzte PQ Zeiten und erhöhte HR auf. Die Daten wurden pro Tier über eine Minute aufgezeichnet, analysiert und als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \* $p < 0,05$ .

#### 5.2.4 CYP2J2 Überexpression verringerte Induktion und Länge von AF nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

In gleicher Weise wie in der chronischen Druckbelastung wurde auch im Iso Modell die EPU zur Untersuchung von Arrhythmien angewendet. In Zusatzstimulationsprotokollen wurde die Induktion von atrialen und ventrikulären Arrhythmien analysiert. Überraschenderweise waren in diesem Modell nur vereinzelt ventrikuläre Arrhythmien

ohne Unterschiede zwischen den Gruppen auszulösen. Stattdessen wurde die Induktion von AF bei den WT Tieren durch eine zweiwöchige Infusion von Iso signifikant erhöht (Abbildung 29 A). Durchschnittlich waren in den WT Iso infundierten Tieren in 48,1 % der durchgeführten Protokolle AF reproduzierbar auslösbar. Kardiale Überexpression des CYP2J2 senkte die Induktion von AF auf 16,7 % der Protokolle, was in etwa den Vehikel infundierten WT Tieren entsprach. In CYP2J2 Tieren mit Vehikelinfusion konnte in keinem Protokoll reproduzierbar AF induziert werden.

Um den Schweregrad des Auftretens weiter zu analysieren, wurde das Auftreten in nicht-anhaltendes AF (< 30 s) und anhaltendes AF (> 30 s) unterteilt (Abbildung 29 B). So waren bei den WT Vehikel infundierten Tieren 63 % gar nicht induzierbar, 13 % nicht-anhaltend und in 24 % der Tiere war anhaltendes AF induzierbar. Bei den CYP2J2, Vehikel infundierten Tieren waren 20 % der Tiere nicht-anhaltend auslösbar und 80 % gar nicht induzierbar. Die Arrhythmien traten hier ausschließlich im Burstprotokoll auf. Durch chronische Infusion von Iso stieg auch die Länge der Induktion dramatisch an. So waren 75 % der WT Tiere anhaltend, mit einem Maximum von 424 s induzierbar. Die restlichen 25 % waren nicht-anhaltend induzierbar. 50 % der CYP2J2 Tiere waren nach Iso gar nicht induzierbar. Jeweils 25 % waren nicht-anhaltend und anhaltend induzierbar, was eine signifikante Verbesserung gegenüber den WT Tieren darstellte.

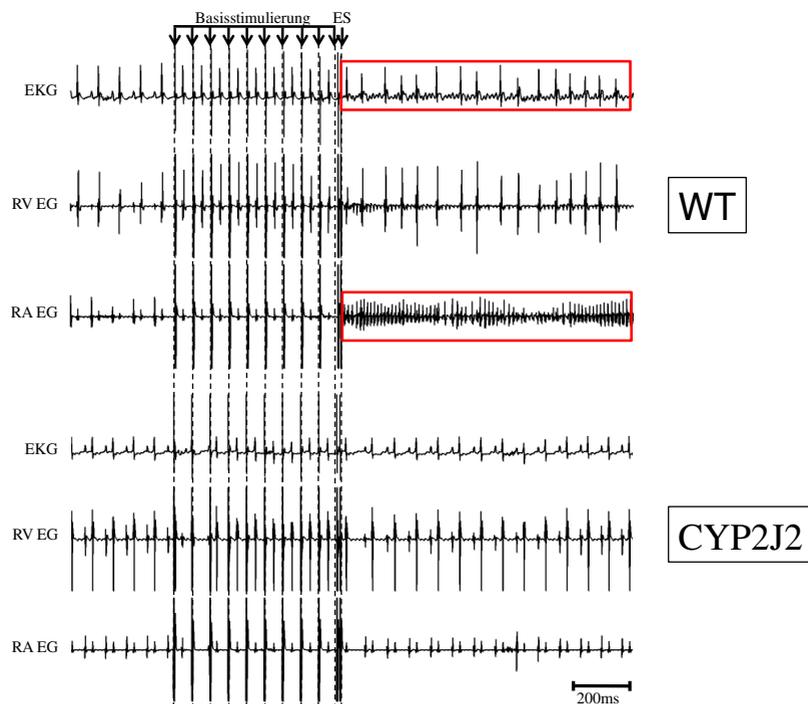


**Abbildung 29: A) Induktion von Vorhofflimmern (AF) und B) Quantifizierung der Länge**

A) Die Induktion von AF in Prozent aller Protokolle wurde durch die chronische Infusion von Isoproterenol (Iso) bei den WT Tieren signifikant erhöht. CYP2J2 Tiere wiesen nur in 16,7 % der Protokolle AF auf. B) Die Länge induzierter Arrhythmien nahm durch chronische Behandlung mit Iso zu. So war anhaltendes AF in 75 % der WT Tiere zu verzeichnen. 50 % der CYP2J2 Iso Tiere wiesen hingegen kein AF auf. Jeweils 25 % zeigten nicht-anhaltendes oder anhaltendes AF, was eine signifikante Reduzierung der Länge gegenüber den WT Tieren darstellte. Die Daten sind als Mittelwerte (S.E.M.  $\pm$ ) dargestellt. n=3 Wiederholungen pro Messung. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \*p<0,05.

Eine repräsentative Aufnahme der *in vivo* EPU nach chronischer Infusion von Iso ist in Abbildung 30 dargestellt. Im oberen Bereich sind das Oberflächen-EKG sowie das RV EG und das RA EG der WT Tiere dargestellt. Der am Anfang bestehende Sinusrhythmus wurde durch 10 Impulse der Basisstimulierung abgelöst, an die ein ES angekoppelt wurde. AF wurde durch eine unregelmäßige und schnelle Abfolge von Signalen im rechten Vorhof, die über das EG aufgezeichnet wurden (rote Umrandung), bestätigt. Zusätzlich konnte im Oberflächen-EKG gleichermaßen eine schnelle und unregelmäßige Aufzeichnung der P-Wellen gemessen werden (rote Umrandung). Auch das RR-Intervall war nicht mehr regelmäßig.

Im unteren Bildabschnitt sind gleiche Aufzeichnungen bestehend aus Oberflächen-EKG, EG des rechten Ventrikels und rechten Atriums der CYP2J2 Tiere nach chronischer Infusion von Iso dargestellt. Auch hier wurde der Sinusrhythmus von den 10 Impulsen der Basisstimulierung und einem ES abgelöst. Anders als bei den WT Tieren folgte nun eine kompensatorische Pause von ca. 100 ms, um dann wieder dem normalen Sinusrhythmus mit regelmäßigen P, QRS und T zu folgen.



**Abbildung 30: Repräsentativer Trace einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) nach zwei Wochen chronischer Isoproterenol Infusion (Iso)**

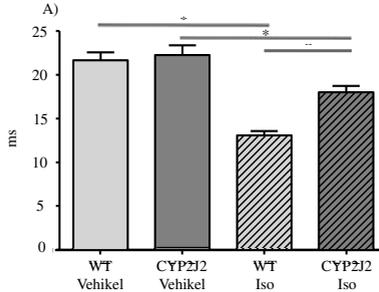
Neben dem Oberflächen-EKG wurden in der EPU auch intrakardiale Elektrogramme (EGs) aufgezeichnet. Apikale Elektroden zeichneten das EG des rechten Ventrikels (RV EG) auf, distale das EG des rechten Atriums (RA EG). Im Anschluss an die Basisstimulierung erfolgte ein Extrastimulus (ES). Bei WT Tieren konnte so reproduzierbar Vorhofflimmern (AF) induziert werden. Bei CYP2J2 Tieren konnte dies signifikant reduziert werden. 3 Wiederholungen pro Messung. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8.

### 5.2.5 Eine Iso induzierte AERP Verkürzung wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede in den Refraktärzeiten post TAC wurden im Iso Modell ebenfalls physiologische Parameter aus Atrium und Ventrikel generiert.

Dabei war auffällig, dass die AERP nach chronischer Infusion von Iso bei beiden Genotypen erniedrigt war (Abbildung 31 A). Die kardiale Überexpression des CYP2J2 schwächte den Effekt der AERP Verkürzung jedoch ab. Bei den CYP2J2 Tieren wurde eine durchschnittliche Refraktärzeit von  $18 \pm 0,9$  ms im Gegensatz zu  $14 \pm 0,8$  ms der

WT Tiere ermittelt. Dieser Unterschied zwischen den Genotypen nach Iso war signifikant. Vehikel infundierte Tiere wiesen keinen Unterschiede in der AERP auf. Sie lagen gleichermaßen bei 21 ms.



B)

	WBP [ms]	2:1 [ms]	AVNERP [ms]	VEPR [ms]	VT
WT Vehikel	71,3±1,3	52,0±0,5	48,7±1,3	28,9±1,0	-
CYP2J2 Vehikel	68,8±1,4	50,8±1,5	47,1±1,0	36,4±1,6 *	-
WT Iso	67,8±1,0	49,6±0,6	46,7±1,2	30,5±0,6	-
CYP2J2 Iso	70,0±1,8	53,3±1,4	48,7±1,3	36,8±0,6 +	-

**Abbildung 31: Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung nach chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol (Iso)**

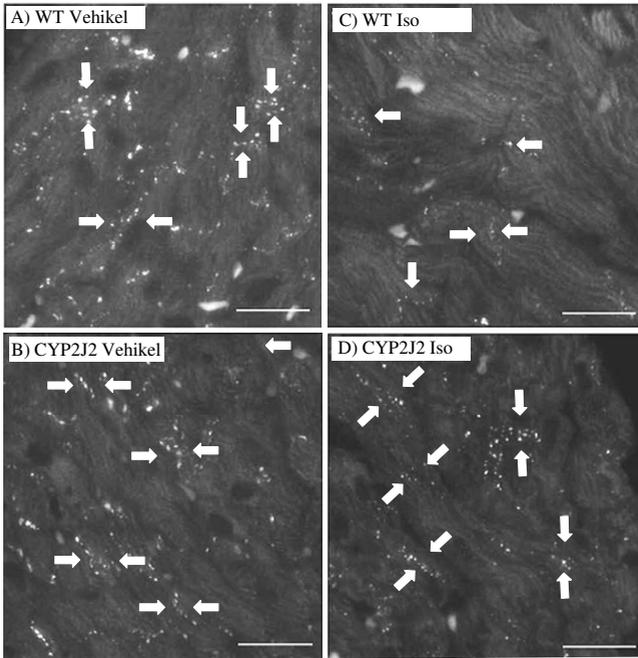
A) Die atriale effektive Refraktärphase (AERP) in ms war durch die zweiwöchige Infusion von Iso signifikant erniedrigt. Der Effekt der Iso Infusion wurde durch die CYP2J2 Überexpression abgeschwächt. Die CYP2J2 Tiere wiesen eine signifikant erhöhte AERP im Vergleich zu den WT Tieren auf. B) Wenckebachpunkt (WBP), 2:1 Überleitung und die Refraktärzeit des Atrioventrikular-Knotens (AVNERP) unterschieden sich nicht. CYP2J2 Vehikel hatten eine signifikant erhöhte ventrikuläre effektive Refraktärphase (VEPR) gegenüber WT Vehikel Tieren (\*). Ebenso war die VEPR der CYP2J2 Iso Tiere höher als die der WT Iso Tiere (+). Ventrikuläre Tachykardien (VT) wurde in keiner Gruppe in erhöhtem Maße induziert. 3 Wiederholungen pro Messung. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \*p<0,05.

Weitere Parameter wie WBP, 2:1 Überleitung und AVNERP wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 31 B). Die VEPR war bei den CYP2J2 Tieren bei Vehikel und Iso infundierten Tieren gegenüber den WT Tieren verlängert. VTs konnten in keiner Gruppe vermehrt induziert werden.

### **5.2.6 Cx40 Degradation nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert**

Aufgrund der Ergebnisse einer positiven Beeinflussung des *gap junction* Remodellings in den Ventrikeln durch CYP2J2 Überexpression wurde eine analoge Untersuchung auch in den Vorhöfen durchgeführt. Cx40 bildet im Atrium das bedeutendste *gap junction* Protein für die geregelte Impulsausbreitung. So zeigten Genmutationen oder – polymorphismen und daraus resultierende, veränderte Expressionsmuster im Atrium eine erhöhte Prädisposition zu AF beim Menschen<sup>60-62</sup> und atrialen Tachyarrhythmien bei der Maus.<sup>103-106</sup>

Nach Färbung mit Cx40 AK konnte eine Abnahme der Cx40 Expression nach chronischer Infusion von Iso festgestellt werden (AAbbildung 32). WT und CYP2J2 Kontrollen wiesen starke Signale in der Immunfluoreszenz auf (AAbbildung 32 A, B), wobei ein erhöhter Anteil in den CYP2J2 Vehikel infundierten Tieren festgestellt wurde. Bei den Iso infundierten WT Tieren konnte nur ein sehr schwaches, vereinzelt Signal von Cx40 gemessen werden (AAbbildung 32 C). CYP2J2 Iso behandelte Tieren wiesen auch eine geringere Cx40 Expression als entsprechende Vehikel infundierte Tiere auf (AAbbildung 32 D). Die Intensität war jedoch höher als in den WT Iso infundierten Tieren, womit eine höhere Expression des Cx40 gezeigt werden konnte.



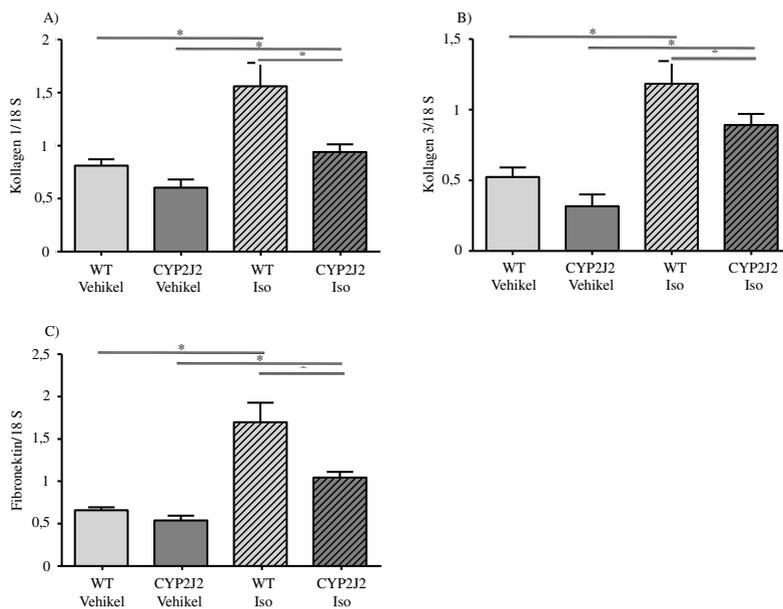
**Abbildung 32: Immunhistochemische Aufnahme der Connexin 40 (Cx40) Färbung des Atriums**

A) B) Das Signal der fluoreszierenden Cx40 AK war in den Vehikel infundierten WT und CYP2J2 Tieren intensiv. C) Nach Infusion von Iso konnte in den WT Tieren nur noch ein sehr schwaches Signal der Cx40 AK erfasst werden. D) Diese Abnahme der Cx40 Expression nach Iso war bei den CYP2J2 Tieren abgeschwächt. Balken = 100 µm

### 5.2.7 CYP2J2 Überexpression senkte RNS-Expression profibrotischer Gene nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Der beschriebene atriale Phänotyp der EPU gab im Folgenden Anlass, das strukturelle Remodelling der Vorhöfe näher zu untersuchen. Die wichtigsten Bestandteile der EZM bilden Kollagen 1 und 3 sowie Fibronektin und werden zum großen Teil von Fibroblasten in der EZM synthetisiert. Gemeinsam spielen sie eine wichtige Rolle beim strukturellen Umbau und wurden daher quantifiziert (Abbildung 33). Unter Basalbedingungen der Vehikel infundierten Tiere wurde kein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt. Nach chronischer Infusion von Iso wurde bei den WT Tieren ein bis zu dreifacher und signifikanter Anstieg der Genexpression von Kollagen

1 und 3 sowie Fibronektin im Atrium gemessen. Die kardiospezifische Überexpression von CYP2J2 minderte den Anstieg der drei Genexpressionen signifikant.

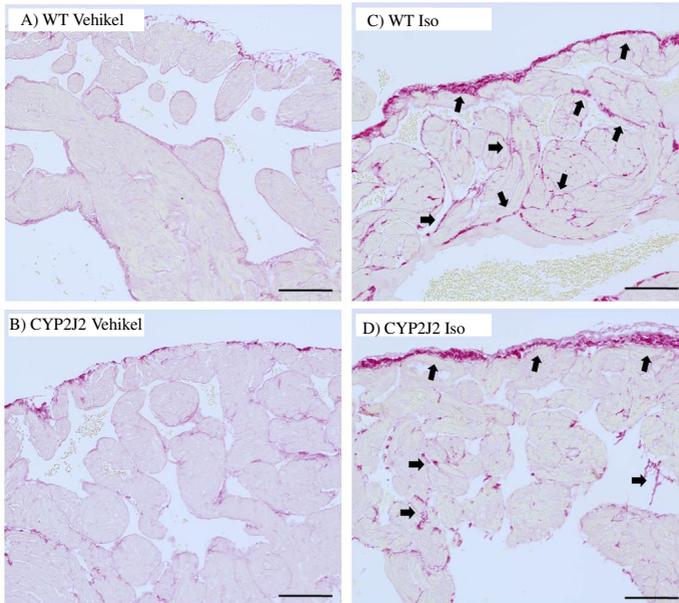


**Abbildung 33: Genexpression von Kollagen 1 und 3 sowie Fibronektin des Atriums**

Durch eine zweiwöchige Infusion von Iso kam es zu einer bis dreifach höheren Expression von A) Kollagen 1 (Kol 1) und B) Kollagen 3 (Kol 3) sowie C) Fibronektin bei den WT Tieren. Kardio-myozytenspezifische Überexpression von CYP2J2 minderte dies signifikant. Bei Vehikel infundierten Tieren war kein Unterschied in der Genexpression zwischen den Genotypen auffällig. WT Vehikel, n=8; CYP2J2 Vehikel, n=5; WT Iso, n=9; CYP2J2 Iso, n=8; \*p<0,05.

### 5.2.8 Gesteigerte interzelluläre Kollagenexpression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde durch CYP2J2 Überexpression gemindert

Zur Bestimmung des interstitiellen Gesamtkollagengehalts wurden Längsschnitte von Herzpräparaten angefertigt und mit Sirius Rot gefärbt. Nach zweiwöchiger Infusion von Iso war ein erhöhter Gehalt von Kollagenen in den linken Aurikeln der Atrien in WT (Abbildung 34 C) und CYP2J2 Tieren (Abbildung 34 D) gegenüber den Vehikel infundierten WT (Abbildung 34 A) bzw. CYP2J2 Tieren (Abbildung 34 B) auffällig. Der erhöhte Kollagengehalt war epikardial bei WT und CYP2J2 am profundesten. Die interstitielle Kollagenzunahme nach Iso war jedoch bei den CYP2J2 Tieren wesentlich geringer ausgeprägt als bei den WT Iso infundierten Tieren.



**Abbildung 34: Sirius Rot Färbung atrialen Gewebes nach zweiwöchiger Infusion von Isoproterenol (Iso) bzw. Vehikel**

In Längsschnitten des linken Aurikels der Atrien waren Kollagene bei den Vehikel infundierten Tieren in nur geringem Maße nachzuweisen. Nach zweiwöchiger Infusion von Iso stieg der Gesamtkollagengehalt, vor allem epikardial an. CYP2J2 Überexpression minderte dabei vor allem die interstitielle Expression von Kollagenen nach Iso gegenüber den WT Tieren. Balken = 100  $\mu$ m

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression des CYP2J2 Gens hinsichtlich des damit einhergehenden Effekts auf Arrhythmien in Hypertrophie-Modellen der chronischen Druckbelastung durch TAC und chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation durch Iso untersucht.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von Mortalität und ventrikulären Arrhythmien in den Tieren mit TAC bedingter Herzhypertrophie, deren ursächlicher Zusammenhang und Vergleich mit anderen Studienergebnissen im Abschnitt 6.1 genauer diskutiert werden. Die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation führte im Gegensatz dazu zu einer eher moderaten Hypertrophie ohne erhöhte Mortalität im Beobachtungszeitraum. Die Neigung zu ventrikulären Arrhythmien war nicht erhöht. Zu unserer Überraschung zeigte sich jedoch eine signifikant erhöhte Induzierbarkeit von AF in den Kontrolltieren, was durch CYP2J2 Überexpression verhindert werden konnte. AF ist bereits in anderen, spezifischen Mausmodellen beobachtet worden, allerdings nicht im Modell der chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation, welches einen relevanten Pathomechanismus in der AF Entwicklung des Menschen darstellt. Die Relevanz dieser Ergebnisse und der Vergleich mit anderen AF Modellen sind im Abschnitt 6.2 diskutiert.

In dieser Arbeit konnten darüber hinaus neue Erkenntnisse über den molekularen Wirkmechanismus des antiarrhythmischen Effekts der EETs erlangt werden. Ein Einfluss auf das strukturelle Remodelling mit Reduktion der Fibroseentwicklung ließ sich nur sicher im Modell der chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation nachweisen. Veränderungen der interzellulären EZM sind in verschiedenen anderen Studien als relevant für die Entstehung von Arrhythmien beschrieben. Wie sich die Ergebnisse dieser Arbeit diesbezüglich einordnen, wird in den Abschnitten 6.1.3 und 6.2.2 beschrieben. Als entscheidend stellte sich eine Verbesserung des elektrischen Remodellings in beiden Hypertrophie-Modellen mit möglicher Einbeziehung von mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanälen heraus, was genauer unter 6.1.4, 6.1.6 und 6.2.3 diskutiert wird. Eine hohe Relevanz kommt in beiden Modellen dabei der Stabilisierung von *gap junction* Proteinen in Atrien und Ventrikeln bei CYP2J2 Mäusen zu, was unter 6.1.5 und 6.2.4 näher diskutiert wird.

Zusammenfassend konnte hiermit erstmals die antiarrhythmische Potenz erhöhter CYP2J2 abhängiger EET Bildung auf ventrikuläre und atriale Arrhythmien gezeigt werden. Des Weiteren konnten zusätzliche Erkenntnisse zu dem Wirkmechanismus von EETs erlangt werden. Diese Ergebnisse und das innovative AF Modell in der Maus stellen eine wichtige Grundlage für die Möglichkeit der Entwicklung eines neuen, antiarrhythmischen Medikaments basierend auf EET Analoga dar.

## **6.1 Der Einfluss von kardialer CYP2J2 Überexpression auf die chronische Druckbelastung durch TAC**

### **6.1.1 TAC induzierte kardiale Hypertrophie in WT und CYP2J2 Tieren gleichermaßen**

Durch die von Rockman et al.<sup>107</sup> etablierte, chronische Druckbelastung nach TAC entwickelte sich in Übereinstimmung mit der Literatur kardiale Hypertrophie.<sup>102, 108, 109</sup> Der Index HW/TL verdoppelte sich nach vier Wochen nahezu von ca. sechs bei den Sham Operierten auf über elf bei TAC Operierten (Abbildung 18). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt.

Zur weiteren Verifizierung der Hypertrophie erfolgte die Messung von ANP, BNP und beta-MHC Expression im Ventrikelmyokard. Diese und weitere Protoonkogene gelten *in vivo* und *in vitro* Modellen von Nagern als etablierte Marker pathologischer, kardialer Hypertrophie.<sup>145,147-149</sup> Im gesunden, adulten Kardiomyozyten sind sie gering oder gar nicht exprimiert und werden erst im Laufe der Hypertrophie, als Anpassung auf verminderte Energieresourcen, vermehrt abgelesen.<sup>102, 110</sup> So wurde in der vorliegenden Studie BNP auf 18 S normalisiert und bei den Sham operierten Tieren in sehr geringem Maße nachgewiesen (Abbildung 18). Entsprechend publizierter Studien zur BNP Expression nach TAC wiesen die WT Tiere in der vorliegenden Arbeit einen fünffachen Anstieg des BNP auf.<sup>111</sup> Die nur tendenziell verringerte BNP Expression der CYP2J2 Tieren bestätigte, dass kein signifikanter Einfluss auf das Ausmaß der Hypertrophieentwicklung durch erhöhte CYP2J2 Expression bestand. Übereinstimmend zu diesen Ergebnissen wurde auch im Modell der chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation kein wesentlicher Einfluss des CYP2J2 auf die Hypertrophieentwicklung beobachtet (6.2.1).

### **6.1.2 CYP2J2 Überexpression senkte die Mortalität nach TAC signifikant und verbesserte die systolische Funktion des Herzes. Verbesserungen im strukturellen und elektrischen Remodelling könnten ursächlich gewesen sein.**

Es ist bekannt, dass eine pathologische Hypertrophie und daraus resultierende HF das Mortalitätsrisiko erhöht. Zur Überlebenszeitanalyse in der vorliegenden Arbeit wurde die Kaplan-Meier-Kurve als eine grafische Darstellung der Mortalität über die Zeit angefertigt (Abbildung 16). Im Beobachtungszeitraum von 60 Tagen überlebten alle Sham Tiere. Anders war dies bei den WT Tieren nach TAC. Diese begannen ab Tag 10 zu sterben, wobei nach 60 Tagen nur noch 58 % der Population lebte. Diese Beobachtung stimmt mit veröffentlichten Arbeiten überein.<sup>112</sup> Überraschenderweise konnte allein durch die Überexpression des CYP2J2 die Mortalitätsrate innerhalb der 60 Tage nach TAC bei vergleichender Hypertrophie zu den WT Tieren signifikant gesenkt werden. Eine entsprechende Vergleichsarbeit existiert in der Literatur zur Zeit nicht.

Prinzipiell kann die hohe Mortalität der TAC Tiere durch ein progredientes Versagen der kontraktilen Funktion oder durch plötzlich auftretende Herzrhythmusstörungen bedingt sein.<sup>21</sup> In der vorliegenden Arbeit wiesen Sham CYP2J2 Tiere eine verbesserte EF gegenüber den WT Tieren auf (Abbildung 17). Achtwöchige chronische Druckbelastung führte zu einer ausgeprägten Herzinsuffizienz, erkennbar an einem deutlichen Abfall der EF beim WT auf  $12 \pm 0,5$  %. TAC Mäuse mit kardialer CYP2J2 Überexpression wiesen eine höhere EF von  $20 \pm 0,5$  % auf. Trotz der signifikanten Differenzen ist in beiden Gruppen nach TAC von einer hochgradigen HF zu sprechen, die beim Menschen bei einer Pumpfunktion unterhalb von 30 % diagnostiziert wird. Somit konnte die CYP2J2 assoziierte Reduktion der Mortalität nicht ausreichend durch eine Verbesserung der Pumpfunktion erklärt werden.

Um nähere Informationen über die Mechanismen, die ursächlich für die erheblich verbesserte Mortalität nach TAC durch CYP2J2 Überexpression waren, zu erhalten, musste das strukturelle und elektrische Remodelling als maßgeblicher Anteil an der kardialen Hypertrophie näher untersucht werden.

### **6.1.3 Das strukturelle Remodelling wurde durch CYP2J2 nur geringfügig beeinflusst.**

Als Reaktion auf einen pathologischen Stimulus mechanischem oder neurohumoralen Ursprungs kommt es im Zuge des strukturellen Remodellings zur Fibrose, einer Akkumulation kollagener Fasern. Im häufig einhergehenden Ungleichgewicht von Matrixproteinen und deren Regulatoren kommt es in Folge der Änderung des Metabolismus der Kardiomyozyten zum kardialen Funktionsverlust.<sup>113</sup> In Übereinstimmung mit der Literatur entwickelten die Tiere innerhalb von vier Wochen nach TAC eine deutliche Fibrose, die sicherlich auch für die verringerte EF aufgrund erhöhter Steifheit des Ventrikels ursächlich war.<sup>102, 108, 114</sup> Der dreifache Anstieg der RNS-Expression von Kollagen 1 und 3 der WT Tiere wurde aber nur tendenziell durch CYP2J2 Überexpression reduziert. (Abbildung 19).

Allgemein gibt es bisher keine direkten Daten zur Auswirkung von CYP Metaboliten auf kardiales Matrixremodelling infolge chronischer Druckbelastung. Jedoch werden in der aktuellen Literatur fibrinolytische Eigenschaften der CYP abgeleiteten EETs über erhöhte Expression des *tissue plasminogen-activators* im vaskulären Endothel beschrieben.<sup>14</sup> Darüber hinaus hemmen EETs die proinflammatorische NF-κB-Aktivierung. Wie gezeigt wurde, spielt sie in der Fibroseentwicklung im TAC Modell eine wichtige Rolle, so dass hierüber ein positiver Effekt der CYP2J2 Expression auf das Matrixremodelling in unserem Modell erklärt werden kann.<sup>115</sup>

Insgesamt erklären allerdings der übereinstimmend geringe Einfluss auf die Hypertrophieentwicklung und die Fibroseentwicklung nicht die Unterschiede in der Mortalität. Dies machte eine Wirkung der EETs auf das elektrische Remodelling wahrscheinlicher.

### **6.1.4 Ventrikuläre Arrhythmien wurden durch Minderung des elektrischen Remodellings bei CYP2J2 Mäusen verhindert.**

Die EPU ergab eine hohe Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien in den WT TAC Tieren, was mit bereits publizierten Studien übereinstimmt.<sup>116</sup>

Zu unserer Überraschung ließen sich in den TAC Tieren mit CYP2J2 Überexpression keine ventrikulären Arrhythmien trotz signifikanter Hypertrophie und reduzierter kontraktiler Funktion induzieren (Abbildung 21). Somit konnte erstmals der

antiarrhythmische Effekt einer erhöhten EET Bildung bei kardialer Hypertrophie gezeigt werden. Die erheblichen Differenzen implizierten einen direkten Zusammenhang zwischen der antiarrhythmischen Wirkung durch CYP2J2 Überexpression und der deutlich verminderten Mortalität nach TAC.

Die Relevanz dieses Zusammenhangs wurde weiterhin durch eine deutliche Stabilisierung von EKG Parametern nach TAC unterstützt. Diese können als wichtige Marker für das elektrische Remodelling genutzt werden.

Auffällig war eine relevante, mit ähnlichen Arbeiten vergleichbare Verbreiterung des QRS-Komplexes der WT Tiere nach TAC von 10,7 ms auf 14 ms (Abbildung 20).<sup>117</sup> Laut Literatur ist eine deutliche Verbreiterung des QRS beim Menschen von mehr als 33 % mit einer HF assoziiert<sup>118</sup> und erhöht das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien deutlich.<sup>33</sup> Zudem war auch die Herzfrequenz bei den TAC operierten WT Tieren stark erhöht, ebenfalls ein Indikator für HF. Diese Veränderungen wurden bei den CYP2J2 Tieren nach TAC im EKG nicht beobachtet. Sie zeigten keine signifikanten Veränderungen zu den Sham Tieren. In dieser Arbeit wurden damit erstmals die Auswirkungen erhöhter EET Produktion auf das EKG beschrieben. Bis auf eine leichte, aber signifikante QTc Zeit Verlängerung der CYP2J2 Sham Tiere zeigten sich sonst keine signifikanten Unterschiede in den EKG-Parametern, was relevante Einflüsse auf die atrioventrikuläre Überleitung ausschließt. Da sich die QTc Verlängerung nur bei den CYP2J2 Sham-Tieren der TAC Studie zeigte und nicht bei den vergleichbaren Kontrollen der Iso Studie, ist die Relevanz dieses Befundes unklar und muss in weiteren Studien verifiziert werden.

Als weiteren Hinweis auf die Beeinflussung der elektrischen Eigenschaften des Herzmuskels fanden wir eine signifikante Verlängerung der VERP Zeit in beiden aufgezeigten Modellen von Herzhypertrophie in CYP2J2 Tieren zu vergleichbaren WT Tieren (Abbildung 23 und Abbildung 31). Schon unter Kontrollbedingungen war diese um 6,4 ms bzw. 7,5 ms erhöht. Nach TAC betrug dieser Unterschied zwischen den Genotypen sogar 14,7 ms, im Iso Modell immerhin noch 6,3 ms. Die VERP stellt das minimale Zeitintervall für die Wiedererregbarkeit der ventrikulären Kardiomyozyten dar und korreliert in der Regel direkt mit der AP Länge.

Die Ergebnisse geben Hinweise auf eine Wirkung der EETs über am kardialen AP beteiligte Ionenkanäle. In der Tat sind bereits mehrere Arbeiten publiziert, die dieses

Ergebnis unterstützen. So wird eine gesenkte Öffnungsbereitschaft des myokardialen  $\text{Na}^+$ -Kanals<sup>84</sup> und eine verringerte Öffnung und Wiedererregbarkeit des LTCC über direkte Hemmung an einem porzinen Lipidbilayer beschrieben.<sup>15</sup> Durch gesenkte Sensitivität zu Adenosintriphosphat (ATP) wird der myokardiale  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal aktiviert.<sup>85,86</sup> Für CYP2J2 Mäuse konnte durch Einsatz pharmakologischer Inhibitoren gezeigt werden, dass die Aktivierung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals essentiell für die verbesserte Erholung nach Ischämie/Reperfusion ist. Dieser Effekt involvierte die Aktivierung der p42/p44 mitogen aktivierten Proteinkinase.<sup>87</sup> Darüber hinaus wurden an isolierten Kardiomyozyten von CYP2J2 Mäusen verstärkte L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{I}_{\text{to}}$  ( $\text{K}^+$ )-Ströme gezeigt.<sup>16,90</sup> Somit führt CYP2J2 abhängige EET Bildung zu einer komplexen Modulation von Ionenkanälen. Die teils kontroversen Aussagen zur Wirkung der EETs auf den LTCC leiten sich wahrscheinlich zum einen von dem Faktum ab, dass regio- und enantiomer bedingte unterschiedliche Wirkungen der EETs vernachlässigt wurden, und zum anderen, dass beim porzinen Lipidbilayer eine Aufreinigung des Kanals durchgeführt wurde, bei dem jeglicher Einfluss durch Signaltransduktionswege außer Acht gelassen wurde.

Die Länge des AP wurde in CYP2J2 Tieren unter TAC Bedingungen noch nicht gemessen. In isolierten Kardiomyozyten von CYP2J2 wurde jedoch ein verkürztes AP gemessen.<sup>16</sup> Auch wenn es keine direkten Hinweise auf eine Verkürzung der APD in der vorliegenden Arbeit gab, widersprechen diese Erkenntnisse nicht den Ergebnissen dieser Studie. Im vorliegenden Modell sprachen die unveränderten  $\text{QT}_c$  Zeiten des Oberflächen-EKGs auf jeden Fall gegen eine Verlängerung der APD. Im Gegensatz dazu sehen wir in unserem Modell eine Verzögerung der Wiedererregbarkeit, was z. B. durch eine verzögerte Reaktivierung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen erklärbar ist. Die genaue Messung der AP Länge und durch EETs *in vivo* regulierte Ionenströme sollten Gegenstand weiterer Studien sein.

Neben stabilen Bedingungen von Ionenverhältnissen ist des Weiteren die Kommunikation der Kardiomyozyten für eine geregelte Herztätigkeit überaus wichtig und sollte im Folgenden zusätzlich untersucht werden.

### **6.1.5 TAC induzierte Cx43 Delokalisation wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert**

Die Impulsleitung im Herzen ist von mehreren Faktoren abhängig: Intrinsischer Membranexzitabilität, intra- und extrazellulärer Widerstand sowie der Zell-Zell-Kopplung, die einen niedrigen Widerstand in der interzellulären Kommunikation bildet.<sup>119</sup> Im Ventrikel wird diese hauptsächlich von *gap junction* Kanälen aus der Familie der Connexine genauer dem Cx43 gewährleistet.<sup>120, 121</sup> Verminderte Expression und unregelmäßige Lokalisation ist häufig mit dem elektrischen Remodelling assoziiert und geht mit strukturellen Herzerkrankungen einher.<sup>122-124</sup> Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation des Cx43 untersucht (Abbildung 24). In den immunhistochemischen Färbungen zeigten die WT Tiere vier Wochen nach TAC eine diffuse Verteilung, die z.T. lateralisiert oder intrazellulär war.

Hingegen zeigten CYP2J2 Tiere nach TAC ähnliche physiologische Cx43-Expressionmuster wie die Sham Tiere mit einer prädominierenden Lokalisation in den Zell-Zell-Verbindungen benachbarter Kardiomyozyten. Dieser *gap junction* stabilisierende Effekt einer CYP2J2 Überexpression in der chronischen Druckbelastung des Herzens ist bisher noch nicht beschrieben worden. Eine Verhinderung einer pathologischen *gap junction* Expression kann ebenfalls die antiarrhythmische Wirkung erklären.

Unterstützende Daten für diesen Zusammenhang lieferten Untersuchungen an induzierbaren, Cx43 defizienten Mäusen, die durch *gap junction* Entkopplung eine starke Reduzierung der Cx43 Expression (> 80 %) und eine moderate Reduzierung der CV (ca. 40 %) zeigten.<sup>125, 126</sup> Sie wiesen eine regionale Heterogenität in der Repolarisation und eine hohe Inzidenz von spontanen und induzierbaren, polymorphen ventrikulären Tachyarrhythmien auf.<sup>127</sup> Die Mutation resultierte in einer bis zu 80 %igen Mortalität aufgrund von spontanen Arrhythmien.<sup>125</sup> Untersuchungen an konventionellen Cx43 Ko Tieren konnten wegen perinataler Mortalität infolge kardialer Malformation des pulmonalen Ausflusstraktes nicht durchgeführt werden.<sup>128-130</sup>

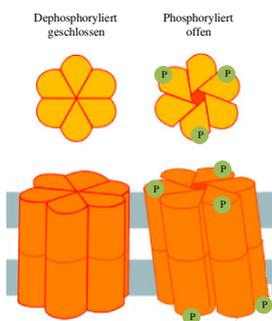
Heterozygot defiziente Mäuse für Cx43 zeigten eine ca. 50 % verringere Cx43 Expression.<sup>131</sup> Sie entwickelten fast keine spontanen Arrhythmien, jedoch zeigten sie Kammerflimmern nach akuter Ischämie.<sup>132</sup>

Boulaksil et al. untersuchten 350 Patienten im Endstadium von HF und verglichen diese mit Gesunden. Dabei stellten sie eine Zunahme der interstitiellen Fibrose fest,

jedoch unterschieden sie sich nicht in der Menge des exprimierten Cx43. Der Vergleich von HF Patienten mit VT zeigte eine signifikant veränderte Verteilung des Cx43 im Gegensatz zu den HF Patienten ohne VT und den Gesunden. Diese Daten konnten in einem Mausmodell mit TAC bestätigt werden.<sup>133</sup>

Einige Studien assoziierten die verringerte Expression mit einer verzögerten Aktivierung der Kardiomyozyten und reduzierter CV.<sup>134, 135</sup> Widersprüchlich zu diesen Erkenntnissen standen Publikationen, die erst ab einer 95 %ig verringerten Expression des Cx43 einen Effekt auf die CV und Induktion von Arrhythmien im Mausherz feststellen konnten.<sup>136, 137</sup>

Obwohl die Studiendaten insgesamt nicht eindeutig sind, weist doch die Mehrheit auf eine entscheidende Rolle der Regulation von Funktion und Lokalisation der *gap junctions* über Phosphorylierungsvorgänge hin.<sup>118,138-140</sup> Die hohe Anzahl an Phosphorylierungsstellen (Speziesabhängig: Maus 24, Mensch 19) gibt dabei die Möglichkeit einer komplexen Regulation durch Signaltransduktionswege. Beschrieben sind verschiedene Kinasen wie z. B. Proteinkinasen A, C und G, Protein-Tyrosin-Kinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, Glykogensynthasekinasen (GSK3 $\beta$ ), aber auch Proteinphosphatasen.<sup>141, 142</sup>



**Abbildung 35: Phosphorylierung der Connexine und Einfluss auf den Öffnungsstatus, adaptiert<sup>143</sup>**  
 Im phosphorylierten Status der Connexine bildet ein geöffneter Tunnel eine interzelluläre Verbindung zum Austausch chemischer und elektrischer Signale. Durch Stressstimuli wie z.B. Ischämie kommt es durch Dephosphorylierung zu Konfigurationsveränderungen, die zum Verschluss des Tunnels führen.

Zum Verständnis der Arrhythmogenese entwickelten Wiener et al. das Modell der kardialen Wellenlänge als Produkt aus CV und ERP.<sup>72</sup> Eine langsame CV und eine

kurze ERP gelten dabei als bestimmende Faktoren für die Arrhythmogenese.<sup>6</sup> Anders ausgedrückt erhöht die daraus resultierende, niedrige Wellenlänge das Risiko zum Auftreten von Reentryarrhythmien.<sup>118</sup>

Aufgrund der Daten dieser Arbeit können wir von einer erhöhten Leitungsgeschwindigkeit und erhöhter Refraktärzeit in Kardiomyozyten mit verstärkter Produktion CYP2J2 abhängiger EETs ausgehen. Laut Wiener et al. folgt darauf eine Verlängerung der Wellenlänge und somit ein verringertes Risiko für Reentry-Arrhythmien durch EETs. Dieser Zusammenhang wird erstmals in dieser Arbeit beschrieben.

### **6.1.6 CYP2J2 abhängige EETs agierten über die Öffnung des mitochondrialen $K_{ATP}$ -Kanals**

Zur weiteren Klärung des bereits diskutierten, komplexen Wirkmechanismus des antiarrhythmischen Effekts der EETs untersuchten wir die Rolle einer Aktivierung mitochondrialer  $K_{ATP}$ -Kanäle im hypertrophen Herzen nach TAC. Grundlage dafür legte eine Arbeit von Seubert et al.<sup>87</sup> In dieser führte eine erhöhte EET Generation zu einer verbesserten kontraktilen Funktion des Herzens nach Ischämie, sogenanntes *postischemic recovery*. Dieser protektive Effekt konnte durch einen Inhibitor mitochondrialer  $K_{ATP}$ -Kanäle aufgehoben werden. Da davon auszugehen war, dass antiarrhythmische und beschriebene kardioprotektive Effekte von EETs einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg nutzen, wurde die Rolle einer Öffnung des mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanals mittels Diazoxid auf eine Reduktion ventrikulärer Arrhythmien im isoliert perfundierten Herz nach Langendorff untersucht. Überraschenderweise konnte die hohe Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien in den TAC WT Tieren durch die Öffnung des mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanals verhindert werden (Abbildung 25). Dies wies auf eine entscheidende Rolle des Kanals bei der Vermittlung des antiarrhythmischen EET Effekts hin und unterstützte die Hypothese eines gemeinsamen Signalweges mit der EET vermittelten Kardioprotektion bei Ischämie/Reperfusion. Interessanterweise konnte in einer ganz aktuell veröffentlichten Studie an Astrozyten gezeigt werden, dass eine Öffnung des mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanals zu einer verbesserten Zell-Zell-Kommunikation via Cx43 *gap junctions* führt.<sup>144</sup> Somit ergibt sich die Hypothese, dass mitochondriale  $K_{ATP}$ -Kanäle das Bindeglied im Signalweg für die in dieser Arbeit gezeigten, EET vermittelten Verbesserung des *gap junction* Remodelling darstellen.

## **6.2 Einfluss kardialer CYP2J2 Überexpression auf die chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Iso**

### **6.2.1 CYP2J2 Überexpression hatte nur einen geringen Einfluss auf die Iso induzierte kardiale Hypertrophie und Funktion**

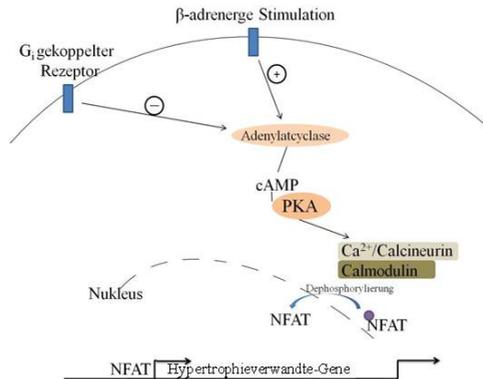
Zur Induktion kardialer Hypertrophie stellt das Modell der chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation eine etablierte Methode dar. Der signifikant erhöhte Hypertrophieindex (HW/TL; Abbildung 26 A) nach zweiwöchiger Infusion von Iso durch osmotische Minipumpen entsprach publizierten Arbeiten.<sup>136,137</sup> Somit war die Funktion der chronisch  $\beta$ -adrenerg induzierten Hypertrophie in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Gestützt wird diese Aussage von dem signifikanten Anstieg der HR (Abbildung 26 B) durch den positiv chronotropen Effekt des Isos in WT und CYP2J2 Tieren. Für die erhöhte HR der Kontrollgruppen nach zwei Wochen wird die Benutzung unterschiedlicher Wärmetische und Narkosegeräte am Tag 1 und Tag 14 ursächlich sein. Aufgrund der räumlichen Trennung von Sicherheitsbereichen war die Benutzung des gleichen Equipments nicht möglich.

Die positiv chrono-, dromo- und inotrope Wirkung von Iso wird durch eine Aktivierung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren am Herzen vermittelt. Über  $\beta_1$ -Rezeptoren wird die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase 2 aktiviert, was einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Folge hat und die erhöhte Kontraktionskraft erklärt.<sup>145</sup> Diese Tatsache war für die fast gleichbleibende EF der WT und CYP2J2 Tiere nach chronischer Iso Infusion im Vergleich zu den Kontrolltieren in dieser Arbeit ursächlich (Abbildung 27). Die durch Hypertrophie und elektrisches sowie strukturelles Remodelling gesenkte kardiale Funktion wurde durch den Katecholamin induzierten Anstieg der Kontraktilität ausgeglichen. Daher war ein Vergleich der kardialen Funktion mit den Kontrolltieren nicht möglich. Hierzu wäre eine Akutgabe von Iso in den Kontrollgruppen zum Zeitpunkt der Untersuchung nötig gewesen. Dennoch wurde eine erhöhte EF durch CYP2J2 Überexpression nach der chronischen Stimulation durch Iso signifikant. Dies deutet auf einen protektiven Effekt der kardialen Überexpression des CYP2J2s auf die kardiale Funktion nach zweiwöchiger chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation hin.

Aus Erkenntnissen der TAC Studie war eine weitere, differenzierte Untersuchung des strukturellen und elektrischen Remodellings sinnvoll.

### 6.2.2 Iso induziertes strukturelles Remodelling war durch CYP2J2 gemindert

Wichtigste Bestandteile der EZM bilden Kollagen 1 und 3 sowie Fibronectin, welche in kardialer Hypertrophie vermehrt exprimiert sind. Sie wurden daher auch in der vorliegenden Studie auf deren Genexpression hin untersucht. Durch Aktivierung des  $\beta$ -Adrenorezeptors erfolgt die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Calmodulin-Signalweges mit Aktivierung der Adenylatcyclase und PKA, das in Dephosphorylierung und Translokation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) resultiert (Abbildung 36).



**Abbildung 36:  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Calmodulin-Signalweg**

Durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation und Aktivierung der Adenylatcyclase steigt intrazelluläres cAMP, wodurch auch PKA aktiviert wird. Durch den Zusammenbau des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Calmodulin Komplexes wird NFAT dephosphoryliert und transloziert in den Nucleus. Als Transkriptionsfaktor führt er zur Expressierung hypertrophieassoziiierter Gene.

Dies führt zur vermehrten Expression verschiedener, hypertrophieassoziiierter Gene, zu denen auch profibrotische gehören. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen darin überein. Nach zweiwöchiger Infusion von Iso war die Genexpression von Kollagen 1 und 3 sowie Fibronectin im atrialen Gewebe ca. dreifach erhöht. Der profibrotische Effekt des Isos wurde durch die Überexpression des CYP2J2 signifikant vermindert (Abbildung 33 A-C). Zur Untersuchung der Fibrose auf Proteinebene wurden histologische Präparate mit Sirius Rot Färbung angefertigt und ausgewertet (Abbildung 34). Wie erwartet, wurde ein Anstieg interstitieller Fibrose nach Iso verzeichnet. Dieser war aber bei den CYP2J2 Tieren wesentlich geringer ausgeprägt. Als ursächlich kann eine inhibitorische Wirkung auf den  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionsweg diskutiert

werden, was eine neue Erkenntnis zum EET Wirkmechanismus darstellen würde. Diese Hypothese muss in weiteren Studien überprüft werden.

Studien an Menschen und Tieren haben die Wichtigkeit atrialer Fibrose in der Entstehung von AF hervorgehoben. Atriale interstitielle Fibrose nimmt im Alter zu und wurde häufig in Biopsien von Patienten mit AF beobachtet.<sup>146, 147</sup> Spach et al. arbeiteten an theoretischen Modellen von AF, die ebenfalls der atrialen interstitiellen Fibrose als Substrat für AF eine wichtige Rolle zusprachen.<sup>148, 149</sup> Aufgrund der Unterbrechung interzellulärer Verbindung wird die inter- und intrazelluläre Erregungsleitung behindert. Zusätzlich kann es aufgrund gestörter Kapillarisation zur Unterversorgung des Myokards kommen.<sup>33, 34</sup> Weitreichend bekannt ist, dass die Quantität, aber auch die Art der Fibrose im Interstitium den Widerstand des Gewebes und damit die CV beeinflusst.<sup>118</sup> So wurde im Mausmodell atrialer Überexpression des *TGF $\beta$*  im isoliert perfundierten Herz nach Langendorff eine Verringerung der CV aufgrund erhöhter Fibrose beschrieben.<sup>150</sup>

Die Unterbrechung interzellulärer Verbindungen durch Kollagenakkumulation kann zur Änderung von uniformer zu nonuniformer Anisotropie in der atrialen Erregungsleitung führen und aufgrund verlangsamer und heterogener Leitung auch die transverse Ausbreitung des elektrischen Impulses begünstigen. Bekannt ist, dass heterogene Ausbreitung der Erregung als Substrat bei der Entstehung von Reentrytachykardien in relativ kleinen Kreisbahnen eine große Rolle spielt.<sup>148</sup> Auch im *caninen* Modell der kongestiven Herzinsuffizienz korrelierten Li et al. die atriale Fibrose mit erhöhter Leitungsheterogenität.<sup>151</sup>

Aufgrund dieses Wissens und der Erfahrungen aus der TAC Studie waren EPU von großem Interesse.

### **6.2.3 AF wurde durch Minderung des elektrischen Remodellings bei CYP2J2 Mäusen verhindert**

In der EPU konnte keine erhöhte Induzierbarkeit von ventrikulären Tachykardien unter chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation festgestellt werden. Dieses unerwartete Ergebnis war wahrscheinlich durch die nur moderat vorhandene Hypertrophie bedingt. Hingegen konnte eine deutlich erhöhte Induzierbarkeit von AF festgestellt werden, was nach

derzeitiger Studienlage erstmalig in diesem Nagermodell beobachtet wurde und zukünftig einige der bisher genutzten Großtierexperimente ersetzen könnte.

In den WT Iso infundierten Tieren konnte in durchschnittlich 48,1 % der Stimulationsprotokolle AF ausgelöst werden (Abbildung 29 A). Zudem wurde auch die Länge der auftretenden Arrhythmien gegenüber den Kontrolltieren gesteigert. In 75 % der WT Iso infundierten Tiere konnten anhaltende Episoden länger als 30 s beobachtet werden. Die restlichen 25 % zeigten Episoden zwischen 0,35 und 30 s. Die kardiale Überexpression des CYP2J2 wirkte protektiv auf die Induktion von AF nach Iso. So lag der durchschnittliche Anteil von induziertem AF bei 16,7 % der Protokolle nach zweiwöchiger Infusion von Iso. Dies war gegenüber den WT Iso Tieren signifikant erniedrigt. Auch bei Betrachtung der Arrhythmie-länge der Tiere war ein protektiver Effekt des CYPs auffällig. Nur 25 % der Tiere zeigten Episoden atrialer Tachyarrhythmien länger als 30 s (Abbildung 29 B).

In der Literatur finden sich viele Hinweise für eine spezifische Rolle von  $\beta$ -adrenerger Stimulation auf die Entstehung von AF. So hat das autonome Nervensystem, genauer die adrenerge/cholinerge Balance, einen profunden Einfluss auf die Entstehung von AF. Überwiegen der Aktivität des adrenergen Systems,<sup>67</sup> aber auch die des cholinergen Systems sind mit einem erhöhten Auftreten von AF assoziiert.<sup>68</sup>

In Studien zur Herzratenvariabilität wurde in Patienten mit AF ein erhöhtes Level von adrenerger, relativ zur cholinergen Aktivität beschrieben.<sup>67</sup> Infusion von Iso induzierte bei 5 % der Patienten ohne Vorgeschichte einer atrialen Herzrhythmusstörung AF und in 84 % der Patienten mit bekanntem paroxysmalen Auftreten von AF.<sup>152</sup> Diese Erkenntnisse unterstützten die Aussage von Gould et al.<sup>153</sup>, die eine erhöhte atriale adrenerge Innervation mit chronischem AF in Patienten postulierten.

In der Pathophysiologie von Katecholamin induziertem AF spielen eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und charakteristische Membranpotential-Oszillationen, sogenannte Afterdepolarisationen, eine wichtige Rolle. Sie führen infolge des erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms zu gesteigerter Automatizität und Arrhythmie-eigung.<sup>154</sup> Aufgrund dieses bekannten Einflusses finden  $\beta$ -Adrenorezeptor-Blocker wie Atenolol zur Therapie des AF Anwendung.

Indirekte Informationen zur Aktivität von Ionenkanälen gab die AERP, das minimale Zeitintervall, das für eine erneute Erregung der atrialen Kardiomyozyten notwendig ist.

In der vorliegenden Arbeit wiesen Tiere mit der höchsten Induktion von AF eine signifikant verkürzte AERP von 12,5 ms auf (Abbildung 31). Durch die kardiale Überexpression des CYP2J2 konnte dieser Effekt signifikant abgeschwächt werden. So betrug die AERP bei diesen Tieren nach Infusion von Iso 18 ms. Somit bestätigte sich hier ein verlängernder Effekt auf die Refraktärzeit durch CYP2J2 Überexpression, wie auch schon durch die VERP im TAC Modell auf ventrikulärer Ebene dargestellt.

Unerwartet war hingegen die verringerte AERP Zeit der CYP Sham operierten Tiere aus dem Modell der chronischen Druckbelastung (Abbildung 23). Sie waren unter basalen Bedingungen im Gegensatz zu den WT Tieren um 5,6 ms erniedrigt. Jedoch wiesen diese Tiere kein AF auf, was durch stabile interzelluläre Verbindungen der *gap junctions* und nicht vermehrter Fibrose zu erklären war. Alleine die Verringerung von AERP führte also nicht zur AF Induktion.

Von AF-Patienten und auch aus anderen, etablierten experimentellen AF Modellen ist bekannt, dass es typischerweise zu einer Reduktion der atrialen Refraktärzeit kommt.<sup>155, 156</sup> Insofern stellt unser Mausmodell ein pathophysiologisch relevantes Modell für AF beim Menschen dar.

Der absolut refraktäre Kardiomyozyt stellt im gesunden Patienten die gerichtete, elektrische Ausbreitung sicher. Bei extrem kurzer AERP trifft der Reiz auf bereits wieder erregbares Gewebe, wodurch sich ein selbstunterhaltender Kreislauf ergibt. Die in der Literatur beschriebenen Effekte von Iso auf die ERP sind oft widersprüchlich. So beschrieben Shimizu et al.<sup>157</sup> eine Erhöhung der CV und nur eine geringe Änderung der ERP bei Patienten nach einer Infusion von Iso. In Hunden wurde kein Einfluss von Iso auf die ERP<sup>158</sup> und in Kaninchen sogar eine Erhöhung der ERP beschrieben.<sup>159</sup> In diesen tierexperimentellen Arbeiten wurden jedoch, anders als in der vorliegenden Arbeit, entweder die akute Infusion von Iso untersucht, wobei das nach chronischer Infusion eingesetzte Remodelling außer Acht gelassen wurde, oder lediglich isolierte Kardiomyozyten und nicht das ganze Organ *in vivo* untersucht. Des Weiteren existieren eine Vielzahl von Studien am Menschen, die den Effekt von Iso an isolierten atrialen Kardiomyozyten untersuchen und kontrovers diskutieren.<sup>160-162</sup> Das verwendete Material stammte jedoch ausschließlich von erkrankten Patienten, weil eine Biopsie Gesunder ethisch nicht vertretbar ist. Eine gesicherte Aussage des Iso Effektes ist aus

den beschriebenen Arbeiten aufgrund der vielfältigen Pathogenese von AF nicht zu treffen.

Bei Taqmananalysen verschiedener  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Kanälen und entsprechenden Unter-einheiten konnten keine Unterschiede in der Expression verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Somit ist von einer posttranslationalen Regulation der Ionenkanäle als Ursache der Unterschiede in den Refraktärzeiten auszugehen. Mögliche Einflüsse von EETs wurden bereits in 5.1.4 diskutiert. Auch hier sind genaue Messungen von AP Dauer und Stärke von Ionenströmen zur weiteren Charakterisierung des antiarrhythmischen EET Effekts notwendig.

#### **6.2.4 CYP2J2 Überexpression verhinderte Iso induzierte Cx40 Degradation**

Aufgrund der bereits vorhandenen Ergebnisse einer Regulation der *gap junction* Expression durch CYP2J2 im TAC Modell wurde auch diese im Atrium in der Immun-histochemie analysiert. An Cx40 Ko Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass Cx40 das für die geregelte Impulsausbreitung bestimmende Protein im Atrium ist. Zudem waren die Tiere anfällig für atriale Tachyarrhythmien.<sup>103-106</sup>

In der vorliegenden Studie war auffällig, dass die verminderte Expression von Cx40 in den WT Tieren nach Iso mit einer hohen Induktion von AF in der EPU einherging. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass CYP2J2 Überexpression die Iso induzierte Degradation von Cx40 stark abschwächt (Abbildung 32) und damit wahrscheinlich zur verminderten AF Induktion der CYP2J2 Tiere beiträgt.

Ergebnisse aus AF Modellen an Großtieren unterstützen die Beobachtung. So zeigten Ziegen mit schneller chronischer Stimulation des Ventrikels über mehrere Wochen eine Cx43- und Cx40-Delokalisation und -Degradation.<sup>163</sup> Anhaltende Episoden von AF korrelierten dabei mit einem verminderten Cx40 Signal in der Immunhistochemie. Trotz reduzierter Cx40 Proteinexpression in Großtier AF Modellen war der mRNA-Level für Cx40 nicht verändert.<sup>163-165</sup> Diese Beobachtung wurde in Taqmananalysen der vorliegenden Arbeit ebenfalls gemacht (Daten nicht gezeigt). Die unveränderte mRNA Genexpression des Cx40 weist auf die überwiegende Bedeutung posttranslationaler Regulation bei diesem Mechanismus hin.

Auch im Menschen konnten Genmutationen oder –polymorphismen und daraus resultierende, veränderte Expressionsmuster des Cx40 im Atrium in Studien mit familiärer Häufung von AF als erhöhtes Risiko ebenfalls bestätigt werden.<sup>60-62</sup>

Aus Erkenntnissen vieler Studien ist von einer verminderten CV durch geringere Cx Expression auszugehen.<sup>166</sup> Dies führt in Kombination mit arrhythmogenen elektrophysiologischen Substraten wie reduzierter AERP,<sup>63-66</sup> nicht einheitlichen Refraktärzeiten<sup>167</sup> sowie abnormaler Impulsweiterleitung<sup>168, 169</sup> zur Initiierung und Perpetuierung von AF und könnte als mögliches Erklärungsmodell zur Pathophysiologie von AF in der vorliegenden Arbeit dienen.

Gesamt betrachtend ist nicht von einer selektiven Wirkung der EETs auf Atrium oder Ventrikel auszugehen. Die Analogien des antiarrhythmischen Effekts zur Protektion bei Ischämie/Reperfusion durch EETs weisen eher auf die Aktivierung eines allgemeinen *prosurvival* Signaltransduktionsweges von Kardiomyozyten der Atrien und Ventrikel hin.

### 6.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde das antiarrhythmische Potential CYP2J2 abhängiger EETs in zwei Modellen kardialer Hypertrophie untersucht. Zur Imitierung humaner pathologischer kardialer Hypertrophie wurde diese in männlichen Mäusen durch TAC und durch chronische Infusion von Iso induziert.

Das TAC-Modell wies im Gegensatz zum Modell der chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation eine ausgeprägte Hypertrophie mit Entwicklung einer hochgradigen HF und hohe Mortalität auf. In beiden Hypertrophie-Modellen war kein relevanter Effekt auf Hypertrophie und nur eine leichte Verbesserung der HF durch CYP2J2 Überexpression zu verzeichnen. Ungeachtet dessen führte die CYP2J2 Überexpression zu einer signifikanten Reduktion in der Mortalität im TAC Modell, was nur durch die reduzierte Neigung zu ventrikulären Arrhythmien in den CYP2J2 Tieren erklärbar war. Dieser antiarrhythmische Effekt wurde durch eine reduzierte Induzierbarkeit von AF im Modell der chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation bestätigt.

Übereinstimmend weisen die Studien in beiden Modellen auf eine entscheidende Bedeutung einer Verlängerung der Refraktärzeit und Verhinderung von *gap junction* Remodelling als Mechanismen des antiarrhythmischen Effekts von EETs hin.

Zusammen mit den EKG Parametern beweist diese Studie eine signifikante Reduktion des elektrischen Remodellings durch EETs. Eine Reduktion des strukturellen Remodellings mit verminderter Fibrosierung konnte nur im Modell der chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation bewiesen werden. Dies kann auf eine spezifische Interaktion von EETs mit dem  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionsweg hinweisen.

Der genaue molekulare Mechanismus der antiarrhythmischen Wirkung von EETs ist noch unbekannt. Diese Arbeit zeigt, dass Modulation von elektrischen Membraneigenschaften und Erhalt physiologischer Zellkopplung über *gap junctions* wichtige Elemente dieses Mechanismus sein könnten. In Analogie zu den protektiven Eigenschaften von EETs bei Ischämie/Reperfusion war anzunehmen, dass ein weiteres Element des Signalweges mitochondriale  $K_{ATP}$ -Kanäle beinhaltet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kurzzeitinfusion des mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanal Öffners Diazoxid die antiarrhythmische Wirkung von EETs in den hypertrophierten TAC Herzen nachahmt.

Weitere, folgende Arbeiten sollen Aufschluss über die genaue Interaktion der EETs mit Ionenkanälen geben. Welche Ionenkanäle sind beteiligt? Hemmen die EETs direkt Ionenkanäle oder agieren sie über Signaltransduktionswege? Ist es möglich die Effekte der EETs durch Analoga zu imitieren und ggf. zu optimieren?

Entscheidende Bedeutung kommt auch der Identifizierung des EET Rezeptors zu.

Diese Arbeit wird in einer anstehenden Firmenausgründung wichtige Grundlagen zur Entwicklung neuer EET ähnlicher Medikamente zur Behandlung und Prävention von AF liefern.

## 6.4 Limitation der Arbeit

Für diese Arbeit wurden männliche C57BL/6N Mäuse mit einer kardialen Überexpression des CYP2J2 und entsprechende WT Tiere verwendet. Trotz Inzucht und standardisierter Haltung wiesen die Tiere erwartungsgemäß individuelle Unterschiede in Behandlung und Intervention auf, was sich als Standardabweichung und Beeinflussung der statistischen *Power* widerspiegelt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nur einen indirekten Schluss auf die Modulation von Ionenkanälen durch EETs zu. Zur genauen Analyse sind Experimente durch die 1976 entwickelte *Patch-Clamp*-Technik notwendig. In dieser ist es möglich, nach

Isolation von einzelnen Zellen, in unserem Falle Kardiomyozyten, kleinste Ströme definierter Kanäle zu messen.<sup>170</sup>

Dies wird auch bei der Identifizierung des wirksamen Metaboliten helfen. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht zwischen regio- und stereoisomeren Unterschieden der EETs differenziert, sondern deren gemeinsame Wirkung betrachtet.

Des Weiteren kann mit den Ergebnissen nur der Effekt einer CYP2J2 Überexpression sicher diskutiert werden. Ob über die bekannte vermehrte EET Generation noch weitere EET unabhängige Mechanismen zu den Ergebnissen beitrugen, kann nicht ausgeschlossen werden. Deshalb soll zum endgültigen Beweis, dass tatsächlich die gebildeten EETs die antiarrhythmische Wirkung ausübten, ein weiterer Versuch am isoliert perfundierten Herz nach Langendorff durchgeführt werden. Hier soll der protektive Effekt des CYP2J2 in einer TAC induzierten Hypertrophie durch Infusion von 14,15-EEZE, einem selektiven EET-Antagonisten, aufgehoben werden.<sup>171</sup>

Das exakte Verständnis der EETs auf die Wirkung entsprechender Signaltransduktionswege bzw. eventueller Rezeptoren wird in Zellkulturexperimenten weiter untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

### Antiarrhythmische Wirkung einer transgenen Überexpression des humanen CYP2J2 in Mausmodellen der Herzhypertrophie

Bastian Spallek

**Hintergrund:** Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden bis heute die Haupttodesursache westlicher Industrienationen. Kardiales Remodelling, das strukturelle und elektrische Veränderungen beinhaltet, spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung kardialer Hypertrophie und prädisponiert für Arrhythmien und den plötzlichen Herztod.

Cytochrom P 450 Enzyme (CYP) tragen durch Katalyse der Epoxidation oder Hydroxylierung von Arachidonsäure (AA) zur Eikosanoid-Biosynthese bei. Enzyme der CYP2C/2J Subfamilie fungieren als AA-Epoxygenasen und generieren Isozym spezifische regio- und stereoisomere Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Sie sind potente Modulatoren physiologischer Funktionen und könnten über bekannte Regulation von Ionenkanälen antiarrhythmische Effekte ausüben.

**Zielstellung:** Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer erhöhten EET-Biosynthese durch kardiomyozytenspezifische Überexpression des CYP2J2 auf strukturelles sowie elektrisches Remodelling und den Einfluss auf Arrhythmien in zwei Mausmodellen kardialer Hypertrophie zu untersuchen.

Zur Induktion kardialer Hypertrophie wurde die transversale Aortenkonstriktion (TAC) als Modell der chronischen Druckbelastung und im zweiten Ansatz die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol (Iso) angewandt.

**Ergebnisse:** CYP2J2 Überexpression führte zur signifikanten Steigerung der Überlebensrate während achtwöchiger TAC, was jedoch nicht durch einen relevanten Effekt auf Hypertrophie und Herzinsuffizienz erklärbar war. Allerdings konnte eine signifikante Reduktion der Induktion ventrikulärer Tachykardien in der elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) der CYP2J2 Mäuse (0/16) gegenüber den Wildtypen (WT) (7/15) beobachtet werden. Der wahrscheinlich für die Verbesserung der Mortalität ursächliche antiarrhythmische Effekt von EETs konnte erstmals beschrieben werden.

CYP2J2 Überexpression führte darüber hinaus zu einer erhöhten ventrikulären effektiven Refraktärphase, basal und insbesondere nach TAC. Die QRS-Verbreiterung der WT Tiere nach TAC wurde durch CYP2J2 Überexpression reduziert. Darüber hinaus verhinderte die CYP2J2 Überexpression eine TAC induzierte Cx43 Dislokalisierung. Zusammen wiesen die Ergebnisse auf Reduktion des elektrischen Remodellings als zugrundeliegenden Mechanismus der EET Wirkung im TAC Modell hin.

Auch im zweiten Protokoll der chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation war kein relevanter Effekt auf die Hypertrophieentwicklung in den CYP2J2 Tieren zu verzeichnen. Im Gegensatz zum TAC Modell reduzierte CYP2J2 die Fibroseentwicklung, was auf eine spezifische Interaktion der EETs mit dem  $\beta$ -adrenergen Signalweg hindeutete. Ventrikuläre Arrhythmien waren in diesem Modell nicht signifikant erhöht induzierbar. Allerdings war es möglich, AF in WT Tieren zu induzieren (13/27), was durch CYP2J2 verbessert wurde (4/24).

Die chronische Iso Infusion induzierte eine Verkürzung der atrialen effektiven Refraktärphase sowie QRS- und QTc-Verkürzung in WT Tieren. Dies wurde durch CYP2J2 Überexpression verhindert. Verlust von Cx40 *gap junction* Proteinen durch Iso wurde durch CYP2J2 verringert. Somit konnte auch in diesem Modell ein hauptsächlichlicher Einfluss auf das elektrische Remodelling festgestellt werden.

**Schlussfolgerung:** Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass erhöhte EET Biosynthese in CYP2J2 Mäusen eine Steigerung der Überlebensrate und einen starken antiarrhythmischen Effekt in zwei Modellen maladaptiver kardialer Hypertrophie ausübt. Unsere Daten weisen auf eine regulierende Rolle der EETs hauptsächlich auf das elektrische Remodelling, durch Einfluss auf Ionenkanäle und *gap junction* Integrität als zugrundeliegenden Mechanismus hin.

Darüber hinaus konnte ein innovatives, leicht reproduzierbares Vorhofflimmermodell in der Maus etabliert werden, das neben der Identifizierung eines putativen EET Rezeptors und seiner nachgeschalteten Targets bei der Entwicklung einer neuen Klasse von kardioprotektiven und antiarrhythmischen Medikamente helfen wird.

## 8 Summary

### Antiarrhythmic effects of transgenic overexpression of the human CYP2J2 in mouse models of cardiac hypertrophy

Bastian Spallek

**Background:** Cardiovascular diseases remain the leading cause of death in western industrial nations. Cardiac remodelling, involving structural and electrical changes, plays a pivotal role in the development of cardiac hypertrophy and predispose to arrhythmias and sudden cardiac death.

CYP450 enzymes (CYP) contribute to eicosanoid-biosynthesis by catalyzing the epoxidation or hydroxylation of arachidonic acid (AA). CYP2C/2J subfamily members function as AA-epoxygenases. They generate isozyme specific sets of regio- and stereoisomeric epoxyeicosatrienoic acids (EETs) thereby acting as potent modulators of physiological functions. Possible anti-arrhythmic effects could be envisioned by the usage of known regulations of ion channels.

**Aims:** The aim of this study was to investigate the effect of enhanced EET biosynthesis through cardiomyocyte specific overexpression of CYP2J2 on structural as well as electrical remodelling and on the development of arrhythmias in two cardiac hypertrophy mouse models.

Cardiac hypertrophy was induced by transverse aortic constriction (TAC) as a model of chronic pressure overload. In a second approach, we used chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation by isoproterenol (Iso).

**Results:** CYP2J2 overexpression led to a significant increase of survival during eight weeks of TAC, although this could not be explained with a relevant effect on hypertrophy or heart failure. However, we could observe a significant reduction of protocols with ventricular tachycardia in electrophysiological studies (EPS) of CYP2J2 mice (0/16) in comparison to wildtype WT (7/15). We could show for the first time that the antiarrhythmic effect of EETs is most likely responsible for the improvement of the mortality.

Additionally, CYP2J2 overexpression resulted in an increase in ventricular effective refractoriness, basal and especially after TAC. The QRS-complex enlargement of WT animals after TAC could be reduced by CYP2J2 overexpression. Furthermore CYP2J2 overexpression prevented TAC induced Cx43 dislocation.

Taken together these results indicate a reduction of electrical remodelling as the underlying mechanism of EET action in the TAC model.

In the second protocol of chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation, we could not observe any relevant effect on hypertrophy development in CYP2J2 animals, either.

In contrast to the TAC model, CYP2J2 reduced the development of fibrosis indicating a specific interaction of EETs on the  $\beta$ -adrenergic signaling pathway. Ventricular arrhythmias were not significantly increased in this model. However it was possible to induce atrial fibrillation in WT animals (13/27) that was improved by CYP2J2 (4/24).

Chronic Iso-infusion induced a shortening of the atrial effective refractory period and QRS- and QTc-shortening in WT animals. Such an effect could be prevented by CYP2J2.

An Iso induced loss of Cx40 gap junction protein could be decreased by CYP2J2. Thus, this model also revealed a major influence on electrical remodeling been observed.

**Summary:** This study showed for the first time that increased EET biosynthesis in CYP2J2 mice provides pro-survival and strong anti-arrhythmic effects in two different models of maladaptive cardiac hypertrophy. Our data suggest a regulatory role of EETs mainly on electrical remodelling through ion channels and gap junction integrity as the underlying mechanisms.

Moreover, an innovative, easy reproducible AF-model in the mouse could be described. Together with the identification of the putative EET receptor and its downstream targets this may allow the development of a new class of cardioprotective and anti-arrhythmic drugs.

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Materialien für das tierexperimentelle Arbeiten.....	20
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Materialien für Genexpressionsanalysen.....	21
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Materialien für die Histologie.....	22
Tabelle 4: Zusammensetzung der Alleinfuttermittel zur Zucht und Haltung von Mäusen.....	23
Tabelle 5: Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintri- phosphat, (G) Desoxyguanosintri- phosphat, (C) Desoxycy- tosintri- phosphat, (T) Desoxythymidintri- phosphat.....	25
Tabelle 6: Übersicht über die Gruppenverteilung.....	26
Tabelle 7: Übersicht über die Gruppenverteilung.....	27
Tabelle 8: Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer.....	37
Tabelle 9: Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Angaben entsprechen einem Ansatz).....	39
Tabelle 10: Unter Verwendung des DNS Thermocycler erfolgte die reverse Transkription unter folgende Bedingungen.....	40
Tabelle 11: Verwendete Primer und Sonden in 5'-3'-Richtung. (A) Desoxyadenosintri- phosphat, (G) Desoxyguanosintri- phosphat, (C) Desoxycytosintri- phosphat, (T) Desoxythymidintri- phosphat.....	40
Tabelle 12: Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Angaben entsprechen einem Ansatz).....	43
Tabelle 13: Unter Verwendung des <i>TaqMan Fast Universal</i> PCR Mastermix für das <i>7.500 Fast</i> System wurden folgende Bedingungen zur cDNS-Amplifikation verwendet.....	43
Tabelle 14: Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe.....	44
Tabelle 15: Protokoll der absteigenden Alkoholreihe.....	44
Tabelle 16: Verwendete primäre Antikörper (AK) in der Immunhistochemie.....	46
Tabelle 17: Verwendete sekundäre Antikörper (AK) in der Immunhistochemie.....	47

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens; adaptiert <sup>44</sup> .....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Aktionspotentials A) des Sinusknotens und B) des Ventrikelmyokards; adaptiert <sup>46</sup> .....	7
Abbildung 3: Aufbau eines <i>gap junction</i> Kanals; adaptiert <sup>49</sup> .....	10
Abbildung 4: Arrhythmieentstehung und deren Forcierung durch kardialen Umbau; adaptiert <sup>73</sup> .....	14
Abbildung 5: Bioaktivierung von Arachidonsäure; adaptiert <sup>10</sup> .....	15
Abbildung 6: Epoxyeicosatriensäure Regioisomere .....	16
Abbildung 7: $\alpha$ MHC Promoter zur kardiomyozytenspezifischen Überexpression des CYP2J2 .....	24
Abbildung 8: Gelelektrophoresebild des CYP2J2 Amplifikats .....	25
Abbildung 9: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierexperiments der chronischen Druckbelastung durch TAC .....	26
Abbildung 10: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierexperiments der chronischen beta-adrenergen Stimulation durch Iso .....	27
Abbildung 11: Komponenten des Oberflächen-EKGs; adaptiert <sup>96</sup> .....	30
Abbildung 12: Katheterpositionierung im rechten Ventrikel mit entsprechender elektropysiologischer Aufzeichnung, adaptiert <sup>44</sup> .....	31
Abbildung 13: Bestimmung des Wenckebachpunktes (WBP) .....	32
Abbildung 14: Bestimmung der effektiven Refraktärzeit des Atrioventrikular-Knotens (AVNERP) .....	33
Abbildung 15: Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff .....	35
Abbildung 16: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier .....	48
Abbildung 17: Ejektionsfraktion acht Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC) .....	49
Abbildung 18: Hypertrophieindizes vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC) .....	50

Abbildung 19: Kollagen 1 und 3 mRNA Expression post transversaler Aortenkonstriktion (TAC).....	51
Abbildung 20: EKG Parameter vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC).....	52
Abbildung 21: Induktion von ventrikulären Arrhythmien.....	53
Abbildung 22: Repräsentativer <i>Trace</i> einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) vier Wochen post transversaler Aortenkonstriktion (TAC).....	55
Abbildung 23: Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC).....	56
Abbildung 24: Immunhistochemische Aufnahme der ventrikulären Connexin 43 (Cx43) Lokalisation.....	58
Abbildung 25: Auslösbarkeit von ventrikulären Arrhythmien im isoliert perfundierten Herz nach Langendorff.....	59
Abbildung 26: Effekt der chronischen Infusion von Iso auf A) Hypertrophie und B) Chronotropie.....	60
Abbildung 27: Ejektionsfraktion (EF) nach chronischer Infusion von Isoproterenol (Iso).....	61
Abbildung 28: EKG Parameter zwei Wochen nach Infusion von Isoproterenol (Iso) oder der Kontrollsubstanz NaCl.....	62
Abbildung 29: A) Induktion von Vorhofflimmern (AF) und B) Quantifizierung der Länge.....	63
Abbildung 30: Repräsentativer <i>Trace</i> einer elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) nach zwei Wochen chronischer Isoproterenol Infusion (Iso).....	65
Abbildung 31: Parameter der elektrophysiologischen Untersuchung nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol (Iso).....	66
Abbildung 32: Immunhistochemische Aufnahme der Connexin 40 (Cx40) Färbung des Atriums.....	68
Abbildung 33: Genexpression von Kollagen 1 und 3 sowie Fibronectin des Atriums.....	69
Abbildung 34: Sirius Rot Färbung atrialen Gewebes nach zweiwöchiger Infusion von Isoproterenol (Iso) bzw. Vehikel.....	70

Abbildung 35: Phosphorylierung der Connexine und Einfluss auf den Öffnungsstatus, adaptiert <sup>143</sup> .....	78
Abbildung 36: Ca <sup>2+</sup> -Calcineurin-Calmodulin-Signalweg .....	81

## 11 Literaturverzeichnis

1. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2007 update: A report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation*. 2007;115:e69-171
2. Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Patel DA, Verma A, Ventura HO. Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009;52:153-167
3. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *N Engl J Med*. 1990;322:1561-1566
4. Messerli FH, Ventura HO, Elizardi DJ, Dunn FG, Frohlich ED. Hypertension and sudden death. Increased ventricular ectopic activity in left ventricular hypertrophy. *Am J Med*. 1984;77:18-22
5. Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D. Beta1ipkc and epsilonpkc isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;51(4):479-484
6. van Rijen HV, van Veen TA, Gros D, Wilders R, de Bakker JM. Connexins and cardiac arrhythmias. *Adv Cardiol*. 2006;42:150-160
7. Fitzpatrick FA, Murphy RC. Cytochrome p-450 metabolism of arachidonic acid: Formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacol Rev*. 1988;40:229-241
8. Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. Role of cytochrome p-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res*. 1995;32:79-92
9. McGiff JC. Cytochrome p-450 metabolism of arachidonic acid. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1991;31:339-369
10. Konkel A, Schunck WH. Role of cytochrome p450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1814:210-222. Nachdruckgenehmigung liegt vor.
11. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285:1276-1279

12. Campbell WB. New role for epoxyeicosatrienoic acids as anti-inflammatory mediators. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:125-127
13. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002;82:131-185
14. Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, Liao JK. Activation of galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem.* 2001;276:15983-15989
15. Chen J, Capdevila JH, Zeldin DC, Rosenberg RL. Inhibition of cardiac l-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol Pharmacol.* 1999;55:288-295
16. Ke Q, Xiao YF, Bradbury JA, Graves JP, Degraff LM, Seubert JM, Zeldin DC. Electrophysiological properties of cardiomyocytes isolated from cyp2j2 transgenic mice. *Mol Pharmacol.* 2007;72:1063-1073
17. Xu D, Li N, He Y, Timofeyev V, Lu L, Tsai HJ, Kim IH, Tuteja D, Mateo RK, Singapuri A, Davis BB, Low R, Hammock BD, Chiamvimonvat N. Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18733-18738
18. Monti J, Fischer J, Paskas S, Heinig M, Schulz H, Gosele C, Heuser A, Fischer R, Schmidt C, Schirdevan A, Gross V, Hummel O, Maatz H, Patone G, Saar K, Vingron M, Weldon SM, Lindpaintner K, Hammock BD, Rohde K, Dietz R, Cook SA, Schunck WH, Luft FC, Hubner N. Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease. *Nat Genet.* 2008;40:529-537
19. World Health Organisation. Cardiovascular Diseases, global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *WHO 2011*; [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/index.html](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/index.html) (January 25, 2012)
20. World Health Organisation. Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, german version, Version 2011. *WHO*; <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2011/index.htm> (June 20, 2012)
21. Qiu H, Li N, Liu JY, Harris TR, Hammock BD, Chiamvimonvat N. Soluble epoxide hydrolase inhibitors and heart failure. *Cardiovasc Ther.* 2010 [Epub ahead of print; DOI No.: 10.1111/j.1755-5922.2010.00150.x]
22. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79

23. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: Recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med.* 1979;300:57-62
24. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: A corollary to infarct expansion. *Circulation.* 1986;74:693-702
25. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-2018
26. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, Ward DM, Lang RM, McGaughey D, Karp RB. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation.* 1992;86:1099-1107
27. Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc.* 1981;40:2037-2041
28. Abrahams C, Janicki JS, Weber KT. Myocardial hypertrophy in macaca fascicularis. Structural remodeling of the collagen matrix. *Lab Invest.* 1987;56:676-683
29. S. Ayad, R.P. Boot-Hanford, M.J. Humphries, K.E. Kadler, C.A. Shuttleworth: The Extracellular Matrix (Facts Book). Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers), Printed in Great Britain, S. 3 ff (1998); ISBN 0-12-068911-1.
30. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, Spinale FG. Et-1 in the myocardial interstitium: Relation to myocyte ece activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H2050-2056
31. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:279-292
32. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79:215-262
33. Baker AJ, Redfern CH, Harwood MD, Simpson PC, Conklin BR. Abnormal contraction caused by expression of g(i)-coupled receptor in transgenic model of dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1653-1659
34. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J. Myocarditis induced by targeted expression of the mcp-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol.* 1998;152:101-111

35. Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 2008;102:185-192
36. Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278:13008-13015
37. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of tgf-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:L68-76
38. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, Gauldie J. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:770-778
39. Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, Kolb M. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" balb/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:510-516
40. Shi-wen X, Stanton LA, Kennedy L, Pala D, Chen Y, Howat SL, Renzoni EA, Carter DE, Bou-Gharios G, Stratton RJ, Pearson JD, Beier F, Lyons KM, Black CM, Abraham DJ, Leask A. Ccn2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 2006;281:10715-10726
41. Engelhardt, W.v.; Breves G.; H.J.; Physiologie der Haustiere. Berlin 2000. Enke Verlag, 1. Auflage: 143-150; ISBN 3-7773-1429-3
42. Schmidt RF, Lang, F., Thews, G. Physiologie des Menschen mit Patophysiologie. Springer Verlag; 2004, 29.Auflage: 517-569; ISBN 3540218823
43. Boyett MR. 'And the beat goes on.' The cardiac conduction system: The wiring system of the heart. *Exp Physiol.* 2009;94:1035-1049
44. Patrick J. Lynch, C. Carl Jaffe. Heart; Conduction system. *Wikipedia* 2007 : [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Reizleitungssystem\\_1.png](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Reizleitungssystem_1.png) (June 14, 2012) Urheber: J. Heuser Genehmigung zur Weiternutzung: Creative Commons Attribution 2.5 License 2007. Nachdruckgenehmigung liegt vor.
45. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagel S. Lehrbuch der Physiologie. Thieme Verlag; 2005, 6. Auflage: 133-172; ISBN 3137960045
46. Nissen B. Pre-Professional in health care. *sharinginhealth.ca.* 2009 [http://www.Sharinginhealth.ca/biology/heart\\_rate.html](http://www.Sharinginhealth.ca/biology/heart_rate.html) (June 15, 2012), Nachdruckgenehmigung liegt vor.

47. Welsch U, Sobotta J. Lehrbuch der Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. München: Urban & Fischer Verlag; 2006, 2. Auflage: 231-233; ISBN 978-3-437-44430-20
48. Böck P, Budras K-D, Maierl J, Reese S, Liebich, H.-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. München: Schattauer; 2004, 4. Auflage: 109-110; ISBN 3-7945-2311-3
49. Duffy HS, Fort AG, Spray DC. Cardiac connexins: Genes to nexus. *Adv Cardiol.* 2006;42:1-17. Nachdruckgenehmigung liegt vor.
50. Gutstein DE, Liu FY, Meyers MB, Choo A, Fishman GI. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J Cell Sci.* 2003;116:875-885
51. Kreuzberg MM, Willecke K, Bukauskas FF. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: Connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:266-272
52. Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res.* 2005;96:1169-1177
53. Trappe H-J; Schuster H-P. EKG-Kurs für Isabel. Stuttgart 2005: Thieme Verlag, 4. Auflage: 26-121. ISBN 3131272848
54. Katz L.N.; Silbser E.N. Heart disease. USA 1987: Macmillian Verlag, 2. Auflage. ISBN 0024104604
55. Tilley L.P.; Augustin-Voss H.; Bob M.; Trautvetter E. EKG bei Hund und Katze. Schlütersche Verlag, 2.Auflage 2000. ISBN 3877065228
56. Chen G, Dong JZ, Liu XP, Zhang XY, Long de Y, Sang CH, Ning M, Tang RB, Jiang CX, Ma CS. Sinus node injury as a result of superior vena cava isolation during catheter ablation for atrial fibrillation and atrial flutter. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011;34:163-170
57. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S. Acc/aha/esc 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines and the european society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation). *Eur Heart J.* 2006;27:1979-2030
58. Murphy NF, Simpson CR, Jhund PS, Stewart S, Kirkpatrick M, Chalmers J, MacIntyre K, McMurray JJ. A national survey of the prevalence, incidence, primary care burden and treatment of atrial fibrillation in scotland. *Heart.* 2007;93:606-612

59. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: The framingham heart study. *Circulation*. 2004;110:1042-1046
60. Yang YQ, Zhang XL, Wang XH, Tan HW, Shi HF, Jiang WF, Fang WY, Liu X. Connexin40 nonsense mutation in familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med*. 2010;26:605-610
61. Yang YQ, Liu X, Zhang XL, Wang XH, Tan HW, Shi HF, Jiang WF, Fang WY. Novel connexin40 missense mutations in patients with familial atrial fibrillation. *Europace*. 2010;12:1421-1427
62. Wirka RC, Gore S, Van Wagoner DR, Arking DE, Lubitz SA, Lunetta KL, Benjamin EJ, Alonso A, Ellinor PT, Barnard J, Chung MK, Smith JD. A common connexin-40 gene promoter variant affects connexin-40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:87-93
63. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation*. 1995;91:1588-1595
64. Fareh S, Villemaire C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation*. 1998;98:2202-2209
65. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92:1954-1968
66. Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation*. 1996;94:2953-2960
67. Dimmer C, Tavernier R, Gjorgov N, Van Nooten G, Clement DL, Jordaens L. Variations of autonomic tone preceding onset of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol*. 1998;82:22-25
68. Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2002;105:2753-2759
69. Fogoros RN. Evidence-based medicine and the implantable defibrillator. *Curr Cardiol Rep*. 1999;1:135-141
70. Coumel P. The management of clinical arrhythmias. An overview on invasive versus non-invasive electrophysiology. *Eur Heart J*. 1987;8:92-99

71. Wagner MB, Gibb WJ, Lesh MD. A model study of propagation of early afterdepolarizations. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995;42:991-998
72. Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1946;16:205-265
73. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;1:62-73. Nachdruckgenehmigung liegt vor.
74. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest.* 2001;107:1339-1345
75. Hall WL. Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. *Nutr Res Rev.* 2009;22:18-38
76. Sacks FM, Campos H. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: Time to widen our view of the mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:398-400
77. Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C996-1012
78. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (eets): Metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res.* 2004;43:55-90
79. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78:415-423
80. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome p450 2c is an edhf synthase in coronary arteries. *Nature.* 1999;401:493-497
81. Chen J, Chen JK, Falck JR, Guthi JS, Anjaiah S, Capdevila JH, Harris RC. Mitogenic activity and signaling mechanism of 2-(14,15-epoxyeicosatrienyl)glycerol, a novel cytochrome p450 arachidonate metabolite. *Mol Cell Biol.* 2007;27:3023-3034
82. Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, Falck JR, Fleming I, Busse R. Cytochrome p450 epoxygenases 2c8 and 2c9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *J Cell Sci.* 2005;118:5489-5498
83. Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, Pohl U. Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:595-600

84. Lee HC, Lu T, Weintraub NL, VanRollins M, Spector AA, Shibata EF. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1999;519 Pt 1:153-168
85. Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, Spector AA, Lee HC. Activation of atp-sensitive k(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol.* 2001;537:811-827
86. Lu T, Hong MP, Lee HC. Molecular determinants of cardiac k(atp) channel activation by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem.* 2005;280:19097-19104
87. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, Gooch R, Foley J, Newman J, Mao L, Rockman HA, Hammock BD, Murphy E, Zeldin DC. Enhanced posts ischemic functional recovery in cyp2j2 transgenic hearts involves mitochondrial atp-sensitive k+ channels and p42/p44 mapk pathway. *Circ Res.* 2004;95:506-514
88. Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Borgel J, Mugge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC, Liao JK. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome p450 epoxygenase cyp2j2. *Circulation.* 2004;110:2132-2136
89. Zhang Y, El-Sikhry H, Chaudhary KR, Batchu SN, Shayeganpour A, Jukar TO, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Myers P, Rouse DC, Foley J, Nyska A, Zeldin DC, Seubert JM. Overexpression of cyp2j2 provides protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H37-46
90. Xiao YF, Ke Q, Seubert JM, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Falck JR, Krausz K, Gelboin HV, Morgan JP, Zeldin DC. Enhancement of cardiac l-type ca2+ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of cyp2j2. *Mol Pharmacol.* 2004;66:1607-1616
91. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of cyp2j2, a human cytochrome p450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem.* 1996;271:3460-3468
92. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem.* 1991;266:9180-9185
93. King LM, Ma J, Srettabunjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H, Zeldin DC. Cloning of cyp2j2 gene and identification of functional polymorphisms. *Mol Pharmacol.* 2002;61:840-852
94. Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, Hammer DJ, Marreez Y, Odley AM, Brunskill EW, Koch WJ, Schwartz RJ, Dorn GW, 2nd. Cardiac-specific ablation of g-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res.* 2006;99:996-1003

95. Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, Diwan A, Martini JS, Sparks L, Parekh RR, Spertus JA, Koch WJ, Kardia SL, Dorn GW, 2nd. A *grk5* polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med.* 2008;14:510-517
96. The Merck manual Home Health Handbook for Patients and Caregivers. *MERCK* 2012 [http://www.merckmanuals.com/home/heart\\_and\\_blood\\_vessel\\_disorders/diagnosis\\_of\\_heart\\_and\\_blood\\_vessel\\_disorders/tests\\_for\\_heart\\_and\\_blood\\_vessel\\_disorders.html](http://www.merckmanuals.com/home/heart_and_blood_vessel_disorders/diagnosis_of_heart_and_blood_vessel_disorders/tests_for_heart_and_blood_vessel_disorders.html) (June 8, 2012). Nachdruckgenehmigung liegt vor.
97. Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha mhc mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest.* 1997;99:570-576
98. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol.* 1999;75:291-295
99. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red fba. *Beitr Pathol.* 1973;150:174-187
100. Ludwig-Maximilians-Universität München; Medizinische Fakultät. Pathologie, Diagnostik, Immunhistochemie 2011. [www.pathologie.med.uni-muenchen.de/010diagnostik/030immunhisto/index.html](http://www.pathologie.med.uni-muenchen.de/010diagnostik/030immunhisto/index.html) (January 24, 2012).
101. Wilkenschoff U.; Kruck I. Handbuch der Echokardiographie. Thieme Verlag, Stuttgart 2008: 225-236. ISBN 3131380144
102. Lopez JE, Myagmar BE, Swigart PM, Montgomery MD, Haynam S, Bigos M, Rodrigo MC, Simpson PC. {beta}-myosin heavy chain is induced by pressure overload in a minor subpopulation of smaller mouse cardiac myocytes. *Circ Res.* 2011;109(6):629-38
103. Bagwe S, Berenfeld O, Vaidya D, Morley GE, Jalife J. Altered right atrial excitation and propagation in connexin40 knockout mice. *Circulation.* 2005;112:2245-2253
104. Hagedorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation.* 1999;99:1508-1515
105. Kirchhoff S, Nelles E, Hagedorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 1998;8:299-302
106. Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10:1380-1389

107. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8277-8281
108. Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CS, Simari RD, Burnett JC, Jr., Redfield MM. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. *Cardiovasc Pathol*. 2011; 21(3):188-98
109. Steinbusch LK, Luiken JJ, Vlasblom R, Chabowski A, Hoebbers NT, Coumans WA, Vroegrijk IO, Voshol PJ, Ouwens DM, Glatz JF, Diamant M. Absence of fatty acid transporter cd36 protects against western-type diet-related cardiac dysfunction following pressure overload in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 301(4):E618-27
110. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeier H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*. 2001;104:2923-2931
111. Mito S, Ozono R, Oshima T, Yano Y, Watari Y, Yamamoto Y, Brydun A, Igarashi K, Yoshizumi M. Myocardial protection against pressure overload in mice lacking *bach1*, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1. *Hypertension*. 2008;51:1570-1577
112. Wang W, Kagaya Y, Asaumi Y, Fukui S, Takeda M, Shimokawa H. Protective effects of recombinant human erythropoietin against pressure overload-induced left ventricular remodeling and premature death in mice. *Tohoku J Exp Med*. 2011;225:131-143
113. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 1997;81:627-635
114. Georgescu SP, Aronovitz MJ, Iovanna JL, Patten RD, Kyriakis JM, Goruppi S. Decreased metalloprotease 9 induction, cardiac fibrosis and higher autophagy after pressure overload in mice lacking the transcriptional regulator p8. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 301(5):C1046-56
115. Zelarayan L, Renger A, Noack C, Zafiriou MP, Gehrke C, van der Nagel R, Dietz R, de Windt L, Bergmann MW. Nf-kappab activation is required for adaptive cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2009;84:416-424
116. Zhang C, Yasuno S, Kuwahara K, Zankov DP, Kobori A, Makiyama T, Horie M. Blockade of angiotensin ii type 1 receptor improves the arrhythmia morbidity in mice with left ventricular hypertrophy. *Circ J*. 2006;70:335-341

117. Boulaksil M, Noorman M, Engelen MA, van Veen TA, Vos MA, de Bakker JM, van Rijen HV. Longitudinal arrhythmogenic remodelling in a mouse model of longstanding pressure overload. *Neth Heart J*. 2010;18:509-515
118. Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 2004;95:717-725
119. Spach MS, Kootsey JM. The nature of electrical propagation in cardiac muscle. *Am J Physiol*. 1983;244:H3-22
120. Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover : Implications for cardiac excitability. *Circ Res*. 2000;86:723-728
121. Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: Distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci (Lond)*. 1996;90:447-452
122. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation*. 1997;95:988-996
123. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Cardiac arrhythmogenesis and the gap junction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:37-44
124. De Mello WC. Cell coupling and impulse propagation in the failing heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10:1409-1420
125. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res*. 2001;88:333-339
126. Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res*. 2004;95:1035-1041
127. Danik SB, Rosner G, Lader J, Gutstein DE, Fishman GI, Morley GE. Electrical remodeling contributes to complex tachyarrhythmias in connexin43-deficient mouse hearts. *Faseb J*. 2008;22:1204-1212
128. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 1995;267:1831-1834
129. Huang GY, Wessels A, Smith BR, Linask KK, Ewart JL, Lo CW. Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. *Dev Biol*. 1998;198:32-44

130. Ya J, Erdtsieck-Ernste EB, de Boer PA, van Kempen MJ, Jongsma H, Gros D, Moorman AF, Lamers WH. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res.* 1998;82:360-366
131. Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1662-1670
132. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in cx43-deficient mice. *Circulation.* 2000;101:547-552
133. Boulaksil M, Winckels SK, Engelen MA, Stein M, van Veen TA, Jansen JA, Linnenbank AC, Bierhuizen MF, Groenewegen WA, van Oosterhout MF, Kirkels JH, de Jonge N, Varro A, Vos MA, de Bakker JM, van Rijen HV. Heterogeneous connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:913-921
134. Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE, Rosenbaum DS. High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin43 deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2001;51:681-690
135. Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: Evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation.* 1998;97:686-691
136. van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation.* 2004;109:1048-1055
137. Morley GE, Vaidya D, Samie FH, Lo C, Delmar M, Jalife J. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous cx43 knockout mice using optical mapping. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10:1361-1375
138. De Groot JR, Coronel R. Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;62:323-334
139. Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;61:208-217
140. Kjolbye AL, Dikshteyn M, Eloff BC, Deschenes I, Rosenbaum DS. Maintenance of intercellular coupling by the antiarrhythmic peptide rotigaptide suppresses arrhythmogenic discordant alternans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H41-49

141. Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1171-1186
142. Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev.* 2007;12:261-266
143. Mariana Ruiz. Connexon and connexin structure; Version 06<sup>th</sup> of June 2006. *Wikipedia* 2011. [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Connexon\\_and\\_connexin\\_structure.svg&filetimestamp=20060606185341#file](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Connexon_and_connexin_structure.svg&filetimestamp=20060606185341#file) (June 10, 2012). Nachdruckgenehmigung liegt vor.
144. Jiang K, Wang J, Zhao C, Feng M, Shen Z, Yu Z, Xia Z. Regulation of gap junctional communication by astrocytic mitochondrial k(atp) channels following neurotoxin administration in vitro and in vivo models. *Neurosignals.* 2011;19:63-74
145. Yoo B, Lemaire A, Mangmool S, Wolf MJ, Curcio A, Mao L, Rockman HA. Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and camkii activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H1377-1386
146. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation.* 1997;96:1180-1184
147. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res.* 2002;54:361-379
148. Spach MS, Josephson ME. Initiating reentry: The role of nonuniform anisotropy in small circuits. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1994;5:182-209
149. Spach MS, Boineau JP. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: A major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1997;20:397-413
150. Verheule S, Sato T, Everett Tt, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of tgf-beta1. *Circ Res.* 2004;94:1458-1465
151. Li D, Farih S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: Atrial remodeling of a different sort. *Circulation.* 1999;100:87-95

152. Oral H, Crawford T, Frederick M, Gadeela N, Wimmer A, Dey S, Sarrazin JF, Kuhne M, Chalfoun N, Wells D, Good E, Jongnarangsin K, Chugh A, Bogun F, Pelosi F, Jr., Morady F. Inducibility of paroxysmal atrial fibrillation by isoproterenol and its relation to the mode of onset of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;19:466-470
153. Gould PA, Yui M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM. Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006;29:821-829
154. Workman AJ. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010;381:235-249
155. Linz D, Schotten U, Neuberger HR, Bohm M, Wirth K. Combined blockade of early and late activated atrial potassium currents suppresses atrial fibrillation in a pig model of obstructive apnea. *Heart Rhythm.* 2011;8(12):1933-9
156. Yu J, Li W, Li Y, Zhao J, Wang L, Dong D, Pan Z, Yang B. Activation of beta(3)-adrenoceptor promotes rapid pacing-induced atrial electrical remodeling in rabbits. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28:87-96
157. Shimizu A, Fukatani M, Tanigawa M, Kaibara M, Konoe A, Isomoto S, Centurion OA, Yano K, Hashiba K. Mechanism of the suppression of repetitive atrial firing by isoproterenol--comparison with disopyramide. *Int J Cardiol.* 1994;43:175-183
158. Rensma PL, Allesie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res.* 1988;62:395-410
159. Smeets JL, Allesie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Hollen J. The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium. The role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium. *Circ Res.* 1986;58:96-108
160. Gelband H, Rosen MR, Myerburg RJ, Bush HL, Bassett AL, Hoffman BF. Restorative effect of epinephrine on the electrophysiologic properties of depressed human atrial tissue. *J Electrocardiol.* 1977;10:313-320
161. Redpath CJ, Rankin AC, Kane KA, Workman AJ. Anti-adrenergic effects of endothelin on human atrial action potentials are potentially anti-arrhythmic. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:717-724
162. Yeh TC, Vassalle M, Lin CI. Arrhythmogenic mechanisms in human atrial and ventricular muscle fibers. *Cardiology.* 1992;80:205-214
163. van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, Hellemons AJ, van Veen TA, Allesie MA, Jongsma HJ. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2000;46:476-486

164. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, van Zijverden M, Groenewegen WA, Allessie MA, Jongsma HJ. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1998;9:596-607
165. Thijssen VL, van der Velden HM, van Ankeren EP, Ausma J, Allessie MA, Borgers M, van Eys GJ, Jongsma HJ. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2002;54:427-437
166. Seidel T, Salameh A, Dhein S. A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue. *Biophys J.* 2010;99:2821-2830
167. Ramanna H, Hauer RN, Wittkamp FH, de Bakker JM, Wever EF, Elvan A, Robles De Medina EO. Identification of the substrate of atrial vulnerability in patients with idiopathic atrial fibrillation. *Circulation.* 2000;101:995-1001
168. Ikeda T, Czer L, Trento A, Hwang C, Ong JJ, Hough D, Fishbein MC, Mandel WJ, Karagueuzian HS, Chen PS. Induction of meandering functional reentrant wave front in isolated human atrial tissues. *Circulation.* 1997;96:3013-3020
169. Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, Allessie MA. High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation.* 1994;89:1665-1680
170. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260:799-802
171. Gross GJ, Gauthier KM, Moore J, Campbell WB, Falck JR, Nithipatikom K. Evidence for role of epoxyeicosatrienoic acids in mediating ischemic preconditioning and postconditioning in dog. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H47-52

## 12 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Publikation:

Wei Guo, Sebastian Schafer, Marion L. Greaser, Michael H. Radke, Martin Liss, Thirupugal Govindarajan, Henrike Maatz, Herbert Schulz, Shijun Li, Amanda M. Parrish, Vita Dauksaite, Padmanabhan Vakeel, Sabine Klaassen, Brenda Gerull, Ludwig Thierfelder, Vera Regitz-Zagrosek, Timothy A. Hacker, Kurt W. Saupe, G. William Dec, Patrick T. Ellinor, Calum A. MacRae, Bastian Spallek, Robert Fischer, Andreas Perrot, Cemil Özcelik, Kathrin Saar, Norbert Hubner, Michael Gotthardt, "RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing."

Nature Medicine, 2012 Apr 1. doi: 10.1038/nm.2693. [Epub ahead of print]

(Eigene Beiträge zur Publikation: Elektrophysiologische und elektrokardiografische Charakterisierung der homo- und heterozygot RBM20-defizienten Ratten sowie korrespondierenden WT Tieren. Supplementary figure 5 a und b sowie Supplementary figure 6 a-d)

### Vorträge:

1) R. Fischer: B. Spallek\*, C. Westphal\*, A. Konkel, Lajos Marko, L. M. DeGraff, C. Schubert, J. A. Bradbury, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer; „CYP2J2 overexpression protects against arrhythmias in two different models of cardiac hypertrophy.“

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Annual Meeting; Mannheim, 27.-30. April 2011.

Poster:

2) B. Spallek\*, C. Westphal\*, A. Konkel, Lajos Marko, L. M. DeGraff, C. Schubert, J. A. Bradbury, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer; „Enhanced EET biosynthesis mediates benefits in mouse models of cardiac hypertrophy.“

Cardiovascular and Metabolic Disease Retreat; Neuruppin, 07.-09. April 2011.

3) B. Spallek, A. Konkel, Lajos Marko, L. M. DeGraff, C. Schubert, J. A. Bradbury, F.C. Luft, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer; „Protection against atrial and ventricular fibrillation in transgenic animals with enhanced EET biosynthesis.“

Council for high blood pressure, American Heart Association; Washington D.C., 13.-16. Oktober 2010.

4) B. Spallek, Lajos Marko, A. Konkel, L. M. DeGraff, C. Schubert, J. A. Bradbury, F.C. Luft, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer; „Epoxyeicosanoids in heart failure development.“

Joint PhD Retreat; Rheinsberg, 9.-11. September 2010.

5) B. Spallek, A. Konkel, Lajos Marko, L. M. DeGraff, C. Schubert, J. A. Bradbury, F.C. Luft, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer; „CYP450-dependent  $\omega$ -3 fatty acids metabolites in heart failure.“

Cardiovascular and Metabolic Disease Retreat; Neuruppin, 05.-07. Mai 2010.

## 13 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Achim Gruber möchte ich herzlich für die offizielle Betreuung dieser Doktorarbeit an der Freien Universität Berlin danken, den ich schon während meines Studiums und eines Praktikums als motivierenden Lehrer und Prüfer kennenlernen durfte.

Meinen Mentoren Prof. Dr. Dominik Müller, Dr. Wolf-Hagen Schunck und Dr. Robert Fischer danke ich sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Aufnahme in eine außergewöhnlich angenehme und inspirierende Arbeitsgruppe. Ihre ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft, ihr Optimismus und Teamgeist werden mir stets ein Vorbild sein. Für die Förderung meiner Eigenständigkeit und persönlichen Entwicklung in Kooperationen und auf zahlreichen, nationalen und internationalen Kongressen danke ich ihnen sehr.

Frau Dr. Christina Westphal danke ich für eine außergewöhnlich gute und äußerst produktive Zusammenarbeit, welche diese Arbeit erst ermöglichte. Ebenso für ihre statistischen Fähigkeiten, für intensive Diskussionen und nicht zuletzt für die Durchsicht dieser Arbeit.

Meinem Kollegen, Bürogenossen und Freund Dr. Florian Herse danke ich für die Einweisung in den Laboralltag, im besonderen für die Einarbeitung in das molekulargenetische Arbeiten. Außerdem für die anregenden Gespräche, für lustige, schöne und stets angenehme Momente in unserem Büro.

Frau May-Britt Köhler und Frau Dr. Fatimunissa Qadri danke ich für die Unterstützung bei histologischen Arbeiten.

Frau Jule Anders, Herr Henning Damm und Frau Dr. Sabine Bartel danke ich für die große Hilfe bei Expressionsanalysen.

Frau Christel Andree möchte ich herzlichst für die Einarbeitung am isolierten Herzen und für die Genotypisierung sowie der Mäusezucht danken.

Ilona Kamer bin ich für eine optimale Zusammenarbeit bei der Implantation der Minipumpen dankbar.

Dr. Ulrike Maschke, Dr. Gesa Albert, Anne Konkel, Lukas Przybyl, Dr. Verena Fokuhl, Dr. Lajos Marko, Gabriele N'diaye, Jutta Meisel sowie allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller/Dechend bin ich für eine unvergessliche und tolle Zeit äußerst dankbar. Ebenso für aufbauende Worte, wenn mal nicht alles rund lief. Stets bin ich gern zur Arbeit gekommen.

Unabhängig vom Laboralltag gilt mein größter Dank meinen Eltern. Erst sie ermöglichen mir das Studium der Veterinärmedizin, gaben mir Freiraum zur persönlichen Entfaltung und unterstützen mich in jeder Situation. Ihre elterliche Liebe und ihr unerschütterliche Glaube in mich geben mir täglich Kraft.

Philipp danke ich für unvergessliche Jahre des Glücks, seine Liebe und Zuneigung. Für unser Zuhause.

## **14 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, Bastian Spallek, geboren am 01.11.1982 in Borken (Westf.), dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.06.2012

Bastian Spallek