

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

**Effekte von Verapamil auf die Expression der L-Typ-
Ca²⁺-Kanaluntereinheiten und Phosphatasen in den
frühen Phasen schneller atrialer Stimulation im
Kaninchenmodell des Vorhofflimmerns**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Christoph-Philipp Winkler
aus Freudenstadt

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Bosch

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hofbeck

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorhofflimmern	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Merkmale des Vorhofflimmerns	1
1.1.3 Ätiologie.....	1
1.1.4 Der elektrophysiologische Mechanismus von Vorhofflimmern	2
1.1.5 Die Initiation von Vorhofflimmern	2
1.1.6 Symptomatik.....	3
1.1.7 Komplikationen	3
1.1.8 Formen.....	4
1.2 Das Aktionspotential der Herzmuskelzellen.....	4
1.2.1 Morphologie des Aktionspotentials.....	5
1.2.2 Phasen des Aktionspotentials	6
1.2.3 Veränderungen des Aktionspotentials bei Vorhofflimmern.....	8
1.3 Kardiale Calciumkanäle.....	8
1.3.1 Funktionelle Klassifizierung der Calciumkanäle	8
1.3.1.1 HVA-Kanäle.....	9
1.3.1.2 L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle.....	9
1.3.2 Molekularer Aufbau der L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle.....	9
1.3.2.1 Lokalisation und Funktion der Kanaluntereinheiten	10
1.3.2.1.1 α_1 -Untereinheit	10
1.3.2.1.2 $\alpha_2\delta$ -Untereinheit.....	11
1.3.2.1.3 γ -Untereinheit	11
1.3.2.1.4 β -Untereinheit.....	11
1.3.3 Regulation der L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle.....	12
1.3.3.1 Regulation der L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle durch Proteinkinasen- und Phosphatasen.....	13
1.3.3.2 Struktur und Nomenklatur der Protein-Phosphatasen	14
1.4 Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	14
1.4.1 Einleitung	14
1.4.2 „AF begets AF“	15
1.4.3 Remodeling bei Vorhofflimmern - Auswirkungen auf die atriale Elektrophysiologie	16

1.4.4	Zelluläre und molekulare Mechanismen des elektrischen Remodeling bei Vorhofflimmern / atrialer Tachykardie.....	17
1.4.4.1	Veränderungen des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Stromes ($\text{I}_{\text{Ca,L}}$).....	18
1.4.5	Zelluläre Veränderungen in den sehr frühen Phasen des atrialen Remodelings	20
1.5	Therapie und Prävention von Vorhofflimmern	21
1.5.1	Funktionelle Bedeutung und klinische Konsequenzen des elektrischen Remodelings	21
1.5.2	Pharmakologische Therapie	22
1.5.2.1	Einteilung der Antiarrhythmika.....	22
1.5.2.2	Antiarrhythmika zur Therapie des Vorhofflimmerns.....	24
1.5.2.3	Ca^{2+} -Kanalblocker.....	24
1.5.2.4	Einfluß des L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblockers Verapamil auf das atriale Remodeling.....	26
1.5.2.5	Probleme bei der Therapie mit Verapamil	26
1.6	Fragestellung	27
2	Material.....	28
2.1	Versuchstiere	28
2.2	Geräte.....	28
2.3	Software.....	29
2.4	Sonstige Laborgeräte und Zubehör	29
2.5	Medikamente	31
2.6	Antikörper.....	31
2.7	Lösungen.....	32
2.7.1	Lösungen zur Probengewinnung	32
2.7.2	Lösungen zur Proben-Aufbereitung	33
2.7.3	Lowry-Protein-Assay	33
2.7.4	Lösungen für die Elektrophorese.....	34
2.7.5	Lösungen für Western Blotting	35
2.7.6	Lösungen zur Immunfärbung	36
2.7.7	Lösungen für die Coomassie-Färbung.....	36
2.8	Chemikalien.....	37

3	Methoden	38
3.1	Implantation der Sonden	38
3.2	Medikation der Kaninchen	40
3.3	Stimulation der Kaninchen.....	41
3.4	Gruppeneinteilung	41
3.5	Ablauf der Präparation des rechten Atriums	42
3.6	Probenaufbereitung/Proteinisolation	44
3.7	Proteinbestimmung nach Lowry.....	45
3.7.1	Prinzip.....	45
3.7.2	Durchführung	45
3.8	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	46
3.8.1	Prinzip.....	46
3.8.2	Durchführung	46
3.9	Western-Blotting	48
3.9.1	Prinzip.....	48
3.9.2	Durchführung	48
3.10	Coomassiefärbung.....	49
3.10.1	Prinzip.....	49
3.10.2	Durchführung	49
3.11	Immunfärbung	49
3.11.1	Prinzip.....	49
3.11.2	Durchführung	50
3.12	ECL-Detektion	50
3.12.1	Prinzip.....	50
3.12.2	Durchführung	50
3.13	Datenauswertung und Statistik.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Expression der α_{1c} -und β_{2a} -Untereinheiten.....	52
4.1.1	Veränderte Expression der α_{1c} -und β_{2a} -Untereinheiten nach Stimulation ohne Gabe von Verapamil	52
4.1.2	Veränderte Expression der α_{1c} -und β_{2a} -Untereinheiten nach Stimulation und Gabe von Verapamil	54

4.2	Expression von PP1α und PP2Aα	56
4.2.1	Veränderte Expression von PP1 α und PP2A α nach Stimulation ohne Gabe von Verapamil	56
4.2.2	Veränderte Expression von PP1 α und PP2A α nach Stimulation und Gabe von Verapamil.....	58
5	<i>Diskussion</i>	60
5.1	Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen.....	60
5.2	Expression der L-Typ-Ca²⁺-Kanaluntereinheiten in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings.....	61
5.2.1	Verminderte Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten als Ursache für den verminderten I _{Ca,L} bei Vorhofflimmern.....	61
5.2.2	Vergleich mit anderen Studien	62
5.3	Einfluß von Verapamil auf die Expression der L-Typ-Ca²⁺-Kanaluntereinheiten	65
5.4	Expression der Phosphatasen in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings	67
5.4.1	Erhöhte Expression von PP1 α	67
5.4.2	Vergleich mit anderen Studien	68
5.5	Einfluß von Verapamil auf die vermehrte Expression von PP1α in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings	69
5.6	Prävention des frühen elektrischen Remodelings durch Verapamil - Klinische Bedeutung	70
6	<i>Zusammenfassung</i>	72
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	73

Abkürzungsverzeichnis

AERP	Atriale Effektive Refraktärzeit
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CAMII	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	4 (2-Hydroxyethyl)-1-piperazin- ethansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylflouride
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecyl-Polyacryamidgel- Elektrophorese
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline + Triton
TEMED	N'N'N'-Tetramethylsulfonylflouride

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Epidemiologie

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende und behandlungsbedürftige Herzrhythmusstörung des Menschen im Erwachsenenalter (Kannel, 1998, Benjamin, 1994). In der westlichen Welt leiden ca. 5 % der über 65jährigen in der Bevölkerung an Vorhofflimmern (Feinberg, 1995). Die Prävalenz von Vorhofflimmern verdoppelt sich ab einem Alter von 50 Jahren mit Erreichen jedes weiteren Lebensjahrzehnts (Go, 2001).

1.1.2 Merkmale des Vorhofflimmerns

Bei Vorhofflimmern kommt es zu einer schnellen und unregelmäßigen Aktivierung des Vorhofmyokards. Bei menschlichem Vorhofflimmern kann die atriale Frequenz zwischen 400 und 600 Vorhofsschlägen in der Minute betragen. Würden Impulse einer derart hohen Frequenz auf die Kammer übergeleitet werden, wäre die daraus resultierende Ventrikelfrequenz zu hoch, um eine adäquate Funktion des Ventrikels zu gewährleisten. Die Folge wäre ein funktioneller Herzstillstand. Da jedoch der Atrioventrikular(AV)-Knoten als „Frequenzfilter“ wirkt, werden die Vorhofaktionen nur in unregelmäßigen Abständen auf die Kammer übergeleitet. Es resultiert das Bild einer absoluten Arrhythmie.

1.1.3 Ätiologie

Vorhofflimmern tritt häufig als Begleitsymptom anderer kardialer Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit, des akuten Koronarsyndroms (Sugiura, 1985, Goldberg, 1990), der linksventrikulären Hypertrophie, des Hochdruckherzens oder von Herzklappenfehlern auf. Weitere Risikofaktoren, die das Auftreten von Vorhofflimmern begünstigen können, sind Diabetes mellitus, Hyperthyreose, männliches Geschlecht, Rauchen, der Gebrauch von Diuretika, Alkohol und hohes Alter (Kannel, 1982). Auch

postoperativ nach kardiochirurgischen Eingriffen ist das Vorhofflimmern von großer klinischer Bedeutung (Frost, 1992). Ätiologisch können auch jegliche Formen der Entzündung, der Vernarbung, der Dehnung und der Hypertrophie des Vorhofmyokards sowie metabolische, humorale und neuronale Faktoren zu Vorhofflimmern führen (Hennersdorf, 2001, Benjamin, 1994). In einer 1997 veröffentlichten Arbeit von Brugada et al. (Brugada, 1997) konnte ein Gen-Locus für das „familiäre Vorhofflimmern“ identifiziert werden. Bei 20 - 50% der Patienten mit Vorhofflimmern scheint dieses jedoch nicht mit irgendwelchen zugrunde liegenden Krankheiten vergesellschaftet zu sein (sogenanntes „lone atrial fibrillation“)(Murgatroyd, 1993).

1.1.4 Der elektrophysiologische Mechanismus von Vorhofflimmern

Heutzutage ist die sogenannte „Multiple Wavelet“-Hypothese, die ursprünglich von Moe et al. (Moe, 1962) formuliert wurde, die am häufigsten anerkannte Theorie für den elektrophysiologischen Mechanismus, der Vorhofflimmern unterhält. Danach beruht Vorhofflimmern auf multiplen, unabhängigen, mobilen Erregungskreisen, die um refraktäre Gewebssareale kreisen. Einmal initiiert, verändern diese Erregungskreise ständig ihre Größe und Lokalisation, abhängig von den lokalen Refraktär- und Leitungseigenschaften des Gewebes. Zu jedem beliebigen Zeitpunkt können zufällig einzelne Erregungskreise spontan terminieren, andere aber reinduziert werden, fusionieren oder in mehrere Erregungsfronten zerfallen. Die Stabilität der Rhythmusstörung hängt von der Anzahl gleichzeitig aktiver Erregungskreise, von der verfügbaren Masse des erregbaren Gewebes und von der Dimension der einzelnen Erregungskreise ab. In der Zwischenzeit gelang durch Mapping-Studien, sowohl im Tierversuch (Allessie, 1985) als auch bei Patienten mit Vorhofflimmern (Konings, 1994), der direkte Nachweis multipler Erregungsfronten und damit indirekt auch eine Bestätigung der „Multiple Wavelet“-Hypothese.

1.1.5 Die Initiation von Vorhofflimmern

Ausgelöst wird Vorhofflimmern, wenn abnorme Erregungen auf ein arrhythmieförderndes Substrat treffen. Zu den typischen Auslösern („Triggern“)

gehören Vorhofextrasystolen, die von ektopen Schrittmachern ausgehen oder durch akute atriale Dehnung entstehen (Dobrev, 2004). Solche ektopen Zentren sind häufig in den Vorhofmyokardanteilen der Pulmonalvenen lokalisiert (Haissaguerre, 1998) und können Vorhofflimmern sowohl auslösen als auch unterhalten. Ischämie, oxidativer Stress und Dehnung infolge von Hypertonie begünstigen die Auslösung von Vorhofflimmern (Jung, 2003, Mihm, 2001). Auch abnorme Aktivitäten im sympathischen und parasympathischen Nervensystem zählen zu den häufigen Auslösern (Dobrev, 2004).

1.1.6 Symptomatik

Vom Patienten selbst werden Episoden von Vorhofflimmern typischerweise als Palpitationen, Schwindel, Präsynkopen, Angina pectoris oder Dyspnoe mit Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit bemerkt. Ein großer Teil der Patienten bleibt jedoch asymptomatisch (Hennersdorf, 2001).

1.1.7 Komplikationen

Vorhofflimmern kann zu einer Reihe klinischer Komplikationen führen. Die bedeutendste unter ihnen ist das Auftreten von Thromboembolien als Folge der durch Vorhofflimmern bedingten Veränderungen des Blutflusses: Die Arrhythmie kann zu einer Stase des Blutes im Atrium sowie zu endothelialen und endokardialen Schäden führen (Lip, 1995). So entstandene Blutgerinnsel werden meist in den zerebralen Kreislauf geschwemmt und sind somit ursächlich für einen großen Teil der embolisch bedingten Schlaganfälle (Wolf, 1991). Aber auch andere embolische Verschlüsse von Gefäßen, wie zum Beispiel Nieren-, Mesenterial-, oder Herzinfarkte sind – wenn auch seltener – möglich.

Bei bereits vorbestehender Herzinsuffizienz kann das Eintreten von Vorhofflimmern, und die daraus resultierende fehlende synchronisierte Füllung des linken Ventrikels aus dem Atrium, zu einer kritischen Abnahme des Herzzeitvolumens von bis zu 20% führen (Hennersdorf, 2001).

1.1.8 Formen

Man unterscheidet klinisch drei Formen des chronischen Vorhofflimmerns (Gallagher, 1997):

- Paroxysmales (anfallsartiges) Vorhofflimmern:
Rhythmusstörung, die spontan wieder in den normalen Sinusrhythmus einmündet.
- Persistierendes (anhaltendes) Vorhofflimmern:
Anhaltende Rhythmusstörung, die nicht spontan konvertiert, aber einer medikamentösen oder elektrischen Konversion zugänglich ist.
- Permanentes (chronisches) Vorhofflimmern:
Anhaltende Rhythmusstörung, die nicht mehr in einen Sinusrhythmus überführt werden kann.

Diese Einteilung gilt jedoch nur für chronisches Vorhofflimmern, da einzelne Perioden von Vorhofflimmern nicht vollständig einer Gruppe zugeschrieben werden können. Patienten, die anfangs paroxysmales Vorhofflimmern aufweisen, entwickeln oftmals längere Anfälle, die nicht mehr spontan in den Sinusrhythmus einmünden. Vorhofflimmern, das anfangs noch für medikamentöse oder elektrische Kardioversion empfänglich gewesen wäre, tendiert dazu, resistent zu werden und sich ab einem bestimmten Punkt nicht mehr in den Sinusrhythmus überführen zu lassen (Wijffels, 1995). Aus diesem Grund hat die Prävention einen besonderen Stellenwert in der Therapie dieser Rhythmusstörung.

1.2 Das Aktionspotential der Herzmuskelzellen

Die elektrische Aktivität des Herzens ist das Ergebnis eines komplizierten Zusammenspiels einer großen Anzahl von transmembranären Ionenströmen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), Ionenpumpen (Na^+/K^+) und Ionenaustauschmechanismen ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) (Forth, 2001). Aus diesen unterschiedlichen Prozessen resultiert in erregbaren Zellen, z.B. Nerven- und Muskelzellen, das Aktionspotential.

1.2.1 Morphologie des Aktionspotentials

Die Form und Dauer des kardialen Aktionspotentials im Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem (Sinusknoten, Atrioventrikular (AV)-Knoten, His-Purkinje-Fasern) oder im Arbeitsmyokard (Atrium, Ventrikel) variieren in den verschiedenen Herzregionen (Nerbonne, 2000). Diese Unterschiede beruhen auf einer unterschiedlichen Ausstattung der Myozyten mit verschiedenen Ionenkanälen (Schram, 2002). Die Aktionspotentialform ändert sich im Verlauf des Erregungsleitungssystems des Herzens vom Sinusknoten bis zu den Purkinjefasern (Abbildung 1).

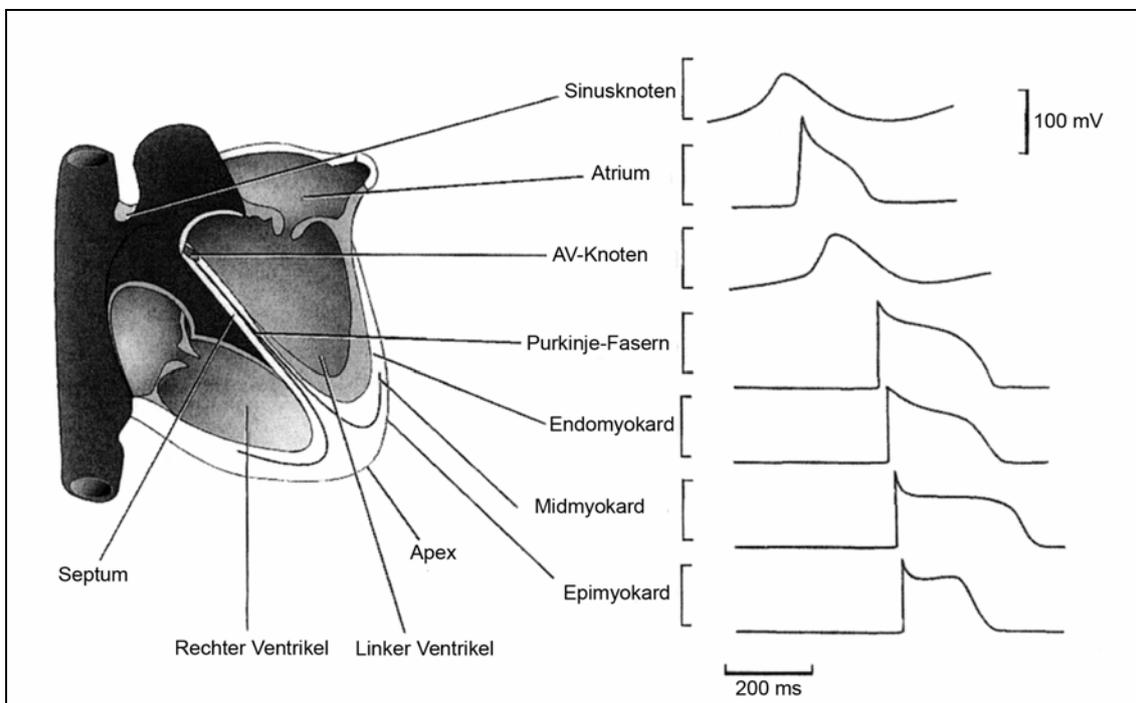


Abbildung 1: Die Morphologie kardialer Aktionspotentiale in den unterschiedlichen Herzregionen. Die Zeichnung ist aus der Literatur übernommen (Nerbonne, 2000) und ins Deutsche übersetzt.

1.2.2 Phasen des Aktionspotentials

Das Aktionspotential stellt ein komplexes Wechselspiel mehrerer Ionenkanäle dar und wird durch schnell veränderliche, spezifische Leitfähigkeiten der Membran für Natrium-, Kalium-, Calcium-, und Chloridionen bestimmt. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der am Aktionspotential beteiligten Ströme.

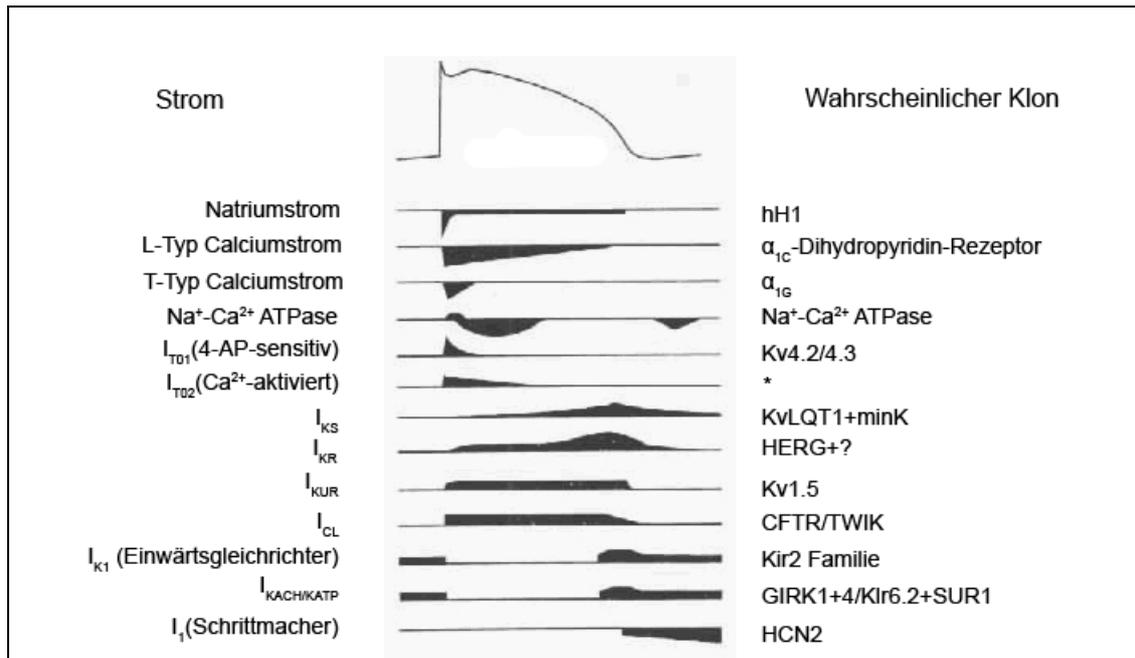


Abbildung 2: Schematische Darstellung des kardialen Aktionspotentials und der daran beteiligten Ionenströme. Links im Bild der Strom, jeweils daneben die Öffnungszeit der Kanäle während eines Aktionspotentials, ganz rechts der wahrscheinliche Kanalklon, der den Strom verursacht. Die regionale Distribution der Kanäle weist jedoch Unterschiede auf, was die unterschiedlichen Aktionspotentialmorphologien in den verschiedenen Herzregionen (Kapitel 1.2.1) erklärt. Die Zeichnung ist aus der Literatur übernommen (Nerbonne, 2000) und ins Deutsche übersetzt.

Das AP lässt sich in fünf zeitliche Phasen unterteilen (0, 1, 2, 3 und 4):

Phase 0: schnelle Depolarisation der Zelle.

Nach einem überschwelligem Reiz reagiert das Herz gemäß dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ mit einer raschen Depolarisation. Aufgrund eines schnellen Na^+ -Einwärtsstroms (I_{Na}) und/oder eines langsamen Ca^{2+} -Einwärtsstroms durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($I_{\text{Ca,L}}$) wird das Zellmembranpotential auf positive Bereiche umgeladen.

Phase 1: frühe oder schnelle Repolarisation.

Sie entsteht nach der spannungsabhängigen Inaktivierung des schnellen Natriumstroms I_{Na} vor allem durch die Aktivierung eines transienten Kaliumstroms, I_{to} , der sich aus einem spannungsabhängigen Kaliumstrom $I_{\text{to,1}}$ und einem Ca^{2+} -abhängigen Chloridstrom $I_{\text{to,2}}$ (Kenyon, 1979) zusammensetzt.

Phase 2: Plateauphase des Aktionspotentials.

Diese lang anhaltende Depolarisationsphase wird durch ein Gleichgewicht zwischen Einwärts(Ca^{2+} und Na^+)- und Auswärts(K^+)-Strömen bestimmt. Die Ionenbewegungen in das Zellinnere werden u.a. von den L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen ($I_{\text{Ca,L/T}}$), dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ($I_{\text{Na/Ca}}$) und einem langsam inaktivierenden Na^+ -Strom getragen. Verzögert aktivierte Kaliumströme sind hauptverantwortlich für den auswärtsgerichteten Ionentransport.

Phase 3: späte oder langsame Repolarisationsphase.

Es kommt zu einer langsamen Inaktivierung der Einwärtsströme. Bei weiter steigenden K^+ -Strömen (I_{Kr} , I_{Ks}), setzt sich die Repolarisation fort. Zuletzt wird auch noch I_{K1} aktiviert und stellt somit vor allem im Ventrikel das ursprüngliche Ruhepotential von ca. -80 mV wieder ein.

Phase 4: Rückkehr zum Ruhemembranpotential.

Während dieser Phase herrscht das durch I_{K1} in der Phase 3 stabilisierte Ruhepotential. In Zellen mit spontaner Schrittmacheraktivität (Sinus-, AV-

Knoten, His-Purkinje-System) kommt es jedoch zu einer langsamen diastolischen Depolarisation. Die Phase-4-Membrandepolarisation ist also entscheidend für die Schrittmacherfunktion dieser Zellen.

1.2.3 Veränderungen des Aktionspotentials bei Vorhofflimmern

Vorhofflimmern führt zu deutlichen Veränderungen der atrialen Aktionspotentialmorphologie, die ausführlich im Kapitel 1.4.3 beschrieben werden.

1.3 Kardiale Calciumkanäle

Die Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ist einer der wichtigsten Regulationsmechanismen der Zelle. Zu den Ca^{2+} -abhängigen Regulationsmechanismen zählt man unter anderem die Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, die Regulation von Enzymaktivitäten, die Kontraktion des glatten Muskels und die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel (Hagiwara, 1983, Reuter, 1983). Im Herzen sind die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle notwendig für die Entstehung elektrischer Impulse und für die Kontraktion des Herzmuskels, da das Ausmaß der Aktivierung des kontraktile Apparates im Wesentlichen durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bestimmt wird. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration vor der Kontraktion erfolgt durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle wird hauptsächlich durch das Membranpotential reguliert, aber auch durch Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Toxine und Pharmaka beeinflusst (Hofmann, 1999).

1.3.1 Funktionelle Klassifizierung der Calciumkanäle

Ca^{2+} -Kanäle können aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften in verschiedene Familien von Ca^{2+} -Kanälen eingeteilt werden. Auf der Basis ihrer Aktivitätsschwelle können zwei Kategorien von Ca^{2+} -Kanälen unterschieden werden. Die erste Kategorie

besteht aus den LVA-Kanälen (low-voltage activated), die zweite aus den sogenannten HVA-Kanälen (high-voltage activated) (Nargeot, 1997).

1.3.1.1 HVA-Kanäle

Die sogenannten HVA-Kanäle (high-voltage activated) werden durch stärkere Depolarisation aktiviert und beginnen sich erst bei > -30 mV zu öffnen. Ihre Permeabilität ist für Ba^{2+} -Ionen größer als für Ca^{2+} -Ionen und auch in der Inaktivierung zeigen sich signifikante Unterschiede zu den LVA-Kanälen (Nargeot, 1997).

In den Zellen des Myokards korrespondiert diese Permeabilität mit dem „slow inward current“ (Rougier, 1969). Später wurde dieser Strom als L-Typ- Ca^{2+} -Strom (long lasting) bezeichnet. Somit lässt sich die Familie der HVA-Kanäle weiter unterteilen in die Gruppe der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und die der Nicht-L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle.

1.3.1.2 L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle

L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression verschiedene Funktionen. Im Herzen sind die $Ca_v1.2$ Calciumkanäle (siehe Kapitel 1.3.2.1.1) notwendig für die Entstehung elektrischer Impulse und für die Kontraktion des Herzmuskels. Sie sind quantitativ gesehen die meist exprimierten Ca^{2+} -Kanäle des Myokards. In Arbeitsmyokardzellen werden sie durch die Depolarisation aktiviert und sind für die Plateauphase des Aktionspotentials verantwortlich. Im Sinus- und AV-Knoten unterstützen sie die Exzitation (Shorofsky, 2001).

1.3.2 Molekularer Aufbau der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle

High voltage aktivierte (HVA) L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sind heterooligomere Komplexe (siehe Abbildung 3), die aus bis zu vier Untereinheiten bestehen. Die wichtigste und größte im Herzen ist die porenformende α_{1c} -Untereinheit (Mikami, 1989). Die anderen am Aufbau beteiligten Proteine werden als Hilfsuntereinheiten bezeichnet. Dazu zählen die cytoplasmatische β -Untereinheit (Hullin, 1992), die α_2 -Untereinheit, die durch eine Disulfid-Brücke

2000). Die kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle werden dabei in erster Linie durch die α_{1C} -Gene ($\text{Ca}_v1.2$) codiert (Mikami, 1989).

1.3.2.1.2 $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten entstehen aus einem Vorläuferprotein, das durch Proteolyse posttranslational gespalten wird. Dies führt zu einem α_2 -Protein und einem δ -Protein, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Wiser, 1996). δ ist ein integrales Membranprotein mit einer einzigen transmembranären Region. Es besitzt eine kurze intrazelluläre und eine längere extrazelluläre Sequenz und ist unterschiedlich glykolisiert (Jay, 1990). α_2 hingegen ist extrazellulär lokalisiert und ebenfalls unterschiedlich glykolisiert (Jay, 1990). Bisher konnten drei verschiedene $\alpha_2\delta$ -Gene gefunden werden (Klugbauer, 1999, Ellis, 1988). Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten scheinen sowohl die Regulation der Kanaleigenschaften, als auch die Expression des Kanalkomplexes zu beeinflussen (Singer, 1991, Klugbauer, 1999, Bangalore, 1996).

1.3.2.1.3 γ -Untereinheit

In verschiedenen Studien konnte in den Ca^{2+} -Kanälen des Skelettmuskels und des Gehirns eine γ -Untereinheit nachgewiesen werden (Jay, 1990, Powers, 1993, Burgess, 1999). Dennoch ist noch unklar, ob auch die kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eine γ -Untereinheit besitzen (Klugbauer, 2000).

1.3.2.1.4 β -Untereinheit

Vier verschiedene Gene (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) codieren für die cytoplasmatischen β -Untereinheiten (Castellano, 1994). Alle werden alternativ gespliced, so dass mehrere Isoformen vorkommen können (Birnbaumer, 1998). Im Herzen ist die β_2 -Untereinheit wahrscheinlich die vorherrschende Isoform, jedoch scheint es zwischen den verschiedenen Spezies große Variationen in der Expression der verschiedenen Isoformen zu geben (Biel, 1991, Collin 1993).

Obwohl die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten bestehen und die grundlegenden Eigenschaften des Kanals

durch die porenformenden α_{1c} -Untereinheiten festgelegt werden, scheinen die β -Untereinheiten die stärksten Modulatoren der Expression, Öffnungswahrscheinlichkeit, Aktivierung und Inaktivierung zu sein (Perez-Reyes, 1995, Walker, 1998). So gibt es Hinweise dafür, dass durch die Coexpression verschiedener β -Untereinheiten mit der α_1 -Untereinheit die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung, Kinetik und Größe des Stromes abhängig von der Kombination der Untereinheiten verändert wird (Hosey, 1996). Wei et al. (Wei, 2000) haben demonstriert, dass die β -Untereinheiten der limitierende Faktor für die Expression des L-Typ- Ca^{2+} -Kanalstroms im Herzen sind. Grammer et al. konnten zeigen, dass eine verminderte Expression der β -Untereinheiten bei Vorhofflimmern auftritt und daher ein wichtiger Mechanismus für die Reduktion der funktionellen Kanäle bei Vorhofflimmern zu sein scheint (Grammer, 2001).

Die Strukturen der Hilfsuntereinheiten des Calciumkanals sind in Abbildung 4 dargestellt.

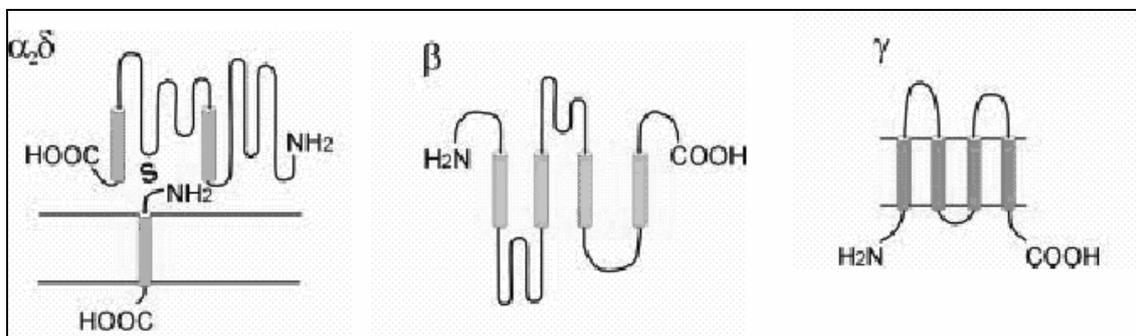


Abbildung 4: Strukturmodelle der Hilfsuntereinheiten des Calciumkanal-komplexes (Specht, 2000).

1.3.3 Regulation der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle

Viele Neurotransmitter oder Hormone sind in der Lage, das Öffnen kardialer Ca^{2+} -Kanäle zu modulieren und dadurch beispielsweise Inotropie und Chronotropie zu regulieren. Beispiel hierfür ist wahrscheinlich die gegensätzliche Regulation parasympathischer und sympathischer

Stimulationen. Eine Beschleunigung der Stimulationsfrequenz induziert unverzüglich, sowohl in menschlichen als auch in tierischen Myokardzellen, eine Vergrößerung der Amplitude und eine Verlangsamung der Inaktivierung des $I_{Ca,L}$. Dieses führt einen starken Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms herbei (Piot, 1996).

1.3.3.1 Regulation der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch Proteinkinasen- und Phosphatasen

Die Modulation der Ca^{2+} -Ströme durch die von Protein-Kinasen induzierte Phosphorylierung der Ionenkanäle ist von großer Bedeutung. Die Proteinkinasen A und C und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (PKA, PKC, und CAMKII) beeinflussen $I_{Ca,L}$ (Kamp, 2000, Xiao, 1994), indem sie durch Membranrezeptoren, die durch second messenger agieren, die Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle modulieren. Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und damit die Calciumstrom-Amplitude werden durch Phosphorylierung der Kanalproteine erhöht, durch Dephosphorylierung vermindert. Im Herzen wirken die Typ1- und Typ2A-Phosphatasen (PP1 und PP2A) der Phosphorylierung von $I_{Ca,L}$ entgegen (Herzig, 2000). Daraus folgt, dass die tatsächliche Amplitude des basalen $I_{Ca,L}$ von der ausbalancierten Aktivität der Kinasen und Phosphatasen bestimmt wird. Christ et al. zeigten in einer Studie, dass die Unterschiede in der Calciumstrom-Amplitude zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Sinusrhythmus nahezu vollständig aufgehoben sind, wenn die Aktivität der Typ1- und Typ2A-Phosphatasen gehemmt wird (Christ, 2004). Daraus und aus weiteren Versuchen haben die Autoren geschlossen, dass bei chronischem Vorhofflimmern eine gesteigerte Aktivität dieser Phosphatasen vorliegen muss. Doch obwohl die Phosphatasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Kanalaktivität zu haben scheinen, ist nichts über die Veränderung der Expression der katalytischen Untereinheiten von PP1 und PP2A in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings bekannt.

1.3.3.2 Struktur und Nomenklatur der Protein-Phosphatasen

Nach einem Vorschlag von Philipp Cohen (Cohen, 1994) werden Proteinphosphatasen in die beiden Gruppen PP1 und PP2 eingeteilt. Die Typ2-Phosphatasen werden weiter unterteilt in PP2A, PP2B und PP2C (Cohen, 1994). Die katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen, die auch für die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin verantwortlich sind, werden durch die beiden Genfamilien PPP und PPM codiert (Cohen, 1997). Die PPP-Familie besteht aus den Phosphatasen Typ 1, 2A und 2B, während die PPM-Familie aus den Mg^{2+} -abhängigen Phosphatasen, wie der Phosphatase Typ 2C, besteht. Im Gegensatz zu der monomeren Form von PP2C besitzen PP1, PP2A und PP2B eine multimere Form, die sich aus einer katalytischen Untereinheit und ein oder zwei zusätzlichen Proteinen zusammensetzt. Diese zusätzlichen Proteine verleihen ihnen Substratspezifität, können die enzymatische Aktivität regulieren und die subzelluläre Lokalisation des Holoenzym kontrollieren (Faux, 1996).

Die katalytische Untereinheit von PP1 wird aufgrund drei verschiedener Gene in Typ 1α -, 1δ - und 1γ unterteilt (Sasaki, 1990). Die katalytische Untereinheit von PP2A existiert in den beiden Isoformen PP2A α und PP2A β (Stone, 1987, Green, 1987, Arino, 1988), wobei PP2A α 10-mal häufiger als PP2A β vorkommt (Khew-Goodall, 1988).

1.4 Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

1.4.1 Einleitung

Vorhofflimmern selbst führt zu einer Vielzahl von elektrophysiologischen, strukturellen und mechanischen Veränderungen, die den Erhalt und das Wiederauftreten von Vorhofflimmern begünstigen können. Diese Prozesse werden als „atriales Remodeling“ bei Vorhofflimmern bezeichnet.

Das elektrische Remodeling stellt eine sehr frühe Adaption an die extrem hohe elektrische Aktivität in den Vorhöfen dar. Betroffen sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhofmyozyten: Die Aktionspotentialdauer und die effektive Refraktärzeit sind verkürzt. Das

strukturelle Remodeling umfasst Adaptionsprozesse sowohl der Myozyten (Myolyse, Hypertrophie) als auch des gesamten Gewebes (Vorhofdilatation, interstitielle Fibrose, Fetteinlagerungen) (Allessie, 2002). Bei der Ausbreitung einer ektopten Erregung in die elektrisch und strukturell veränderten Vorhöfe hinein kann eine um ein funktionelles oder anatomisches Hindernis kreisende Erregungsfront („Reentry“) entstehen (Dobrev, 2004). Mit Fortschreiten des Remodelings bilden sich multiple Reentry-Wege aus, die Vorhofflimmern dauerhaft unterhalten (Allessie, 2002).

1.4.2 „AF begets AF“

Schon sehr früh wurde erkannt, dass die Überführung in den Sinusrhythmus und dessen Aufrechterhaltung durch elektrische oder pharmakologische Methoden mit zunehmender Dauer der Rhythmusstörung schwieriger werden (Parkinson, 1929).

Die Auswirkungen des Vorhofflimmerns auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens wurden erstmalig von Attuel et al. (Attuel, 1982) beschrieben. Sie fanden einen Zusammenhang zwischen einer Verkürzung und verminderten Frequenzadaption der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP) und einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern, bei Patienten die anfällig für atriale Tachyarrhythmien waren. Diese Befunde wurden bestätigt durch Aktionspotentialmessungen an isolierten Herzohren von Patienten mit Vorhofflimmern (Boutjidir, 1986), in welchen sich neben der verminderten Frequenzadaption auch eine deutliche Verkürzung der Aktionspotentialdauer und die für Vorhofflimmern typische Dreiecksform der Aktionspotentiale mit einem Verlust des Plateaus fanden (siehe Abbildung 5).

Von Wijffels et al. (Wijffels, 1995) wurde in einer Studie untersucht, ob die elektrophysiologischen Veränderungen Ursache oder Folge des Vorhofflimmerns darstellen. Bei wachen Ziegen wurde durch Hochfrequenzstimulation mittels eines externen Stimulationscomputers wiederholt Vorhofflimmern induziert, sobald eine spontane Konversion in den Sinusrhythmus eintrat. Die Autoren konnten feststellen, dass die Dauer der Episoden des Vorhofflimmerns stetig zunahm. Bedingt durch das künstlich

erhaltene Vorhofflimmern kam es – wie schon von Attuel, allerdings als Endzustand bei Patienten mit Vorhofflimmern, beschrieben - zu einer zunehmenden Verkürzung und verminderten Frequenzadaption der atrialen Refraktärzeit. Somit konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass Vorhofflimmern zu den Veränderungen der atrialen Elektrophysiologie führt, die dann selbst wiederum das Auftreten und den Erhalt der Arrhythmie begünstigen („Atrial fibrillation begets atrial fibrillation“).

1.4.3 Remodeling bei Vorhofflimmern - Auswirkungen auf die atriale Elektrophysiologie

Vorhofflimmern führt zu den bereits im vorigen Kapitel beschriebenen elektrophysiologischen Veränderungen. Bosch et al. (Bosch, 1999) untersuchten in einer Studie die Aktionspotentiale humaner Vorhofzellen bei Sinusrhythmus und bei Vorhofflimmern. Sie konnten feststellen, dass in den Zellen von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern die Aktionspotentialdauer stark gegenüber Sinusrhythmus verkürzt war und auf zellulärer Ebene eine verminderte Frequenzadaption der Repolarisation auftrat. Sie zeigten, dass Vorhofflimmern zu einer deutlichen Veränderung der Aktionspotentialmorphologie mit Verlust des Plateaus führt, weshalb die Aktionspotentiale nahezu Dreiecksform aufweisen (Abbildung 5).

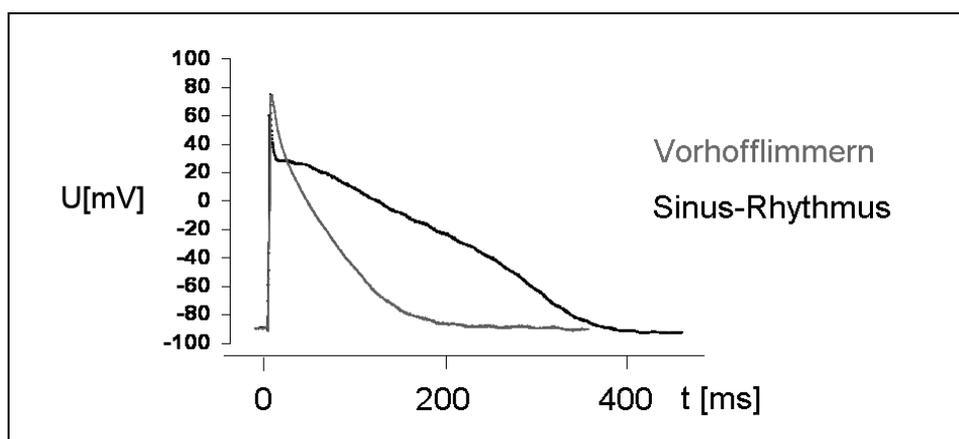


Abbildung 5: Aktionspotentiale humaner Vorhofzellen bei Sinusrhythmus und bei Vorhofflimmern (Bosch, 1999).

Die oben genannten Veränderungen der Aktionspotentialeigenschaften bei atrialer Tachykardie konnten in verschiedenen experimentellen Modellen und beim Menschen bestätigt werden: Im so genannten "Rapid Atrial Pacing Model" (schnelle atriale Stimulation) des Hundes (Gaspo, 1997, Morillo, 1995, Yue, 1997) wurden einheitlich eine progressive Verkürzung und eine verminderte Frequenzadaption der atrialen Refraktärzeit beobachtet. Außerdem zeigte sich in diesem Modell eine verminderte atriale Leitungsgeschwindigkeit bei Vorhofflimmern, welche sich langsamer entwickelte als die Verkürzung der atrialen Refraktärzeit. Auch beim akuten induzierten Vorhofflimmern des Menschen (Daoud, 1996, Yu, 1998) konnte eine signifikante Verkürzung der atrialen Refraktärzeit beobachtet werden.

Die zunehmende Heterogenität der Refraktärzeiten in den Vorhöfen ist eine bedeutende Eigenschaft von Vorhofflimmern, da sie einen wichtigen Beitrag für die gesteigerte Vulnerabilität gegenüber Vorhofflimmern liefert (Fareh, 1998). Gaspo et al. (Gaspo, 1997) konnten zeigen, dass es mit zunehmender Dauer von Vorhofflimmern zu einer signifikanten Steigerung der Variabilität der Zykluslänge, einem Indexparameter der atrialen Refraktärzeit während Vorhofflimmern, kommt. Diese Veränderungen führen zu einer Verkürzung der Wellenlänge (dem Produkt aus atrialer Refraktärzeit und Leitungsgeschwindigkeit) der funktionellen Reentry-Kreise bei Vorhofflimmern, wodurch das gleichzeitige Auftreten mehrerer Reentry-Kreise im Vorhof und dadurch der Erhalt von Vorhofflimmern begünstigt werden (Gaspo, 1997, Rensma, 1988).

1.4.4 Zelluläre und molekulare Mechanismen des elektrischen

Remodeling bei Vorhofflimmern / atrialer Tachykardie

Die durch Vorhofflimmern hervorgerufenen Veränderungen der atrialen Elektrophysiologie beruhen wahrscheinlich auf einer Modulation der für das kardiale Aktionspotential verantwortlichen Ionenkanäle. Dieses elektrische Remodeling findet entweder auf der Ebene der Expression der Ionenkanäle oder durch Veränderungen der Eigenschaften der Ionenkanäle statt.

1.4.4.1 Veränderungen des L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Stromes (I_{Ca,L})

Den Veränderungen des transmembranösen Calciumstromes und der intrazellulären Calciumhomöostase kommt eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns zu. Modulationen des I_{Ca,L} wirken sich entscheidend auf die Aktionspotentialdauer und die Frequenzadaption der Repolarisation aus (Li, 1997). Eine verminderte Amplitude des L-Typ-Calciumstroms verkürzt die Plateauphase und damit auch die Gesamtdauer des Aktionspotentials. Auch die eingeschränkte Kontraktilität der Vorhöfe ist auf die verminderte Aktivität des L-Typ-Ca²⁺-Kanals zurückzuführen.

Eine von Yue et al. (Yue, 1997) durchgeführte Studie deutet auf die zentrale Rolle des L-Typ-Ca²⁺-Kanals im Remodelingprozess hin. Sie konnten zeigen, dass die bei Vorhofflimmern in den Zellen von schnell stimulierten Hunden auftretenden Veränderungen der Aktionspotentialdauer, Frequenzadaption und Morphologie, durch Blockade des L-Typ-Ca²⁺-Kanals mit Nifedipin imitiert werden können (Yue, 1997). Gleichzeitig führte die Gabe von BayK8644 (I_{Ca,L}-Agonist) zu einer Normalisierung der Aktionspotentialmorphologie. Nach 42 Tagen atrialer Stimulation trat eine progressive Reduktion von I_{Ca,L} um 70% auf, vermutlich bedingt durch eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts der Herzmuskelzellen (siehe Kapitel 1.4.5). Der Ca²⁺-unabhängige transiente K⁺-Auswärtsstrom (I_{to}) war im gleichen Ausmaß verringert, wohingegen alle anderen Ströme, inklusive des T-Typ-Ca²⁺-Stroms (I_{Ca,T}), der Delayed-Rectifier (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Kur,d})- und Inward-Rectifier (I_{K1})-Kaliumströme sowie des Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Stroms, nicht verändert waren.

In einer Folgestudie zeigte dieselbe Gruppe, dass bei Tieren mit schneller Vorhofstimulation der mRNA-Gehalt der α_{1c} -Untereinheit des L-Typ-Ca²⁺-Kanals und der von Kv4.3 vermindert waren, was sie auf eine transkriptionelle Herunterregulation der Kanal-Untereinheiten als Ursache der verminderten Stromdichten von I_{Ca,L} und I_{to}, schließen ließ (Yue, 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei diesen Tieren, neben der verminderten Proteinexpression des L-Typ-Ca²⁺-Kanals, auch die Anzahl der Dihydropyridinrezeptoren vermindert war. Letzteres deutet auf eine

Verminderung der Anzahl der funktionellen Kanäle in der Zellmembran hin (Gaspo, 1999).

Auch beim Menschen stellt der L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) eine wichtige Determinante der Aktionspotentialdauer und -frequenzadaptation dar (Li, 1997). In verschiedenen Studien bei Patienten mit Vorhofflimmern konnte eine Verminderung des $I_{\text{Ca,L}}$ um 60 - 75% gezeigt werden (Bosch, 1999, Van Wagoner, 1999, Workman, 2001). Ein Hauptmechanismus der verringerten Stromdichte scheint auch hier die transkriptionelle Verminderung der porenbildenden α_{1c} -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals zu sein (Brundel, 1999, Lai, 1999, Van Gelder, 1999).

Neben der porenbildenden α_{1c} -Untereinheit sind auch die β -Untereinheiten wichtig für die Regulation der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (siehe Kapitel 1.3.2.1.4). Diese sind sowohl für den Einbau des Kanalkomplexes in die Oberflächenmembran als auch für die Regulation der Kanaleigenschaften von großer Bedeutung (Birnbaumer, 1998, Singer, 1991, Kamp, 1996, Chien, 1995, Haase, 1993, Neely, 1993, Pragnell, 1994), so dass die Veränderung dieser Untereinheit auch ein Schlüsselmechanismus des elektrischen Remodeling bei Vorhofflimmern sein könnte (Grammer, 2001).

Als ein anderer möglicher Mechanismus für die geringere Stromamplitude bei Vorhofflimmern wird auch die veränderte Regulation der Kanäle durch Proteinkinasen und Phosphatasen diskutiert (siehe Kapitel 1.3.3.1).

Des Weiteren wird die sarkoplasmatische Calciumfreisetzung und -aufnahme und die intrazelluläre Calciumhomöostase durch eine Reihe modulierender Enzyme kontrolliert. Eine Veränderung dieser Proteine bei Vorhofflimmern erscheint daher naheliegend. Diese Vermutung veranlasste verschiedene Gruppen dazu, die Proteine, die die Calciumhomöostase beeinflussen, beim Menschen zu untersuchen (Van Gelder, 1999, Brundel, 1999, Lai, 1999, Ohkusa, 1999). Auch hier war die Reduktion der Proteinexpression des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals eine der Hauptentdeckungen. Doch zusätzlich konnten Brundel et al. eine verminderte mRNA- und Proteinexpression der Ca^{2+} -ATPase bei chronischem Vorhofflimmern des Menschen nachweisen. Die Expression von

Phospholamban, Ryanodin und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers war bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern hingegen identisch (Lai, 1999).

1.4.5 Zelluläre Veränderungen in den sehr frühen Phasen des atrialen Remodelings

Eine abrupte Erhöhung der Herzfrequenz, wie sie bei Vorhofflimmern auftritt, verursacht eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer und der atrialen Refraktärzeit. Die rasche Folge von Aktionspotentialen führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. (Sun, 2001). In einer anderen Studie stellten Goette et al. fest, dass Hunde, bei denen eine schnelle Vorhofstimulation für einige Stunden durchgeführt wurde, deutliche histologische Veränderungen zeigten, die für eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung sprechen (Goette, 1996).

Das Phänomen des Remodelings besteht vermutlich aus einer Reihe von Veränderungen, die unter anderem ausgelöst werden, um diese Ca^{2+} -Überladung zu verhindern und die Zellintegrität zu wahren. Da die Inaktivierung von $I_{\text{Ca,L}}$ mit zunehmender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration beschleunigt wird, kommt es wahrscheinlich aufgrund eines negativen Feedback-Mechanismus zu einer Verminderung des Calciumeinwärtsstroms (I_{Ca}) (Bosch, 1999, Van Wagoner, 1999). Diese Vorgänge begrenzen eine weitere Ca^{2+} -Überladung der Zelle. Somit beruhen die sehr frühen Veränderungen beim elektrischen Remodeling der Vorhöfe wahrscheinlich auf einer funktionellen oder regulatorischen Modulation der Ionenkanäle (Nattel, 2000).

Nach diesen sofort einsetzenden Veränderungen scheint es, als Folge der schnellen atrialen Tachykardie, auch zu einer transkriptionellen Herunterregulation der Ionenkanäle zu kommen. Erste Erkenntnisse über diese Adaptionsvorgänge in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodeling, lieferte die Gruppe von Bosch et al. (Bosch, 2003). Sie konnten in einem in-vivo-Modell schneller atrialer Stimulation beim Kaninchen zeigen, dass $I_{\text{Ca,L}}$ erstmalig nach 12 Stunden vermindert war. Veränderungen der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten wurden sogar noch früher beobachtet. Die porenbildende

α_{1c} -Untereinheit-mRNA war nach 12 Stunden verringert, während die β -Untereinheiten teilweise bereits nach 6 Stunden vermindert waren.

Die in den frühen Phasen einsetzende Reduktion von $I_{Ca,L}$ scheint von großer funktioneller Bedeutung zu sein, da sie - wie bereits erwähnt - eine Hauptursache für die Verkürzung und verminderte Frequenzadaption der atrialen Aktionspotentiale zu sein scheint (Yue, 1997). Innerhalb der ersten Tage schneller atrialer Stimulation werden die Veränderungen schließlich quantitativ vergleichbar mit denen, die bei chronischem Vorhofflimmern gemessen werden können (Yue, 1997, Lai, 1999, Brundel, 1999, Van Gelder). Somit stellen die frühen Phasen des elektrischen Remodeling ein interessantes Ziel für eine therapeutische Intervention dar, da die ausgelösten Veränderungen noch reversibel sind und somit der Teufelskreis der Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns durchbrochen werden kann.

1.5 Therapie und Prävention von Vorhofflimmern

1.5.1 Funktionelle Bedeutung und klinische Konsequenzen des elektrischen Remodelings

Eine bedeutende Eigenschaft des Vorhofflimmerns ist es, mit der Zeit persistierend zu werden: Wie in Kapitel 1.4.2 angesprochen, wird die Konversion zu Sinusrhythmus und dessen Aufrechterhaltung durch pharmakologische und elektrische Intervention mit der Dauer der Arrhythmie zunehmend schwieriger (Van Gelder, 1996). Es wurde schon in den 20er Jahren erkannt, dass es bei länger bestehendem Vorhofflimmern schwieriger ist, einen Patienten durch Chinidin in den Sinusrhythmus zu überführen oder diesen zu erhalten (Parkinson, 1929). Eine Reihe späterer Studien mit verschiedenen Antiarrhythmika, bestätigte diese Beobachtung (Crijns, 1988, Kochiadakis, 1998, Reisinger, 1998, Garratt, 1997). Auch die Erfolgsaussichten einer elektrischen Kardioversion scheinen von der Dauer des Vorhofflimmerns abzuhängen (Van Gelder, 1991). Aus diesen Gründen sollte bei geplanter Kardioversion diese so früh wie möglich angestrebt werden.

Die Prävention des durch Vorhofflimmern induzierten elektrischen Remodelings erscheint somit als Therapieansatz attraktiv, da hierdurch der Teufelskreis der Stabilisierung von Vorhofflimmern unterbrochen werden könnte.

Dies könnte zur Verhinderung einer Chronifizierung von paroxysmalem Vorhofflimmern und auch zur Verbesserung der Erfolgsrate bei Kardioversionen führen.

Neben einer Primärprävention durch optimale Behandlung epidemiologischer Risikofaktoren wie der Herzinsuffizienz oder der arteriellen Hypertonie stellen pharmakologische Maßnahmen zur Arrhythmieprophylaxe nach diagnostiziertem Vorhofflimmern einen interessanten Ansatz dar, mit dem die Entwicklung der Remodeling-Kaskade verhindern werden könnte.

1.5.2 Pharmakologische Therapie

Obwohl in den vergangenen Jahren eine Vielzahl nicht pharmakologischer Therapieansätze entwickelt worden ist (Ablation, Defibrillatoren, Schrittmacher, Operation) (Iqbal, 2005), ist die medikamentöse Therapie immer noch die Option erster Wahl für die Mehrzahl der betroffenen Patienten.

Sind die kausalen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft, können bei klinisch evidentem Vorhofflimmern Antiarrhythmika zum Einsatz kommen. Diese können entweder durch intravenöse oder orale Gabe einen Sinusrhythmus herbeiführen oder durch Beeinflussung der AV-Überleitung zumindest die Herzfrequenz senken, falls eine Konversion in den Sinusrhythmus nicht mehr möglich ist (Hennersdorf, 2001).

1.5.2.1 Einteilung der Antiarrhythmika

Antiarrhythmika werden klassischerweise, wie zuerst von Vaughan-Williams und Singh vorgeschlagen, nach ihrer vorherrschenden Wirkung auf Natrium-, Calcium- und Kaliumkanäle oder β -adrenerge Rezeptoren eingeteilt. Die neuere Sicilian-Gambit-Einteilung (Schwartz, 1992) berücksichtigt die Dissoziationsrate des Blockers vom Kanal bzw. die Geschwindigkeit der Erholung vom Block. Abbildung 6 vereinigt diese beiden Klassifikationen.

ANTIARRHYTHMIC DRUG ACTIONS

Vaughn-Williams Class	DRUG	CHANNELS			RECEPTORS			Clinical Effects				ECG Changes	
		Na	Ca	K	α	β	ACh	Ado	Pro-Arrthy	LV Fx	Heart Rate		Extra Cardiac
I	A Quinidine	○		●	○				●			○	
	Procainamide	○		○			○					●	
	Disopyramide (Norpace)	○		○			○					○	
	B Lidocaine (Xylocaine)	○										○	
	Mexiletine (Mexitil)	○										○	
	C Propafenone (Rythmol)	●					○				↓	○	
Flecainide (Tambocor)	●										○		
II	β adrenergic antagonists					●			○	↓		○	
III	Bretylum (Bretylol)			●	▲	▲			○		↓	○	
	Sotalol (Betapace)			●	○	○			●		↓	○	
	Amiodarone (Cordarone)	○	○	●	○	○	○		○		↓	●	
	foubilide (Corvert)	△		●					●			○	
IV	Verapamil (Calan, Isoptin)		●						○		↓	○	
	Diltiazem (Cardizem)		○						○	↓	↓	○	
Misc	Adenosine (Adenocard)								△		↓	○	

Antagonist
Relative potency

○ Low ○ Moderate ● High

△ = Agonist ▲ = Agonist/Antagonist

Abbildung 6: Modifizierte Sicilian-Gambit-Klassifikation der Antiarrhythmika (Schwartz, 1992), die auch die „traditionelle“ Vaughan-Williams Einteilung berücksichtigt. Die Natrium-Kanal Blocker sind, aufgrund unterschiedlicher Wirkungen auf den QRS-Komplex bzw. die QT-Zeit, in die Gruppen A, B und C unterteilt. Die Wirkorte (Natrium-, Kalium oder Calcium-Kanal, α -, β -adrenerger, cholinerg oder Adenosinrezeptor) der einzelnen Pharmaka sind in der obersten Zeile angegeben. Die nächste Spalte vergleicht die klinische Wirkung der Substanzen wie Proarrhythmogenität, Effekt auf den linken Ventrikel, Herzfrequenz oder extrakardiale Wirkungen. Rechts wird die Wirkung der Pharmaka auf das Oberflächen-EKG dargestellt, der jeweilige Wirkzeitpunkt ist unterstrichen. Die Wirkweise (Agonist/Antagonist) bzw. die relative antagonistische Potenz ist mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Die Anzahl und Richtung geben das Ausmaß der Wirkung an.

1.5.2.2 Antiarrhythmika zur Therapie des Vorhofflimmerns

Zur Therapie des Vorhofflimmerns werden Antiarrhythmika der Vaughan-Williams-Klasse Ia, Ic, II, III und IV verwendet (Hennersdorf, 2001). Diese Substanzen werden entweder zur Konversion in den Sinusrhythmus (Klasse Ic und III) oder zur Kontrolle der ventrikulären Frequenz bei weiter bestehendem Vorhofflimmern (Klassen II-IV, Digitalis, Betablocker) eingesetzt (Tamargo, 2004). Ebenso scheint die Gabe von ACE(Angiotensin-Converting-Enzym)-Hemmern und AngiotensinII-Blockern das atriale Remodeling beim Menschen günstig zu beeinflussen und somit ein Therapieansatz bei Vorhofflimmern darzustellen (Pedersen, 1999, Madrid, 2002), wobei Ergebnisse großer kontrollierter Studien noch ausstehen.

1.5.2.3 Ca^{2+} -Kanalblocker

Ca^{2+} -Kanalblocker beziehen sich auf strukturell verschiedene Familien synthetischer Moleküle, die spezifisch L-Typ- Ca^{2+} -Ströme inhibieren und damit den Ca^{2+} -Einstrom in glatter Muskulatur, Myokard und Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem blockieren. Die Hauptgruppen bestehen aus den Dihydropyridinen (Nifedipin), Phenylalkylaminen (Verapamil) und Benzothiazepinen (Diltiazem). Diese Moleküle binden direkt an unterschiedliche Orte der α_1 -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Ihr klinischer Gebrauch richtet sich nach ihrer Gewebsspezifität:

Nifedipin-Typ:	Wirkungsschwerpunkt: glatte Gefäßmuskulatur
Diltiazem-Typ:	Wirkung an glatter Gefäßmuskulatur, Myokard, Erregungsbildung und Erregungsleitung
Verapamil-Typ:	Wirkungsschwerpunkt: Myokard, Erregungsbildung und Erregungsleitung

Die Hemmung durch Phenylalkylamine wie Verapamil ist frequenzabhängig, was bedeutet, dass ihre Affinität für offene Kanäle höher ist als für geschlossene. Diese Medikamente werden spezifisch zur Behandlung von Rhythmusstörungen eingesetzt. Kennzeichnend für die Kreislaufwirkung der

Diphenylalkylamine ist eine relativ stärkere Wirkung auf die Calciumkanäle des Reizleitungssystems des Herzens mit der Tendenz, die Herzfrequenz zu reduzieren und die Überleitungszeit zu verlängern. Trotz einer peripheren Gefäßdilatation kommt es daher nicht wie bei anderen Ca^{2+} -Antagonisten zum reflektorischen Frequenzanstieg des Herzens. Eine negativ inotrope Komponente ist aber ebenfalls zu berücksichtigen. Aufgrund seiner Wirkung auf das Reizleitungssystem ist Verapamil Mittel der Wahl bei paroxysmalen supraventrikulären Tachykardien. Calciumantagonisten stellen auch eine wichtige Medikamentengruppe zur Behandlung von Hypertonie und Angina pectoris dar. Bei bestehendem Vorhofflimmern wird Verapamil (neben Betablockern) hauptsächlich zur Kontrolle der ventrikulären Frequenz eingesetzt. Jedoch scheint es keinen Effekt auf die Konversion von Vorhofflimmern oder auf den Erhalt von Sinusrhythmus zu haben (Rinkenberger, 1980, Waxman, 1981, Shenasa, 1988).

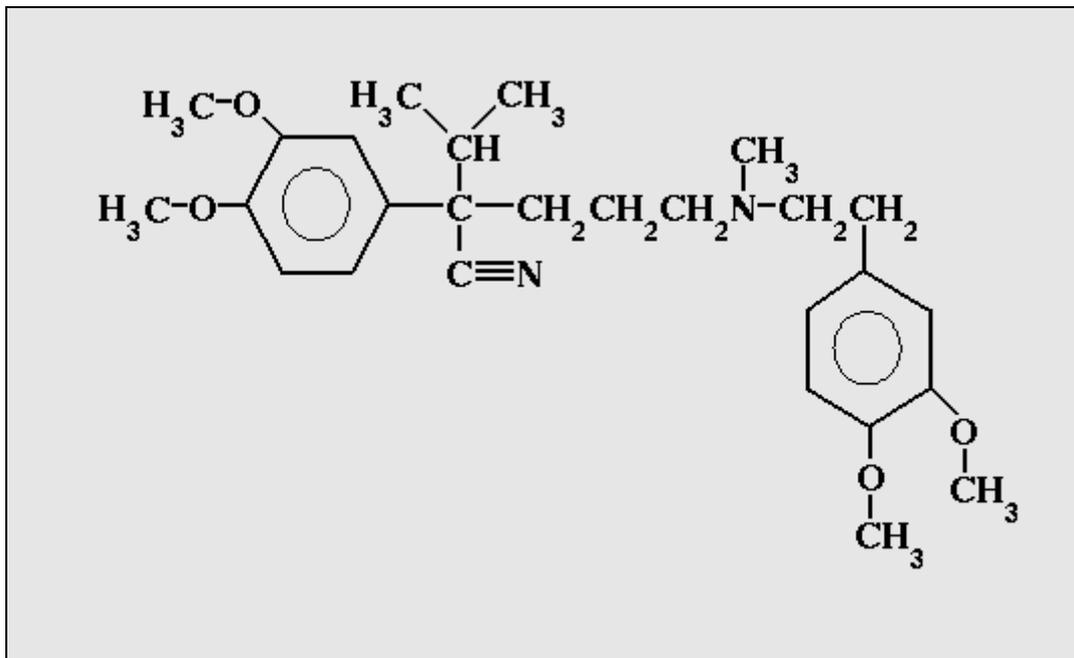


Abbildung 7: Chemische Struktur von Verapamil.

1.5.2.4 Einfluß des L-Typ-Ca²⁺-Kanalblockers Verapamil auf das atriale Remodeling

Der bei schneller atrialer Stimulation vergrößerte Ca²⁺-Einstrom, mit der daraus resultierenden Überladung der Zelle mit Ca²⁺ (Thandroyen, 1991), scheint ein zentraler Mechanismus des elektrischen Remodelings bei Vorhofflimmern zu sein (Goette, 1996). Es wurde gezeigt, dass ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einen negativen Feedback-Effekt auf die Aktivität der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle mit einer Verminderung der Plateauphase des Aktionspotentials hat (Lee, 1985).

Auf dieser Erkenntnis aufbauend konnte in verschiedenen experimentellen Modellen (Tieleman, 1997, Goette, 1996, Kinebuchi, 2004, Moriguchi, 2003, Kurita, 2002) und beim Menschen (Daoud, 1997, Yu, 1998) gezeigt werden, dass die bei Vorhofflimmern schon nach wenigen Minuten auftretenden Veränderungen der Refraktärzeit und der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern durch Vorbehandlung mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanalblocker Verapamil verringert werden können. Dies lässt darauf schließen, dass Verapamil das durch Vorhofflimmern induzierte Remodeling der Vorhöfe unter Umständen abschwächen könnte.

Bis heute gibt es jedoch keine Untersuchung über die Auswirkungen einer präventiven Gabe von Verapamil auf die Ca²⁺-Ströme und die L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Expression in den frühen Phasen des atrialen elektrischen Remodeling.

1.5.2.5 Probleme bei der Therapie mit Verapamil

Ein grundlegendes Problem bei der Therapie mit allen Antiarrhythmika ist, dass diese unter bestimmten Bedingungen selbst Herzrhythmusstörungen auslösen können. Ca²⁺-Kanalblocker können frühe Nachdepolarisationen und Torsade de Points induzieren (Wit, 1991). Patienten mit Defekten im Reizleitungssystem (AV-Überleitungsstörungen) sind von einer Therapie mit Verapamil auszuschließen. Ein weiterer Nachteil des Ca²⁺-Blockers Verapamil ist, dass er negativ chronotrop und inotrop wirkt, wodurch er bei Patienten mit Herzinsuffizienz nur mit großer Vorsicht angewendet werden kann. Eine weitere typische Nebenwirkung ist eine Gefäßerweiterung (Flush, Kopfschmerz).

1.6 Fragestellung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung im Erwachsenenalter. Trotz intensiver Forschung sind die Mechanismen, die Vorhofflimmern initiieren, aufrechterhalten und terminieren können, immer noch nicht ausreichend verstanden. Es ist bekannt, dass schon sehr kurze Phasen schneller atrialer Stimulation die elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe bedeutend verändern können. Einmal initiiert, kann Vorhofflimmern schließlich selbst zu elektrophysiologischen, mechanischen und strukturellen Veränderungen führen, die den Erhalt und das Wiederauftreten dieser Arrhythmie begünstigen können. Da gerade die frühen Veränderungen eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns zu spielen scheinen, sind sie als Ansatzpunkt einer möglichen therapeutischen Intervention von großem Interesse.

In verschiedenen Studien konnte in experimentellen Modellen und beim Menschen gezeigt werden, dass die bei Vorhofflimmern schon nach wenigen Minuten auftretenden Veränderungen der Refraktärzeit und der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern durch Vorbehandlung mit Verapamil verringert werden können. Bis heute gibt es jedoch keine Untersuchung über die Auswirkungen einer präventiven Gabe von Verapamil auf die Ca^{2+} -Ströme und die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalexpression in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer präventiven Verapamilgabe auf die Expression der Calcium-Kanaluntereinheiten α_{1c} und β_{2a} und auf die Phosphatasen PP1 α und PP2A α in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings beim Kaninchen zu untersuchen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Für die in der Arbeit beschriebenen Versuche wurden aus der Zucht genommene adulte weibliche Kaninchen der Rasse New Zealand Albino White (Charles River, Kisslegg, Deutschland) verwendet. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere betrug zu Beginn der Versuche zwischen 4 und 4,5 kg. Die Tiere wurden unter artgerechten Bedingungen in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Versuche erfolgten mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen und in Zusammenarbeit mit dem Tierschutzbeauftragten der Universität Tübingen. Sie erhielten Trinkwasser ad libitum und standardisiertes pelletiertes Trockenfutter ssniff K-H, 4mm (ssniff, Spezialdiäten GMBH, Soest, D).

2.2 Geräte

Elektrode	Flügelversion, bipolar, Spezialanfertigung VascoMed, Binzen, D
Schrittmacher	Logos, Biotronik, Berlin, D



Abbildung 8: Schrittmacher mit Elektrode.

Mikrotiterphotometer	Microplate Reader, Model Nr.680, Biorad, München, D
Elektrophorese-Kammer	Mini-Protean II Cell, Biorad, München, D
Blotkammer	Trans Blot Cell, Biorad, München, D
Densitometer	GS 800 Calibrated Densitometer, Biorad, München, D

Langendorff-Perfusionsapparatur

Bubble Trap	Radnofi, Monrovia, USA
Herzkammer	Schott, Mainz, D
Kühler	Brand, Wertheim, D
Thermostat	Haake DC30, Gebrüder Haake, Karlsruhe, D

2.3 Software

Quantity One	Quantity One, Quantitation Software, Biorad, München, D
Microplate manager	Microplate Manager, Version 5.2, Biorad, München, D

2.4 Sonstige Laborgeräte und Zubehör

Power Pac	Power Pac 300, Biorad, München, D
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, D

Minishaker	MS 1 Minishaker, IKA Works, Wilmington, USA
Magnetrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Kühlaggregat	Multi temp III, Gebrüder Haake, Karlsruhe, D
Centrifuge	Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenkassette	Hypercassette, Amersham, Little Chalfont, UK
Feinwaage	Typ KBBA100, Sartorius, Göttingen, D
pH-Meter	Migge & Glock, Leonberg, D
Röntgenfilm	Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, UK
Hybond-ECL	Nitrocellulosemembran, Amersham, Little Chalfont, UK
Whatmann-Filter	Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel, D
Frischhaltefolie	Papstar, Papstar, Kall, D
Nahtmaterial	Ethicon PermaHand Seide, Ethicon Mersilene 3-0, nicht resorbierbar, Johnson-Johnson , Brüssel, B

2.5 Medikamente

Verapamil HCl	Reinsubstanz, Knoll, Ludwigshafen, D
Xylazinhydrochlorid 2%	Rompun, Bayer, Leverkusen, D
Ketaminhydrochlorid 100mg/ml	Ketavet Pharmacia&Upjohn, Erlangen, D
Penicillin-Streptomycin-Kombination	Tardomyocel comp.III, Bayer Vital, Leverkusen, D

2.6 Antikörper

Primärantikörper

α_{1c} -Antikörper	Epitop: KQLEEDLKGYLWITQAE polyklonal aus Kaninchen, aufgereinigt über eine mit Immunisierungspeptid beladene Säule (Bosch, 2003)
β_{2a} -Antikörper	Epitop: KKRNEAGEWNRDVYIRQ polyklonal aus Kaninchen, aufgereinigt über eine mit Immunisierungspeptid beladene Säule (Christ, 2004)
GAPDH	Biotrend, Köln, D monoklonal aus Maus
PP2A Catalytic α	Katalognummer 610555 Transduction Biosciences, Pharmingen, D
PP1 α	Produktnummer P7607 Sigma, Saint Louis, USA

Sekundärantikörper

Anti-mouse IgG, HRP konjugiert	Sigma, Steinheim, D
Anti-rabbit IgG, HRP konjugiert	DAKO, Hamburg, D

2.7 Lösungen

2.7.1 Lösungen zur Probengewinnung

Calciumhaltige Tyrode-Lösung

- D(+)-Glucose 10 mmol/l
- NaCl 136 mmol/l
- KCl 5,4 mmol/l
- HEPES 5 mmol/l
- NaH₂PO₄ 0,33 mmol/l
- CaCl₂ 2,0 mmol/l

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Calciumfreie Tyrode-Lösung

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösung entspricht der calciumhaltigen Tyrodelösung mit Ausnahme des CaCl₂ [0 mmol/l].

2.7.2 Lösungen zur Proben-Aufbereitung

3x Probenauftragspuffer

- 1,75 ml 1 M Tris pH 6,8
- 1,5 ml Glycerin
- 5 ml [10%] SDS
- 1,75 ml Wasser dest.
- aliquotiert und bei -20°C gelagert

PMSF-Stammlösung (100 mmol/l)

- 174,2 mg PMSF gelöst in 10 ml Isopropanol

Lämmli-Puffer

- 330 µl 3x Probenauftragspuffer
- 655 µl Wasser dest.
- 5 µl Mercaptoethanol
- 10 µl PMSF-Stocklösung (100 mmol/l)

2.7.3 Lowry-Protein-Assay

Alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung

- 25 mg CuSO_4
- 44 mg NaK-Tartrat
- in 200 ml Wasser dest. lösen
- 5 g Na_2CO_3
- 2,5 ml 10M NaOH langsam zugeben
- auf 250 ml mit Wasser dest. auffüllen

2.7.4 Lösungen für die Elektrophorese

1,5M Tris-Puffer pH 8,8

- 45,4 g Tris
- 200 ml Wasser dest.
- mit conc. HCl auf pH 8,8 einstellen
- auf 250 ml mit Wasser dest. auffüllen

1M Tris-Puffer pH 6,8

- 12,21 g Tris
- 70 ml Wasser dest.
- mit conc. HCl auf pH 6,8 einstellen
- auf 100 ml mit Wasser dest. auffüllen

10% SDS-Lösung

- 25 g SDS
- 250 ml Wasser dest.

APS-Lösung

- 1g APS (Ammoniumperoxodisulfat)
- 10 ml Wasser dest.
- aliquotiert und bei -20°C gelagert

Laufpuffer 5x

- 15,1 g Tris Base
- 94 g Glycin
- 10 g SDS
- pH mit konzentrierter HCl auf 8,3 einstellen
- auf 1000 ml mit Wasser dest. auffüllen

Laufpuffer 1x

- 200 ml Laufpuffer 5x werden mit Wasser dest. auf 1000 ml aufgefüllt

2.7.5 Lösungen für Western BlottingBlot-Puffer (Towbin-Puffer) 10x

- 34,5 g Tris Base
- 160,68 g Glycin
- in 1000 ml Wasser dest. lösen

Blot-Puffer 1x (für 1000 ml)

- 70 ml Blot-Puffer (10 x) auf 700 ml mit Wasser dest. auffüllen
- 200 ml Methanol
- 10 ml 10% SDS
- auf 1000 ml mit Wasser dest. auffüllen

2.7.6 Lösungen zur Immunfärbung

TBS 10x

- 87,6 g NaCl
- 15,7 g Tris Base
- mit conc. HCl auf pH 7,5 einstellen
- auf 1000 ml mit Wasser dest. auffüllen

TBS-T

- 100 ml TBS (10x)
- auf 1000 ml mit Wasser dest. auffüllen
- 200 µl Triton X100

TBS für Antikörper

- 500 mg Rinderserum-Albumin (BSA)
- 2 ml NaN₃ 1% Lösung
- auf 50 ml mit TBS 1x aufgefüllt

Blotto 2% (Blocklösung für Proteine)

- 1 g Magermilch-Pulver
- 50 ml TBS 1x

2.7.7 Lösungen für die Coomassie-Färbung

Essigsäure 5%

- 475 ml Wasser dest.
- 25 ml Eisessig

Coomassie-Blue Lösung

- 225 ml Methanol
- 50 ml Eisessig
- 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 125 ml Wasser dest.

2.8 Chemikalien

Acrylamid 30%	Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, D
Blocklösung	RotiBlock, 10 x Konzentrat, Roth, Karlsruhe, D
Marker	Full Range Rainbow, 10000–250000 Dalton Amersham, Little Chalfont, UK
Rinderserumalbumin	Albumin Fraction 5, pH 7,0, AppliChem, Darmstadt, D
ECL-Reagenz 1	Detection Reagent 1, Amersham, Little Chalfont, UK
ECL-Reagenz 2	Detection Reagent 1, Amersham, Little Chalfont, UK
Magermilchpulver	Naturaflor, Töpfer, Dietmannsried, D

Alle übrigen, nicht aufgeführten Substanzen wurden in analysenreiner Qualität bei den Firmen Sigma, Steinheim, D, oder Merck, Darmstadt, D, bezogen.

3 Methoden

3.1 Implantation der Sonden

Die Kaninchen wurden mit Ketamin (75 mg/kg) und Xylazin (5.8 mg/kg) anästhesiert. Falls erforderlich, wurde eine höhere Dosis nachinjiziert. Unter Einhaltung steriler Techniken wurde eine maßgefertigte bipolare Sonde in die linke Vena jugularis eingeführt und in den rechten Vorhof vorgeschoben. Dieser Eingriff wurde unter röntgenologischer Durchleuchtung durchgeführt und kontrolliert. Eine zweite Sonde wurde über die rechte Vena jugularis in den Koronarsinus eingeführt und kam auf dem linken Vorhof zu liegen. Somit konnte man bipolare Ableitungen des linken Atriums während der Stimulation im rechten Vorhof erhalten. Bei idealer Lage nahm die Reizschwelle einen sehr kleinen Wert an und das Signal aus den Vorhöfen war um ein Vielfaches höher als das der Kammern. Nach Bestätigung der korrekten Lage der Elektroden wurden die Wunden vernäht und die Enden der Sonden extern belassen. Zur Verhinderung operationsbedingter Infektionen wurde den Kaninchen 0,5 ml Tardomyocel comp.III (siehe Kapitel 2.5) subkutan verabreicht. Die Kontrollgruppe (sham) wurde einer identischen Behandlung unterzogen, allerdings erfolgte hier keine atriale Stimulation.

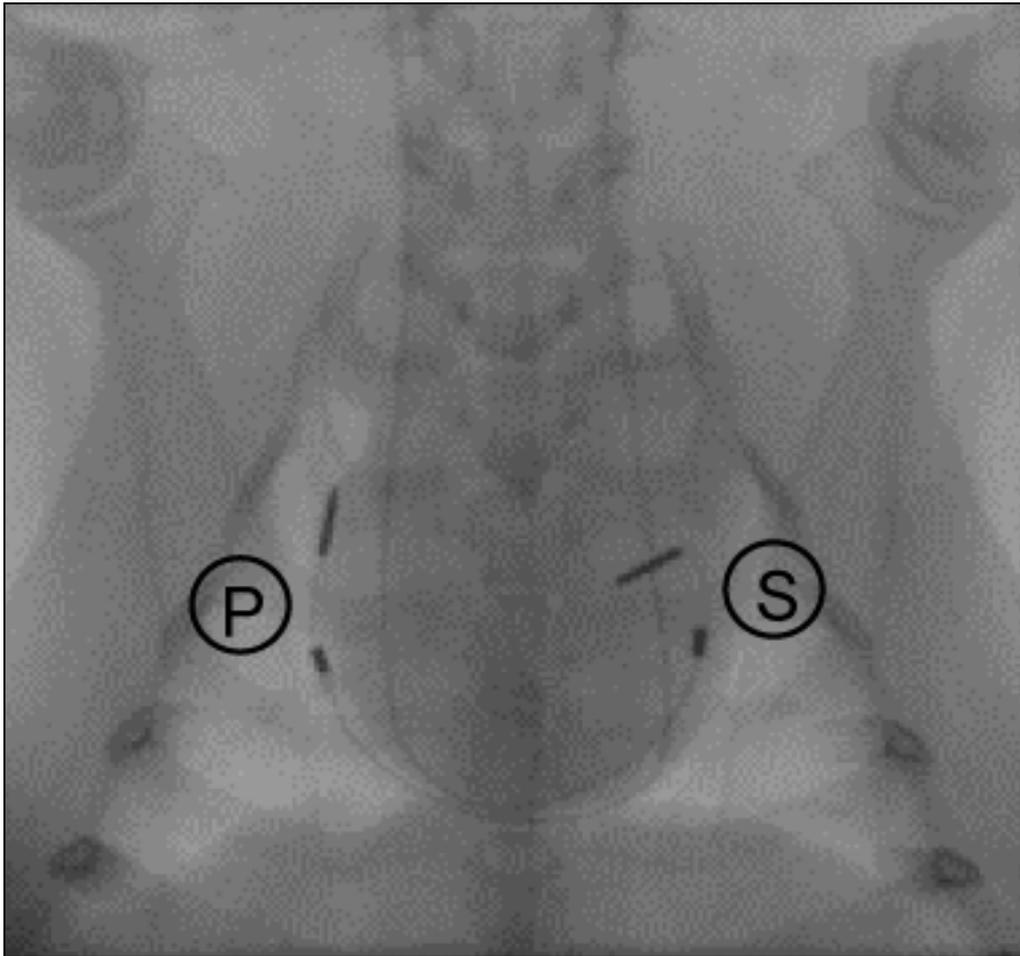


Abbildung 9: Kaninchenmodell schneller atrialer Stimulation. (A) Lage der stimulierenden (P) und der wahrnehmenden Elektrode (S).



Abbildung 10: Oberflächen-Elektrokardiogramm (I und aVL) und bipolares Elektrogramm des linken Vorhofs (LA) eines Kaninchens während schneller atrialer Stimulation mit 600 Schlägen/Minute. (Schreibgeschwindigkeit 100 mm/s).

3.2 Medikation der Kaninchen

Im Abstand von 12 Stunden (jeweils um 9.00 Uhr und 21.00 Uhr) wurde den Kaninchen an 7 aufeinanderfolgenden Tagen 30 mg Verapamil (7,5 mg/kg) in isotoner NaCl-Lösung subkutan verabreicht. Verglichen mit den therapeutischen Dosen beim Menschen waren die hier verabreichten Dosen somit stets suprathérapeutisch (Koike, 1979, Schutz, 1982).

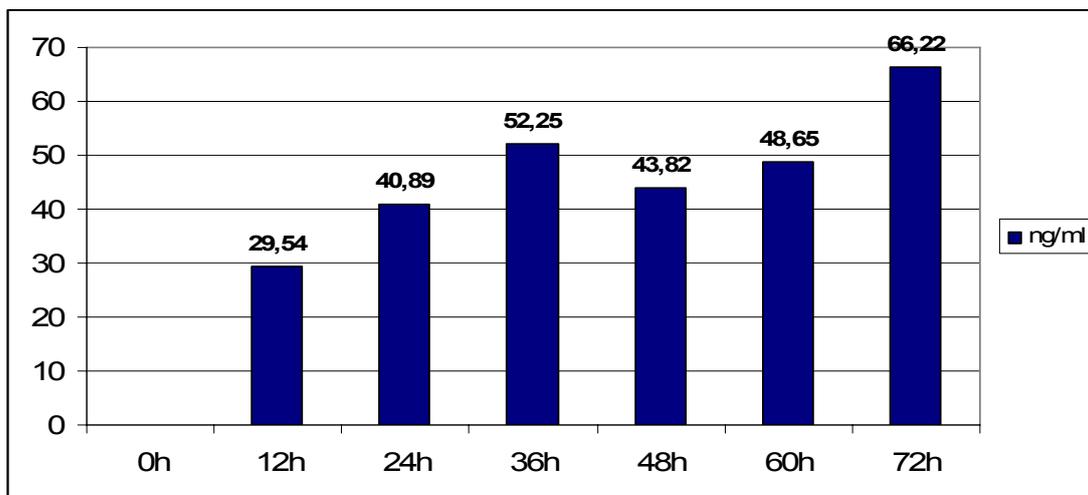


Abbildung 11: Serumspiegel von Verapamil in ng/ml gemessen in 12-stündigem Abstand bei einem Kaninchen aus der Gruppe „shamV“ (siehe Kapitel 3.4). Das Kaninchen erhielt eine Initialdosis von 30 mg Verapamil und in einem Abstand von 12 Stunden eine Erhaltungsdosis von jeweils 30 mg Verapamil.

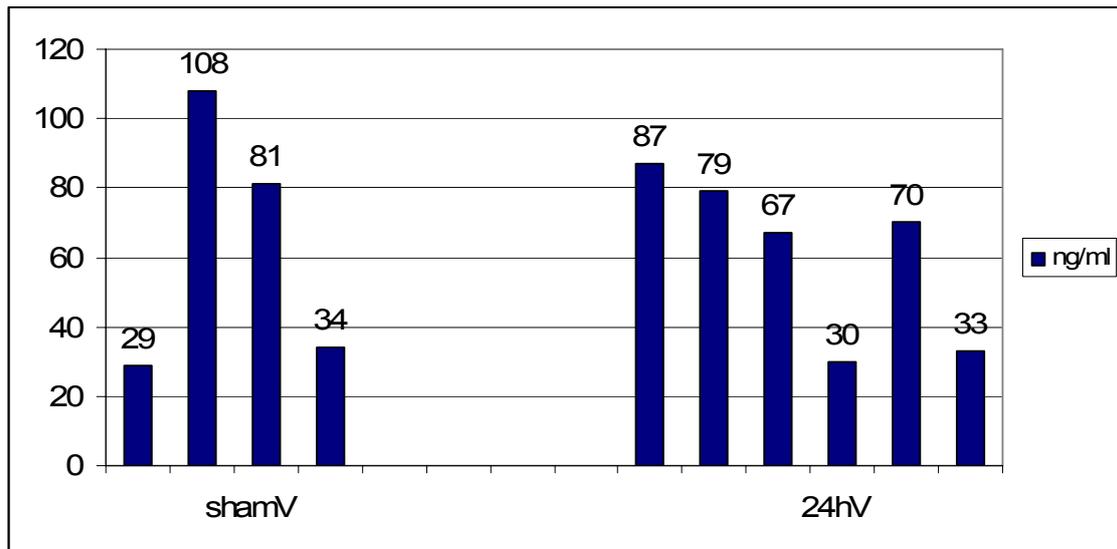


Abbildung 12: Serumspiegel von Verapamil in ng/ml gemessen bei 4 Kaninchen aus der Gruppe „shamV“ und 6 Kaninchen aus der Gruppe „24hV“ (siehe Kapitel 3.4) nach einer wiederholten Gabe von 30 mg Verapamil im Abstand von 12 Stunden an 7 aufeinanderfolgenden Tagen. Bei den Kaninchen der Gruppe „24hV“ erfolgte vor der Spiegelbestimmung eine 24-stündige schnelle atriale Stimulation.

3.3 Stimulation der Kaninchen

Nach Ablauf der 7 Tage wurde die Sonde mit dem Herzschrittmacher verbunden und der rechte Vorhof mit einer Frequenz von 600 Schlägen pro Minute (Amplitude 4 Volt, Pulsbreite 0,5 mV) stimuliert. Diese Stimulation wurde 24 Stunden aufrechterhalten. Zur Kontrolle der Sondenlage und Funktionsfähigkeit wurde vor und nach der Stimulation eine Messung der Reizschwellen durchgeführt.

3.4 Gruppeneinteilung

In der Arbeit wurden die Vorhöfe von insgesamt 24 Kaninchen untersucht. Im Vorfeld des Versuches erfolgte eine willkürliche Aufteilung der Kaninchen auf

die unten beschriebenen 4 Gruppen, die sich jeweils aus 6 Kaninchen zusammensetzten.

- Gruppe „sham“: Dieser Gruppe von Kaninchen wurden Sonden implantiert. Eine atriale Stimulation wurde jedoch nicht induziert.
- Gruppe: „24 h“: Bei Kaninchen dieser Gruppe wurde nach erfolgreicher Implantation der Sonden eine 24 Stunden andauernde atriale Tachykardie induziert.
- Gruppe: „shamV“: Diese Gruppe wurde wie die „sham“-Gruppe behandelt, wobei zusätzlich eine Gabe von Verapamil erfolgte.
- Gruppe: „24 hV“: Diese Gruppe wurde wie die „24h“-Gruppe behandelt, wobei zusätzlich eine Gabe von Verapamil erfolgte.

3.5 Ablauf der Präparation des rechten Atriums

Vor der Probenentnahme wurde mittels einer elektrophysiologischen Untersuchung die Qualität der Sondenlage überprüft (Reizschwelle, Lage, Refraktärzeit). Im Anschluss wurden die Tiere je nach Körpergewicht mit 20 - 25 ml Ketavet/Rompun (3:1) anästhesiert. Nach einem medianen Bauchschnitt und Öffnen des Thorax wurde das Herz rasch entnommen. Vorhandene Gewebereste wurden in einer mit Ca^{2+} -haltiger Tyrodelösung gefüllten Petrischale entfernt. Daraufhin wurde die Aorta ascendens freipräpariert, mit zwei Pinzetten gefasst und sofort über die Kanüle einer Langendorff-Apparatur gezogen. Der Aufbau der Apparatur orientierte sich an der von Langendorff 1895 entwickelten Methodik zur „Untersuchung am überlebenden Säugetierherzen“ (Langendorff, 1895). Das Prinzip besteht in einer retrograden Perfusion des isolierten Herzens unter konstanten Druckverhältnissen. Abbildung 13 zeigt schematisch die Anordnung dieser Langendorff-Apparatur.

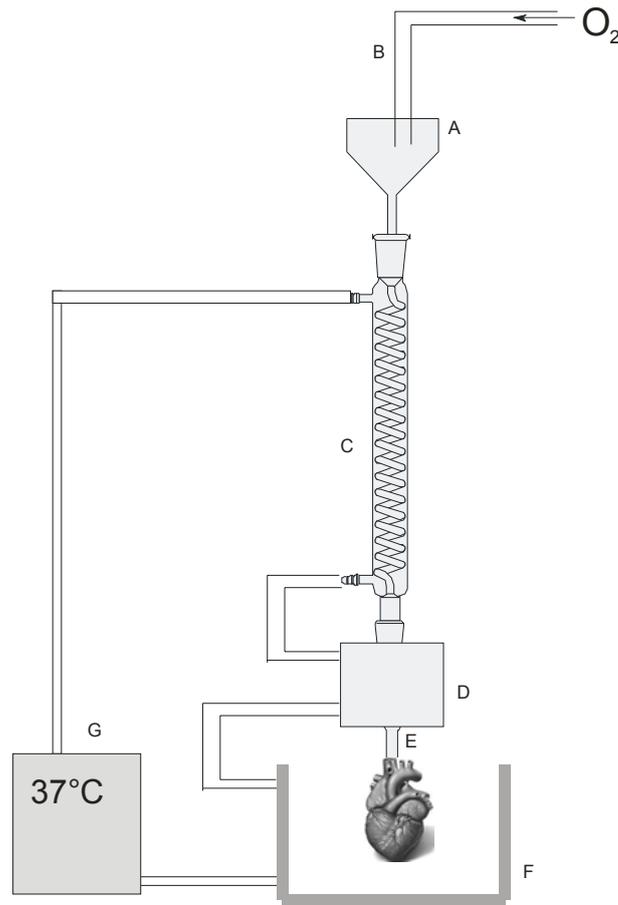


Abbildung 13: Schema der Langendorff-Apparatur zur Isolation von Herzmuskelzellen. Die Langendorffssäule wird an einem Stativ mit einer Höhe von ca. 100 cm befestigt, um einen konstanten Perfusionsdruck von 800-1000 mmH₂O (58-73 mmHg) auf das Herz zu erzeugen. Dies entspricht ungefähr der Höhe des mittleren arteriellen Blutdrucks des Versuchstieres. Die Perfusionslösung wird in das Vorratsgefäß (A) eingefüllt und über eine Schlauchverbindung (B) mit 100% O₂ begast. Über einen beheizbaren Schlangenkühler (C) gelangt die Lösung in das sogenannte „Luftblasenauffanggefäß“, Bubble Trap (D). Dadurch können Mikroembolien vermieden werden, falls sich Luftblasen in der Perfusionslösung befinden. Die Bubble Trap mündet in eine kurze Röhre, an deren Ende eine Kanüle angebracht ist. Das kanülierte Herz befindet sich in einer Wärmekammer (F), die das Perfusat aufnimmt. Das gesamte System wird über ein zirkulierendes Wasserbad (G) auf einer konstanten (Körper-)Temperatur von 36-37°C gehalten.

Mit einem Seidenfaden fixiert, konnte so der erste Perfusionsschritt des Herzens vollzogen werden. Dabei wurde das Herz nach Erwärmung der Apparatur fünf Minuten lang mit Tyrodelösung von Blutresten freigewaschen. Von der Aorta ausgehend durchströmte das Perfusat die Koronararterien und das myokardiale Kapillarnetz, um schließlich das Herz durch die Vena cava am rechten Vorhof zu verlassen. Dabei blieb eine deutliche Herzkontraktion erkennbar. In einem nächsten Schritt erfolgte eine 3-bis 5-minütige Phase der Perfusion mit Ca^{2+} -freier Tyrode, bis das Herz keine Eigenrhythmik mehr aufwies. Nach Abbinden des rechten Herzohres wurde dieses mit einer Schere abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff bei -70°C eingefroren.

3.6 Probenaufbereitung/Proteinisolation

In 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde 150 μl Lämmli-Puffer vorgelegt. Die gefrorenen Proben wurden in einer Reibeschale mit flüssigem Stickstoff zerstoßen und jeweils ein 20 - 50 mg großes Stück davon entnommen. Dieses Gewebestück wurde in flüssigem Stickstoff vorsichtig pulverisiert, in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt und mit einem Douncer 10 - 15 Sekunden homogenisiert. Die dem Douncer anhaftenden Reste wurden mit 150 μl Lämmli-Puffer abgespült. In abgekühltem Zustand wurde die Probe kurz am Vortexer geschüttelt und dann im Heizblock bei 95°C fünf Minuten erhitzt. Im Anschluss wurden sie wiederholt auf dem Vortexer geschüttelt und auf Eis abgekühlt. In einem letzten Schritt wurde die Probe für zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der so erhaltene Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Mit diesem Gewebehomogenisat wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

3.7 Proteinbestimmung nach Lowry

3.7.1 Prinzip

Der Proteinbestimmung nach Lowry liegt die Bildung von Biuret-Komplexen aus Cu^{2+} und Protein zugrunde. Die so entstandenen Komplexe können mit Folin-Reagenz reagieren, wodurch es zu einer Blauverfärbung der zuvor gelben Lösung kommt. Diese Verfärbung kann anschließend photometrisch gemessen werden. Die Extinktionszunahme ist dabei einem Anstieg der Proteinkonzentration proportional. Anhand einer parallel bestimmten Eichkurve kann die Proteinkonzentration anschließend abgelesen werden.

3.7.2 Durchführung

In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 6 μl der zu untersuchenden Proben mit 44 μl Wasser dest. verdünnt, in eine 48er-Mikro-Titer-Platte pipettiert, und nach und nach mit folgenden Reagenzien vermischt:

- 200 μl frisch angesetzte Kupfer-Tartrat-Lösung (für 15 Minuten stehen gelassen)
- 200 μl SDS 10%
- 20 μl Folin-Ciocalteau-Phenol (1:1 Verdünnung mit destilliertem Wasser) (für 30 Minuten stehen gelassen)

Je Einfachbestimmung wurden 2×200 μl in eine 96er-Mikro-Titer-Platte überführt und die Extinktion bei 490 nm gegen den Leerwert und einen Protein-Standard (BSA in Wasser dest.) vermessen. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Software „Microplate Manager“.

3.8 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.8.1 Prinzip

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) (Laemmli, 1970) ist ein einfaches und hochauflösendes Verfahren, um Proteine zu analysieren. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine solubilisiert, denaturiert und in eine negative Gesamtladung gebracht. Dies verleiht ihnen ein einheitliches Verhältnis von Masse zu Ladung. Durch Zugabe reduzierender Substanzen (z.B. β -Mercaptoethanol) werden sie zudem vollständig entfaltet und vorhandene Cystin-Brücken getrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einer Gelmatrix aus Acrylamidpolymeren, die über N'N'-Methylen-Bisacrylamid quervernetzt sind. Die Durchlässigkeit der Matrix ist abhängig von der Konzentration der Polyacrylamid-Monomere und dem Grad der Quervernetzung, d.h. der Konzentration der bifunktionellen Gruppen. Dadurch können physikalische Effekte, wie Konvektion und Diffusion, umgangen werden. Die Polymerisation erfolgt durch eine Radikalkettenreaktion, die mit dem Zerfall von APS in Radikale gestartet wird, welche daraufhin TEMED aktivieren.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem eigentlichen Trenngel noch ein Sammelgel von ca. 1/10 Länge der Trenngelstrecke vorgeschaltet, dessen pH-Wert um zwei Einheiten tiefer liegt als der des Trenngels. Dies führt zu einer Verdichtung der Proteinprobe vor dem Eintritt in das Trenngel und somit zu einer schärferen Trennung der jeweiligen Proteinbanden.

3.8.2 Durchführung

Die Glasplatten, Spacer und Kämmen wurden mit 80% Ethanol und fusselfreien Tüchern gründlich gereinigt und abgetrocknet. Dann wurde die Gelkammer zusammengesetzt und im Gieß-Stand fixiert. Das nach unten beschriebenen Schema angefertigte Trenngel wurde dann im flüssigen Zustand blasenfrei zwischen zwei abgedichtete, durch „Spacer“ getrennte Glasplatten gegossen. Die Acrylamidkonzentration der Gele betrug 8%.

Trenngel 15 ml 8%

- H₂O 7,0 ml
- 30% Acrylamid 4,0 ml
- 1,5 M Tris (pH 8,8) 3,8 ml
- 10% SDS 0,15 ml
- 10% APS 0,15 ml
- TEMED 0,009 ml

Das Gel wurde mit 400 µl Isopropanol überschichtet, um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Isopropanol mit dest. Wasser vom Trenngel gewaschen und die restlichen Wassertropfen mit einem Stück Whatman-Filterpapier entfernt. Das Sammelgel wurde nach untenstehender Anleitung gegossen und luftblasenfrei in die Kammer überführt.

Sammelgel 5ml

- H₂O 3,4 ml
- 30% Acrylamid 0,83 ml
- 1,5 M Tris (pH 6,8) 0,63 ml
- 10% SDS 0,05 ml
- 10% APS 0,05 ml
- TEMED 0,005 ml

In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt, um geeignete Taschen zum Auftragen der Proben zu erhalten. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde zusammengebaut und mit Laufpuffer befüllt.

Die Proben (60 µg Protein) wurden mit mindestens 50% ihres Volumens mit 3× Probenauftragspuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden sie auf Eis wieder abgekühlt und 10 Sekunden bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nun konnten die Proben auf das Gel geladen, die Kammer

verschlossen und die Elektrophorese bei 120 V gestartet werden. Die Laufzeit betrug in der Regel 90 Minuten und wurde beendet, wenn die Metylenblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Um die entstandenen Banden ihrer Masse zuordnen zu können, lief ein Full Range Rainbow Marker mit (siehe Kapitel 2.8).

3.9 Western-Blotting

3.9.1 Prinzip

Durch das Western-Blot-Verfahren (Towbin, 1979, Burnette, 1981) werden die Proteine, durch Anlegen eines elektrischen Feldes, aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Da die Proteine auf dieser Membran dann immobilisiert vorliegen, sind sie für weitere Analysen ohne den störenden Einfluss der Gelmatrix zugänglich. In diesem Versuch wurde das Verfahren des „wet“- bzw. „tank“-Blottings“ angewendet. Hierbei werden Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran mit Blotpuffer getränkt und in einer Blotapparatur so geschichtet, dass die Proteine aus dem Gel zur Anode wandern und dabei auf der Membran haften bleiben. Die Wanderung zur Anode kommt durch SDS zustande, das nach der Gelelektrophorese noch an die Proteine gebunden ist, und ihnen so eine negative Ladung verleiht.

3.9.2 Durchführung

Um das SDS-Gel zu blotten, wurden sechs Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Filter, Schwammplatten und Membran wurden dann in Blotpuffer eingeweicht. Das im Puffer enthaltene Methanol diente dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Das Blot-Sandwich wurde luftblasenfrei zusammengesetzt und der Proteintransfer mit 200 mA für 18 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 8°C vollzogen. Danach wurde die Membran mit den darauf befindlichen Proteinen einer Immunfärbung unterzogen (siehe Kapitel 3.11).

3.10 Coomassiefärbung

3.10.1 Prinzip

Durch den Coomassie-Färbetest wurde überprüft, ob die Proteine vom Gel vollständig auf die Nitrozellulosemembran übertragen werden konnten. Bei der Substanz Coomassie-Brilliant-Blau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, mit dem Proteine direkt im Gel sichtbar gemacht werden können. Dieser Farbstoff lagert sich an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine an.

3.10.2 Durchführung

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde das Gel für zehn Minuten in Coomassielösung (R250) gelegt und leicht geschüttelt. Dabei wurden die Proteine fixiert und angefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Gel durch mehrfaches Wechseln der Schnellentfärbelösung von überschüssigem Farbstoff befreit, so dass nur noch gefärbte Proteinbanden zu sehen waren. Dann wurde die Entfärbungsreaktion mit 5% v/v Essigsäure gestoppt. Bei erfolgreichem Transfer auf die Membran waren die Gele nicht angefärbt.

3.11 Immunfärbung

3.11.1 Prinzip

Hierbei können einzelne Proteine eines Proteingemisches mittels spezifischer Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden. Dafür wird zunächst ein Primärantikörper an das entsprechende Protein gebunden, an den dann wiederum ein Zweitantikörper bindet. Da an den Zweitantikörper das Enzym Meerettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann durch anschließende Zugabe eines geeigneten Substrates eine Emission von Licht an der Stelle, an der sich das Protein auf der Membran befindet, hervorgerufen werden.

3.11.2 Durchführung

Nach dem Proteintransfer auf die Membran (Kapitel 3.9) wurde diese 60 Minuten lang bei Raumtemperatur in Block-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper in einer geeigneten Verdünnung in TBS für Antikörper angesetzt und die Membran damit 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Erstantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Der geeignete Zweitantikörper wurde in 2% Blotto (Blocklösung für Proteine) verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Danach wurde nochmals 60 Minuten mit TBS-T gewaschen.

3.12 ECL-Detektion

3.12.1 Prinzip

Um die spezifischen immobilisierten Antigene sichtbar zu machen, wurden in einem zweiten Schritt Sekundärantikörper daran gebunden. Da diese mit Meerrettich-Peroxidase ausgestattet sind, können sie unter Zugabe eines geeigneten Substrats Licht emittieren.

3.12.2 Durchführung

Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen gemischt und für eine Minute auf die gefärbte Blotmembran gegeben. Dann wurden die Membranen in Frischhaltefolie luftblasenfrei eingeschlagen, in einer Röntgenkassette fixiert und die Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert. Dies wurde bei verschiedenen Belichtungszeiten (zwischen fünf Sekunden und fünf Minuten) mehrfach wiederholt. Das Ergebnis wurde unter Zuhilfenahme der Software Quantity One ausgewertet.

Als interner Standard, mit Hilfe dessen eine spätere Quantifizierung der Expression der L-Typ-Ca²⁺-Kanaluntereinheiten und der Phosphatasen möglich wurde, wurde die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem sogenannten „Housekeeping-gene“, genommen. Dabei geht

man davon aus, dass das Niveau der Expression dieses „Housekeeping-gene“ in den Gewebeproben die man vergleichen möchte nicht variiert.

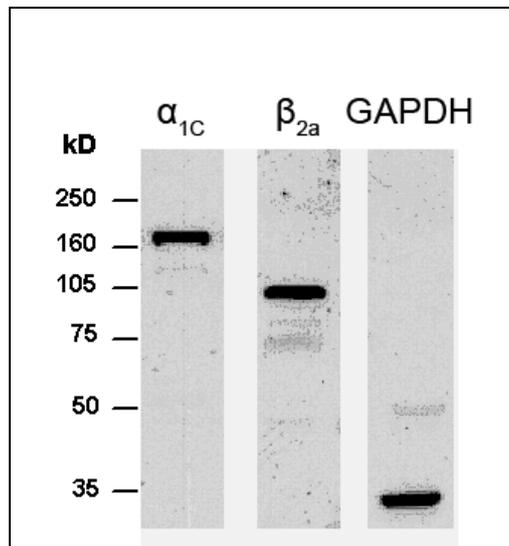


Abbildung 14: Spezifische Banden der untersuchten Proteine (kD = kiloDalton).

3.13 Datenauswertung und Statistik

Die Probenbestimmungen wurden jeweils dreimal wiederholt. Von diesen drei Bestimmungen wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (sem) berechnet. Die verschiedenen Gruppen wurden untereinander mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen. Ein Wert wurde als statistisch signifikant gesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 war.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten

4.1.1 Veränderte Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten nach Stimulation ohne Gabe von Verapamil

In Abbildung 15 sind die Unterschiede in der Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten α_{1c} und β_{2a} zwischen den Gruppen sham und 24h graphisch dargestellt. Diese Versuchsreihe wurde in unserer Arbeitsgruppe (Bosch, 2003) schon einmal durchgeführt und hier in dieser Arbeit anhand vergleichbarer Proben reproduziert.

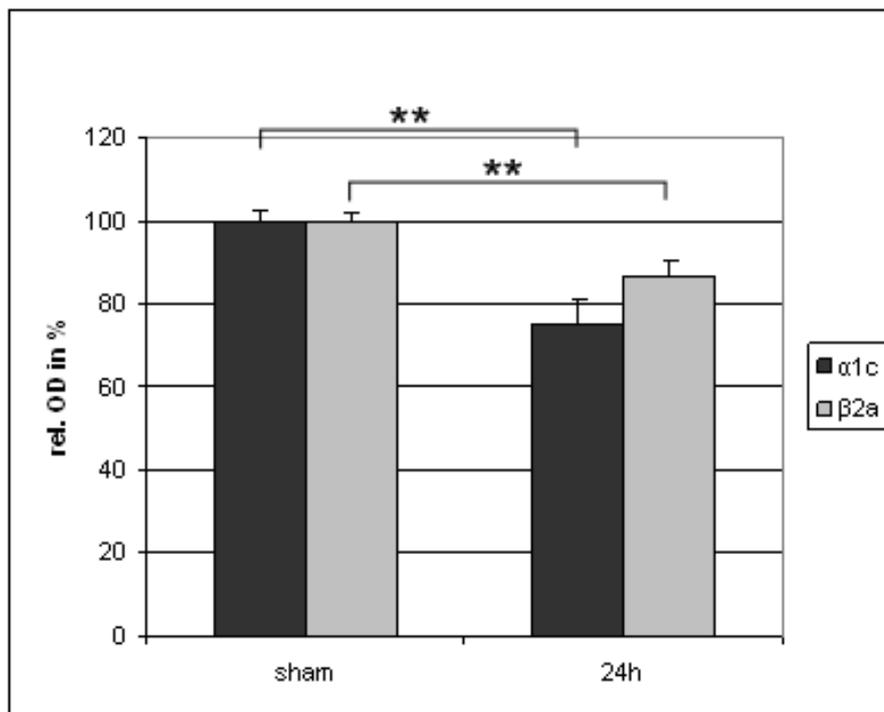


Abbildung 15: Protein-Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Auf der Ordinate die relative OD, d.h. die absolute, gemessene OD der Bande bezogen auf die OD des Housekeeping-Proteins GAPDH (siehe Kapitel 3.12.2). Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot-Verfahren. (**p-Wert < 0,05)

Zum einen kommt es nach 24 Stunden schneller atrialer Stimulation zu einer deutlichen Verminderung der Expression der α_{1c} -Untereinheiten. Die Werte sinken signifikant ($p= 0,004$) um 24,7% auf 75,3% der Werte der sham-Gruppe. Zum anderen scheint sich die induzierte atriale Tachykardie auch auf die Expression der β -Untereinheiten auszuwirken. Hier sinken die Werte um 13,3% auf 86,7% der Werte der sham-Gruppe ($p= 0,009$).

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Veränderung der Proteinexpression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals in Prozent [%] und der jeweilige Standardfehler (sem).

	sham [%]	sem sham [%]	24h [%]	sem 24h [%]
α_{1c}	100	2,66	75,3	6,21
β_{2a}	100	1,88	86,7	3,69

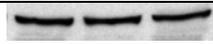
	sham	24h
α_{1c}		
β_{2a}		
GAPDH		

Abbildung 16: Ausgewählte Blotbeispiele der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals sowie von GAPDH für die Gruppen sham und 24h.

4.1.2 Veränderte Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten nach Stimulation und Gabe von Verapamil

In Abbildung 17 sind die Unterschiede in der Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten α_{1c} und β_{2a} zwischen den Gruppen shamV und 24hV graphisch dargestellt. Die Gabe von Verapamil führte zu erheblichen Abweichungen von den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Veränderungen: Sowohl bei der Expression der α_{1c} ($p = 0,594$) – als auch der β_{2a} ($p = 0,838$)-Untereinheiten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

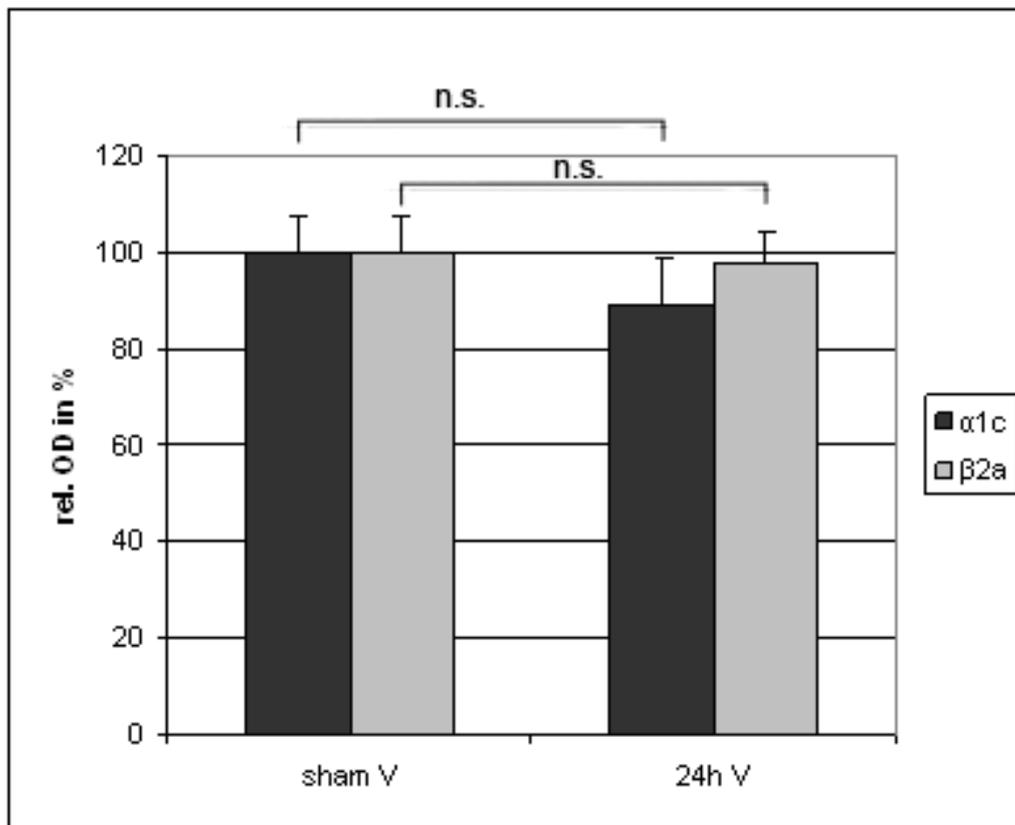


Abbildung 17: Protein-Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Auf der Ordinate die relative OD, d.h. die absolute gemessene OD der Bande bezogen auf die OD des Housekeeping-Proteins GAPDH (siehe Kapitel 3.12.2). Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot-Verfahren. (n.s. = nicht signifikant).

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Veränderung der Proteinexpression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals in Prozent [%] und der jeweilige Standardfehler (sem).

	shamV [%]	sem shamV [%]	24hV [%]	sem 24hV [%]
α_{1c}	100	7,57	89,4	9,61
β_{2a}	100	7,36	98	6,21

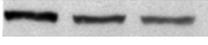
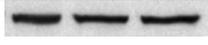
	shamV	24hV
α_{1c}		
β_{2a}		
GAPDH		

Abbildung 18: Ausgewählte Blotbeispiele der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals sowie von GAPDH für die Gruppen shamV und 24hV.

4.2 Expression von PP1 α und PP2A α

4.2.1 Veränderte Expression von PP1 α und PP2A α nach Stimulation ohne Gabe von Verapamil

In Abbildung 19 sind die Unterschiede in der Expression der Phosphatasen PP1 α und PP2A α zwischen den Gruppen sham und 24h graphisch dargestellt. Die schnelle atriale Stimulation führte zu einem Anstieg der Expression von PP1 α um 32,4% ($p = 0,031$) verglichen mit den Werten der sham-Gruppe.

Bei der Expression von PP2A α kam es nach schneller atrialer Stimulation zu keiner signifikanten Veränderung ($p = 0,901$).

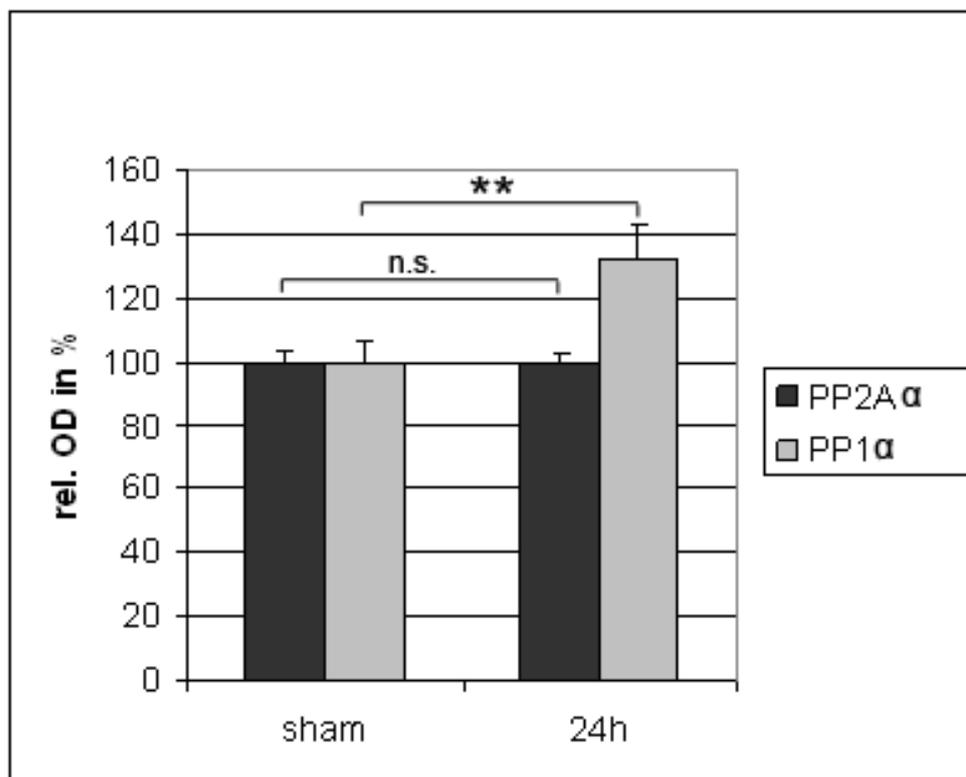


Abbildung 19: Protein-Expression der Phosphatasen PP2A α und PP1 α .

Auf der Ordinate die relative OD, d.h. die absolute gemessene OD der Bande bezogen auf die OD des Housekeeping-Proteins GAPDH (siehe Kapitel 3.12.2). Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot-Verfahren. (n.s. = nicht signifikant; ** p -Wert < 0,05).

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Veränderung der Proteinexpression der Phosphatasen PP1 α und PP2A α in Prozent [%] und der jeweilige Standardfehler (sem).

	sham [%]	sem sham [%]	24h [%]	sem 24h [%]
PP2A α	100	3,82	99,4	3,33
PP1 α	100	6,56	132,4	10,54

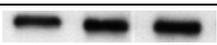
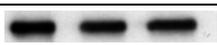
	sham	24h
PP1 α		
GAPDH PP1 α		
PP2A α		
GAPDH PP2A α		

Abbildung 20: Ausgewählte Blotbeispiele der Phosphatasen PP1 α und PP2A α , sowie von GAPDH für die Gruppen sham und 24h.

4.2.2 Veränderte Expression von PP1 α und PP2A α nach Stimulation und Gabe von Verapamil

In Abbildung 20 sind die Unterschiede in der Expression der Phosphatasen PP1 α und PP2A α zwischen den Gruppen shamV und 24hV graphisch dargestellt. Unter Verapamilgabe blieb der in Kapitel 4.2.1 beschriebene Anstieg der Expression von PP1 α nach atrialer Stimulation aus und es kam zu keiner signifikanten Veränderung ($p= 0,50$). Allerdings zeigte sich hier ein Unterschied in der Expression von PP2A α zwischen den Gruppen shamV und 24hV. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Expression um 15,6% ($p= 0,033$) gemessen werden.

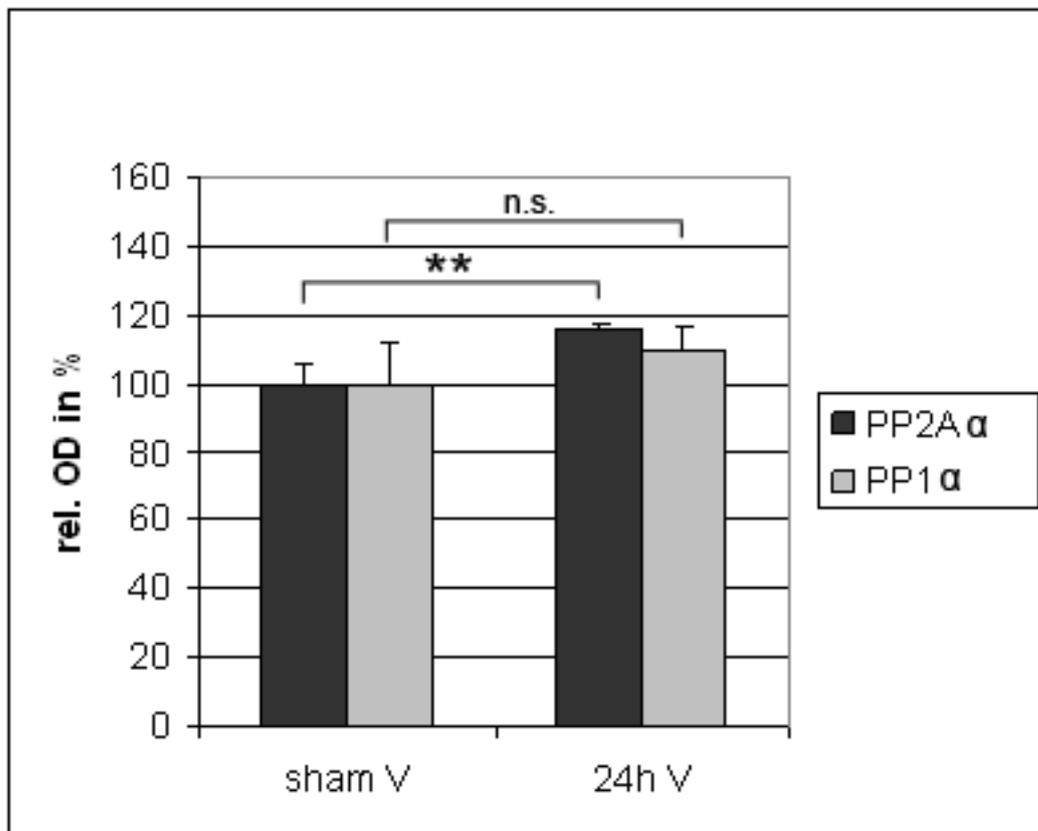


Abbildung 21: Protein-Expression der Phosphatasen PP2A α und PP1 α . Auf der Ordinate die relative OD, d.h. die absolute gemessene OD der Bande bezogen auf die OD des Housekeeping-Proteins GAPDH (siehe Kapitel 3.12.2). Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot-Verfahren. (n.s. = nicht signifikant; **p-Wert < 0,05).

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Veränderung der Proteinexpression der Phosphatasen PP1 α und PP2A α in Prozent [%] und der jeweilige Standardfehler (sem).

	shamV [%]	sem shamV [%]	24hV [%]	sem 24hV [%]
PP2A α	100	6,07	115,6	1,75
PP1 α	100	12,35	109,9	6,83

	shamV	24 hV
PP1 α		
GAPDH PP1 α		
PP2A α		
GAPDH PP2A α		

Abbildung 22: Ausgewählte Blotbeispiele der Phosphatasen PP1 α und PP2A α , sowie von GAPDH für die Gruppen shamV und 24hV.

5 Diskussion

5.1 Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen

Daten, die aus Tiermodellen erhoben werden, sind sehr wichtig, da sie eine Beschränkung auf die spezifischen Umstände, die von Interesse sind, zulassen. Dennoch kann eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen nicht ohne weiteres erfolgen. Trotz der Tatsache, dass die in den Tiermodellen gemessenen Vorgänge weitgehend den bei Menschen gefundenen entsprechen, bleibt es offensichtlich, dass experimentelle Modelle nicht in jeder Hinsicht die komplexe Pathophysiologie dieser Arrhythmie, wie sie im klinischen Alltag anzutreffen ist, widerspiegeln kann. Humanes Gewebe ist für gewöhnlich nur von kranken Herzen verfügbar, bei denen das Alter, die zugrunde liegenden Herzkrankheiten oder die begleitende Medikation einen zusätzlichen Einfluß haben können, so dass die pathophysiologischen Prozesse, die humanes Vorhofflimmern begleiten, von den entsprechenden Tiermodellen abweichen können.

5.2 Expression der L-Typ-Ca²⁺-Kanaluntereinheiten in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings

5.2.1 Verminderte Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Untereinheiten als Ursache für den verminderten $I_{Ca,L}$ bei Vorhofflimmern

In den in unserer Arbeitsgruppe bisher durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es nach 24 Stunden schneller atrialer Stimulation im in-vivo-Modell des Kaninchens zu einer verminderten Expression der atrialen α_{1c} - und β_{2a} -Ca²⁺-Kanaluntereinheiten kommt. Diese verminderte Expression der Ca²⁺-Kanaluntereinheiten, die schon in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings einsetzt, ist sehr wahrscheinlich eine der Ursachen für die Veränderungen des L-Typ-Ca²⁺-Kanalstroms $I_{Ca,L}$ bei Vorhofflimmern. Parallel zu den Proteinbestimmungen dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe die Veränderungen des L-Typ-Ca²⁺-Stroms in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings im Kaninchenmodell untersucht (Bosch, 2003). Mittels patch-clamp-Technik konnte bei der 24h-Gruppe eine Verminderung von $I_{Ca,L}$ um 48% ($p < 0,001$) gemessen werden.

Da sich der L-Typ-Calciumstrom der ganzen Zelle aus der Anzahl der funktionellen Kanäle (N), der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle (P_o) und dem Strom durch einen einzelnen Kanal (i) zusammensetzt ($I_{Ca,L} = N \times P_o \times i$), beruht die Reduktion von $I_{Ca,L}$ entweder auf einer Verminderung der Anzahl der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle oder auf einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften der vorhandenen L-Typ-Ca²⁺-Kanäle.

Die in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verminderte Expression der Ca²⁺-Kanaluntereinheiten die Anzahl der funktionellen Kanäle verringert, und somit einen Beitrag zu der Verminderung des $I_{Ca,L}$ liefert.

5.2.2 Vergleich mit anderen Studien

Die in dieser Arbeit gemessenen Veränderungen der Proteinexpression der Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten sind gut vergleichbar mit den 2003 gemachten Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe (Bosch, 2003): Eine signifikante Reduktion der α_{1C} -mRNA-Expression konnte nach 24 Stunden festgestellt werden. Dies ging mit einer Verminderung der Stromdichte von $I_{\text{Ca,L}}$ einher. Die Reduktion der mRNA-Expression der Ca^{2+} -Kanal- β -Untereinheiten ging der Verminderung der Ionenströme und der α_1 -Untereinheiten voraus. Letzteres deutet darauf hin, dass auch der reduzierten Transkription dieser Hilfsuntereinheiten eine bedeutende Rolle bei der Verminderung der Anzahl der funktionellen Kanäle in der Zellmembran zukommt.

Auch in verschiedenen Studien des chronischen Vorhofflimmern beim Menschen geht die Reduktion des mRNA- und Proteinniveaus der Ca^{2+} - α_{1C} -Untereinheiten mit einer Reduktion von $I_{\text{Ca,L}}$ einher. Über Veränderungen der anderen Untereinheiten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals gibt es nur sehr wenige Untersuchungen, aber die Ergebnisse einer Studie von Grammer et al. (Grammer, 2001) lassen - in Analogie zum Kaninchenmodell - vermuten, dass die verminderte Expression der β -Untereinheiten ein wichtiger Mechanismus für die Reduktion der funktionellen Kanäle in der Zellmembran ist.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse verschiedener Studien über die Veränderungen des $I_{\text{Ca,L}}$ und der mRNA- und Proteinexpression der α_{1C} -Untereinheit beim chronischen Vorhofflimmern des Menschen zusammengefasst.

Tabelle 5: Expression der Kanaluntereinheit α_{1c} und Aktivität des L-Typ- Ca^{2+} -Stroms ($I_{\text{Ca,L}}$) bei chronischem humanen Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus (n.b. = nicht bestimmt, \leftrightarrow = keine signifikante Veränderung).

Referenzen	$I_{\text{Ca,L}}$	α_{1c} -Untereinheit	
		mRNA	Protein
Bosch et al., 1999	-70%	n.b.	n.b.
Lai et al., 1999	n.b.	- 60%	n.b.
Van Gelder et al., 1999	n.b.	- 49%	n.b.
Brundel et al., 1999	n.b.	- 57%	- 43%
Van Wagoner et al., 1999	- 63%	n.b.	n.b.
Schotten et al., 2000	n.b.	n.b.	\leftrightarrow
Grammer et al., 2001	n.b.	\leftrightarrow	n.b.
Workman et al., 2001	- 65%	n.b.	n.b.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, stehen die in dieser und anderen Studien gemessenen Veränderungen in Konflikt mit den Ergebnissen der Studien von Schotten et al. und Grammer et al. (Schotten, 2003, Grammer, 2001), in denen keine Änderung der mRNA- und Proteinspiegel der α_{1c} - und auch β_{2a} - Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern gemessen werden konnte. Diese Unterschiede in den Ergebnissen können auf eine ganze Reihe von Umständen zurückführbar sein:

Zum einen sind sie vermutlich auf die unterschiedliche Dauer des Vorhofflimmerns zurückführbar. In der vorliegenden Arbeit sind die Veränderungen in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings untersucht worden, wohingegen Schotten et al. die Veränderungen in einem Modell chronischen Vorhofflimmerns untersuchten.

Zum anderen können die widersprüchlichen Ergebnisse auf die Unterschiede des untersuchten Gewebes zurückführbar sein, da die Expression der Ionenkanaluntereinheiten und -pumpen eine hohe interspezifische Variabilität

aufweist (Femini, 1992, Wang, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sich Veränderungen der L-Typ- Ca^{2+} -Ströme und der Anzahl der Kanäle viel langsamer bei Vorhofflimmern des Menschen als in Tiermodellen ereignen (Brundel, 2002). Dieses könnte darauf hinweisen, dass andere, schützende Adaptionsvorgänge eine Rolle bei menschlichem Vorhofflimmern spielen (Brundel, 2002).

Es sollte auch berücksichtigt werden, dass bei Vorhofflimmern die gemessenen mRNA-Spiegel nicht immer mit den gemessenen Proteinspiegeln übereinstimmen, wie in verschiedenen experimentellen und menschlichen Studien festgestellt werden konnte (Van Gelder, 1999, Yue, 1999). Während die Proteinspiegel deutlich vermindert waren, blieben die mRNA-Spiegel nahezu unberührt. Hier könnte eine Reihe verschiedener Mechanismen eine Rolle spielen, wie z.B. eine Aktivierung von mRNA-Silencern, eine allgemeine Reduktion der Translation oder ein vermehrter Abbau der Kanäle durch erhöhte proteolytische Aktivität in den Vorhöfen (Brundel, 2002). Tatsächlich scheint Vorhofflimmern mit einer gesteigerten Aktivität von proteolytischen Enzymen, z.B. des Calcium-abhängigen Enzyms Calpain, einherzugehen (Goette, 2002).

In der Studie von Schotten et al. war die Menge der $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteine der Patienten mit Sinusrythmus verglichen mit den Patienten mit Vorhofflimmern, unverändert. Erstaunlich ist, dass in einer anderen Studie mit menschlichen Vorhofproben die mRNA-Levels für eine andere $\text{Ca}_v\beta$ Genfamilie ($\text{Ca}_v\beta_{1a}$, $\text{Ca}_v\beta_{1b}$ und $\text{Ca}_v\beta_{1c}$) gemessen wurden und eine signifikante Verminderung der $\text{Ca}_v\beta_{1b}$ mRNA festgestellt werden konnte (Grammer, 2001). Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Isoformen der $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten im menschlichen Vorhof exprimiert sein könnten. Eine Vielzahl verschiedener Isoformen der $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten wurde im Ventrikel mit ähnlicher Spezies-Variabilität detektiert (Birnbaumer, 1998), aber es gibt keine Veröffentlichungen, in denen systematisch die Ca^{2+} -Kanal- $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten, die im Vorhof exprimiert sind, bestimmt wurden.

Wie Tabelle 5 verdeutlicht, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Daten zur Expression der Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten nach schneller atrialer Stimulation bei Tieren und beim Vorhofflimmern des Menschen. Die in unserer Arbeitsgruppe

und anderen Studien gefundenen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Herunterregulierung der Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten eine entscheidende Rolle beim atrialen Remodeling zukommt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess schon in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings einsetzt.

5.3 Einfluß von Verapamil auf die Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Verapamil auf die Expression der α_{1c} - und β_{2a} - Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings untersucht. Zwischen den beiden Gruppen sham Verapamil und 24h Verapamil konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der α_{1c} - und β_{2a} - Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Verminderung der Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings durch die präventive Gabe von Verapamil verhindert oder zumindest verlangsamt werden kann.

Diese Ergebnisse korrespondieren gut mit denen in unserer Arbeitsgruppe parallel gewonnen Daten über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Stromdichte, die bei den mit Verapamil vorbehandelten Tieren ebenfalls nicht durch schnelle atriale Stimulation vermindert ist (Wessel, 2004).

Die präventive Gabe von Verapamil scheint also zumindest zum Teil durch die Verhinderung der Herunterregulation der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten die Reduktion von $I_{\text{Ca,L}}$ in den sehr frühen Phasen des Remodelings zu verhindern. Überraschenderweise konnte jedoch zwischen den beiden Gruppen sham und shamV kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass die alleinige Gabe von Verapamil ohne folgende Stimulation keine Auswirkungen auf die Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten zu haben scheint und der oben beschriebene Effekt von Verapamil nur während schneller atrialer Stimulation auftritt. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die „use-dependency“

der Wirkung von Verapamil sein (Forth, 2001). Diese Eigenschaft bedeutet, dass bei einer vermehrten Beanspruchung von Ca^{2+} -Kanälen, wie sie bei tachykarden Rhythmusstörungen der Fall ist, eine verstärkte Blockade erfolgt. Bei niedrigen Frequenzen ist die Verapamil-Wirkung entsprechend geringer. Allerdings zeigte sich in den von unserer Arbeitsgruppe parallel durchgeführten patch-clamp-Messungen auch, dass die Behandlung mit Verapamil in der shamV-Gruppe zu einem signifikantem Anstieg von $I_{\text{Ca,L}}$ um 203% führte (Wessel, 2004).

Nun stellt sich die Frage, warum die Verdoppelung der Ca^{2+} -Ströme bei der shamV-Gruppe nicht mit einer Erhöhung der Expression der L-Typ- Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten einhergeht.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Gabe von Verapamil im Laufe der Behandlung zu einer gegenregulatorischen „Rekrutierung“ von seither inaktiven Kanälen führen könnte. Zum Zeitpunkt der Organentnahme sind die Herzmuskelzellen noch dem Verapamil ausgesetzt, durch die Isolationsvorgänge wird das Verapamil jedoch ausgewaschen, was dazu führt, dass man zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Untersuchung dann letztlich - relativ gesehen - mehr funktionsfähige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle hat als bei den Tieren ohne Verapamil, bei denen die „Rekrutierung“ aufgrund der Blockade des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals nicht stattgefunden hat. Diese Vermutung muss jedoch in keinem Widerspruch zu den beobachteten Proteinkonzentrationen stehen, da mittels Western-Blot-Verfahren keine Unterscheidung zwischen funktionellen und nicht funktionellen Kanälen möglich ist.

5.4 Expression der Phosphatasen in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings

5.4.1 Erhöhte Expression von PP1 α

Ein Schlüsselmechanismus der funktionellen Regulation der Ca²⁺-Kanäle ist deren Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Mit dieser Arbeit wurde versucht, Hinweise dafür zu liefern, ob der verminderte I_{Ca,L} mit Veränderungen dieses Mechanismus einhergeht, da die tatsächliche Amplitude des basalen I_{Ca,L} von der ausbalancierten Aktivität der Kinasen und Phosphatasen bestimmt wird. Im Herzen sind es die Typ1- und Typ2A-Phosphatasen (PP1 und PP2A), die der Phosphorylierung von I_{Ca,L} entgegenwirken (Herzig, 2000).

In dieser Studie konnte nach 24 Stunden schneller atrialer Stimulation allerdings nur eine vermehrte Expression der katalytischen Untereinheit von PP1 α im Kaninchenmodell gemessen werden. In der Expression von PP2A α konnte nach erfolgter atrialer Stimulation kein signifikanter Unterschied gesehen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Heraufregulierung von PP1 α ein Teil des Pathomechanismus in den sehr frühen Phasen des atrialen Remodelings sein könnte und ein Mechanismus für die schnelle Regulation der Kanäle ist. Eine Abhängigkeit verschiedener Kinasen und Phosphatasen von den intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen ist bekannt, daher könnte dieser Mechanismus durch eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration ausgelöst werden.

Zwischen den Gruppen sham und shamV besteht kein signifikanter Unterschied, d.h. die beiden Gruppen sind trotz prozentualer Unterschiede statistisch als „gleich“ zu betrachten. D.h. die Gabe von Verapamil führt zu keiner veränderten Expression der Phosphatasen. Auch hier scheint die Wirkung von Verapamil auf die Phosphatasen nur bei erfolgter atrialer Stimulation eine Rolle zu spielen.

5.4.2 Vergleich mit anderen Studien

In einer Studie von Christ et al. (Christ, 2004) wurde die Hypothese, dass der verminderte $I_{Ca,L}$ mit Veränderungen der phosphorylationsabhängigen Kanalregulation zusammenhängt, bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern überprüft. Die Autoren konnten durch folgende Beobachtungen Beweise für eine verminderte Phosphorylation der Kanäle bei Vorhofflimmern liefern: (1) die bei Vorhofflimmern auftretende Rechtsverschiebung des Maximums der Stromspannungskurve von $I_{Ca,L}$; (2) Verlust eines Effekts des CAMKII-Inhibitors KN-93 bei Vorhofflimmern; (3) größerer Anstieg des basalen $I_{Ca,L}$ bei Vorhofflimmern durch Blockierung der Phosphatasen mit Okadaic Acid; und (4) höhere PP2A-C Proteinexpression bei Vorhofflimmern. Ein weiterer Beweis für die verminderte Kanalphosphorylation bei Vorhofflimmern konnte durch die ausbleibende Blockierung des NE(Norepinephrin)-aktivierten $I_{Ca,L}$ durch den PKC-Hemmer Bisindolylmaleimide geliefert werden.

Daraus schlossen sie, dass entweder eine verminderte Fähigkeit der Kinasen, die Kanäle zu phosphorylieren, oder eine vergrößerte Aktivität der Phosphatasen bei Vorhofflimmern vorliegen muss. Allerdings fanden sie bei den Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu denen mit Sinusrhythmus nur eine verstärkte Expression der katalytischen Untereinheit von PP2A, wohingegen die Expression der katalytischen Untereinheit von PP1 α und die der strukturellen Untereinheit von PP2A unverändert schien. Aus diesen Ergebnissen folgerten sie, dass die bei Vorhofflimmern erhöhte Aktivität von PP2A den stimulierenden Effekten von CAMKII auf $I_{Ca,L}$ scheinbar entgegenwirkt und daraus der verminderte $I_{Ca,L}$ resultiert. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit, bei der es in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings beim Kaninchen zu einer verstärkten Expression der katalytischen Untereinheit von PP1 α kam. Dieser Unterschied könnte aber durch die interspezifischen Differenzen der Phosphatasenbedeutung erklärt sein. Entscheidend ist jedoch, dass in beiden Arbeiten eine erhöhte Expression der Phosphatasen gemessen werden konnte.

5.5 Einfluß von Verapamil auf die vermehrte Expression von PP1 α in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings

Bei der Expression von PP1 α konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen sham Verapamil und 24h Verapamil nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Verapamil die vermehrte Expression von PP1 α in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings verhindern kann. Dies könnte von besonderem Interesse sein, falls die vermehrte Expression von PP1 α ein Teil des Pathomechanismus ist, der das elektrische Remodeling in den frühen Phasen von Vorhofflimmern induziert. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei den mit Verapamil vorbehandelten Tieren die schnelle atriale Stimulation nicht zu einer Verminderung von $I_{Ca,L}$ führt. Dies lässt vermuten, dass Verapamil neben den Effekten auf die Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten auch Effekte auf die Expression der Phosphatase PP1 α zeigt. Die erhöhte Expression der Phosphatasen könnte mit einer verstärkten Dephosphorylierung anderer Proteine einhergehen. Davon könnten z.B. Proteine, die eine Rolle in der elektromechanischen Koppelung spielen, betroffen sein (Herzig, 2000). Da die kontraktile Dysfunktion die Entstehung atrialer Thromben fördern kann, könnte eine Verbesserung der kontraktile Funktion durch Blockade der Phosphatasen das Risiko eines Schlaganfalls bei Patienten mit Vorhofflimmern verhindern. Gleichzeitig könnte durch die Blockade der Phosphatasen das elektrische Remodeling aufgehalten werden.

Allerdings konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass es nach präventiver Verapamilgabe und schneller atrialer Stimulation zu einem Anstieg von PP2A α um 15,6 % ($p= 0,03$).kommt. Dieser Effekt tritt nur dann auf, wenn zusätzlich zu der Gabe von Verapamil die atriale Stimulation erfolgt. Ein möglicher Mechanismus hinter diesem hier beobachteten Effekt ließ sich auch nach eingehender Literaturrecherche nicht durch die bekannten Wirkmechanismen von Verapamil erklären.

5.6 Prävention des frühen elektrischen Remodelings durch Verapamil - Klinische Bedeutung

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass sogar kurze Phasen schneller atrialer Stimulation die elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe bedeutend verändern können. Deshalb erscheint die Spekulation, dass die sofortige Termination kurzer Phasen von Vorhofflimmern den naturgemäßen Verlauf des Fortschreitens dieser Erkrankung verlangsamen könnte, sehr verführerisch und stellt die Grundlage für eine mutmaßliche therapeutische Intervention dar. Es scheint, dass eine Normalisierung der $I_{Ca,L}$ -Amplitude bei Vorhofflimmern sowohl die verkürzte Aktionspotentialdauer als auch die kontraktile Dysfunktion beheben kann.

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine präventive Wirkung von Verapamil auf die veränderte Proteinexpression der Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten α_{1c} und β_{2a} und auf die Phosphatase PP1 α in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings gezeigt werden. Dies lässt darauf schließen das Verapamil, dass durch Vorhofflimmern induzierte Remodeling der Vorhöfe abzuschwächen scheint. Somit könnte Verapamil eine Rolle in der Prävention des Vorhofflimmerns spielen. Bei Patienten mit hohem Risiko für ein Auftreten von Vorhofflimmern, wie z.B. bei Patienten mit einer Bypass-Operation, könnte sich die Gabe von Verapamil positiv auf die Verhinderung des postoperativen Vorhofflimmerns auswirken. Die durchgeführten klinischen Studien zur Verwendung von Calciumantagonisten zur Prävention des postoperativen Vorhofflimmerns (Davison, 1985, Seitelberger, 1994, Smith, 1985) fanden jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Effektivität dieser Substanzen:

In verschiedenen anderen Studien konnte in experimentellen Modellen (Tieleman, 1997, Goette, 1996, Kinebuchi, 2004, Moriguchi, 2003, Kurita, 2002) und beim Menschen (Daoud, 1997, Yu, 1998) gezeigt werden, dass die bei Vorhofflimmern schon nach wenigen Minuten auftretenden Veränderungen der Refraktärzeit und der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern durch Vorbehandlung mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil verringert werden können. Gleichzeitig konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass L-Typ- Ca^{2+} -

Kanal-Blocker ihren Effekt verlieren, wenn die atriale Tachykardie für mehrere Tage bis Wochen anhält (Lee, 2000, Fareh, 2001). Auch konnte sowohl im experimentellen Modell mit Ziegen als auch bei Menschen gezeigt werden, dass Verapamil die Dauer des Vorhofflimmerns erhöht und die Intervalle verkürzt (Shenasa, 1988, Duytschaever, 2001). Folglich kann aufgrund der Beschränkung auf die frühen Phasen des elektrischen Remodelings auch in dieser Studie keine Aussage darüber gemacht werden, ob eine Ca^{2+} -Kanal-Blockade durch Verapamil das langzeitige elektrische Remodeling verringern kann, da die schnelle atriale Stimulation nur für 24 Stunden durchgeführt wurde. Weitere Experimente, in denen die schnelle atriale Frequenz für längere Zeit aufrechterhalten wird, sind nötig, um herauszufinden, ob Verapamil das Tachykardie-induzierte atriale Remodeling nur verzögern oder auch verringern kann. Auch ist bekannt, dass eine ganze Reihe anderer Mechanismen Vorhofflimmern zugrunde liegen kann. Inwieweit eine präventive Gabe von Verapamil einen Einfluß auf diese Mechanismen hat, muss noch genauer untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste supraventrikuläre Tachyarrhythmie des Menschen und hat daher eine große klinische und wirtschaftliche Relevanz. Obwohl in den vergangenen Jahren eine Reihe nicht pharmakologischer Therapieansätze entwickelt worden ist, ist die medikamentöse Therapie immer noch die Option erster Wahl für die Mehrzahl der betroffenen Patienten.

In dieser Studie wurden die protektiven Wirkungen einer präventiven Gabe von Verapamil auf die molekularen und elektrischen Veränderungen in den sehr frühen Phasen des elektrischen Remodelings in einem in-vivo-Modell schneller atrialer Stimulation beim Kaninchen untersucht. Es wurde gezeigt, dass es in den frühen Phasen des elektrischen Remodelings zu einer verminderten Expression der α_{1c} - und β_{2a} -Ca²⁺-Kanaluntereinheiten kommt, die durch die Gabe von Verapamil verlangsamt werden kann. Zusätzlich scheint die präventive Gabe von Verapamil positive Auswirkungen auf den durch Vorhofflimmern veränderten Phosphorylierungszustand des L-Typ-Ca²⁺-Kanals zu haben. Verapamil könnte somit eine Rolle in der Prävention der durch das frühe atriale Remodeling induzierten Veränderungen spielen.

Weitergehende Untersuchungen sind jedoch nötig, um mehr über die Untereinheiten der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, ihre veränderte Regulation bei Vorhofflimmern und ihre Beeinflussung durch eine präventive Gabe von Verapamil herauszufinden. Auch die Rolle der Phosphatasen im Prozess des atrialen elektrischen Remodelings bedarf weiterer Untersuchungen, um dadurch möglicherweise neue Therapieansätze für die Behandlung von Vorhofflimmern entwickeln zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Allesie, M., Ausma, J., Schotten, U. (2002). Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **54**, 230-246.
- Allesie, M. A., Boyden, P. A., Camm, A. J., Kleber, A.G., Lab, M. J., Legato, M. J., Rosen, M. R., Schwartz, P. J., Spooner, P. M., Van Wagoner, D. R., Waldo, A. L. (2001). Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* **103**, 769-777.
- Allesie, M. A., Konings, K., Kirchhof, C.J., Wijffels, M. (1996). Electrophysiologic mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation. *Am.J. Cardiol.* **77**, 10A-23A.
- Allesie, M. A., Lammers, W. J. E. P., Bonke, F. I. M., Hollen, J. (1985). Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. In: *Cardiac Arrhythmias*, ed. DP Zipes, J. Jalife, 256-76. New York: Grune & Stratton
- Arino, J., Woon, C. W., Brautigan, D. L., Miller, T. B. Jr, Johnson, G. L. (1988). Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **85**, 4252-4256
- Attuel, P., Childers, R., Cauchemez, B., Poveda, J., Mugica, J., Coumel, P. (1982). Failure in the rate adaption of the atrial refractory period: its relationship to vulnerability. *Int.J.Cardiol.* **2**, 179-197.
- Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., Kass, R. S. (1996). Influence of L-type Ca channel alpha 2/delta-subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am.J.Physiol.* **270**, H1521-H1528.
- Benjamin, E. J., Levy, D., Vaziri, S. M., D'Agostino, R. B., Belanger, A. J., Wolf, P. A. (1994). Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* **271**, 840-844.
- Biel, M., Hullin, R., Freundner, S., Singer, D., Dascal, N., Flockerzi, V., Hofmann, F. (1991). Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur.J.Biochem.* **200**, 81-88.

-
- Birnbaumer, L., Quin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., Stefani, E. (1998). Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J.Bioenerg.Biomembr.* **30**, 357-375.
 - Bosch, R. F., Scherer C. R., Rüb, N., Wöhrl, S., Steinmeyer, K., Haase, H., Busch, A. E., Seipel, L., Kühlkamp, V. (2003). Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces $I_{Ca,L}$ and I_{to} in rapid atrial pacing in rabbits. *J.Am.Coll.Cardiol.* **41**, 858-869.
 - Bosch, R. F., Zeng, X., Grammer, J. B., Popovic, K., Mewis, C., Kühlkamp, V. (1999). Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res.* **44**, 121-131.
 - Boutjdir, M., Le Heuzey, J. Y., Lavergne, T., Chauvaud, S., Guize, L., Carpentier, A., Peronneau, P. (1986). Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing Clin.Electrophysiol.* **9**, 1095-1100.
 - Brugada, R., Tapscott, T., Czernuszewicz, G. Z., Marian, A. J., Iglesias, A., Mont, L., Brugada, J., Girona, J., Domingo, A., Bachinski, L. L., Roberts, R. (1997). Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N.Engl.J.Med.* **336**, 905-911.
 - Brundel, B. J., van Gelder, I. C. , Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G., Grandjean, J. G., van Gilst, W. H., Crijns, H. J. (1999). Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res.* **42**, 443-454.
 - Brundel, B.J., Henning, R. H., Kampinga, H. H., Van Gelder, I. C. Crijns, H. J. (2002). Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation, *Cardiovasc.Res.* **54**,315-324.
 - Burgess, D. L., Davis, C. F., Gefrides, L. A., Noebels, J. L. (1999). Identification of three novel Ca^{2+} channel gamma subunit genes reveals molecular diversification by tandem and chromosome duplication. *Genome Res.* **9**, 1204-1213.
 - Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* **112**,195-203.
 - Campbell, K. P., Leung, A. T., Sharp, A. H. (1988). The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* **11**, 425-430.

-
- Castellano, A., Perez-Reyes, E. (1994). Molecular diversity of Ca²⁺ channel beta subunits. *Biochem.Soc.Trans.* **22**, 483-488.
 - Chien, A. J., Zhao, X., Shirokov, R.E., Puri, T.S., Chang, C.F., Sun, D., Rios, E., Hosey, M. M. (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-Typ-Ca²⁺-channels. *J.Biol.Chem.* **270**, 30036-30044.
 - Christ, T., Boknik, P., Wöhrl, S., Wettwer, E., Graf, E. M., Bosch, R. F., Knaut, M., Schmitz, W., Ravens, U., Dobrev, D. (2004). L- type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* **110**, 2651-2657.
 - Cohen, P. (1994). The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* **16**, 583-588.
 - Cohen, P. T. (1997). Novel serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends.Biochem.Sci.* **22**, 245-251.
 - Collin T., Wang, J. J., Nargeot, J., Schwartz, A. (1993). Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ.Res.* **72**, 1337-1344.
 - Crijns, H. J., van-Wijk, L. M., van Gilst, W. H., Kingma, J. H., van Gelder, I. C., Lie, K. I. (1988). Acute conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm: clinical efficacy of flecainide acetate. Comparison of two regimes. *Eur.Heart J.* **9**, 634-638.
 - Daoud, E. G., Bogun, F., Goyal, R., Harvey, M., Man, K. C., Strickberger, S. A., Morady, F. (1996). Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* **94**, 1600-1606.
 - Daoud, E. G., Knight, B. P., Weiss, R., Bahu, M., Paladino, W., Goyal, R., Man, K. C., Strickberger, S. A., Morady, F. (1997). Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation- induced electrical remodeling in humans. *Circulation* **96**, 1542-1550.
 - Davison, R., Hartz, R., Kaplan, K., Parker, M., Feiereisel, P., Michaelis, L. (1985). Prophylaxis of supraventricular tachyarrhythmia after coronary bypass surgery with oral verapamil: a randomized, double-blind trial. *Ann.Thorac.Surg.* **39**, 336-339.
 - DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* **55**, 455-472.

-
- Dobrev, D. (2004). Molecular basis of remodelling in atrial fibrillation. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **129**, 827-830.
 - Duytschaever, M. F., Garratt, C. J., Allesie, M. A. (2000). Profibrillatory effects of verapamil but not of digoxin in the goat model of atrial fibrillation. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **11**, 1375-1385.
 - Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., Campbell, K. P., McKenna, E., Koch, W. J., Hui, A. (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**, 1661-1664.
 - Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* **25**, 533-535.
 - Fareh, S., Benardeau, A., Nattel, S. (2001). Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Cardiovasc.Res.* **49**, 762-770.
 - Fareh, S., Villemaire, C., Nattel, S. (1998). Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* **98**, 2202-2209.
 - Faux, M. C., Scott, J. D. (1996). More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends.Biochem.Sci.* **21**, 312-315.
 - Feinberg, W. M., Blackshear, J. L., Laupacis, A., Kronmal, R., Hart, R. G. (1995). Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch.Intern.Med.* **155**, 469-473.
 - Fermini, B., Wang, Z., Duan, D., Nattel, S. (1992). Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am.J.Physiol.* **263**, H1747-H1754.
 - Forth, Henschler, Rummel, Förstermann, Starke (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Urban&Fischer Verlag
 - Frost, L., Molgaard, H., Christiansen, E. H., Hjortholm, K., Paulsen, P. K., Thomsen, P. E. (1992). Atrial fibrillation and flutter after coronary artery bypass surgery: epidemiology, risk factors and preventive trials. *Int.J.Cardiol.* **36**, 253-261.

- Gallagher, M. M., Camm, A. J. (1997). Classification of atrial fibrillation. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **20**, 1603-1605.
- Garratt, C. J., Duytschaever, M., Kilian, M., Dorland, R., Mast, F., Allesie, M. A. (1997). The lower success rate of pharmacological cardioversion of atrial fibrillation of longer duration is due to atrial remodeling. *Pacing and clinical Electrophysiology* **20**, 1154
- Gaspo, R., Bosch, R. F., Talajic, M., Nattel, S. (1997). Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* **96**, 4027-4035.
- Gaspo, R., Sun, H., Fareh, S., Levi, M., Yue, L., Allen, B. G., Herbert, T. E., Nattel, S. (1999). Dihydropyridine and beta adrenergic receptor binding in dogs with tachycardia-induced atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **42**, 434-442.
- Go, A. S., Hylek, E. M., Phillips, K. A., Chang, Y., Henault, L. E., Selby, J. V., Singer, D. E. (2001). Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study. *JAMA* **285**, 2370-2375.
- Goette, A., Arndt, M., Rocken, C., Staack, T., Bechtloff, R., Reinhold, D., Huth, C., Ansoerge, S., Klein, H. U., Lendeckel, U. (2002). Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **283**, 264-272.
- Goette, A., Honeycutt, C., Langberg, J. J. (1996). Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* **94**, 2968-2974.
- Goldberg, R. J., Seeley, D., Becker, R. C., Brady, P., Chen, Z. Y., Osganian, V., Gore, J. M., Alpert, J. S., Dalen, J. E. (1990). Impact of atrial fibrillation on the in-hospital and long-term survival of patients with acute myocardial infarction: a community-wide perspective. *Am. Heart J.* **119**, 996-1001.
- Grammer, J. B., Zeng, X, Bosch, R. F., Kühlkamp, V. (2001). Atrial L-type Ca^{2+} -channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res. Cardiol.* **96**, 82-90.
- Green, D. D., Yang, S. I., Mumby, M. C. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4880-4884.

- Haase, H., Karczewski, P., Beckert, R., Krause, E. G. (1993). Phosphorylation of the L-type channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium. *FEBS Lett.* **335**, 217-22.
- Hagiwara, S., Byerly, L. (1983). Calcium channel. *Annu.Rev.Neurosci.* **4**, 69-125.
- Haissaguerre, M., Jais, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Metayer, P., Clementy, J. (1998). Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N.Engl.J.Med.* **339**, 659-666.
- Hennersdorf, M. G., Perings, C., Kelm, M., Strauer, B. E. (2001). Vorhofflimmern. *Internist* **42**, 1631-1640.
- Herzig, S., Neumann, J. (2000). Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol.Rev.* **80**, 173-210.
- Hofmann, F., Lacinová, L., Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. **139**, 33-87.
- Hohaus, A., Poteser, M., Romanin, C., Klugbauer, N., Hofmann, F., Morano, I., Haase, H., Groschner, K. (2000). Modulation of the smooth-muscle L-type Ca^{2+} channel alpha1 subunit (alpha 1C-b) by the beta2a subunit: a peptide which inhibits binding of beta to the I-II linker of alpha1 induces functional uncoupling. *Biochem.J.* **348**, 657-665.
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., Flockerzi, V. (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* **11**, 885-90.
- Iqbal, M. B., Taneja A. K., Lip, G. Y., Flather, M. (2005). Recent developments in atrial fibrillation. *B.M.J.* **330**, 238-243.
- Jay, S. D., Ellis, S. B., Mc Cue, A. F., Williams, M. E., Vedvick T. S., Harpold M. M., Campbell, K.P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science.* **248**, 490-492.
- Jung, J. (2003). Atrial fibrillation as endpoint in studies of arterial hypertension. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **128**, 2493-2496.
- Kamp, T. J., Hell, J. W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ.Res.* **87**, 1095-1102.

- Kamp, T. J., Perez-Garcia, M. T., Marbán, E. (1996). Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line. *J.Physiol.* **492**, 89-96.
- Kannel, W. B., Abbott, R. D., Savage, D. D., McNamara, P. M. (1982). Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N.Engl.J.Med.* **306**, 1018-1022.
- Kannel, W. B., Wolf, P. A., Benjamin, E. J., Levy, D. (1998). Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am.J.Cardiol.* **82**, 2N-9N.
- Kenyon, J. L., Gibbons, W. R. (1979). Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J.Gen.Physiol.* **73**, 117-138.
- Khew-Goodall, Y., Hemmings, B. A. (1988). Tissue-specific expression of mRNAs encoding α - and β -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* **238**, 265-268.
- Kinebuchi, O., Mitamura, H., Shiroshita-Takeshita, A., Kurita, Y., Ieda, M., Ohashi, N., Fukuda, Y., Sato, T., Miyoshi, S., Hara, M., Takatuski, S., Nagumo, M., Ogawa, S. (2004). Oral verapamil attenuates the progression of pacing-induced electrical and mechanical remodeling of the atrium. *Circ.J.* **68**, 494-500.
- Klugbauer, N., Dai, S., Specht, V., Lacinova, L., Marais, E., Bohn, G., Hofmann, F. (2000). A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett.* **470**, 189-197.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J. Neurosci.* **19**, 684-691.
- Kochiadakis, G. E., Igoumenidis, N. E., Solomou, M. C., Parthenakis, F. I., Christakis-Hampsas, M. G., Chlouverakis, G. I., Tsatsakis, A. M., Vardas, P. E. (1998). Conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm using acute intravenous procainamide infusion. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **12**, 75-81.
- Koike, Y., Shimamura, K., Shudo, I., Saito, H. (1979). Pharmacokinetics of verapamil in man. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* **24**, 37-47.
- Konings, K. T., Kirchhof, C. J., Smeets, J. R, Wellens, H. J., Penn, O. C., Allessie, M. A. (1994). High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation* **89**, 1665-1680.

- Kurita, Y., Mitamura, H., Shiroshita-Takeshita, A., Yamane, A., Ieda, M., Kinebuchi, O., Sato, T., Miyoshi, S., Hara, M., Takatsuki, S., Ogawa, S. (2002). Daily oral verapamil before but not after rapid atrial excitation prevents electrical remodeling. *Cardiovasc.Res.* **54**, 447-455.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, L. P., Su, M. J., Lin, J. L., Lin, F. Y., Tsai, C. H., Chen, Y. S., Huang, S. K., Tseng, Y. Z., Lien, W. P. (1999). Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J.Am.Coll.Cardiol.* **33**, 1231-1237.
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Arch.Ges.Physiol.Mens.Tiere Pflügers* **61**, 291-332.
- Lee, K. S, Marban, E., Tsien R. W. (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J.Physiol.* **364**, 395-411.
- Lee, S. H., Yu, W. C., Ding, Y. A. (2000). Effect of verapamil on long-term tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* **101**, 200-206.
- Li, G. R., Nattel, S. (1997). Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am.J.Physiol.* **272**, H227- H235.
- Lip, G. Y. (1995). Does atrial fibrillation confer a hypercoagulable state? *Lancet* **346**, 1313-1314.
- Madrid, A. H., Bueno, M. G., Rebollo, J. M. G., Mann, I., Pena, G., Bernal, E., Rodriguez, A., Cano, L., Cano, J. M., Cabeza, P. (2002). Use of irbesartan to maintain sinus rhythm in patients with long-lasting persistent atrial fibrillation. A prospective and randomized study. *Circulation* **106**, 331-336.
- Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser P. J., McCarthy, P. M., Van Wagoner, D. R., Bauer, J. A. (2001). Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* **104**, 174-180.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., Numa, S., (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-233.

-
- Moe, G. K. (1962). On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **140**,183-8.
 - Moriguchi, M., Niwano, S., Yoshizawa, N., Kojima, J., Inuo, K., Izumi, T. (2003). Verapamil suppresses the inhomogeneity of electrical remodeling in a canine long-term rapid atrial stimulation model. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **26**, 2072-2082.
 - Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L., Guiraudon, C. M. (1995). Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* **91**, 1588-1595.
 - Murgatroyd, F. D., Camm, A. J. (1993). Atrial arrhythmias. *Lancet* **341**, 1317-1322.
 - Nargeot, J., Lory, P., Richard, S. (1997). Molecular basis of the diversity of calcium channels in cardiovascular tissues. *European Heart Journal* **18**, A15-A26.
 - Nattel S, Li, D. (2000). Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ. Res.* **87**, 440-447.
 - Neely, A., Wei, X., Olcese, R., Birnbaumer, L., Stefani, E. (1993). Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* **262**, 575-578.
 - Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J. Physiol.* **525**, 285-298.
 - Parkinson, J., Campbell, M. (1929). The quinidine treatment of auricular fibrillation. *Q. J. Med.* **22**, 281-303.
 - Perez- Reyes, E., Schneider, T. (1995). Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int.* **48**, 1111-1124.
 - Pedersen, O. D., Bagger, H., Kober, L., Torp-Pedersen, C. (1999). Trandolapril reduces the incidence of atrial fibrillation after acute myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction. *Circulation* **100**, 376-380.
 - Piot, C., Lemaire, S., Albat, B., Seguin, J., Nargeot, J., Richard, S. (1996). High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* **93**,120-128.

- Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K., Gregg, R. G. (1993). Molecular characterization of the gene encoding the gamma subunit of the human skeletal muscle 1,4-dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel (CACNLG), cDNA sequence, gene structure, and chromosomal location. *J.Biol.Chem.* **268**, 9275-9279.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., Campbell, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmatic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67-70.
- Reisinger, J., Gatterer, E., Heinze, G., Wiesinger, K., Zeindlhofer, E., Gattermeier, M., Poelzl, G., Kratzer, H., Ebner, A., Hohenwallner, W., Lenz, K., Slany, J., Kuhn, P. (1998). Prospective comparison of flecainide versus sotalol for immediate cardioversion of atrial fibrillation. *AM.J.Cardiol.* **81**, 1450-1454.
- Rensma, P. L., Allessie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, H., Schaliij, M. J. (1988). Length excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circulation* **62**, 395-410.
- Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. (1983). *Nature.* **301**, 569-574.
- Rinkenberger, R. L., Prystowsky, E. N., Heger, J. J., Troup, P. J., Jackman, W. M., Zipes, D. P. (1980). Effects of intravenous and chronic oral verapamil administration in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *Circulation* **62**, 996-1010.
- Rougier, O., Vassort, G., Garnier, D., Gargouil, Y. M., Coraboeuf, E. (1969). Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Arch.* **308**, 91-110.
- Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T., Nagao, M. (1990). Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 α gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn.J.Cancer Res.* **81**, 1272-1280.
- Schotten, U., Haase, H., Frechen, D., Greiser, M., Stellbrink, C., Vazquez-Jimenez, J. F., Morano, I., Allessie, M. A., Hanrath, P. (2003). The L-type- Ca^{2+} -channel subunits α_{1c} und β_{2a} are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation, *J.Moll.Cell.Cardiol.* **35**, 437-443.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., Nattel, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ.Res.* **90**, 939-950.

-
- Schutz E., Ha, H. R., Buhler F. R., Follath, F. (1982). Serum concentration and antihypertensive effect of slow-release verapamil. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **4** Suppl **3**, S346-9.
 - Schwartz, P. J., Zaza, A. (1992). The Sicilian Gambit revisited-theory and practice. *European Heart Journal*, **13** Supplement F, 23-29.
 - Seitelberger, R., Hannes, W., Gleichauf, M., Keilich, M., Christoph, M., Fasol, R. (1994). Effects of diltiazem on perioperative ischemia, arrhythmias, and myocardial function in patients undergoing elective coronary bypass grafting. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **107**,811-821.
 - Shenasa, M., Kus, T., Fromer, M., LeBlanc, R. A., Dubuc, M., Nadeau, R. (1988). Effect of intravenous and oral calcium antagonists (diltiazem and verapamil) on sustenance of atrial fibrillation. *Am.J.Cardiol.* **62**, 403-407.
 - Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., Dascal, N. (1995). Ca^{2+} current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J.Physiol.* **489**, 55-62.
 - Shorofsky, S. R., Balke, C. W. (2001). Calcium Currents and Arrhythmias-Insights from Molecular Biology. *Am.J.Med.* **110**, 127-140.
 - Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., Dascal, N.(1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**, 1553-1557.
 - Smith, E. E., Shore, D. F., Monroe, J. L., Ross, J. K. (1985). Oral verapamil fails to prevent supraventricular tachycardia following coronary artery surgery. *Int.J. Cardiol.* **9**, 37-44.
 - Spach, M. S. (1989). Multiple regional differences in cellular properties that regulate repolarization and contracting in the right atrium of adult and newborn dogs. *Circ.Res.* **65**, 1594-1611.
 - Specht, V. (2000). Genetische Modifikation des α_{1c} L-Typ-Kalziumkanals der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems. Dissertation an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.
 - Stone, S. R., Hofsteenge, J., Hemmings, B. A. (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* **26**, 7215-7220.

- Sugiura, T., Iwasaka, T., Ogawa, A., Shiroyama, Y., Tsuji, H., Onoyama, H., Inada, M. (1985). Atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* **56**, 27-29.
- Sun, H., Chartier, D., Leblanc, N., Nattel, S. (2001). Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc.Res.* **49**, 759-761.
- Tamargo, J., Caballero, R., Delpon, E. (2004). Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr.Med.Chem.* **11**, 13-28.
- Thandroyen, F. T., Morris, A. C., Hagler, H. K., Ziman, B., Pai, L., Willerson, J. T., Buja, L. M. (1991). Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circ.Res.* **69**, 810-819.
- Tieleman, R. G., De Langen, C., Van Gelder, I. C., de Kam, P. J., Grandjean, J., Bel, K. J., Wijffels, M. C., Allessie, M. A., Crijns, H. J. (1997). Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria. *Circulation* **95**, 1945-1953.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Van Gelder I. C., Crijns, H. J., Tieleman, R. G., Brugemann, J., De Kam, P. J., Gosselink, A. T., Verheugt, F. W., Lie, K. I. (1996). Chronic atrial fibrillation. Success of serial cardioversion therapy and safety of oral anticoagulation. *Arch.Intern.Med.* **156**, 2585-2592.
- Van Gelder, I. C., Brundel, B. J., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Tieleman, R. G., Deelman, L., Grandjean, J. G., De Kam, P. J., Van Gilst, W. H., Crijns, H. J. (1999). Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **10**, 552-560.
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., Nerbonne, J. M. (1999). Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ.Res.* **85**, 428-436.
- Van-Gelder, I. C., Crijns, H. J., Van Gilst, W. H., Verwer, R., Lie, K. I. (1991). Prediction of uneventful cardioversion and maintenance of sinus rhythm from direct-current electrical cardioversion of chronic atrial fibrillation and flutter. *Am.J.Cardiol.* **68**, 41-46.

-
- Walker, D., De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} -channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* **21**, 148-154.
 - Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J. M., Nattel, S. (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K^+ -current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ.Res.* **84**, 551-561.
 - Waxman, H. L., Myerburg, R. J., Appel, R., Sung, R. J. (1981). Verapamil for control of ventricular rate in paroxysmal supraventricular tachycardia and atrial fibrillation or flutter: a double-blind randomized cross-over study. *Ann.Intern.Med.* **94**, 1-6.
 - Wei, S. K., Colecraft, H. M., DeMaria, C. D., Peterson B. Z., Zhang, R., Kohout, T. A., Rogers, T. B., Yue, D. T. (2000). Ca^{2+} channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circ.Res.* **86**, 175-184.
 - Wessel, R., Wöhrl, S., Gogel, J., Kühlkamp, V., Seipel, L., Bosch, R. F. (2004). Prevention of tachycardia induced cellular electrical remodeling by Verapamil in rabbit atria. Abstract at ESC 2004.
 - Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., Allessie, M. A. (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: A study in awake, chronically instrumented goats. *Circulation* **92**, 1954-1968.
 - Wisner, O., Trus, M., Tobi, D., Halevi, S., Giladi, E., Atlas, D. (1996). The alpha2/delta subunit of voltage sensitive Ca^{2+} channels is a single transmembrane extracellular protein which is involved in regulated secretion. *FEBS Lett.* **379**, 15-20.
 - Wit, A. L., Rosen, M. R. (1991). Afterdepolarizations and triggered activity: distinction from automaticity as an arrhythmogenic mechanism. In: Fozzard HA, et al, eds. *The Heart and Cardiovascular System: Scientific foundations*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press 2113-2163
 - Wolf, P. A., Abbott, R. D., Kannel, W. B. (1991). Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham study. *Stroke* **22**, 983-988.
 - Workman, A. J., Kane, K. A., Ankin, A. C. (2001). The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res.* **52**, 226-235.

-
- Xiao, R. P., Cheng, H., Lederer, W. J., Suzuki, T., Lakatta, E. G. (1994). Dual regulation of Ca^{2+} /calmodulin- dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 9659-9663.
 - Yu, W. C., Chen, S. A., Lee, S. H., Tai, C. T., Feng, A. N., Kuo, B. I., Ding, Y. A., Chang, M. S. (1998). Tachycardia- induced change of of atrial refractory period in humans: rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation* **97**, 2331-2337.
 - Yue, L. Melnyk, P., Gaspo, R., Wang, Z., Nattel, S. (1999). Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ.Res.* **84**, 776-784.
 - Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., Nattel, S. (1997). Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ.Res.* **81**, 512-525.

Danksagung

Bei Herrn Privatdozent Dr. R. Bosch möchte ich mich für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn S. Wöhrl für die intensive Betreuung der praktischen Arbeit, die Einarbeitung in die Methoden der Proteinbestimmung, sowie die vielen netten Gespräche und Diskussionen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Herrn Dr. R. Laszlo für seine konstruktive Kritik, seine Anregungen und Ideen und die permanente Bereitschaft die erzielten Ergebnisse zu diskutieren.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem „Kompetenznetz Vorhofflimmern“ danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Letztlich gilt mein Dank Frau H. Haase (Max-Dellbrück Zentrum Berlin) für die Bereitstellung von Antikörpern.

Lebenslauf

- 27.06.1980 Geburt in Freudenstadt
Eltern Dr. med. Helmut Winkler (Facharzt für Innere Medizin), Uta-Maria Winkler (Med. Tech. Assistentin), 2 Brüder
- 1986-1990 Besuch der Grund- und Hauptschule
Klosterreichenbach
- 1990-1995 Besuch des Progymnasiums Baiersbronn
- 1995-1997 Besuch des Kepler-Gymnasiums Freudenstadt
- 1997-1998 Besuch der Franklin Grove High School Illinois (USA)
High-School-Abschluss
- 1998-2000 Besuch des Kepler Gymnasiums in Freudenstadt
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
- Oktober 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität des Saarlandes
- August 2002 Physikum
- Oktober 2002 Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- August 2003 Erstes Staatsexamen
- März 2004 Beginn der Promotionsarbeit im Labor für zelluläre
kardiale Elektrophysiologie an der Universitätsklinik
(PD Dr. med. Ralph Bosch)
- März 2006 Zweites Staatsexamen
- April 2006 Beginn des Praktischen Jahres am Klinikum Stuttgart
- Juni 2007 Drittes Staatsexamen (Gesamtnote: 2,16)