

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuerin: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Reinacher

**Das strukturelle Korrelat von
chronischem Vorhofflimmern
Immunhistochemische und ultrastrukturelle
Untersuchung an humanem Atrium**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Gabriele Klein

Tierärztin aus Siegen

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2002

für Margarete und Mimo

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	5
1. Vorhofflimmern	5
2. Chirurgische Intervention	9
2.1. Entwicklung verschiedener Operationstechniken	9
2.2. Maze-Methode	10
2.3. Mini-Maze-Technik	11
3. Histologische Grundlagen und mögliche arrhythmogene Substrate	11
3.1. Kardiomyozyten, Glanzstreifen und Zellverbindungen	11
3.2. Gap junctions und Connexine	13
3.3. Fascia adherens und Cadherin	19
3.4. Fascia adherens und gap junctions	22
3.5. Extrazelluläre Matrix	24
3.6. Degeneration, Nekrose und Apoptose	28
3.6.1. Degeneration und Ubiquitin	28
3.6.2. Nekrose und Komplementsystem	29
3.6.3. Apoptose	30
3.7. Sarkomerproteine	31
3.7.1. Aktin	31
3.7.2. α -Aktinin	32
III. Material und Methoden	33
1. Gewebe	33
1.1. Gewebeherkunft	33
1.2. Maze-Operation	33

	Seite
1.3. Klinische Daten	33
1.4. Kontrollgewebe	35
1.5. Gewebeaufbewahrung für die Immunhistochemie	35
1.6. Vorbereitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie	35
2. Herstellung histologischer Schnittpräparate	36
2.1. Mikrotomie	36
2.1.1. Gefriermikrotomie	36
2.1.1.1. Auflockern des Gewebes	36
2.1.1.2. Vorbereitung der Objektträger	37
2.1.1.3. Anfertigung von Gefrierschnitten	37
2.1.2. Ultramikrotomie	38
2.2. Schnell-, Übersichtsfärbung	38
2.2.1. Toluidinblau	38
2.2.2. Hämalaun-Eosin-Färbung	38
2.3. Kontrastierung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie	39
3. Immunhistochemie	40
3.1. Immunfluoreszenz	40
3.1.1. Direkte Methode	40
3.1.2. Indirekte Methode	40
3.1.3. Biotin-Streptavidin-Methode	40
3.2. Antikörper	41
3.2.1. Primäre Antikörper	41
3.2.2. Sekundäre Antikörper	42
3.2.3. Detektionssystem für biotinylierte Sekundärantikörper	42
3.3. Weitere Farbstoffe	42
3.4. Einzel- und Doppelfärbungen	43
3.4.1. Einzelfärbungen	43
3.4.2. Doppelfärbungen	46

	Seite
4. Mikroskopie und Bildverarbeitung	47
4.1. Lichtmikroskopie	47
4.2. Fluoreszenzmikroskopie	47
4.3. Konfokale Mikroskopie	48
4.4. Bildverarbeitung	50
4.5. Elektronenmikroskopie	51
5. Proteinquantifizierung	52
5.1. Proteine des Glanzstreifens	52
5.1.1. Quantifizierung der Connexin 43 Fluoreszenz	52
5.1.1.1. Fluoreszenz pro Zelle	52
5.1.1.2. Fluoreszenz pro Fläche	54
5.1.2. Quantifizierung der Connexin 40 Fluoreszenz	54
5.1.2.1. Fluoreszenz pro Zelle	54
5.1.2.2. Fluoreszenz pro Fläche	54
5.1.3. Quantifizierung der N-Cadherin Fluoreszenz	55
5.2. Proteine der extrazellulären Matrix	55
5.2.1. Quantifizierung der Kollagen I Fluoreszenz	55
5.3. Grundeinstellungen für die Proteinquantifizierung	57
5.4. Weitere Berechnung und Auswertung der Meßergebnisse	57
5.5. Zellgröße	58
6. Marker für Degeneration, Nekrose und Apoptose	58
6.1. Semiquantitative Ubiquitin und C 9 - Bestimmung	58
6.2. TUNEL-Methode	58
IV. Ergebnisse	61
1. Morphologische Beurteilung des Gewebes	61
1.1. Proteine des Glanzstreifens	61

	Seite
1.1.1. Connexin 43	61
1.1.2. Connexin 40	62
1.1.3. N-Cadherin	63
1.1.4. Desmoplakin	63
1.2. Extrazelluläre Proteine	76
1.2.1. Kollagen I	76
1.2.2. Kollagen VI und Fibronectin	77
1.3. Sarkomerproteine	82
1.3.1. α -Aktinin	82
1.3.2. Aktin	82
2. Proteinquantifizierung	84
2.1. Proteine des Glanzstreifens	84
2.1.1. Connexin 43 Fluoreszenz pro Zelle	84
2.1.2. Connexin 40 Fluoreszenz pro Zelle	84
2.1.3. Connexin 43- und Connexin 40 Fluoreszenz pro Fläche	86
2.1.4. N-Cadherin Fluoreszenz	86
2.1.5. Korrelationen zwischen Connexin 43, -40 und N-Cadherin	86
2.1.5.1. Connexin 43 und Connexin 40	86
2.1.5.2. Connexin 43, - 40 und N-Cadherin	87
2.2. Proteine der extrazellulären Matrix	87
2.2.1. Kollagen I Fluoreszenz	87
3. Zellgröße	88
4. Marker für Degeneration, Nekrose und Apoptose	88
4.1. Ubiquitin	88
4.2. Komplement C 9	89
4.3. TUNEL	89
5. Ultrastrukturelle Veränderungen	91

	Seite
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	110
V. Diskussion	113
1. Gewebeauswahl	113
1.1. Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	113
1.2. Vorhofflimmern und atriale Dilatation	115
2. Spezielle Vorteile der Kombination von konfokaler- und Elektronenmikroskopie bei der Untersuchung von gap junctions	116
3. Mögliche Ursachen veränderter Anisotropie und potentiell arrhythmogene Substrate	117
4. Zellgröße	119
5. Degeneration, Nekrose und Apoptose	121
6. Extrazelluläre Matrix	123
7. Gap junctions	130
7.1. Connexin 43	130
7.2. Connexin 40	141
8. N-Cadherin	145
9. Klinische Relevanz	146
10. Schlußfolgerung	149
VI. Zusammenfassung	153
VII. Summary	155
VIII. Abkürzungen	157
IX. Literaturverzeichnis	159
X. Danksagung	173

I. EINLEITUNG

Vorhofflimmern ist mit einer Gesamt-Prävalenz von 0,15-1% die häufigste supraventrikuläre Arrhythmie des Menschen ^{1,2}.

Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung nehmen mit jeder Lebensdekade, von 0,5% jenseits des 50. Lebensjahres bis zu fast 9% nach dem 80. Lebensjahr, signifikant zu ³.

Neben subjektiven, die Lebensqualität beeinträchtigenden Symptomen führt chronisches Vorhofflimmern u.U. zu einer zweifach erhöhten kardiogen bedingten Morbidität und Mortalität und, bei fehlender adäquater antikoagulatorischer Therapie, zu einem fünffach erhöhten Risiko einer apoplexia cerebri ^{4,5}.

Auch beim Tier stellt diese Form der kardialen Rhythmusstörung eine häufige und ernstzunehmende Erkrankung dar ⁶.

Beim Hund tritt Vorhofflimmern als häufigste tachykarde Vorhofarrhythmie v.a. bei älteren Rüden großer Rassen oder ansonsten meist im Terminalstadium einer Herzinsuffizienz auf und ist generell als schweres, prognostisch ungünstiges Zeichen zu bewerten ^{6,7}.

Beim Pferd bleibt Vorhofflimmern in Ruhe oder bei mäßiger Anstrengung häufig symptomlos oder geht mit nur geringer Leistungsverminderung einher und wird gelegentlich als Zufallsbefund bei der Herzuntersuchung diagnostiziert. Komplikationen treten oft erst in Form einer Belastungsherzinsuffizienz auf. Grundsätzlich gilt die Erkrankung aber auch hier als progressiv verlaufende Regulationsstörung, die früher oder später zur dekompensierten Herzinsuffizienz führt ⁸.

Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich, die symptomatische Behandlung mit Antiarrhythmika und Antikoagulantien zur Senkung der Ventrikelfrequenz, Verbesserung der Kontraktionskraft oder Beseitigung eventueller Insuffizienzerscheinungen ist nicht zuletzt aufgrund ihrer bekannten Nebenwirkungen nur selten zufriedenstellend, und eine zunächst erfolgreiche Kardioversion hat häufig Rezidive zur Folge. Ein präventiver Ansatz gewinnt daher zunehmend an Bedeutung, da chronisches Vorhofflimmern und die damit assoziierten Risiken, einmal etabliert, nur schwer kontrollierbar sind.

Für eine effektive Prävention und Therapie ist die Kenntnis prädisponierender Faktoren sowie der Pathophysiologie der Entstehung und Etablierung von Vorhofflimmern von grundlegender Bedeutung.

Zahlreiche klinische, elektrophysiologische, histologische und molekularbiologische Studien auf diesem Gebiet, sowohl am Tiermodell als auch am Menschen, führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die kontrovers diskutiert werden.

Die prädisponierenden Faktoren für chronisches Vorhofflimmern sind vielfältig, die zugrundeliegenden elektrophysiologischen und strukturellen Korrelate noch immer ungeklärt.

Als gesichert wird inzwischen angesehen, daß es sich bei Vorhofflimmern um eine reentry-Arrhythmie handelt. Reentry ist ein prinzipieller Mechanismus sowohl atrialer als auch ventrikulärer Tachyarrhythmien, dessen Entstehung und Fortsetzung Geweberegionen mit langsamer, heterogener Weiterleitung oder Leitungsblock erfordert, so daß sich depolarisierende Aktionspotentiale retrograd auf nicht mehr absolut refraktäre, erregbare Zellen ausbreiten können^{9,10}.

Die Pathogenese der verlangsamten Weiterleitung des kardialen Impulses steht sowohl mit aktiven Ionen-Transportfunktionen der Zellmembran, als auch mit den passiven elektrischen Eigenschaften und der myokardialen Gewebearchitektur in Zusammenhang¹⁰⁻¹⁵.

Als Ergebnis zahlreicher Untersuchungen gibt es zunehmend Hinweise darauf, daß Veränderungen des passiven Widerstandes, unabhängig von Veränderungen der aktiven Membraneigenschaften und der Zellgeometrie, die Leitungsgeschwindigkeit vermindern und die Heterogenität der Impulsweiterleitung erhöhen können^{10-13,16,17}.

Die zentrale Rolle im Hinblick auf die passiven Leitungseigenschaften eines elektrisch erregbaren Gewebes kommt spezialisierten Regionen der Zellmembran, den gap junctions, zu.

Die cytosolischen Kompartimente benachbarter Kardiomyozyten werden via gap junctions im Bereich des Glanzstreifens verbunden. Gap junctions ermöglichen als sogenannte „low resistance pathways“ die Kommunikation benachbarter Zellen durch den Austausch von Ionen, Metaboliten und Signalmolekülen und sind somit für die elektrische Kopplung der einzelnen Zellen und die interzelluläre Impulsweiterleitung sowie darüber hinausgehend für die koordinierte Kontraktion des gesamten Myokards und dessen anisotrope Eigenschaften verantwortlich^{12,13,18}.

Die strukturellen transmembranären Proteine der gap junction-Kanäle sind die Connexine. Im Glanzstreifen des menschlichen Herzens werden gap junctions von bis zu drei verschiedenen Connexinisoformen - Connexin 40, 43 und 45 - mit unterschiedlicher Lokalisation, Anordnung und Kombination in verschiedenen Zelltypen und Regionen des Herzens gebildet. Im Säugerherzen ist Connexin 43 das am meisten verbreitete gap junction Protein und kommt in fast allen Anteilen des Organs vor. Connexin 40 dagegen ist spezifisch für atriales Myokard und spezielle Leitungsgewebe^{2,19}.

Unterschiede in der Expression verschiedener Connexinisoformen und die Anzahl, Größe und räumliche Anordnung der gap junctions werden als kritische

Determinante gewebespezifischer Leitungseigenschaften in verschiedenen Teilen des Herzens unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen einschließlich potentiell lebensbedrohlicher Arrhythmien angesehen^{13,15,20-22}.

Zahlreiche tierexperimentelle Studien sowie Untersuchungen an humanem Ventrikelmyokard, haben einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Verteilungsstörungen der gap junctions, bzw. Veränderungen der Expression der jeweiligen Connexinisoformen und der Entstehung von Arrhythmien belegt. Abnormale Weiterleitung und Ausbreitung des elektrischen Impulses durch verminderte Connexinexpression bzw. veränderte gap junction Verteilung werden im Ventrikel v.a. mit Ischämie, Infarkt und Hypertrophie assoziiert. Generell scheint eine Connexinreduktion bei chronischen Herzerkrankungen aufzutreten, und Computersimulationen konnten veranschaulichen, daß eine reduzierte Kardiomyozytenverbindung über Connexine zur verlangsamten Impulsweiterleitung, veränderten Dauer des Aktionspotentials und inhomogenen anisotropen Weiterleitung führt und somit als signifikant proarrhythmogen einzustufen ist²³.

Daneben wurde nachgewiesen, daß altersbedingten oder pathologischen fibrotischen Veränderungen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von reentry-Kreisläufen zukommt, und morphologische Untersuchungen beschreiben eine differierende Anzahl degenerativer und anderer Veränderungen die mit tachykarden Rhythmusstörungen in Verbindung gebracht werden. Zusammenfassend bleibt die Rolle der gap junctions auch bei der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien immer noch ungeklärt.

Im Vergleich zu den an ventrikulärem Myokard durchgeführten Untersuchungen sind die Literaturangaben über Vorhofflimmern verschwindend gering. Abgesehen von einigen tierexperimentellen Studien, die sich aber v.a. aufgrund der limitierenden zeitlichen Unterschiede nicht unbedingt auf „*in vivo*-Verhältnisse“ übertragen lassen, und wenigen Untersuchungen an humanem atrialen Myokard mit sehr kontroversen Ergebnissen, ist nahezu nichts über die chronischem Vorhofflimmern zugrundeliegenden Mechanismen und der Pathophysiologie hinter der Chronizität bekannt.

Auch wenn grundsätzlich davon auszugehen ist, daß sich vermutete ventrikuläre Pathomechanismen auf atriales Myokard übertragen lassen, machen die Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Eigenschaften bezüglich mechanischer Anforderungen, der Gewebearchitektur, der exprimierten Connexin-Isoformen, und der dreidimensionalen gap junction-Verteilung eine genauere Betrachtung atrialen Myokards unumgänglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an humanem Vorhofmyokard das strukturelle Korrelat chronischen Vorhofflimmerns im Hinblick auf die Fragestellung zu untersuchen, ob und inwieweit remodeling elektrischer und mechanischer interzellulärer Verbindungen, Veränderungen in der Expression atrialer gap junction Proteine oder eine Zunahme extrazellulärer Matrixproteine als möglicherweise proarrhythmogen einzustufen sind.

Dabei kam neben der Elektronenmikroskopie, die notwendig war, um v.a. die Frage nach dem funktionellen Status vorhandener gap junctions und dem Ausmaß degenerativer Veränderungen zu klären, die konfokale Mikroskopie zum Einsatz, deren entscheidender Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden in der hochsensitiven und quantifizierbaren Fluoreszenzdarstellung verschiedener intra- und extrazellulärer Proteinisofomen in größeren Gewebevolumenta liegt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Vorhofflimmern

Bei Vorhofflimmern handelt es sich um eine weit verbreitete, meist progredient verlaufende, kardiale Arrhythmie, deren Inzidenz mit zunehmenden Alter, den meisten Formen kardialer und einiger pulmonaler Erkrankungen sowie diversen metabolischen, toxischen, endokrinen oder genetischen Abnormalitäten zunimmt.

Eine klinische Klassifikation des Vorhofflimmerns erfolgt nach den Abständen, innerhalb derer die Episoden der Arrhythmie auftreten ²⁴.

Paroxysmales Vorhofflimmern konvertiert im Allgemeinen innerhalb von 48 Stunden spontan zum Sinusrhythmus. Die seltener auftretende, persistierende Form der Erkrankung endet nicht von selbst, sondern erfordert Kardioversion zur Wiederherstellung des Sinusrhythmus. Als permanent oder chronisch bezeichnetes Vorhofflimmern ist weder mit elektrischer noch pharmakologischer Kardioversion konvertierbar ^{5,25,26}.

Aus chronischem Vorhofflimmern resultieren für die betroffenen Patienten zwei wesentliche, langfristige klinische Konsequenzen:

1. Arrhythmie und erhöhte Ventrikelfrequenz führen durch Verlust der AV-Synchronität, der verminderten ventrikulären Füllungszeit und häufig gleichzeitig bestehender AV-Klappen-Insuffizienz, zu einer Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion mit den damit verbundenen nachteiligen hämodynamischen Auswirkungen.
2. Durch den Verlust der atrialen Kontraktionsfunktion und atriale Stase wird die Bildung intrakardialer Thromben begünstigt und somit das Risiko der Entstehung systemischer Thrombembolien signifikant erhöht ^{27,28}.

33% der Patienten entwickeln infolge des chronischen Vorhofflimmerns eine Thrombembolie, 75% davon im Gehirn mit Todesfolge oder bei 60% mit permanenten, schwerwiegenden neurologischen Ausfällen ²⁷.

Die Erkrankung wird entweder asymptomatisch vom Patienten toleriert oder geht mit Symptomen wie Herzklopfen, Benommenheit und allgemeinem Leistungsabfall, Tachykardie-bedingter linksventrikulärer Dysfunktion und einem stark erhöhten Thrombembolierisiko mit signifikant erhöhter Morbidität und Mortalität einher, wobei die paroxysmale Form mit einem zunächst geringeren Mortalitätsrisiko assoziiert ist ^{4,5}. Patienten mit initial paroxysmalem Vorhofflimmern entwickeln

jedoch häufig länger andauernde, nicht mehr spontan endende Anfälle. Ausnahme kann paroxysmales Vorhofflimmern während intensivem Vagustonus sein. Auch anfangs noch gut auf pharmakologische oder elektrische Kardioversion ansprechendes Vorhofflimmern neigt meist, in Abhängigkeit von der Dauer und Art der zugrunde liegenden Herzerkrankung, zur Therapieresistenz²⁵.

Der Zeitfaktor scheint generell eine wichtige Rolle bei der Etablierung chronischen Vorhofflimmerns und der damit verbundenen Therapieresistenz zu spielen; anhand zahlreicher klinischer Studien wurde nachgewiesen, daß sich nicht nur die Wiederherstellung des Sinusrhythmus oder die Prävention von Rezidiven um so schwieriger gestaltet, je länger das Vorhofflimmern besteht und die einzelnen Episoden andauern, sondern sich auch zunehmende, beträchtliche Verzögerungen in der Wiederherstellung der Kontraktionsfunktion nach Kardioversion einstellen^{25,26,29-35}. Ob dieser Tatsache atriales strukturelles oder funktionelles remodeling zu Grunde liegt, ist immer noch ungeklärt.

Bis zu einem gewissen Grad scheint es sich jedoch bei chronischem Vorhofflimmern um eine Art sich selbst erhaltenden, progressiven *circulus vitiosus* zu handeln, wobei der „point of no return“ zum Sinusrhythmus noch nicht bekannt ist^{24,36,37}. So konnten elektrophysiologische Untersuchungen belegen, daß schnelle atriale Aktivierung, entweder durch Vorhofflimmern selbst oder infolge schnellen atrialen „pacings“, zu einer verminderten effektiven Refraktärzeit, einer verlangsamten Weiterleitung und einer erhöhten elektrophysiologischen Heterogenität der Vorhöfe führt^{26,38,39}. Diese Ergebnisse wurden von Wijffels et al.³² unter der treffenden Bezeichnung „atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ zusammengefaßt und veranschaulichen, wie die Aufrechterhaltung chronischen Vorhofflimmerns durch die von diesem selbst veränderten, atrialen elektrischen Eigenschaften unterstützt wird, sagen dabei aber nichts über das diesen Veränderungen zugrunde liegende Substrat aus³⁷.

Die prädisponierenden Faktoren für chronisches Vorhofflimmern sind vielfältig, wobei zwischen primären atrialen Veränderungen, generalisierten Herzerkrankungen und atrialen Veränderungen, die auf hämodynamischen Störungen oder extrakardialen Ursachen beruhen, unterschieden werden kann (Abb. 1).

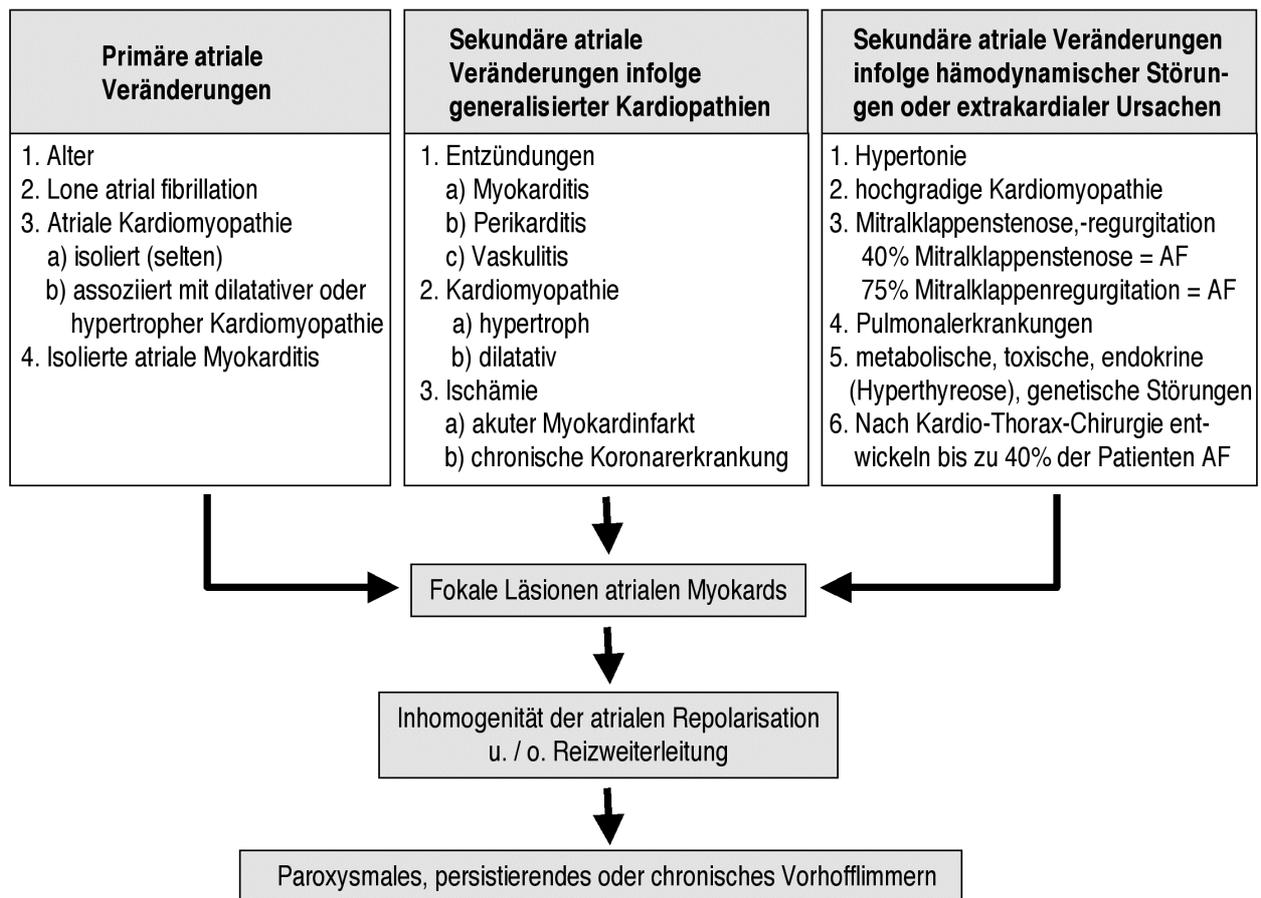


Abb. 1: Prädisponierende Faktoren für chronisches Vorhofflimmern (AF = atrial fibrillation).

Desweiteren existiert eine idiopathische Form der Erkrankung, die auch als „lone atrial fibrillation“, d.h. ohne das Vorliegen einer ersichtlichen Grunderkrankung, bezeichnet wird und von der etwa ein Drittel der Patienten betroffen ist⁴⁰. Bei ca. 50% der paroxysmalen Form und ca. 20% der persistierenden oder chronischen Formen handelt es sich um “lone atrial fibrillation”.

Grundsätzlich müssen alle mit Vorhofflimmern assoziierten Veränderungen am Herzen aber im Kontext zu normalen altersbedingten Veränderungen und bestehenden Grunderkrankungen gesehen werden⁴ (Tab. 1).

Allein diese physiologischen, altersbedingten Vorgänge wirken prädisponierend für eine verminderte und inhomogene Reizweiterleitung und kommen als Ursache für die Entstehung, Etablierung und altersbedingt zunehmende Prävalenz der Arrhythmie in Betracht.

Für das Verständnis der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns erscheint eine Unterscheidung zwischen Auslösern, sogenannten triggern, wie etwa einer akuten Läsion des atrialen Myokards oder einem intensiven neurologischen Input und

unterhaltenden Faktoren für das Einsetzen und die Aufrechterhaltung der Arrhythmie von Bedeutung²⁵ (Abb. 2).

Tab. 1: Normale altersbedingte Veränderungen am Atrium (modifiziert nach Falk et al.⁴)

Geburt bis 30. Lebensjahr	Proliferation von glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Kollagen
30. bis 70. Lebensjahr	Verfettung, Vakuolisierung und Atrophie des Endokards, Ersatzfibrose
ab 80. Lebensjahr	Kollagenzunahme, Amyloidablagerung, Infiltration des Sinusknotens mit Fett und Kollagen, atriale Dilatation infolge ventrikulärer Fibrose

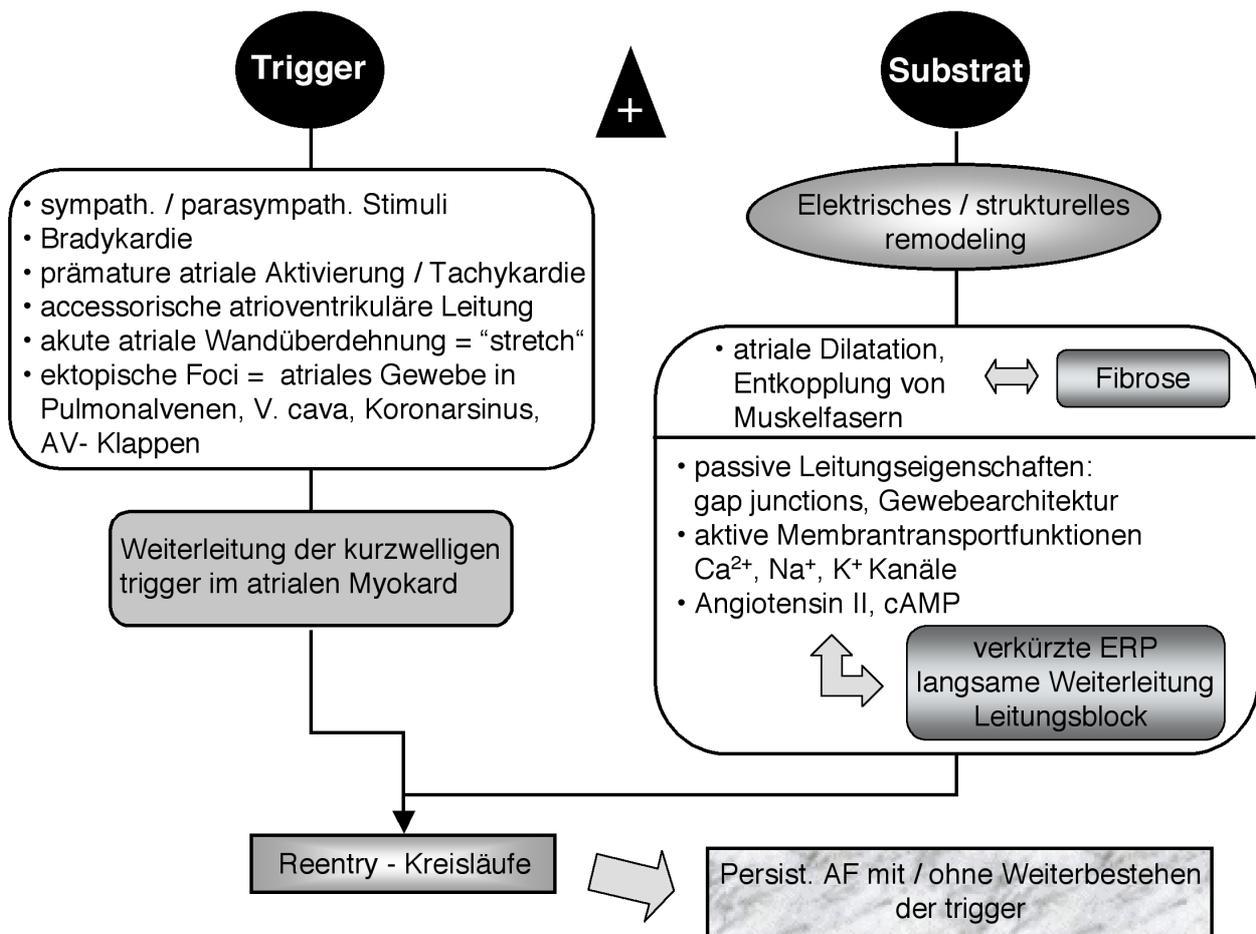


Abb. 2: Pathophysiologie des Vorhofflimmerns (AF = atrial fibrillation).

Die vielfältigen möglichen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen prädisponierenden Faktoren, Triggern und Substraten chronischen Vorhofflimmerns und besonders deren wahrscheinliche zeitliche Abfolge wurden bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts eingehend untersucht, konnten aber bis heute nicht abschließend geklärt werden ⁴¹.

2. Chirurgische Intervention

2.1. Entwicklung verschiedener Operationstechniken

Aufgrund der häufigen Therapieresistenz und Rezidiventwicklung nach Kardioversion bei chronischem Vorhofflimmern, kommt oft nur noch die chirurgische Intervention als letzte therapeutische Möglichkeit in Betracht ^{42,43}.

Ziel einer effektiven chirurgischen Therapie muß es sein, nicht nur den Sinusrhythmus wiederherzustellen und rezidivierende Arrhythmien dauerhaft zu verhindern, sondern auch ausreichende atriale Transportfunktion zu gewährleisten und somit atriale Stase zu vermeiden ²⁷.

Unter diesen Aspekten wurden zahlreiche unterschiedliche Operationstechniken entwickelt und klinisch erprobt.

Ausgehend von der sich aus diversen elektrophysiologischen Untersuchungen ^{1,44} ableitenden Theorie, daß es sich bei Vorhofflimmern um eine durch sog. reentry-Kreisläufe verursachte Arrhythmie handelt, für deren Aufrechterhaltung eine kritische Anzahl kreisender Erregungswellen notwendig ist, sollte durch chirurgische Reduktion der atrialen Masse und Oberfläche, die Anzahl und Ausbreitung dieser reentries verringert werden ⁵.

Cox et al. beschrieb 1980 die Isolation des linken Vorhofs, nach der das vom restlichen Herzen isolierte Atrium entweder inaktiv bleibt, einen eigenen asynchronen Rhythmus entwickelt oder weiter fibrilliert, so daß zwar die linksventrikuläre Funktion verbessert, das Risiko der Thrombembolie aber nicht verringert wurde ^{27,28}.

1982 entwickelten Scheinman et al. die transvenöse Katheterablation des His-Bündel, die über einen längeren Zeitraum als Standardtechnik für therapieresistentes Vorhofflimmern eingesetzt wurde, deren gravierender Nachteil aber in der Notwendigkeit der Schrittmacherimplantation liegt ^{27,28,42}.

Auch die von Guiraudon et al. 1985 eingeführte sog. Korridor Methode erzielte mit der Isolation beider Vorhöfe keine Verminderung des Embolierisikos ^{27,28}.

2.2. Maze-Methode

Da mit keiner der bis dahin eingesetzten Methoden die Langzeitkomplikationen chronischen Vorhofflimmerns zufriedenstellend eliminiert wurden, entwickelten Cox et al. 1987 im Anschluß an zahlreiche elektrophysiologische und tierexperimentelle Studien die sogenannte Maze I-Operation, um alle potentiellen reentries durch gezielte links- und rechtsatriale Inzisionen zu unterbrechen und dabei die atriale Transport- und Sinusknotenfunktion aufrechtzuerhalten²⁷. Die initial dazu durchgeführten Inzisionen wurden anschließend mehrfach bis hin zur Maze III-Technik modifiziert und gelten inzwischen überwiegend als Mittel der Wahl für nicht pharmakologisch therapierbares Vorhofflimmern.

Das Prinzip dieser Methode basiert annähernd auf dem eines Labyrinthes, was zu der Bezeichnung Maze-Technik führte.

Grundsätzlich ging man zunächst einmal davon aus, daß die Entstehung von reentry-Kreisläufen an Stellen der Unterbrechung der Kontinuität der freien atrialen Wand ermöglicht wird^{1,44}.

So wurden im Wesentlichen zwei macro-reentry-Kreisläufe für die Etablierung der Arrhythmie verantwortlich gemacht. Im rechten Atrium stellen die Ostien der V. cava sup. und inf., im linken Atrium die Ostien der Pulmonalvenen sowie der weite Übergang ins linke Herzohr diese Unterbrechungen in der ansonsten glatten Vorhofwand dar, die von den eintreffenden elektrischen Impulsen umgangen werden müssen^{27,44}.

Bei der endgültigen Methode nach Cox werden die chirurgischen Inzisionen rund um den Sinusknoten so platziert, daß die Sinusimpulse in nur eine Richtung weitergeleitet werden können. Die anschließenden Inzisionen erfolgen derart, daß die gängigsten reentry-Wege unterbrochen werden und die reguläre Erregungswelle auf vordefinierten Wegen alle atrialen Regionen und den AV-Knoten erreicht, bevor von dort die Ventrikelkontraktion ausgelöst wird.

Durch die Aktivierung der gesamten Vorhofmuskulatur, mit Ausnahme der entfernten Herzohren und der isolierten Pulmonalvenen, wird die atriale Transportfunktion sichergestellt. Die Entstehung eventuell post operativ erneut auftretender reentries wird verhindert, indem die elektrischen Impulse bei normaler Refraktärzeit nicht mehr umkehren und weitere reentries induzieren können, wenn sie in dieser Richtung ausschließlich auf refraktäres Gewebe treffen und an der finalen Naht, ähnlich der anuli fibrosi des normalen Herzens, beendet werden^{5,42}.

2.3. Mini-Maze-Technik

An der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim wurde die Methode der Mini-Variante der Maze III Operation entwickelt und auf ihre mittelfristige Erfolgsquote im Vergleich zu Maze III hin untersucht.

Diese Variante entstand auf der Basis zahlreicher Literaturangaben, um einige der zeitaufwendigen und risikoreicheren Maze III-Inzisionen, unter Aufrechterhaltung der wesentlichen Maze Ziele, zu eliminieren. Die so erreichte Verkürzung der Ischämie (Aortenklemmzeit) und des extrakorporalen Kreislaufs, macht diese Methode besonders geeignet für polymorbide Patienten oder solche mit beeinträchtigter linksventrikulärer Funktion ²⁸.

3. Histologische Grundlagen und mögliche arrhythmogene Substrate

3.1. Kardiomyozyten, Glanzstreifen und Zellverbindungen

Herzmuskulatur stimmt in ihrem prinzipiellen Aufbau aus Aktin- und Myosinfilamenten, den grundlegenden sarkomeren, cytoskelettären und intermediären Proteinen sowie in ihren Kontraktionsmechanismen im Wesentlichen mit dem der Skelettmuskulatur überein. Zum grundsätzlichen Aufbau quergestreifter Muskulatur und den der Kontraktion zugrundeliegenden Mechanismen soll hier auf bekannte Literatur verwiesen werden.

Bei Kardiomyozyten handelt es sich aber, im Unterschied zu anderen quergestreiften Muskelzellen nicht um ein Syncytium, sondern um Einzelzellen mit jeweils nur einem Zellkern, die an den Enden durch sogenannte Glanzstreifen oder intercalated discs (ID), Modifikationen der Zellmembran, miteinander verbunden sind ⁴⁵.

Im Bereich des ID spezialisiert sich die Zellmembran eines Kardiomyocyten zu drei verschiedenen Arten interzellulärer Verbindungen, die entweder mechanische bzw. adhaesive Funktionen haben oder aber die Weiterleitung des Aktionspotentials und die Zellkommunikation ermöglichen.

Das Myokard setzt sich grundsätzlich aus drei funktionell und ultrastrukturell unterschiedlichen Zelltypen zusammen: Reizbildende Gewebe (Sinus- und AV-Knoten), spezielle reizleitende Gewebe (His' Bündel, dessen Aufzweigungen und Purkinjefasern) und Arbeitsmyokard.

Hinsichtlich ihrer Ultrastruktur differieren diese drei Zelltypen v.a. auch in der Anordnung und Zusammensetzung ihrer IDs^{46,47}.

Im Arbeitsmyokard von Atrium und Ventrikel lassen sich am ID drei unterschiedliche dreidimensionale, hoch spezialisierte Regionen der Zellmembran neben unspezialisierten Anteilen unterscheiden:

- 1) gap junctions (nexus)
- 2) fascia adherens
- 3) Desmosomen
- 4) unspezialisierte Anteile der Zellmembran

Gap junctions sind sogenannte kommunizierende Verbindungen oder „low resistance pathways“, die eine schnelle Weiterleitung des Aktionspotentials und somit eine synchrone Muskelkontraktion erlauben. Die äußeren Schichten der beiden dreischichtigen Plasmamembranen lagern sich in diesem Abschnitt derart zusammen, daß der Eindruck einer fünfflagigen Membran entsteht, der Interzellularspalt ist auf ca. 2-4 nm verengt⁴⁸.

Desmosomen haben mechanische Bedeutung, sie heften benachbarte Zellen aneinander und dienen im Zellinneren der Verankerung von Intermediärfilamenten (Desmin). Diese wiederum bilden ein dichtes Gerüst im Cytoplasma, koppeln nebeneinanderliegende Myofibrillen über andere Proteine an die Plasmamembran und verleihen so der Zelle mechanische Stabilität. Der Interzellularspalt ist in diesem Bereich ca. 25-35 nm weit und enthält eine elektronendichte Glykoproteinsubstanz.

Die überwiegend transvers zur Muskelfaserrichtung gelegenen fasciae adherentes verbinden die Aktinfilamente der Myofibrillen, werden deshalb auch als Myofibrillen-Insertionsstellen bezeichnet und dienen der interzellulären Adhäsion; die Weite des Interzellularspalts beträgt auch hier in etwa 20 nm.

Im nicht spezialisierten Anteil zwischen diesen Zellverbindungen, ist die Weite des Interzellularspaltes variabel und meist größer als 20 nm. Die Zellmembranen der benachbarten Zellen verlaufen irregulär und weisen keinerlei strukturelle Spezialisierung auf⁴⁹.

Im Arbeitsmyokard sind die endständigen IDs meist stufenförmig auf Höhe der Z-Banden angeordnet und lassen sich überwiegend in regelmäßige longitudinale und transversale Abschnitte unterteilen; wobei diese Unterscheidung im Ventrikel größtenteils deutlicher ausgeprägt ist als in den oft einfacher strukturierten^{15,17},

nicht so tiefe Einstülpungen bildenden und häufig auch schräg zur Zellachse verlaufenden IDs des Atriums^{47,48}. Im transversen Anteil des ID ragen kurze Zellfortsätze ineinandergreifend in die jeweilige benachbarte Zelloberfläche. In diesem „undulierenden“ Abschnitt der Zellmembran sind v.a. die Desmosomen, fasciae adherentes und kleinere gap junctions lokalisiert. Größere, weiter ausgedehnte gap junctions finden sich dagegen vor allem in den longitudinalen Anteilen, in denen die Zellmembran parallel zur Muskelfaserrichtung verläuft^{48,50}. Daneben kommen sowohl in ventrikulärem als auch atrialen Myokard IDs, mit den unterschiedlichen Zellverbindungen, an den lateralen Zellgrenzen vor. Die Häufigkeit dieser lateralen IDs scheint jedoch auch innerhalb unterschiedlicher Regionen des jeweiligen Kammermyokards sowie speziesspezifisch zu variieren. Am Rattenherzen werden ventrikuläre Myozyten von $9,8 \pm 2,1$ IDs und atriale Myozyten von $5,5 \pm 1,5$ IDs durch zelluläre Überlagerung verbunden¹⁵. Am Hundeherzen werden am linksventrikulären Myokard ebenfalls 11-12 Myozyten, in etwa gleichermaßen lateral und endständig, miteinander verbunden, in der atrialen Crista terminalis sind dagegen nur halb so viele und überwiegend endständige Verbindungen vorhanden²¹. Im humanen Ventrikel enthalten Myozyten durchschnittlich 11,6 IDs, für humanes atriales Myokard liegen diesbezüglich z.Z. keine quantitativen Angaben vor. Im normalen humanen Atrium scheinen Myozyten aber sowohl endständig als auch in geringerem Ausmaß lateral verbunden zu sein^{17,46,51-54}. Eine vermehrte Lateralisierung, v.a. von gap junctions, wird übereinstimmend für Atrium und Ventrikel als pathomorphologisch beschrieben.

3.2. Gap junctions und Connexine

Die elektrische Aktivität des Myokards erfordert interzellulären Spannungstransfer.

Da es sich bei Kardiomyozyten nicht um ein elektrisches Syncytium handelt, muß die Spannungsübertragung zwischen einzelnen Zellen über spezielle Verbindungen, die gap junctions erfolgen^{21,55,56}. Gap junctions sind Gruppen transmembranärer Kanäle, die im Bereich dieser spezialisierten Regionen der Zellmembran die cytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen direkt verbinden und die Passage von Ionen und Molekülen kleiner als 1 kD ermöglichen^{48,55}. Neben der elektrischen Kopplung kommt den gap junctions durch den Austausch von Metaboliten, Signalmolekülen und anderer molekularer Informationen (u.a. für Differenzierung, Gewebebildung und -entwicklung), also durch die Vermittlung interzellulärer Kommunikation eine fundamentale Aufgabe von den frühen Stadien der Embryogenese bis zur Koordination multizellulärer Funktionen in verschiedenen Geweben zu⁵⁵.

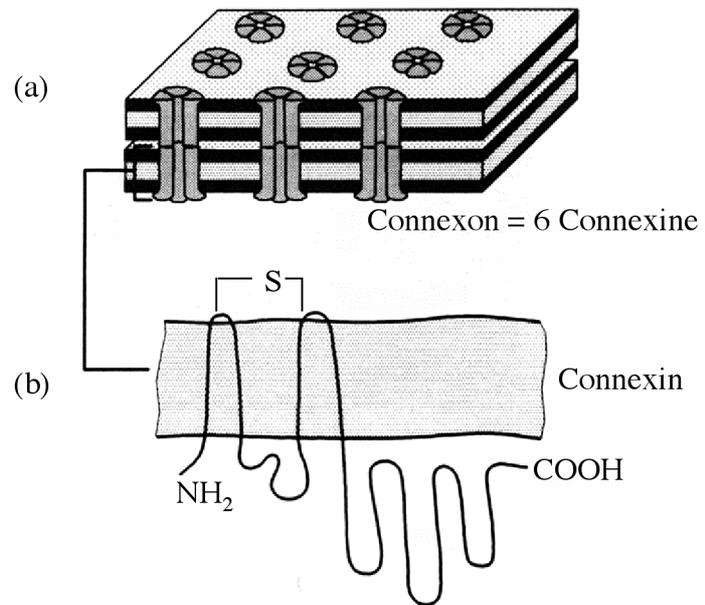
Einzelne, bis zu mehr als 2 μm große gap junctions am Herzen bestehen, je nach Entwicklungszustand und Zelltyp, aus zehn bis hundert oder auch tausend dicht angeordneten, individuellen Kanälen⁵⁷. In den Zellen des Sinusknoten finden sich z.B. nur einzelne kleine gap junctions mit wenigen Kanälen, im Arbeitsmyokard dagegen zahlreiche große, aus vielen Kanälen bestehende Verbindungen^{16,58}.

Jeder einzelne dieser interzellulären Kanäle wird über stabile, nicht kovalente Verbindung zweier Hemikanäle, von denen jeweils einer in der Plasmamembran der benachbarten Zelle lokalisiert ist, gebildet. Die strukturellen Proteine dieser, auch als Connexone bezeichneten, Hemikanäle sind die Connexine. Jedes Connexon ist ein Hexamer aus sechs integralen Connexin-Untereinheiten, die eine zentrale wässrige (1,5 bis 2 nm große) Pore umgeben^{45,57,59}. Einzelne Connexine bestehen aus vier transmembranären hydrophoben Domänen, welche die Lipiddoppelschicht der Zellmembran durchziehen sowie einem intrazellulären Carboxy- und Amino-Ende. Diese vier Domänen werden von einer hydrophilen interzellulären und zwei extrazellulären Schleifen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, getrennt (Abb. 3).

Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz sind die transmembranären und hydrophilen, extrazellulären Abschnitte am einheitlichsten innerhalb der Connexinfamilie, während die stark in Sequenz und Länge variierenden intracytoplasmatischen Regionen vermutlich für die spezifischen Eigenschaften verschiedener Connexinisoformen verantwortlich sind^{48,55}.

Connexine (Cx) gehören einer multigenen Proteinfamilie an, deren verschiedene Mitglieder in unterschiedlichen Zelltypen, Geweben und Spezies exprimiert werden. Insgesamt fünfzehn Connexine^{53,60} mit einer Molekularmasse von 26 bis 50 kD⁵⁸ konnten bisher identifiziert werden, von denen jedes durch ein einzelnes Gen codiert und nach seinem Molekulargewicht benannt wird. Mindestens sechs davon (Cx 50, -46, -45, -43, -40 und -37) wurden in Vertebraten-Herzen, z.T. allerdings nur während bestimmter Entwicklungsstufen (Cx 50) oder innerhalb bestimmter Zelltypen (Cx 37 bisher nur in Endothelzellen u. evtl. auch im Arbeitsmyokard⁶⁰, Cx 46-mRNA wurde in geringen Mengen gefunden, die exprimierenden Zelltypen sind noch nicht identifiziert), nachgewiesen⁵⁸.

Abb. 3: Gap junction-Modell (modifiziert nach Peters et al.⁵⁷). Gap junctions bestehen aus Gruppen einzelner Kanäle. Jeder Kanal wird von einem Connexonpaar gebildet. Connexone bestehen aus jeweils 6 Connexinmolekülen (a). Jedes Connexinmolekül hat vier transmembranäre Regionen mit intrazellulär lokalisiertem Amino- und Carboxyende. Die extrazellulären Anteile werden über Disulfidbrücken verbunden (b).



Transmembranäre Hemikanäle werden als homomer bezeichnet, wenn sie nur eine dieser Connexinisoformen enthalten oder als heteromer, wenn sie aus verschiedenen Connexinen zusammengesetzt sind. Zwei identische, symmetrische Connexone können sich zu einem homotypischen Kanal zusammenlagern, ein heterotypischer Kanal wird dementsprechend von unterschiedlichen Connexonen gebildet. Die Kompatibilität der Connexine hängt dabei von der Sequenz und Struktur der extrazellulären Schleifen ab^{53,58}. Im Herzen sind verschiedene Connexinisoformen in gap junction-Plaques kolokalisiert⁶¹, ob dabei heterotypische und / oder heteromere Kanäle bestehen ist unbekannt^{21,22,53,61-64}.

Kardiomyozyten exprimieren die gap junction Proteine Cx 43, 40 und 45 speziesabhängig in unterschiedlichen Mengen und Kombinationen in verschiedenen Zelltypen und unterschiedlich erregbaren Regionen^{64,65}.

Verallgemeinert kommt Cx 43 nahezu ubiquitär als prinzipielles gap junction Protein im Atrium und Ventrikel und in speziesabhängiger Verteilung auch in den reizleitenden Geweben des Säugerherzens vor. Cx 40 dagegen ist v.a. im Atrium sowie in Endothelzellen der Blutgefäße und, abgesehen vom Meerschweinchen (Cx 40 nur im Atrium exprimiert), in den reizweiterleitenden Geweben^{2,64} vorhanden⁶⁶. Beim Hund ist in Purkinjefasern z.B. dreimal mehr Cx 40 enthalten als im Ventrikel^{65,67}.

Cx 45 ist außer bei Hund und Mensch⁵⁴ überwiegend beschränkt auf den AV-Knoten und den angrenzenden Teil des His' Bündels und isoliert somit die zentralen Leitungsgewebe vom Arbeitsmyokard⁶⁰.

Insgesamt wurden verschiedene Lokalisationen der Cx-Isoformen in verschiedenen Spezies mit widersprüchlichen Ergebnissen beschrieben⁶⁵ (Tab. 2 und 3).

Die einzelnen Connexinisoformen bilden Kanäle mit verschiedenen spezifischen biophysikalischen Eigenschaften, die im Wesentlichen in zwei verschiedenen Systemen (Xenopus Oocyten sowie kommunikations-defizienten Säuger (HeLa-Zellen) ⁵⁸ eingehend untersucht wurden.

Connexin 43-Kanäle weisen, abhängig vom Phosphorylierungszustand (es existieren zwei phosphorylierte und eine unphosphorylierte Form), eine mittlere Leitfähigkeit von 75 pS auf und sind relativ spannungsabhängig, hoch permeabel für Anionen und Kationen sowie pH- und Calciumabhängig ⁵⁸. Im normalen Herzen liegt überwiegend die phosphorylierte Form von Cx 43 vor ²², und zunehmende Dephosphorylierung wird unter ischämischen Bedingungen beschrieben ⁶⁸. Ein additiver Effekt durch eine Zunahme der H⁺- und Ca²⁺-Ionen Konzentration auf verminderte Leitfähigkeit der Cx 43 gap junctions z.B. unter ischämischen Bedingungen sowie eine Dephosphorylierung als Kompensation wird diskutiert ^{58,69}. Die Auswirkungen verschiedener (de-) phosphorylierender Behandlungen auf die Cx 43 Kanalfunktion sind variabel, zumindest teilweise abhängig von Gewebe oder Zelltyp und noch nicht hinreichend untersucht. Noch weniger ist über die Eigenschaften phosphorylierter Isoformen der anderen Connexine bekannt ⁶⁴.

Connexin 40 besitzt die größte einheitliche Leitfähigkeit mit ~ 200 pS und ist sehr kationenselektiv. Ein voll geöffneter Cx 40 Kanal transportiert somit also mehr Ionen als ein dephosphorylierter Cx 43 Kanal.

Zwischen Connexin 40 und 43 wurde am Herzen die bisher einzige Inkompatibilität heterotypische Kanäle zu formen nachgewiesen, während beide Isoformen jedoch mit Cx 45 kompatibel sind ⁵⁸.

Connexin 45 kommt beim Menschen neben Cx 43 in Ventrikelmyozyten, beim Hund jedoch in allen Kardiomyozyten vor und hat mit ~ 20 pS die geringste Weiterleitungsgeschwindigkeit, ist ebenfalls hoch kationenselektiv und sehr pH- und spannungsabhängig ⁵⁸.

Die unterschiedliche Permeabilität von gap junctions hängt von der jeweils vorhandenen Connexinisoform ab, die Leitfähigkeit wird durch transmembranäre Spannungsunterschiede, H⁺- und Ca²⁺- Konzentration, Phosphorylierungszustand ⁶⁸ und extrazellulärer Fettsäurekonzentration moduliert ⁵³.

Tab. 2: Nachgewiesene Connexin 43-Genprodukte in Kardiomyozyten adulter Säugerherzen (modifiziert nach Gros⁵⁸).

	Maus	Ratte	Hamster	Meer- schwein- -chen	Kaninchen	Hund	Schwein	Rind	Mensch
Sinusknoten	nb	- ; ±	+	-	- ; +	- ; ±	-	-	-
Atrium	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AV-Knoten	nb	- ; ±	nb	-	nb	- ; ±	-	-	-
Leitungssystem									
His' Bündel	-	-	nb	+	nb	±	+	+	+
Aufzweigung:									
proximal	-	-	nb	+	nb	+	+	+	+
distal	+	+	nb	+	nb	+	+	+	+
Purkinjefasern	+	+	nb	+	nb	+	+	+	+
Ventrikel	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = entweder Cx 43 mRNA oder Protein wurde definitiv nachgewiesen
 - = weder Cx 43 mRNA noch Protein wurde definitiv nachgewiesen
 +/- = nur schwaches Signal erkennbar
 nb = nicht bekannt
 ; = trennt widersprüchliche Ergebnisse

Tab. 3: Verteilung von Connexin 43 und -40 am Herzen von Ratte und Meerschweinchen (modifiziert nach Gros⁷⁰).

	Ratte		Meerschweinchen	
	Cx 43	Cx 40	Cx 43	Cx 40
Atrium	+	+/-	+	+
Ventrikel	+	-	+	-
His' Bündel	-	+	+	-
Aufzweigungen	-	+	+	-
Purkinjefasern	+	+	nb	nb

+ = entweder Cx 43 mRNA oder Protein wurde definitiv nachgewiesen
 - = weder Cx 43 mRNA noch Protein wurde definitiv nachgewiesen
 +/- = nur schwaches Signal erkennbar
 nb = nicht bekannt

Über die Regulationsmechanismen der Connexinexpression ist derzeit erst wenig bekannt. *In vitro* Untersuchungen an Zellen neonataler Rattenherzen zeigten eine vermehrte Expression von Cx 43 durch cAMP, verbunden mit einer Zunahme der Weiterleitungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale^{53,71}. Eine ähnlich verstärkte Connexinexpression konnte an neonatalen Rattenkardiomyozyten *in vitro* durch Angiotensin II verursacht werden, wobei Angiotensin die Connexin-Synthese verstärkt, während cAMP eher den Connexin-Abbau hemmt^{16,72}.

Der "turnover" vieler Connexine ist mit einer Halbwertszeit von nur ein bis fünf Stunden bemerkenswert schnell^{20,21,73}, wobei die Regulation der Connexin-Synthese, des intrazellulären Transports, der Integration in gap junctions oder des Abbaus erst ansatzweise geklärt ist^{21,73}. Morphologische Studien lassen einen Abbau von gap junctions nach Endocytose vermuten, da sogenannte anulare gap junctions oder vesikuläre Strukturen, die gap junctions beeinhaltend häufig in Zellen innerhalb dissoziierter, ischämischer oder anoxischer Gewebe identifiziert wurden⁷³. Anhand selektiver entweder proteosomaler oder lysosomaler Inhibitoren wurde sowohl ein in unterschiedlichen Zelltypen variierender, parallel oder sequentiell stattfindender, proteosomaler als auch lysosomaler Cx 43-Abbau biochemisch nachgewiesen^{20,72,73}, der in Abhängigkeit vom jeweiligen Phosphorylierungszustand eines Connexins stattzufinden scheint²⁰. Die phosphorylierte Cx 43-Form unterliegt v.a. lysosomalem Abbau während dephosphoryliertes Cx 43 hauptsächlich proteosomal degradiert wird⁷². Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch unklar ob oder inwieweit der Abbau von gap junctions zu abnormaler Reizweiterleitung und Arrhythmogenese beitragen kann. Ein verstärkter Connexin-Abbau und "turnover" wird aber vermutlich verminderte interzelluläre Verbindung und somit verlangsamte Weiterleitung zur Folge haben²⁰.

Eine weitere essentielle Funktion von Cx 43 liegt in der kardialen Morphogenese⁷⁴. In Mausblastomeren existieren funktionsfähige Cx 43-Kanäle bereits ab dem Acht-Zell-Stadium und während der embryonalen Entwicklung wird Cx 43 in zahlreichen Organen exprimiert⁵⁸. Homozygot Cx 43 defiziente (-/-) Mäuse sterben erst kurz nach Geburt aufgrund einer Obstruktion der Pulmonalarterien^{55,58,60,75-78}. Für die Weiterleitung elektrischer Impulse scheinen, zumindest pränatal, also nicht zwingend Cx 43 Kanäle notwendig zu sein. Neuere Daten lassen vermuten, daß Cx 40 und 45, die im fetalen und embryonalen Herzen exprimiert sind, zu diesem Zeitpunkt Cx 43 ersetzen können^{58,60}, wobei auch diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse vorliegen; in einer anderen Studie entwickelten sich Cx 43 -/- Mäuse normal und überlebten bis zum Auftreten von spontaner Arrhythmie und plötzlichem Herztod nach einigen Wochen⁷⁹. Lebensfähige heterozygote Cx 43 knock out Mäuse zeigten keine signifikanten Änderungen in Leitungsgeschwindigkeit oder sonstigen Leitungsparametern, demgegenüber wurden in

einer früheren Studie verlangsamte Weiterleitung bzw. in einer Weiteren nur moderate Veränderungen beschrieben⁶⁰. Verlangsamte Weiterleitung scheint dabei allerdings eindeutig durch verminderte elektrische Kopplung bedingt zu sein, da normale und +/- Mäuse identische aktive Membraneigenschaften haben⁷⁶. Homozygote Cx 40 knock out Mäuse sind trotz verlangsamter Weiterleitung, partiellem AV-Block und teilweise auftretenden Arrhythmien lebensfähig^{56,60,75}. Einige sterben jedoch auch prä- oder neonatal, ohne daß histologisch offensichtliche Defekte erkennbar sind. Heterozygote Cx 43 und -40 Doppelmutanten zeigen einen additiven Effekt auf die ventrikuläre, nicht aber auf die atriale Weiterleitung⁷⁵. Auch wenn zentrale Fragen bisher ungeklärt sind, haben knock out Maus-Modelle gezeigt, daß gap junctions eine wichtige Funktion in der kardialen Morphogenese und der Impulsweiterleitung haben.

Übereinstimmend werden dagegen wesentliche postnatale Veränderungen in der sarkolemmalen gap junction Lokalisation und den damit verbundenen anisotropen Eigenschaften des Myokards beschrieben. Die postnatal zunächst zusammen mit anderen Zellkontakten diffus über die gesamte Zelloberfläche verteilten gap junctions lokalisieren sich erst wesentlich später in ihrer endgültigen Position an den Zellenden und lateralen Zellgrenzen^{13,80}. Dieser kontinuierliche Umbauprozess erstreckt sich speziesunabhängig über einen relativ langen Zeitraum post partum, und die endgültige, adulte gap junction-Verteilung ist am humanen Herzen erst in einem Alter von ca. sechs Jahren erreicht^{13,15,23}.

Zweifelsfrei führen Veränderungen in Verteilung, Dichte und Eigenschaften der gap junctions zu einer veränderten Weiterleitung von Aktionspotentialen und beeinflussen somit die Leitungseigenschaften eines Gewebes unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen⁵³. Spannungs-, pH- und Ionenkonzentrationsabhängigkeit der Kanäle und die komplexen Mechanismen der Connexin-Expressionsregulation bieten zusammengenommen viele verschiedene potentielle Angriffspunkte für pathophysiologische Veränderungen, die zur Entstehung verschiedener kardialer Arrhythmien beitragen.

3.3. Fascia adherens und Cadherin

Die Eigenschaft extremer mechanischer Belastbarkeit und Zugfestigkeit des Glanzstreifens kommt durch die Aktin-bindenden Cadherine der fascia adherens und die Desmin-bindenden Desmoplakine der Desmosomen zustande⁸¹. Fascia adherens und Desmosomen gehören zu der Gruppe der Adhärenzverbindungen und sind verantwortlich für die Anheftung der kontraktilen Filamente und Intermediärfilamente an interzelluläre Verbindungen⁸².

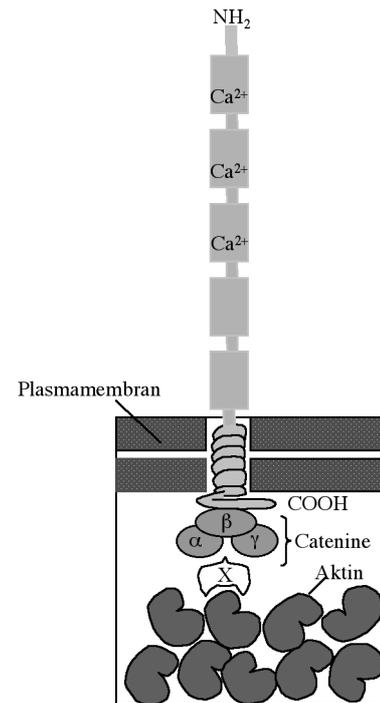
Die meisten Cadherine sind transmembranäre, Ca^{2+} -abhängige Glykoproteine, die homophile Zelladhäsion durch Interaktion mit dem entsprechenden Protein der benachbarten Zelle ermöglichen^{45,83}. Die ursprünglich entdeckten Cadherine wurden nach den Geweben benannt, in denen sie in Adhärenzverbindungen nachgewiesen wurden: E-Cadherin in Epithelzellen, N-Cadherin in Nerven, Herz und Linse und P-Cadherin in Placenta und Epidermis, wobei alle drei während der Entwicklung auch vorübergehend in anderen Geweben exprimiert werden. Inzwischen sind mindestens 12 Cadherine bekannt und zunehmend werden weitere anhand struktureller Homologien beschrieben, wobei die Adhärenzfunktionen noch nicht für alle nachgewiesen wurden und einige auch andere biologische Funktionen haben könnten^{45,84}. Am Herzen kommen neben dem N-Cadherin der fascia adherens in den transversen Anteilen des Glanzstreifens und in Regionen engen lateralen Kontakts zwischen benachbarten Myozyten, auch noch die desmosomalen Cadherine Desmoglein 1,2,3 und Desmocollin 1,2,3 in den Desmosomen des Glanzstreifens vor⁸³.

Die klassischen Cadherine E-, N-, und P sind die am besten untersuchten Repräsentanten dieser Familie. Sie bestehen aus etwa 700 bis 750 Aminosäuren mit einer extrazellulären Domäne, einer einzelnen transmembranären Region und einer hoch konservierten intrazellulären Domäne. Der extrazelluläre Teil ist zu fünf ähnlichen Abschnitten gefaltet, von denen drei die Bindungsstellen für Ca^{2+} enthalten, das N-Terminale Ende bindet spezifisch an das Cadherinmolekül der Nachbarzelle. Der C-Terminus des intracytoplasmatischen Teils interagiert via Catenine mit dem Cytosklett durch F-Aktin-Bindung (Abb. 4).

Catenine sind submembranäre Proteine, die die Verbindung der transmembranären Cadherine an das intrazelluläre Zytoskelett und somit die mechanische Zellkopplung vermitteln⁸⁴⁻⁸⁶.

β - und γ - Catenin (Plakoglobin) binden direkt an Cadherine, bei α -Catenin erfolgt die Bindung an Aktinfilamente über Vinkulin und α -Aktinin⁸³. Dabei werden zwei verschiedene N-Cadherin / Catenin-Komplexe gebildet; in den ersten Stadien in Zellkultur tritt N-Cadherin mit α - und β -Catenin auf, während morphologischer Veränderungen nach der Etablierung der Zelladhäsion bestehen v.a. Verbindungen aus N-Cadherin mit α -Catenin und Plakoglobin.

Abb. 4: Schematische Darstellung eines Cadherin-Moleküls. Der extrazelluläre Teil des Moleküls ist zu fünf ähnlichen Domänen gefaltet; drei davon enthalten die Bindungsstellen für Ca^{2+} . Der intracytoplasmatische Teil tritt über mehrere intrazelluläre Anheftungsproteine in Wechselwirkung mit dem Aktin des Cytoskeletts. Zu den Anheftungsproteinen gehören die Catenine (α -, β - und γ -Catenin), X stellt nicht charakterisierte Anheftungsproteine dar (modifiziert nach Alberts: Molekularbiologie der Zelle⁴⁵).



Neben der mechanischen Verbindung des Kardiomyozytenverbandes werden weitere wesentliche Funktionen von N-Cadherin diskutiert. Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang zwischen N-Cadherin und Zelldifferenzierung, Morphogenese, Myofibrillogenese sowie der Neubildung von Glanzstreifen mit dem nachfolgenden Einbau von gap junctions. Spezifische Cadherine stimulieren die Entwicklung spezifischer Gewebe⁸⁴. Im präkardialen Mesoderm von Hühnerembryonen wurde N-Cadherin bereits nach der Gastrulation nachgewiesen und N-Cadherin-Null-Mutante Mäuseembryonen weisen schwere Adhäsionsdefekte zwischen lose angeordneten Kardiomyozyten, die kein funktionsfähiges Myokard ausbilden können, auf⁸⁶.

Antikörper gegen N-Cadherin hemmen die Kontraktion sowohl des Myozytenverbandes, als auch einzelner isolierter Myozyten in embryonaler Hühnerzellkultur, die Ausbildung von Zellkontakten sowie die Myofibrillenentwicklung und -organisation wurden signifikant vermindert^{85,87}.

Adhärenzverbindungen spielen eine zentrale Rolle in der kardialen Morphogenese. Die essentielle Funktion von N-Cadherin bei der Formation Glanzstreifen ähnlicher Strukturen wurde anhand von adulten Rattenkardiomyozyten-Kulturen (ARC) *in vitro* eingehend untersucht. Das „De- und Redifferenzierungsmodell“ von ARC in Langzeitkultur bietet die Möglichkeit, den genauen zeitlichen Ablauf und die Zusammenhänge der Myofibrillogenese, der Regeneration des cytoskelettären Apparates und der Wiederherstellung mechanischer und elektrischer Kopplung zwischen redifferenzierenden Kardiomyozyten nachzuvollziehen. Da ARC keine Zellteilung oder Fortbewegung zeigen, besteht die einzige Möglichkeit der interzellulären Kontaktneubildung in der Vergrößerung des Zellvolumens und der

Ausbildung von Pseudopodien. Somit eignet sich ARC allgemein als *in vitro* Modell des embryonalen, neonatalen oder auch des hypertrophierten Herzens, bei dem es im Terminalstadium einer DCM zu schweren Beeinträchtigungen des Cytoskeletts und ultrastrukturellen Veränderungen des Glanzstreifens kommt^{82,86,88}. Mikroinjektion korrespondierender cDNA einer nicht funktionellen Hühner-N-Cadherin-Mutante mit überwiegend deletierter extrazellulärer Domäne in ARC-Zellkerne, führt zu einem massivem Verlust von Zellkontakten; Zellkontaktverlust erfolgt ebenfalls nach Ca^{2+} Entzug aus dem Medium. Bei Injektion von N-Cadherin mit mutiertem C-Terminus war zusätzlich die Sarkomerogenese beeinträchtigt⁸⁵.

3.4. Fascia adherens und gap junctions

Zahlreiche Studien an verschiedenen Zelltypen *in vitro* sowie tierischem und menschlichem Myokard geben Hinweise darauf, daß N-Cadherin auch eine wesentliche Bedeutung für die Formation von gap junctions innerhalb des Glanzstreifens hat⁸⁹. Mit Anti-N-Cadherin-Antikörpern behandelte Zellen kontrahieren nicht mehr synchron, was auf eine Beeinflussung der gap junctions schließen läßt. Die Injektion mutierter, nicht funktioneller N-Cadherin-cDNA führt neben der Zerstörung der Fascia adherens auch zu Dissoziation von gap junctions^{85,87}.

Im ARC-Modell scheinen N-Cadherin / Catenin-Komplexe während der Redifferenzierung die Voraussetzung für den nachfolgenden Einbau von gap junctions in den Glanzstreifen zu sein^{82,85,88}:

Während des Dedifferenzierungsprozesses der Myozyten ist Connexin (Cx) 43 im Gegensatz zu N-Cadherin noch im Bereich der Plasmamembranen, in dem sich die Zellkontakte bereits aufzulösen beginnen, nachweisbar. Die gap junctions können, bei Verlust der Ca^{2+} abhängigen fascia adherens, allein keinen intakten Glanzstreifen mehr aufrecht erhalten⁸⁵, werden selbst aber erst nach etwa 24 h in Kultur internalisiert und degradiert⁸². Im Verlauf des nachfolgenden Redifferenzierungsvorganges führt N-Cadherin zusammen mit den Cateninen als primärer Zellkontakt erst zum Einbau von Cx 43 in gap junctions^{82,88}. Während der ersten Tage in Kultur ist neben Desmoplakin und N-Cadherin nur wenig Cx 43 immunhistochemisch nachweisbar. Auch nach der beginnenden Glanzstreifenneubildung durch Desmoplakin, N-Cadherin, α -Catenin und Plakoglobin sind noch keine gap junctions vorhanden.

Erst nachdem sich N-Cadherin und α - und β - Catenin bereits im neuen Glanzstreifen organisiert haben und transmembranäres N-Cadherin durch Ausbildung Reißverschluß ähnlicher Strukturen die benachbarten Zellmembranen

stabilisiert und angenähert hat, wird die gap junction Formation ermöglicht und es erfolgt eine schnelle Akkumulation von Cx 43⁸².

Ca²⁺ - Entzug bewirkt Protease vermittelten Abbau der extrazellulären Domäne des N-Cadherins. Eine gap junction Zerstörung erfolgt daraufhin ebenfalls, wahrscheinlich aufgrund der Zerstörung N-Cadherin vermittelter Zellkontakte. Dieser Prozeß ist in Kultur reversibel; bei Ca²⁺-Substitution und 27°C, sind sowohl N-Cadherin als auch Cx 43-Vesikel an der Plasmamembran kolokalisiert, ohne jedoch Zellkontakte zu bilden. Ein Einbau von N-Cadherin und nachfolgend auch Cx 43 erfolgt sequentiell bei 37°C.

Desweiteren wurde N-Cadherin als wichtige Determinante für die postnatale Dynamik der räumlichen Verteilung von gap junctions im humanen ventrikulären Myokard beschrieben⁸²:

Die elektrischen und mechanischen Interaktionen zwischen Kardiomyozyten verändern sich altersabhängig aufgrund einer ebenso alters- und eventuell anforderungsbedingt unterschiedlichen Verteilung von gap junctions und N-Cadherin. Diese Umverteilung setzt sich, aufgrund verschiedener Reifestadien bei Geburt speziesabhängig, mehrere Jahre post partum fort und ist beim Menschen erst in einem Alter von etwa sechs Jahren abgeschlossen⁷⁴. Veränderungen in der Verteilung interzellulärer Verbindungen sind wahrscheinlich parallel zu den sich, von schnellem Wachstum und veränderter Hämodynamik zu stabiler Verbindung und schneller Weiterleitung, ändernden Anforderungen des sich entwickelnden Myokards zu sehen. Während dieser Entwicklung besteht ebenfalls eine enge Assoziation zwischen gap junctions und fascia adherens. Am neonatalen humanen Ventrikelmyokard ist Cx 43 und N-Cadherin diffus und punktförmig über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Mit fortschreitendem Alter erfolgt eine linear zunehmende Polarisierung der Zellverbindungen an transversen Glanzstreifen an den Zellenden, wobei gap junctions, fascia adherens und Desmosomen v.a. initial nicht immer unmittelbar kolokalisiert sind, sondern gap junctions auch häufig isoliert vorliegen⁷⁴. Auch in atrialem humanen Myokard wurde eine solche postnatale Umverteilung von Cx 43 nachgewiesen¹³. Im ventrikulären Myokard von Hund und Ratte wurden ähnliche postnatale Umbauprozesse beschrieben, wenn auch mit einer höheren Divergenz zwischen N-Cadherin und Connexinen. Hier bleiben die gap junctions länger dispers und später noch lateral verteilt, während sich fascia adherens und Desmosomen bereits schneller an die Zelltermini verlagern. Erst fast gegen Ende des Wachstums der Tiere liegen gleiche Proportionen aller drei Verbindungen im Glanzstreifen vor⁸⁹.

Speziesunabhängig ist das postnatale remodeling der Zellkontakte bis zur Formation des maturaen Glanzstreifens von veränderten Weiterleitungs-

eigenschaften des Gewebes begleitet. Die in Purkinjellen und Atrium nachgewiesenermaßen zunehmende postnatale Leitungsgeschwindigkeit wurde mit erhöhter Anisotropie assoziiert. Die Dauer der ventrikulären Depolarisation nimmt nur um ~20% gegenüber einem sechzehnfachen Anstieg des Herzgewichtes in den ersten Lebensjahren zu. Das neonatale bzw. juvenile Verteilungsmuster der Zellverbindungen scheint somit die für Gesamtgeometrie und Pumpfunktion des Organs während des schnellen Wachstums benötigten Zellkontakte zu gewährleisten und sich den altersbedingt wechselnden Anforderungen anzupassen ⁷⁴.

Verteilungsänderungen von N-Cadherin sowie Connexinen während des Wachstums sind mit der Entstehung uniformer elektrischer Anisotropie korreliert, die am adulten Myokard für schnelle und geordnete Impulsweiterleitung notwendig ist ⁸⁹.

3.5. Extrazelluläre Matrix

Das Myokard besteht neben den eigentlichen Kardiomyozyten zu einem erheblichen Teil aus extrazellulärem Raum, der überwiegend von einem komplexen Makromolekülnetzwerk, der extrazellulären Matrix (EZM) ausgefüllt ist ⁴⁵. Diese EZM bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Gewebes und dient der Aufrechterhaltung einer funktionellen Struktur. Als stabiles Grundgerüst gewährleistet sie durch Fixierung sämtlicher zellulärer Elemente eines Gewebes und deren Verankerung über die Zellmembran an das innere Cytoskelett jeder Zelle sowohl die Stabilität der zellulären Architektur, als auch durch Kraftaufnahme und -übertragung den Widerstand gegenüber mechanischen Kräften, die während der Kontraktionszyklen auftreten ^{81,90,91}. Die Regulation zahlreicher Zellfunktionen wie Entwicklung, Bewegung, Vermehrung, Form und Stoffwechselfunktion werden ebenfalls entscheidend von der EZM beeinflusst ^{45,92}.

Zahlreiche unterschiedliche Polysaccharide und Proteine, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden und sich dann mit diesen zu einem strukturierten Geflecht zusammenlagern, bilden die Bestandteile der EZM.

Unterschieden werden zwei Hauptklassen extrazellulärer Makromoleküle, die Glykosaminoglykane und die sogenannten Faserproteine. Glykosaminoglykane sind Polysaccharide, die meist an Proteine gekoppelt sind und dann als Proteoglykane im Extrazellulärraum vorliegen. Glykosamin- und Proteoglykane bilden eine stark wasserhaltige, gelartige, die schnelle Diffusion hydrophiler Moleküle ermöglichende Grundsubstanz, in die die Faserproteine eingebettet sind. Letztere lassen sich anhand ihrer Funktion nochmals in Struktur- und Anheftungsproteine unterteilen.

Zu den Strukturproteinen zählen die für Zugfestigkeit, Stabilität und Elastizität des Gewebes verantwortlichen Kollagene und Elastin. Anheftungsproteine wie Fibronectin oder Laminin stellen die Verbindung der EZM zu anderen Zellen (Fibroblasten) bzw. der Basalmembran her.

Kollagene stellen die Hauptbestandteile der EZM dar. Bisher wurden ~ 25 verschiedene Kollagen- α -Ketten nachgewiesen, die jeweils von einem eigenen Gen codiert werden und sich in verschiedenen Geweben auf unterschiedliche Weise zu dreisträngigen Kollagentypen zusammenlagern. Mindestens 15 dieser unterschiedlichen Kollagentypen sind bekannt. Die fibrillären Kollagene I, II, III, V und XI lagern sich im Extrazellularraum zu geordneten polymeren Kollagenfibrillen, mit einem Durchmesser von 10 bis 300 nm und einigen μm Länge und diese wiederum oft noch zu größeren, kabelartigen Kollagenfaserbündeln zusammen. Die sich auf der Oberfläche dieser Fibrillen befindenden Kollagentypen IX und XII werden als Fibrillen assoziierte Kollagene bezeichnet und verknüpfen die Fibrillen untereinander sowie mit anderen Bestandteilen der EZM. Kollagen IV und VII sind sogenannte netzbildende Kollagene. Kollagen IV hat eine biegsamere Struktur als fibrilläre Kollagene und bildet zusammen mit Fibronectin und Laminin die Basalmembran der Zellen⁴⁵. Basalmembranen sind zusammenhängende, dünne, zwei bis dreischichtige, spezialisierte Strukturen der EZM, die Zellen von dem sie umgebenden Bindegewebe trennen und, je nach Zelltyp, als hochselektiver Filter strukturgebend und polarisierend wirken sowie Einfluß auf Zellstoffwechsel und -differenzierung haben.

Im adulten Myokard wurden bisher fünf Kollagentypen (I, III, IV, V, VI) identifiziert.

Kollagen I und III repräsentieren als feine fibrilläre Strukturen im gesamten Interstitium mehr als 90% des gesamten Kollagengehalts und weisen eine charakteristische dreisträngige Helix-Struktur aus drei Kollagen-Polypeptidketten, sogenannten α -Ketten, die umeinander gewunden sind, auf⁹².

Kollagen I, Hauptkollagentyp von Knochen und Sehnen, bildet dickere Fibrillen, während Kollagen III, ansonsten v.a. in Haut und Blutgefäßen vorkommend, eher ein retikuläres Netzwerk darstellt⁹². Kollagen VI, ebenfalls ubiquitär im Extrazellularraum vorhanden, unterscheidet sich von den anderen Kollagenen durch eine wesentlich feinere Struktur aus dünnen (5-10nm) Filamenten.

Aufgebaut aus zwei Ketten (α - und β -), mit einem Molekulargewicht von 140 und 250 kD und einem hohen Anteil globulärer Strukturen sowie ausgeprägter Disulfidbrückenverbindung, formiert sich Kollagen VI bereits intrazellulär zu Di- und Tetrameren, während die anderen Kollagene zunächst als Monomere

sezerniert werden und sich erst im Extrazellularraum verbinden. Die triple-Helices von Kollagen I und III weisen im Vergleich nur etwa ein Drittel dieses Molekulargewichtes auf⁹².

Kollagen IV ist als Bestandteil der Basalmembran in Myozyten sowie den Endothelzellen der Kapillaren lokalisiert⁹².

Fibronectin, ein weiteres wesentliches Protein der EZM, zeichnet sich durch zahlreiche spezifische Bindungsstellen für Kollagene, daneben für Heparin, Fibrin, Faktor XIIIa, Proteoglykane und viele Zelltypen aus und ist über Integrine eng mit Bestandteilen des Cytoskeletts (Vinculin, Talin) und Aktinfilamenten verknüpft⁹³. Dieses dimere Glykoprotein besteht aus zwei Ketten, die an den Carboxyenden über Disulfidbrücken verbunden sind, hat ein Molekulargewicht von 440 kD, tritt im Plasma, anderen Körperflüssigkeiten sowie in vielen Geweben auf und hat neben der Verbindung extrazellulärer Matrixproteine untereinander und mit dem Cytoskelett vielfältige Funktionen, u.a. in der Blutgerinnung und Wundheilung. Im Myokard ist Fibronectin ähnlich wie Kollagen VI homogen im Interstitium verteilt und ebenfalls ein Bestandteil der Basalmembran⁹⁴.

Aufgrund der engen Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett wirken sich Veränderungen im Inneren der Kardiomyozyten auch auf die Zusammensetzung der EZM aus. Umgekehrt führen fibrotische Veränderungen im Extrazellularraum nicht nur zur morphologischen Separation, sondern auch zur funktionellen Beeinträchtigung des Myozytenverbandes⁹³; längere Diffusionswege wirken sich negativ auf den Sauerstoff- und Substrataustausch aus, die elektrische Kopplung und somit koordinierte Kontraktion wird behindert und die kardiale Compliance durch insgesamt erhöhte Steifigkeit und veränderte Zellgeometrie vermindert^{95,96}. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Intra- und Extrazellularraum wurden von Schaper et al.^{90,92,93,97} in verschiedenen Studien, u.a. am Beispiel der DCM, eingehend untersucht und belegt. Eine primäre Kardiomyozytenschädigung unterschiedlicher Art, gefolgt von degenerativen Veränderungen bis zur Apoptose oder Nekrose, führt zur Sequestrierung von Zellbestandteilen in den Extrazellularraum. Dort werden daraufhin einerseits Monocyten zur Phagozytose und Fibronectinbildung und andererseits Fibroblasten zur Produktion verschiedener Proteine der EZM stimuliert. Eine so ausgelöste Zunahme der EZM führt wiederum zu einer weiteren Schädigung der Myozyten⁹⁷.

Strukturelles remodeling an sich stellt eine der fundamentalen adaptiven Reaktionen des Herzens auf pathologische Bedingungen dar, kann aber andererseits häufig auch maladaptive Konsequenzen zur Folge haben. So reduziert z.B. der Ersatz infarzierten Myokards mit fibrösem Narbengewebe die Wahrscheinlichkeit einer fatalen Ruptur und unterstützt die Aufrechterhaltung der

ventrikulären Geometrie, kann aber gleichzeitig auch entscheidend negativen Einfluß auf die elektrische Kopplung der Myozyten haben und u.U. zur Arrhythmieentstehung beitragen^{21,72}. Fibrotische Veränderungen treten im Rahmen zahlreicher pathologischer Prozesse am Herzen auf und wurden detailliert am insuffizienten Herzen bei Hypertonie, Ischämie und DCM beschrieben^{21,72}.

Auch im Zusammenhang mit atrialen oder ventrikulären Arrhythmien und veränderten Leitungseigenschaften wurde in verschiedenen Studien eine unterschiedlich starke Zunahme der EZM beschrieben, z.T. in enger Korrelation mit Veränderungen in der Connexinexpression und gap junction Verteilung.

Grundsätzlich werden drei Formen der Fibrose unterschieden. Bei der interstitiellen Fibrose sind die feinen Kollagenstränge und Septen, die einzelne Muskelfasern umgeben und separieren, je nach Ausmaß lokal, diffus oder generalisiert, unterschiedlich stark, bis hin zur Isolierung einzelner Myozyten durch ein dichtes Kollagennetzwerk, verbreitert.

Fokale, evtl. auch konfluierende Bereiche mit Ersatzfibrose resultieren aus Zerstörung und anschließender Reparatur des Myokards und sind eindeutig gekennzeichnet durch ihre Lokalisation im Zusammenhang zum umgebenden Myokard, die ein ehemaliges Vorhandensein von Myozyten an diesen Stellen indiziert⁹⁸. Perivaskuläre Fibrose der Adventitia intramyokardialer Arterien oder Venen ist meist mit größeren, mehr peripheren Gefäßen innerhalb von Bindegewebssepten assoziiert.

Manche Autoren⁹⁸ unterscheiden zusätzlich noch eine vierte Form, die sogenannte plexiforme Fibrose, bei der ein „Kollagenrasen“ ungeordnet und diffus das gesamte Myokard infiltriert, häufig kombiniert mit dem Bild des sogenannten „myofiber-disarray“ bei DCM.

Für den Zusammenhang zwischen fibrotischen Veränderungen und der Art der Beeinträchtigung der Herzfunktion, ist das Verhältnis der einzelnen Kollagene zueinander wegen ihrer unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von Bedeutung. Veränderungen bei DCM sind von einer präferentiellen Zunahme v.a. von Kollagen I bei einem gleichbleibenden oder u.U. verminderten Kollagen III Anteil gekennzeichnet und resultieren so in vermehrter Steifigkeit und reduzierter Elastizität des Gewebes⁹¹.

3.6. Degeneration, Nekrose und Apoptose

3.6.1. Degeneration und Ubiquitin

Unter dem Begriff Degeneration werden vielfältige morphologische und funktionelle Veränderungen aufgrund verschiedenster zellulärer Stoffwechselstörungen zusammengefaßt. Defizite an Sauerstoff oder essentiellen Substraten, Enzymblockaden und Mitochondrienschädigung oder auch direkte cytotoxische Noxen sowie mechanische oder thermische Überbelastung sind einige der vielfältigen Ursachen, die allgemein degenerative Veränderungen in Geweben auslösen können.

Die meisten pathologischen Vorgänge am Herzen werden immer auch von mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Degenerationserscheinungen begleitet.

Die wichtigsten ultrastrukturellen Kennzeichen degenerierter Kardiomyozyten sind gestörte Anordnung und Verlust von kontraktilem Material mit teilweisem Ersatz durch glykogenhaltiges unspezifisches Cytoplasma, Verlust von Zellorganellen, Ansammlung von in Größe und Form stark variierenden Mitochondrien sowie lysosomalen Vakuolen, unregelmäßig geformte und z.T. vergrößerte Zellkerne mit irregulärer Chromatinverteilung^{29,52,95,99}.

Auch im Zusammenhang mit chronischen Arrhythmien und Vorhofflimmern wurden verschiedengradige degenerative Veränderungen beschrieben.

Der Abbau degenerierter Zellorganellen bzw. falsch gefalteter oder fehlerhaft zusammengelagerter Proteine erfolgt im Cytoplasma betroffener Zellen auf verschiedenen Wegen. Die meisten cytosolischen und nukleären Proteine sowie einige Membranproteine werden proteosomal degradiert, während Lysosomen v.a. Membranproteine und extrazelluläres, über Endocytose in die Zelle gelangtes Material abbauen⁷³.

Der Ubiquitin abhängige proteolytische Reaktionsweg stellt eine dieser Möglichkeiten des selektiven Proteinabbaus dar. Ubiquitin ist ein intracytoplasmatisches, hitzestabiles Protein aus 76 Aminosäuren, das sich an freiliegende, sogenannte destabilisierende Aminosäuresequenzen abzubauen Proteine anlagert. Die Anheftung eines einzelnen Ubiquitin-Moleküls an ein Protein ist eine reversible Modifikation mit regulatorischer Funktion. Erst die enzymatisch katalysierte Verbindung einer verzweigten Multiubiquitin-Kette mit dem Protein hat dann einen schnellen Abbau dieser konjugierten Proteine durch eine ATP-abhängige Protease (26 S -Proteosomen-Komplex) mit anschließender Ubiquitinfreisetzung und Reutilisierung zur Folge^{45,100,101}.

Die Proteolyse über das Ubiquitin-System ist in verschiedene grundlegende zelluläre Vorgänge wie Regulation von Zellzyklus und -teilung, Modulation von Immun- und Entzündungsreaktionen, Entwicklung und Differenzierung oder Kontrolle von Signalübertragungswegen, wie Zelloberflächenrezeptoren und Ionenkanälen, integriert^{100,102}. Aufgrund des breiten Spektrums an Proteinsubstraten und involvierten Enzymen, ist Ubiquitin auch an der Pathogenese vieler Erkrankungen, darunter maligner Tumoren, neurodegenerativer Veränderungen oder Muskeldegenerationen, beteiligt. Die allgemeinen Mechanismen des Ubiquitin-Systems sowie dessen Regulation und Spezifität, sind im Einzelnen noch nicht genau bekannt.

Spezifische, gegen Ubiquitin gerichtete, fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen den immunhistochemischen Nachweis intrazellulärer, degenerativer Abbauvorgänge.

3.6.2. Nekrose und Komplementsystem

Eine völlige Zellzerstörung infolge irreversibler Zellschädigung wird als Nekrose bezeichnet¹⁰³ und tritt häufig im Endstadium fortgeschrittener Degenerationsformen mit Karyorhexis, -lysis und irregulärem DNA-Abbau auf.

Der Abbau nekrotischen Zellmaterials erfolgt u.a. mit Hilfe des Komplementsystems, einem komplexen System von etwa 20, miteinander in Wechselwirkung stehenden, zunächst inaktiven Serum-Proteinen⁴⁵. Diese können auf verschiedenen Wegen^{104,105}, klassisch von Antigen-Antikörper-Komplexen oder Antikörper unabhängig, lektinvermittelt von Mikroorganismen sowie auf alternativem Weg von ansonsten als „körperfremd“ erkannten Strukturen, aktiviert werden und unterstützen die Wirkung von Antikörpern, aktivieren phagozytierende Zellen und fördern allgemein inflammatorische Abläufe. Die Aktivierung des Komplement-Systems setzt eine Kaskade proteolytischer Reaktionen mit zahlreichen biologischen Schutzfunktionen in Gang, welche letztlich zur Bildung sogenannter Membranangriffs-Komplexe führt, die durch endgültige Destabilisierung der Zellmembran eine osmotisch bedingten Lyse der abzubauenen Zellen verursachen^{45,106}.

Das Komplementsystem leistet so einen entscheidenden Beitrag zur unspezifischen Abwehr, kann aber daneben potentiell auch zur Schädigung körpereigener Zellen beitragen, was jedoch unter physiologischen Verhältnissen durch zahlreiche protektive Systeme verhindert wird; an der Kontrolle der Komplementaktivierung sind fast genauso viele membrangebundene oder Plasmaproteine¹⁰⁵ beteiligt, wie C-Faktoren vorhanden sind. Eine exzessive oder falsch lokalisierte

Komplement-Aktivierung trägt über die entstehenden proinflammatorischen Produkte zur Gewebeschädigung und Pathogenese verschiedener Krankheiten bei ¹⁰⁶.

Die Bedeutung der Komplementkomponenten in klinisch relevanten, pathologischen Prozessen bei Autoimmunerkrankungen, Ischämie und Arteriosklerose des kardiovaskulären Systems, malignen Tumoren, Glomerulonephritis oder Xenotransplantationen ist noch nicht vollständig untersucht ¹⁰⁷. Aus verschiedenen Bereichen liegen aber Hinweise vor, daß der therapeutische Einsatz von Komplement-Inhibitoren das Ausmaß der Gewebeschädigung während solcher Prozesse reduzieren kann ^{107,108}. Humanes Myokard enthält mRNA für alle Komplementfaktoren, und ischämische Bedingungen oder chronische Kardiomyopathien verursachen eine erhöhte Komplement-Expression und Deposition im Myokard ^{105,109} sowie erhöhte Komplement-Serumspiegel ¹¹⁰. Versuche am Rattenherzen ergaben eine Reduktion der Infarktgröße um 60% nach Applikation von Antikörpern gegen C5 ¹⁰⁷.

Der immunhistologische Nachweis des finalen Komplementfaktors der Kaskade, C9, wird als sensitiver Nachweis akuter myokardialer Schädigung genutzt.

In mit Hilfe spezifischer Anti-C9-Antikörper untersuchten Autopsie-Proben sowie am neonatalen und fetalen menschlichen Herzen, korrelierte die Anzahl C9-positiver Zellen eindeutig mit klinischen und pathologischen Befunden, auch wenn, wie z.B. in sehr frühen Infarktstadien oder bei vorliegenden bereits schädigenden Risikofaktoren, mit konventioneller histologischer Untersuchung noch keine Gewebeschädigung feststellbar war ^{109,111}.

3.6.3. Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte suizidale Zelltod bezeichnet. Verschiedene Erkrankungen (darunter Karzinome, Autoimmunkrankheiten, etc.) werden vermutlich durch fehlerhafte genetische Determination apoptotischer Vorgänge hervorgerufen ¹¹², und Apoptose scheint auch zu der Entstehung verschiedener Herzerkrankungen bei akuten oder chronisch ischämischen Bedingungen maßgeblich beizutragen ¹⁰³.

Die aktive Selbstzerstörung von Kardiomyozyten ist durch charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Bildung sogenannter „apoptotic bodies“ bei - im wesentlichen Unterschied zur Degeneration - gleichzeitigem Vorhandensein normaler Mitochondrien und intakter Zellmembran gekennzeichnet. Ein weiteres Charakteristikum apoptotischer Zellen ist die DNA-Fragmentierung in gleich große Fragmente (Nucleosomen) von 185 bis 200 bp, die auch die Basis eines der verschiedenen Apoptose-Nachweise, der

TUNEL-Methode, darstellt^{103,113}. Desweiteren unterscheidet sich Apoptose von degenerativen Vorgängen oder Nekrose durch das Fehlen entzündlicher Reaktionen, Zelldebris werden durch Makrophagen abgebaut. Während ischämisch oder inflammatorisch bedingte degenerative oder nekrotische Veränderungen i.d.R. Gruppen benachbarter Zellen betreffen, unterliegen der Apoptose meist nur einzelne Zellen¹⁰³.

Im Myokard tritt Apoptose, im Gegensatz zu sich permanent teilenden und regenerierenden Geweben wie Intestinum oder Thymus, nur extrem selten auf. Bisher existieren nur wenige Publikationen über Apoptose am menschlichen Herzen, deren Ergebnisse, z.T. aufgrund technischer Limitationen der verschiedenen Nachweismöglichkeiten, zudem stark variieren^{103,113}.

Ausgehend von der Möglichkeit, daß persistierende pathologische Voraussetzungen wie chronische Druck-Volumen-Überlastung oder erhöhte Herzfrequenz in einzelnen strukturell geschädigten Kardiomyozyten programmierten Zelltod aktivieren könnten, wurde in einer morphologischen Untersuchung an humanem Atrium von Patienten mit diesen Voraussetzungen aufgrund diverser Herz-erkrankungen das Auftreten von Apoptose bei atrialer Dilatation und Vorhofflimmern beschrieben.

3.7. Sarkomerproteine

3.7.1. Aktin

Alle eukaryotischen Zellen enthalten, neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, Aktinfilamente als Bestandteile des Zytoskeletts⁴⁵. In Muskelzellen bildet Aktin zusammen mit Myosin den Hauptbestandteil der Myofibrillen.

Einzelne globuläre Aktinmoleküle (G-Aktin) sind Polypeptide aus 375 Aminosäuren, die ein eng gebundenes ATP-Molekül tragen und sich zu einer polaren, eng gewundenen Helix zusammenlagern (F-Aktin).

In Säugergeweben existieren mindestens sechs verschiedene Aktin-Isoformen, die anhand ihres isoelektrischen Punktes in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. α -Aktin kommt in den verschiedenen Muskelgeweben, β - und γ -Aktin in Nicht-Muskelzellen vor.

Wie auch im Skelettmuskel bilden die Aktinfilamente in Kardiomyozyten einen motilen Komplex mit Myosinfilamenten und durch die bekannte Wechselwirkung der beiden Filamente wird die Verkürzung der Sarkomere und somit die Muskelkontraktion ermöglicht.

F-Aktin läßt sich mit Fluorochrom-konjugiertem Phalloidin, dem Toxin des Knollenblätterpilzes, histochemisch in Form einer regelmäßigen Querstreifung darstellen.

3.7.2. α -Aktinin

α -Aktinin ist eines der Aktin-bindenden Proteine und führt zur Quervernetzung zweier Aktinfilamente und ihrer Verankerung im Z-Streifen und Glanzstreifen. Bei den verschiedenen Isoformen von α -Aktinin (α -Aktinin-3 des Skelettmuskels, -2 der Herzmuskulatur, -1 der glatten- und Nicht-Muskelzellen) handelt es sich um Dimere aus zwei identischen Polypeptidketten, deren N-Terminus Bindungsstellen für die Aktinmoleküle besitzt.

Auch α -Aktinin stellt sich in Kardiomyozyten, gebunden an markierte spezifische Antikörper, in Form einer regelmäßigen Querstreifung dar.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewebe

1.1. Gewebeherkunft

In dieser Studie wurde ausschließlich humanes atriales Myokard untersucht. Dieses Material stammte von Patienten, die sich aufgrund chronischen, nicht pharmakologisch therapierbaren Vorhofflimmerns sowie verschiedengradiger Dilatation eines oder beider Vorhöfe, einer Maze-Operation unterziehen mußten.

1.2. Maze-Operation

Bei dieser OP werden, wie in Abschnitt II. 2.2. genauer ausgeführt, unterschiedlich große Bereiche des dilatierten Atriums entfernt, um die Entstehung und Ausbreitung sogenannter reentry-Kreisläufe durch gezielte Reduktion der Vorhofgröße zu unterbinden.

1.3. Klinische Daten

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 31 Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 65 Jahren, einer Erkrankungsdauer von durchschnittlich 6 Jahren und einer mittleren rechten Atriumgröße von 56 mm. Nur ein Patient litt an sogenanntem "lone atrial fibrillation", d.h. idiopathischem Vorhofflimmern ohne Vorliegen einer weiteren erkennbaren Grunderkrankung. Bei den restlichen Patienten wurden neben der Arrhythmie ein oder auch mehrere gleichzeitig bestehende Klappendefekte und Koronarerkrankungen diagnostiziert.

Die Ejektionsfraktion lag bei einem Mittelwert von 47,9 bei einem durchschnittlichen linksventrikulären endsystolischen Durchmesser von 34,4 mm bzw. enddiastolischen Durchmesser von 55,4 mm.

Drei Monate post operativ war die Vorhofgröße auf durchschnittlich 50 mm verringert; 20 der Patienten zeigten Sinusrhythmus, 5 dagegen erneut Vorhofflimmern und 3 Sick-Sinus-Syndrom / Vorhofflimmern; 3 Patienten verstarben in diesem Zeitraum. Genaue Daten zum Patientenkollektiv sind Tab. 4 zu entnehmen.

Bei 10 der Maze-Patienten wurde Gewebe aus dem rechten Atrium entnommen, von den restlichen 21 wurde Material aus dem rechten Appendix zur Verfügung gestellt.

Tab. 4: Klinische Daten von Maze- und Kontroll-Patienten

	Vorhofflimmern	Sinusrhythmus
n	31	12
Alter (mean)	65,4 (41-83)	50,3 (34-70)
Dauer AF in Jahren	6,2 (1-22)	0
Grunderkrankung:		
KHK	3	3
KHK u. VD	8	1
DCM	0	6
MVD	9	1
AVD	3	0
TVD	1	1
CVD	6	0
LAF	1	0
Größe rechtes Atrium [mm]	56,2 (33-69)	53,1 (33-69)
Größe linkes Atrium [mm]	64,2 (51-83)	61,6 (40-75)
Linksventrikuläre Funktion:		
EF [%]	47,9 (20-60)	43,5 (20-65)
LVESD [mm]	34,4 (19-48)	32,7 (12-60)
LVEDD [mm]	55,4 (40-71)	56,1 (49-71)
Zustand post OP:		
SR 3 Mo p.OP	20	
AF 3 Mo p.OP	5	
SSS/AF 3 Mo p.OP	3	
verstorben 3 Mo p.OP	3	

KHK = koronare Herzerkrankung

VD = valve disease

DCM = dilatative Kardiomyopathie

MVD = mitral valve disease

AVD = aortic valve disease

CVD = combined valve disease

LAF = lone atrial fibrillation

SR = Sinusrhythmus

AF = atrial fibrillation

SSS = Sick sinus syndrom

EF = Ejektionsfraktion

LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

mean = Mittelwert

1.4. Kontrollgewebe

Da vollständig normales humanes Myokard zur sofortigen Fixierung und generell für Forschungszwecke kaum verfügbar ist, wurde als Kontrollmaterial Gewebe von 12 Patienten vergleichbaren Alters, Sinusrhythmus, mit entweder normaler Vorhofgröße oder dilatiertem Atrium sowie ansonsten unterschiedlich ausgeprägten Kardiomyopathien bzw. koronaren Herzerkrankungen verwendet, deren atriales Myokard aber keinerlei bzw. nur geringe pathologische Veränderungen aufwies.

Zusätzlich wurden die Vorhöfe fünf klinisch gesunder Schweine zur vergleichenden morphologischen Untersuchung herangezogen.

1.5. Gewebeaufbewahrung für die Immunhistochemie

Alle Biopsien wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur endgültigen Aufarbeitung bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

1.6. Vorbereitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie

Direkt nach Entnahme der Biopsien wurde das Gewebe in ca. $1 \times 2 \times 5\text{mm}$ kleine Proben zerteilt und sofort für die Dauer von 2 - 4 Stunden in 3%igen Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4; 400 mosmol) bei 4°C fixiert.

Glutaraldehyd führt zu einer kovalenten Quervernetzung der Proteine untereinander.

Anschließend wurden die Präparate mehrmals in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 7,5% Saccharose gewaschen und 2 Stunden in 2%igem Osmiumtetroxid in Veronalacetatpuffer postfixiert. Osmium bindet und stabilisiert Lipiddoppelschichten und Proteine. Nach erneutem mehrmaligem Waschen in Veronalacetatpuffer und nachfolgender Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie zweimaliger Behandlung mit Propylenoxid erfolgte die Einbettung der Proben in Epon mit Hilfe eines Einbettautomaten (Lynx Microscopy Tissue Processor, Fa. Leica). Bis zur vollständigen Auspolymerisation des Kunstharzes wurden die Blöcke in speziellen Ausgießformen für 3 Tage bei 50°C im Wärmeschrank aufbewahrt.

Tab. 5: Eponeinbettung

1.	5 ml Osmium + 10 ml Veronalacetat mit 7,5% Saccharose	120 min bei 4°C
2.	3x Veronalacetat mit 7,5% Saccharose	3 x 15 min bei 4°C
3.	Alkohol 30%	15 min bei 4°C
4.	Alkohol 50%	15 min bei 4°C
5.	Alkohol 70% mit 5% Uranyl	15 min bei 4°C
6.	Alkohol 90%	15 min bei 4°C
7.	2 x Alkohol 100%	15 min bei 4°C
8.	2 x Propylenoxid	15 min bei 4°C
9.	Propylenoxid-Epon-Gemisch (1:1)	15 min bei 4°C
10.	3 x Epon	60 min bei 37°C

2. Herstellung histologischer Schnittpräparate

2.1. Mikrotomie

2.1.1. Gefriermikrotomie

Bei dieser Methode wird die zum Schneiden des Gewebes notwendige Härtung durch Gefrieren der Präparate erzielt. Neben der schnellen Verarbeitung bei niedrigen Temperaturen, liegt der Vorteil dieses Verfahrens in dem Verzicht auf vorherige Entwässerung und Einbettung und somit in der möglichst schonenden Gewebebehandlung unter Vermeidung von Schrumpfungsartefakten sowie v.a. in einer optimalen Antigenitätserhaltung als Voraussetzung für die Immunhistochemie.

2.1.1.1. Aufblocken des Gewebes

Die unmittelbar nach Entnahme, noch in nativem Zustand auf entsprechende Größe zerkleinerten, in flüssigem Stickstoff bei -180 °C konservierten Gewebeproben, wurden mit dem wasserlöslichen Gewebeklebemittel Tissue-Tec (OCT Compound, Fa. Miles Inc., USA) auf speziell für diesen Zweck angefertigten Metall-Objekthaltern befestigt. Größere eingefrorene Proben mußten zuvor noch im Kryostat mit gekühlter Zange oder Skalpell zerteilt und so ausgerichtet werden, daß später im angeschnittenen Präparat eine für die weitere Untersuchung ausreichende Anzahl längsgeschnittener Sarkomere vorlag.

2.1.1.2. Vorbereitung der Objektträger

Eine exakte Reinigung der Objektträger ist wesentlich für gutes Haften der Schnitte aber auch für die Qualität und Haltbarkeit der Färbung.

Die verwendeten Glasobjektträger (Menzel-Superfrost) wurden in Extran-Spüllösung (Merck) gereinigt und nach anschließendem gründlichen Abspülen in Leitungswasser und Aqua dest. im Wärmeschrank bei 40°C über Nacht getrocknet. Zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte während der folgenden Behandlungsschritte wurden diese Objektträger dann mit einer Silanelösung beschichtet.

Tab. 6: Objektträgerbeschichtung

1. Becken	196 ml Aceton + 4 ml 2%ige 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (Sigma)	in jedes Becken für ca. 5 sec eintauchen
2. Becken	reines Aceton	
3.+4. Becken	Aqua dest.	
5.	Trocknen über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank und anschließende Aufbewahrung im Exsikkator	

2.1.1.3. Anfertigung von Gefrierschnitten

Vor dem eigentlichen Schneidevorgang sollte das, bei niedrigeren Temperaturen aufbewahrte oder frisch aufgeblockte, Gewebe für einige Zeit bereits im Kryostat gelagert werden, um sich der dort eingestellten Temperatur anpassen zu können. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren des Gewebes oder auch schon größere Temperaturschwankungen führen zu gravierenden Strukturveränderungen und sollten daher vermieden werden.

Mit einem Gefriermikrotom (Leica Kryostat CM 3000) wurden dann, bei einer je nach Beschaffenheit und Schneidbarkeit des Gewebes individuell variierten Kühl- und Objekttemperatur, ca. 8 µm dicke Gefrierschnitte unter Verwendung eines Anti-Rollplättchens angefertigt, welche mit warmen (Raumtemperatur) Glasobjektträgern aufgenommen wurden.

Kühltemperatur: -28°C bis -30°C

Objekttemperatur: -20°C bis -22°C

Um Gewebeverluste möglichst gering zu halten, wurde die beim Anschneiden der Blöcke gewählten Messer- und Objektwinkeleinstellungen bei allen Schneidevorgängen beibehalten.

2.1.2. Ultramikrotomie

Die Eponblöckchen wurden mit entfetteten Rasierklingen zunächst so getrimmt, daß eine trapezförmige Anschnittfläche des Gewebes mit jeweils zwei parallelen Seiten entstand.

Mit einem Knife Maker 7800 der Fa. LKB wurden Glasmesser zum Anschneiden des Gewebes hergestellt. Mit diesem Gerät können aus vorgefertigten, gereinigten und entfetteten Glasstangen (Leica) zunächst Rechtecke und aus diesen dann wiederum Dreiecke mit 45° Neigung zur Bruchkante gebrochen werden, nachdem mit einem Diamanten die Bruchlinie vorgeritzt wurde.

Mit diesen Glasmessern wurde das Gewebe mit dicken Schnitten so weit angeschnitten, bis eine ausreichend große Schnittfläche der Pyramide vorhanden war; dann wurden auf einige Messer kleine Plastiktröge (LKB) angebracht und zum Auffangen der Schnitte mit Wasser gefüllt.

Mit einem Ultracut E Mikrotom (Reichert-Jung) wurden zunächst Semidünnschnitte von etwa 1 μm für die Übersichtsfärbung mit Toluidinblau angefertigt. Nach erfolgter lichtmikroskopischer Orientierung und Beurteilung des Gewebes wurden von geeignet erscheinenden Arealen, mit Hilfe eines Diamantmessers (ultra 45°, Diatome), ca. 50 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt und auf 200 mesh Kupfergrids (Plano) aufgefangen.

2.2. Schnell-, Übersichtsfärbung

2.2.1. Toluidinblau

Zur schnellen Orientierung hinsichtlich der Schnittrichtung wurden die unfixierten, luftgetrockneten Gefrierschnitte auf einer Heizplatte bei 60°C für 1-2 min mit 1%iger Toluidinblaulösung überschichtet und die Präparate anschließend gegebenenfalls umgeblockt, um die benötigten Längsschnitte zu erhalten. Toluidinblau färbt alle basophilen und osmiophilen Strukturen in unterschiedlich kräftigen Blautönen an.

Semidünnschnitte der in Epon eingebetteten Präparate zur Orientierung für die Elektronenmikroskopie wurden für mindestens 15 bis 20 min bei 60°C mit Toluidinblau gefärbt.

2.2.2. Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur vorläufigen Beurteilung bezüglich der Gewebeerhaltung und -beschaffenheit wurden vor der Immunhistochemie von allen Gewebeproben zunächst

HE-Präparate angefertigt. Zellkerne werden von dem basischen Hämalaun blau angefärbt, alle anderen Strukturen erscheinen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot.

Tab. 7: Färbeprotokoll Hämalaun-Eosinfärbung

1.	Schnitte in Hämalaun nach Mayer (Chroma) zur Kernfärbung einstellen	10 min
2.	Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 min
3.	Aqua dest.	eintauchen
4.	Färben in Eosin 2% (Chroma)	6 min
5.	95% Alkohol	2 x eintauchen
6.	100% Alkohol	2 x 30 sec.
7.	Xylol	5 min
8.	Eindecken der Schnitte mit Entellan (Merck)	

2.3. Kontrastierung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie

Das elektronenmikroskopisch erzielte Schwarzweißbild entsteht infolge unterschiedlicher Durchdringung der Gewebestrukturen durch den Elektronenstrahl. Aufgrund unterschiedlicher Anlagerung einer elektronendichten Substanz an bestimmte Ultrastrukturen, kommen verschiedene Grautöne bis zur Schwärzung zustande, da eine Struktur auf dem Negativ um so dunkler und folglich auf dem Positiv bzw. Schirm dann um so heller erscheint, je mehr Elektronen durch sie hindurchdringen können. Infolge der Zunahme der Elektronenabsorption durch Bindung geeigneter Stoffe wird ein verbesserter Bildkontrast erzielt.

Eine erste Kontrastierung erfolgt schon bei der Osmiumfixierung, da zahlreiche Moleküle mit Osmium reagieren und dieses binden. Zur Nachkontrastierung, d.h. zur Verstärkung des bereits vorhandenen Kontrastes, eignen sich 5% Uranylacetat sowie Bleicitrat nach Reynolds.

Tab. 8: Kontrastierung von Dünnschnitten

1.	Uranylacetat 5% in Aqua dest.	2 min
2.	gründliches Waschen in Aqua dest.	ca. 1 min
3.	Bleicitrat nach Reynolds	2 min
4.	gründliches Waschen in Aqua dest.	ca. 1 min

3. Immunhistochemie

Mit Hilfe spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper können die korrespondierenden antigenen Strukturen (Proteine) eines Gewebes nachgewiesen, identifiziert und gegebenenfalls quantifiziert werden.

3.1. Immunfluoreszenz

3.1.1. Direkte Methode

Ein direkt mit einem Fluorochrom konjugierter Antikörper bindet an das Antigen und kann dann mit Licht bestimmter Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Vorteil dieser Methode ist eine nur geringe unspezifische Hintergrundfärbung (Abb. 5).

3.1.2. Indirekte Methode

Ein unmarkierter (primärer) Antikörper bindet spezifisch das Antigen und wird dann mit Hilfe eines konjugierten sekundären Antikörpers nachgewiesen, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Diese Methode hat den Vorteil höherer Sensitivität (Abb. 6).

3.1.3. Biotin-Streptavidin-Methode

Streptavidin, ein Protein von *Streptomyces avidinii*, zeichnet sich durch seine hohe Bindungsaffinität zum Vitamin Biotin aus. Bei der direkten Form dieser Methode wird ein biotinylierter primärer Antikörper verwendet, entsprechend bindet markiertes Streptavidin bei der indirekten Form an einen biotinylierten sekundären Antikörper. Da das Biotinmolekül vier Bindungsstellen besitzt, können mehrere Marker-Streptavidinkomplexe binden, was eine Erhöhung der Sensitivität der Methode und eine Verstärkung des Signals zur Folge hat.

Als Detektionssystem für die biotinylierten Antikörper wurde Cy-2 verwendet, ein grünfluoreszierendes, mit Streptavidin konjugiertes Carbocyanin.

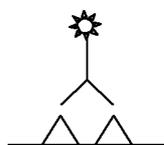


Abb. 5: Direkte Immunfluoreszenz

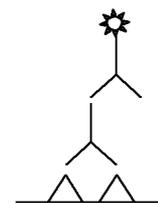


Abb. 6: Indirekte Immunfluoreszenz

3.2. Antikörper

In zahlreichen Vorversuchen wurden verschiedene mono- und polyklonale Antikörper im Hinblick auf ihre Qualität und Spezifität bei unterschiedlichen Gewebefixierungen und Verdünnungen ausgetestet, um mögliche Störfaktoren wie unspezifische Markierungen oder starke Hintergrundfärbung zu eliminieren und so optimale Voraussetzungen für die spätere quantitative Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Strukturen zu gewährleisten. Monoklonale Antikörper sind gegen nur eine bestimmte antigene Determinante des darzustellenden Proteins gerichtet und damit zwar sehr spezifisch, aber weniger sensitiv.

Polyklonale Antikörper reagieren mit unterschiedlichen Determinanten des Antigens, so daß neben einer höheren Reaktivität der Antikörper und somit höheren Empfindlichkeit der Methode eventuell auch unerwünschte Kreuzreaktionen mit falsch-positivem Ergebnis auftreten können.

Abhängig vom jeweiligen Ergebnis der Vorversuche wurden beide Antikörperarten für die endgültigen Färbungen verwendet (Tab. 9).

Bei der Durchführung von Doppelfärbungen mit der Biotin-Streptavidin-Methode ist darauf zu achten, daß primäre Antikörper für die parallel darzustellenden Proteine nicht durch Immunisierung der gleichen Tierart gewonnen wurden. Aus diesem Grund sollte jeweils ein monoklonaler (Maus) mit einem polyklonalen (Kaninchen) Antikörper kombiniert und die entsprechenden biotinylierten Esel-anti-Maus oder Esel-anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper verwendet werden.

3.2.1. Primäre Antikörper

Tab. 9: Primärantikörper

Name	Hersteller	Art	Fixierung	Verdünnung
Collagen I	Sigma	Maus	Aceton	(1:10)1:50
Collagen VI	Rockland	Kaninchen	Aceton	1:50
Fibronectin	ICN	Kaninchen	Aceton	1:50
Connexin 43; 4E6.2	Biotrend	Maus	PFA	(1:1000) 1:500
Connexin 43	Zymed	Kaninchen	PFA	1: 200
Connexin 40	Biotrend	Kaninchen	PFA	1:100
N-cadherin; GC-4	Sigma	Maus	PFA	1:200
Desmoplakin	Cymbus	Maus	Aceton	1: 20
α -actinin; EA-53	Sigma	Maus	PFA	1:200
Complement C9	Novocastra	Maus	PFA	1:50
Ubiquitin	Dako	Kaninchen	Aceton	1:50

3.2.2. Sekundäre Antikörper

Tab. 10: Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Art	Verdünnung
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research	Esel	1: 100
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research	Esel	1:100
Rhodamine Red TM-X-affini pure goat anti- mouse IgG	Biotrend	Ziege	1:100
Cy3-conjugated Donkey Anti-Rabbit	Chemicon	Esel	1:250

Die ersten beiden biotinylierten Sekundärantikörper wurden in der oben beschriebenen, indirekten Biotin-Streptavidinmethode eingesetzt. Der dritte, direkt mit Rhodamin bzw. der vierte, mit rotem Indocarbocyanin konjugierte Sekundärantikörper, wurde für die indirekte Immunfluoreszenz bei Doppelfärbungen verwendet.

3.2.3. Detektionssystem für biotinylierte Sekundärantikörper

Tab. 11: Detektionssystem für biotinylierte Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung	Farbe
Cy-2 conjugated Streptavidin	Rockland	1: 100	grün

Cy-2 zeichnet sich gegenüber anderen getesteten Detektionssystemen durch seinen hohen Extinktionskoeffizienten und seine Langzeitstabilität aus.

3.3. Weitere Farbstoffe

TRITC markiertes Phalloidin wurde im Anschluß an die Immunhistochemie verwendet, um Aktin zur besseren Abgrenzbarkeit der Myozyten darzustellen. Mit Propidiumjodid, Aktinomycin, Dapi oder Toto wurden bei Bedarf die Zellkerne angefärbt.

Tab. 12: Weitere Farbstoffe

Name	Hersteller	Verdünnung	Farbe
Phalloidin-TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)	Sigma	1:500	Rot
Propidiumjodid	Molecular Probes	1:1000	Rot
7-Amino-Aktinomycin	Molecular Probes	1:100	Rot
Dapi (4,6-diamidino-2-phenylindol,dihydrochlorid)	Molecular Probes	1:600	Blau
Toto-3 jodid	Molecular Probes	1:1000	Blau

3.4. Einzel- und Doppelfärbungen

Bei allen im Rahmen dieser Studie durchgeführten, immunhistochemischen Färbungen kamen ausschließlich indirekte Methoden zum Einsatz, d.h. der erste Antikörper war immer unkonjugiert und mußte mit Hilfe eines zweiten markierten bzw. biotinylierten und dem zugehörigen Detektionssystem nachgewiesen werden.

Für die morphologische Untersuchung des Gewebes wurden die verschiedenen intra- und extrazellulären Strukturen sowohl separat in Einzelfärbungen als auch vergleichend in Doppelfärbungen dargestellt.

Für die quantitative Auswertung waren nur Einzelfärbungen geeignet, um Überlagerungen der Fluoreszenzsignale verschiedener Strukturen zu vermeiden.

Desweiteren wurden für die Quantifizierung alle Präparate in einem einzigen Durchgang strikt nach unten aufgeführtem Protokoll unter exakt gleichen Bedingungen gefärbt, um eine spätere Standardisierung der Messungseinstellungen zu ermöglichen.

Während aller Inkubationszeiten wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer, je nach Inkubationsdauer bei 4°C oder Raumtemperatur, aufbewahrt, um ein Verdunsten der Lösungen oder ein Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Nach allen Waschvorgängen wurden die Objektträger in der Umgebung der Schnitte sorgfältig abgetrocknet, um eine unbeabsichtigte Verdünnung der Antikörper durch Reste der PBS-Lösung zu verhindern.

3.4.1. Einzelfärbungen

Tab. 13: Färbeprotokoll Einzelfärbung

1.	Fixierung	a) Aceton b) PFA 4%	5 min 10 min
2.	Lufttrocknen	im Anschluß an 1.a)	ca. 5 min
3.	Waschen	Phosphat buffered saline (PBS)	3 x 3 min
4.	Inkubation	1. Antikörper	1-18 h
5.	Waschen	PBS	3 x 3 min
6.	Inkubation	2. Antikörper	1-2 h
7.	Waschen	PBS	3 x 3min
8.	Inkubation	3. Antikörper	1-2 h
9.	Waschen	PBS	3 x 3min
10.	Inkubation	a) Phalloidin b) Kernfarbstoff	15-30 min
11.	Waschen	PBS	3 x 3min
12.	Eindecken	Mowiol	

Fixierung mit 4% PFA / Aceton:

Die frisch angefertigten Gefrierschnitte wurden bis zur Fixierung bei -30°C im Kryotom belassen und bei Paraformaldehydfixierung erst unmittelbar davor für ca. 10 min luftgetrocknet, bzw. bei Acetonfixierung im Kryostat in die Fixierlösung eingebracht.

Die Wahl des Fixierungsmittels richtete sich nach dem jeweiligen verwendeten Antikörper und dem Ergebnis der Vorversuche, da sich Antigene entsprechend ihrer chemischen Struktur unterschiedlich gegenüber Fixierungsmitteln verhalten.

Aceton bewirkt einen schnellen Wasserentzug und eignet sich besonders zur Fixierung von Proteinantigenen in Gefrierschnitten. Für die Fixierung des Gewebes zur nachfolgenden Darstellung u.a. extrazellulärer Proteine wurde tiefgekühltes reines Aceton bei einer Temperatur von -30°C im Kryostat verwendet; anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur luftgetrocknet und danach mehrmals gründlich in PBS gewaschen.

Paraformaldehydfixierung führt zu einer Quervernetzung und Polymerisation von Amino-, Amido- und anderen Gruppen und bewirkt eine gute Strukturhaltung. Eine 4% ige Formaldehydlösung wurde bei Raumtemperatur verwendet.

Tab. 14: Herstellung von 4% PFA

40 g Paraformaldehyd (Merck)	in einem Liter PBS lösen und mit 1 N HCL auf pH 7,4 einstellen.
3 Plätzchen Natriumhydroxid (Merck)	

Die zubereitete Formalinlösung wurde in gebrauchsfertigen Portionen eingefroren und die benötigte Menge erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht.

Puffer (PBS):

Nach der Fixierung und nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger mehrmals in Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssiges Fixierungsmittel, Antikörper oder sonstige Farbstoffe vollständig zu entfernen und die jeweilige Inkubation abubrechen.

Tab. 15: PBS - Zusammensetzung

1. Stammlösung	397,40 g NaCl 10,00 g KCl 10,00 g H_2PO_4 88,75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	in 5 Litern Aqua dest. auflösen
2. Gebrauchslösung	500 ml der Stammlösung 4500 ml Aqua dest.	mit 0,1-1 N HCl / NaOH auf pH 7,4 einstellen

Inkubation des Gewebes mit dem primären Antikörper:

Die primären Antikörper wurden mit PBS auf die jeweilige benötigte Konzentration verdünnt und von dieser Verdünnung jeweils 50 μ l pro Schnitt aufgetragen.

Schnitte die für die quantitative Untersuchung angefertigt wurden, wurden aus technischen Gründen über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert und am nächsten Tag zeitgleich weiterbehandelt. Bei Färbungen für die morphologische Untersuchung, die nicht für alle Präparate gleichzeitig durchgeführt werden mußten, war eine Inkubation mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur für die Dauer von ein bis zwei Stunden ausreichend.

Negativkontrolle:

Bei jedem Färbedurchgang wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Färbeprotokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welche durch Inkubation mit PBS-Lösung ersetzt wurde.

Inkubation des Gewebes mit dem sekundären Antikörper:

Der zweite Antikörper wurde ebenfalls mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und davon jeweils 50 μ l pro Schnitt aufgetragen.

Nach einer Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht, wurde der sekundäre Antikörper für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Inkubation des Gewebes mit dem Detektionssystem:

Bei der Verwendung biotinylierter Sekundärantikörper erfolgte die Inkubation mit dem Detektionssystem entsprechend für 1-2 Stunden.

Inkubation des Gewebes mit sonstigen Farbstoffen:

Die Auswahl sonstiger Farbstoffe richtete sich u.a. nach dem verwendeten Fixierungsmittel; so können nach Acetonfixierung z.B. Artefakte bei der Kernfärbung auftreten.

Phalloidin zur Darstellung von Aktin wurde in allen Schnitten für die Quantifizierung verwendet.

Alle Farbstoffe wurden mit PBS auf die benötigte Konzentration verdünnt und jeweils 50 μ l pro Schnitt aufgetragen.

Eindecken und Aufbewahrung der Präparate:

Zur Konservierung und Untersuchung wurden die Präparate nach Abschluß der Färbung mit dem wasserlöslichen Einschlußmedium Mowiol (Hoechst) eingedeckt. Dazu wurde ein mit einer geeigneten Menge Mowiol bestrichenes Deckglas so auf den noch feuchten Objektträger gebracht und leicht angedrückt, daß eventuelle Luftblasen entweichen konnten.

Anschließend wurden die Objektträger in lichtundurchlässigen Aufbewahrungsmappen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, um das Mowiol auspolymerisieren zu lassen und die Präparate vor dem Ausbleichen zu schützen.

Tab. 16: Herstellung von Mowiol

50 g Mowiol (Hoechst) + 200 ml PBS	16 Stunden rühren
Zugabe von 25 ml wasserfreiem Glycerin	16 Stunden rühren
15 min bei 12000 rpm zentrifugieren	Überstand bei 4°C aufbewahren und rechtzeitig vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

3.4.2. Doppelfärbungen

Das Färbeprotokoll entspricht im Wesentlichen dem der oben dargestellten Einfachfärbung.

Tab. 17: Färbeprotokoll Doppelfärbung

1.-9.	Punkt 1 – 9 siehe Protokoll Einfachfärbung		
10.	Inkubation	2. primärer Antikörper	1 - 2 h
11.	Waschen	PBS	3 x 3 min
12.	Inkubation	a) 2. markierter sekundärer Antikörper (z.B.Cy3 / Rhodamin) b) 2. biotynlierter sekundärer Antikörper	1 - 2 h
13.	Waschen	PBS	3 x 3 min
14.	entfällt nach 12a) Inkubation	3. Antikörper (Cy 2-Streptavidin, nach 12 b)	1 - 2 h
15.	entfällt nach 12a) Waschen	PBS	3 x 3 min
16.	Inkubation	a) Phalloidin b) Kernfarbstoff	15 - 30 min
17.	Waschen	PBS	3 x 3 min
18.	Eindecken	Mowiol	

Alternativ besteht die Möglichkeit den ersten und zweiten primären Antikörper sowie anschließend die beiden sekundären Antikörper zusammen in einer Verdünnung aufzutragen und somit Punkt 10 bis 12 entfallen zu lassen. Eine zeitsparende Methode, die sich allerdings nicht für alle Antikörperkombinationen eignet, da sich diese dabei u. U. gegenseitig von ihren Bindungsstellen verdrängen können.

Doppelfärbungen wurden beispielsweise durchgeführt, um Kollagen I entweder zusammen mit Kollagen VI oder Fibronectin darzustellen. Dabei wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper gegen den monoklonalen primären Kollagen I Antikörper verwendet und direktes anti-rabbit Cy-3 gegen die polyklonalen Kollagen VI bzw. Fibronektin Antikörper.

Bei der Doppeldarstellung von α -Aktinin mit Cx 43 bzw. Fibronectin wurde monoklonales α -Aktinin mit polyklonalem Connexinantikörper oder Fibronectin kombiniert und entsprechend Biotin-rabbit und Rhodamin eingesetzt.

4. Mikroskopie und Bildverarbeitung

4.1. Lichtmikroskopie

Im Anschluß an die unter III. 2.2. beschriebenen Schnell- und Übersichtsfärbungen, wurden die Gewebeproben lichtmikroskopisch unter Durchlicht hinsichtlich ihrer Schnittrichtung, Erhaltung und Beschaffenheit untersucht. Dazu wurde ein Leica DM-RB Mikroskop, mit folgenden Objektiven verwendet:

- PL Fluotar 25x / 0,75 OIL, Leica Germany
- PL Fluotar 40x / 1,00-0,5 OIL, Leica Germany
- PL Apo 63x / 1,4 OIL, Leica Germany

4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Immunhistochemisch markierte Strukturen werden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht, indem die verwendeten Fluorochrome durch kurzwelliges Licht bestimmter Wellenlänge (Quecksilberdampfampe oder Laserlicht) bestrahlt und so zur Emission von Licht längerer Wellenlänge angeregt werden.

Bei dem für diese Studie verwendeten Leica DM-RB Fluoreszenzmikroskop wird die Strahlung einer 100 Watt Quecksilber-Dampfampe (Osram) im Auflicht durch Filter für verschiedene Wellenlängenbereiche von oben auf das Objekt geleitet. Die

Verwendung unterschiedlicher Filter zur Auswahl eines möglichst engen Bereichs aus dem Lampenspektrum, welcher den jeweils eingesetzten Farbstoff zur Fluoreszenz bringt, ermöglicht dabei die einzelne oder kombinierte Anregung verschiedener Fluorochrome.

4.3. Konfokale Mikroskopie

Konfokale Lasermikroskope verwenden zur Anregung der Fluoreszenz Laserlicht und liefern durch Kombination verschiedener technischer Details hochaufgelöste Bilder jeder beliebigen Ebene eines Präparates.

Das Grundprinzip eines solchen Mikroskopes besteht darin, das auf einen Punkt des Objekts eingestrahlte und von dort ins Objektiv emittierte Licht wiederum punktförmig auf eine Detektorlochblende zu fokussieren, welche unerwünschtes, insbesondere aus höheren oder tieferen Ebenen stammendes Licht, welches die Schärfe der Abbildung beeinträchtigen würde, größtenteils abschirmt (Abb.7). Dabei wird zu einem Zeitpunkt immer nur jeweils ein Punkt der Fokusebene dargestellt; um eine vollständige Abbildung eines größeren Gebiets des Objektes zu erhalten, muß der Laser ständig mit hoher Geschwindigkeit über das Präparat bewegt werden.

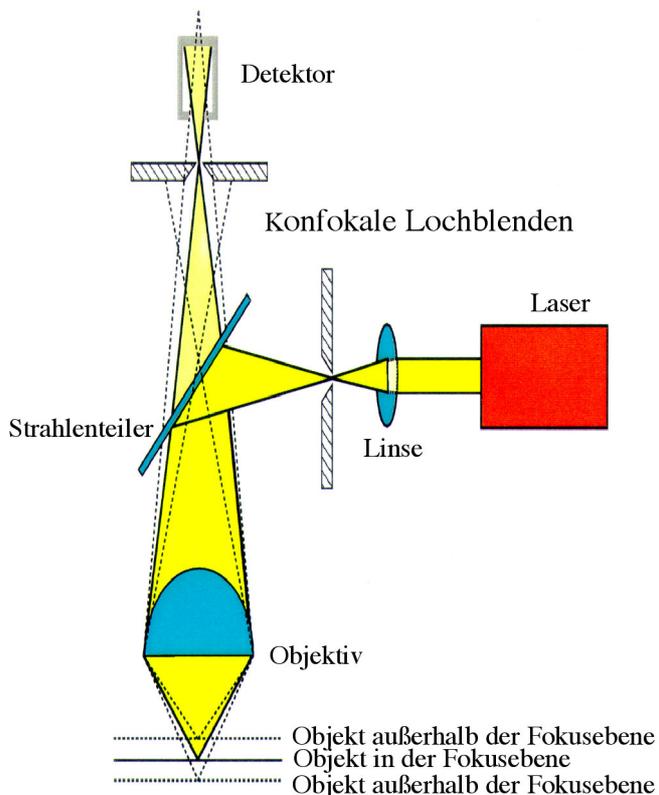


Abb. 7: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips. Der Laserstrahl wird durch eine Linse auf eine Lochblende geleitet und dann mittels Strahlenteiler und Objektiv auf einen Punkt in der Fokusebene des Präparates gebündelt. Das von dem Objekt ins Objektiv emittierte Licht wird durch den Strahlenteiler wieder auf die Öffnung einer Lochblende fokussiert und von dem dahinter liegenden Detektor erfaßt.

Die Dicke (Ausdehnung entlang der z-Achse) der gescannten Ebene hängt von verschiedenen Parametern ab (so z.B. dem variablen Durchmesser der Lochblendenöffnung). Bei dem Detektor hinter der Lochblende handelt es sich um einen Photomultiplier, der das Erfasste in eine Folge elektrischer Signale umsetzt, indem die eintreffenden Photonen die Beschleunigung einer Elektronenkaskade durch einen Stapel von Plattendynoden hindurch in Gang setzen. Ein für die quantitative Analyse geeigneter Detektor muß dabei einen linearen Output zu der eintreffenden Lichtintensität erstellen. Eine Anordnung von bis zu vier Detektoren ermöglicht die simultane Aufnahme verschiedener Signaldaten. Da der eintreffende Lichtstrahl alle Detektoren gleichzeitig anregt, können zwei oder auch mehrere verschiedene Fluoreszenzfärbungen parallel dargestellt werden.

Der entscheidende Vorteil eines konfokalen Mikroskopes gegenüber konventionellen Mikroskopen liegt also in der Möglichkeit, verschiedene Strukturen in ihrer gesamten dreidimensionalen Ausdehnung durch alle Ebenen, ohne Beeinträchtigung von Schärfe oder Kontrast, durch gleichzeitig einfallendes, von anderen Schichten und Strukturen stammendes Streulicht, darzustellen.

Zusammengefaßt läßt sich das konfokale Prinzip auf drei grundlegende Merkmale reduzieren:

- die Beleuchtung eines nur sehr kleinen, punktförmigen Gebiets
- das Fokussieren des von dort emittierten Lichts auf eine entsprechend ausgerichtete Lochblende, die nur das aus der Focusebene kommende Licht weiterleitet und aus anderen Ebenen stammendes Licht abschirmt
- das Abtasten des Präparates im Rasterverfahren

In dieser Studie kam ein konfokales Lasermikroskop (TCS SP) der Firma Leica zum Einsatz, welches mit drei unterschiedlichen Lasern (Argon, Krypton und Helium-Neon) und folgenden Objektiven ausgestattet ist:

- HC PL APO 20x / 0,70 IMM Corr, Leica Germany
- HCX PL APO 40x / 1,25-0,75 OIL, Leica Germany
- HCX PL APO 63x / 1,32-0,6 OIL, Leica Germany

Bei dem eigentlichen Mikroskop handelt es sich um ein Fluoreszenzmikroskop (Leica DM-RB), wie unter III. 4.2 beschrieben, mit dem die darzustellende Struktur zunächst im Gesichtsfeld eingestellt wird. Anschließend wird vom Licht der Quecksilberdampfampe auf Laserlicht umgeschaltet wobei der Laser jedoch nicht durch Filter geleitet wird, sondern statt dessen in einem Prisma zunächst nach verschiedenen Wellenlängen aufgetrennt und dann durch eine entsprechende

Blende der gewünschte Wellenlängenbereich selektiert wird. Zusätzlich wird das Spektrum durch die Auswahl eines geeigneten Lasers (Ar, Kr, He / Ne) eingegrenzt.

Tab. 18: Hauptspektren der verschiedenen Laser

Krypton	568 nm
Argon	488 nm
Helium-Neon	633 nm

Man kann verschiedene Wellenlängen zur Anregung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe benutzen. Da ein Fluorochrom nicht nur von Strahlung genau einer Frequenz, sondern einer bestimmten Frequenzbreite zur Emission angeregt wird, ist bei Doppelfärbungen darauf zu achten, daß es möglichst nicht zu einer Überlagerung der entsprechenden Anregungs- und Fluoreszenzbereiche kommt.

Tab. 19: Anregungsbereiche verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

Cy 2	489 nm
Cy 3	550 nm
Propidiumjodid	536 nm
Aktinomycin	555 nm
TRITC	554 nm
Toto	642 nm

4.4. Bildverarbeitung

Durch Scannen des Präparates entlang der z-Ebene in die Tiefe entsteht ein Stapel von Schichtbildern. Mit der entsprechenden Software (Leica TCSNT) kann die Helligkeit jedes einzelnen Punktes, dessen Lage auf der gescannten Ebene sowie deren Tiefe im Präparat bestimmt und aufgezeichnet werden.

Diese durch drei Raumkoordinaten (x-, y-, z-Achse) gekennzeichneten Punkte werden, abgeleitet von den zweidimensionalen pixel (picture elements), als voxel bezeichnet.

Mit Hilfe spezieller Bildverarbeitungsprogramme und ausreichender Computerspeicherkapazität ist es möglich, mit dem oft einigen Megabyte umfassenden, digitalen voxel-Datensatz das untersuchte Präparat räumlich darzustellen, zu drehen und so jede einzelne Schicht aus jeder Ansicht zu betrachten.

Hier wurde für die Verarbeitung der konfokalen Datensätze eine Silicon Graphics Octane-Workstation verwendet. Mit dem Bildverarbeitungsprogramm Imaris

wurden die geladenen Daten individuell hinsichtlich Farbe, Geometrie und Darstellung einer bestimmten Ebene bearbeitet und anschließend mit dem Programm Selima gespeichert und dokumentiert.

4.5. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Gewebes erfolgte mit einem Phillips EM 201.

Bei einem Elektronenmikroskop werden Ultrastrukturen des Gewebes mit Hilfe eines Elektronenstrahls sichtbar gemacht. Grundsätzlich ist es nicht möglich mit Strahlung einer bestimmten Wellenlänge Strukturen darzustellen, die kleiner sind als diese Wellenlänge. Abhängig von der Beschleunigung der Elektronen im Elektronenmikroskop, wird deren Wellenlänge stark reduziert, so daß die Auflösung im Vergleich zum Lichtmikroskop ca. 100-fach verbessert wird.

Das Grundprinzip eines Transmissions-Elektronenmikroskops (TEM) ähnelt dem eines Lichtmikroskopes, mit Ausnahme der Größe und der umgekehrten Anordnung (Abb. 8).

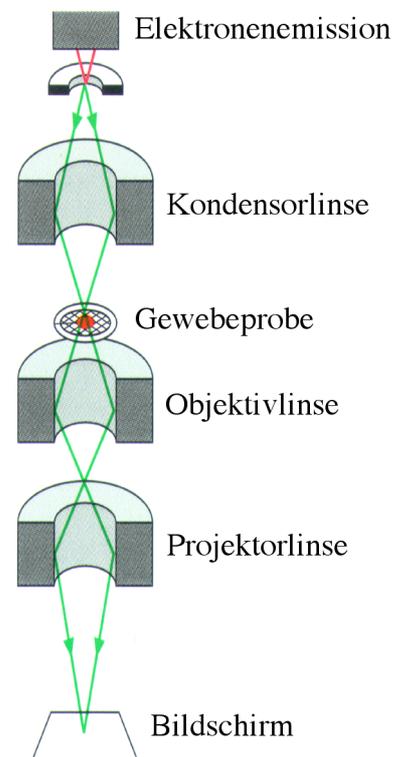


Abb. 8: Schematische Darstellung des Grundprinzips eines TEM. Die von einer Kathode emittierten Elektronen werden durch eine Anode im Hochvakuum beschleunigt. Entlang der Säule sind Magnetspulen angebracht, die den Elektronenstrahl ähnlich wie die Linsen eines Lichtmikroskopes fokussieren. Die Gewebeprobe wird durch eine Schleuse in die Säule gebracht und von dem Elektronenstrahl durchdrungen, der dann auf einen phosphoreszierenden Schirm gebündelt wird.

Als Strahlenquelle dient im TEM eine Kathode, die am Ende einer zylindrischen Säule Elektronen emittiert. In dieser Säule wird zunächst ein Hochvakuum erzeugt, um die Streuung der Elektronen durch Luftmoleküle zu verhindern. Mittels einer Anode werden die Elektronen nach ihrer Emission beschleunigt und anschließend durch eine filterähnliche, kleine Öffnung zu einem Elektronenstrahl

gebündelt. Durch in regelmäßigen Abständen in der Säule angebrachte Magnetspulen wird der Elektronenstrahl fokussiert, bevor er auf die durch eine Schleuse ins Vakuum eingebrachte Gewebeprobe trifft. Je nach Gewebedichte werden einige Elektronen abgelenkt, die anderen durchdringen das Gewebe und führen so zur Bildentstehung auf einer Photoplatte bzw. einem phosphoreszierenden Schirm, wobei dichtere Bereiche des Gewebes heller erscheinen, da die gestreuten Elektronen nicht zur Abbildung beitragen.

Zur Dokumentation der Befunde wurden mit einer 35 mm Kamera Photos angefertigt.

5. Proteinquantifizierung

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie und der integrierten Leica-Software wurden verschiedene intra- und extrazelluläre Proteine der Kardiomyozyten dargestellt und anhand ihrer Fluoreszenz quantitativ bestimmt.

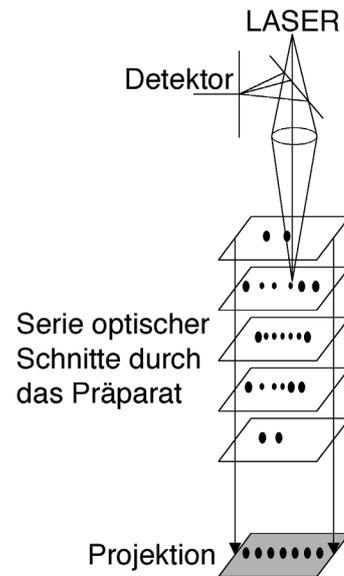
5.1. Proteine des Glanzstreifens

5.1.1. Quantifizierung der Connexin 43 Fluoreszenz

5.1.1.1. Fluoreszenz pro Zelle

Die spezifisch für Cx 43 angefärbten gap junctions wurden als Fluoreszenz pro Zelle gemessen und anschließend prozentual zur gemessenen Zellfläche angegeben. Um sicher zu gehen, daß dabei jeweils eine Zelle in ihrer vollständigen Ausdehnung erfaßt wurde, wurden nur solche Zellen ausgewählt, die im Längsschnitt von zwei endständigen Glanzstreifen begrenzt waren. Von jedem Präparat (28 Patienten- und 12 Kontrollgewebe) wurden 20 dieser so ausgewählten Zellen gemessen. Aus den ca. 8 μm dicken Schnitten wurden dazu jeweils sechs optische Schnitte von jeweils 0,5 μm Dicke angefertigt, um mit diesen 3 μm einen möglichst großen Anteil der vertikalen Ausdehnung des Glanzstreifens zu berücksichtigen. Im „acquisition mode“ wird dazu die „begin“- und „end position“ des zu scannenden Bereichs festgelegt sowie die Anzahl der anzufertigenden Schnitte einer bestimmten Dicke definiert. Diese 6 optischen Schnitte können anschließend unabhängig voneinander betrachtet sowie im „projection mode“ übereinander gelegt werden, wobei dann von den jeweils 6 vertikal übereinander liegenden Bildpunkten der jeweils hellste eines layers ausgewählt und ein maximal projiziertes Bild berechnet wird.

Abb. 9: „projection mode“: Im projection mode entsteht eine maximale Projektion aller angefertigten optischen Schnitte durch das Präparat.



Da alle Präparate gleichzeitig unter genau gleichen Bedingungen geschnitten und gefärbt wurden, war es möglich die Fluoreszenzmessung unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Dies bedeutet, daß anhand der hellsten Punkte innerhalb der Präparate die verschiedenen variablen Parameter wie Laserpower, PMT (photomultiplier) -gain (detector voltage), offset (legt das level fest, oberhalb dessen Signale sichtbar sind) oder pinhole (Lochblendenöffnung) eingestellt und für alle weiteren Messungen eines Proteins beibehalten wurden. Am konfokalen Mikroskop ist ein variables Bildraster mit 512 x 512 bis maximal 1024 x 1024 Punkten, die gescannt werden vorhanden. Für jeden Bildpunkt sind 256 Grau- bzw. Helligkeitsstufen vorgesehen. Die standardisierten Einstellungen wurden so gewählt, daß sich möglichst alle sowohl hellsten als auch dunkelsten Punkte innerhalb dieser 256 Graustufen befanden, damit einzelne Bildpunkte weder über- noch unterbelichtet wurden. Die zu Hilfenahme eines speziellen „Glow over and under“ Modus während des Scannens erleichtert die Optimierung der Einstellungen, da in diesem Abbildungsmodus die extremen Helligkeitsstufen mit besonders starken Farben dargestellt und somit sofort erkennbar sind.

Aus der entsprechenden TCS-Software zur Markierung verschiedener geometrischer Flächen wurde die polygonale Form ausgewählt und die jeweils zu messende Zelle mittels cursor markiert (Abb. 10 A).

Mit der sogenannten „Quantify-Funktion“ der Leica-Software wird ein Histogramm für die markierte Fläche erstellt (Abb. 10 C), dem die Helligkeit der einzelnen Bildpunkte innerhalb der Skala von 0-255 zu entnehmen ist. Daneben wird die minimale und maximale Intensität, die Gesamtintensität (die sich aus der Summe der Intensitätsstufen, jeweils multipliziert mit der Anzahl der Bildpunkte dieser Intensität, errechnet), mittlere Intensität (Gesamtintensität bezogen auf die Anzahl

aller Bildpunkte) und dazugehörige Standardabweichung sowie die Größe der gemessenen Fläche in μm^2 angegeben.

Diese Werte wurden in einem sogenannten „annotation workbook“ gespeichert, wobei die Helligkeit der einzelnen Bildpunkte getrennt für beide Kanäle zusätzlich in einer Excel-Tabelle als Grundlage für weitere Berechnungen angegeben wird. Die Bildrohdaten wurden als „scanner file“ abgespeichert und diese zusammen mit den Daten der zugehörigen Messungen zur Dokumentation und Reproduzierbarkeit auf CD-ROM gesichert.

5.1.1.2. Fluoreszenz pro Fläche

Aufgrund der auffallenden Connexinverteilung außerhalb der regulären Glanzstreifen, wurde zusätzlich noch die Fluoreszenz über einen größeren Bereich, in dem dann eine unterschiedliche Anzahl abgebildeter Myozyten nebeneinander im Verband erfaßt wurde, pro Gewebefläche (Aktin) gemessen. So konnte eine eventuelle Beeinflussung des Endergebnisses durch die selektive Auswahl von Zellen mit regelmäßiger Connexinverteilung ausgeschlossen werden. Für diese Messung wurden ebenfalls nur längsgeschnittene Bereiche berücksichtigt, auch das weitere Vorgehen bei dieser Methode entspricht im Wesentlichen der Messung pro Zelle, nur daß in diesem Fall der zu messende Bereich mit einem Rechteck, das eine größere Gewebefläche umfaßte, markiert wurde. Bei 22 Patienten- und 7 Kontrollgeweben wurden, je nach vorhandenen longitudinal angeschnittenen Fasern, jeweils 10 bis 20 solcher Rechtecke ausgewertet.

5.1.2. Quantifizierung der Connexin 40 Fluoreszenz

5.1.2.1. Fluoreszenz pro Zelle

Die Durchführung dieser Messung entspricht dem unter III. 5.1.1.1. Beschriebenen. Die Einstellungen zur Darstellung von Connexin 40 wurden ebenfalls vor Beginn der eigentlichen Messung standardisiert und anschließend 20 längsgeschnittene vollständige Zellen pro Schnitt (30 Patienten- und 12 Kontrollgewebe) ausgewählt und über eine Strecke von $3 \mu\text{m}$ entlang der Z-Achse in 6 Schichten á $0,5 \mu\text{m}$ gescannt. Bildrohdaten, Histogramme und Excel-Tabellen wurden ebenfalls auf CD-Rom gespeichert.

5.1.2.2. Fluoreszenz pro Fläche

Diese Messung unterscheidet sich nur in einer anderen Auswahl der Grundeinstellungen von der entsprechenden Connexin 43-Bestimmung und wurde für 22 Patienten- und 9 Kontrollgewebe durchgeführt.

5.1.3. Quantifizierung der N-Cadherin Fluoreszenz

Das in der fascia adherens des Glanzstreifens lokalisierte Protein N-Cadherin wurde pro Zelle, entsprechend der Connexinmessung, mit wiederum vorausgehender Standardisierung in 28 Patienten- und 9 Kontrollgeweben quantifiziert.

5.2. Proteine der extrazellulären Matrix

5.2.1. Quantifizierung der Kollagen I Fluoreszenz

Kollagen I wurde pro Gewebefläche gemessen (Abb. 10B).

Grundsätzlich wurde ähnlich wie bei den anderen oben beschriebenen Flächenmessungen vorgegangen. Bei der Auswahl der zu messenden Gebiete war die Schnittrichtung der Sarkomere hier aber nur von untergeordneter Bedeutung, so daß Kollagen in 30 Patienten- und 11 Kontrollgeweben sowohl im Longitudinal- als auch im Transversalschnitt bestimmt wurde; daneben wurden für diese Messung ausschließlich Gebiete außerhalb der physiologisch vorkommenden Bindegewebsareale (Septen und Blutgefäße) ausgewählt. Die Einstellungen für die Bestimmung der Kollagen I Fluoreszenz wurden nicht genau, sondern innerhalb eines bestimmten Bereichs standardisiert. Durch das gleichzeitige Vorkommen, dünner, vergleichsweise schwach fluoreszierender Kollagenfibrillen neben dicken, stark fluoreszierenden Fibrillenbündeln war es nicht möglich, alle Bildpunkte in den Bereich der 256 Punkteskala zu bringen, so daß bei einer standardisierten Einstellung meist einige Punkte über- oder unterstrahlt waren. Aus diesem Grund wurden die gewählten Einstellungen, soweit notwendig (unter zu Hilfenahme der Octane-Bildverarbeitung), durch geringfügige Veränderung der PMT-gain, einzeln derart korrigiert, daß die schwächste Struktur noch sichtbar und die Stärkste nicht überbelichtet wurde.

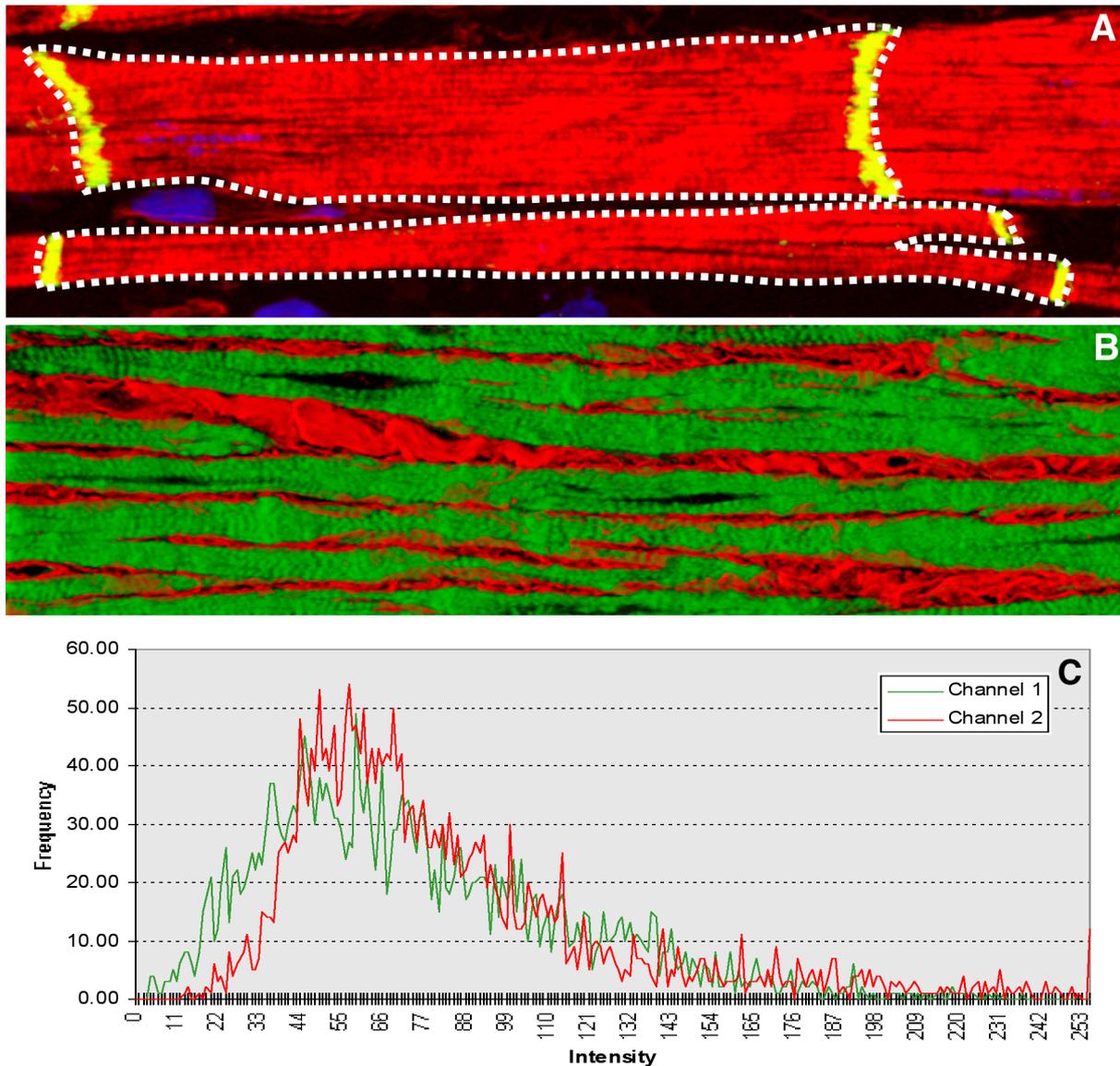


Abb. 10: Darstellung der Proteinquantifizierung:

(grün: Cx 43 in (A) bzw. Aktin in (B), rot: Aktin in (A) bzw. Kollagen I in (B))

A Zur Quantifizierung der Cx-Fluoreszenz pro Zelle wurde aus der entsprechenden TCS-Software zur Flächenmarkierung die polygonale Form gewählt und Kardiomyozyten, die von zwei vollständigen Glanzstreifen begrenzt waren, mittels cursor markiert.

B Zur Quantifizierung der Kollagen I Fluoreszenz wurde aus der TCS-software die rechteckige Form gewählt, und mittels cursor eine gesamte zu messende Gewebefläche markiert.

C Beispiel für ein gemessenes Histogramm

5.3. Grundeinstellungen für die Proteinquantifizierung

Tab. 20: Standardisierte Einstellungen für die Quantifizierung

	Cx 43 / Zelle	Cx 43 / Fläche	Cx 40 / Zelle	Cx 40 / Fläche	N-Cadh. / Zelle	Koll I
Format	512x512x6	512x512x6	512x512x6	512x512x6	512x512x6	512x512x1
Image size	150,6x 150,6 x 3	210,1x 210,1 x 3	150,6x 150,6 x 3	210,1x 210,1 x 3	210,1x 210,1 x 3	105,8x 105,8 x 0
zoom	1,66	1,19	1,66	1,19	1,19	1,5
Voxel sizeY	0,294	0,410	0,294	0,410	0,410	0,207
Voxel size Z	0,608	0,608	0,608	0,410	0,410	0
PMT 1	548	541	601	467	576	492-566
Offset 1	7	5	7	5	5	-5
PMT 2	619	587	548	584	516	425-495
Offset 2	10	4	10	4	4	-5
Pinhole	1	1	1	1	1	1
Objektiv	40	40	40	40	40	63

5.4. Weitere Berechnung und Auswertung der Meßergebnisse, Statistik

Da man bei Anwendung der Biotin-Streptavidinmethode zur Signalpotenzierung nicht grundsätzlich davon ausgehen kann, daß immer alle vier Bindungsstellen des Biotinmoleküls mit markiertem Streptavidin besetzt wurden, kann eine Gleichsetzung der gemessenen Fluoreszenzintensität mit der im Gewebe vorhandenen Proteinmenge problematisch sein. Aus diesem Grund wurde nicht die Intensität der gefärbten Strukturen verglichen, sondern allgemein die Anzahl der für ein Protein positiv gefärbten Bildpunkte, unabhängig von ihrer Intensität, als Grundlage für weitere Berechnungen verwendet.

In zahlreichen Testmessungen wurde für jede Färbung ein geeigneter cut-off, also die Intensität oberhalb derer ein pixel als positiv gewertet wird, ermittelt, da bei der Standardisierung der Einstellungen und gleichzeitig optimalem Kurvenverlauf im Histogramm eine gewisse Hintergrundfärbung nicht völlig zu vermeiden ist. Durch den Vergleich der Gesamtintensität einer Zelle mit der Summe der Intensitäten der beiden dazugehörigen Glanzstreifen, wurde die jeweilige Differenz als Hintergrund definiert und rechnerisch eliminiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten der verschiedenen gemessenen Proteine, mußte ein solcher cut-off für jede Färbung separat festgelegt werden.

Aus den in den Excel-Tabellen enthaltenen Angaben über die Anzahl der Pixel mit einer bestimmten Intensität wurde unter Berücksichtigung des ermittelten cut-off die Anzahl der positiven pixel in Prozent ausgerechnet; wobei es sich in dem ermittelten Prozentwert nicht um einen absoluten Wert, sondern um eine relative, vergleichend zu bewertende Zahl handelt.

Aus dem gewählten Format von 512 x 512 pixeln, der verwendeten Vergrößerung und zoom ergibt sich die Größe der pixel. Die Größe der markierten Fläche errechnet sich aus der Anzahl der pixel multipliziert mit der Größe der pixel.

Diese Berechnungen wurden sowohl für das zu messende Protein als auch für das mit Phalloidin gegengefärbte Aktin durchgeführt, so daß die Anzahl der positiven pixel prozentual auf die Myozyten bezogen werden konnte.

Für die gesamte Datenaufarbeitung, Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Excel (Microsoft Corporation) verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler dargestellt. Statistische Vergleiche wurde mit Hilfe von SigmaStat (Jandel) durchgeführt. Zum Vergleich der Daten von Kontroll- und Patientengruppe wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben benutzt. In allen Fällen galt ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant.

5.5. Zellgröße

Die durchschnittliche Zellgröße ergab sich während der Proteinquantifizierung pro Zelle durch die Markierung vollständig abgebildeter Myozyten am konfokalen Mikroskop mittels cursor. Die Zellfläche wurde wie unter III. 5.4 beschrieben aus der Größe der Pixel multipliziert mit der Anzahl der Pixel errechnet.

6. Marker für Degeneration, Nekrose und Apoptose

6.1. Semiquantitative Ubiquitin und C 9 - Bestimmung

Als Marker für intrazelluläre, degenerative Abbauvorgänge wurde das intracytoplasmatische Protein Ubiquitin und als Nachweis ischämischer bzw. nekrotischer Myokardschädigung, der Komplementfaktor C9 mit den jeweiligen Antikörpern spezifisch angefärbt und morphometrisch ausgewertet. Mit Hilfe eines Zählgitters mit einer Gesamtfläche von 1 mm² wurden dazu jeweils im gesamten Gewebeschnitt die positiv markierten Zellen gezählt und die durchschnittliche Anzahl der Myozyten pro Zählfeld sowie die Größe der Schnittfläche ermittelt.

Ubiquitin- bzw. C 9 - positive Zellen wurden dann prozentual zur Gesamtzahl der Myozyten berechnet.

6.2. TUNEL-Methode

Das Prinzip der TUNEL-Methode (terminal-deoxy nucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end-labeling method) basiert auf der für Apoptose charakteristischen DNA-Fragmentierung in immer etwa gleich große Bruchstücke von ca. 185 bp.

Eine terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) verbindet Digoxigenin-gekoppelte Nucleotide mit den 3'OH-Enden dieser DNA-Fragmente. Diese dienen dann als Bindungsstelle für Fluorescein-gekoppelte-Anti-Digoxigenin-Antikörper und können bei 523 nm als grünes Signal sichtbar gemacht werden.

Zum Nachweis apoptotischer Zellkerne wurde der in situ „Apoptosis Detection Kit“ (Apop Tag®, Fluorescein – Fa. Oncor) verwendet.

Tab. 21: Protokoll der TUNEL-Methode Apop Tag ®

Fluorescein Kit	Temperatur	Dauer
4% PFA-Fixierung	RT	15 min
PBS	RT	3 x 5 min
Essigsäure / Ethanol 1:2	RT	5 min
PBS	RT	3 x 5 min
<i>nur Positiv-Kontrolle: DNase Puffer *</i>	RT	30 min
Äquilibrierungspuffer	RT	20 sec
TdT Enzym** #	37°C	1,5 h
„Stop and wash“ Puffer ***	37°C	10 min
PBS	RT	3 x 5 min
Anti-Digoxigenin Fluorescein****	RT	30 min
PBS	RT	3 x 5 min
Propidiumjodid	RT	20 min
PBS	RT	3 x 5 min
Eindecken mit Mowiol		

RT = Raumtemperatur

* = 15µl DNase (Sigma) + 40µl DDT + 4,0ml Tris-Puffer 300mM + 13,3 ml Na-Cacodylat 420 mM + 160 µl MgCl₂

** = 32 µl TdT Enzym + 76 µl Reaktionspuffer

*** = 1ml Stop and Wash Puffer + 34 ml Aqua dest.

**** = 56 µl Blocksolution + 49 µl Anti-Digoxigenin

= mit Plastikfolie abdecken

Als Positiv-Kontrolle diente ein Duodenumpräparat vom Schwein sowie ein mit DNase (Fa. Sigma) vorinkubierter Gewebeschnitt, der dann aufgrund dieser artifiziellen DNA-Fragmentierung im TUNEL-Nachweis positiv ausfiel.

Als Negativ-Kontrolle wurde ein Gewebeschnitt nicht mit TdT-Enzym inkubiert und ansonsten in allen Arbeitsschritten gleich mit den übrigen Proben behandelt.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte im Anschluß mit Propidiumjodid.

Pro Patient wurde jeweils ein gesamter Gewebeschnitt mit Hilfe eines Zählgitters ausgewertet. Bei der prozentualen Auswertung wurde die Gesamtzahl der Myozyten sowie die TUNEL-positiven Myozyten berücksichtigt.

IV. ERGEBNISSE

1. Morphologische Beurteilung des Gewebes

Die morphologische Beurteilung des Gewebes der Maze-Patienten erfolgte im Vergleich zu Geweben von Patienten mit Sinusrhythmus und z.T. auch porcinem atrialen Myokard. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag bei folgenden strukturellen Veränderungen:

- 1) Remodeling interzellulärer Verbindungen (atriale gap junction Proteine Cx 43 und Cx 40 sowie mechanische Zellverbindungen, repräsentiert durch N-Cadherin und Desmoplakin)
- 2) Fibrotische Veränderungen (Kollagen I, VI und Fibronectin)
- 3) Degenerative Veränderungen (Aktin- und α -Aktinin)

1.1. Proteine des Glanzstreifens

1.1.1. Connexin 43

Abhängig von der Spezies und dem Entwicklungsstadium (embryonal, adult) sowie in unterschiedlichen Bereichen von Atrium oder Ventrikel (Arbeitsmyokard oder Reizleitungsgewebe), treten grundlegende topographische Unterschiede in der Anzahl und überwiegenden Art der Zellkontakte (endständig oder lateral) und der Verteilung der verschiedenen gap junction-Proteine innerhalb der Glanzstreifen auf.

Die Cx 43 gap junctions sind im gesamten adulten humanen rechten Atrium (und Appendix) normalerweise überwiegend in End-zu-End aber auch in seitlichen Zellverbindungen lokalisiert.

In den untersuchten Kontrollgeweben von Patienten mit Sinusrhythmus markierten alle für Cx 43 angefärbten gap junctions deutlich abgegrenzte, reguläre Glanzstreifen an den Enden oder Seiten der Kardiomyozyten. In longitudinal angeschnittenen Sarkomeren stellten sich diese Zellkontakte als kurze, aus vielen einzelnen Punkten bestehende, horizontale oder vertikale Linien dar (Abb. 11 A). Im Transversalschnitt waren regelmäßig charakteristische periphere, aus größeren gap junctions bestehende Ringe, die eine innere Region mit zahlreichen kleineren gap junctions umgeben, sichtbar (Abb. 11 E). Da sich nicht alle endständigen Glanzstreifen des Gewebes auf einer Ebene befinden, sind einige Myozyten im Querschnitt ungefärbt.

Bei allen Maze-Patienten war diese „Normalverteilung“ der CX 43 gap junctions stark gestört (Abb. 11 B). In allen Geweben fiel im Längsschnitt eine starke Zunahme der lateralen Zellverbindungen sowie eine diffus verteilte, unstrukturierte Cx 43-Markierung an der gesamten Zelloberfläche auf.

Im Querschnitt war es aufgrund dieser Umverteilung von gap junctions schwierig, vollständige Glanzstreifen mit der charakteristischen ringförmigen Anordnung verschiedener gap junction-Größen zu finden, stattdessen war nur eine periphere linienartige Färbung vorhanden (Abb. 11 F).

Bei 14 Patienten waren die Cx 43 gap junctions zumindest noch in einigen Gewebereichen, ähnlich wie im Kontrollmyokard, relativ regelmäßig in deutlich abgrenzbaren Glanzstreifen angeordnet. Daneben lagen aber sowohl vermehrt laterale Zellkontakte, als auch über die gesamte Zelloberfläche verteilte Connexinansammlungen vor (Abb. 12).

Bei 9 Patienten traten neben wenigen, in gut definierbaren endständigen Glanzstreifen vorhandenen Cx 43 gap junctions, hauptsächlich laterale Zellkontakte auf. Einzelne gap junctions waren oft über lange Strecken perlschnurartig aneinander gereiht und longitudinal zwischen (z.T. degenerierten) Myozyten gestreut. Ausgeprägte, parallel zur Muskelfaserrichtung angeordnete Ansammlungen von Cx 43 gap junctions, waren in fibrotischen Bereichen auch an den lateralen Zellgrenzen zur extrazellulären Matrix hin sichtbar (Abb. 13 A-D).

In den Geweben von weiteren 8 Patienten war Cx 43 kaum noch in normalen Glanzstreifen, sondern überwiegend ohne ersichtliche Ordnung punktförmig diffus über die gesamte Zelloberfläche verteilt. In weiten Bereichen waren keine Glanzstreifen mehr erkennbar, die Färbung war extensiv auf nahezu der gesamten Zelloberfläche vorhanden (Abb. 14).

Hinsichtlich der Connexinverteilung war insgesamt kein Zusammenhang mit der Herkunft des Gewebes aus der freien Atriumwand oder dem Herzohr feststellbar.

1.1.2. Connexin 40

Cx 40 wird ähnlich wie Cx 43 mit zahlreichen tierartlichen Unterschieden in verschieden erregbaren Herzgeweben in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert.

Im humanen Myokard ist dieses Protein v.a. wesentlicher Bestandteil der gap junctions im Atrium und kommt daneben nur noch im Endothel von Blutgefäßen (Abb. 11 C,D) sowie dem proximalen Bereich des His' Bündel vor.

Im humanen rechten Atrium (und Appendix) sind Cx 40 und Cx 43 kolokalisiert (außer im Bereich der Gefäßendothelien, in denen Cx 43 fehlt), so daß die Verteilung der Cx 40 gap junctions die für Cx 43 beschriebenen Befunde sowohl bei den Kontrollgeweben als auch bei Patientenmaterial bestätigte. Im Kontrollgewebe von Patienten mit Sinusrhythmus waren Cx 40 gap junctions hauptsächlich in endständigen aber auch lateralen Glanzstreifen lokalisiert. Das Myokard von Patienten mit Vorhofflimmern zeigte dagegen eine deutliche Umverteilung der Cx 40 gap junctions an die lateralen Zellgrenzen sowie eine diffuse Verteilung über gesamte Zelloberflächen (Abb. 11 C,D und Abb. 13 E,F).

1.1.3. N-Cadherin

Dieses in der fascia adherens des Glanzstreifens lokalisierte Protein, entspricht in seiner Verteilung im humanen Atrium (und Appendix) der oben für die Connexine Beschriebenen. Die für N-Cadherin angefärbten Zellkontakte waren im Kontrollgewebe, ähnlich wie die markierten gap junctions, überwiegend in abgegrenzten regelmäßigen Glanzstreifen an den endständigen oder lateralen Zellgrenzen lokalisiert, während in den Geweben der Maze-Patienten eine auffallende Lateralisierung von N-Cadherin sowie völlig unstrukturierte Proteinanordnung über die gesamte Zelloberfläche hinweg vorlag (Abb. 15 B,D).

Im Querschnitt stellte sich N-Cadherin im Kontrollgewebe als ovale, zusammenhängend angefärbte, größere Fläche dar (Abb. 15 E), während bei Vorhofflimmern nur noch peripher schmale, linienartige Anfärbungen erkennbar waren (Abb. 15 F). Diese Umverteilung stimmte in aus Atrium und aus Appendix stammenden Geweben mit dem oben beschriebenen remodeling von gap junctions überein.

1.1.4 Desmoplakin

Die Desmoplakinverteilung entsprach der oben für Connexine und N-Cadherin Beschriebenen. Desmoplakin war mit den anderen Proteinen des Glanzstreifens sowohl in Kontrollgewebe als auch bei Maze-Patienten kolokalisiert (Abb. 16 E,F).

Abb. 11: Darstellung der normalen Connexin (Cx) 43 und Cx 40-Verteilung bei Sinusrhythmus im Kontrollgewebe gegenüber deutlichem remodeling von gap junctions im Gewebe der Maze-Patienten bei Vorhofflimmern (grün: Cx 43 in (A) und (B), bzw. Cx 40 in (C) und (D), rot: Aktin, blau: Zellkerne / Lipofuscin; durch Überlagerung von rot und grün erscheinen die gap junctions z.T. gelb angefärbt). (A), (C), (E) der linken Abbildungshälfte zeigen normale Cx-Verteilung im Kontrollgewebe, (B), (D), (F) rechts dagegen Cx-Umverteilung im Gewebe der Maze-Patienten.

A Cx 43 ist im Längsschnitt in deutlich abgrenzbaren, überwiegend endständigen Glanzstreifen lokalisiert.

B Im Gewebe eines Maze-Patienten sind nur noch einzelne Glanzstreifen erkennbar, stattdessen deutliche Umverteilung von Cx 43 gap junctions an die lateralen Zellgrenzen, z.T. auch an die Zelloberfläche.

C Cx 40 ist im Kontrollgewebe, wie Cx 43 in (A), innerhalb gut abgrenzbarer Glanzstreifen lokalisiert. Ein Gefäß mit positiver Cx 40 Markierung ist erkennbar (*).

D Deutliche Umverteilung von Cx 40 im Gewebe eines Maze-Patienten.

(*) kennzeichnet positive Cx 40 Markierung im Gefäßendothel.

E Cx 43 gap junctions im Querschnitt von Kontrollgewebe; mehrere endständige Glanzstreifen (→) sind in der geschnittenen Ebene sichtbar, mit einem Ring aus größeren gap junctions in der Zellperipherie und kleineren zentral gelegenen gap junctions.

F Cx 43 gap junctions im Querschnitt bei Vorhofflimmern; charakteristische Glanzstreifen sind kaum erkennbar, die periphere, linienartige Anfärbung entspricht der Umverteilung von Cx 43 gap junctions in (B).

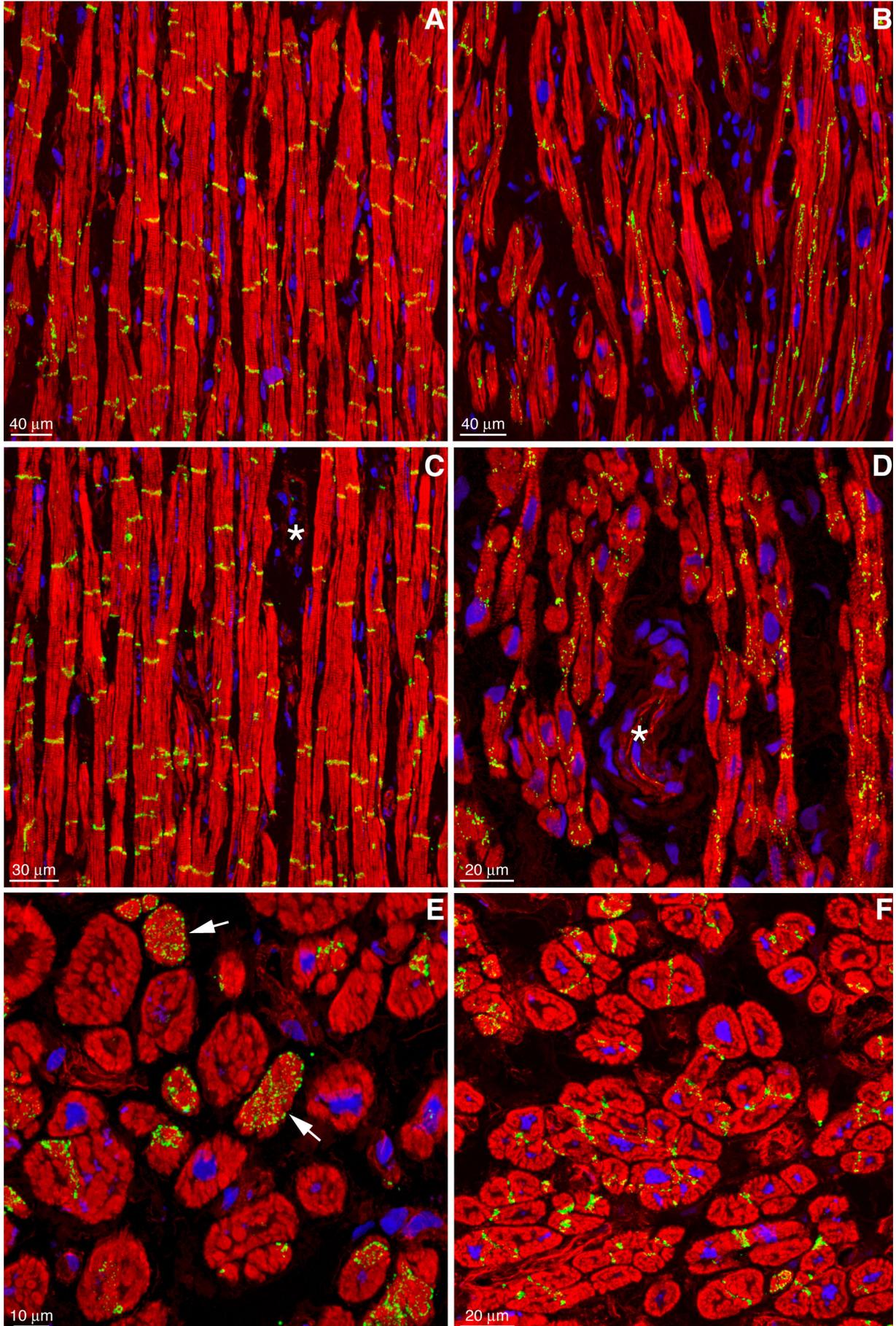


Abb. 12: Umverteilung von Cx 43 bei Vorhofflimmern (grün (gelb): Cx 43, rot: Aktin in (A), (B), (D-F) bzw. α -Aktinin in (C), blau: Zellkerne / Lipofuscin).

A, B Cx 43 gap junctions sind in einigen noch abgrenzbaren regulären Glanzstreifen, daneben aber vermehrt an den lateralen Zellgrenzen lokalisiert.

C, D Cx 43 Markierung ist teilweise noch innerhalb von Glanzstreifen, aber auch diffus verteilt an der Zelloberfläche sichtbar.

E neben einem regulären Glanzstreifen ist nur eine oberflächliche Connexinverteilung erkennbar

F Cx 43 gap junctions sind nur noch in wenigen Glanzstreifen, sondern hauptsächlich an der Zelloberfläche und an den lateralen Zellgrenzen lokalisiert.

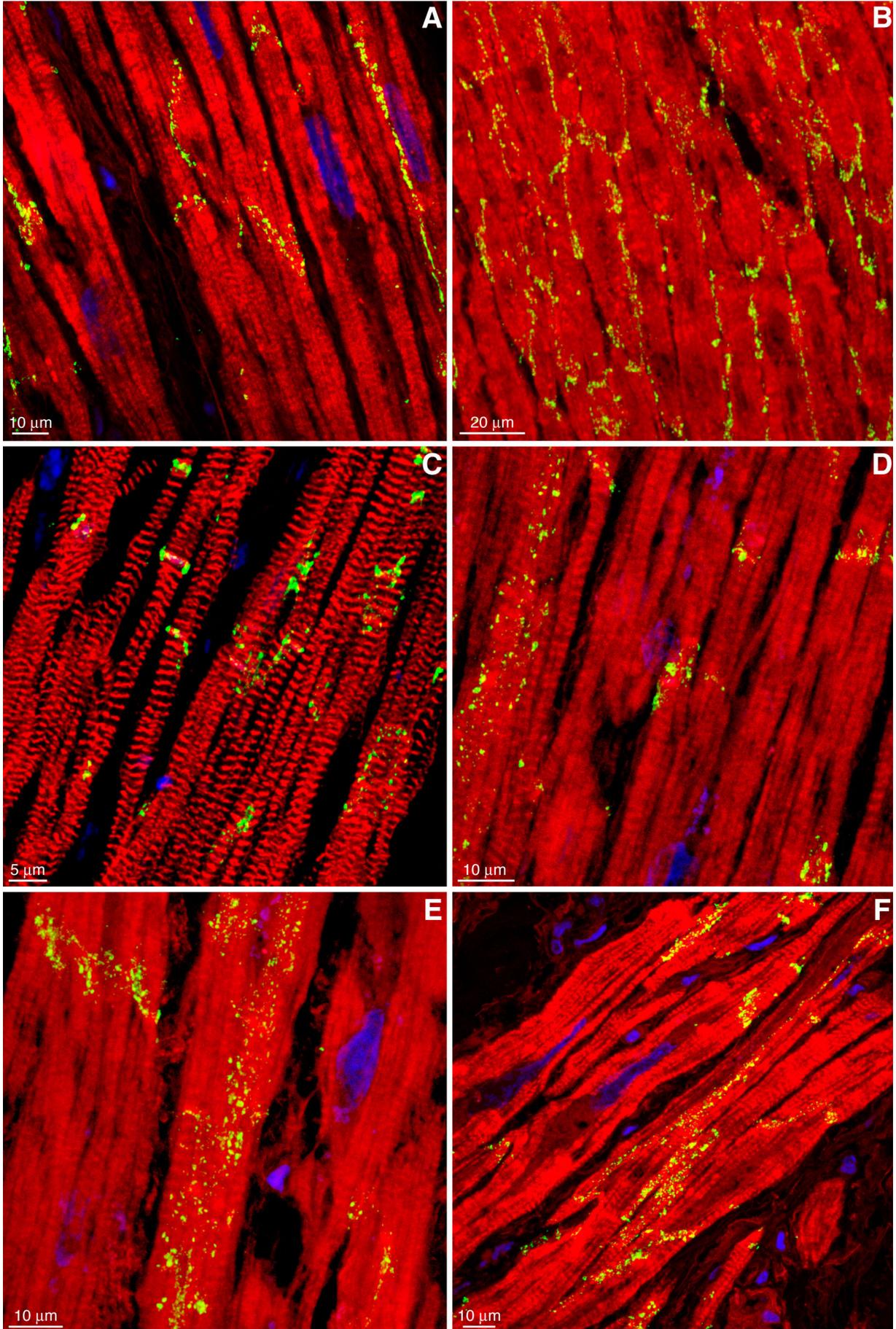


Abb. 13: Ausgeprägte Lateralisierung von gap junctions bei Vorhofflimmern (grün (gelb): Cx 43 in (A)-(D) bzw. Cx 40 in (E) und (F), rot: Aktin in (A),(E),(F) bzw. α -Aktinin in (C), blau: Zellkerne)

A *Deutliche Umverteilung von Cx 43 gap junctions an die lateralen Myozytengrenzen zum angrenzenden EZR.*

B *Identischer konfokaler Bildausschnitt, aber separate Darstellung perlschnurartig aneinandergereihter Cx 43 gap junctions unter Verwendung nur eines Laserkanals.*

C *Lateralisierung von Cx 43 in intakten Myozyten, die durch weiten EZR voneinander getrennt sind.*

D *Gleicher Bildausschnitt mit separater Demonstration der gap junctions unter Verwendung nur eines Laserkanals.*

E *Ausgeprägte Lateralisierung und perlschnurartige Aneinanderreihung von Cx 40 gap junctions.*

F *Lateralisierung von Cx 40 gap junctions im Querschnitt. Vollständige charakteristische Glanzstreifen sind nur noch vereinzelt erkennbar, stattdessen sind überwiegend periphere schmale Anfärbungen von Cx 40 gap junctions vorhanden.*

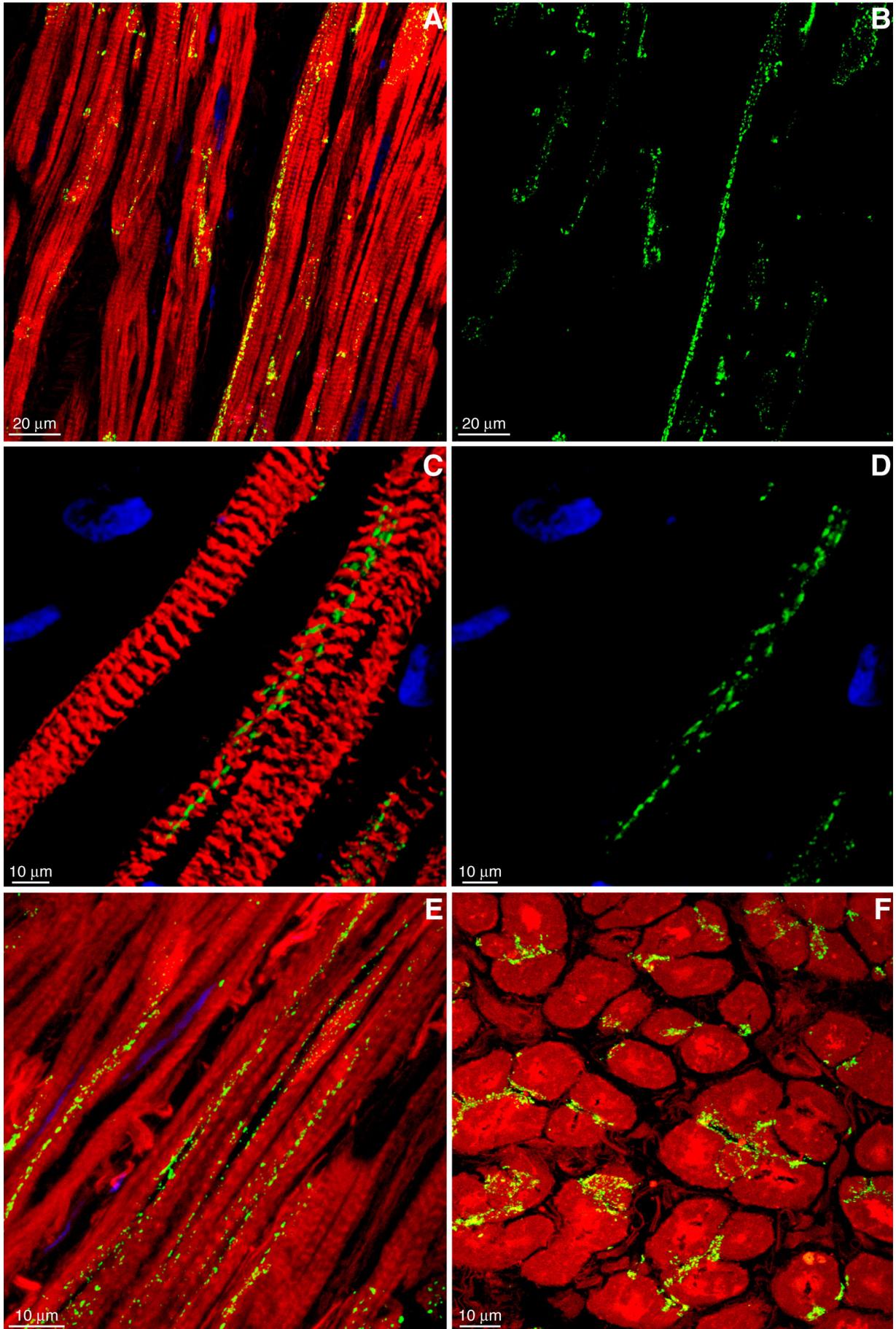


Abb. 14: Unregelmäßige, diffuse Cx-Expression auf der gesamten Zelloberfläche bei Vorhofflimmern (grün (gelb): Cx 43, rot: Aktin, bzw. α -Aktinin in (E), blau: Zellkerne).

A *Neben vereinzelt erkennbaren Glanzstreifen v.a. diffuse punktförmige Cx 43-Markierung ähnlich einem neonatalen / juvenilen Verteilungsmuster.*

B *Separate Darstellung der Cx 43 gap junctions im gleichen Bildausschnitt.*

C *Unregelmäßige, oberflächliche Cx 43 Verteilung in höherer Vergrößerung.*

D *Cx 43 Markierung diffus auf der Oberfläche z.T. degenerierender Kardiomyozyten verteilt.*

E *Oberflächlich punktförmige Cx 43 Verteilung in einzelnen Zellen in höherer Vergrößerung und Doppelfärbung mit α -Aktinin.*

F *Gleicher Bildausschnitt mit separater Darstellung der punktförmigen Cx 43 gap junctions.*

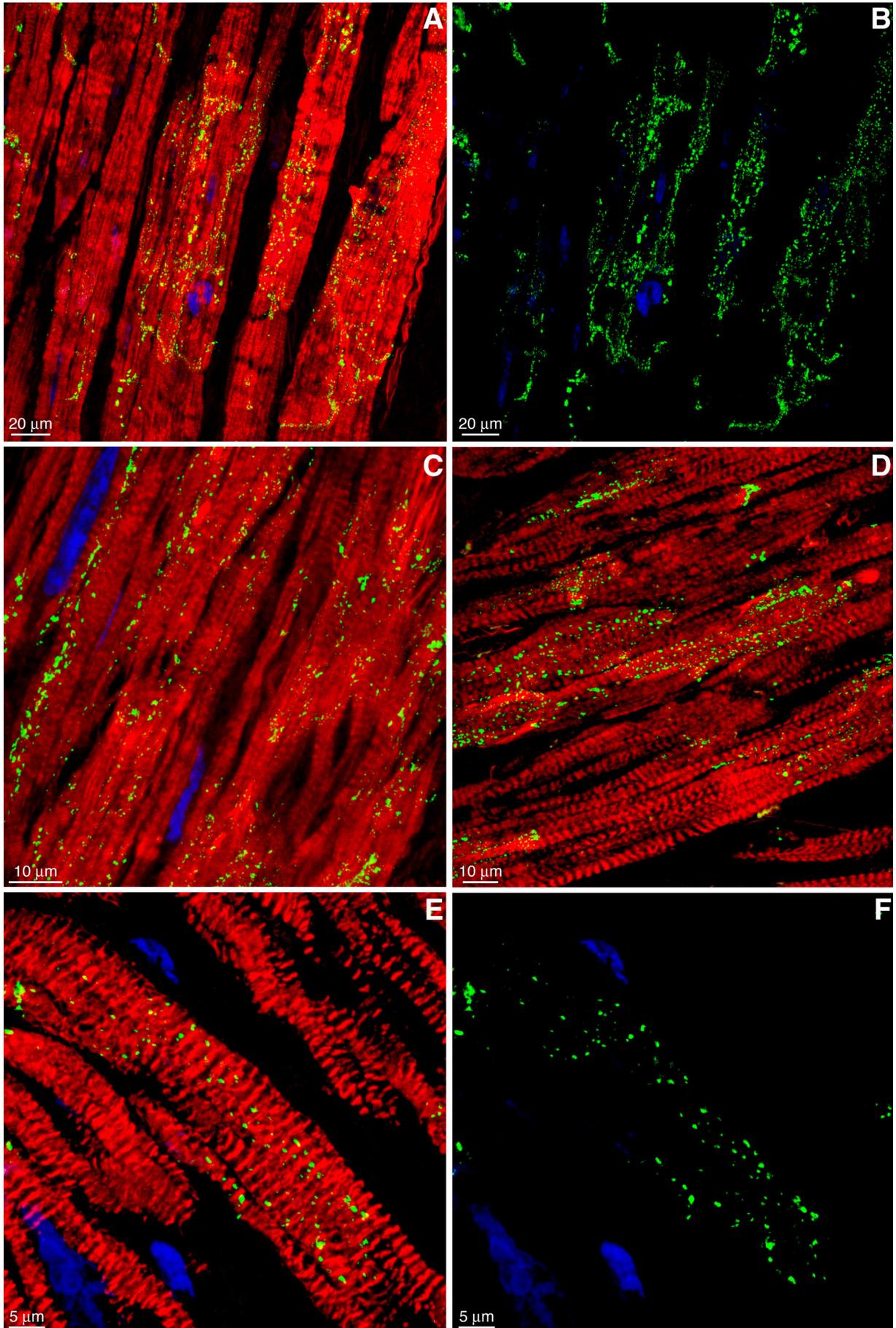


Abb. 15: Darstellung von N-Cadherin bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern (grün (gelb): N-Cadherin, rot: Aktin, blau: Zellkerne / Lipofuscin). (A), (C), (E) der linken Abbildungshälfte zeigen Kontrollgewebe mit Sinusrhythmus, (B), (D), (F) rechts Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern.

A *N-Cadherin in der f. adherens klar abgegrenzter, überwiegend endständiger Glanzstreifen im Kontrollmyokard.*

B *Deutliche Umverteilung von N-Cadherin bei Vorhofflimmern. N-Cadherin ist nur noch in wenigen vorhandenen Glanzstreifen, sondern v.a. lateral oder oberflächlich lokalisiert.*

C *Dreidimensionale Darstellung von N-Cadherin in gut abgrenzbaren Glanzstreifen des Kontrollmyokards bei höherer Vergrößerung.*

D *Umverteilung von N-Cadherin im Gewebe eines Maze-Patienten bei höherer Vergrößerung.*

E *Querschnitt von Kontrollgewebe: N-Cadherin stellt sich an den Zellenden als größere ovale Anfärbung dar (→).*

F *Querschnitt von Gewebe eines Maze-Patienten: Aufgrund der Umverteilung von N-Cadherin ist nur noch eine periphere, schmale Anfärbung erkennbar.*

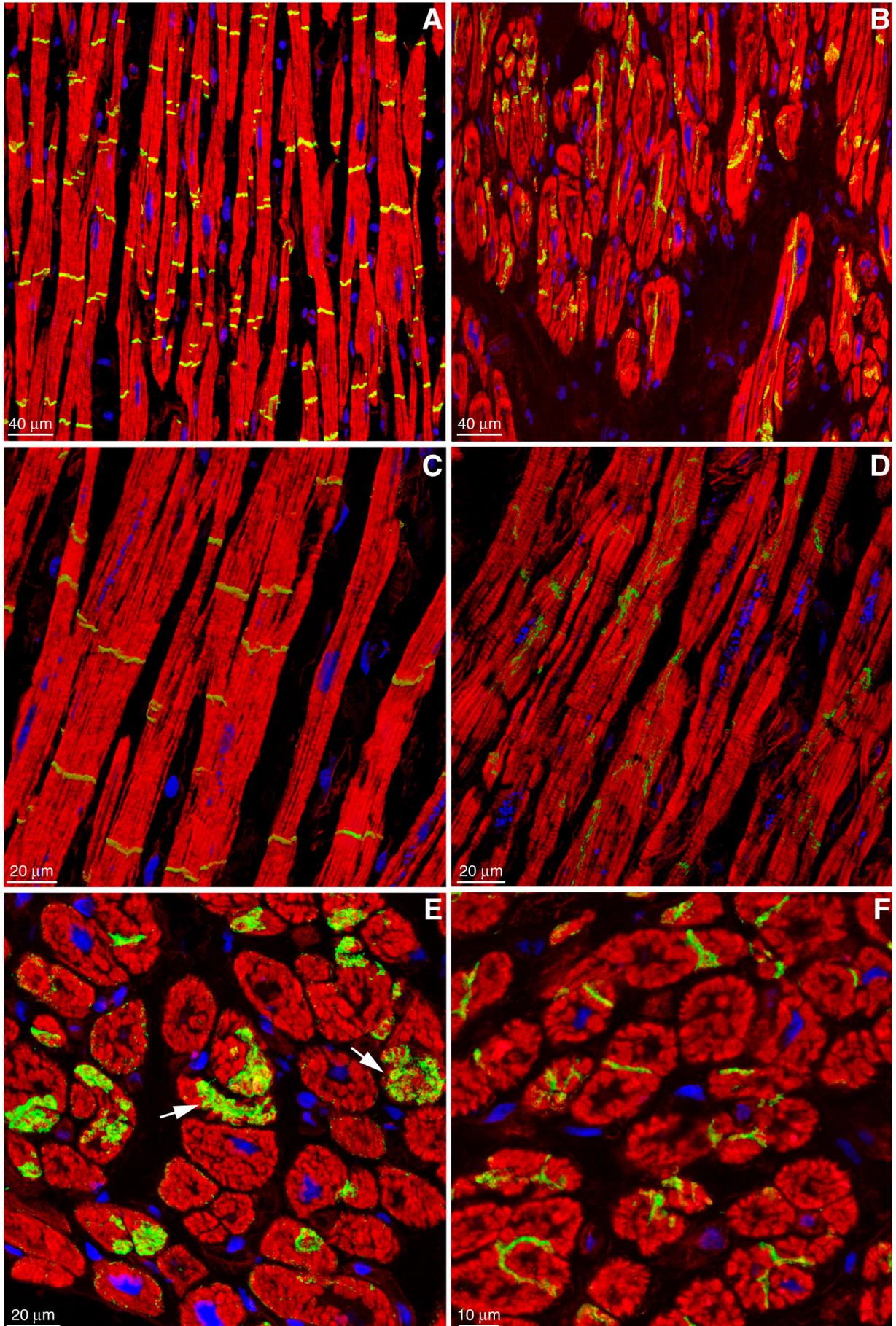
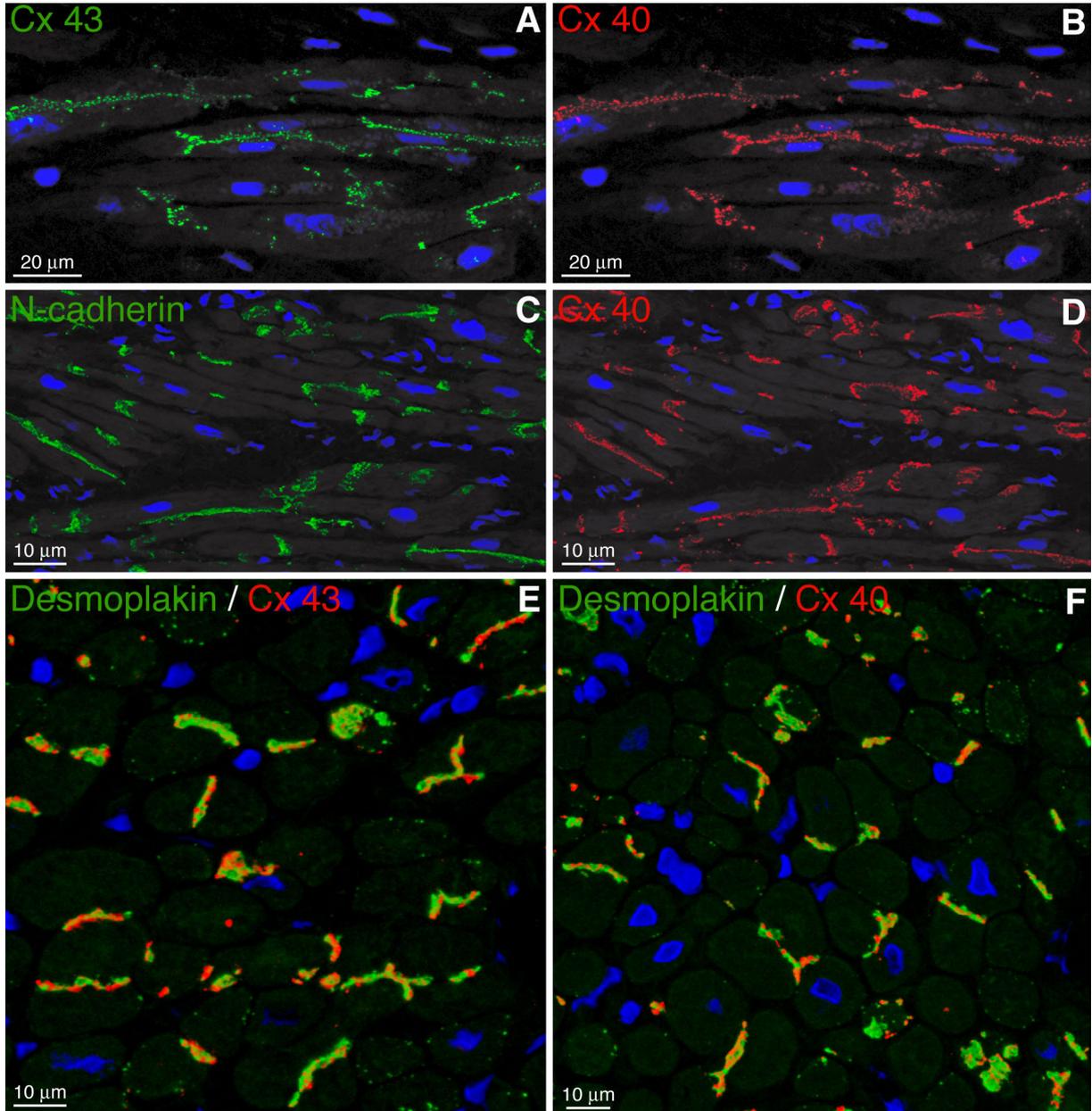


Abb. 16: Darstellung der bei Vorhofflimmern gleichzeitig stattfindenden Umverteilung aller Proteine des Glanzstreifens mit verschiedenen Doppelfärbungen (grün: Cx 43 in (A) bzw. N-Cadherin in (C) bzw. Desmoplakin in (E) und (F), rot: Cx 40 in (B), (D) und (F) bzw. Cx 43 in (E)).

A, B Doppelfärbung für Cx 43 und Cx 40, mit anschließend jeweils separater Darstellung der Proteine unter Verwendung nur eines Laserkanals. Cx 43 und Cx 40 sind vollständig kolokalisiert.

C, D Doppelfärbung für N-Cadherin und Cx 40, wiederum unter Verwendung nur eines Kanals, zeigt die gleichzeitige Umverteilung und Kolokalisation dieser beiden Glanzstreifenproteine in einem anderen Gewebeausschnitt.

E, F Doppelfärbung von Cx 43 (E) bzw. Cx 40 (F) und jeweils Desmoplakin zeigt die gleichzeitige Lateralisierung von Connexinen und Desmoplakin.



1.2. Extrazelluläre Proteine

1.2.1. Kollagen I

Kollagen I wurde qualitativ als Maß der Fibrose an allen Patienten- und Kontrollgeweben sowie vergleichend am Atrium vom Schwein beurteilt.

Am normalen atrialen Myokard (Abb. 17 A,C,E) stellt sich Kollagen I in Form feiner Fibrillen dar, welche die einzelnen Muskelfasern als Endomysium umgeben, sich im Extrazellularraum zu Kollagenfasern mit mehreren μm Durchmesser zusammenlagern und so als Perimysium die primären und sekundären Muskelfaserbündel trennen und breite, gefäßführende Bindegewebssepten bilden.

Diese physiologisch vorkommenden Septen sind im Atrium von Mensch und Schwein in Anzahl und Breite wesentlich stärker ausgeprägt, als in normalem Ventrikelmyokard.

Im Vergleich zu den Kontrollgeweben und porcinem Atrium lagen bei allen Maze-Patienten deutliche fibrotische Veränderungen vor.

Unter Berücksichtigung der physiologischen Verteilung im Atrium wurde, unabhängig von der Form der Fibrose, eine Einteilung des Patientenkollektivs in drei Gruppen vorgenommen :

- Gruppe I = geringgradige Fibrose (+)
- Gruppe II = mittelgradige Fibrose (++)
- Gruppe III = hochgradige Fibrose (+++)

Bei der Beurteilung wurde darauf geachtet, die von größeren oder verbreiterten Septen ausgehenden Bindegewebsareale von der interstitiellen, Ersatz- oder perivaskulären Fibrose zu differenzieren.

Gruppe I: 10 der 31 Patienten zeigten eine mehr oder weniger normale Kollagen I - Verteilung mit eher geringgradiger Zunahme der extrazellulären Matrix. In den Geweben dieser Patienten waren die meist eher langen und schmalen, physiologisch vorkommenden Bindegewebssepten zwar gegenüber dem Kontrollgewebe deutlich vermehrt, aber in insgesamt noch vergleichsweise geringer Anzahl (gegenüber hochgradigen Veränderungen) vorhanden. Der Extrazellularraum erschien in einigen Fällen erweitert, wobei die erweiterten Räume aber nicht immer vollständig von Kollagen ausgefüllt wurden; in einigen Gewebebereichen war deutliche interstitielle Fibrose erkennbar. Perivaskuläre Fibrose kam bei keinem dieser Patienten vor. (Abb. 18 A,C)

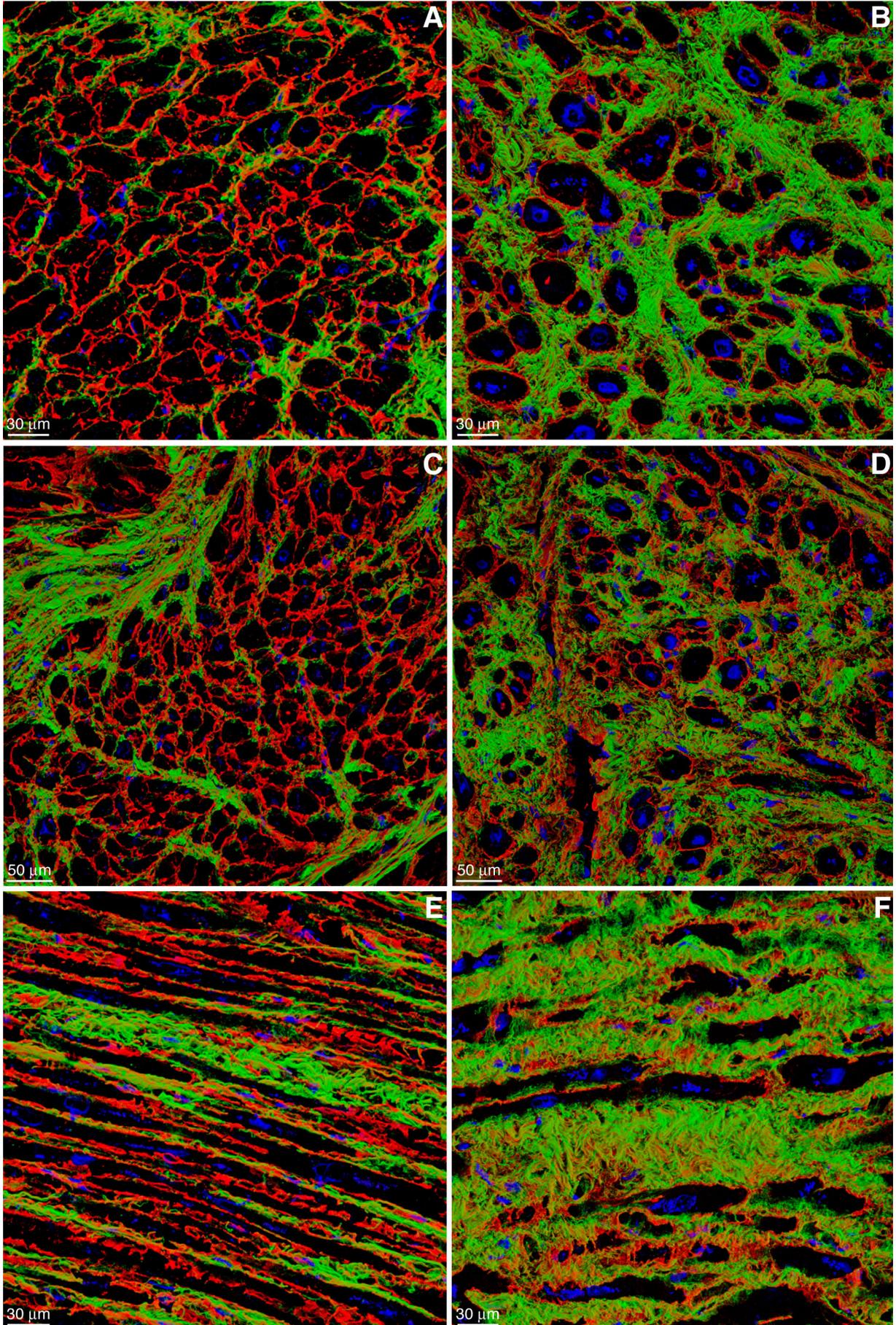
Gruppe II: Bei 15 der 31 Patienten waren mittelgradige fibrotische Veränderungen vorhanden. Das Gewebe wurde von deutlich mehr und insgesamt breiteren oder auch nur gebietsweise stark verbreiterten Septen durchzogen. Unabhängig von diesen von den verbreiterten Bindegewebssepten ausgehenden Arealen, trat in zahlreichen Gewebebereichen zusätzlich noch deutliche interstitielle Fibrose auf; daneben waren z.T. auch vermehrt Kollagen I-Fasern locker, diffus im häufig erweiterten EZR verteilt. Beim überwiegenden Teil (12) dieser Gruppe lag zumindest vereinzelte, unterschiedlich stark ausgeprägte, perivaskuläre Fibrose vor. (Abb. 18 B,D und Abb. 19 A,B)

Gruppe III: 6 der untersuchten Gewebe wurden als hochgradig fibrotisch eingestuft. Hier waren die zahlreich vorkommenden Septen insgesamt deutlich verbreitert, der EZR war oft stark erweitert. Die Muskelfaserbündel, teilweise auch einzelne Muskelfasern wurden über große Gebiete hinweg deutlich durch starke interstitielle Fibrose getrennt. Daneben waren einige septumsfern lokalisierte Bereiche mit Ersatzfibrose vorhanden; perivaskuläre Fibrose war bei allen Patienten eindeutig erkennbar. (Abb. 17 B,D,F-H und Abb. 19 C,D)

Innerhalb dieser Gruppen entstand unter rein morphologischen Gesichtspunkten teilweise der Eindruck, daß im Appendixgewebe von Kontroll- sowie von Maze-Patienten mehr Kollagen vorhanden war, als in der freien atrialen Wand.

1.2.2. Kollagen VI und Fibronectin

Im Gegensatz zu dem überwiegend fibrillären Kollagentyp I sind Kollagen VI (Abb. 17-19) und auch Fibronectin (Abb. 18 A,B und Abb. 20 C,D) eher homogen im gesamten Interstitium verteilt. Einzelne Kollagen VI-Fasern ziehen häufig auch als schmale Ausläufer der Basalmembran bis in die intrazellulären T-Tubuli, während bei Kollagen I und meist auch bei Fibronectin keine intrazelluläre Anfärbung im Bereich des T-Systems erkennbar war. Ansonsten deckte sich die Verteilung und Zunahme dieser beiden weiteren extrazellulären Parameter hinsichtlich fibrotischer Veränderungen überwiegend mit der oben beschriebenen Verteilung von Kollagen I.



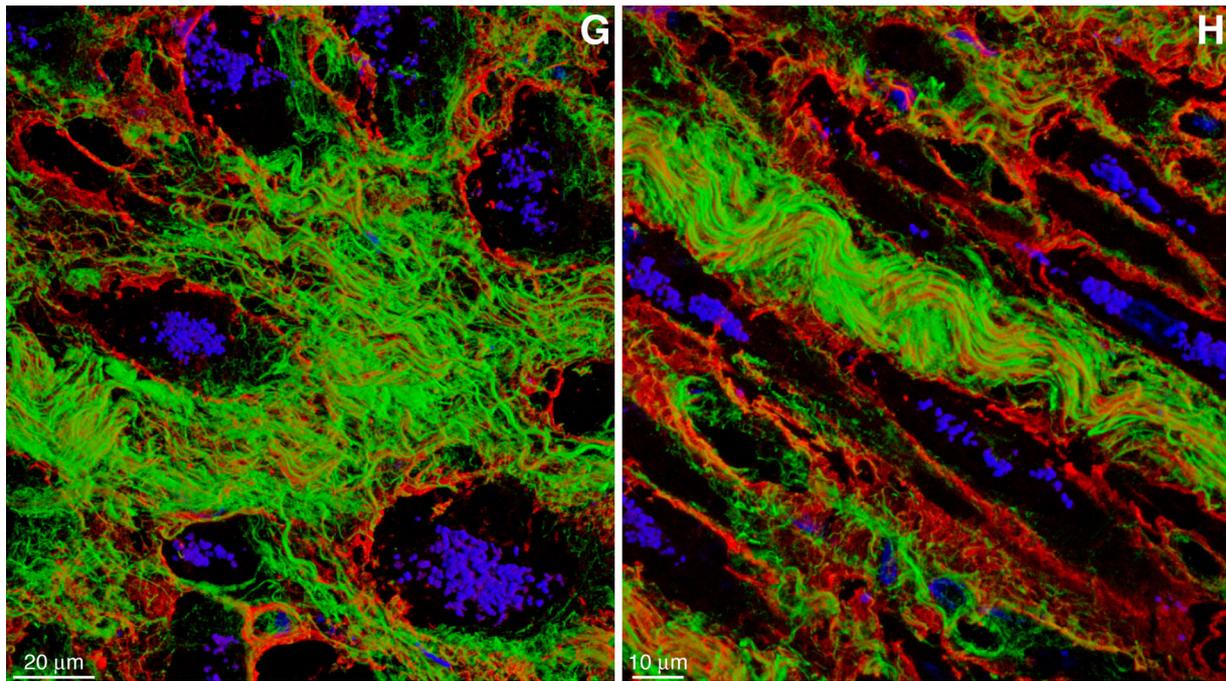


Abb. 17: Darstellung von normaler Kollagenverteilung bei Sinusrhythmus gegenüber hochgradiger Fibrose bei Vorhofflimmern mit einer Doppelfärbung für Kollagen I und Kollagen VI (grün: Kollagen I, rot: Kollagen VI, blau: Zellkerne / Lipofuscin). (A), (C), (E) der linken Abbildungshälfte zeigen unverändertes Myokard des Kontrollgewebes, (B), (D), (F) rechts sowie (G) und (H) oben zeigen hochgradig fibrotisch verändertes Myokard der Maze-Patienten Gruppe III.

A Normales Myokard von Kontroll-Patienten mit feinen Kollagen I-Fibrillen und homogener Kollagen VI-Verteilung im Querschnitt; intrazelluläre Anfärbung von Kollagen VI ist im Bereich der T-Tubuli erkennbar.

B Hochgradige interstitielle Fibrose bei Vorhofflimmern im Querschnitt.

C Physiologische gefäßführende Bindegewebssepten im Kontrollgewebe.

D Von verbreiterten Septen ausgehende interstitielle Fibrose bei Maze-Patient.

E Normale Kollagen I und VI -Verteilung im Kontrollgewebe im Längsschnitt.

F Hochgradige interstitielle Fibrose bei Vorhofflimmern im Längsschnitt.

G, H Deutliche Separation einzelner Myozyten durch hochgradige interstitielle Fibrose (**G**) oder verbreiterte Bindegewebssepten (**H**) im Gewebe der Maze-Patienten im Quer- und Längsschnitt.

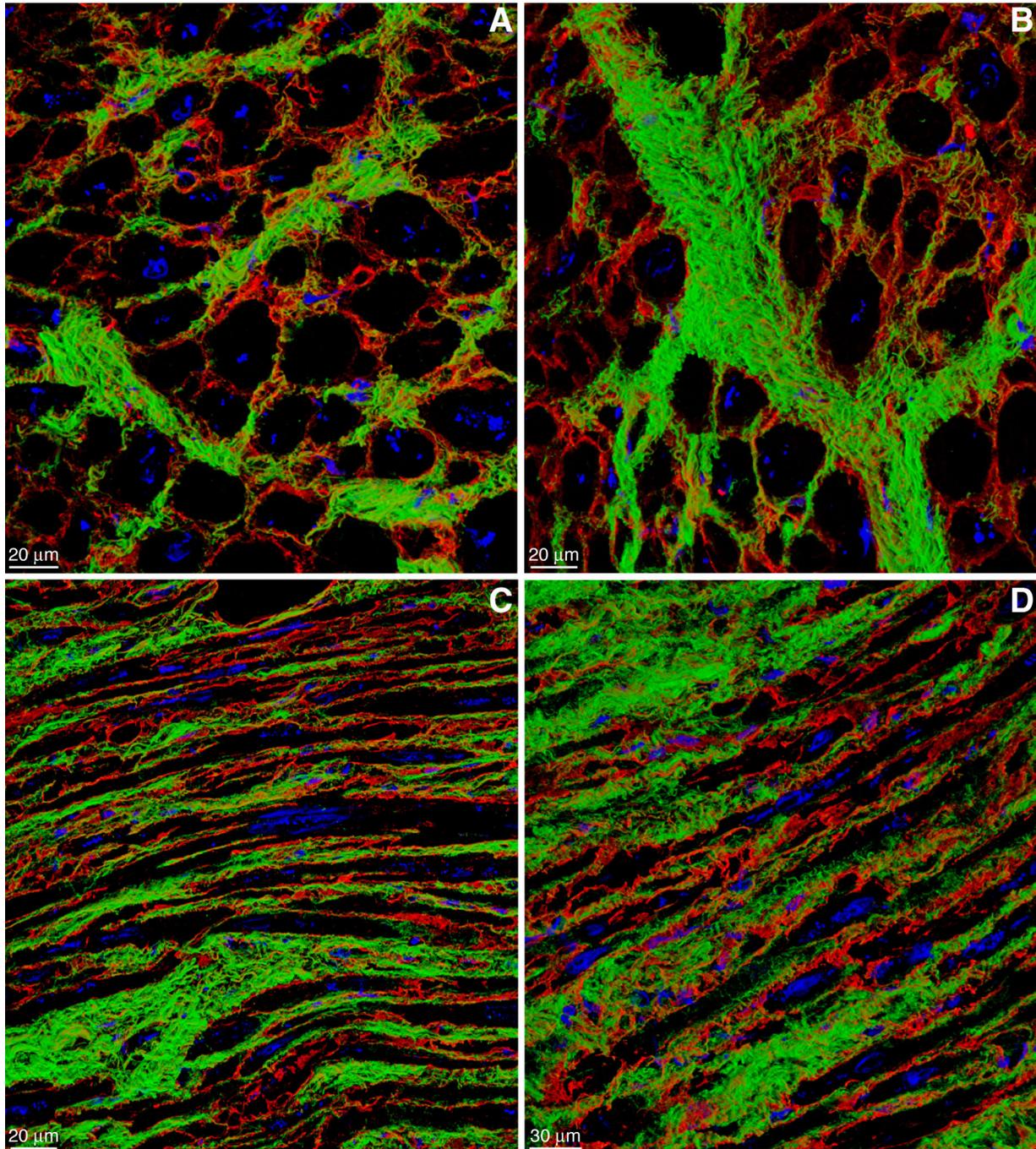


Abb. 18: Darstellung von Gewebe der Maze-Patienten Gruppe I und II (grün: Kollagen I, rot: Fibronectin in (A) und (B), bzw. Kollagen VI in (C) und (D), blau: Zellkerne/Lipofuscin).

A Geringgradige Fibrose in Gewebe von Maze-Patient der Gruppe I im Querschnitt; Fibronectin ist geringgradig vermehrt aber ähnlich homogen wie Kollagen VI im EZR verteilt, intrazelluläre Anfärbung ist teilweise im Bereich des T-Systems erkennbar.

B Verbreitertes Septum bei Maze-Patient der Gruppe II im Querschnitt.

C Geringgradige (Gruppe I) interstitielle Fibrose bei Vorhofflimmern im Längsschnitt.

D Mittelgradige (Gruppe II) interstitielle Fibrose bei Vorhofflimmern im Längsschnitt.

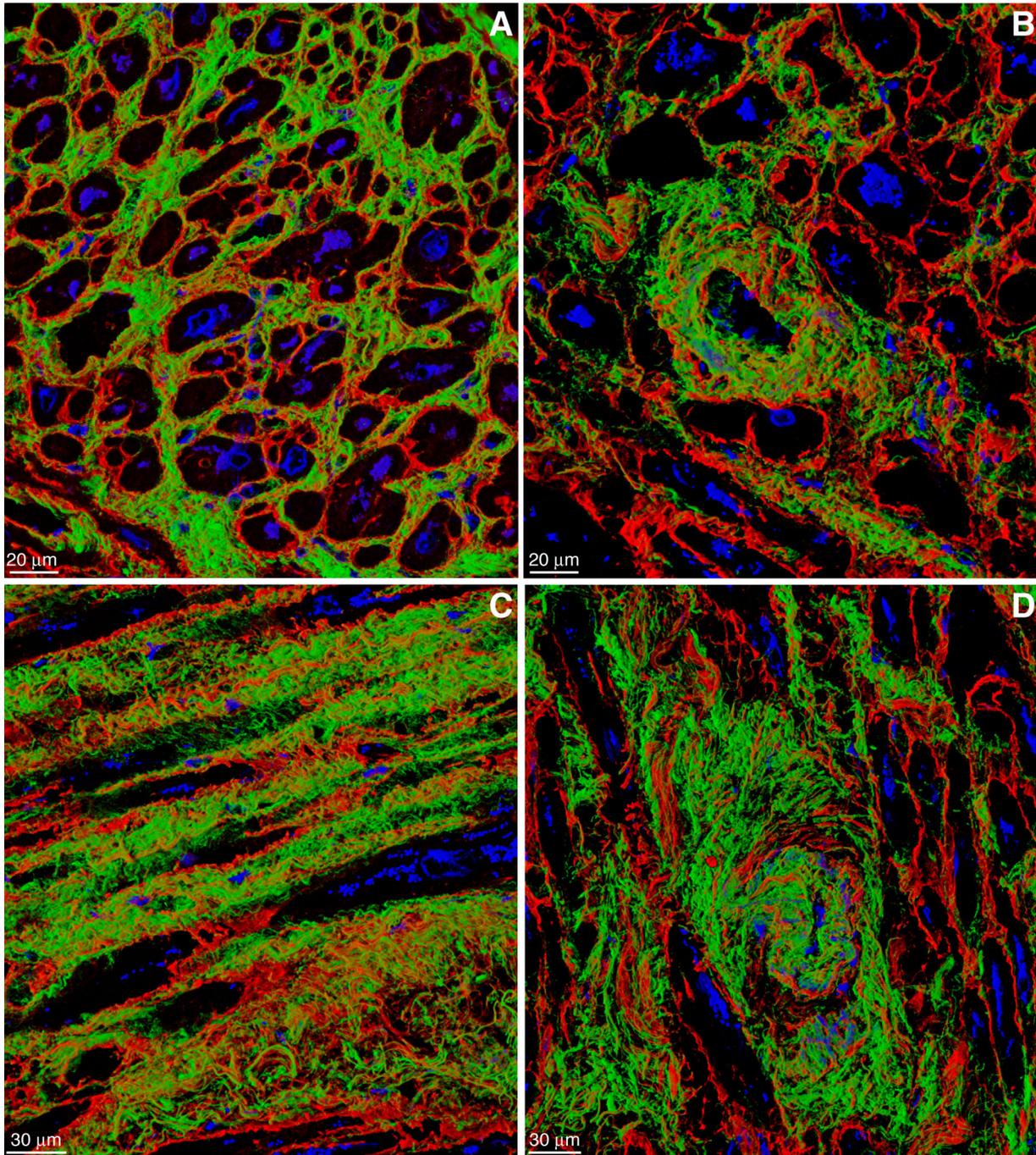


Abb. 19: Darstellung von fibrotischen Veränderungen (Gruppe II und III) bei Vorhofflimmern (grün: Kollagen I, rot: Kollagen VI, blau: Zellkerne/Lipofuscin).

A Mittelgradige interstitielle Fibrose bei Maze-Patient Gruppe II.

B Perivaskuläre Fibrose bei Maze-Patient Gruppe II.

C Bereiche mit interstitieller- und Ersatzfibrose (im rechten unteren Bildteil) bei Vorhofflimmern (Gruppe III).

D Hochgradige perivaskuläre Fibrose bei Vorhofflimmern (Gruppe III).

1.3. Sarkomerproteine

1.3.1. α -Aktinin

Das Aktin-bindende Protein α -Aktinin ist in der Z-Scheibe der Myozyten lokalisiert und stellt sich in nicht pathologisch veränderten Kardiomyozyten in Form einer regelmäßigen Querstreifung dar (Abb. 20 A).

Bei einem Großteil der Maze-Patienten ergab die Anfärbung dieses Proteins verschiedengradige degenerative Veränderungen von denen oft nur einzelne Myozyten, v.a. in fibrotischen Bereichen, z.T. aber auch zusammenhängende größere Gewebebereiche betroffen waren. Bei allen untersuchten Patienten war zumindest an einigen Stellen ein deutlicher Verlust der Querstreifung sowie eine Abnahme des kontraktiven Materials zu erkennen (Abb. 20 B-D). Diese Veränderungen beschränkten sich zum Teil auf die Umgebung des Zellkerns, breiteten sich aber auch bis zur Peripherie über die gesamte Zelle aus, bis hin zur vollständigen Myolyse, von der dann v.a. einzelne Myozyten in Gebieten mit starker Fibrose betroffen waren.

1.3.2. Aktin

Die Darstellung der mit Phalloidin zur Quantifizierung gleichzeitig angefärbten Aktinfilamente bestätigte die für α -Aktinin beschriebenen Befunde im Hinblick auf unterschiedlich stark ausgeprägte degenerative Veränderungen.

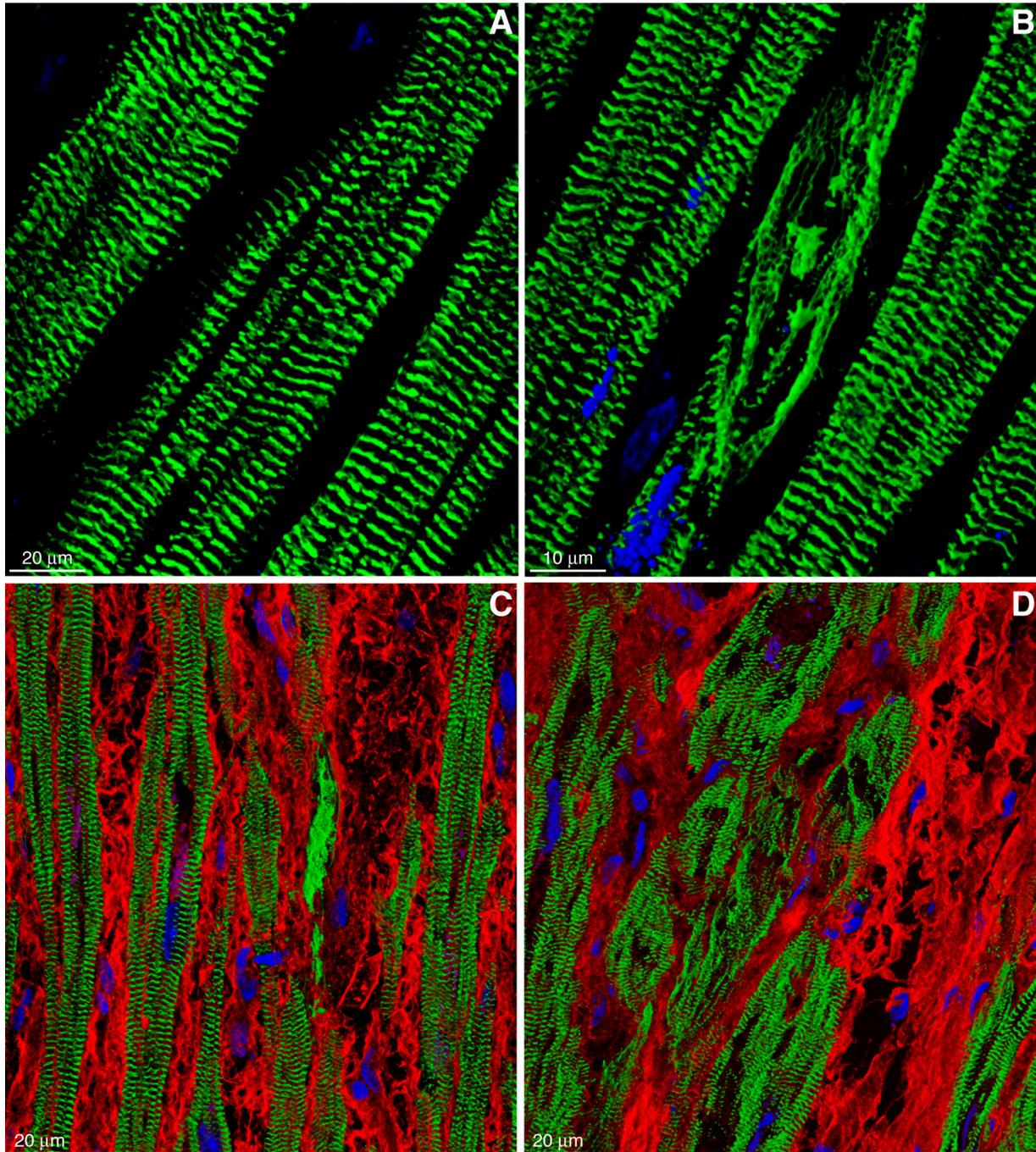


Abb. 20: Darstellung intakter und degenerativ veränderter Kardiomyozyten (grün: α -Aktinin, rot: Fibronectin, blau: Zellkerne/ Lipofuscin)

A Regelmäßige Querstreifung von α -Aktinin in intakten Kardiomyozyten.

B Einzelne degenerierte Zelle mit Verlust der Querstreifung neben normal erscheinenden Myozyten.

C Degeneration einzelner Zellen innerhalb eines fibrotischen Gewebeareals.

D Verlust der Querstreifung und Reduktion von α -Aktinin in einem gesamten Myokardbereich mit fibrotischer Veränderung.

2. Proteinquantifizierung

2.1. Proteine des Glanzstreifens

2.1.1. Connexin 43 Fluoreszenz pro Zelle

Connexin 43 war bei Vorhofflimmern (Maze-Patienten) vermindert gegenüber dem Kontrollgewebe von Patienten mit Sinusrhythmus. In den rechtsatrialen Appendices (RAA) war Connexin 43 signifikant um 58% bzw. in der rechtsatrialen freien Wand (RFW) um 40% reduziert.

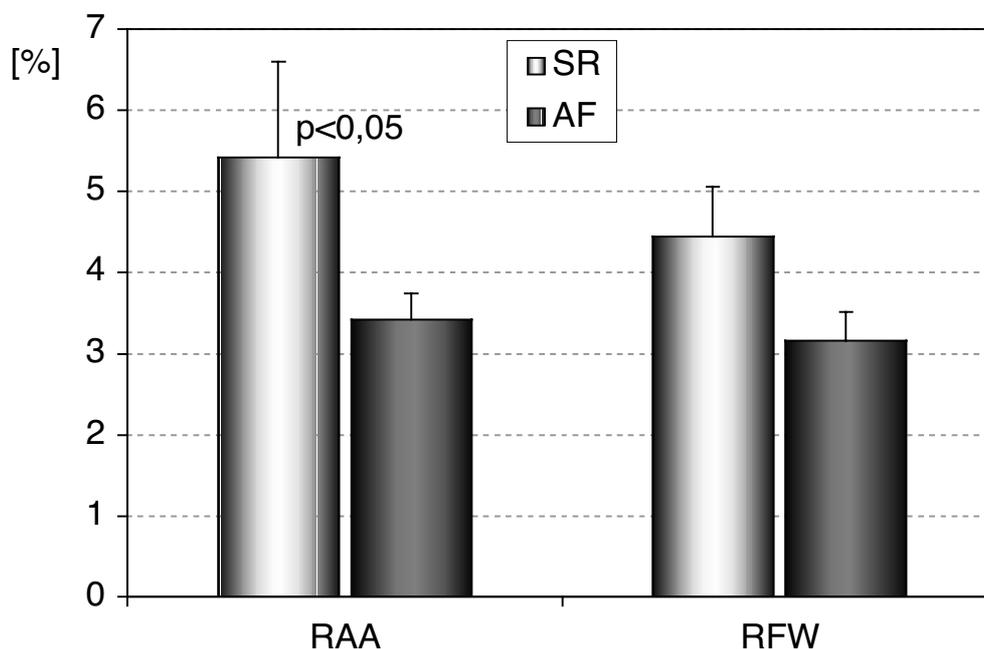


Abb. 21: Cx 43 % pro Myozytenfläche (SR= Sinusrhythmus, AF= Vorhofflimmern, RAA= rechtsatrialer Appendix, RFW= rechtsatriale freie Wand)

Die quantitative Bestimmung der Connexin 43 Fluoreszenz pro Zelle zeigt eine Reduktion von Connexin 43 in RAA ($p < 0,05$) und RFW der Maze-Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Daten sind als SEM angegeben.

2.1.2. Connexin 40 Fluoreszenz pro Zelle

Connexin 40 war in den rechtsatrialen Appendices (RAA) der Maze-Patienten um 35% gegenüber dem Kontrollgewebe reduziert. In der rechtsatrialen freien Wand (RFW) ergab sich dagegen ein tendenzieller Anstieg von Cx 40 um 16,5% gegenüber dem Kontrollgewebe.

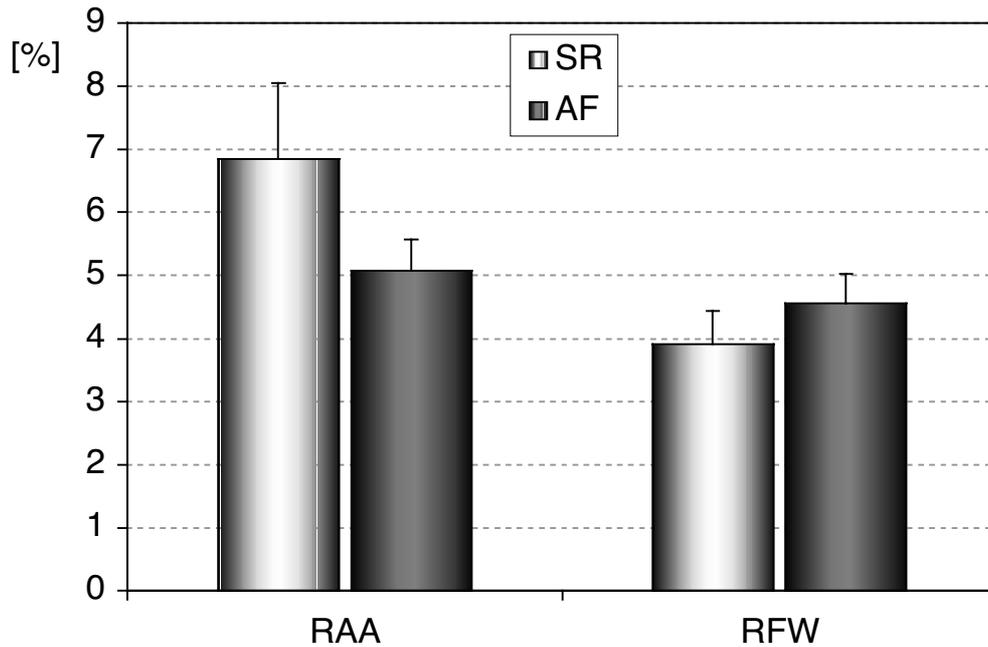


Abb. 22: Cx 40 % pro Myozytenfläche (SR= Sinusrhythmus, AF= Vorhofflimmern, RAA= rechtsatrialer Appendix, RFW= rechtsatriale freie Wand)

Die quantitative Bestimmung der Connexin 40 Fluoreszenz pro Zelle zeigt eine Reduktion von Connexin 40 in RAA der Maze-Patienten und eine Erhöhung in RFW im Vergleich zu Kontrollgewebe.

Die Daten sind als SEM angegeben.

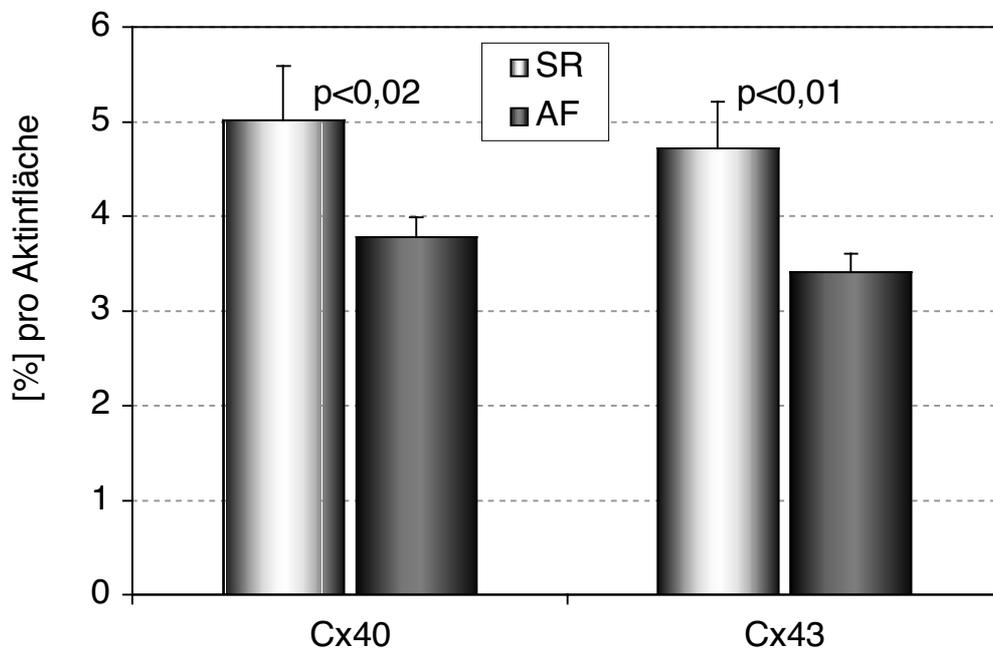


Abb. 23: Cx 43 % und Cx 40 % pro Aktinfläche (SR= Sinusrhythmus, AF= Vorhofflimmern)

Signifikante Reduktion von Connexin 43 und Connexin 40 im Gewebe der Maze-Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Daten sind als SEM angegeben.

2.1.3 Connexin 43- und Connexin 40 Fluoreszenz pro Fläche

Bei der Connexinquantifizierung pro Aktinfläche wurde die Tendenz der Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen pro Zelle bestätigt. Connexin 43 war um 38% und Connexin 40 um 32% pro Aktinfläche im Gewebe der Maze-Patienten signifikant reduziert (Abb. 23).

2.1.4. N-Cadherin Fluoreszenz

Für N-Cadherin ergaben sich keine signifikanten quantitativen Veränderungen zwischen Maze-Patienten und Kontrollgewebe.

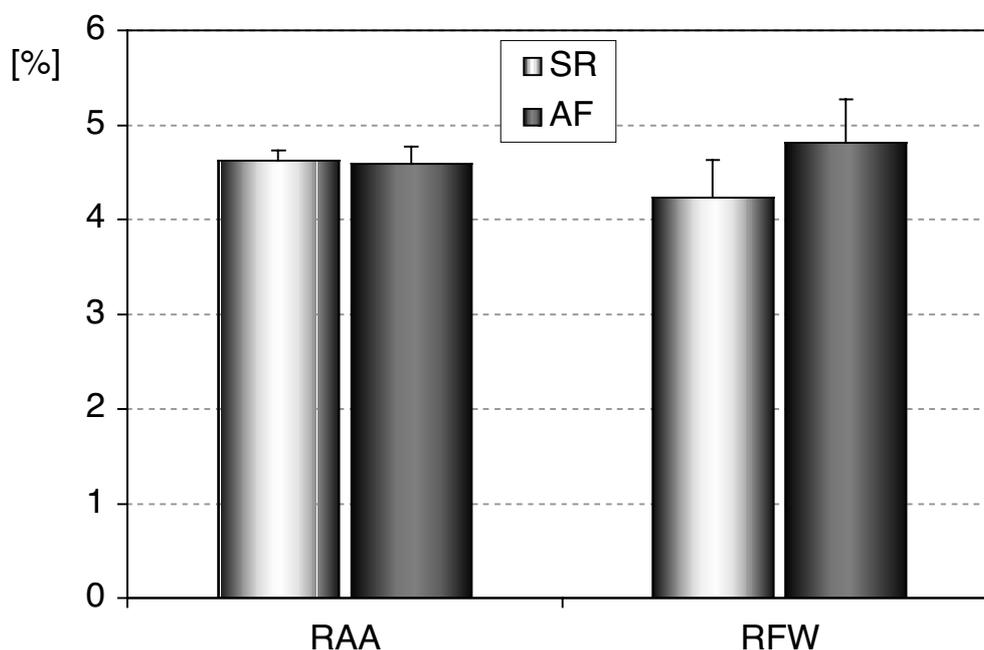


Abb. 24: N-Cadherin % pro Myozytenfläche
(SR= Sinusrhythmus, AF= Vorhofflimmern, RAA= rechtsatrialer Appendix, RFW= rechtsatriale freie Wand)

Die quantitative Bestimmung der N-Cadherin Fluoreszenz pro Zelle ergibt keine Veränderungen im Gewebe der Maze-Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Daten sind als SEM angegeben.

2.1.5. Korrelationen zwischen Connexin 43, -40 und N-Cadherin

2.1.5.1. Connexin 43 und Connexin 40

Bei Kontrollpatienten mit Sinusrhythmus liegt eine enge Korrelation zwischen der Connexin 43 und Connexin 40 Menge vor. Diese Korrelation besteht nicht mehr bei Patienten mit Vorhofflimmern.

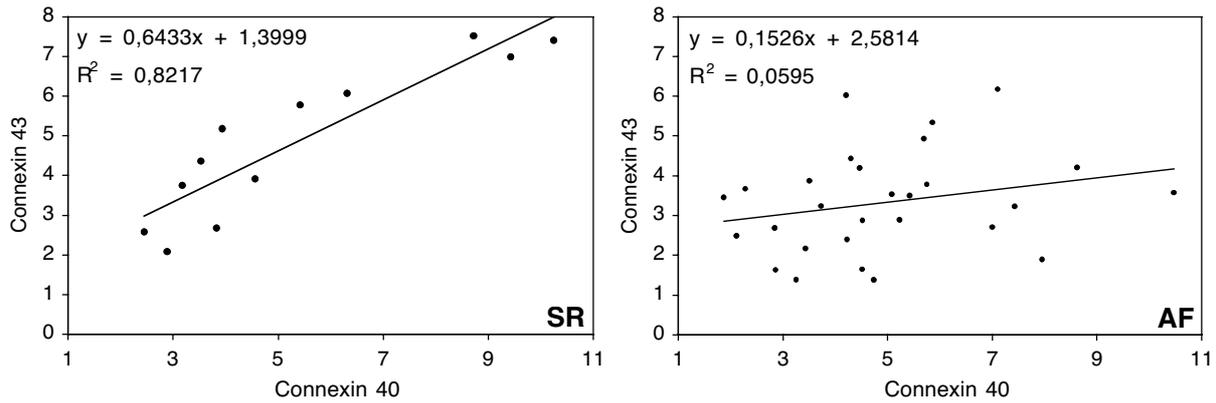


Abb. 25 A: Korrelation zwischen Connexin 43 und Connexin 40 bei Sinusrhythmus (SR) und Vorhofflimmern (AF). Bei Sinusrhythmus besteht eine enge Korrelation zwischen der Connexin 43- und Connexin 40-Menge. Bei Vorhofflimmern ist diese Korrelation nicht mehr vorhanden.

2.1.5.2. Connexin 43, - 40 und N-Cadherin

Bei Kontrollpatienten mit Sinusrhythmus besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Menge von N-Cadherin und der Summe beider Connexinmengen. Diese Korrelation bleibt auch bei Patienten mit Vorhofflimmern erhalten.

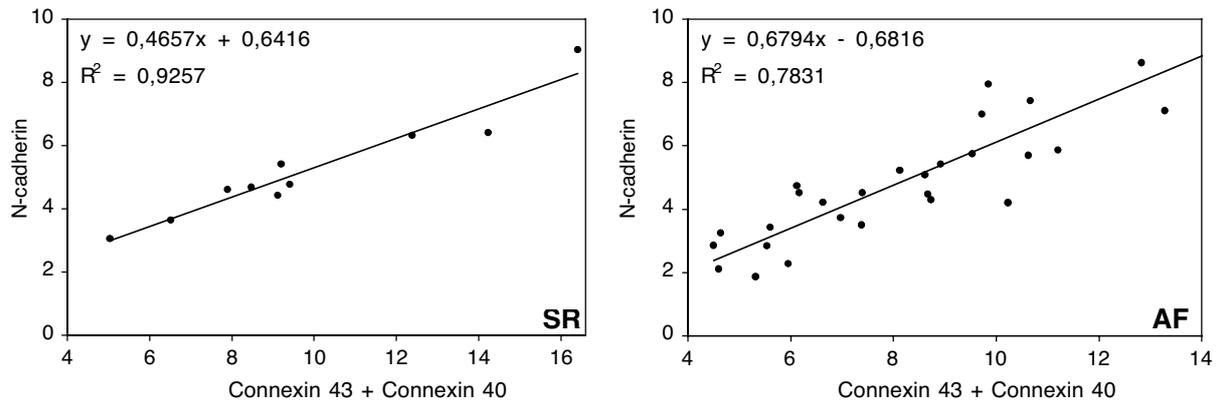


Abb.25 B: Korrelation zwischen den Mengen beider Connexinisoformen und N-Cadherin bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern. Bei Sinusrhythmus (SR) und auch bei Vorhofflimmern (AF) besteht eine enge Korrelation zwischen der Summe der Connexin 40- und Connexin 43 Mengen und N-Cadherin.

2.2. Proteine der extrazellulären Matrix

2.2.1. Kollagen I Fluoreszenz

Kollagen I war bei Maze-Patienten quantitativ vermehrt gegenüber dem Kontrollgewebe. In der rechtsatrialen freien Wand (RFW) der Maze-Patienten war Kollagen I signifikant um 53% und in den rechtsatrialen Appendices (RAA) um 33% erhöht.

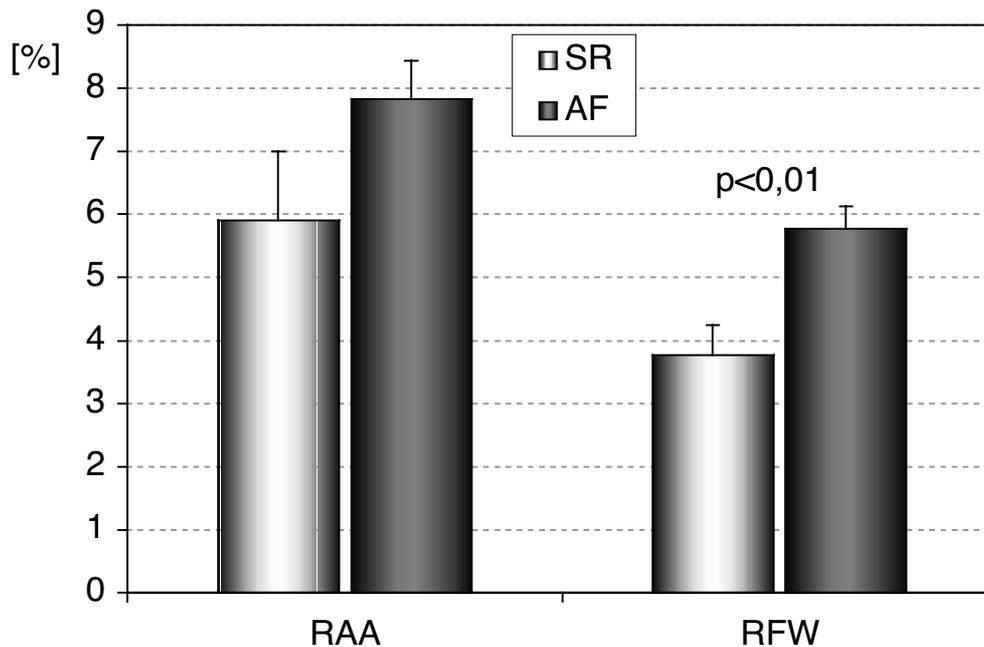


Abb. 26: Kollagen I % pro Gewebefläche (SR= Sinusrhythmus, AF= Vorhofflimmern, RAA= rechtsatrialer Appendix, RFW= rechtsatriale freie Wand). Die quantitative Bestimmung der Kollagen I Fluoreszenz pro Gewebefläche zeigt eine Zunahme von Kollagen I in RFW ($p < 0,01$) und RAA der Maze-Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Daten sind als SEM angegeben.

3. Zellgröße

Mit durchschnittlich 20 während der Proteinquantifizierung jeweils gemessenen Zellen pro Patient, ergab sich für die Gruppe der Maze-Patienten eine mittlere Zellgröße von $1094 \mu\text{m}^2$.

Verglichen mit einer im Kontrollgewebe ermittelten Zellgröße von $1167 \mu\text{m}^2$ und entsprechenden Literaturangaben, lag innerhalb der Maze-Gruppe kein Hinweis für eine generelle Hyper- bzw. Atrophie der Zellen vor. Auch zwischen aus Atrium und Appendix entnommenen Material bestand kein Unterschied hinsichtlich der Zellgröße.

4. Marker für Degeneration, Nekrose und Apoptose

4.1. Ubiquitin

Ubiquitin-positive Zellen traten nur vereinzelt im Gewebe der Maze-Patienten auf (Abb. 27 A,B).

Durchschnittlich waren mit 7,6 positiven Zellen pro Schnitt 0,11% aller Kardiomyozyten positiv und somit degenerativ verändert.

4.2. Komplement C 9

Neben der physiologisch vorhandenen C9-Markierung innerhalb von Blutgefäßen waren, ähnlich wie bei Ubiquitin, nur vereinzelte Myozyten im Gewebe der Maze-Patienten C9-positiv (Abb. 27 C,D). Mit durchschnittlich 5,7 Zellen pro Schnitt zeigten 0,09% der Myozyten Anzeichen von Nekrose.

4.3. TUNEL

TUNEL-positive Zellen waren in der mitgeführten Positivkontrolle zahlreich vorhanden, in den Geweben der Maze-Patienten dagegen nur vereinzelt zu finden. Mit durchschnittlich 2,4 positiven Zellen pro Schnitt waren 0,05% aller Kardiomyozyten TUNEL-positiv.

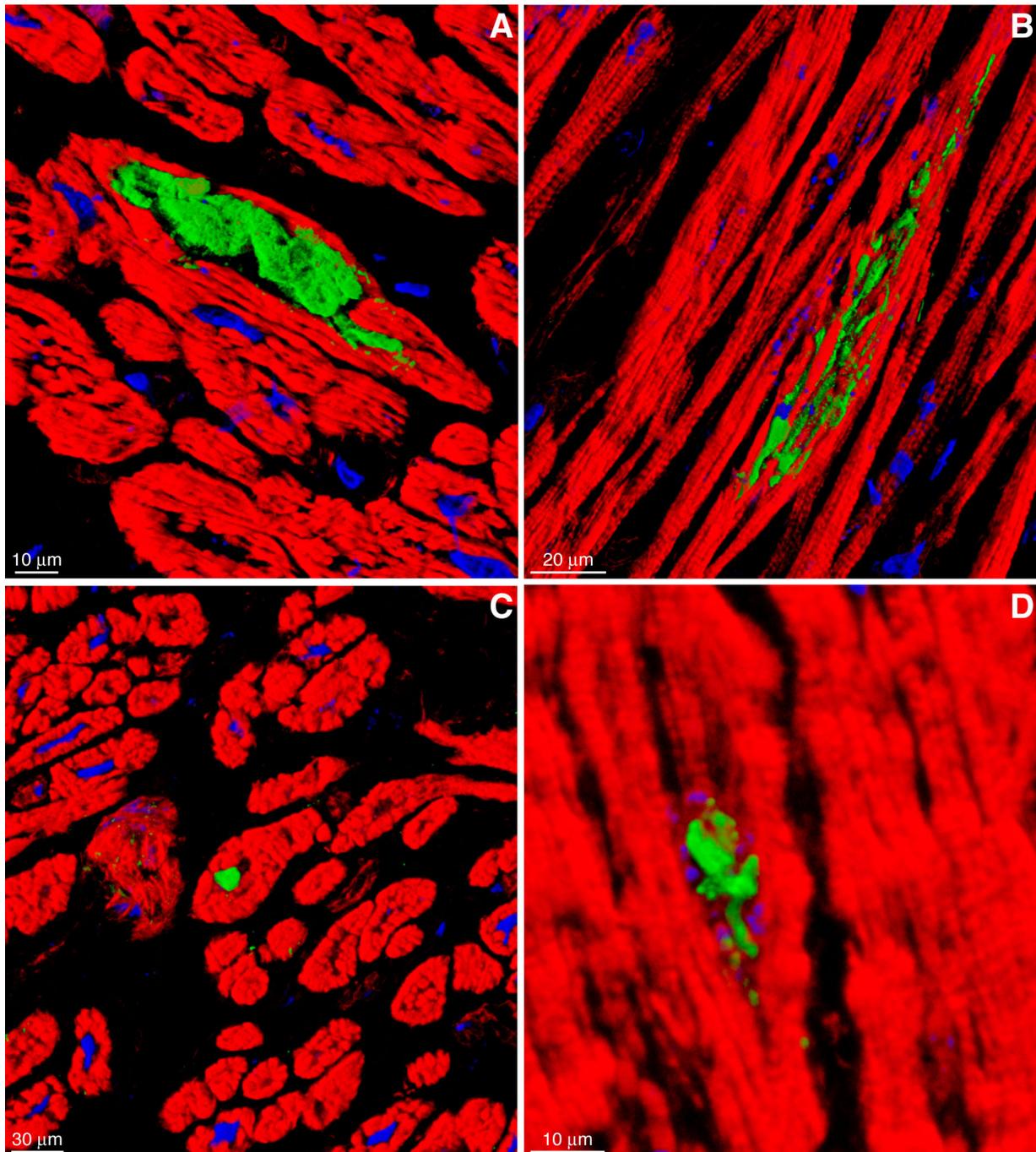


Abb. 27: Immunhistochemische Darstellung von Ubiquitin und Komplement C9 im Gewebe von Maze-Patienten (grün: Ubiquitin in (A) und (B), bzw. C9 in (C) und (D), rot: Aktin, blau: Zellkerne/ Lipofuscin).

A, B Einzelne Ubiquitin-positive Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern.

C Einzelne C9-positive Zelle in fibrotischem, ansonsten unveränderten Myokard eines Maze-Patienten; schwach erkennbar die positive C9-Markierung eines Blutgefäßes in der Mitte des oberen Bildteils.

D Einzelner C9-positiver Kardiomyozyt bei höherer Vergrößerung.

5. Ultrastrukturelle Veränderungen

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Gewebe lag der Schwerpunkt zum einen bei vorhandenden Anzeichen degenerativer und fibrotischer Veränderungen, daneben bei der normalen sowie pathologischen Verteilung der Glanzstreifen im humanen Atrium. Von besonderem Interesse war dabei das Ausmaß des Vorhandenseins lateraler Zellkontakte, entweder in Form von vollständigen lateralen Glanzstreifen oder isolierten lateralen gap junctions. Hinsichtlich der bei der immunhistochemischen Auswertung beschriebenen, gegenüber dem Kontrollgewebe stark vermehrten lateralen Connexinlokalisierung, war v.a. die Frage von Bedeutung, ob es sich hierbei um Connexinmoleküle handelt, die funktionstüchtige Kanäle bilden oder ob das immunhistochemisch dargestellte Connexin in diesen Bereichen eventuell überwiegend in Form sogenannter „anular profiles“, d.h. kreisförmiger, intrazellulärer Strukturen, welche keinerlei zelluläre Verbindung herstellen, vorliegt.

Normales atriales Myokard besteht aus einem geordneten Verband ovaler Myozyten, die im Unterschied zum Ventrikel kaum Verzweigungen bilden und regelmäßig angeordnete sarkomere Einheiten enthalten.

Zwischen diesen Zellverbänden findet sich auch im normalen Vorhofgewebe reichlich Kollagen.

Glanzstreifen sind sowohl an den lateralen Grenzen der Myozyten als auch endständig, meist auf Höhe der Z-Banden, zu finden, wobei die Anordnung auf unterschiedlicher Höhe den endständigen Glanzstreifen im Längsschnitt häufig ein stufenartiges Aussehen (Abb. 32 und 33) mit longitudinalen und transversalen Abschnitten verleiht.

Bei allen untersuchten Geweben der Maze-Patienten war in weiten Bereichen dieses normale Bild atrialen Myokards zu finden (Abb. 28-31).

Die regelmäßig angeordneten Sarkomere zeigten eine ebenfalls regelmäßige Querstreifung, mit deutlich erkennbarer Z-, I-, A-Bande und M-Linie.

Die Zellorganellen waren intakt, die elliptischen Nuclei mit gleichmäßiger Chromatinverteilung überwiegend zentral gelegen, die runden bis ovalen Mitochondrien von sehr unterschiedlicher Größe, mit elektronendichter Matrix, normaler dunkler Matrixgrana und intakten Cristae. Golgi-Apparat sowie endoplasmatisches und sarkoplasmatisches Retikulum zeigten keine Besonderheiten; desweiteren waren im Cytoplasma neben zahlreichen Glycogenansammlungen, die charakteristischen atrialen Granula sowie teilweise auch Lipofuscin vorhanden.

Auffallend in vielen Geweben war jedoch, daß die atrialen Granula in einigen Bereichen völlig fehlten oder nur in geringer Anzahl auftraten.

Die Myofibrillenbündel wurden durch unterschiedlich stark ausgeprägte Bereiche mit extrazellulärer Matrix voneinander getrennt. Im Extrazellularraum waren Fibrocyten, Kollagen, zahlreiche Blutgefäße und Axone erkennbar.

Die Myozyten wurden sowohl durch laterale (Abb. 35 und 36) als auch durch endständige (Abb. 32 und 33) intakte Glanzstreifen in regelmäßigen Abständen verbunden. Am Glanzstreifen lassen sich vier unterschiedliche, dreidimensionale Regionen unterscheiden. Im transversalen, undulierenden Anteil überwiegen die grundsätzlich transvers zur Myofibrillenrichtung angeordneten fasciae adherentes, die zwischen diesen Insertionsstellen der Myofibrillen lokalisierten Desmosomen und die nicht spezialisierten Membranregionen. Im longitudinalen Anteil des Glanzstreifens, parallel zur Längsachse der Zelle, sind v.a. die großen, ausgeprägteren gap junctions lokalisiert. In diesen Abschnitten sind die äußeren Schichten der beiden dreilagigen Zellmembranen zu einer dann fünf-lagigen, elektronendichten Membran verschmolzen.

Bei ebenfalls allen Maze-Patienten fanden sich aber auch pathologische Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades.

In Übereinstimmung mit dem immunhistochemischen Befund, war auch elektronenmikroskopisch in zahlreichen Gewebearealen ausgeprägte interstitielle Fibrose zu erkennen (Abb. 47-50). Häufig war auch der Extrazellularraum erweitert, ohne vollständig mit Kollagen ausgefüllt zu sein.

Degenerative Veränderungen (Abb. 38-46) äußerten sich zunächst durch leichte bis irreversible Schädigung der Mitochondrien mit aufgehellter Matrix, fehlender Matrixgrana und fragmentierten, teilweise auch völlig fehlenden Cristae sowie Chromatinaufhellung oder randständigen Chromatinverklumpungen in z.T. ödematösen Zellkernen. In einigen Zellen fiel der perinucleär beginnende Verlust von Myofibrillen (Abb. 38) und deren Ersatz durch Glykogen (Abb. 39) auf, während in anderen Bereichen, besonders in fibrotischen Arealen, das Cytoplasma fast gesamter Zellen durch Glykogen, zahlreiche Vakuolen sowie Ansammlungen degenerierter Mitochondrien ausgefüllt war (Abb. 40). Querstreifung war in diesen Zellen nicht mehr erkennbar. Zu den weiteren häufig zu beobachtenden pathologischen Veränderungen gehörte das sogenannte „myofiber disarray“ (Abb. 44) sowie fokale Akkumulation von sarkoplasmatischem Retikulum und sog. „polylysosomal bodies“. Ein weiterer auffallender Befund waren die regelmäßig auftretenden, abnormen Ansammlungen von elektronendichtem

Material an den lateralen Zellgrenzen, bei dem es sich entweder um Z-Band-Material oder um N-Cadherin handeln kann (Abb. 51 und 52).

Die Glanzstreifen zeigten ebenfalls bei allen Patienten mehr oder weniger stark ausgeprägte Veränderungen (Abb. 53-59). Gelegentlich traten irreguläre Glanzstreifen auf, bei denen die Unterteilung in die oben beschriebenen vier Regionen nicht mehr erkennbar war, wobei meist die gap junctions fehlten. Die unspezialisierten Anteile des Glanzstreifens waren häufig erweitert, z.T. ebenfalls die fasciae adherentes.

Unverändert erscheinende gap junctions waren teilweise an den lateralen Myozytengrenzen, isoliert von f. adherens oder Desmosomen, in einiger Entfernung zu den „vollständigen“ lateralen Glanzstreifen vorhanden (Abb. 61 und 62).

Anulare gap junctions waren häufig sowohl in der Nähe endständiger Glanzstreifen, als auch an den lateralen Zellgrenzen normaler oder degenerierter Myozyten vollständig intrazellulär sichtbar und kamen daneben vereinzelt auch im Extrazellularraum vor (Abb. 65-73).

An den lateralen Zellmembranen zum unmittelbar angrenzenden Extrazellularraum lagen gap junctions häufig entweder in Form der anular profiles, oder auch innerhalb von Zellfortsätzen bzw. unterhalb von überlappenden Fortsätzen des Sarkolemm vor (Abb. 74-80).

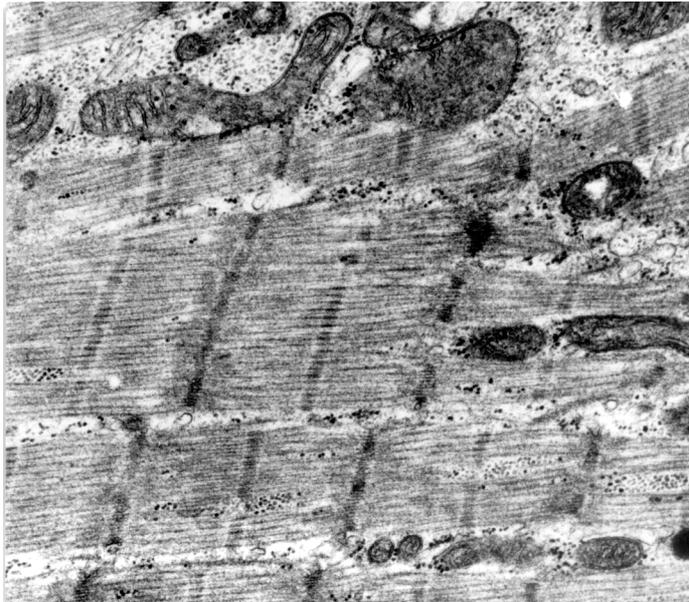


Abb. 28 bis 31 zeigen normales atriales Myokard.

Abb. 28: Normale atriale Myozyten im Längsschnitt: regelmäßig angeordnete Sarkomere, deutliche Querstreifung, Mitochondrien zeigen die typische, homogene elektronendichte Matrix und intakte Cristae, reichlich Glykogen vorhanden.

x 21500

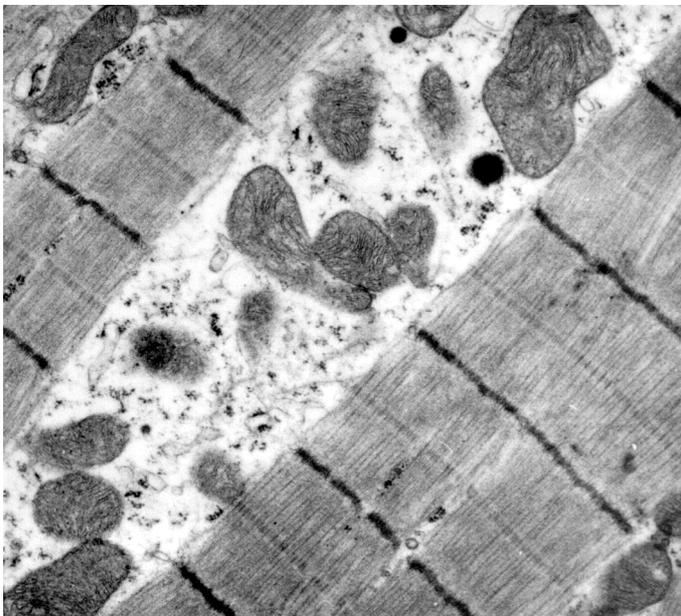


Abb. 29: Normale atriale Myozyten: Deutlich strukturiertes kontraktiles Material, normale Mitochondrien. x 14300

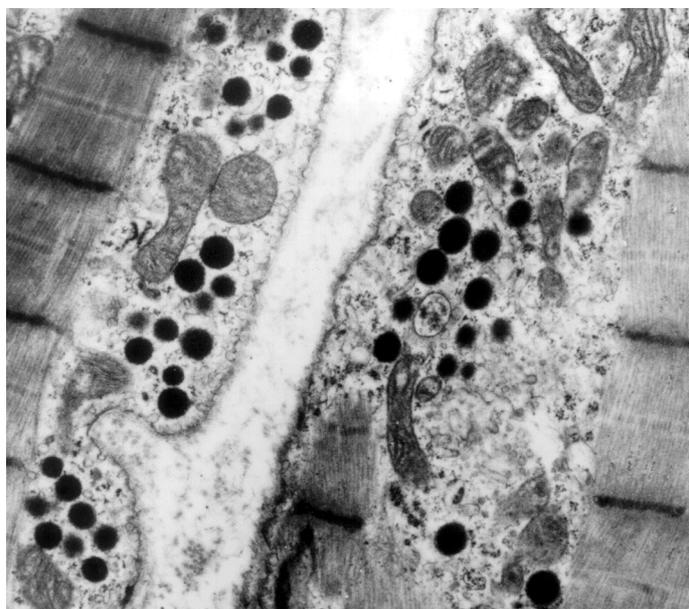


Abb. 30: Normales atriales Myokard mit gut erkennbarer Z-, I-, A-, M- Bande, den charakteristischen atrialen Granula und schmalem Extrazellularraum (EZR). x 14300

Abb. 31: Normaler Zellkern: Gleichmäßig disperse Chromatinverteilung, schmaler Randsaum mit Heterochromatin. Äussere Kernmembran, perinukleärer Spalt und Kernporen sind sichtbar. x 14300

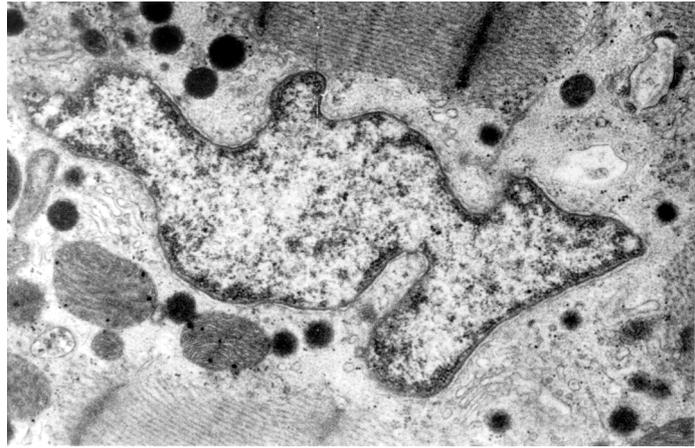


Abb. 32 bis 37 zeigen normale Glanzstreifen.

Abb. 32: Klassischer, stufenförmiger Glanzstreifen im Längsschnitt: F. adherens (↔) und Desmosomen (→) v.a. im transversen Anteil, größere gap junctions (GJ) (↔) v.a. longitudinal, parallel zur Muskelfaserrichtung verlaufend, dazwischen nicht spezialisierte Membranregionen (▶) sichtbar. x 10000

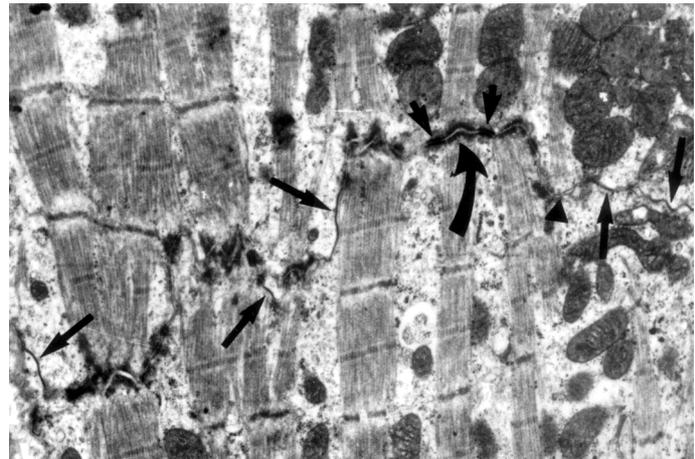


Abb. 33: Ausschnitt aus normalem endständigen Glanzstreifen: Die obere transverse Membranregion zeigt f. adherens sowie drei Desmosomen. Die longitudinal verlaufenden Membranen bilden links davon eine große und auf der rechten Seite eine kleinere GJ, jeweils gefolgt von einem unspezialisierten Membranbereich. (Pfeile s. Abb. 32) x 28600

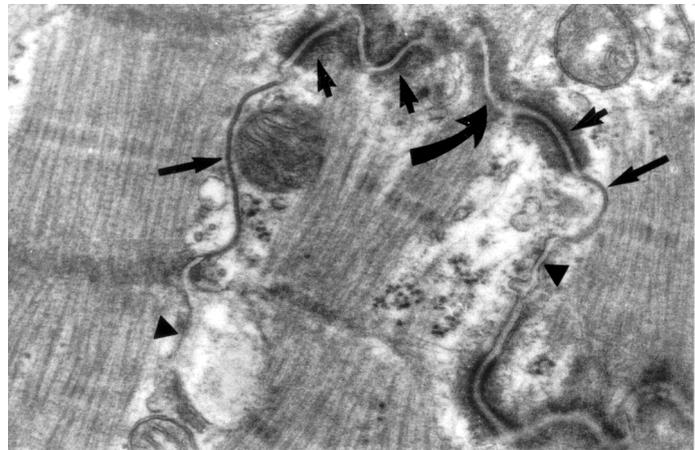
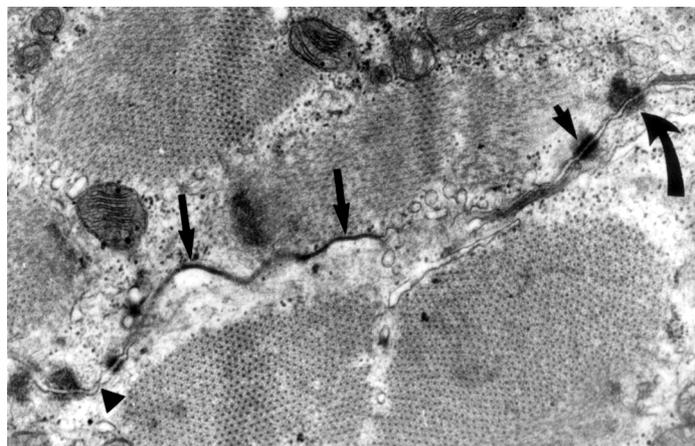


Abb. 34: Normaler Glanzstreifen im Querschnitt: Mit GJ, Desmosomen, f. adherens, sowie nicht spezialisierten Membranregionen. (Pfeile s. Abb. 32) x 21500



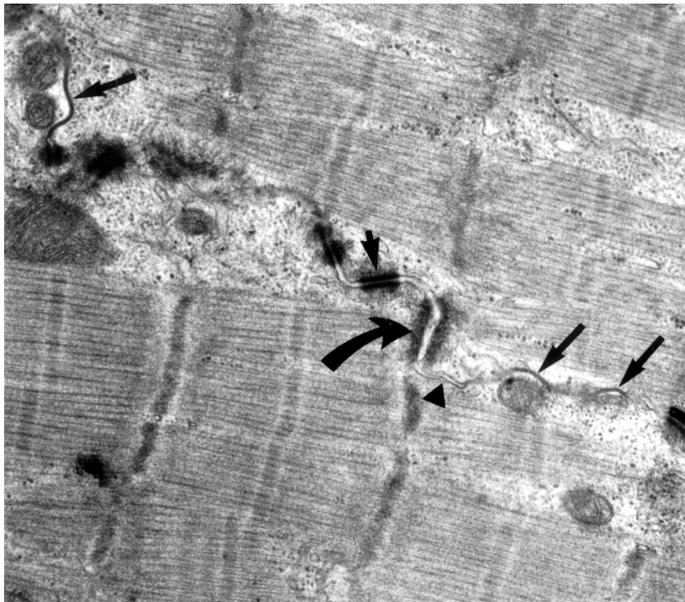


Abb. 35: Parallel zur Längsachse der Myofibrillen verlaufender lateraler Glanzstreifen: Enthält f. adherens, deutlich erkennbare Desmosomen, GJ und nicht spezialisierte Membranregionen. (Pfeile s. Abb. 32) x 21500



Abb. 36: Lateraler Glanzstreifen: Drei gut abgrenzbare GJ sind neben f. adherens, Desmosomen und unspezialisiertem Anteil sichtbar. (Pfeile s. Abb. 32) x 21500

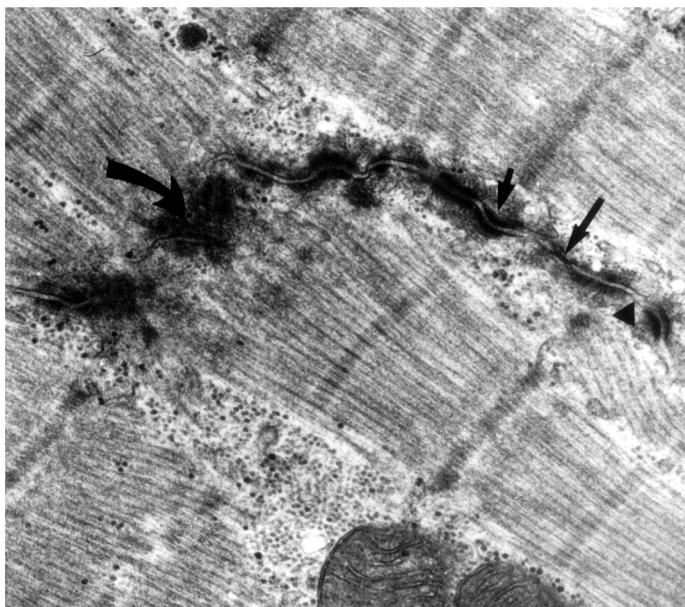


Abb. 37: Beispiel für schräg verlaufenden und gegenüber der Stufenform einfacher strukturierten Glanzstreifen im atrialen Myokard. F. adherens, GJ, Desmosomen und unspezialisierte Anteile sichtbar. (Pfeile s. Abb. 32) x 28600

Abb. 38 bis 46 zeigen degenerative Veränderungen.

Abb. 38: Perinukleärer Verlust von Sarkomeren: Verlust von kontraktilem Material, Chromatinkondensation und Invaginationen der Kernmembran, zahlreiche Mitochondrien. $\times 6450$

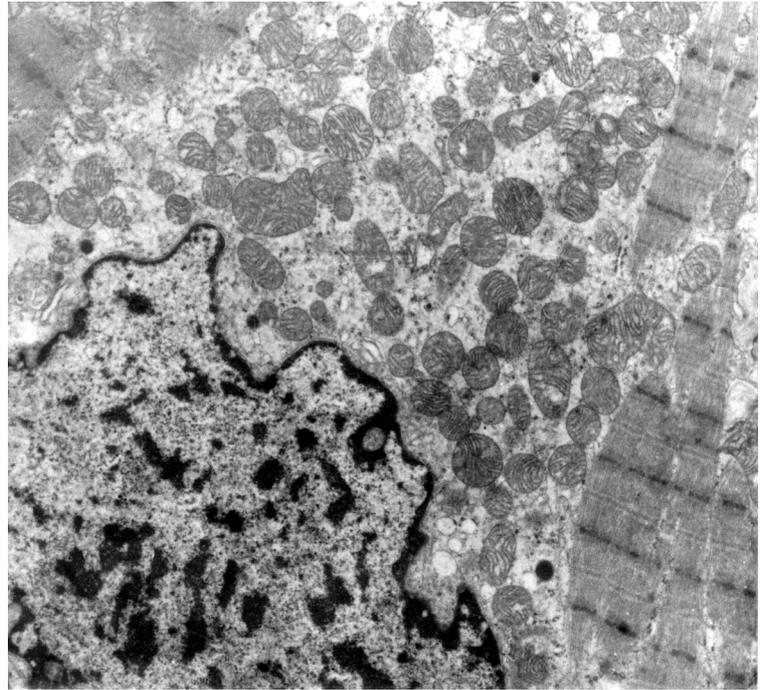


Abb. 39: Perinukleärer Ersatz von Sarkomeren durch Glykogen (G) und Lipofuszin (L) in unspezifischem Cytoplasma. $\times 10000$

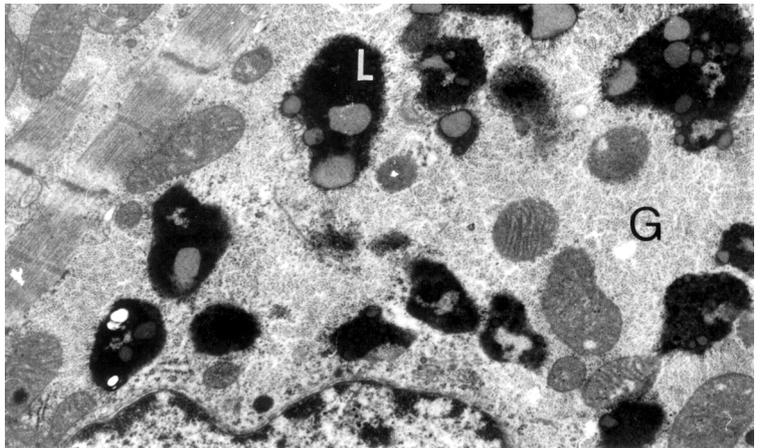


Abb. 40: Hochgradig degenerativ veränderter Kardiomyozyt: Im Zytoplasma nur peripher noch vereinzelte kontraktile Elemente, stark reduzierte Mitochondrienzahl, einige Myelinfiguren, Membranreste und Vakuolen, Aufhellung des Karyoplasmas. $\times 6450$

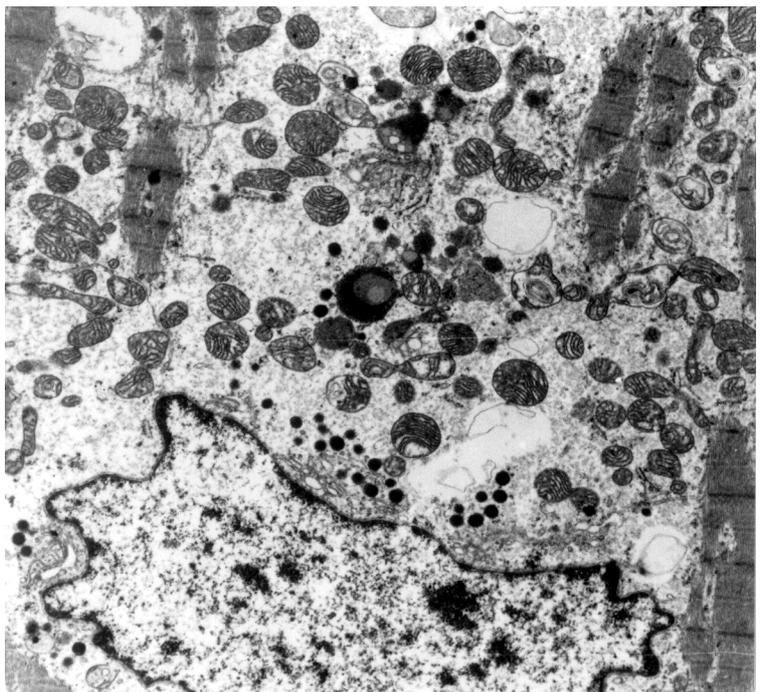




Abb. 41: Vakuoläre Degeneration: Autophage Vakuolen, Vesikel, Myelinfigur, irreguläre Glanzstreifen, teilweise Verlust der Querstreifung, Kontraktionsbänder. x 14300

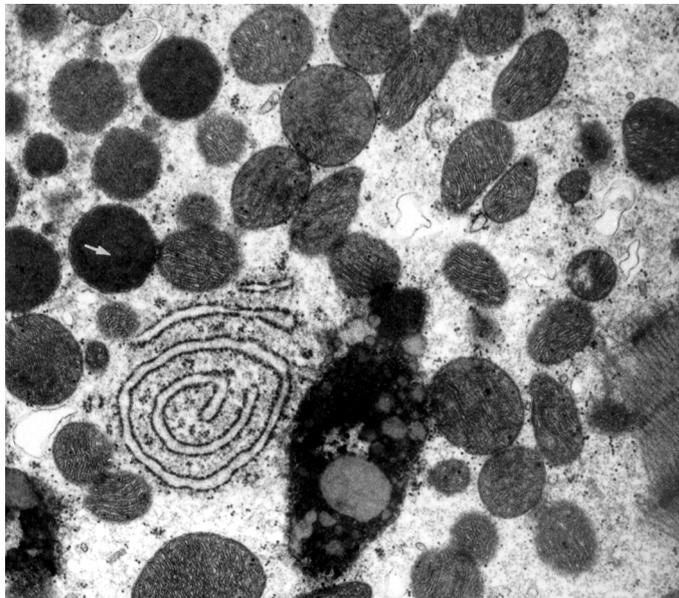


Abb. 42: Cytoplasmaausschnitt einer degenerierten Zelle: Wenig Glykogen, Lipofuscin, einige Lysosomen (weißer Pfeil) in der linken oberen Bildhälfte, pleomorphe Mitochondrien und normale konzentrische Ringe rauhen endoplasmatischen Retikulums und zahlreiche Ribosomen im Cytoplasma. x 14300



Abb. 43: Autophage Vakuolen und Myelinfiguren an lateralen Ausstülpungen der Zellmembran, die mit zahlreichen endocytotischen Vesikeln besetzt ist. x 21500

Abb. 44: sog. „myofiber disarray“: Deutliche Abweichung des Sarkomerenverlaufs von der normal parallelen, geraden Anordnung. $\times 10000$

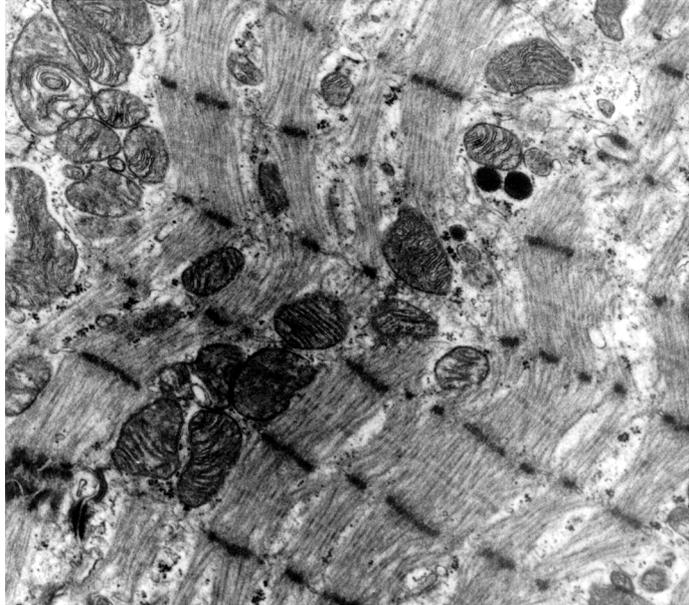


Abb. 45: Intakter Glanzstreifen mit ausgeprägten GJ (\rightarrow) zwischen einer normalen (untere Bildhälfte) und einer degenerativ veränderten (obere Bildhälfte) Zelle. $\times 21500$

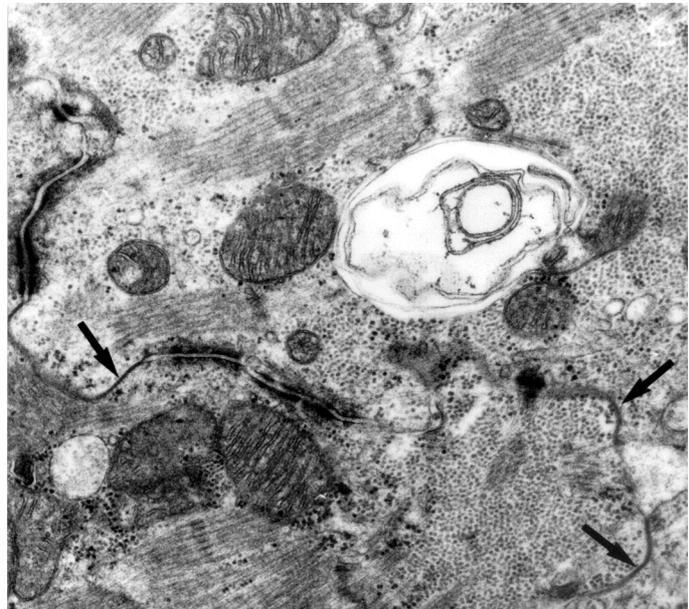


Abb. 46: Lateraler Glanzstreifen zwischen normalen und stark vakuolig degenerierten Kardiomyozyten. $\times 10000$

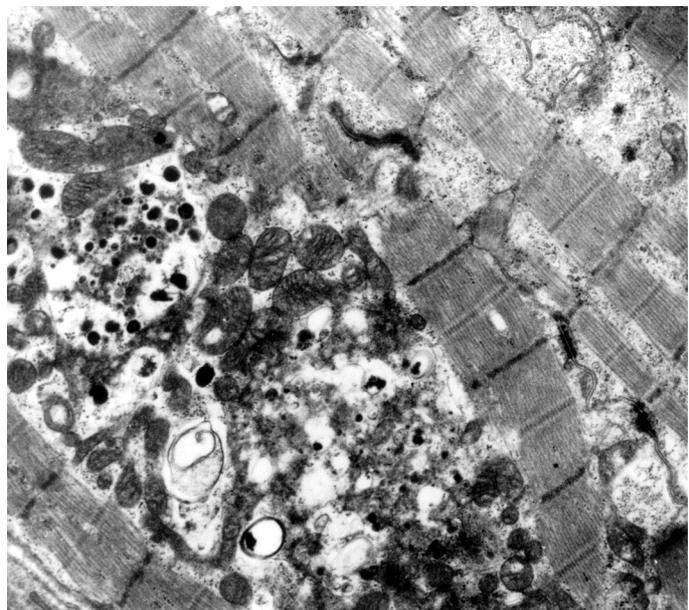




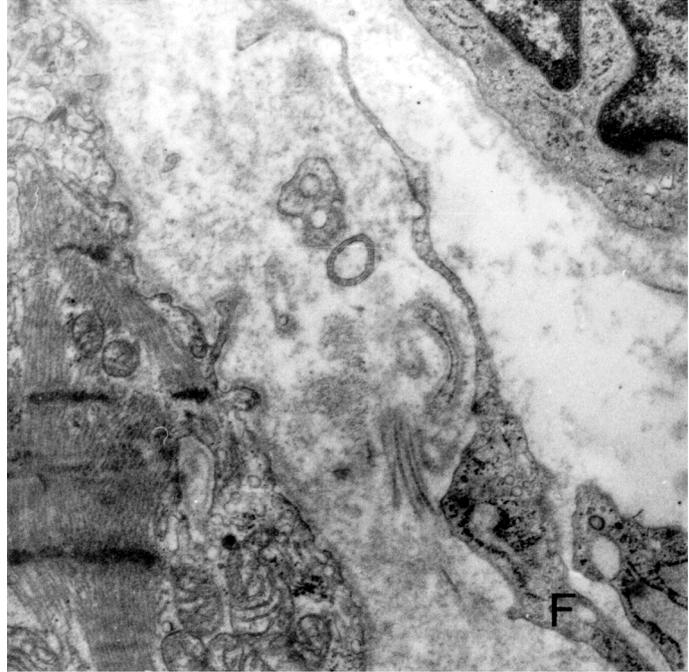
Abb. 47 bis 50 zeigen fibrotische Veränderungen.

Abb. 47: Interstitielle Fibrose: Geringgradig degenerativ veränderte Zellen werden durch einen stark erweiterten EZR voneinander getrennt. x 6450



Abb. 48: Ausschnitt aus erweitertem EZR in höherer Vergrößerung; Kollagenfasern (K) und Fibrozytenausläufer sichtbar. Angrenzende Zellmembranen bilden mit vielen endocytotischen Vesikeln besetzte Einstülpungen. x 14300

*Abb. 49: Interstitielle Fibrose:
Der erweiterte EZR ist von Fibrozyten (F) und nur vereinzelt Kollagenfasern ausgefüllt.
x 14300*



*Abb. 50: Interstitielle Fibrose:
Elastin, Kollagen und Zelldebris im EZR, angrenzende Myozyten zeigen deutliche Degenerationszeichen sowie verdickte Basalmembranen. x 10000*

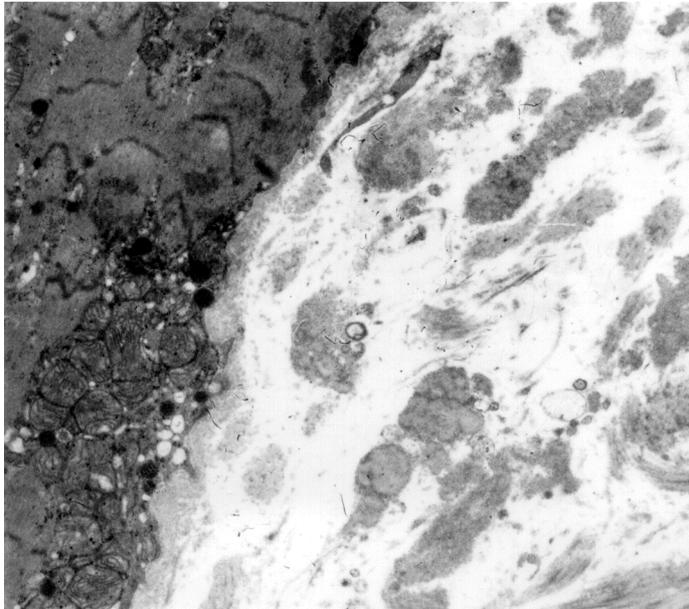


Abb. 51 und 52 zeigen abnorme Ansammlungen von elektronendichtem Material.

*Abb. 51: Zentrale Ansammlungen von elektronendichtem Material (→) im Z-Band-Bereich.
x 21500*



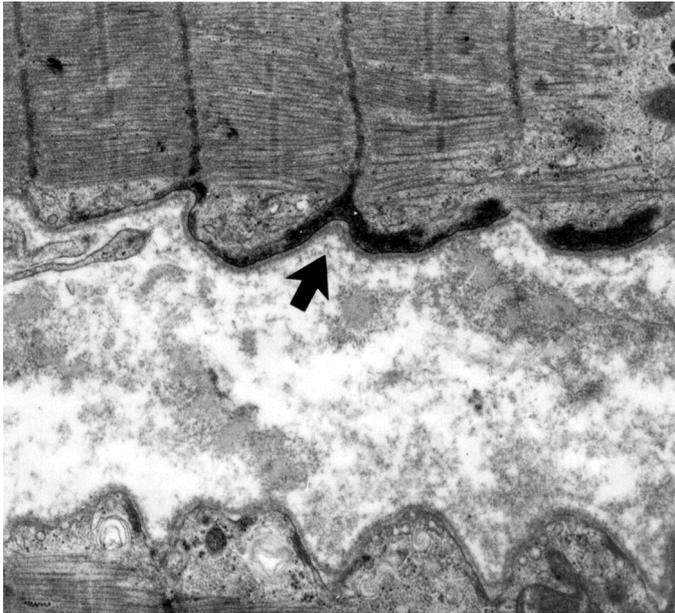


Abb. 52: Ansammlungen elektronendichten Materials (→) an den lateralen Zellgrenzen. x 14300



Abb. 53 bis 59 zeigen veränderte Glanzstreifen.

Abb. 53: Irregulärer endständiger Glanzstreifen mit erweiterter f. adherens-Region (→) in einem an den EZR angrenzenden Myozyten: Die Spezialisierung in vier Membranabschnitte ist unregelmäßig, zwischen den ausgeprägten Myofibrillenansatzstellen fehlen Desmosomen und GJ. x 21500

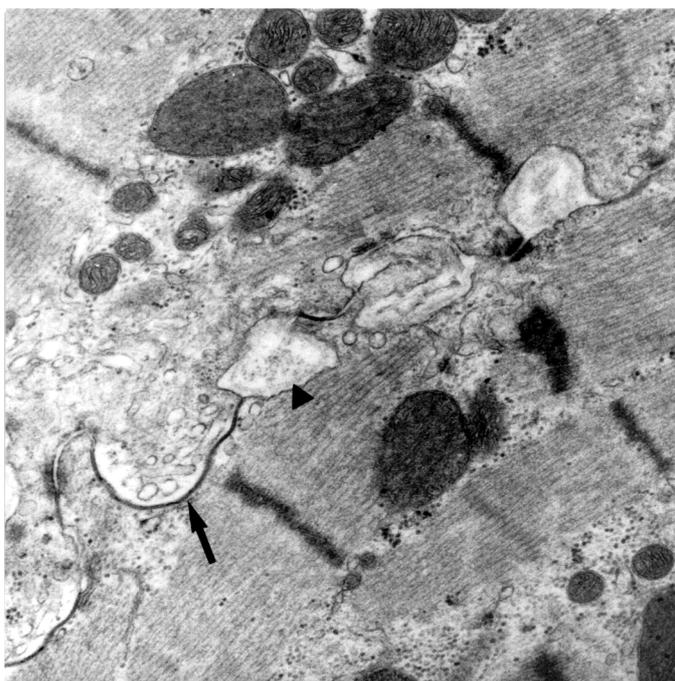


Abb.54: Irregulärer lateraler Glanzstreifen: Stark dilatierter unspezialisierte Membranregionen (▶), dazwischen mehrere, z.T. ausgeprägte laterale GJ (→) und ein Desmosom. x 21500

Abb. 55: Insgesamt erweitert erscheinender Glanzstreifen: Im transversen Abschnitt wiederum v.a. erweiterte f. adherens, z.T. erweiterte unspezialisierte Region, wenige Desmosomen und GJ. x 14300

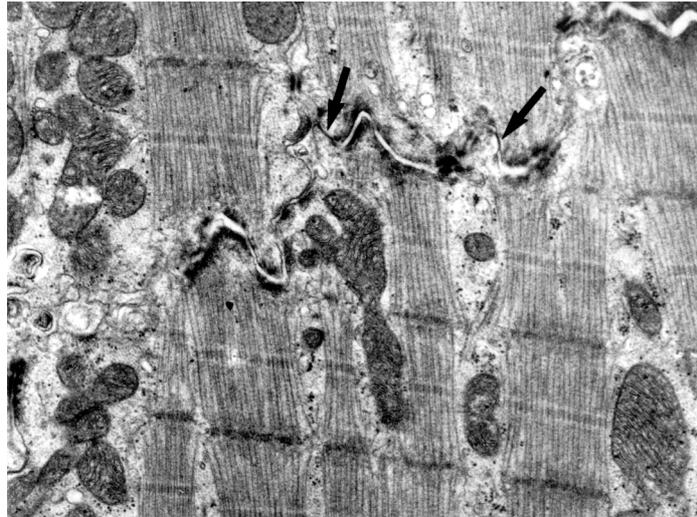


Abb. 56: Überwiegend aus GJ bestehender Glanzstreifen im Querschnitt: Nur selten in diesem Ausmaß vorkommende sehr lange GJ-Membranabschnitte (→) von Zellen innerhalb einer fibrotischen Region. x 28600

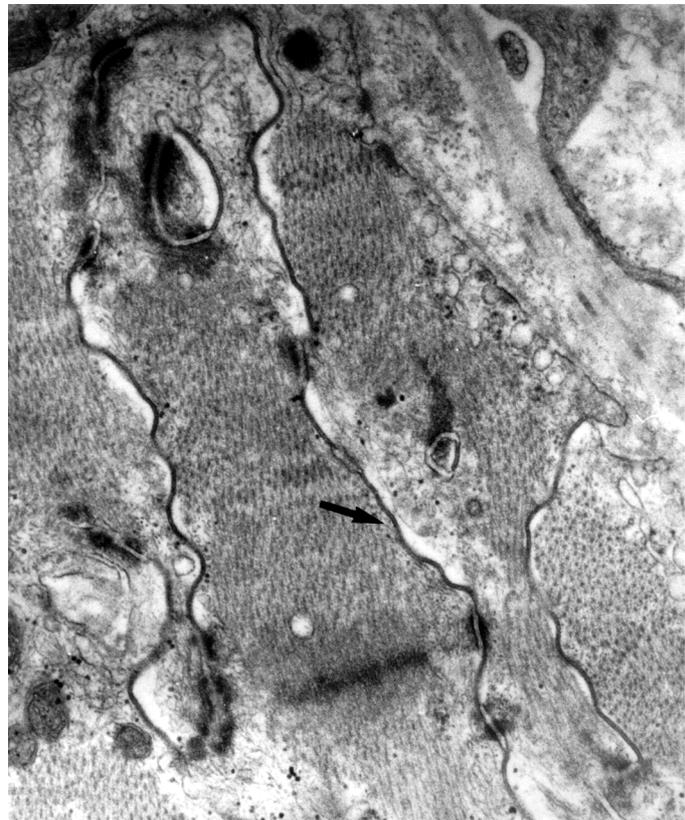


Abb. 57: Irregulärer Glanzstreifen: Mit ebenfalls stark ausgeprägter GJ-Membran (→). x 21500

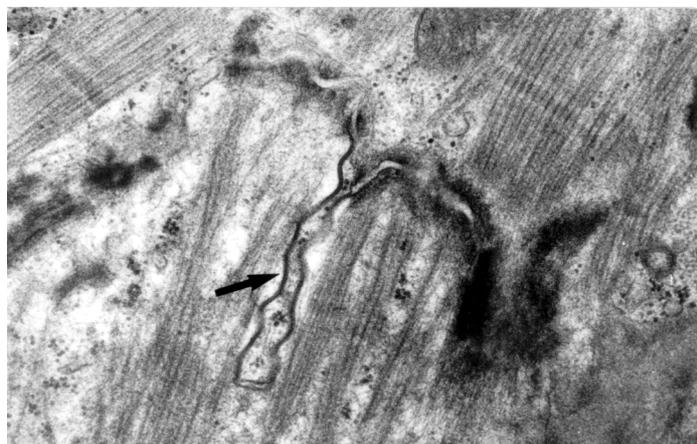




Abb. 58: Internalisierter Glanzstreifen: Vollständiger Glanzstreifen mit allen Membranregionen, (GJ = \rightarrow) komplett intrazellulär lokalisiert. Im rechten unteren Bildausschnitt ist ein sog. polyvesicular body erkennbar. x 28600



Abb. 59: Irregulärer Glanzstreifen: Mit extrem ausgeprägter GJ-Region (\rightarrow), f. adherens und Desmosom. Intrazellulär in einem Zellfortsatz dissoziierter Zellen gelegen. Angrenzend hochgradige interstitielle Fibrose. x 14300

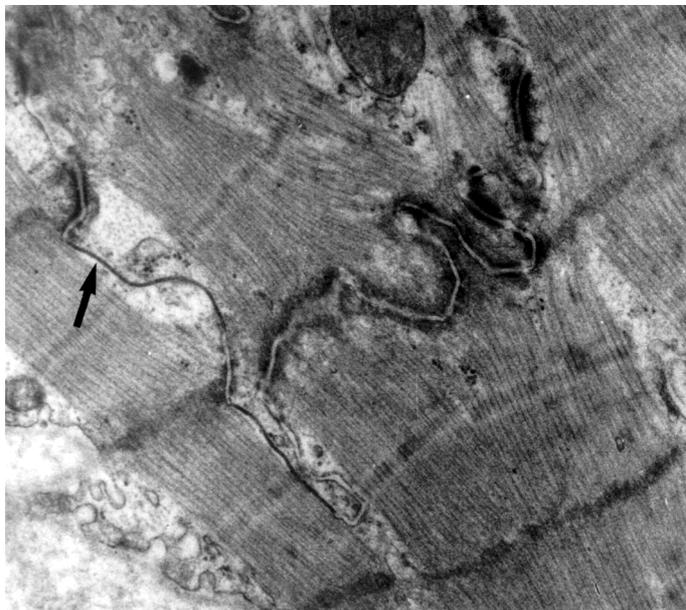


Abb. 60 bis 62 zeigen laterale GJ.

Abb. 60: Lange laterale GJ (\rightarrow): In Verbindung mit einem Glanzstreifen von Kardiomyozyten, die an den Extrazellulärraum angrenzen. x 21500

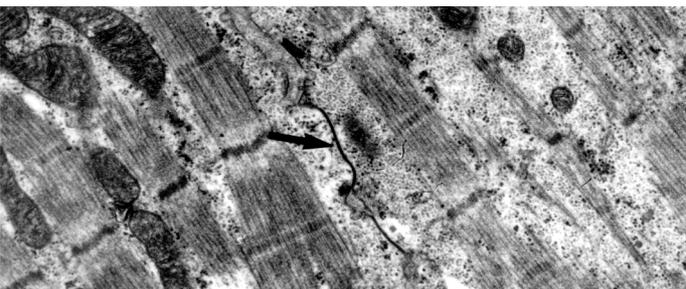


Abb. 61: Lange laterale GJ (\rightarrow): Ohne Verbindung zu einem Glanzstreifen, von Adhärenzverbindungen isoliert vorliegend. x 21500

Abb. 62: Lange laterale GJ:
Isolierte parallel zur Myozyten-
längsachse verlaufende GJ-Mem-
bran (→) in höherer Vergrös-
serung. $\times 43000$

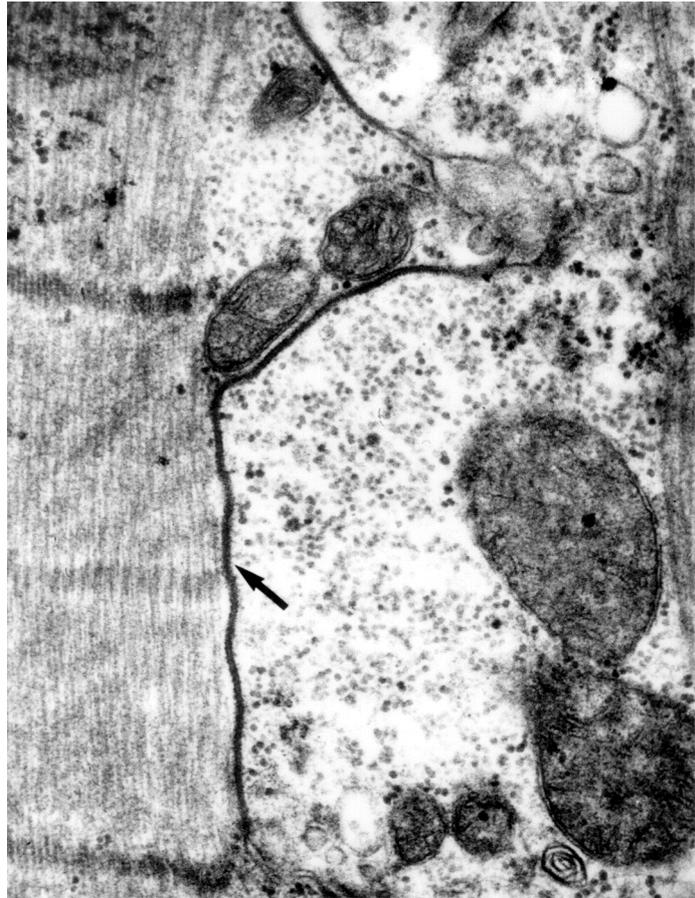


Abb. 63 und 64 zeigen Inter-
nalisierung von GJ.

Abb. 63: Beginnende Internali-
sierung der GJ-Region (→) eines
Glanzstreifens. $\times 21500$

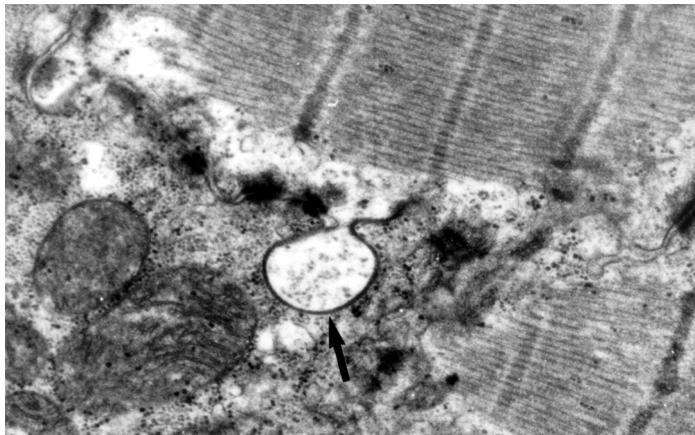
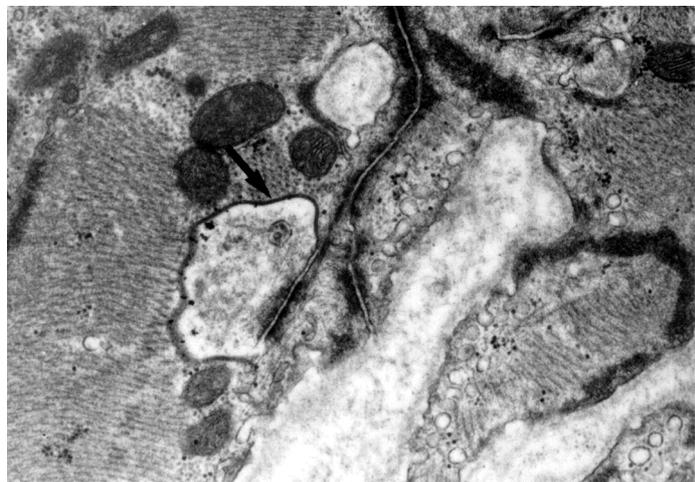


Abb. 64: Internalisierung von GJ
(→) und Adhärenzregion eines
Glanzstreifens zwischen Zellaus-
läufern in fibrotischer Region,
abnorme Ansammlungen von
elektrondichtem Material
sichtbar. $\times 21500$



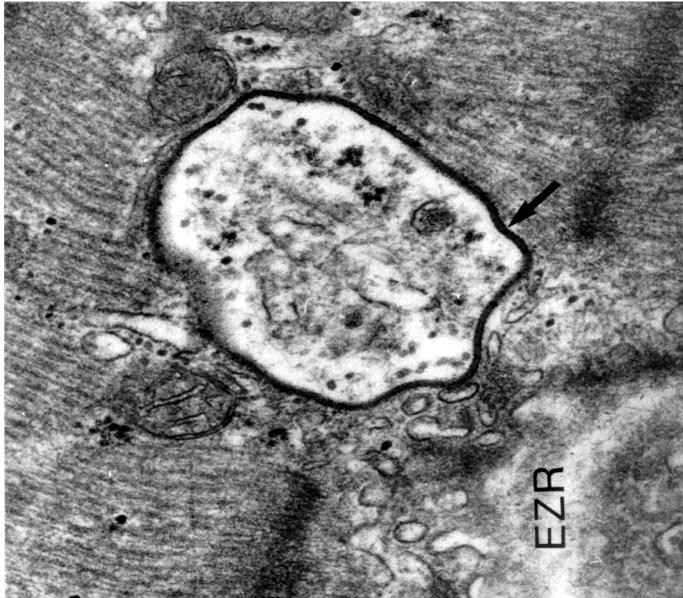


Abb. 65 bis 73 zeigen anulare GJ.

Abb. 65: „anular profile“: Internalisierte GJ-Membran (→), vollständig intrazellulär, in unmittelbarer Nähe zum angrenzenden EZR gelegen, zahlreiche endocytotische Vesikel der Zellmembran erkennbar. x 43000

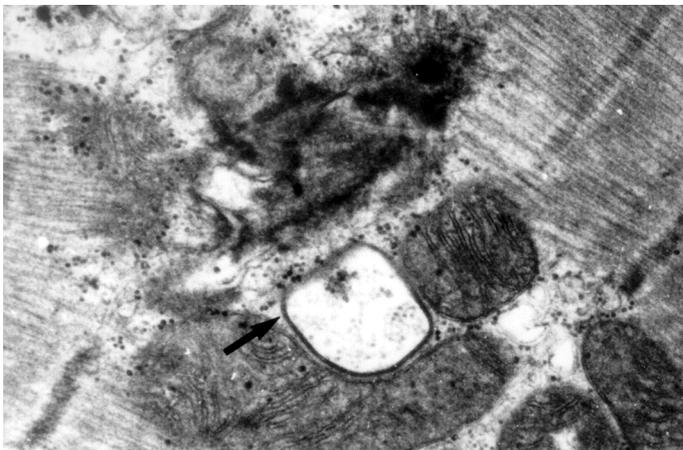


Abb. 66: Anulare GJ (→): Vollständig intrazellulär innerhalb eines intakten Kardiomyozyten gelegen. x 28600



Abb. 67: Anulare GJ: Sehr grosser GJ-Membranabschnitt (→) zusammen mit einem Desmosom im Cytoplasma eines degenerativ veränderten Kardiomyozyten, unmittelbar angrenzend zum EZR. x 21500

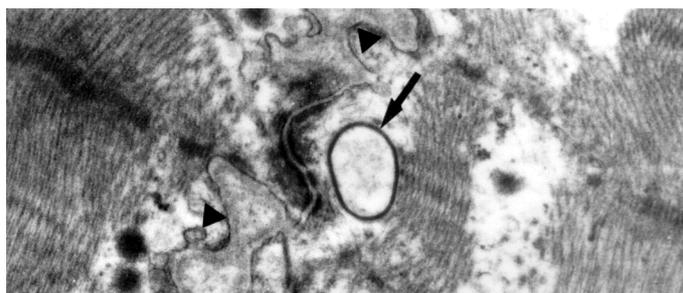


Abb. 68: Anulare GJ (→): Vollständig intrazellulär unterhalb eines Glanzstreifen mit erweitertem unspezialisiertem Anteil (▶) lokalisiert. x 21500

Abb. 69: Anulare GJ (→):
Neben Zelldebris und Kollagen
im erweiterten EZR. x 21500



Abb. 70: Anulare GJ (→): Inner-
halb eines schmalen Zellfort-
satzes in unmittelbarem Kontakt
zu einem „polyvesicular body“
gelegen; in den Ausstülpungen
der benachbarten Zellmembran
sind wiederum Ansammlungen
von abnormem elektronendichten
Material erkennbar. x 28600



Abb. 71: Anulare GJ: Ansamm-
lungen von GJ-Membranen (→)
in einem der in den erweiterten
EZR reichenden Zellfortsätze
gelegen. x 14300

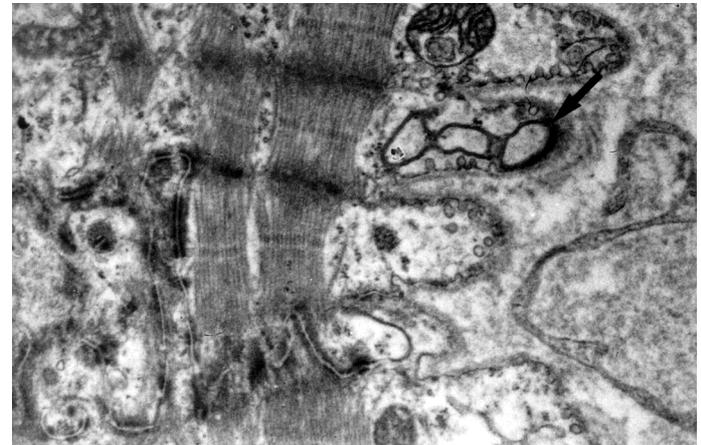
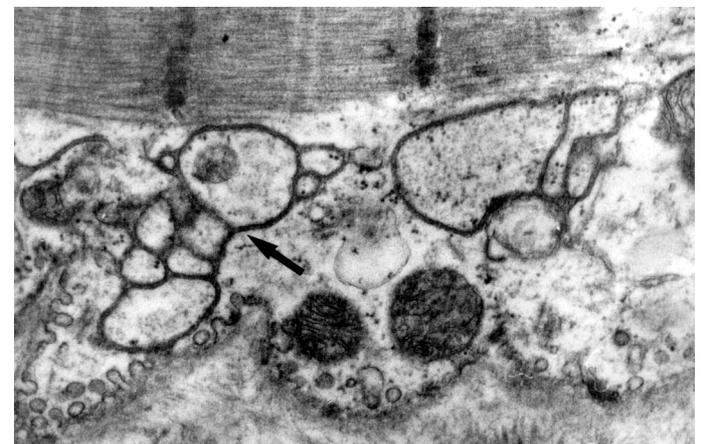


Abb. 72: Anulare GJ: Akkumu-
lation zahlreicher anularer
GJ-Membranen (→) an den
lateralen Myozytengrenzen zum
Bindegewebe in höherer Ver-
größerung. x 21500



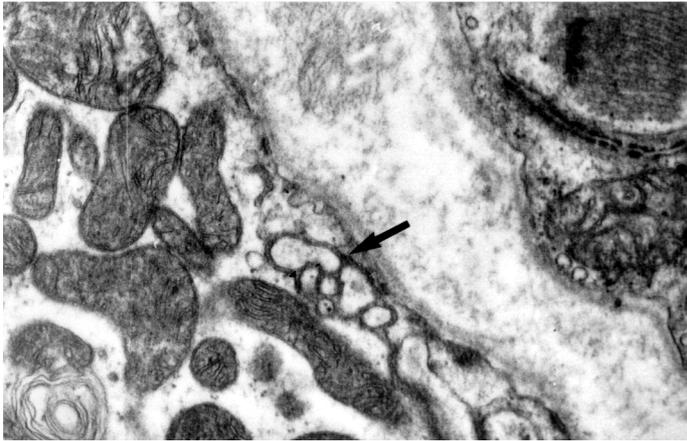


Abb. 73: Anulare GJ (→): Intra-cytoplasmatisch, unmittelbar angrenzend an den erweiterten EZR. x 21500



Abb. 74 bis 80 zeigen laterale GJ innerhalb von Zellfortsätzen in Fibrosegebieten.

Abb. 74: Isolierte laterale GJ (→): Ohne assoziierte Adhärenzverbindungen unterhalb eines schmalen Cytoplasmasaums zum angrenzenden EZR gelegen. x 43000



Abb. 75: Isolierte laterale GJ: Ausgeprägte GJ (→) unter einer überlappenden Zellmembran am stark erweiterten EZR sichtbar. x 21500

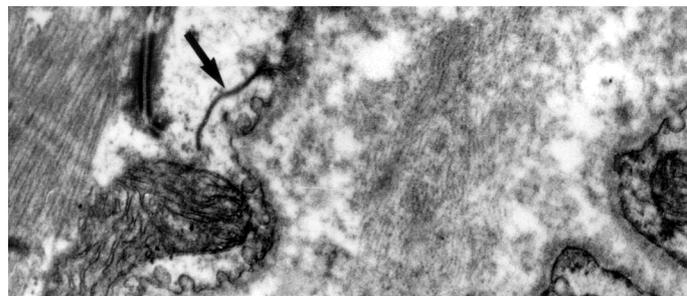


Abb. 76: Laterale GJ (→): Der zugehörige Glanzstreifen verbindet einen intakten und einen leicht geschädigten Kardiomyozyten in einem Fibroseareal. x 21500

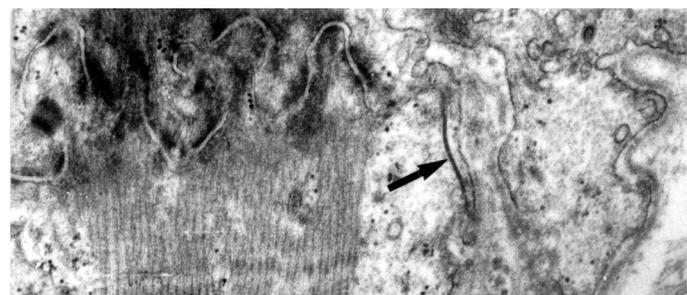


Abb. 77: Laterale GJ: An der Ansatzstelle eines Glanzstreifens am externen Sarkolemm befindet sich eine ausgeprägte GJ (→) unterhalb einer Zellmembranausstülpung. x 21500

Abb. 78: Zelluläre Dissoziation in hochgradig fibrotischer Myokardregion: Die Zellen bilden zahlreiche Cytoplasmafortsätze aus, die sich in den erweiterten EZR erstrecken. Zwischen diesen Zellfortsätzen sind Glanzstreifen-ähnliche Strukturen und ausgeprägte GJ-Membranen (→) erkennbar. x 21500

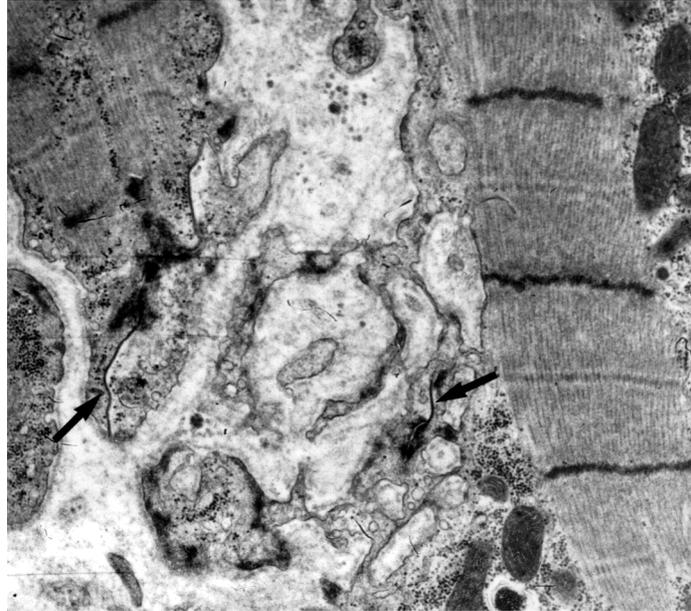


Abb. 79: Vergrößerter Ausschnitt aus 78: Ausgeprägte GJ Membranen (→) und elektronendichtes Material unterhalb einer überlappenden Cytoplasmaausstülpung mit zahlreichen endocytotischen Vesikeln, und einem „polyvesicular body (→)“. x 28600

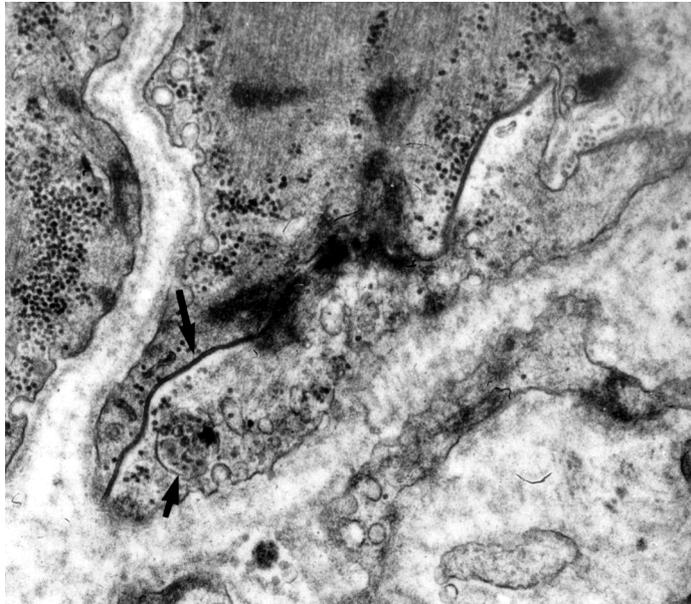
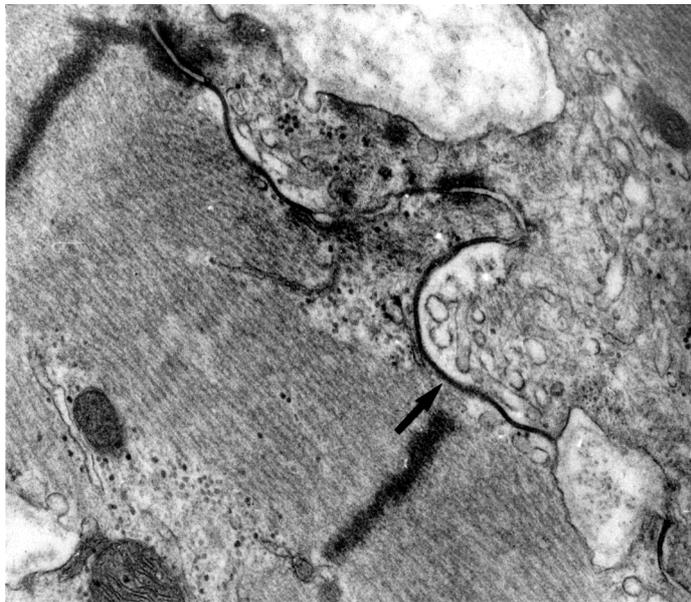


Abb. 80: Lange, longitudinal an einer lateralen Zellgrenze angeordnete GJ-Membran (→) und Desmosomen zwischen den mehrfach verzweigten Fortsätzen einer benachbarten Zelle. x 28600



6. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten die möglichen strukturellen Korrelate von chronischem Vorhofflimmern am menschlichen Herzen untersucht werden.

Die Untersuchung umfasste eine morphologische Beschreibung sowie eine Quantifizierung der strukturellen Veränderungen, die als anatomische Substrate der Arrhythmie in Betracht kommen.

Das Gewebe von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern (Maze) wurde unter verschiedenen Gesichtspunkten im Vergleich zu Kontrollgewebe von Patienten mit Sinusrhythmus bewertet:

Die morphologische Untersuchung erfolgte immunhistochemisch im Hinblick auf folgende strukturelle Veränderungen:

- 1) Remodeling interzellulärer Verbindungen (Cx 43, Cx 40, N-Cadherin und Desmoplakin),
- 2) Zunahme extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen I, VI und Fibronectin),
- 3) Degenerative Veränderungen (α -Aktinin und Aktin).

Ergänzend wurde eine ultrastrukturelle morphologische Untersuchung durchgeführt.

Eine quantitative Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie wurde für folgende Parameter vorgenommen:

- 1) Cx 43 und Cx 40, als atriale gap junction Proteine,
- 2) N-Cadherin, als Protein der fascia adherens,
- 3) Kollagen I, als Marker für Fibrose.

Eine semiquantitative Bestimmung erfolgte für Ubiquitin, Komplement C9 und TUNEL-positive Zellkerne, als Marker für Degeneration, Nekrose und Apoptose.

I. Immunhistochemische Befunde:

Die morphologische immunhistochemische Untersuchung ergab eindeutige strukturelle Veränderungen im Gewebe der Maze-Patienten gegenüber den Kontrollgeweben:

- 1) Alle Patienten mit chronischem Vorhofflimmern zeigten ein deutliches remodeling interzellulärer Verbindungen. Es lag eine auffallende gleichzeitige Lateralisierung von N-Cadherin, Desmoplakin, Cx 43 und Cx 40 sowie eine teilweise völlig ungeordnete diffuse Verteilung dieser Proteine an der gesamten Zelloberfläche vor. Normal strukturierte Glanzstreifen waren häufig kaum noch

vorhanden.

Im Kontrollgewebe waren demgegenüber sowohl Cx 43 und Cx 40 als auch N-Cadherin und Desmoplakin an hauptsächlich transversen, aber auch lateralen Zellgrenzen innerhalb der Glanzstreifen kolokalisiert.

- 2) In allen Geweben von Patienten mit Vorhofflimmern lagen deutlich ausgeprägte fibrotische Veränderungen gegenüber dem Kontrollgewebe vor.
- 3) Degenerative Veränderungen traten bei Vorhofflimmern und im Kontrollgewebe auf.
- 4) Unter morphologischen Gesichtspunkten ergab sich kein Unterschied zwischen aus Appendix und freier Atriumwand stammenden Geweben, mit Ausnahme der extrazellulären Matrix, die in Appendixgewebe stärker ausgeprägt erschien.

II. Ultrastrukturelle Befunde:

Bei der ultrastrukturellen Untersuchung konnten die immunhistochemischen Befunde bei Vorhofflimmern bestätigt werden.

- 1) In allen untersuchten Geweben der Maze-Patienten lagen Hinweise für ein remodeling von Zellverbindungen vor. Einige vollständige und intakte Glanzstreifen waren sowohl endständig als auch an den lateralen Zellgrenzen lokalisiert. Daneben fielen aber häufig veränderte, z.T. erweiterte Glanzstreifen, bei denen die normale Unterteilung in vier regelmäßig angeordnete Membranregionen nicht mehr gegeben war sowie von diesen isoliert vorliegende gap junctions auf. Isolierte gap junctions waren, unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse, ebenfalls relativ häufig an den lateralen Zellgrenzen lokalisiert und lagen sowohl in Form intakter gap junctions als auch als sogenannte „anular profiles“ vor. Auch innerhalb von Zellfortsätzen zum angrenzenden Extrazellulärraum traten isolierte gap junctions auf. An den lateralen Zellgrenzen waren häufig auch abnorme Ansammlungen elektronendichten Materials erkennbar.
- 2) Deutliche interstitielle Fibrose lag in allen untersuchten Geweben der Maze-Patienten vor.
- 3) Deutliche degenerative Veränderungen waren ebenfalls in einigen Gewebebereichen der Maze-Patienten erkennbar.
- 4) Auffallend war desweiteren die bei Vorhofflimmern nur mäßig vorhandenen atrialen Granula.

III. Quantitative Ergebnisse:

Die quantitative Auswertung der verschiedenen immunhistochemisch dargestellten Proteine ergab ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber Sinusrhythmus.

- 1) Cx 43 war bei Vorhofflimmern sowohl im Atrium als auch in Appendixgewebe gegenüber der Kontrollgruppe reduziert
Cx 40 dagegen war nur in den Appendices der Maze-Patienten vermindert, während in Myozyten der freien atrialen Wand eine Tendenz zur Zunahme von Cx 40 vorlag.
- 2) Für N-Cadherin ergab sich kein quantitativer Unterschied zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.
- 3) Kollagen I war bei Vorhofflimmern deutlich erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.
- 4) Im Kontrollgewebe bestand eine enge Korrelation zwischen der Cx43-Menge und der Cx 40-Menge pro Kardiomyozyt. Bei Vorhofflimmern war diese Korrelation nicht mehr vorhanden.
- 5) Eine signifikante Korrelation zwischen N-Cadherin und der Summe beider Connexine pro Zelle war dagegen sowohl bei Sinusrhythmus als auch bei Vorhofflimmern vorhanden.

IV. Semiquantitative Bestimmung von Degenerations-, Nekrose- und Apoptosemarkern:

Die Anzahl der für Ubiquitin, C9 und Tunel-positiven Kardiomyozyten war im Gewebe aller Maze-Patienten verschwindend gering.

Schlußfolgerung:

Aufgrund dieser Ergebnisse kann sowohl ein remodeling interzellulärer Verbindungen und eine reduzierte Connexinexpression, als auch die Zunahme extrazellulärer Matrixproteine als mögliches strukturelles Korrelat chronischen Vorhofflimmerns angesehen werden, während degenerative Veränderungen von eher untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen.

V. DISKUSSION

1. Gewebeauswahl

1.1. Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

In dieser Studie wurden Gewebeproben eines sehr breiten Patientenkollektivs mit chronischem Vorhofflimmern untersucht. Abgesehen von dieser wesentlichen Gemeinsamkeit lagen innerhalb der Patientengruppe grundlegende klinische Unterschiede im Hinblick auf Alter, Dauer des Vorhofflimmerns, Atriumgröße und bestehender Grunderkrankung vor.

Diese Divergenzen erschweren natürlich zum Teil die Interpretation der erzielten Ergebnisse, sind aber unvermeidbar, da nur bei wenigen Patienten wirkliches „lone atrial fibrillation“ vorliegt.

Mary-Rabine et al.⁵² untersuchten vergleichbar ultrastrukturelle und elektrophysiologische Veränderungen im atrialen Myokard von Patienten mit und ohne atriale Tachykardie mit ebenfalls sehr unterschiedlichen kardialen Erkrankungen und beschrieben eine Vielzahl verschiedenster pathomorphologischer Befunde, wobei die Veränderungen bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern am stärksten ausgeprägt erschienen.

In dieser wie auch in der hier vorliegenden und vergleichbaren anderen Studien kann so die Frage, ob vorhandene Veränderungen durch Vorhofflimmern selbst oder durch die zugrundeliegende Herzerkrankung verursacht wurden, nicht endgültig geklärt werden.

Andererseits bleibt selbst im Tiermodell mit induziertem Vorhofflimmern, welches eindeutig zu strukturellen Veränderungen am atrialen Myokard führt³⁰, letztendlich unklar, welchen Mechanismen diese Veränderungen unterliegen, bzw. inwieweit diese eventuell durch Inaktivität, erhöhte Wandspannung oder Ischämie der fibrillierenden Vorhöfe beeinflusst werden.

Auch innerhalb der Kontrollgruppe existierten ähnliche grundlegende Unterschiede, die sich z.T. aber dadurch ausgleichen lassen, daß in beiden Gruppen vergleichbare Altersgruppen und Herzerkrankungen sowie unterschiedlich stark dilatierte Vorhöfe vorhanden waren.

In der vorliegenden Untersuchung ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den klinischen Patientendaten und den erzielten Ergebnissen.

Auch ein erwarteter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und dem Ausmaß fibrotischer Veränderungen war nicht erkennbar.

Die Verwendung von Gewebe erkrankter Herzen verschiedener Pathologien als Kontrollmaterial ist grundsätzlich sicher weit entfernt von idealen Voraussetzungen und stellt an sich schon einen limitierenden Faktor dar, der für diese Studie als tolerierbar betrachtet wurde, da der wesentliche Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen in fehlendem bzw. vorhandenem Sinusrhythmus bei ansonsten vergleichbaren Voraussetzungen lag.

Darüber hinausgehend liegen nur wenige und teilweise widersprüchliche Beschreibungen über die normale atriale Struktur und insbesondere über die Lokalisation und Verteilung von Zellkontakten vor. Aufgrund der offensichtlich nur geringen Erfahrungen mit pathologischen Veränderungen an humanem Atrium, wurden hier v.a. eigene, anhand der Kontrollgruppe gewonnene, Einschätzungen der morphologischen Beurteilung zugrunde gelegt und zusätzlich Gewebe von fünf klinisch gesunden, für tierexperimentelle Studien bestimmten Schweinen zur vergleichenden Untersuchung herangezogen. Das porcine Gewebe war besonders für die Beurteilung fibrotischer Veränderungen sehr hilfreich, da auch schon im Atrium dieser jungen, gesunden Tiere im Vergleich zum Ventrikel erstaunlich viel Bindegewebe vorhanden war und daher z.B. das Alter der Kontrollgruppe als Ursache für den auch hier relativ hohen Kollagenanteil ausgeschlossen werden konnte.

Im Hinblick auf die Connexin- und Cadherinverteilung erwies sich dieses Gewebe als weniger geeignet, da die untersuchten Schweine erst ca. sechs Monate alt waren und somit noch eine juvenile Verteilung der Zellkontakte zeigten.

Um die Voraussetzungen dieser Studie bezüglich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse weitestgehend zu optimieren, wurde für alle Untersuchungen nur Gewebe aus dem rechten Atrium bzw. Appendix verwendet, da auch bezüglich der Unterschiede zwischen rechtem und linkem und sogar zwischen freier Atriumwand und Herzohr innerhalb eines Atriums verschiedene Auffassungen bestehen. Van der Velden et al.^{2,56} untersuchten verschiedene Bereiche im Atrium der Ziege auf Connexinmenge und -verteilung und kamen zu dem Schluß, daß die Ergebnisse aus Appendixgewebe repräsentativ für das gesamte atriale Myokard seien, während Vozzi et al.⁵⁴ im humanen Myokard ungefähr gleiche Connexin 43-Mengen in beiden Vorhöfen, aber eine deutlich höhere Connexin 40-Menge im rechten Atrium, als im Linken fanden. Daneben sind die Zellen des linken Atriums deutlich größer²⁴ und zeigen z.T. anders verteilte Zellkontakte als im rechten Atrium. Elektrophysiologische Unterschiede bestehen ebenfalls zwischen den beiden

Vorhöfen, so scheint z.B. die ERP im rechten Atrium länger als im Linken zu sein ¹¹⁴.

Auch wenn in der Kontroll- und Maze-Gruppe morphologisch keine deutlichen Unterschiede zwischen rechtem Atrium und rechtem Appendix bestanden, abgesehen davon, daß zumindest in einigen Bereichen der untersuchten Appendices vermehrt Kollagen vorhanden war, erschien es aufgrund potentiell möglicher Unterschiede zwischen den verschiedenen rechtsatrialen Geweben sinnvoll, die quantitativen Ergebnisse nach Entnahmeort des Gewebes zu unterteilen. Bisher ist nur eine Studie ¹¹⁵ bekannt, in der humanes Appendix-Gewebe morphologisch untersucht wurde und in allen anderen Fällen wurde entweder nur Atrium beschrieben oder aber keine Differenzierung der verschiedenen Gewebe vorgenommen.

1.2. Vorhofflimmern und atriale Dilatation

Bei der Gewebeauswahl erschienen die sehr unterschiedlichen Vorhofgrößen der Patienten zunächst als kritischer Faktor für die Spezifität der Ergebnisse, da atriale Dilatation und Vorhofflimmern häufig miteinander in Verbindung gebracht werden ^{33,35,116-119}.

Lange Zeit wurde diskutiert, ob die Vergrößerung der Vorhöfe die Ursache oder eine Folge des Vorhofflimmerns darstellt, und aus vielen Studien liegen Hinweise auf beide Möglichkeiten vor.

In der Studie von Mary-Rabine et al. ⁵² waren klinisch nur Patienten älter als 35 Jahre und mit deutlich dilatiertem Atrium von Vorhofflimmern betroffen. Aufgrund der häufigen Assoziation des Vorhofflimmerns mit Mitralklappenerkrankungen geht man überwiegend davon aus, daß eine Klappeninsuffizienz (-stenose) in erhöhtem atrialen Druck, nachfolgender Dilatation und Fibrose und letztendlich in Vorhofflimmern resultiert. Demgegenüber indizierte allerdings eine klinische Studie von Sanfilippo et al. ¹²⁰ an Patienten mit Vorhofflimmern als alleinigem Befund und ansonsten normaler Herzstruktur sowie anfangs normaler, im Verlauf aber signifikant zunehmender Vorhofgröße, daß atriale Dilatation nicht nur als Ursache, sondern ebenfalls als Konsequenz der Rhythmusstörung auftreten kann. Dieser Hinweis konnte von Morillo et al. ⁶⁹ und Everett et al. ¹²¹ bestätigt werden, die bei Hunden nach 6 Wochen induziertem Vorhofflimmern eine Vergrößerung beider Vorhöfe um 40% beschrieben. Auch die Tatsache, daß die Atriumgröße nach erfolgreicher Kardioversion zum Sinusrhythmus wieder abnimmt deutet darauf hin, daß atriale Dilatation als Folge der Arrhythmie auftreten kann ³⁹.

Spach et al.¹¹⁶ sehen dagegen als zusammenfassendes Ergebnis mehrerer Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und Atriumgröße, sondern stellen zunehmendes Alter in den Vordergrund, da es ihnen kaum möglich war, bei jungen Tieren mit dilatiertem Atrium Vorhofflimmern auszulösen und umgekehrt ältere Tiere mit normal großem Atrium eindeutig zur Arrhythmie tendierten. Entsprechend trat Vorhofflimmern in Kombination mit rheumatischer Herzerkrankung nicht bei jungen Patienten mit dilatierten Vorhöfen, sondern nur bei älteren Patienten mit entsprechender oder kleinerer Vorhofgröße auf, und elektrophysiologische Untersuchungen derselben Forschungsgruppe zeigten, daß die Entstehung von reentries auch in ganz kleinen atrialen Gewebebereichen (1-2 mm²)⁸⁰ mit zudem normalen Aktionspotentialen möglich ist. Auch eine Studie an Schafen mit atrialer Dilatation ergab keinen Zusammenhang zwischen der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern und der Atriumgröße¹¹⁴.

In der hier vorliegenden Arbeit waren weder in der Patientengruppe mit Vorhofflimmern noch bei Patienten mit Sinusrhythmus und z.T. ebenfalls hochgradig dilatiertem Atrium Zusammenhänge zwischen Atriumgröße und den verschiedenen Ergebnissen erkennbar.

Auch wenn der Beitrag der atrialen Dilatation zur Arrhythmieentstehung bislang ungeklärt bleibt, ist deren Einfluß auf die hier untersuchten Parameter, wenn auch nicht auszuschließen, zumindest nicht statistisch signifikant.

2. Spezielle Vorteile der Kombination von konfokaler- und Elektronenmikroskopie bei der Untersuchung von gap junctions

Die konfokale Mikroskopie^{122,123} bietet den entscheidenden Vorteil der sehr sensitiven und spezifischen Darstellung und Quantifizierbarkeit immunhistochemisch gefärbter Proteine. Vor allem bei subzellulären Strukturen wie gap junctions, würde demgegenüber eine elektronenmikroskopische morphometrische Analyse die Menge des untersuchbaren Gewebes und somit auch die Aussagefähigkeit stark einschränken.

Andererseits kann mit einer vorhandenen Connexin-Immunfluoreszenz lediglich eine Aussage über vorhandenes Protein nicht aber notwendigerweise auch über intakte, funktionsfähige gap junctions getroffen werden. In einigen, ebenfalls kombiniert elektronenmikroskopisch und konfokalen, Untersuchungen stellten sich vor allem laterale, immunhistochemisch markierte gap junctions ultrastrukturell

als internalisierte anulare Strukturen dar, die nicht mehr zu interzellulärer Verbindung beitragen^{10,18,22}. Auch *in vitro* Studien über den Farbstofftransfer von „Lucifer Yellow CH“ durch gap junctions haben bestätigt, daß die Anzahl der gap junction-Plaques nicht mit dem Ausmaß der interzellulären Kommunikation korreliert⁷³.

Zudem ermöglicht erst eine detaillierte ultrastrukturelle Untersuchung die Beurteilung degenerativer Veränderungen und ist insbesondere zur Bestätigung der TUNEL-Reaktion notwendig.

3. Mögliche Ursachen veränderter Anisotropie und potentiell arrhythmogene Substrate

Der dem Vorhofflimmern zugrundeliegende reentry-Mechanismus kann nur dann entstehen, wenn sich Aktionspotentiale retrograd auf bereits kontrahierte, nicht mehr refraktäre Zellen ausbreiten. Eine solche diffuse und nicht mehr koordinierte Exzitation und Kontraktion des Myokards kommt zustande, wenn eine Abweichung von der normalen Ausbreitungsrichtung und -geschwindigkeit der elektrischen Impulse vorliegt.

Die normale, koordinierte Erregungsausbreitung unterliegt sowohl im Atrium als auch im Ventrikel der sogenannten Anisotropie. Dieser Begriff beschreibt die unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Aktionspotentiale in longitudinaler und transversaler Richtung.

In beiden Richtungen treffen die Aktionspotentiale bei der interzellulären Weiterleitung auf gap-junction-Membranen, deren Widerstand zwar wesentlich geringer als der normaler Zellmembranbereiche, aber noch um einiges höher als der cytoplasmatische intrazelluläre Widerstand ist. Aufgrund der zylindrischen Form der Myozyten müssen eintreffende Aktionspotentiale in transverser Richtung mehr Zellgrenzen bzw. gap junctions passieren als über eine entsprechende Entfernung in longitudinaler Richtung, was in einem höheren Widerstand und langsamerer Leitung transvers zur Muskelfaserrichtung als parallel dazu resultiert^{17,57}.

Saffitz et al.⁵⁵ untersuchten am Hundeherzen die verschiedenen anisotropen Verhältnisse in verschiedenen kardialen Regionen und deren mögliche zugrundeliegenden Ursachen:

In der atrialen Crista terminalis ist die Weiterleitungsgeschwindigkeit in longitudinaler Richtung ca. 10 x schneller als in transverser Richtung, während das Verhältnis im Arbeitsmyokard des Ventrikels bei nur etwa 3:1 liegt^{17,55}.

Sowohl aktive Membraneigenschaften als auch passive Eigenschaften sind für die sehr unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten in unterschiedlichen kardialen Geweben verantwortlich.

Obwohl die Myozyten von Atrium und Ventrikel sich in ihren aktiven Ionenströmen unterscheiden, können diese nicht die unterschiedliche Gewebe-Anisotropie erklären^{17,124,125}. Vielmehr konnten anhand dieser Experimente die Bedeutung der gap junction-Anordnung und der Gewebearchitektur für die anisotrope Leitung demonstriert werden:

Das Verhältnis Zelllänge zu -breite beträgt an isolierten caninen ventrikulären Myozyten ca. 6:1. Durch die irreguläre Form und die komplexe überlappende Anordnung der Myozyten sowie die dreidimensionale Verteilung interzellulärer Verbindungen entsteht ein effektives Länge-Breite-Verhältnis von nur ca. 3,4 : 1, das die Anzahl der Zellgrenzen, die pro Strecke von Aktionspotentialen passiert werden müssen beschreibt. Dieses entspricht in etwa dem Verhältnis der Anisotropie und zeigt somit die Bedeutung der gap junction-Verteilung und Myozytenanordnung für die Weiterleitungsgeschwindigkeit⁵⁷. Obwohl ventrikuläre Myozyten ca. 25% länger und breiter sind als die der Crista terminalis, sind die Länge-zu-Breite Verhältnisse identisch. Somit kann die Zellgröße allein ebenfalls nicht die unterschiedliche Anisotropie unter physiologischen Bedingungen erklären.

Im caninen ventrikulären Myokard sind die Myozyten über multiple Fortsätze in einer komplexen überlappenden Anordnung gleichermaßen über endständige und seitliche IDs mit jeweils 11 bis 12 anderen Myozyten verbunden. In der Crista terminalis überwiegen dagegen endständige relativ einfache, gerade IDs mit kleinen gap junctions zwischen nur jeweils 6 bis 7, wenig verzweigten Myozyten. Durch diese Anordnung wird die longitudinale Weiterleitung erleichtert, die transverse Leitung durch weniger laterale Verbindungen verringert und somit die Anisotropie erhöht¹⁷. Ein weiterer Aspekt der unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten liegt in der Expression verschiedener Connexinisoformen, da in der Crista terminalis zusätzlich die „schnelleren“ Connexin 40-Kanäle vorhanden sind¹⁷.

Bei der normalen, uniformen Anisotropie der Impulsweiterleitung verläuft die fortschreitende Depolarisationswelle glatt in allen Richtungen, und die Leitungsgeschwindigkeit ändert sich monoton von schnell (longitudinal) zu langsam (transvers)^{57,80}. Nicht uniforme Anisotropie tritt dagegen auf, wenn die Ausbreitung in einer Richtung (meist transvers) unterbrochen ist, so daß benachbarte Muskelfasern in deutlich irregulärer Reihenfolge aktiviert werden. Die Depolarisationswelle erhält dabei ein polyphasisches Aussehen mit multiplen kleinen Ausläufern^{57,80}.

Eine solche nicht uniforme Veränderung der normalen Anisotropie ist prädisponierend für die Entstehung von reentry-Kreisläufen und kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein:

1. Uneinheitlich veränderte aktive Ionen-Kanal-Eigenschaften und daraus resultierende regionale Veränderungen der ERP,
2. Veränderungen in Zellgröße und -geometrie,
3. Veränderungen der interzellulären elektrischen Kopplung durch gap junctions,
4. Zunahme extrazellulärer Matrixproteine und daraus resultierende elektrische Isolation individueller Kardiomyozyten (-gruppen).

Spach et al.^{125,126} konnten in verschiedenen elektrophysiologischen Untersuchungen nachweisen, daß reentries auch unabhängig von Veränderungen der aktiven Membraneigenschaften und Refraktärzeiten auftreten können.

Wahrscheinlich stellt die Entstehung von reentry-Kreisläufen einen komplexen Vorgang verschiedener Mechanismen dar, die sowohl kombiniert als auch unabhängig voneinander zur Veränderung der normalen Anisotropie führen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die aktiven Membraneigenschaften nicht berücksichtigt, die anderen möglichen Parameter werden im Folgenden im Hinblick auf ihren möglichen Beitrag zur Arrhythmieentstehung diskutiert.

4. Zellgröße

Abweichungen der Kardiomyozyten von der normalen Zellgröße sind nicht nur wichtige Parameter des Gesamtgewebezustandes und teilweise adaptive Reaktionen auf pathologische Bedingungen, sondern haben auch eine lang unterschätzte Bedeutung⁸⁰ für die normale oder abnormale Weiterleitung der Aktionspotentiale^{15,57}. Während die Funktion aktiver sarkolemmaler Ionenkanäle für die elektrophysiologischen Charakteristika eher auf der Ebene individueller Myozyten von Bedeutung ist, haben die myokardiale Gewebearchitektur und die gap junctions als passive elektrische Eigenschaften, einen genauso wichtigen Einfluß auf das gesamte elektrophysiologische Profil des Herzens¹³. Die Gewebearchitektur beeinflusst die elektrische Leitung des Gewebes durch Größe und Form einzelner Myozyten sowie durch deren Anordnungsgeometrie im Zellverband¹⁵. So konnten Spach et al.¹²⁷ nachweisen, daß ein normales Zellwachstum während der Entwicklung zu veränderten anisotropen Verhältnissen

führt und demonstrierten anhand von Computermodellen, daß die Zellgröße einen unerwartet großen Effekt auf elektrophysiologische Parameter, v.a. die maximale transverse Leitungsgeschwindigkeit, hat. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Hypothese, daß eine Aufrechterhaltung der normalen Zellgröße unter pathologischem remodeling von gap junctions und bei normaler Funktion der aktiven Ionenkanäle eine Möglichkeit zur Aufrechterhaltung maximaler Leitungsgeschwindigkeiten sein kann.

Saffitz et al.^{21,72} sehen die adaptive akute zelluläre Hypertrophie darüber hinausgehend auch im Zusammenhang mit einer veränderten Connexinexpression und veränderten Leitungseigenschaften, da sowohl Angiotensin II⁶² als auch cAMP als Mediatoren kardialer Hypertrophie gelten sowie daneben *in vitro* Einfluß auf Connexinexpression und Leitungsgeschwindigkeit haben.

Zellhypertrophie ist ein häufiger und eher unspezifischer Befund der ultrastrukturellen Untersuchung bei vielen Herzerkrankungen, so auch bei atrialen Arrhythmien^{29,30,37,51,52,69,115,128-131}.

Insbesondere experimentelle Untersuchungen an gesunden Tierherzen ergeben allerdings inkonsistente Ergebnisse für die Zellgröße bei Vorhofflimmern. So beschreiben Ausma et al.^{29,30} bei Ziegen nach induziertem Vorhofflimmern eine Hypertrophie atrialer Myozyten, während Everett et al.¹²¹ bei Hunden nach induziertem Vorhofflimmern eine Abnahme der Zellgröße im Atrium beschreiben.

Eine klinisch-histologische Studie an 62 Patienten mit oder ohne Vorhofflimmern mit verschiedenen Herzklappenerkrankungen ergab eine signifikant (~ 40%) erhöhte Myozytengröße in Patienten mit chronischem Vorhofflimmern¹³².

Die in der vorliegenden Studie gemessenen Zellgrößen von Patienten mit Vorhofflimmern und ebenfalls verschiedenen Klappenfehlern zeigten dagegen keine Abweichungen vom allgemeinen Normbereich.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte die immunhistochemisch ermittelten insgesamt sehr unterschiedlichen Zellgrößen insofern, daß zwischen überwiegend normalen, auch gelegentlich hypertrophierte und atrophiierte Zellen vorhanden waren und sich auch hier im durchschnittlichen Gesamtbefund keine wesentliche Abweichung von der Norm ergab.

Trotz der oben beschriebenen generell sicher grundlegenden Bedeutung von Zellform und -größe für die Weiterleitung elektrischer Aktivität, konnte ein entscheidender Einfluß der Zellgröße auf die chronische Arrhythmie bei der hier untersuchten Patientengruppe ausgeschlossen werden.

5. Degeneration, Nekrose und Apoptose

Degenerative Veränderungen sind, zumindest bis zu einem gewissen Ausmaß, ein universeller Befund bei verschiedenen kardialen Dysfunktionen.

Auch bei allen Studien über Vorhofflimmern wurden sowohl im Tierexperiment an Ziegen^{29,30}, Hunden^{37,69,121,129} oder Katzen^{37,69,128} als auch an menschlichem Gewebe^{36,51,52,115,130-133} stereotype Charakteristika degenerativer Veränderungen beschrieben.

Mary-Rabine et al.⁵² stellten innerhalb einer klinisch sehr diversen Patientengruppe Myolyse und Degeneration fest und stuften ohne weitere Quantifizierung die Veränderungen bei Patienten mit Vorhofflimmern als am stärksten ausgeprägt ein.

Aime-Sempe et al.³⁶ untersuchten Gewebe aus den dilatierten rechten Vorhöfen von 50 Patienten mit Vorhofflimmern und fanden neben Apoptose (TUNEL-positive Zellen) ausgeprägte degenerative Veränderungen der Myozyten sowohl bei Vorhofflimmern als auch im Kontrollgewebe von Patienten mit Sinusrhythmus.

Frustaci et al.¹³³ untersuchten rechtsatriale Biopsien von zwölf Patienten mit paroxysmalem „lone atrial fibrillation“ und beschrieben variierende histologische Veränderungen wie Degeneration, Myolyse, Myokarditis oder Nekrose neben Hypertrophie und Fibrose, wobei keine Korrelation zwischen der Dauer des Vorhofflimmerns und dem Grad der Gewebeschädigung bestand.

Conelly et al.¹¹⁵ beschrieben signifikant mehr Degeneration und Fettgewebe in den Herzohren von Maze-Patienten als einzigen statistisch signifikanten Befund gegenüber Autopsiekontrollen mit teilweise vorhandener Koronarerkrankung, während sich Hypertrophie und Fibrose nicht signifikant zwischen den Untersuchungsgruppen unterschieden.

Wouters et al.¹³² führten eine vergleichbare Studie an Patienten mit unterschiedlichen Klappenerkrankungen durch und verglichen von diesen Patienten solche mit und ohne Vorhofflimmern histologisch. Die vorhandenen degenerativen Veränderungen waren bei allen Formen der Klappenerkrankungen verschiedengradig und unabhängig von dem zusätzlichen Vorliegen von Vorhofflimmern.

Die immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Maze-Patienten in der vorliegenden Studie ergab, in gewisser Übereinstimmung mit Wouters et al.¹³², unterschiedlich stark ausgeprägte Anzeichen der Degeneration in unterschiedlichen Gewebereichen und oft auch nur einzelnen Zellen einzelner Patienten. Nie waren vollständige Gewebe betroffen, sondern immer auch normale neben verschiedengradig veränderten Bereichen vorhanden. Für diese Veränderungen kommt eine Vielzahl von Ursachen wie Ischämie während Koronarerkrankungen, erhöhte Wandspannung aufgrund atrialer Dilatation oder erhöhtem Druck bei bestehender Klappeninsuffizienz sowie metabolische Defizite aufgrund ausgeprägter Fibrose in Betracht, so daß Degeneration nicht zwingend in direktem Zusammenhang mit Vorhofflimmern gesehen werden muß.

Natürlich kann auch im „nur“ fibrillierenden Atrium eine inadäquate metabolische Versorgung der Zellen unter ischämischen Bedingungen oder die reduzierte kontraktile Aktivität zu Degeneration und Nekrose führen.

An anästhesierten Hunden wurde während des Vorhofflimmerns eine zwei- bis dreifach erhöhte koronare atriale Perfusion und erhöhter Sauerstoffverbrauch nachgewiesen, die dort allerdings nicht zur Ischämie führten¹¹⁸. Bei höherem metabolischem Bedarf unter normalen Bedingungen (Anästhesie), ist eine Erschöpfung der koronaren Reserven und das Auftreten von Ischämie jedoch sehr wahrscheinlich.

Andererseits können Myolyse und Ischämie auch schwerwiegenden Einfluß auf die Connexinverteilung und die spezifischen Eigenschaften der gap junction-Kanäle haben.

Beardslee et al.⁶⁸ führten Ischämie- und Reperfusionsexperimente an isolierten Rattenherzen durch und konnten die elektrische Entkopplung und intrazelluläre Translokation von Connexin 43-gap junctions, wahrscheinlich hervorgerufen durch zeitgleiche progressive Dephosphorylierung des Proteins, bei akuter Ischämie nachweisen.

Übereinstimmende Zusammenhänge zwischen Ischämie, die auch im fibrillierenden Atrium die Ursache für Degeneration und Nekrose darstellen kann^{26,34,39}, und zellulärer Entkopplung werden in anderen Studien ebenfalls beschrieben^{57,76}:

Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} und H^+ -level bei Azidose, Ansammlung von Lipidmetaboliten bei Umstellung des Energiestoffwechsels von Fettsäure- auf Kohlenhydratstoffwechsel unter Hypoxie⁷² sowie ATP-Mangel, Proteinkinaseaktivierung und verstärkte Protein-Dephosphorylierung werden als Promotoren der elektrischen Entkopplung angesehen^{68,76}.

Eine veränderte Connexin 43-Phosphorylierung beeinflusst wiederum wesentlich die spezifischen Kanaleigenschaften im Hinblick auf die Leitungsgeschwindigkeit

(im normalen Herzen liegt v.a. die phosphorylierte Connexin 43-Form vor) und ist somit eventuell als proarrhythmogen einzustufen. Daneben ist es möglich, daß dephosphorylierte Connexinisoformen verstärkt dem Abbau unterliegen und so zur Reduktion der Gesamtconnexinmenge beitragen^{68,76}.

Trotz dieser bekannten möglichen Zusammenhänge können die aus der hier vorliegenden Untersuchung resultierenden Ergebnisse für Degeneration, Nekrose oder Apoptose eher als unspezifisch und sekundär, denn als primär ursächlich für die Arrhythmieentstehung angesehen werden.

Zum einen ergab auch die spezifische Anfärbung für C9 und Ubiquitin nur einen minimalen Anteil ernsthaft geschädigter Zellen bei allen Maze-Patienten, und die wenigen TUNEL-positiven Zellen konnten elektronenmikroskopisch nicht als Apoptose bestätigt werden. Zum anderen lagen auch in den Geweben der Kontrollgruppe immer wieder einzelne Zellen oder Gewebebereiche mit erkennbarem Verlust der Querstreifung, perinucleärer Myolyse oder abnormalen Zellorganellen vor, die zusammengenommen mit den uneinheitlichen Veränderungen innerhalb der Maze-Gruppe wahrscheinlich eher auf die unterschiedlichen Grunderkrankungen zurückzuführen sind. Da hinsichtlich der Degeneration keine quantitative Beurteilung der Gewebe vorgenommen wurde, konnte eine generell für die Maze-Gruppe ausgeprägtere Veränderung und ein somit deutlicher Zusammenhang mit chronischem Vorhofflimmern nicht nachgewiesen werden. Genauso wenig kann aber anhand dieser Befunde ein „unterstützender“ Einfluß degenerativer Veränderungen auf das Fortbestehen der Arrhythmie ausgeschlossen werden. Zumindest Mitochondrienschädigung und Glykogenzunahme sollten auch als möglicher Hinweis auf eine veränderte metabolische Funktion des Myokards und unter Berücksichtigung eventueller Auswirkungen auf die Connexinexpression interpretiert werden.

Der im Gewebe der hier untersuchten Maze-Patienten bei chronischem Vorhofflimmern nicht auftretende apoptotische Zelltod weist dabei aber zumindest auf einen noch reversiblen Prozeß hin.

6. Extrazelluläre Matrix

Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) können unumstritten die normale Funktion des Myokards in vielfältiger Hinsicht wesentlich beeinflussen. Physiologische altersbedingte sowie als Reparationsvorgang nach Myokardschädigung auftretende oder pathologische fibrotische Veränderungen haben negative Auswirkungen nicht nur auf metabolische und elektrische

Kopplung individueller Kardiomyozyten, sondern bezüglich der so veränderten Zellgeometrie und Gewebearchitektur auch auf den gesamten Zellverband und die Organfunktion.

Einen deutlichen Einfluß der EZM und der Gewebearchitektur auf Anisotropie und Impulsweiterleitung unter bereits physiologischen Voraussetzungen konnten Spach et al.¹²⁵ belegen:

Im Atrium des Hundes liegt selbst unter normalen Bedingungen Inhomogenität in der Erregungsausbreitung vor; an Stellen wo Muskelfaserbündel durch physiologische Bindegewebssepten voneinander getrennt sind, treten bei transverser, nicht aber bei longitudinaler Weiterleitung des Aktionspotentials lokale Abweichungen auf, und an Verzweigungen oder Verbindungen von Zellen kommt es zur Verlangsamung und Formveränderung der sich ausbreitenden Erregungswellen¹²⁵.

Weiterhin wiesen ebenfalls Spach et al.⁸⁰ den wesentlichen Zusammenhang zwischen Veränderungen der EZM und veränderten myokardialen Leitungseigenschaften während des normalen Alterungsprozesses nach:

Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen an isoliertem humanen atrialen M. pectinatus von Patienten unterschiedlichen Alters mit unterschiedlichen Herzerkrankungen, jedoch ohne vorhandene atriale Dilatation oder Arrhythmie, ergaben deutliche altersabhängige Veränderungen der Anisotropie des Gewebes, die im Wesentlichen auch bereits in früheren tierexperimentellen Studien ermittelt wurden⁸⁰. In Geweben von jungen Patienten ist die uniforme anisotrope Weiterleitung normalen atrialen Gewebes durch in allen Richtungen glatt verlaufende, fortschreitende depolarisierende Wellen gekennzeichnet. Bei älteren Patienten mit nicht uniformer Anisotropie ist die Weiterleitung in transverser Richtung durch ausgeprägte Bindegewebssepten mit variabler Geometrie unterbrochen, so daß benachbarte Muskelfasergruppen in irregulärer Reihenfolge erregt werden und die abgeleiteten Wellen ein polyphasisches Aussehen erhalten. Diese Unterschiede in der Ausbreitung der Aktionspotentiale korrelieren deutlich mit der Entwicklung von extensiven Kollagensepten, die schmale Muskelfaserbündel voneinander trennen, und weisen auf eine laterale elektrische Entkopplung der Myozyten und damit verbundener, reduzierter transverser Leitungsgeschwindigkeit hin. Im Gewebe der älteren Patienten lag dabei keine absolute Zunahme des Gesamtkollagengehaltes, sondern eher eine Umverteilung gegenüber jungen Patienten vor^{80,116,125}.

Eine Zunahme der EZM wurde in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der hier vorliegenden Untersuchung häufig als begleitender Befund bei Arrhythmien beschrieben^{33,36,37,51,78,115,124,129-131,133,134}.

Regionen abnormaler Weiterleitung im Gewebe von Patienten mit ventrikulärer Tachykardie wurden mittels "mapping" in fibrotischen Gewebearealen mit einer gleichzeitigen Umverteilung von gap junctions lokalisiert ⁷⁸.

Hunde mit Mitralklappenfibrose, vergrößertem linkem Atrium und, je nach Ausmaß der Fibrose, intermittierendem bis chronischem Vorhofflimmern, zeigten keinerlei Veränderungen des zellulären Ruhe- oder Aktionspotentials, aber neben degenerativen ultrastrukturellen Veränderungen und Zellhypertrophie eine deutliche Zunahme der EZM und eine Formveränderung der Glanzstreifen innerhalb fibrotischer Bereiche, die zusammen mit veränderten anisotropen Eigenschaften assoziiert wurden ¹²⁹.

Fibrose im Atrium stellte ebenfalls den häufigsten Befund postmortalen Untersuchungen an Geweben von Patienten mit atrialen Tachyarrhythmien dar ¹²⁹.

Extensive Fibrose bei erhöhter Heterogenität der Weiterleitung war auch Ergebnis einer weiteren elektrophysiologischen Studie an Hunden mit kongestiver Kardiomyopathie und induziertem Vorhofflimmern, während andere elektrophysiologische Parameter wie Refraktärzeit oder Membranpotential unbeeinträchtigt blieben ³⁷.

Am induziert chronisch (2-6 Wochen) fibrillierenden Atrium vom Hund wurde deutliche Ersatzfibrose in Verbindung mit vermehrter Connexin 43-Expression und einer Zunahme lateraler Zellverbindungen beschrieben ¹³⁴.

Im atrialen Gewebe von 15 Patienten mit dilatiertem Atrium und chronischem Vorhofflimmern trat neben verschiedenen degenerativen und apoptotischen Veränderungen ebenfalls gravierende interstitielle Fibrose auf ³⁶.

Trotz dieser insgesamt übereinstimmenden Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen EZM und interzellulärer Impulsweiterleitung ist die Rolle der Fibrose bei der Entstehung kardialer Rhythmusstörungen teilweise umstritten. Untersuchungen, die sich hauptsächlich mit Veränderungen der EZM bzw. der Gewebearchitektur oder der kardialen Ultrastruktur beschäftigten, sehen deren Bedeutung für die Entstehung von verlangsamter Weiterleitung und Block im Vergleich zu elektrophysiologischen Veränderungen als wesentlicher an ^{29,37,127,129}. Andere Studien dagegen, deren Schwerpunkt auf der gleichzeitigen Untersuchung von Veränderungen der EZM und Veränderungen der elektrischen interzellulären Kopplung lag, stellen die Bedeutung einer veränderten Connexinexpression gegenüber der Bedeutung der Fibrose in den Vordergrund für die Entstehung von Arrhythmien ^{10,12,74}.

So stellt v.a. die Infarkt „border zone“, wahrscheinlich eines der am besten untersuchten Fibrose- bzw. Arrhythmieemodelle, einen Anlaß für die kontroverse Diskussion über die Bedeutung der Fibrose dar.

Während der Entzündungs- und Reparationsphase nach einem Infarkt setzen umfassende strukturelle Änderungen der Kardiomyozyten und der EZM ein.

Zahlreiche detaillierte Studien existieren über morphologische und elektrophysiologische Veränderungen innerhalb der Infarkt „border zone“ bei Mensch und Hund. Diese resultieren übereinstimmend in einer massiven, v.a. parallel zu den Muskelfaserbündeln angeordneten, Zunahme des Bindegewebes, welche wiederum - mit oder ohne Beteiligung von gap junctions - für die Entstehung von Weiterleitungsabnormalitäten verantwortlich gemacht wird^{11,12,21}. Zwar wurde an diesen fibrotischen Bereichen verlangsamte Leitung und Leitungsblock nachgewiesen^{21,126}, ein weiteres wesentliches Kriterium war daneben aber auch eine gravierende Umverteilung und Reduktion der Connexin 43-gap junctions zwischen degenerierten aber noch lebensfähigen Myozyten in Gewebearealen mit Ersatzfibrose¹¹.

Am Hundemodell wurde bereits vier Tage nach Koronarocclusion eine stark gestörte gap junction-Verteilung, ähnlich der eines ausgeheilten humanen Infarktes^{11,21} sowie nicht uniforme Anisotropie¹² nachgewiesen, während zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei fibrotische Veränderungen vorlagen^{11,12} und sich die aktiven Membraneigenschaften zumindest partiell bereits wieder normalisiert hatten¹².

Peters et al. untersuchten humane ventrikuläre Biopsien aus ischämischen und hypertrophierten Herzen, zwei Voraussetzungen also, die eng mit Arrhythmieentstehung assoziiert sind, auf ihre Connexin 43-Quantität sowie die gap junction-Verteilung und kamen auch hier zu dem Schluß, daß vielmehr beeinträchtigte interzelluläre Verbindung als fibrotische Veränderungen für die Arrhythmieentstehung verantwortlich sind¹⁰.

Daneben liegen auch Untersuchungen vor, die keinerlei Zusammenhang zwischen EZM und Arrhythmieentstehung erkennen lassen, sondern veränderte Anisotropie entweder nur auf degenerative Veränderungen oder nur auf veränderte Connexinexpression zurückführen.

Ausma et al.^{29,30} führten verschiedene elektrophysiologische und histologische Studien an Ziegen mit induziertem Vorhofflimmern durch und beschrieben zwar deutliche degenerative histologische Veränderungen unter der Bezeichnung Dedifferenzierung, fanden aber keine morphologischen Veränderungen innerhalb der Glanzstreifen, oder der Connexin 43-Expression und keine Anzeichen für Fibrose.

Eine Studie von Thomas et al.⁷⁸ an heterozygot defekten Cx 43 (+/-) Mäusen ergab stark beeinträchtigte ventrikuläre Weiterleitung ohne erkennbare Unterschiede in der histologischen Gewebestruktur und ohne fibrotische Veränderungen im Vergleich zu normalen Mäusen.

Morillo et al.⁶⁹ konnten nach sechswöchigem induziertem Vorhofflimmern bei Hunden ebenfalls keinerlei Fibrose, sondern nur zelluläre Hypertrophie und ultrastrukturelle Veränderungen feststellen. Diese Autoren sehen die Hypertrophie und unregelmäßige Anordnung der Myofibrillen als Entstehungsorte verlangsamter Weiterleitung an und sehen in Veränderungen von Zellorganellen wie Mitochondrien und ER "trigger", die über Veränderungen der Ionenkanäle zur Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns beitragen.

Bei der vergleichenden Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen verschiedener Spezies wirkt sich v.a. der Zeitfaktor limitierend aus. Die Ätiologie und Pathogenese von experimentellen Mitralklappenerkrankungen ist bei Hunden beispielsweise sicher nicht identisch mit der des Menschen, auch wenn die pathophysiologischen Effekte auf die kardiale Funktion dieselben sind. Im Tierexperiment handelt es sich dabei aber um eine akute atriale Hypertrophie, von der sich die klinische Situation bei chronischem Vorhofflimmern mit einer Entwicklung über mehrere Jahre deutlich unterscheidet. Auch die fibrotischen Veränderungen nach einem akuten Infarkt, gleich welcher Spezies, lassen sich aus diesem Grund nicht uneingeschränkt auf die Situation bei atrialer Dilatation und Arrhythmie übertragen, die erst nach beträchtlicher Zeit und i.d.R. erst in höherem Lebensalter in veränderten anisotropen Eigenschaften resultiert.

Ähnlich tragen Untersuchungen an isoliertem Gewebe zwar entscheidend zum Verständnis allgemein proarrhythmogener Bedingungen bei, können aber nicht alle komplexen Auswirkungen, wie z.B. den Einfluß des autonomen Nervensystems, humoraler Faktoren im Blut oder verschiedener Druck-Volumen / Dehnungseffekte *in situ* berücksichtigen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein ausgeprägter fibrotischer Veränderungen und der verzögerten Wiederherstellung der Kontraktionsfunktion nach Kardioversion bei chronischem Vorhofflimmern wurde andererseits gerade auch aufgrund der akuten Veränderungen im Tierversuch ersichtlich; die Ursache der zwar vorhandenen degenerativen aber fehlenden fibrotischen Veränderungen in den Experimenten mit Ziegen^{29,30}, ist wahrscheinlich in der relativ geringen Dauer der Arrhythmie begründet. Die daraufhin erfolgende schnelle, völlige Wiederherstellung der kardialen Funktion bei diesen Tieren nach Beendigung des induzierten Vorhofflimmerns innerhalb von

zwei Wochen, könnte durch eben diese fehlende Zunahme der extrazellulären Matrix bedingt sein.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche, z.T. extensive Zunahme der EZM bei chronischem Vorhofflimmern. Kollagen I war im Gewebe der Maze-Patienten um 53 % (RFW) bzw. 33 % (RAA) erhöht. Die fehlenden fibrotischen Veränderungen bei Patienten mit Sinusrhythmus und ansonsten ähnlichen Grunderkrankungen ergeben eine eindeutige Relation zwischen Fibrose und Vorhofflimmern. Auch die fehlende Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und dem Grad der Fibrose weist auf eine pathologische Kollagenzunahme, die nicht mehr als physiologischer Alterungsprozeß angesehen werden kann hin. Eine Kollagenzunahme in dem Ausmaß, wie sie in den hier untersuchten Geweben der Maze-Patienten (selbst bei als geringgradig eingestufte Fibrose) vorlag, kann sicher die normale uniforme Anisotropie und Impulsweiterleitung im Atrium gravierend beeinträchtigen.

Durch die ausgeprägten interstitiellen Fibroseareale, die einerseits eventuell eine Kompensation des erhöhten intraatrialen Drucks bei atrialer Dilatation darstellen, werden andererseits gesamte Muskelfaserbündel, z.T. auch einzelne Myozyten, über weite Bereiche isoliert, ohne daß die Möglichkeit sarkolemmaler Apposition besteht. So kann zwischen benachbarten Zellen keine laterale elektrische Kopplung über gap junctions stattfinden und somit kein Spannungstransfer in dieser Richtung erfolgen. Durch diese Reduktion v.a. der lateralen Zellverbindung und den erhöhten extrazellulären Widerstand wird besonders die Weiterleitung in transverser Richtung (über Myozytengruppen hinweg) stark beeinträchtigt werden, während die longitudinale Leitungsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Daneben verursachen solche fibrotischen Areale eine Diskontinuität des atrialen Myokards und an den daraus entstehenden Verzweigungen von Myozyten wurde ebenfalls verlangsamte Weiterleitung nachgewiesen ¹²⁵.

Interstitielle Fibrose kann also in verminderter Leitungsgeschwindigkeit oder lokalem Leitungsblock resultieren und ist somit unabhängig von Veränderungen der elektrischen interzellulären Kopplung durch gap junctions als mögliche Voraussetzung für die Entstehung von reentry-Kreisläufen anzusehen.

Ob atriale Fibrose eine der primären Ursachen des Vorhofflimmerns oder eine Konsequenz der Arrhythmie darstellt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt und auch die Mechanismen, die auf molekularer Ebene für die Fibroseentstehung bei chronischem Vorhofflimmern verantwortlich sind werden noch diskutiert ¹³⁵.

Inzwischen konnte in mehreren Studien, die sich mit der Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an der Arrhythmiepathogenese beschäftigten^{71,135-137}, ein wesentlicher Zusammenhang zwischen Angiotensin II und der Fibroseentstehung nachgewiesen werden.

Angiotensin II aktiviert extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen (Erk 1 und 2). Diese wiederum gehören einer Subfamilie Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) an und induzieren in phosphorylierter (aktiver) Form, über weitere Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, allgemein zelluläre Differenzierungs-, Wachstums- und Proliferationsprozesse und aktivieren so u.a. auch Fibroblasten¹³⁵. Am Herzen wurde Erk 1 und 2 im Interstitium überwiegend in Fibroblasten, im Kapillarendothel sowie im perikardialen Fettgewebe immunhistochemisch nachgewiesen¹³⁵. Auch die Existenz eines kardialen Renin-Angiotensin-Systems ist inzwischen hinreichend belegt⁷¹, und die positiven Auswirkungen von ACE-Inhibitoren bei Patienten mit kongestiver Kardiomyopathie in Dosierungen, die nicht ausreichten, den arteriellen Blutdruck durch Hemmung der Angiotensin II-Synthese im Plasma zu senken, weisen auf einen direkten Effekt auf die kardiale Angiotensin II-Synthese hin⁷¹.

Experimentell konnten die Vermutungen bestätigt werden, daß eine vermehrte Angiotensin II-Synthese nach mechanischer Dehnung des Myokards erfolgt und daß induziertes Vorhofflimmern mit einer substantiellen intraatrialen Druckzunahme verbunden ist¹³⁵. Auch die Proliferation von Fibroblasten und Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Myokard durch die direkte Wirkung von Angiotensin II (über Erks) ist bekannt¹³⁵.

Neben dieser Aktivierung der Erk-Kaskade liegen auch Hinweise auf weitere Signalwege (stress responsive kinases wie cJNK oder p38-MAPK) vor, über die möglicherweise parallel die Fibroseentstehung durch Angiotensin II potenziert werden kann¹³⁵. Auch erste Untersuchungen¹³⁷ der Regulation kardialer Angiotensin II-Rezeptoren bei chronischem Vorhofflimmern bestätigen die Beteiligung des ACE-Systems an der Fibroseentstehung.

Goette et al.¹³⁵ untersuchten Veränderungen von Erk 1 + 2 und ACE bei 43 Patienten mit paroxysmalem (PAF) und chronischem Vorhofflimmern (CAF), atrialer Dilatation und ausgeprägten fibrotischen Veränderungen an aus den rechtsatrialen Appendices stammendem Gewebe:

Bei PAF und CAF waren die phosphorylierten Erks signifikant erhöht und in etwa gleichem Maß bei beiden Formen vorhanden.

Die Erhöhung der Kinasen korrelierte nicht mit der Dauer des Vorhofflimmerns. Bei CAF lag zusätzlich eine signifikante ACE-Erhöhung vor. Die aktivierten Erk-

Formen konnten mit ACE-Hemmern reduziert werden. Diese Studie bestärkte so die Hypothese, daß fibrotische Veränderungen bereits in frühen Phasen des Vorhofflimmerns vorliegen (gleiche Erk-Menge bei PAF und CAF) und der persistierend erhöhte intraatriale Druck und die Vorhofdehnung bei CAF über vermehrte lokale ACE-Synthese und Angiotensin II zu permanent verstärkter Erk-Aktivierung und somit progressiver Fibrose führt.

7. Gap junctions

7.1. Connexin 43

Mit zunehmendem Wissen über die Bedeutung von Connexin (Cx) 43 gap junctions (GJ) für die geordnete und synchrone mechanische Funktion des Herzens wurde auch die Bedeutung von Veränderungen in der Connexinexpression oder -verteilung bei der Arrhythmieentstehung offensichtlich.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Menge und Verteilung von GJ und der interzellulären Leitung geht aus zahlreichen Untersuchungen über die allgemeine Funktion von GJ im Myokard, die fehlende Weiterleitung *in vitro* zwischen Zellen ohne GJ und das nur geringe Vorhandensein von GJ in Herzregionen mit langsamer Leitung hervor.

Die Untersuchungsergebnisse vieler Studien konnten zusammen mit Computermodellen belegen, daß eine Reduktion von Cx 43 und / oder eine Umverteilung von Cx 43 GJ zur verlangsamten Weiterleitung und Veränderung der normalen Gewebeanisotropie führt.

Veränderungen in der GJ-Verteilung treten sowohl als strukturelle Antwort des Myokards bei vielen Erkrankungen als auch während der postnatalen Entwicklung und im Alter auf.

Die eingehende Untersuchung postnatal stattfindender Umverteilung von Zellkontakten und die damit einhergehenden Änderungen der Gewebeanisotropie zeigt die Bedeutung der Cx 43 GJ-Verteilung für die normale uniforme anisotrope Weiterleitung.

Spach et al.⁸⁰ ermittelten im neonatalen Ventrikel gleiche Leitungsgeschwindigkeiten in transverser und longitudinaler Richtung, die wahrscheinlich auf die diffuse Verteilung der GJ während dieser Phase zurückzuführen sind. Anisotrope Weiterleitung trat dagegen erst mit zunehmender Zellgröße und überwiegender Lokalisation der GJ in Glanzstreifen auf.

Lichtenberg et al.¹³ sehen in der postnatalen Umverteilung von GJ ebenfalls einen der wesentlichen Faktoren für die Veränderung der anisotropen Eigenschaften während der Entwicklung und untersuchten die atriale Crista terminalis von neugeborenen, juvenilen und adulten Kaninchen im Alter von 3 Tagen bis 6 Monaten auf Veränderungen in der Cx 43 GJ-Verteilung und Anisotropie. Während der Phase der diffusen Cx 43-Verteilung bei Neugeborenen lag zwar uniforme, aber kaum anisotrope Leitung vor. Im Alter von 6-9 Wochen trat parallel zu der überwiegenden Cx 43 Lokalisation an den Zelltermini eine bereits erhöhte longitudinale Weiterleitungsgeschwindigkeit auf. Im adulten Myokard (4-6 Monate), war Cx 43 hauptsächlich an den Zellenden polarisiert und die Anisotropie deutlich ausgeprägt. Während dieser Entwicklung zeigten sich kaum Veränderungen im gesamten Cx 43-Gehalt, aber große Unterschiede in der sarkolemmalen Verteilung: Endständiges Cx 43 war 3,5 fach erhöht bei den adulten gegenüber den neonatalen Tieren, und gleichzeitig erhöhte sich die longitudinale Weiterleitung um das 2,4 fache. Die lateralen Cx 43 GJ und die transverse Leitungsgeschwindigkeit blieben fast unverändert, so daß die erhöhte Anisotropie in erster Linie durch die verbesserte longitudinale Weiterleitung zustande kommt.

Auch Peters et al.⁷⁴ beschreiben in ihrer Studie an humanem ventrikulärem Myokard eine deutliche Umverteilung der GJ während der Entwicklung und sehen in dieser, neben zunehmender Myozytengröße und Kollagengehalt, die Ursache für die veränderte longitudinale Leitungsgeschwindigkeit und die geringe Anisotropie des neonatalen Myokards.

Spach et al.¹¹⁶ übertrugen diese Resultate auf die Situation am alternden Myokard und konnten in einer anderen Studie zeigen, daß der Verlust lateraler Zellkontakte durch die Zunahme von Kollagen im Alter nicht uniforme Anisotropie verursacht. Auch Lichtenberg et al.¹³, Angst et al.⁸⁹ und Peters et al.⁷⁴ sehen in der Reduktion lateraler GJ, die sich im Alter fortsetzt, den Grund für verminderte transverse Leitungsgeschwindigkeit, somit erhöhte Anisotropie und das Auftreten von mikro-reentries.

Einen weiteren wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Beziehung zwischen Connexinexpression und Veränderungen der kardialen Leitungseigenschaften brachten Untersuchungen an Cx 43-defizienten Mäusen, deren Ergebnisse zwar teilweise variierten, übereinstimmend aber die Bedeutung von Cx 43 GJ für die koordinierte Impulsweiterleitung belegen konnten:

In einer Studie von Thomas et al.⁷⁸ wurde an Cx 43 +/- Mäusen sowohl die atriale als auch die ventrikuläre Leitungsgeschwindigkeit gemessen und neben Cx 43 auch Cx 40 quantitativ bestimmt. Während Cx 43 bei diesen Mäusen in Atrium und

Ventrikel um 50% reduziert war, war die Leitungsgeschwindigkeit nur im Ventrikel um ca. 38% verringert, im Atrium dagegen unverändert. Im EKG zeigte sich parallel dazu eine signifikant verlängerte QRS-Dauer bei unveränderter P-Wellen-Dauer und -Amplitude. Elektrophysiologische Parameter der Aktionspotentiale (AP) waren unverändert, histologische Unterschiede oder Veränderungen anderer Cx-Isoformen im Ventrikel nicht erkennbar.

Mit diesem Ergebnis konnte die bereits bestehende Auffassung^{55,64} über die unterschiedliche Bedeutung der verschiedenen Connexinisoformen in unterschiedlichen Geweben insofern bestätigt werden, daß Cx 43 das wesentliche GJ-Protein im Ventrikel ist, während im Atrium hauptsächlich Cx 40 die Leitungseigenschaften zu determinieren scheint.

Andere Studien an Cx 43-defizienten Mäusen befassen sich überwiegend nur mit Veränderungen der ventrikulären Weiterleitungsgeschwindigkeiten, lassen aber dennoch Rückschlüsse auf die möglichen Effekte verminderter Connexin 43-Expression auch im Atrium zu. Mit Hilfe dieser gendefekten Mäuse kann zumindest ein Einfluß von Gewebearchitektur und aktiven Ionen-Transportfunktionen, welche sich nicht vom Wildtyp unterscheiden, ausgeschlossen werden und proarrhythmogene Veränderungen der Anisotropie eindeutig auf vorhandene Connexin 43-Veränderungen zurückgeführt werden.

In einer Studie von Gutstein et al.⁷⁹ an homozygot defekten Cx 43 (-/-) Mäusen war Cx 43 im Ventrikel um 95% reduziert und die Weiterleitungsgeschwindigkeit in longitudinaler Richtung um 42%, transvers um 55% verringert. Auch hier scheint der GJ-Defekt für verminderte Leitungsgeschwindigkeit und die nach ca. zwei Monaten spontan entstehende Arrhythmie und den plötzlichen Herztod der Tiere verantwortlich zu sein. Ein wesentlicher Unterschied dieser Studie zu vergleichbaren anderen Untersuchungen an +/- Mäusen liegt in der postnatal zwar stark reduzierten, jedoch stattfindenden Impulsweiterleitung, die einen Hinweis darauf gibt, daß andere Connexin-Isoformen zumindest eine „low-level“-Weiterleitung übernehmen können, da Cx 43 bei diesen Mäusen nur in einzelnen, verstreuten Myozyten exprimiert war. Die Tiere in vergleichbaren Studien verstarben umgehend post partum, eventuell aufgrund eines nicht selektiv kardialen Cx 43-Defektes.

Ischämie-Reperfusion-Versuche von Lerner et al.⁷⁶ an Cx 43 +/- Mäusen verdeutlichten den Einfluß von verminderter Cx 43-Expression speziell unter ischämischen Bedingungen, da diese Cx 43 defizienten Mäuse doppelt so häufig ventrikuläre Tachykardien entwickelten wie normale Mäuse. Daraus wurde

geschlossen, daß reduzierte Kopplung durch Cx 43 die Entstehung ventrikulärer Tachyarrhythmien erleichtert sowie deren Inzidenz, Frequenz und Dauer erhöht.

Saffitz et al.¹⁶ untersuchten zusätzlich die Auswirkung von verminderter Cx-Expression auf GJ-Größe und Anzahl. Bei Cx 43 +/- Mäusen scheint die Anzahl der GJ vermindert, die mittlere Größe einzelner GJ dagegen unverändert. Dies spricht für eine adaptive Aufrechterhaltung einer im Ventrikel vorhandenen Subpopulation größerer GJ, erscheint für atriales Gewebe allerdings nicht weiter interpretierbar, da eine solche Subpopulation dort bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Viele Untersuchungen von Cx 43 bei verschiedenen, mit Arrhythmie assoziierten Herzerkrankungen am Menschen und im Tierversuch geben inkonsistente Ergebnisse, obwohl alle Veränderungen beschreiben.

Am ventrikulären Myokard werden Veränderungen in der Verteilung und Expression von Cx 43 v.a. bei Ischämie und Hypertrophie beschrieben, und verschiedene konfokale Untersuchungen belegen eine deutlich gestörte Cx 43-Verteilung und -Reduktion in der Infarkt „border zone“ und am hypertrophierten Herzen. Ischämie und Hypertrophie werden am Herzen mit Arrhythmie assoziiert, deren Entstehung durch abnormale Zellkopplung verursacht wird und zahlreiche diesbezügliche Untersuchungen stimmen in einer Reduktion von Connexin 43 als Ergebnis für das ventrikuläre Myokard überein:

Peters et al.¹⁰ beschrieben eine signifikante Reduktion der Cx 43 GJ-Fläche um 40% pro Zellvolumen mit einer gleichen Reduktion aller GJ-Größen bei ventrikulärer Ischämie und Hypertrophie.

Kaprielian et al.¹³⁸ fanden in linksventrikulären Biopsien von Bypass-Patienten Cx 43 in reversibel ischämischen Segmenten um 23%, in sogenanntem hibernating Gewebe um 33% gegenüber dem Kontrollgewebe vermindert.

In Herzen im Endstadium einer ischämischen bzw. idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie, die explantiert wurden waren sowohl Cx 43-mRNA als auch -Protein vermindert¹²⁴. Lerner et al.¹³⁹ beschrieben eine signifikant verminderte Cx 43-Expression während akuter Abstoßungsreaktionen, die sich zudem als reversibel erwies.

Auch bei der häufig mit Arrhythmie verbundenen Chagas Krankheit war Cx 43 in *in vitro* mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Kardiomyozyten reduziert^{11,48}.

Am Modell der kongestiven Kardiomyopathie beim Meerschweinchen war Cx 43 im Ventrikel um 37% reduziert, während bei kompensierter Hypertrophie keine Veränderungen auftraten⁵³. Auch am ventrikulären Rattenmyokard wurde nach Infarkt eine temporär reduzierte und abnorme Cx 43-Expression beschrieben¹⁴⁰.

Bei Ratten mit rechts-ventrikulärer Hypertrophie aufgrund induzierter pulmonaler Hypertonie trat eine Reduktion der GJ-Fläche pro ID um 35% sowie eine um 30% verminderte longitudinale Leitungsgeschwindigkeit auf. Gleichzeitig erfolgte eine Umverteilung von Cx 43 an die lateralen Zellgrenzen bei unveränderter Gesamt-Cx 43-Menge und unveränderter transversaler Leitungsgeschwindigkeit. Die Autoren folgerten daraus, daß die Umverteilung der GJ für die verminderte Anisotropie verantwortlich war, aber auch die Zunahme der Zellgröße um 55% muß in diesem Fall berücksichtigt werden ⁵³.

Eine Umverteilung von Cx 43 GJ an die lateralen Zellgrenzen scheint bei einer Vielzahl von Herzerkrankungen stattzufinden.

Peters et al. ¹² beschreiben innerhalb der Infarkt „border zone“ beim Hund hauptsächlich lateral zwischen degenerierenden Myozyten lokalisierte Cx 43 GJ mit longitudinaler Orientierung und sehen in dieser Lateralisierung eine Verbesserung der transversen Weiterleitung, eventuell als Kompensation metabolischer Prozesse. Gleichzeitig wies diese Studie erstmalig – neben Computersimulationen – den direkten Zusammenhang zwischen Störungen in der GJ-Verteilung und der Lokalisation von reentry-Kreisläufen an Stellen wo diese Verteilungsstörung die gesamte Wanddicke des Myokards umfaßte auf.

Luke et al. ^{21,141} beschreiben demgegenüber in der caninen Infarkt „border zone“ eine Reduktion v.a. einer Subpopulation großer Cx 43 GJ an seitlichen Myozytenverzweigungen und betrachten diese Reduktion als Ursache für verschlechterte transverse Leitung und erhöhte Anisotropie.

Auch bei hypertropher Kardiomyopathie wurde eine Zunahme der lateralen Verbindungen beschrieben ⁵³.

Inwieweit die Lateralisierung von Cx 43 GJ die Impulsweiterleitung beeinflußt, ist allerdings nicht immer eindeutig; anhand ventrikulärer Rattenkardiomyozyten aus der „border zone“ eines verheilten Infarktes sowie bei ventrikulärer Hypertrophie wurde nachgewiesen, daß viele der lateral umverteilten GJ an Einstülpungen der Zellmembran zum Zellinneren lokalisiert sind und somit nicht zur Zellkommunikation beitragen ⁵³.

Neben der beschriebenen Reduktion und Umverteilung existieren aber auch Beispiele für erhöhte Cx 43-Expression im ventrikulären Myokard:

Ergebnisse verschiedener *in vivo* oder *in vitro*-Experimente zeigten, daß akute Hypertrophie generell zunächst mit vermehrter Cx -Expression einhergeht.

So wiesen Saffitz et al. ⁷² an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten einen zweifachen Anstieg von Cx 43 und erhöhte Anzahl von GJ nach 24 stündiger cAMP-Exposition nach. Diese Veränderungen waren von einer deutlichen Zunahme der

Leitungsgeschwindigkeit begleitet, während die Erregbarkeit einzelner Zellen unverändert blieb, so daß die schnellere Leitung auf verstärkte interzelluläre Verbindung zurückzuführen war. Bei einer noch kompensierten Hypertrophie kommt es zunächst zur verstärkten Cx-Expression während im Stadium der Dekompensation verminderte Cx-Expression und Zellentkopplung auftritt⁷².

Bei renaler Hypertonie, mit⁷² oder ohne¹¹ zelluläre Hypertrophie, beim Meerschweinchen wurde im akuten Stadium ebenfalls eine um 45% pro Zelle und 30% pro Gewebevolumen vermehrte Cx 43-Expression nachgewiesen, und auch in der glatten Muskulatur arteriosklerotischer Gefäße kommt es zu einer Zunahme von Cx 43¹⁴².

Gesteigerte Cx 43-Expression scheint allgemein einen adaptiven frühen Mechanismus einer akuten Reaktion geschädigter Zellen darzustellen wogegen verminderte Cx 43-Expression generell eher bei chronischen Erkrankungen ventrikulären Myokards auftritt²¹.

Während für ventrikuläres Myokard noch relativ gute Übereinstimmung und Interpretierbarkeit der Ergebnisse vorliegt, wird die Situation im Atrium durch Koexpression zweier Connexinisoformen zusätzlich verkompliziert und läßt sich so wahrscheinlich nur bedingt mit pathologischen Situationen im Ventrikel vergleichen.

Zudem liegen zumindest in quantitativer Hinsicht kaum übereinstimmende Ergebnisse für die Connexinverteilung im Atrium vor, und selbst die normale Anordnung von gap junctions wird, wenn auch speziesabhängig, differierend beschrieben.

An Stelle der im Ventrikel überwiegend bei chronischen Erkrankungen auftretenden Reduktion von Cx 43, werden im Atrium hauptsächlich Umverteilung von Cx 43 GJ und z.T. erhöhte Cx 43-Expression beschrieben. Im Vergleich zu den am Ventrikel durchgeführten Studien läßt sich dies eventuell damit erklären, daß im Zusammenhang mit atrialer Arrhythmie überwiegend akute Veränderungen untersucht wurden und sich nur wenige Studien mit der Veränderung von Cx 43 bei wirklich chronischem Vorhofflimmern beschäftigen.

Dupont et al.¹⁹ untersuchten die rechten Herzohren von Bypasspatienten, bei denen post operativ z.T. Vorhofflimmern auftrat. Generell tritt Vorhofflimmern, assoziiert mit einer sterilen, OP-bedingten Perikarditis, bei bis zu 40% der Patienten nach Kardio-Thorax-Chirurgie auf. Diese Untersuchung ergab keine quantitativen Unterschiede von Cx 43 in Geweben von Patienten mit

Vorhofflimmern post OP und Geweben von Patienten mit Sinusrhythmus post OP, aber deutliche Unterschiede in der Cx 40-Expression.

Experimente mit induziertem Vorhofflimmern bei Ziegen^{2,30} ergaben ebenfalls keine quantitativen Veränderungen für Cx 43 (-mRNA und -Protein). Van der Velden et al.² beschrieben neben veränderter Leitungsgeschwindigkeit im Atrium der Ziegen eine verstärkt laterale Anordnung von Cx 43, Ausma et al.³⁰ dagegen eine unveränderte Lokalisation im Bereich des ID, wenn auch mit mehr disperser Verteilung.

Elvan et al.¹³⁴ induzierten bei Hunden Vorhofflimmern, allerdings für den relativ geringen Zeitraum von 10-14 Wochen und beschrieben nach konfokaler Quantifizierung vermehrt Cx 43 gegenüber Hunden mit Sinusrhythmus und eine zunehmende Lateralisierung der GJ.

Weitere grundsätzlich vergleichbare Studien an Hunden^{37,69,129} beschränkten sich auf morphologische Untersuchungen und nahmen keine immunhistochemische Darstellung der GJ-Proteine vor.

Das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit zeigt zwei wesentliche Veränderungen der Cx 43 GJ bei chronischem Vorhofflimmern:

- 1) Cx 43 war im Gewebe der Maze-Patienten um 58 % (RAA) bzw. um 40 % (RFW) reduziert.
- 2) Im Gewebe der Maze-Patienten lag ein deutliches remodeling von Cx 43 GJ vor.

Beide Veränderungen treten unabhängig von bestehenden Grunderkrankungen oder klinischen Parametern sowohl in Atrium- als auch in Appendixgewebe der Maze-Patienten, nicht aber bei Sinusrhythmus und ähnlichen Grunderkrankungen auf und zeigen deutliche Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Veränderungen von Cx 43 bei ebenfalls chronischen, mit Arrhythmie assoziierten Erkrankungen ventrikulären Myokards.

Somit kann hier eindeutig ein bestehender Zusammenhang zwischen Veränderungen von Cx 43 GJ und chronischem Vorhofflimmern bestätigt werden.

Die quantitativ signifikant reduzierte Cx 43-Expression und die damit verbundene verminderte Zellkopplung resultiert in ventrikulärem Myokard in verlangsamter Weiterleitung und erhöht die Diversität der Aktionspotentialdauer. Durch diese lokale Inhomogenität wird die anisotrope Leitung nicht-uniform verändert. Manche Autoren sehen den Mechanismus, durch den verminderte Zellkopplung prädisponierend für Arrhythmien wirkt auch im Zusammenhang mit den Aktionspotentialcharakteristika individueller Myozyten: Humane und canine

Myozyten haben, wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Kaliumkanal-Eigenschaften, sowohl in normalem als auch in erkranktem Ventrikelmyokard, Unterschiede in der Dauer der Aktionspotentiale innerhalb verschiedener Regionen gezeigt¹³⁸. Diese Unterschiede können mittels entsprechender Zellkopplung durch Modulation der Aktionspotentialdauer zum Erreichen einer homogenen Depolarisation *in vivo* maskiert werden, wohingegen eine Reduktion der interzellulären Verbindung die Inhomogenität der Leitung wieder hervortreten läßt^{10,138}.

Prinzipiell sind diese Mechanismen sicher auch entsprechend auf atriales Myokard anwendbar. Da aber aus den Ergebnissen verschiedener Studien Hinweise dafür vorliegen, daß das im Atrium vorhandene Cx 40 die beeinträchtigte Funktion reduzierter Cx 43 GJ ersetzen kann, ist bei chronischem Vorhofflimmern eine weitere Differenzierung notwendig.

Unter der Voraussetzung einer normalen Expression und Verteilung von Cx 40, muß die Reduktion von Cx 43 nicht zwingend auch im Atrium in verlangsamter Weiterleitung resultieren, sondern wird die anisotropen Eigenschaften des Gewebes möglicherweise nur in geringem Ausmaß verändern. Bei den im Gewebe der hier untersuchten Maze-Patienten gleichzeitig bestehenden Veränderungen der Cx 40 GJ sind dagegen komplexe, eventuell auch additive Auswirkungen, die dann zu ähnlich verlangsamter und heterogener Weiterleitung wie in ventrikulärem Myokard führen können, wahrscheinlich.

Derzeit ist zu wenig über die komplexe Regulation der Connexinexpression unter normalen und pathologischen Bedingungen bekannt, um eine definitive Aussage über die primäre Ursache der Connexinreduktion treffen zu können.

Die überwiegend einheitlich bestätigte verminderte Cx-Expression unter ischämischen Bedingungen gibt Hinweise darauf, daß es sich eventuell auch bei chronischem Vorhofflimmern um einen metabolisch defizitären Zustand handelt. Die im Gewebe der Maze-Patienten zumindest lokal stark ausgeprägten ultrastrukturellen Veränderungen können als bestätigende Anzeichen dafür und als eventuell unterstützende Faktoren interpretiert werden, erscheinen insgesamt allerdings zu geringfügig, um als primär ursächlich für die Reduktion von Cx 43 angesehen zu werden.

Eine weitere mögliche Ursache der Connexinreduktion stellt die bereits unter Kapitel V.6. beschriebene Aktivierung des kardialen Renin-Angiotensin-Systems bei chronischem Vorhofflimmern dar. Neben der erwähnten Aktivierung von Mechanismen, die fibrotische Veränderungen auslösen bewirkt Angiotensin II in adulten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte auch eine Verminderung und

Umverteilung von GJ⁷¹. Diese Wirkung, die wahrscheinlich auf veränderter Cx-Phosphorylierung durch Protein-Kinasen beruht, konnte mit Enalapril (ACE-Hemmer) verhindert werden.

In experimentellen Untersuchungen an Hamstern wurde im Zusammenhang mit einer erhöhten ACE-Aktivität bei Kardiomyopathie auch eine Zellentkopplung und verminderte zelluläre Kommunikation durch Angiotensin I und II nachgewiesen, die ebenfalls mit ACE-Inhibitoren antagonisiert werden konnte¹³⁶.

Eine Reduktion von GJ könnte daneben eventuell auch noch in entferntem Zusammenhang mit den, bei der ultrastrukturellen Untersuchung beschriebenen, verminderten atrialen Granula im Gewebe der Maze-Patienten stehen. Diese Granula enthalten den atrialen natriuretischen Faktor / Peptid (ANF / ANP), der u.a. an der hormonalen Kontrolle des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes durch forcierte Natriuresis und Diuresis beteiligt ist. Erhöhte Vorhofdehnung bewirkt die Ausschüttung von ANF und könnte die im Gewebe der Maze-Patienten verminderte Anzahl atrialer Granula erklären. Es ist bekannt, daß der Plasmaspiegel von ANF bei atrialen Tachyarrhythmien ansteigt³⁹. Unklar dagegen ist derzeit, ob die noch nicht genau untersuchten elektrophysiologischen Effekte von ANF auf direkten Veränderungen von Ionenkanälen am Herzen (ANF scheint zu verminderter Ca²⁺ und K⁺-Spannung zu führen) oder auf einem indirekten Einfluß des autonomen Nervensystems beruhen³⁹. De Mello et al.⁷¹ beschrieben in diesem Zusammenhang auch eine Verminderung von GJ durch ANF bei kardiomyopathischen Hamstern, so daß dieser Aspekt auch bei chronischem Vorhofflimmern zumindest hypothetisch in Betracht gezogen werden kann.

Hinsichtlich der Umverteilung war bei den Maze-Patienten sowohl eine extreme Lateralisierung, ähnlich der am ventrikulären Myokard bei Ischämie innerhalb der Infarkt „border zone“ von Peters^{12,23}, Smith et al.¹⁸ u.a. Beschriebenen, als auch eine diffuse Verteilung über die gesamte Zelloberfläche, ähnlich der des neonatalen bzw. juvenilen Gewebes, auffallend.

Beide Verteilungsmuster können nachhaltig die normale Anisotropie des atrialen Myokards verändern.

Die neonatale / juvenile Verteilung, bei der nur wenige GJ in einzelnen IDs organisiert sind, führt zur starken Reduktion der Anisotropie. Die Zunahme lateraler Verbindungen verbessert die transverse Weiterleitung gegenüber der reduzierten longitudinalen und führt so ebenfalls zur verminderten Anisotropie.

Das Ergebnis anderer Untersuchungen, daß es sich bei den lateralen Zellkontakten überwiegend um anulare GJ handelt⁵³, die somit einer Reduktion lateraler Zellverbindungen gleichzusetzen wäre, konnte in der vorliegenden Studie nicht

bestätigt werden. Zu der immunhistochemisch stark ausgeprägten Lateralisierung von Cx 43 tragen im Gewebe der Maze-Patienten sowohl intakte, funktionelle GJ-Membranen als auch anulare Strukturen bei.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse im Ultradünnschnitt, eine beträchtliche Anzahl intakter lateraler Glanzstreifen wie auch isolierter lateraler gap junctions. Daher ist davon auszugehen, daß es sich zumindest bei einigen dieser lateralen Zellkontakte um funktionstüchtige GJ-Kanäle handelt, die den oben beschriebenen Einfluß auf die Anisotropie ausüben können. Daneben waren aber auch zahlreiche anulare GJ im Gewebe der Maze-Patienten vorhanden.

Anulare oder vesikuläre, GJ beinhaltende Strukturen werden häufig in degenerierenden Myozyten in Assoziation mit Fibrose oder in ischämischem Gewebe bei verschiedenen Herzerkrankungen¹⁸ sowie auch während des postnatal stattfindenden remodelings^{74,89} beschrieben und als via Endocytose internalisierte GJ-Membranen angesehen, die dem intrazellulären Abbau unterliegen^{48,73}. Auch wenn es sich bei diesen anularen Strukturen teilweise um artifizielle in der Schnittebene liegende, stark gewundene, undulierende Membranabschnitte des IDs^{74,143} handeln könnte, läßt die in dieser Arbeit vorgefundene meist vollständig intrazelluläre Lokalisation eher eine Internalisierung vermuten und weist auf einen GJ-Abbau hin.

Da keine elektronenmikroskopische Quantifizierung vorgenommen wurde, war ein präferentieller Abbau entweder lateraler oder endständiger Zellkontakte hier nicht erkennbar.

Anulare GJ traten im Gewebe der Maze-Patienten sowohl in der Nähe intakter endständiger IDs, als auch an den lateralen Zellgrenzen intakter oder degenerierter Myozyten auf. Bei den ebenfalls häufig an den lateralen Zellmembranen zum angrenzenden Extrazellularraum auftretenden anularen GJ-Membranen handelt es sich vermutlich um die oft deplaziert von ihrer normalen Lokalisation vorhandenen GJ, die in unmittelbarer Nähe zum Extrazellularraum keine Funktion mehr erfüllen können. Diese nicht mehr länger ausschließlich in der Nähe der stabilisierenden Adhärenzverbindungen lokalisierten, isolierten „Non disc-GJ“, werden eventuell vermehrt verletzbar durch Zugkräfte der extrazellulären Matrix und daher selektiv internalisiert.

Ein weiteres auffallendes Phänomen waren die oft an Stellen, wo der ID die lateralen Zellmembranen erreicht, unter den überlappenden Fortsätzen des Sarkolemm auftretenden GJ. Diese erklären den relativ häufigen immunhistochemischen, paradox erscheinenden Befund, daß eine intensive Cx 43-Markierung in unmittelbarer Nähe zum angrenzenden Bindegewebe sichtbar war

und stellten meist ausgeprägte GJ-Membranen an Zellfortsätzen zwischen benachbarten Myozyten dar, die aufgrund der zu geringen Auflösung im Fluoreszenzmikroskop nicht erkennbar waren.

Die der ausgeprägten Umverteilung der GJ bei Vorhofflimmern zugrunde liegenden Mechanismen sind unbekannt.

Eine sehr detaillierte elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung von Kostin et al.¹⁵ belegte die Reproduzierbarkeit der charakteristischen *in vivo* GJ-Unterschiede zwischen adultem atrialen und ventrikulären Rattenmyokard im ARC-Modell und konnte somit eine grundsätzlich intrinsische Regulation der gewebespezifischen GJ-Verteilung nachweisen. Unter nicht mehr physiologischen Verhältnissen sind daneben aber auch zahlreiche extrinsische Faktoren zu berücksichtigen.

Die Lateralisierung der GJ kann zum einen eine Kompensation der veränderten Anisotropie aufgrund der verminderten Cx-Expression, zum anderen aber v.a. eine Kompensation der lateralen Zellentkopplung aufgrund der hochgradigen Fibrose darstellen. Da bereits die normale altersbedingte Reduktion lateraler Zellkontakte durch Fibrose zu nicht uniformer Anisotropie führt, erscheint eine kompensatorische Umverteilung von GJ an die lateralen Zellgrenzen zum Ausgleich einer beeinträchtigten transversen Leitung, in Übereinstimmung mit der Theorie von Spach et al.¹⁴⁴ und anderen, als geeignet, um die Entstehung von reentry-Kreisläufen zu verhindern.

Desweiteren ist auch die Kompensation metabolischer Prozesse denkbar, da *in vitro* Untersuchungen zeigen konnten, daß Hypoxie, Azidose sowie erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zur Entkopplung v.a. lateraler GJ¹² und zur verminderten transversen Weiterleitung führen und die elektronenmikroskopischen Befunde der hier vorliegenden Studie zumindest in einigen Bereichen der Gewebe Anzeichen für eine ischämische Zellschädigung ergaben.

Auch durch Angiotensin II ausgelöste, Erk vermittelte Zell(de)differenzierungsprozesse stellen wiederum eine weitere mögliche Ursache der Cx - Umverteilung dar. Das Einsetzen möglicher Dedifferenzierungsvorgänge bei Vorhofflimmern wurde bereits von Ausma et al.³⁰ diskutiert, die einen embryonalen Phänotyp der Kardiomyozyten als wesentliche Folge von induziertem Vorhofflimmern bei adulten Ziegen beschrieben. In diesen Zellen wurde immunhistochemisch u.a. eines der für embryonales Myokard spezifischen Proteine (α -smooth muscle actin) nachgewiesen, während ein erst postnatal vorhandenes Protein (Cardiotin) fehlte und Titin eine embryonalen Zellen entsprechende Anfärbung zeigte. Die Ursache dieser

Veränderungen wurde von den Autoren in der verminderten Kontraktion der Myofibrillen bei Vorhofflimmern vermutet.

Grundsätzlich kann sowohl die Lateralisierung als auch die diffuse Umverteilung von GJ, zumindest auf zellulärer Ebene, als kompensatorische Reaktion beeinträchtigter Myozyten, auf das Vorhofflimmern selbst oder auf die diesem zugrundeliegenden initialen Ursachen angesehen werden. Andererseits kann dieses zunächst kompensatorische remodeling auf multizellulärer Ebene auch lokale Leitungsstörungen hervorrufen, die Arrhythmogenität des Gewebes durch Inhomogenität der Leitung erhöhen und so zur Aufrechterhaltung der Arrhythmie beitragen.

7.2. Connexin 40

Über die offensichtlich sehr speziesabhängige „normale“ Expression von Cx 40 in unterschiedlichen kardialen Geweben existieren kontroverse Ergebnisse, die sich aber zumindest teilweise durch technische Schwierigkeiten bei der Gewebefixierung, Affinität oder Spezifität der verschiedenen Antikörper bei unterschiedlichen Tierarten erklären lassen⁶⁵. Die verschiedenen Auffassungen über die spezifische biologische Funktion dieser Connexinisoform unter physiologischen Bedingungen und v.a. auch bei der Arrhythmieentstehung bleiben jedoch weiter umstritten.

Cx 40-Kanäle weisen insgesamt die schnellste einheitliche Weiterleitungsgeschwindigkeit (200 pS) und den geringsten Widerstand innerhalb aller bekannten Connexinisoformen auf.

Daher wird die im Vergleich zum ventrikulären Arbeitsmyokard extrem schnelle und anisotrope Weiterleitung in Atrium oder Purkinjefasern auf die in diesen Geweben verstärkt oder exklusiv vorhandenen Cx 40 GJ zurückgeführt^{11,48,54,60,67}. Daneben wurde Cx 40 aber auch in Geweben mit nur geringer Weiterleitungsgeschwindigkeit wie Sinus- und AV-Knoten nachgewiesen^{17,65}. Als mögliche Erklärung für diese zunächst paradox erscheinende Proteinverteilung wurden diverse andere komplexe Zusammenhänge, die zu den verschiedenen Gewebeeigenschaften in unterschiedlichen Regionen beitragen können angeführt. So könnten z.B. in den unterschiedlichen Geweben ebenfalls Unterschiede in der (De-)Phosphorylierung oder der Regulation des Öffnungszustandes der Cx 40-Kanäle sowie in Anzahl und Größe der GJ vorhanden sein oder auch andere Faktoren wie z.B. die unterschiedliche Zellform, die anisotropen Eigenschaften entscheidend beeinflussen^{17,65}. In Sinus- und AV-Knoten liegt Cx 40 in Form weniger und kleinerer GJ als beispielsweise im Atrium vor^{10,17}, und Gourdie et al.⁶³

konnten, zumindest am Rattenherzen, eine hundertfache Zunahme der Connexin-40-Menge vom AV-Knoten bis zu den Purkinjefasern in Übereinstimmung mit den unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten innerhalb der reizweiterleitenden Gewebe nachweisen.

Neben der schnellen Leitungsgeschwindigkeit wird die Funktion der Cx 40-Expression in bestimmten Herzregionen auch verstärkt in der Separation von Geweben mit unterschiedlichen Leitungseigenschaften (Knoten- oder Leitungsgewebe vom Arbeitsmyokard) aufgrund der (In-)Kompatibilität bestimmter Connexinisoformen gesehen^{17,63}, die eine schnelle bzw. gezielte Weiterleitung der Aktionspotentiale in distaler Richtung gewährleistet⁵³.

Die Anzahl der Studien, die Cx 40 mit Herzerkrankungen und Arrhythmien in Verbindung bringen, ist ungleich geringer, wahrscheinlich bedingt durch die spezifische Expression in Atrium und reizleitendem Gewebe.

Die im Zusammenhang mit Cx 43 unter Kapitel V.7.1. bereits erwähnte Studie von Thomas et al.⁷⁸ an isolierten Herzen von Cx 43 +/- Mäusen, deren Ergebnis zwar eine um 38% verringerte Leitungsgeschwindigkeit im Ventrikel, aber unveränderte Leitungsgeschwindigkeit im Atrium und unveränderte atriale EKG-Parameter darstellte, zeigt das mögliche Ausmaß der Bedeutung von Cx 40 gegenüber Cx 43 für die Aufrechterhaltung normaler Impulsweiterleitung unter pathologischen Bedingungen im Atrium⁵⁵.

Auch andere Untersuchungen an transgenen Tieren gaben Hinweise darauf, daß Cx 40 zumindest pränatal Cx 43 ersetzen kann^{58,60}.

Mausmodelle mit selektivem Cx 40 knock out zeigten dagegen eine deutlich (30%) verlangsamte Leitung in Atrium⁵⁶ und ventrikulärem Leitungssystem⁷⁵, partiellen AV-Block und teilweise Arrhythmie⁶⁰ und bestätigten so die wesentliche Funktion von Cx 40 GJ im Atrium.

Ansonsten werden im Zusammenhang mit atrialen Arrhythmien meist erhöhte Cx 40-Expression sowie veränderte Verteilung beschrieben – allerdings mit ebenfalls kontroversen Ergebnissen:

Van der Velden et al.^{2,56} stellten nach induziertem Vorhofflimmern bei Ziegen zwar weder Veränderungen von Cx 43 noch Cx 40 (mRNA und Protein) fest, beschrieben aber eine heterogene Anfärbung von Cx 40 GJ. Neben ähnlich homogen wie für Cx 43 angefärbten Bereichen, lagen nach Vorhofflimmern in ca. 25% der untersuchten Gewebefläche auch 0,15-0,6 mm große schwach gefärbte Areale bei unveränderter Cx 40 mRNA vor.

Van der Velden et al.^{2,56} sahen diese Heterogenität – trotz unveränderter atrialer Leitungsgeschwindigkeit – als mögliche Ursache für die Entstehung von

Weiterleitungsheterogenitäten an, die aufgrund technischer Limitationen nicht nachweisbar waren.

Eine ähnliche Inhomogenität der Cx 40-Färbung beschrieben Dupont et al.¹⁹ bei der Untersuchung der Herzohren von Bypass-Patienten. Allerdings wurden diese schwach gefärbten Areale, sowohl im Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern post OP als auch bei Sinussrhythmus post OP, im gesamten Myokard nachgewiesen. Somit bleibt unklar, ob es sich um eine normale Verteilung oder die Konsequenz eines physiologischen oder pathologischen Prozesses handelt. Zusätzlich ergab dieselbe Untersuchung von Dupont et al.¹⁹ aber eine Erhöhung der Cx 40 mRNA um 50% und eine signifikante Erhöhung von Cx 40-Protein bei Patienten, die post OP Vorhofflimmern entwickelten, während für Cx 43 keine Unterschiede nachweisbar waren.

Ebenfalls Dupont et al.¹²⁴ beschrieben im Rahmen einer weiteren Studie eine Erhöhung von Cx 40 (mRNA und Protein) im ventrikulären Myokard (Gefäßendothel und endokardial assoziiert mit Purkinjefasern) von Patienten im Endstadium ischämischer Kardiomyopathie nicht aber bei idiopathischer DCM, während Cx 43 bei beiden Erkrankungen reduziert war.

Bastide et al.⁶⁶ beschrieben im ventrikulären Rattenmyokard, kontrovers zu anderen Untersuchungen, die Kollokalisierung von Cx 40 und 43, fanden bei Hypertonie eine 3,1 fach erhöhte Cx 40-Expression bei gleichzeitig 3,3 fach verminderter Cx 43-Expression und betrachteten den Cx 40 Anstieg als logische Kompensation der Cx 43-Abnahme.

Am Hypertonie induzierten hypertrophen Rattenherzen wurde ebenfalls eine erhöhte Cx 40-Expression in Purkinjefasern^{21,64} und im Arbeitsmyokard¹¹ beschrieben, während im ventrikulären Myokard von Ratten nach Infarkt Cx 40 unverändert war⁴⁸.

Das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit zeigt zwei wesentliche Veränderungen der Cx 40 GJ bei chronischem Vorhofflimmern:

- 1) Cx 40 war im Appendixgewebe der Maze-Patienten um 35% reduziert während im Atrium eine tendenzielle Zunahme von Cx 40 vorlag.
- 2) Im Gewebe der Maze-Patienten lag ein deutliches, mit Cx 43 kollokalisiertes, remodeling von Cx 40 GJ vor.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Untersuchungen nur bedingt überein. Die Unterschiede sind wiederum durch den limitierenden zeitlichen Faktor im Tierexperiment bzw. bei akutem Vorhofflimmern post OP erklärbar.

Vermutlich ist die verstärkte Cx 40-Expression bei den beschriebenen (sub-) akuten Prozessen parallel zu einem akuten Anstieg der Cx 43-Expression zu sehen und als generelle adaptive Reaktion des Myokards an akute Schädigung zu bewerten. Demzufolge ist anzunehmen, daß ähnlich wie bei Cx 43 im Verlauf chronischer Erkrankungen ebenfalls eine Reduktion auch der Cx 40 Expression eintritt.

Die von Van der Velden et al.^{2,56} und Dupont et al.¹⁹ beschriebene Inhomogenität der Cx 40-Färbung konnte weder bei der Untersuchung von Gewebe der Maze-Patienten noch für Kontrollgewebe bestätigt werden. Stattdessen lag im Gewebe der Maze-Patienten eine erhöhte Inhomogenität der Cx 40-Verteilung im Sinne einer unterschiedlichen Expression in den unterschiedlichen atrialen Geweben vor.

Die der Cx 40 Reduktion zugrundeliegenden möglichen Ursachen stimmen wahrscheinlich mit den für die Cx 43 Reduktion diskutierten Ursachen überein, sind aber zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls nicht abschließend zu erklären. Über die Regulation der Expression von Connexin 40 ist selbst unter physiologischen Bedingungen nahezu nichts bekannt. Die in der vorliegenden Untersuchung beschriebene bestehende Korrelation zwischen der Menge von Cx 40 und 43 bei Sinusrhythmus und deren Fehlen bei chronischem Vorhofflimmern deutet darauf hin, daß in „fibrillierenden“ Myozyten eine separate Regulation der beiden Connexinisoformen erfolgt.

Eine erhöhte Cx 40-Expression bei bereits verminderter Cx 43-Expression erscheint als sinnvolle Kompensation der verminderten Zellkopplung durch eine schnellere Weiterleitung. Eine Reduktion beider Isoformen hat demgegenüber eher dekompensatorischen Charakter.

Unter Vernachlässigung der bisher noch nicht bekannten Bedeutung des Phosphorylierungszustandes von Cx 40 ist davon auszugehen, daß eine Reduktion dieser schnell leitenden Kanäle in einem, im Vergleich zu den beschriebenen Veränderungen der Cx 43 GJ, noch stärker erhöhten intrazellulären Widerstand und eine Lateralisierung in einer verbesserten und schnelleren transversen Leitungsgeschwindigkeit und Veränderung der Anisotropie resultiert.

Auf multizellulärer Ebene kann die Umverteilung von Cx 40 und die inhomogene Expression in verschiedenen atrialen Regionen aber auch, ähnlich wie die Umverteilung von Cx 43, zur Entstehung von lokalen Leitungsstörungen und reentry-Kreisläufen beitragen.

8. N-Cadherin

Die wesentliche Funktion von N-Cadherin hinsichtlich der Formation von GJ innerhalb des IDs konnte, wie in Kapitel II. 3.4. beschrieben, durch viele diesbezügliche Studien übereinstimmend bestätigt werden.

Die Bedeutung von N-Cadherin bei der Arrhythmieentstehung wurde bislang nur marginal untersucht, und über quantitative oder qualitative Veränderungen der Adhärenzverbindungen bei Vorhofflimmern liegen kaum Literaturangaben vor.

Ausma et al.³⁰ untersuchten in einem ihrer Ziegenmodelle neben Cx 43 auch N-Cadherin, konnten aber keinerlei Veränderungen bei Vorhofflimmern feststellen.

Eine Untersuchung von Saffitz et al.¹⁶ an Cx 43 +/- Mäusen mit um 50% verringerter Cx 43-Menge und verminderter GJ-Anzahl, aber ultrastrukturell normaler Anzahl und Größe der f. adherentes zeigte, daß verminderte elektrische Kopplung der Kardiomyozyten keinen Einfluß auf die mechanische Kopplung zu haben scheint. Umgekehrt hätte eine reduzierte mechanische Kopplung wahrscheinlich aber eine verminderte elektrische Kopplung zur Folge, da die Anwesenheit der Adhärenzverbindungen im ID essentiell für die mechanische Annäherung und Verbindung benachbarter Zellmembranen und den nachfolgenden Einbau und die Stabilität von GJ ist.

Die quantitative Beurteilung von N-Cadherin in der vorliegenden Arbeit ergab keinen Unterschied zwischen Vorhofflimmern und Sinusrhythmus. Qualitativ fiel immunhistochemisch besonders die deutliche Umverteilung von N-Cadherin an die lateralen Zellgrenzen auf. Diese Umverteilung stellt eine der Voraussetzungen für die Funktion der dort lokalisierten GJ dar, und an Stellen, wo GJ isoliert von Adhärenzverbindungen vorlagen, traten mehr anulare GJ auf. Erweiterte Adhärenzverbindungen sowie andere Veränderungen wie irreguläre, stark gewundene IDs oder erweiterte unspezialisierte Membranregionen, die auch im Gewebe der Maze-Patienten vorhanden waren, werden auch in anderen morphologischen Untersuchungen mit Arrhythmien beschrieben^{51,52,128,130} und sind eher im Zusammenhang mit der atrialen Dilatation und den gefundenen degenerativen Veränderungen sowie der teilweise gestörten Myofibrillenordnung zu interpretieren. Ein weiterer häufiger Befund waren die immer wieder im Gewebe der Maze-Patienten auffallenden Ansammlungen abnormen elektronendichten Materials, die in anderen ultrastrukturellen Untersuchungen übereinstimmend als abnormes Z-Band-Material beschrieben wurden^{51,52,130}. Unter Berücksichtigung der immunhistochemischen N-Cadherinverteilung und der häufigen Lokalisation dieser elektronendichten Strukturen an den lateralen

Zellgrenzen, sind diese zumindest zum Teil als umverteilte fasciae adherentes zu bewerten.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene gleichzeitige Lateralisierung aller Arten der Zellverbindung bestätigt die Hypothese, daß eine Umverteilung mechanischer Zellkontakte die Voraussetzung für ein remodeling von GJ darstellt.

Die auch bei Vorhofflimmern noch erhaltene Korrelation zwischen der N-Cadherin-Menge und der Summe beider Cx -Isoformen spricht nicht nur für die Reversibilität der beschriebenen Veränderungen, sondern läßt auch vermuten, daß die unveränderte N-Cadherin-Menge der Aufrechterhaltung einer ausreichenden Cx-Menge dient.

9. Klinische Relevanz

Die hohe Prävalenz von Vorhofflimmern bei Mensch und Tier sowie die mit dieser Erkrankung assoziierten u.U. letalen Risiken machen eine adäquate kausale Therapie und Prophylaxe bei bestehenden prädisponierenden Faktoren dringend erforderlich.

Alle bis heute zur Verfügung stehenden pharmakologischen Therapiemöglichkeiten können, sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin, jedoch häufig nur begrenzten Behandlungserfolg gewährleisten.

Bei gleichzeitig bestehender Herzinsuffizienz oder vor der Anwendung anderer Antiarrhythmika, besteht die bisherige symptomatische Behandlung überwiegend im Einsatz von Herzglykosiden zur Verbesserung der Kontraktionskraft und Senkung der Ventrikelfrequenz. Digitalispräparate führen aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite und ihrer positiv bathmotropen Wirkung häufig aber auch zu adversen Effekten, ohne das eigentliche Therapieziel zu erreichen.

Bei erfolgloser Digitalisierung oder bei sympathikoton oder hyperthyreotisch bedingtem Vorhofflimmern besteht die Möglichkeit der symptomatischen Frequenzsenkung mit β -Adrenolytika (Propranolol, u.a.). Daneben stehen unterschiedliche Antiarrhythmika, v.a. Klasse Ia (Chinidin, Procainamid, u.a.) oder Klasse Ic (Flecainid, u.a.) sowie Calciumantagonisten (Verapamil) der Klasse IV, für die Anwendung bei Vorhofflimmern zur Verfügung, deren therapeutischer Nutzen aber durch kardiodepressive und negativ inotrope Wirkungen limitiert wird.

Die Verwendung der üblicherweise eingesetzten Antiarrhythmika zur (selektiven) Blockade von Ionenkanälen basiert auf Ergebnissen elektrophysiologischer

Forschung, die Vorhofflimmern auf Veränderungen der aktiven Membraneigenschaften mit verkürzter ERP und veränderten AP-Charakteristika zurückführen. Ausgehend von der Hypothese, daß die erhöhte Frequenz mit hohem Ca^{2+} -Einstrom assoziiert ist und ein Ca^{2+} -Überschuß den Hauptgrund für die verminderte ERP und nachfolgende elektrophysiologische Veränderungen darstellt, wurden in einigen Studien die Effekte von Ca^{2+} -Antagonisten bei Vorhofflimmern untersucht. In der Literatur existieren übereinstimmende Hinweise, daß Verapamil bis zu einem gewissen Grad das elektrische remodeling in der Anfangsphase des Vorhofflimmerns verzögern kann^{26,39}:

Experimentell reduziert Verapamil frühe elektrophysiologische Veränderungen, verändert aber nicht die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern²⁶. Eine Verkürzung der ERP konnte im Tierversuch nur während der ersten 24 Stunden erreicht werden, bei länger bestehender Arrhythmie war kein präventiver Erfolg mehr erzielbar²⁵.

Nach derzeitigem Kenntnisstand treten Veränderungen der Ionenkanäle als Antwort auf zahlreiche Streßvariationen (bei hoch frequenten aber noch nicht fibrillierenden, bei dilatierten nicht fibrillierenden sowie auch bei chronisch fibrillierenden Vorhöfen) auf²⁵, und es gibt zunehmende Belege dafür, daß Veränderungen der passiven Gewebewiderstände unabhängig von Ionenkanälen verantwortlich für Leitungsstörungen sein können. Der begrenzte Erfolg der überwiegend verwendeten Antiarrhythmika kann dadurch vermutlich erklärt werden.

Vorhofflimmern tritt bei 50% der Patienten trotz pharmakologischer Therapie unabhängig von den eingesetzten Medikamenten erneut auf²⁶, und das Versagen selbst selektiver Ionenkanalblocker macht deutlich, daß es sich bei Vorhofflimmern wahrscheinlich nicht primär um ein Problem von Ionenkanälen einzelner Zellen handelt, sondern um veränderte (passive) elektrische Eigenschaften eines gesamten Gewebes.

Demzufolge erscheint es notwendig, auch andere Ansatzpunkte für zukünftige Therapien in Erwägung zu ziehen.

Ein remodeling von GJ wurde bei verschiedenen Formen kardialer Erkrankungen beschrieben und konnte in der vorliegenden Arbeit auch für chronisches Vorhofflimmern bestätigt werden. Somit ist die Beseitigung potentiell reversibler struktureller Störungen und die Wiederherstellung normaler interzellulärer Verbindungen, als ein neues, vielleicht effektiveres Behandlungsziel vorstellbar. Die komplexen Mechanismen der Regulation der gewebespezifischen Connexinexpression, in die eine solche Therapie eingreifen müßte, sind aber immer

noch unklar. So könnte eine potentielle therapeutische Strategie bei Arrhythmien aufgrund beeinträchtigter Zellverbindung, in der Intervention in den Connexinabbau liegen. Derzeit ist jedoch noch fraglich, ob durch Inhibition lysosomalen oder proteasomalen Abbaus akkumulierendes Connexin in funktionierenden Kanälen lokalisiert ist und so Einfluß auf die Weiterleitung hat ²⁰. Aus der gewebespezifischen Expression unterschiedlicher Connexinisoformen und dem auch aus dieser Arbeit resultierenden Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation von Cx 40 und 43 bei Vorhofflimmern, ergibt sich potentiell die Möglichkeit, spezifisch GJ von Atrium und Ventrikel pharmakologisch zu beeinflussen. So könnte eventuell selektiv die atriale oder ventrikuläre elektrische Kopplung moduliert werden, ohne die interzellulären Verbindungen der jeweils anderen Kammer zu beeinträchtigen. Auch über die Auswirkungen der (De-) Phosphorylierung, v.a. auf Cx 40, ist bisher zu wenig bekannt, um sie bereits als ebenfalls selektiven, möglichen therapeutischen Angriffspunkt über die damit verbundene Änderung der Leitungsgeschwindigkeit der interzellulären Kanäle nutzen zu können.

Dagegen existieren konkrete Hinweise, daß umgehende Kardioversion nicht nur erfolgreicher ist, wenn Vorhofflimmern erst kurzzeitig besteht ³², sondern auch fortschreitendem remodeling und der Zunahme von Dauer und Häufigkeit der Paroxysmen vorbeugen kann ²⁵. Bei Ziegen mit dreiwöchigem Vorhofflimmern konnten eingefügte Perioden mit Sinusrhythmus die durch Vorhofflimmern induzierten Veränderungen verhindern, und nachfolgende Episoden wurden nicht chronisch ²⁵.

Bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern besteht eine Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung und der Zeit, die benötigt wird, um nach Kardioversion die kontraktile Funktion der Vorhöfe wiederherzustellen ²⁹. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen substantiellen Veränderungen subzellulärer Strukturen und der EZM nach langandauerndem Vorhofflimmern erklären, daß nach Wiederherstellung des Sinusrhythmus keine sofortige Erholung stattfindet und warum frühzeitige Kardioversion erfolgreich sein kann, weisen aber auch auf eine mögliche Reversibilität zumindest der veränderten Connexinexpression hin. Inwieweit die beschriebenen extensiven fibrotischen Veränderungen reversibel sind, ist jedoch fraglich.

Inzwischen scheint erwiesen, daß Pharmaka wie selektive ACE-Hemmer, die auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zielen, Fibrose vorbeugen und sie sogar revidieren können ^{116,135}. Desweiteren haben klinische Ergebnisse den positiven Effekt von ACE-Hemmern bei der Prävention von Vorhofflimmern nach Infarkt gezeigt, die auch bei Hunden mit kongestiver Kardiomyopathie einem strukturellen

remodeling vorbeugen konnten⁴¹. Bezüglich der Wirkungen von Angiotensin II auf gap junctions liegen allerdings erst vorläufige und z.T. auch widersprüchliche Ergebnisse vor. Zumindest bestehen aber Hinweise auf die positive Auswirkung von ACE-Inhibitoren auf gap junctions *in vitro*:

Bei Hamstern mit Kardiomyopathie¹³⁶ und an isolierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte⁷¹ bewirkte die Applikation von Enalapril eine Zunahme der gap junctions sowie der Leitungsgeschwindigkeit.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint atriale Fibrose zumindest beim Menschen ein wesentlicher aufrechterhaltender Faktor von chronischem Vorhofflimmern zu sein. Daher erscheint es im Hinblick auf neue therapeutische Ansätze von Bedeutung, in weiteren Studien den Einfluß von ACE-Hemmern auf den klinischen Verlauf und die Morphologie bei Vorhofflimmern zu untersuchen und auch deren Wirkung auf die Connexinexpression grundsätzlich zu klären.

Insgesamt erscheint eine grundlegend verbesserte Kenntnis der elektrophysiologischen und auch strukturellen Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel weiterhin notwendig, um spezifischere pharmakologische Therapien für chronisches Vorhofflimmern zu entwickeln. Auch ein mehr detailliertes Verständnis der vielfältigen und eventuell zunächst adaptiven Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Arrhythmie beitragen können, wird fundamentale Bedeutung für die Entstehung neuer therapeutischer Strategien haben.

10. Schlußfolgerung

Viele Erkrankungen wirken prädisponierend für die Entstehung von Vorhofflimmern. Welche pathologischen Faktoren jedoch zusammen treffen müssen damit chronisches Vorhofflimmern entsteht ist unbekannt. Die Ergebnisse zahlreicher Studien^{32,145} lassen vermuten, daß die Arrhythmie selbst und unabhängig von der Grunderkrankung zu strukturellen und elektrischen Veränderungen des atrialen Myokards führt.

Die in der vorliegenden Arbeit bei chronischem Vorhofflimmern untersuchten Parameter wurden bereits in früheren Untersuchungen an ventrikulärem Myokard, unabhängig von elektrophysiologischen Veränderungen und aktiven Membraneigenschaften, in direkten Zusammenhang mit Arrhythmieentstehung gebracht. Es gibt viele Wege, auf denen Vorhofflimmern auch bei Zellen mit normalem Membranpotential auftreten kann. Überwiegend wird inzwischen eine Abnahme der Weiterleitungsgeschwindigkeit einerseits auf erhöhten extrazellulären Wider-

stand durch interstitielle Fibrose sowie andererseits auf erhöhten intrazellulären Widerstand durch verminderte Cx-Expression zurückgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß auch chronisches Vorhofflimmern von eindeutigen strukturellen Veränderungen im atrialen Myokard begleitet wird. Interstitielle Fibrose und verminderte Connexinexpression im Gewebe von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern kommen sowohl zusammen als auch unabhängig voneinander als anatomische Substrate der Arrhythmie in Betracht. Auch ein deutliches remodeling interzellulärer Verbindungen konnte immunhistochemisch im Gewebe der Maze-Patienten nachgewiesen und elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Die Auswirkungen dieser Umverteilung von gap junctions lassen sich derzeit, v.a. im atrialen Myokard, eigentlich nur hypothetisch interpretieren. Aufgrund der ultrastrukturellen Befunde kann zwar davon ausgegangen werden, daß es sich bei der Lateralisierung von gap junctions zumindest teilweise um funktionelle interzelluläre Kanäle handelt, die zu Veränderungen der normalen Anisotropie führen können. Entscheidend ist dabei aber auch, ob die jeweiligen Connexinisoformen phosphoryliert oder dephosphoryliert vorliegen. Gap junction Kanäle können offen oder geschlossen sein, die Öffnungshäufigkeit hängt neben der Connexinisoform und dem vorliegenden intrazellulären Milieu, auch entscheidend von der Connexin-Phosphorylierung ab. Diese Unterscheidung war mit den hier eingesetzten Methoden nicht möglich, und die genauen Auswirkungen verschiedener Phosphorylierungsformen von Cx 40 GJ auf die Leitungsgeschwindigkeit sind zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt. Da die Phosphorylierungsform von Connexinen allgemein aber wesentlichen Einfluß auf die Leitungsgeschwindigkeit von GJ-Kanälen hat, kann ohne diese Kenntnis keine definitive Aussage über die Auswirkungen einer Umverteilung von GJ auf die normale Anisotropie getroffen werden. Ähnliches trifft für die Reduktion von Cx 43 zu, da bisher nur vermutet werden kann, ob und in welchem Phosphorylierungszustand Cx 40 GJ fehlendes Cx 43 im humanen Atrium ersetzen können. Zu wenig ist ebenfalls bisher noch über die Connexinregulation am normalen Herzen bekannt, um bestehende Zusammenhänge zwischen Connexinreduktion, -korrelation und -umverteilung bei Vorhofflimmern erklären zu können. Potentielle Kontrollmechanismen zur Regulation des Ausmaßes interzellulärer Verbindungen bestehen in Expression, Verteilung und Funktion von GJ-Kanälen. Verschiedene Verteilungsmuster von GJ verursachen präferentielle Kommunikationswege, aber auch Kommunikationsgrenzen innerhalb eines Gewebes. Dabei stellen GJ keine fixen passiven Widerstände dar, sondern werden von komplexen Mechanismen reguliert, die gerade erst identifiziert werden. Die Regulation spezifischer GJ-Verteilung in verschiedenen Geweben und andere Mechanismen der Connexin-

biologie wie intrazellulärer Transport, Integration in funktionelle Kanäle, Einzelkanaleigenschaften wie Leitungsgeschwindigkeit oder Öffnungshäufigkeit, Abbau und „turnover-Kinetik“ oder phosphorylierende Enzyme sind größtenteils noch unbekannt.

Die Frage nach den genauen Mechanismen, die den Veränderungen bei Vorhofflimmern zugrunde liegen und vor allem deren zeitliche Abfolge und somit die Frage nach der primären Ursache der Arrhythmie, kann anhand der Ergebnisse dieser Studie nicht abschließend beantwortet werden. Einiges deutet jedoch darauf hin, daß es sich bei den beschriebenen Veränderungen um zunächst adaptive Reaktionen auf eine beeinträchtigte Weiterleitung und Kontraktionsfunktion gleich welcher Ursache handelt, die dann selbst wiederum zur Aufrechterhaltung der Arrhythmie beitragen. Da die bei Maze-Patienten vorliegenden Veränderungen nicht bei Patienten mit ähnlichen Grunderkrankungen und Sinusrhythmus auftraten und auch bei mit Arrhythmie assoziierten Erkrankungen ventrikulären Myokards beschrieben wurden, erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen Fibrose, Connexinreduktion und gap junction-Umverteilung einerseits sowie dem Vorhofflimmern andererseits offensichtlich.

In der „Ionenkanalforschung“ bestehen ebenfalls noch immer differierende Ergebnisse und Meinungen hinsichtlich der vielfältigen möglichen Veränderungen bei Vorhofflimmern. Trotzdem ist anzunehmen, daß metabolische Adaptionsprozesse wie veränderte intrazelluläre Ionen-Konzentration, veränderte Aktivität von Ionenpumpen oder Phosphorylierungsänderungen der Kanäle bereits schon früh nach Gewebeschädigung erfolgen und zu verminderter ERP und AP-Dauer führen können, während andere kompensatorische Reaktionen wie eine Zunahme der extrazellulären Matrix oder Umverteilung von GJ und Reduktion der Connexinexpression eventuell erst vergleichsweise später einsetzen.

Wahrscheinlich resultiert der progressive Charakter von Vorhofflimmern aus einer Kumulation von elektrischem und strukturellem remodeling der Vorhöfe als pathophysiologische Adaption. Unter verschiedenen pathologischen Voraussetzungen werden auch jeweils verschiedene Substrate aus dem breiten Spektrum möglicher elektrophysiologischer oder struktureller Veränderungen wie abnormale Zellverbindung oder Fibrose die entscheidende Rolle bei der Etablierung der Arrhythmie und Chronizität spielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß sowohl interstitielle Fibrose als auch Connexinreduktion und -umverteilung eine zentrale Rolle in der Genese des Vorhofflimmerns haben.

Weitere Studien und eventuell auch neue Untersuchungsaspekte sind dringend erforderlich, um zukünftig ein besseres Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen zunächst adaptiven Veränderungen des Myokards und daraus resultierenden maladaptiven strukturellen Korrelaten der Arrhythmieentstehung zu erzielen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Vorhofflimmern ist eine der häufigsten kardialen Arrhythmien und wurde bereits in einigen klinischen und experimentellen Studien untersucht. Der progressive, zur Chronizität neigende Charakter dieser Erkrankung und die erhöhte Inzidenz mit zunehmendem Alter lassen vermuten, daß strukturelle Veränderungen des atrialen Myokards unabhängig von elektrophysiologischen Veränderungen wesentlich zur Etablierung der Arrhythmie beitragen. In der Pathogenese von Vorhofflimmern wie auch ventrikulären Tachykardien ist eine veränderte Reizweiterleitung zwischen einzelnen Zellen durch gap junctions sowie aufgrund fibrotischer Veränderungen von grundlegender Bedeutung. Veränderungen in der Verteilung und Anzahl von gap junction- und extrazellulären Matrixproteinen wurden an ventrikulärem Myokard bei normalem Wachstum, während des Alterns und bei mit Arrhythmie assoziierten Erkrankungen nachgewiesen. Veränderungen von gap junctions bei Vorhofflimmern wurden bisher überwiegend nur experimentell an normalen Tierherzen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen variieren stark zwischen den verschiedenen Modellen und die Übertragbarkeit auf die klinische Erkrankung ist durch die fehlende zugrundeliegende chronische atriale Pathologie und die akuten Veränderungen in den Kurzzeit-Modellen limitiert.

Die strukturellen Korrelate von chronischem Vorhofflimmern sind immer noch unbekannt. Veränderungen in der Kardiomyozytenverbindung durch gap junctions werden neben fibrotischen und degenerativen Veränderungen auch als Ursache für die Entstehung von chronischem Vorhofflimmern diskutiert.

Daher wurde in der vorliegenden Studie Gewebe von 31 Patienten mit chronischem Vorhofflimmern (Maze) im Vergleich zu Gewebe von 12 Patienten mit Sinusrhythmus immunhistochemisch (qualitativ und quantitativ) sowie ultrastrukturell im Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) remodeling mechanischer und elektrischer interzellulärer Verbindungen,
- 2) Zunahme extrazellulärer Matrixproteine, 3) Degenerative, nekrotische und apoptotische Veränderungen, 4) Quantitativ veränderte Expression von Connexin 43 und 40 (atriale gap junction Proteine), N-Cadherin (fascia adherens) und Kollagen I (EZM).

Nach immunhistochemischer Darstellung verschiedener intra- und extrazellulärer Proteine erfolgte eine eingehende morphologische Untersuchung von Kontroll- und Patientengeweben mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie sowie eine weiterführende ultrastrukturelle Untersuchung zur Bestätigung der immunhistochemischen Befunde.

Im Anschluß an ein exakt standardisiertes Färbeprotokoll wurden die atrialen gap junction proteine Connexin 43 und 40 sowie N-Cadherin der f. adherens und Kollagen I als Protein der EZM mit Hilfe entsprechender software Ausstattung des konfokalen Mikroskopes quantifiziert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben deutliche strukturelle Veränderungen im Gewebe von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern gegenüber Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus. Alle Patienten mit chronischem Vorhofflimmern zeigten eine gleichzeitige Lateralisierung bzw. oberflächliche Verteilung von Connexin 43, Connexin 40, N-Cadherin und Desmoplakin. Elektronenmikroskopisch wurden laterale gap junctions innerhalb intakter lateraler Glanzstreifen sowie isoliert von diesen nachgewiesen. Bei isolierten lateralen gap junctions handelte es sich sowohl um intakte, normal erscheinende gap junctions als auch um sogenannte „anular profiles“. An den lateralen Zellgrenzen traten häufig abnorme Ansammlungen elektronendichten Materials auf, bei denen es sich um N-Cadherin handeln kann. Bei Vorhofflimmern waren die atrialen gap junction Proteine reduziert gegenüber dem Kontrollgewebe. Dabei war Connexin 43 sowohl in Atrium als auch Appendix der Maze-Patienten vermindert, während Connexin 40 nur in den Appendices reduziert war. Die Expression von N-Cadherin war bei Vorhofflimmern unverändert. Ausgeprägte fibrotische Veränderungen waren bei allen Patienten mit Vorhofflimmern immunhistochemisch sowie ultrastrukturell nachweisbar. Degenerative Veränderungen traten bei Vorhofflimmern aber auch im Kontrollgewebe bei Sinusrhythmus auf. Die Anzahl Ubiquitin, Komplement C9 oder TUNEL-positiver Kardiomyozyten war bei Vorhofflimmern vernachlässigbar gering. TUNEL-positive Zellkerne konnten elektronenmikroskopisch nicht als Apoptose bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß chronisches Vorhofflimmern zu deutlichen strukturellen Veränderungen im atrialen Myokard führt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl das remodeling mechanischer und elektrischer interzellulärer Verbindungen und die verminderte Connexinexpression als auch die ausgeprägten fibrotischen Veränderungen und die Zunahme extrazellulärer Matrixproteine als strukturelle Korrelate von chronischem Vorhofflimmern anzusehen sind. Strukturelles remodeling der interzellulären Verbindungen kann zusammen mit den fibrotischen Veränderungen lokale Leitungsabnormalitäten verursachen und so zur Entstehung und Aufrechterhaltung von reentry-Kreisläufen und Vorhofflimmern beitragen.

VII. SUMMARY

Atrial fibrillation is one of the most common cardiac arrhythmias and has been already investigated in numerous clinical and experimental studies. The progressive character of the disease, its tendency to become chronic and the increased incidence with advancing age suggest that independent of electrophysiological changes structural changes of the atrial myocardium may significantly contribute to the establishment of the arrhythmia. Conduction disturbances between individual myocytes due to changes of gap junctions have a fundamental importance in the pathogenesis of atrial fibrillation as well as ventricular tachycardia. Changes in number and distribution of gap junctions and an increase in fibrosis have been reported in ventricular myocardium during normal growth, aging and in cardiac diseases which are associated with arrhythmia. Changes of gap junctions in atrial fibrillation were mainly investigated in experimental animal models. The results of these studies are still contradictory and their clinical relevance is limited because of the absence of chronic atrial pathology. Furthermore only acute changes can be studied in short-time experiments.

The structural correlates of chronic atrial fibrillation are still unknown. Changes in the intercellular connection of cardiomyocytes concerning gap junctions as well as fibrotic and degenerative changes are discussed as possible causes for the initiation and self-perpetuation of chronic atrial fibrillation.

Therefore in the present study the atrial tissue of 31 patients with chronic atrial fibrillation (Maze) were immunohistochemically (qualitatively and quantitatively) and ultrastructurally examined in comparison to the atrial tissue of 12 patients with sinus rhythm with regard to the following questions: 1) remodeling of intercellular mechanical and electrical connections, 2) extent of interstitial fibrosis, 3) quantitatively changed expression of Connexin 43 and 40 (atrial gap junction proteins), N-Cadherin (fascia adherens) and Collagen I (extracellular matrix).

After immunolabeling of different intra- and extracellular proteins all tissues were morphologically examined in detail by laser scanning confocal microscopy. In addition an ultrastructural examination was performed to confirm the immunohistochemical results.

Following a standardized labeling protocol Connexin 43 and Connexin 40 as well as N-Cadherin and Collagen I have been quantified using a suitable software of the confocal microscope.

The results of the present study showed obvious structural changes in the tissues of patients with chronic atrial fibrillation as compared to tissues from patients with sinus rhythm. All patients with chronic atrial fibrillation demonstrated a

concomitant lateralisation and redistribution of Connexin 43, Connexin 40, N-Cadherin and Desmoplakin. Electron microscopy showed lateral gap junctions both, in intact lateral intercalated discs and isolated from intercalated discs. Isolated lateral gap junctions were either intact and of normal appearance or presented „anular profiles“. At the lateral cell borders abnormal accumulations of electron dense material were often detected, which might be N-Cadherin. Quantitative studies showed that the atrial gap junction proteins were reduced in atrial fibrillation. The Connexin 43 was reduced in atrium and appendages of Maze-patients whereas Connexin 40 was only reduced in the appendages. The expression of N-Cadherin was not altered in atrial fibrillation. Distinct interstitial fibrosis was immunohistochemically and ultrastructurally shown in all patients with atrial fibrillation. Degenerative changes were present in atrial fibrillation but also in control tissue of patients with sinus rhythm. The rate of ubiquitin, complement C9, or TUNEL positive cardiomyocytes was extremely low in atrial fibrillation. TUNEL positivity of nuclei could not be confirmed as apoptosis by electron microscopy.

These results show that chronic atrial fibrillation is associated with distinct structural changes of the atrial myocardium. Both the remodeling of mechanical and electrical intercellular junctions, the reduced expression of connexins and the high degree of interstitial fibrosis can be regarded as structural correlates of chronic atrial fibrillation. Structural remodeling of intercellular junctions accompanied by fibrosis may cause localized abnormal conduction and thereby contribute to the initiation and establishment of reentry pathways and atrial fibrillation.

VIII. Abkürzungen

AF	atrial fibrillation
AK	Antikörper
AP	Aktionspotential
ARC	adulte Kardiomyozyten der Ratte
bp	Basenpaar
Cx	Connexin
C 9	Komplementfaktor C 9
CAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERP	effektive Refraktärzeit
EZM	extrazelluläre Matrix
EZR	Extrazellularraum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GJ	gap junction
h	Stunden
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
ID	intercalated disc
kD	Kilodalton
M	Molar (mol/l)
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
μm	Mikrometer
nm	Nanometer
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
pS	pico-Siemens
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RAA	rechtsatrialer Appendix
RFW	rechtsatriale freie Wand
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
SR	Sinusrhythmus
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat

IX. Literaturverzeichnis

1. Cox JL, Schuessler RB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. I. Summary of the current concepts of the mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1991;101:402-5.
2. van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, van Zijverden M, Groenewegen WA, Allessie MA, Jongsma HJ. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat [see comments]. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1998;9:596-607.
3. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, Incidence, Prognosis and Predisposing Conditions for Atrial Fibrillation: Population-Based Estimates. *American Journal of Cardiology*. 1998;82:2N-9N.
4. Falk RH. Etiology and complications of atrial fibrillation: insights from pathology studies. *American Journal of Cardiology*. 1998;82:10N-17N.
5. Lönnerholm S, Blomstrom P, Nilsson L, Oxelbark S, Jideus L, Blomstrom-Lundqvist C. Effects of the maze operation on health-related quality of life in patients with atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;101:2607-11.
6. Kulbertus HE, Olsson SB, Schlepper M. Natural occurrence and experimental initiation of atrial fibrillation in different animal species. In: *Atrial Fibrillation*. Mölndal, Sweden: AB Hässle, subsidiary of AB Astra, Sweden; 1982:33-41.
7. Freudiger U, Grünbaum E-G, Schimke E. Klinik der Hundekrankheiten. In: Verlag GF, ed. 2 ed. Jena-Stuttgart; 1993:402-404.
8. Wintzer HJ. Krankheiten des Pferdes. *Paul Parey-Berlin,Hamburg*. 1982:83-86.
9. Mehra R, Zeiler RH, Gough WB, El-Sherif N. Reentrant ventricular arrhythmias in the late myocardial infarction period. 9. Electrophysiologic-anatomic correlation of reentrant circuits. *Circulation*. 1983;67:11-24.
10. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*. 1993;88:864-875.

11. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Cardiac arrhythmogenesis and the gap junctions. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1995;27:37-44.
12. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation*. 1997;95:988-96.
13. Litchenberg WH, Norman LW, Holwell AK, Martin KL, Hewett KW, Gourdie RG. The rate and anisotropy of impulse propagation in the postnatal terminal crest are correlated with remodeling of Cx43 gap junction pattern. *Cardiovascular Research*. 2000;45:379-387.
14. Luke RA, Beyer EC, Hoyt RH, Saffitz JE. Quantitative analysis of intercellular connections by immunohistochemistry of the cardiac gap junction protein connexin 43. *Circulation Research*. 1989;65:1450-1457.
15. Kostin S, Schaper J. Tissue-Specific Patterns of Gap Junctions in Adult Rat Atrial and Ventricular Cardiomyocytes In Vivo and In Vitro. *Circulation Research*. 2001;88:933-939.
16. Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin 43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. *American Journal of Physiology*. 2000;278:H1662-H1670.
17. Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, Beyer EC. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circulation Research*. 1994;74:1065-70.
18. Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease: an immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *American Journal of Pathology*. 1991;139:801-821.
19. Dupont E, Ko Y, Rothery S, Coppens SR, Baghai M, Haw M, Severs NJ. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103:842-9.
20. Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circulation Research*. 2000;86:723-8.

21. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovascular Research*. 1999;42:309-17.
22. Saffitz JE, Yamada KA. Do alterations in intercellular coupling play a role in cardiac contractile dysfunction? [editorial; comment]. *Circulation*. 1998;97:630-2.
23. Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clinical Science*. 1996;90:447-52.
24. Boyden PA. Three Things You Should Know When Considering the Atria: Location, Location, Location. *Circulation Research*. 2001;88:1097-1098.
25. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Spooner PM, Van Wagoner Dr, Waldo AL. Pathophysiology and Prevention of Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2001;103:769-777.
26. Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:1101-17.
27. Cox JL, Schuessler RB, D'Agostino HJ, Jr., Stone CM, Chang BC, Cain ME, Corr PB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure [see comments]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1991;101:569-83.
28. Szalay ZA, Skwara W, Pitschner HF, Faude I, Klovekorn WP, Bauer EP. Midterm results after the Mini-Maze procedure. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 1999;16:306-11.
29. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. 1997;96:3157-63.
30. Ausma J, Wijffels M, van Eys G, Koide M, Ramaekers F, Allessie M, Borgers M. Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation. *American Journal of Pathology*. 1997;151:985-97.
31. Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Come PC, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;23:1535-40.

32. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92:1954-68.
33. Davies MJ, Pomerance A. Pathology of atrial fibrillation in man. *British Heart Journal*. 1972;34:520-5.
34. Shapiro EP, Effron MB, Lima S, Ouyang P, Siu CO, Bush D. Transient atrial dysfunction after conversion of chronic atrial fibrillation to sinus rhythm. *American Journal of Cardiology*. 1988;62:1202-7.
35. Nattel S. Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*. 1999;42:298-308.
36. Aime-Sempe C, Folliguet T, Rucker-Martin C, Krajewska M, Krajewska S, Heimburger M, Aubier M, Mercadier JJ, Reed JC, Hatem SN. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;34:1577-86.
37. Li D, Farih S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100:87-95.
38. Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, Morady F. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation*. 1996;94:1600-6.
39. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Power J, Allessie MA. Electrical remodeling due to atrial fibrillation in chronically instrumented conscious goats: roles of neurohumoral changes, ischemia, atrial stretch, and high rate of electrical activation. *Circulation*. 1997;96:3710-20.
40. Lip GYH, Beavers GD. ABC of Atrial Fibrillation: History, Epidemiology and Importance of Atrial Fibrillation. *British Medical Journal*. 1995;311.
41. Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation--very new insights into very old ideas. *Annual Review of Physiology*. 2000;62:51-77.
42. Jessurun ER, van Hemel NM, Defauw JA, Stofmeel MA, Kelder JC, de la Riviere AB, Ernst JM. Results of maze surgery for lone paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;101:1559-67.
43. Scheinmann MM, Morady F. Nonpharmacological Approaches to Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2001;103:2120-2125.

44. Cox JL, Canavan TE, Schuessler RB, Cain ME, Lindsay BD, Stone C, Smith PK, Corr PB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. II. Intraoperative electrophysiologic mapping and description of the electrophysiologic basis of atrial flutter and atrial fibrillation. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1991;101:406-26.
45. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. © VCH, Weinheim. 1990.
46. Legato J. Ultrastructure of the Atrial, Ventricular, and Purkinje Cell, with Special Reference to the Genesis of Arrhythmias. *Circulation*. 1973;XLVII:178-189.
47. Kawamura K, James TN. Comparative Ultrastructure of Cellular Junctions in Working Myocardium and the Conduction System under Normal and Pathologic Conditions. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1971;3:31-60.
48. Severs NJ. Cardiac muscle cell interaction: from microanatomy to the molecular make-up of the gap junction. *Histol. Histopathology*. 1995;10:481-501.
49. Burch GE, Sohal RS. Morphologic and pathologic aspects of intercalated disc of the heart. *American Heart Journal*. 1969;78:358-368.
50. Severs NJ. Pathophysiology of Gap Junctions in Heart disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1994;5:462-475.
51. Fenoglio JJ, Jr., Pham TD, Hordof A, Edie RN, Wit AL. Right atrial ultrastructure in congenital heart disease. II. Atrial septal defect: effects of volume overload. *American Journal of Cardiology*. 1979;43:820-7.
52. Mary-Rabine L, Albert A, Pham TD, Hordof A, Fenoglio JJ, Jr., Malm JR, Rosen MR. The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure. *Circulation Research*. 1983;52:188-99.
53. Jongsma HJ, Wilders R. Gap junctions in cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2000;86:1193-1197.
54. Voizzi C, Dupont E, Coppén SR, Yeh HI, Severs NJ. Chamber-related differences in connexin expression in the human heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:991-1003.

55. Saffitz JE. Gap junctions: functional effects of molecular structure and tissue distribution. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 1997;430:291-301.
56. van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, Hellemons AJ, van Veen TA, Alessie MA, Jongsma HJ. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovascular Research*. 2000;46:476-86.
57. Peters NS, Wit AL. Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation*. 1998;97:1746-1754.
58. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays*. 1996;18:719-730.
59. Rook MB, van Ginneken AC, de Jonge B, el Aoumari A, Gros D, Jongsma HJ. Differences in gap junction channels between cardiac myocytes, fibroblasts, and heterologous pairs. *American Journal of Physiology*. 1992;263:C959-77.
60. Lo CW. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circulation Research*. 2000;87:346-8.
61. Kanter HL, Laing JG, Beyer EC, Green KG, Saffitz JE. Multiple connexins colocalize in canine ventricular myocyte gap junctions. *Circulation Research*. 1993;73:344-50.
62. Verheule S, van Kempen MJ, te Welscher PH, Kwak BR, Jongsma HJ. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circulation Research*. 1997;80:673-81.
63. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *Journal of Cell Science*. 1993;105:985-91.
64. Saffitz JE, Yamada KA. Closing the gap in understanding the regulation of intercellular communication. *Cardiovascular Research*. 2000;45:807-9.
65. Davis LM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;24:1124-32.

66. Bastide B, Neyses L, Ganten D, Paul M, Willecke K, Traub O. Gap junction protein connexin40 is preferentially expressed in vascular endothelium and conductive bundles of rat myocardium and is increased under hypertensive conditions. *Circulation Research*. 1993;73:1138-49.
67. Kanter HL, Laing JG, Beau SL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circulation Research*. 1993;72:1124-31.
68. Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circulation Research*. 2000;87:656-62.
69. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation*. 1995;91:1588-95.
70. Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, de Maziere A, van Kempen MJA, Davoust J, Briand JP, Moorman AFM, Jongsma HJ. Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circ Res*. 1994;74:839-851.
71. de Mello WC. Cell coupling and impulse propagation in the failing heart. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1999;10:1409-20.
72. Saffitz JE. Regulation of intercellular coupling in acute and chronic heart disease. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*. 2000;33:407-13.
73. Laing JG, Tadros PN, Westphale EM, Beyer EC. Degradation of Connexin 43 Gap Junctions Involves both the Proteasome and the Lysosome. *Experimental Cell Research*. 1997;236:482-492.
74. Peters NS, Severs NJ, Rothery SM, Lincoln C, Yacoub MH, Green CR. Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation*. 1994;90:713-725.
75. Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, Thonnissen E, Kruger O, Lamers WH, Willecke K. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circulation Research*. 2000;87:399-405.

76. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation*. 2000;101:547-52.
77. Simon AM. Gap junctions: more roles and new structural data. *trends in Cell Biology*. 1999;9 (May):169-170.
78. Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: Evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation*. 1998;97:686-691.
79. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circulation Research*. 2001;88:333-9.
80. Spach MS, Dolber PC. Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation at a microscopic level in human cardiac muscle. Evidence for electrical uncoupling of side-to-side fiber connections with increasing age. *Circulation Research*. 1986;58:356-71.
81. Hein S, Kostin S, Bauer E, Klövekorn WP, Schaper J. Das Zytoskelett des Kardiomyocyten im normalen und insuffizienten menschlichen Myokard, I. *Zeitschrift für Kardiovaskuläre Medizin*. 1998;2:7-22.
82. Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circulation Research*. 1999;85:154-67.
83. Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn WP, Schaper J. The Protein Composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Failure Reviews*. 1998;2:245-460.
84. Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Current Opinion in Cell Biology*. 1996;8:685-91.
85. Hertig CM, Eppenberger-Eberhardt M, Koch S, Eppenberger HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *Journal of Cell Science*. 1996;109:1-10.

86. Zuppinger C, Schaub MC, Eppenberger HM. Dynamics of early contact formation in cultured adult rat cardiomyocytes studied by N-cadherin fused to green fluorescent protein. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:539-55.
87. Soler AP, Knudsen KA. N-cadherin involvement in cardiac myocyte interaction and myofibrillogenesis. *Developmental Biology (Orlando)*. 1994;162:9-17.
88. Hertig CM, Butz S, Koch S, Eppenberger-Eberhardt M, Kemler R, Eppenberger HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. II. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell-cell contact and communication. Formation of two distinct N-cadherin/catenin complexes. *Journal of Cell Science*. 1996;109:11-20.
89. Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circulation Research*. 1997;80:88-94.
90. Schaper J, Speiser B, Brand T. The Cytoskeleton and Extrazellular Matrix in Human Hearts with Dilated Cardiomyopathie. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*. 1993;I:75-80.
91. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio [see comments]. *Circulation*. 1999;99:2750-6.
92. Speiser B, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience*. 1991;2:225-32.
93. Schaper J, Speiser B. The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Research in Cardiology*. 1992;87:303-9.
94. Speiser B, Weihrauch D, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human cardiac tissue. Part II: Vimentin, laminin, and fibronectin. *Cardioscience*. 1992;3:41-9.
95. Schaper J, Schaper W. Ultrastructural correlates of reduced cardiac function in human heart disease. *European Heart Journal*. 1983;4:35-42.

96. Mac Kenna DA, Omens JH, McCulloch AD, Covell JW. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. *American Journal of Physiology*. 1994;266:H1007-18.
97. Schaper J, Mollnau H, Hein S, Scholz D, Mönkel B, Devaux B. Wechselwirkungen zwischen Kardiomyozyten und der extrazellulären Matrix im insuffizienten menschlichen Herzen. *Z Kardiol*. 1995;84:33-38.
98. Anderson KR, Sutton MGS, Lie JT. Histopathological Types of Cardiac Fibrosis in Myocardial Disease. *Journal of Pathology*. 1979;128:79-85.
99. Schaper J, Hein S, Scholz D, Mollnau H. Multifaceted Morphological Alterations are Present in the Failing Human Heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1995;27:857-861.
100. Ciechanover A, Orián A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *Journal of Cellular Biochemistry - Supplement*. 2000;34:40-51.
101. Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182:1-11.
102. Ciechanover A, Orián A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. 2000;22:442-51.
103. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz*. 1999;24:219-24.
104. Speth C, Wurzner R, Stoiber H, Dierich MP. The complement system: pathophysiology and clinical relevance. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1999;111:378-91.
105. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Molecular Immunology*. 1999;36:941-8.
106. Morgan BP. Regulation of the Complement Membrane Attack Pathway. *Critical reviews in immunology*. 1999;19:173-198.
107. Marsh JE, Pratt JR, Sacks SH. Targeting the complement system. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*. 1999;8:557-62.
108. Linton SM, Morgan BP. Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. *Molecular Immunology*. 1999;36:905-14.

109. Lazda EJ, Batchelor WH, Cox PM. Immunohistochemical Detection of Myocardial Necrosis in Stillbirth and Neonatal Death. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2000;3:40-47.
110. Kosar F, Varol E, Ileri M, Ayaz S, Hisar I, Kisacik H. Circulating cytokines and complements in chronic heart failure. *Angiology*. 1999;50:403-8.
111. Ferreira MAS, Owen HE, Howie AJ. High prevalence of acute myocardial damage in a hospital necropsy series, shown by C9 immunohistology. *Journal of Clinical Pathology*. 1998;51:548-551.
112. Lorenz-Meyer S. Die Bedeutung der Apoptose bei Langzeitschämie und Reperfusion im Hundeherzen. *Dissertationsschrift*. 1999.
113. Schaper J, Elsasser A, Kostin S. The role of cell death in heart failure. *Circulation Research*. 1999;85:867-9.
114. Power JM, Beacom GA, Alferness CA, Raman J, Wijffels M, Farish SJ, Burrell LM, Tonkin AM. Susceptibility to atrial fibrillation: a study in an ovine model of pacing-induced early heart failure. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1998;9:423-35.
115. Connelly JH, Clubb FJ, Vaughn W, Duncan M. Morphological changes in atrial appendages removed during the maze procedure: a comparison with autopsy controls. *Cardiovascular Pathology*. 2001;10:39-42.
116. Spach MS, Starmer CF. Altering the topology of gap junctions a major therapeutic target for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*. 1995;30:337-44.
117. Leistad E, Christensen G, Ilebekk A. Effects of atrial fibrillation on left and right atrial dimensions, pressures, and compliances. *American Journal of Physiology*. 1993;264:H1093-7.
118. Allessie MA. Atrial electrophysiologic remodeling: another vicious circle? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1998;9:1378-93.
119. Abildskov JA, Millar K, Burgess MJ. Atrial fibrillation. *American Journal of Cardiology*. 1971;28:263-7.
120. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, Oertel LB, Harrigan P, Hughes RA, Weyman AE. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study [see comments]. *Circulation*. 1990;82:792-7.

121. Everett THt, Li H, Mangrum JM, McRury ID, Mitchell MA, Redick JA, Haines DE. Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;102:1454-60.
122. Green CR, Peters NS, Gourdie RG, Rothery S, Severs NJ. Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1993;41:1339-1349.
123. Lichtman JW. Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft*. 1994;Oktober 1994:78-87.
124. Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2001;33:359-71.
125. Spach MS, Miller WTd, Dolber PC, Kootsey JM, Sommer JR, Mosher CE, Jr. The functional role of structural complexities in the propagation of depolarization in the atrium of the dog. Cardiac conduction disturbances due to discontinuities of effective axial resistivity. *Circulation Research*. 1982;50:175-91.
126. Spach MS, Kootsey JM. The nature of electrical propagation in cardiac muscle. *American Journal of Physiology*. 1983;244:H3-22.
127. Spach MS, Heidlage F, Dolber PC, Barr RC. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size. Experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circulation Research*. 2000;86:302-311.
128. Boyden PA, Tilley LP, Albala A, Liu SK, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. Mechanisms for atrial arrhythmias associated with cardiomyopathy: a study of feline hearts with primary myocardial disease. *Circulation*. 1984;69:1036-47.
129. Boyden PA, Tilley LP, Pham TD, Liu SK, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis. *American Journal of Cardiology*. 1982;49:1896-908.

130. Pham TD, Wit AL, Hordof AJ, Malm JR, Fenoglio JJ, Jr. Right atrial ultrastructure in congenital heart disease. I. Comparison of ventricular septal defect and endocardial cushion defect. *American Journal of Cardiology*. 1978;42:973-82.
131. Thiedemann KU, Ferrans VJ. Left atrial ultrastructure in mitral valvular disease. *American Journal of Pathology*. 1977;89:575-604.
132. Wouters L, Liu GS, Flameng W, Thijssen V, Thoone F, M. B. Structural remodeling of atrial myocardium in patients with cardiac valve disease and atrial fibrillation. *Experimental and Clinical Cardiology*. 2000;5:158-163.
133. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997;96:1180-4.
134. Elvan A, Huang XD, Pressler ML, Zipes DP. Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. *Circulation*. 1997;96:1675-85.
135. Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:1669-77.
136. de Mello WC, Crespo MJ. Correlation between changes in morphology, electrical properties, and angiotensin-converting enzyme activity in the failing heart. *European Journal of Pharmacology*. 1999;378:187-94.
137. Goette A, Arndt M, Rocken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 2000;101:2678-81.
138. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennel DJ, Fox Kim, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the human left ventricle. *Circulation*. 1998;97:651-660.
139. Lerner DL, Chapman Q, Green KG, Saffitz JE. Reversible down-regulation of connexin43 expression in acute cardiac allograft rejection. *Journal of Heart & Lung Transplantation*. 2001;20:93-7.
140. Matsushita T, Takamatsu T. Ischaemia-induced temporal expression of connexin43 in rat heart. *Virchows Archiv*. 1997;431:453-8.

141. Luke RA, Saffitz JE. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;87:1594-602.
142. Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, Rothery S, Green CR, Severs NJ. Upregulation of connexin43 gap junctions during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 1995;15:1219-28.
143. Hoyt RH, Cohen ML, Saffitz JE. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. *Circulation Research*. 1989;64:563-74.
144. Spach MS. Changes in the topology of gap junctions as an adaptive structural response of the myocardium. *Circulation*. 1994;90:1103-6.
145. Tieleman RG, Crijns HJ. The 'second factor' of tachycardia-induced atrial remodeling. *Cardiovascular Research*. 2000;46:364-6.

X. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten und umfangreichen Themas besonders aber auch für ihre immer freundliche und individuelle Betreuung und motivierende Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen, die in zwei Jahren wissenschaftlichen Arbeitens auftraten sowie für das überaus angenehme Arbeitsklima unter ihrer Leitung,
- Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Genehmigung der finanziellen Unterstützung seitens der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. während dieses Projektes,
- Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher für sein Interesse an dieser externen Arbeit, seine Bereitschaft zur unterstützenden Betreuung, die kritische Überarbeitung des Manuskripts und die Vertretung dieser Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,
- Herrn Dr. Zoltan Szalay und Herrn Dr. Stefan Hein für die Auswahl und freundliche Überlassung geeigneten Patienten- und Kontrollgewebes und die ausführliche Zusammenstellung der entsprechenden klinischen Daten,
- Herrn Dr. Sawa Kostin für seine fortwährende, überaus kompetente und intensive Betreuung, Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation und die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit während dieser Zeit,
- Herrn Gunther Schuster für seine nachsichtige und stets umgehende Problembearbeitung und optimale Unterstützung bei der Photodokumentation und Herrn Gerhard Stämmler für seine qualifizierte und geduldige Hilfe bei computertechnischen Fragen und der Fertigstellung dieser Arbeit,
- Frau Beate Grohmann für die ausführliche Einarbeitung im Laborbereich, ihre immer sehr herzliche und aufmunternde Unterstützung und das, dank ihrer Anwesenheit, sehr abwechslungsreiche Arbeitsumfeld und Frau Brigitte Matzke für die detaillierte Einführung in die konfokale Mikroskopie und Bildverarbeitung, ihre kompetente Beratung und auch für die vielen unterhaltsamen und motivierenden Gespräche und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft in allen Bereichen,
- Frau Renate Möhren für die freundliche und ausführliche Einarbeitung und Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Frau Annemarie Möbs für ihren großen Einsatz bei der Erstellung der zahlreichen elektronenmikroskopischen Photos und ihre perfekte photographische Arbeit,
- Frau Dr. Veronika Person und Frau Kerstin Birlenbach für die sorgfältige und kritische Korrektur des Manuskripts,

- Herrn Markus Rieger für die geduldige Einarbeitung in die Proteinquantifizierung und Tabellenkalkulation, Herrn Lieven Pool für sein immer spontanes Eingreifen bei akuten computertechnischen Problemen, Frau Alessandra Matire, Herrn Dr. Borja Fernandez und Herrn Dr. Dimitri Scholz für ihre in jeder Hinsicht immer vorhandene Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, Allen, auch den inzwischen ehemaligen, Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe und des Max-Planck-Institutes Bad Nauheim für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre,
- Herrn PD Dr. Peter Seifert und Frau Claudine Strack, die durch ihre Arbeit und unsere Freundschaft meine Einstellung zu wissenschaftlichem Arbeiten geprägt haben, für die fundierte Ausbildung und Auffrischung in der Elektronenmikroskopie,
- Meinen Eltern und meinen Freunden, die mir durch Ihre Unterstützung, Hilfe und Freundschaft diesen Weg ermöglicht haben.