

Einfluss rhythmischer elektrischer Felder
auf die Expression und Ausschüttung neurotropher Faktoren
sympathischer Neurozyten:
Ein In-vitro-Modell des Vorhofflimmerns

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Florian Küppers

aus

Würselen

Berichter: Herr Professor
 Dr. med. Patrick Schauerte

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Joachim Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2012

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.***

Widmung

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern und Großeltern, die durch Ihre außerordentliche Unterstützung in allen Bereichen mein Studium der Humanmedizin und somit auch diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Außerdem widme ich diese Arbeit meinem verstorbenen Freund Lutz Heck, der in der gleichen Arbeitsgruppe an seiner Promotion arbeitete und in dieser Zeit bei einem tragischen Motorradunfall ums Leben kam.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	-1-
1.1	Vorhofflimmern.....	-1-
1.2	Stand der Forschung	-2-
1.3	Hypothese	-5-
1.4	Das Modell	-6-
2.	Material und Methoden	-8-
2.1	Zellkulturen	-8-
2.1.1	Präparation des Ganglion Cervicale Superior	-8-
2.1.2	Isolation der Neurozyten.....	-11-
2.1.3	Anlage der Zellkultur.....	-12-
2.1.4	Mediumwechsel	-13-
2.2	Hochfrequente elektrische Stimulation	-13-
2.3	Nativbilder	-15-
2.4	Immunfluoreszenz	-16-
2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	-18-
2.6	Polymerase chain reaction (PCR)	-20-
2.6.1	RNA Isolation.....	-20-
2.6.2	Bestimmung der RNA Konzentration	-22-
2.6.3	Reverse Transkription in cDNA	-23-
2.6.4	Real Time PCR-Amplification	-24-
2.7	Western Blot	-26-
2.7.1	Zelllyse	-26-
2.7.2	Gele herstellen	-27-
2.7.3	Proteinproben	-28-
2.7.4	Kammer beladen	-29-
2.7.5	Blotten	-29-

2.7.6	Blocken des Blottes.....	-30-
2.7.7	Proteindetektion	-30-
2.7.8	Enhanced Chemoluminescence (ECL)	-32-
2.8	Verwendete Pharmaka	-32-
2.8.1	Lidocain	-32-
2.9	Statistische Analyse	-32-
3.	Ergebnisse	-34-
3.1	HFES beeinflusst die Expression von NGF und NT-3 in SN	-34-
3.1.1	HFES erhöht die NGF und NT-3 Sekretion von SN	-34-
3.1.2	Anstieg der Proteine NT-3 und NGF im Zelllysate SN nach HFES	-36-
3.1.3	Anstieg der kodierenden mRNA für NT-3 und NGF in SN durch HFES.....	-38-
3.1.4	Die Ausschüttung von NT-3 und NGF durch HFES ist depolarisationsabhängig	-40-
3.2	HFES induziert sympathisches Nervenwachstum	-42-
3.2.1	Morphologische Darstellung im Nativpräparat	-42-
3.2.2	Erhöhung des Sproutingmarkers GAP-43 (growth associated protein 43)	-44-
3.2.3	Morphologische Darstellung mittels Immunfluoreszenz.....	-45-
3.2.4	SNS durch HFES ist depolarisationsabhängig.....	-46-
3.3	NGF hat größere Bedeutung für SNS als NT-3.....	-48-
3.4	TrkA als Rezeptor der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3	-50-
3.4.1	HFES steigert depolarisationsabhängig die Expression von TrkA	-50-
3.4.2	TrkA vermittelt SNS	-52-
4.	Diskussion	-54-
4.1	Hauptergebnisse dieser Studie.....	-54-
4.2	NGF- und NT-3 Expression sowie deren Funktion.....	-54-

4.3	Der Rezeptor TrkA	-56-
4.4	HFES bewirkt NGF, NT-3 und TrkA Hochregulierung in SN	-57-
4.5	Möglichkeiten in der Klinik	-62-
5.	Zusammenfassung	-64-
6.	Quellen	-66-
7.	Publikationen	-78-
8.	Danksagung.....	-79-
9.	Erklärung zur Datenaufbewahrung.....	-80-
10.	Lebenslauf	-81-

Abkürzungsverzeichnis

ACH – Acetylcholin

AERP – Atrial effective refractory period

BS – Blocking solution

BSA – Bovines Serum Albumin

CABS – Capture antibody solution

DABS – Detection antibody solution

DAPI – Diamin phenylindol

EAD – early after depolarization

ECL – Enhanced Chemoluminescence

ECM – Extrazelluläre Matrix

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FBM – Final base medium

FEL – Finale Experimentier Lösung

FCS – Fetal calf serum

GAP 43 – Growth associated protein 43

GAPDH – Glycerinaldehyd Phosphat Dehydrogenase

HFES – hochfrequente elektrische Stimulation

LP – Lysepuffer

MS – Master solution

MM – Master mix

NBM – Neuronal Base Medium

NGF – Nerve growth factor

NL – Nährlösung

NT-3 – Neurotrophin 3

PAK – Primärantikörper

PAKL – Primärantikörperlösung

PBS-T – PBS-Tween 20 0,1 %

PCR – Polymerase chain reaction

PFA - Paraformaldehyd

PL - Permeabilisierungslösung

RD – Reagent diluent
RT-PCR – Real time polymerase chain reaction
SAK – Sekundärantikörper
SAKL - Sekundärantikörperlösung
SCG – Ganglion Cervicale Superior
SGS – Standardgerade basic solution
SHS – Streptavidin-HRP solution
SL – Suspensionslösung
SN – Sympathische Neurozyten
SNS – Sympathisches nerve sprouting
SS – Substrate solution
TB – Transfer buffer
TMM – TaqMan Master Mix
TP – Transferpuffer
Trk – Tropomyosin related kinase
VHF – Vorhofflimmern
VL – Verdauungslösung
WB – Wash buffer

1. Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen unter der allein in Deutschland etwa 300.000 Menschen leiden (1) (2). In ganz Europa sind es inzwischen etwa 4,5 Millionen Menschen, die diese Erkrankung aufweisen (3). Dadurch sind die Hospitalisierungen aufgrund von VHF in den letzten 20 Jahren um 66% angestiegen (4).

Diese supraventrikuläre Herzrhythmusstörung wird unterteilt in die Typen paroxysmales, persistierendes und permanentes VHF. Wenn es bis zu 48 h nach erstmaligem Auftreten spontan sistiert, spricht man von paroxysmalem VHF. Das persistierende VHF liegt vor, wenn es nur durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion beendet werden kann. Das permanente VHF ist dadurch charakterisiert, dass mehrmalige Kardioversionsversuche erfolglos blieben (5) (6). Bei allen genannten VHF-Varianten kommt es aus noch ungeklärter Ursache zu einer Aktivierung der Vorhöfe mit bis zu 300-600 Schlägen/Minute (5-10 Hz) (7) (8) (9). Der AV-Knoten verhindert eine direkte 1:1 Überleitung vieler dieser Erregungen auf die Ventrikel. Jedoch funktioniert die Filterfunktion des AV-Knotens bei den hohen Frequenzen der Vorhöfe nur bedingt, so dass die Vorhoferregungen insbesondere bei körperlicher Belastung schnell und in unregelmäßigen Abständen auf die Ventrikel übergeleitet werden (10). Im Verlauf des VHF kommt es ohne Therapie in vielen Fällen zu einer sogenannten Tachyarrhythmia absoluta mit Herzfrequenzen von bis zu 200/min, worunter die Patienten klinische Symptome bemerken können.

Ungeachtet dessen bleiben 54-70% der Vorhofflimmerepisoden im Verlauf asymptomatisch (11) (12). Symptomatische Patienten mit VHF sind jedoch in der Regel weniger physisch belastbar und verspüren Palpitationen. Zum einen führt das Flimmern aufgrund der unregelmäßigen Erregung der Kammern zu einer schlechteren Ventrikelfüllung mit unterschiedlichen Schlagvolumina. Zum anderen kommt es durch die hohen Vorhofflimmerfrequenzen zu keiner hämodynamisch wirksamen Vorhofkontraktion mehr. Der Wegfall der synchronen Vorhofpumpfunktion vermindert somit das Herzzeitvolumen um bis zu 20%. Dies tritt vor allem unter körperlicher

Mehrbelastung auf, da das enddiastolische Blutvolumen im Ventrikel nicht adäquat gesteigert werden kann (6). Aufgrund des eingeschränkten Bewegungsausmaßes der Vorhofwände kommt es weiterhin zu hämodynamischen Veränderungen im linken Vorhof. Diese begünstigen nach der Virchowschen Trias eine Thrombenbildung (13). Dies führt zu einem erhöhten Schlaganfallrisiko von 4 %, welches allerdings durch Co-Faktoren wie zum Beispiel ein bereits stattgehabter Insult, arterielle Hypertonie, eine begleitende Herzerkrankung, Diabetes mellitus oder ein Lebensalter von über 75 Jahren um das 20 fache steigen kann (14). Schon das Alter alleine ist ein positiver Prädiktor für das Auftreten von VHF. Sind noch unter 40 Jahren weniger als 1% der Bevölkerung erkrankt, so sind es in der Altersgruppe von 55-64 Jahren 3-4% und in der Altersgruppe über 80 Jahre sogar schon 10%. (2) (3). Das Letalitätsrisiko insgesamt ist durch VHF bis zu 30% Prozent erhöht (15).

1.2 Stand der Forschung

VHF ist charakterisiert durch eine komplexe Pathogenese. Nach Coumel 2004 sind für das Entstehen einer Arrhythmie drei Dinge von Bedeutung: Ein Impuls, das Substrat und Regulierungsfaktoren (16). Wie die einzelnen Punkte zusammenhängen und was letztendlich der Auslöser der Entstehung ist, bleibt bislang noch ungeklärt. Betrachtet man die Unterpunkte jedoch einzeln, können unter ihnen jeweils die heutigen Forschungsergebnisse der Pathogenese des VHF eingeordnet und zusammengefasst werden.

Die Region in und um Pulmonalvenen wird heute als die bedeutendste Quelle von Vorhofflimmern auslösenden Extrasystolen angesehen (17). Optische Mapping-Studien im VHF-Hundemodell (18) (19) zeigen dies genauso wie die Wirksamkeit der Isolation der Pulmonalvenen durch Katheterablation als klinische Therapie bei VHF (20) (21) (22) (23). Der Mechanismus des Impulses ist nach wie vor noch nicht genau geklärt, jedoch geht man weitestgehend von Phase III getriggelter Aktivität aus, der frühe oder späte Nachdepolarisationen zugrunde liegen (17) (24) (25). Dieses Modell beschreibt, dass einem Aktionspotential einer Myozyte in einer vulnerablen Phase eine Nachdepolarisation folgen kann, welche die Erregungsschwelle der Zelle ebenfalls wieder überschreitet und ein erneutes Aktionspotential auslöst. Dies kann als

Erregungsimpuls, als sogenannter Trigger, dienen und teilweise auf refraktäres oder nicht refraktäres Myokard treffen und zu einer kreisenden reentrance Erregung führen (26) (27).

Betrachtet man nun als zweiten Punkt der Coumelschen Trias das Substrat des VHF, muss man das strukturelle sowie das elektrische Remodelling in Betracht ziehen. Remodelling beschreibt hier in beiden Fällen die Veränderungen in Struktur, Funktion und Morphologie, die im Zuge der Arrhythmie erkannt werden können. Es sagt nichts darüber aus, ob es Ursache oder Folge der Pathologie ist.

Im Zuge des elektrischen Remodellings ist bei chronischem VHF die Refraktärzeit verkürzt (28). Dies führt zu einer erhöhten Vulnerabilität der Myozyten für einen elektrischen Impuls, wodurch eine Re-Entry Aktivität ausgelöst werden kann, was in der Konsequenz VHF auslösen kann oder dies unterhält (29). Das elektrophysiologische Korrelat hierzu ist der erhöhte einwärts gleichgerichtete Kaliumstrom I_{K1} , der nach einem Aktionspotential für eine schnellere Repolarisation der myozytären Zelle sorgt. Der konstitutive, durch das autonome Nervensystem gesteuerte, $I_{K_{Ach}}$ Kaliumkanal ist beim VHF für diese Veränderung mitverantwortlich. Zwar nimmt seine Dichte im Verlauf des VHF auf den Myozyten, vermutlich durch körpereigene Gegenregulation, ab (30) (31), seine Agonisten unabhängige Offenwahrscheinlichkeit nimmt jedoch zu, wodurch im Endeffekt der einwärts gleichgerichtete Kaliumstrom I_{K1} ebenfalls zunimmt (32).

Außerdem zeigt sich bei VHF eine Verkürzung des Aktionspotentials, die aus dem erniedrigten L-Type Ca^{2+} Strom I_{Ca} (33) und dem erniedrigten Na^{+} Strom I_{Na} resultiert und dadurch ein in der Leitungsgeschwindigkeit verlangsamtes Vorhofmyokard bildet. Dieses Vorhofmyokard erhöht durch das längere gleichzeitige Vorhandensein von refraktärem und nicht refraktärem Myokard die Anfälligkeit für VHF (34). Der erniedrigte Calciumeinstrom, der u.a. durch eine Verkürzung der Phase III des Aktionspotentials ausgelöst wird, sowie die erniedrigte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bei gleichzeitig geringerer Synchronität können so von elektrischem Remodelling zu kontraktilem Remodelling führen (35) (36).

Das strukturelle Remodelling im Rahmen des VHF ist bei Myozyten gekennzeichnet durch eine vergrößerte Zellgröße, Myolyse, perinukleäre Anhäufung von Glykogen, Änderungen in der Connexin-Expression, Fragmentierung des Sarkoplasmatischen Retikulums sowie Änderungen der Mitochondrienstruktur (37). Außerdem findet man

Änderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM), wie man sie auch bei anderen Herzkreislauferkrankungen wie zum Beispiel der Hypertonie, Klappenerkrankungen oder der koronaren Herzerkrankung antrifft (38). Es wurde gezeigt, dass Patienten mit VHF Dysregulationen der Kollagen-Typen I und III aufweisen und dies mit dem Anstieg der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 korreliert, die für den Umbau der ECM verantwortlich sind (39). Zwei potentielle profibrotische Faktoren scheinen hier Angiotensin II sowie TGF- β 1 zu sein. Sie werden von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Modellen als Mediatoren des VHF's genannt (40). Die Fibrose führt zu einer elektrischen Leitungsverlangsamung beziehungsweise zu einer Inhomogenität der Leitungsausbreitung, die, wie oben beschrieben, durch die ungleichmäßige Repolarisierung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Re-Entry Erregungen und somit von VHF begünstigt (41). Ebenfalls leitungsverlangsamend und proarrhythmisch wirkt die bereits zuvor erwähnte Verminderung der Connexin CX40 Expression (42). Dies scheint einleuchtend, da Connexine als interzelluläre Kanäle, so genannte „Gap Junctions“, zwischen Myozyten den Austausch von niedermolekularen Molekülen und Ionen sicherstellen.

Die Remodelling-Prozesse bei VHF begünstigen nach dem Modell von Wijffels et al. 1995 die Perpetuierung Arrhythmie (43). VHF begünstigt die Entstehung von VHF. Remodelling als Substratveränderung kann so weder genau als alleinige Ursache noch lediglich als dessen Folge eingeordnet werden.

In die Kategorie der Regulierungsfaktoren nach Coumel kann man beim VHF das autonome neuronale Versorgungssystem einordnen, das sich aus sympathischer und parasympathischer Aktivität zusammensetzt und dessen Bedeutung für das VHF in verschiedenen klinischen (44) (45) (46) (47) und experimentellen Studien herausgestellt worden ist (48) (49) (50). Ein erhöhter kardialer Vagotonus kann über verkürzte effektive atriale Refraktärzeiten (AERP) das Auftreten von kreisenden Erregungen und somit von VHF begünstigen (51). Dem liegt eine Verkürzung der Wellenlänge der atrialen Erregung zugrunde (52). So wirkt ein erhöhter Sympathikotonus protektiv durch verlängerte atriale Refraktärzeiten dem entgegen (51). Andererseits sorgt eine sympathikogene intrazelluläre Calciumüberladung in Kombination mit verkürzten Aktionspotentialen wiederum für ein gehäuftes Auftreten von frühen Nachdepolarisationen (EAD), welche als arrhythmogener Impuls dienen (53) (54). Gerade Störungen im Gleichgewicht der beiden Gegenspieler Sympathikus

und Parasympathikus am Herzen scheinen, unabhängig von zugrundeliegenden strukturellen Vorhoferkrankungen, ein Auftreten von VHF zu begünstigen (55) (54). Darüber hinaus scheint aber auch bei VHF mit nicht phänotypisch dominantem Para- / Sympathikotonus, zum Beispiel auf dem Boden einer strukturellen Kardiopathie, ein neurales Remodelling im Vorhof aufzutreten. So ist gezeigt worden, dass ein vermehrter Anstieg von Thyrosin-hydroxylase positiven Nervenfasern in den Vorhöfen im Sinne einer erhöhten sympathischen Innervationsdichte mit der Entstehung und der Unterhaltung des VHF einhergeht. Dies zeigte sich sowohl in einigen Tiermodellen (56) (57) als auch in Humanmodellen (24) (58).

Von den Autoren Tan et. Al 2008 ist im VHF Hundemodell erstmals ein Teil des möglicherweise zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der sympathischen Hyperinnervation im Herzen postuliert worden (55). Sie konnten eine signifikante Erhöhung des transkardialen Plasmagradients für den nerve growth factor (NGF) bei hochfrequent stimulierten Hunden messen. In vitro konnten Gong et. Al 2009 zeigen, dass eine hochfrequente Stimulation (mit 6,7 Hz über 6 Wochen) zu einer erhöhten NGF-Protein-Expression in kultivierten Vorhofzelllysaten führt (59).

Unklar ist derzeit, ob das beobachtete nerve sprouting zu einer erhöhten neuronalen Aktivität führt. Darüber hinaus sind die zellulären Mechanismen, die zur autonomen Hyperinnervation führen, weitgehend unbekannt.

1.3 Hypothese

Elektrische hochfrequent wechselnde Felder, wie sie bei Vorhofflimmern in den Vorhöfen vorliegen, beeinflussen die Expression von neurotrophen Faktoren durch sympathische kardiale Neurozyten und induzieren deren Wachstum. Die Charakterisierung zugrunde liegender intrazellulärer Signalkaskaden kann neue Therapiewege zur Verhinderung eines pathologischen neuronalen Remodellings bei VHF erschließen.

1.4 Das Modell

Um andere Wechselwirkungen auszuschließen und erstmals zu zeigen, dass vermutlich allein rhythmische elektrische Felder über die autokrine/paracrine Wirkung der Faktoren NGF und NT-3, ausgeschüttet durch sympathische Neurozyten, sympathisches nerve sprouting bewirken, wurde für diese Studie bewusst ein In-vitro-Modell gewählt. Es bestand aus kultivierten sympathischen Neurozyten des Ganglion Cervicale Superior (SCG) von neonatalen Sprague Dawley Ratten. Dieses Modell ist vielfach in der Untersuchung von sympathischen Neurozyten und dem Zusammenhang mit neurotrophen Faktoren zum Einsatz gekommen und ist auch für diese Studie sehr geeignet (60) (61) (62).

Das SCG ist bei der Ratte direkt mit dem Ganglion Stellatum verbunden, dessen sympathische Efferenzen zusammen mit den parasympathischen Efferenzen den Plexus cardiacus bilden, der zudem noch Efferenzen aus anderen kleineren Ganglien rund um die Aorta und Pulmonalvenen erhält, die wiederum mit dem SCG in Verbindung stehen und schließlich das Herz versorgen (63). Diese nervale Verschaltung entspricht nicht genau der des menschlichen Körpers, da dort das Ganglion stellatum die meisten sympathischen kardialen Fasern enthält, kann aber im Modell als beste Annäherung gesehen werden. Beim Menschen stammen aus dem Nucleus intermediolateralis des 2.-4. Thorakalsegmentes die sympathischen Fasern, die das Ganglion stellatum versorgen, von dem die Nn. Cardiaci zum Plexus cardiacus ziehen und dort mit parasympathischen Fasern aus dem Nucleus dorsalis N. vagi zusammentreffen. Die sympathischen Fasern ziehen direkt zum Herzen ohne dort erneut, wie die parasympathischen Efferenzen, organnah in weiteren Geflechten verschaltet zu werden (64).

Bei VHF in-vivo sind also, dem verwendeten Modell bei der Ratte in unserer Studie entprechend, die kardialen sympathischen Nervenfasern rhythmischen elektrischen Feldern ausgesetzt.

Beim menschlichen VHF herrschen im Vorhof Frequenzen von ca. 300-600 Schlägen/min vor, entsprechend einer Frequenz von 5-10 Hz (65) (66) (9). Im Sinusrhythmus (SR) wird der Vorhof jedoch mit 60-100 Schlägen/min elektrisch erregt (67), woraus sich der Faktor vom SR zum VHF von ca. 1:8 ergibt.

Um die elektrischen Wechselfelder bei menschlichem VHF an unser Rattenmodell in-vitro anzupassen, errechneten wir analoge Frequenzen für unser Modell. Die Herzfrequenz der verwendeten neonatalen Ratten konnte mit einem speziellen Ultraschallgerät gemessen werden. Sie lag bei einer Stichprobe von $n=10$ im Mittel bei 360 Schlägen/min, also bei 6 Hz. Wendet man nun hierauf den errechneten Faktor 1:8 an, ergibt sich eine VHF Simulationsfrequenz im Modell von mindestens 48 Hz. Darüber hinaus wurden umliegende Frequenzen ebenfalls analysiert, um der Frequenzbreite von VHF gerecht zu werden und Grenzwerte zu untersuchen. In unserer Studie wurde eine Frequenztreppe von 5-99 Hz gefahren.

Außerdem musste in dem vorhandenen Modell der Neurozytenkultur die Spannung der elektrischen rhythmischen Stimulation passend gewählt werden. Hierzu wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits vorhandene atriale Rattenmyozyten-Zellkulturen mit einer Spontankontraktionsrate von 3-5 Hz untersucht. Da das elektrische Feld am Herzen für die Kontraktion der Myozyten sorgt und diese im Herzen von den Nervenfasern durchsetzt sind, kann man von einem einheitlichen elektrischen Feld am Herzen sprechen. So kann die rhythmische elektrische Spannung, bei der die Myozyten gerade nicht mehr im Eigenrhythmus schlagen, als Indikator für die benötigte Spannung im Modell stehen. Zunächst wurde die Kontraktionsreizschwelle in-vitro bestimmt. Es zeigte sich, dass gerade bei 1 V/cm elektrischer Stimulationsspannung und einer elektrischen Impulsdauer von 1 ms 90% der Myozyten bei einer gewählten Frequenz von 5 Hz kontrahierten, so dass schließlich die doppelte Reizschwellenspannung von 2 V/cm bei einer Impulsdauer von 1 ms als Standard für unser Stimulationsmodell gewählt wurde.

Als Stimulationsdauer wurden 48 h gewählt. Dies beruhte darauf, dass nach Stimulationsvorgang noch mind. 90 % vitale Zellen von der Ausgangspopulation im gleichen Sichtfeld im Mikroskop sein mussten, bevor die Kultur verworfen wurde. Es konnten sowohl während der Stimulation Mediumproben abgenommen werden als auch nach der Stimulation die Zellen für Zelllysate oder Zellfärbungen verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

Für die Zellkulturen wurden sympathische Neurozyten aus dem Ganglion Cervicale Superior (SCG) von neonatalen Sprague Dawley Ratten isoliert. Die Ratten waren zu diesem Zeitpunkt zwischen drei und fünf Tagen alt. Die Tiere wurden gemäß den Vereinbarungen für Tierschutz in der Tierversuchskunde der RWTH Aachen gehalten.

2.1.1 Präparation des Ganglion Cervicale Superior

Zuerst wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Forene©) getötet, um anschließend umgehend mit der Präparation der SCGs beginnen zu können. Hierzu wurden die toten Tiere mit Nadeln auf Wachsplatten fixiert, um mit dem Präparationsbesteck unter einer Vergrößerungslupe mit 5× Vergrößerung arbeiten zu können. Zur Präparation waren als Arbeitsbesteck zwei feine Pinzetten und zwei feine Scheren nötig. Es wurde, wie in **Abbildung 2** dargestellt, sorgfältig von ventral nach dorsal unter Berücksichtigung der anatomischen Strukturen präpariert. In der untersten Schicht wurde die Arteria carotis communis sichtbar. Wurde diese vorsichtig zur Seite gehoben, trat medial das SCG deutlich hervor und konnte mithilfe von zwei feinen Pinzetten entnommen werden. Anschließend wurde es zügig in Nährlösung (NL) überführt.

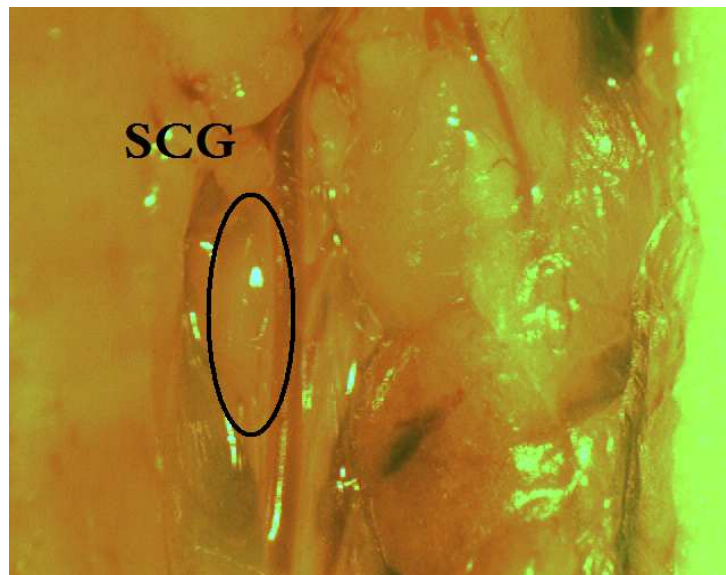
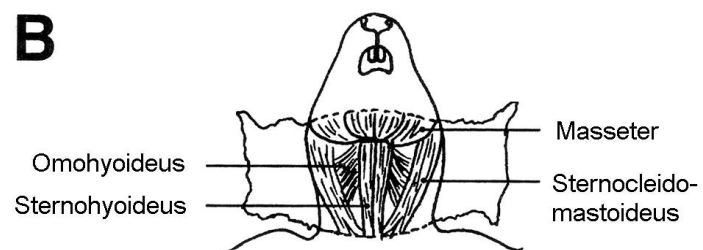
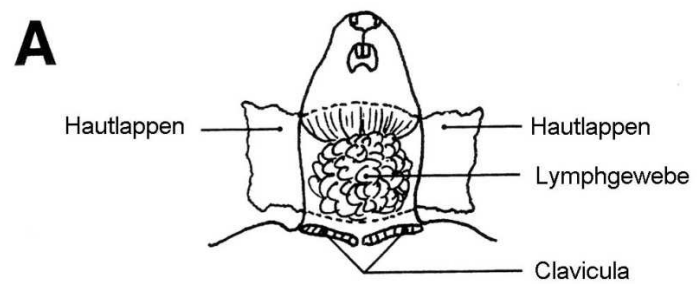


Abbildung 1: Darstellung eines linksseitigen SCG einer neonatalen Ratte im letzten Präparationsschritt vor Entnahme.



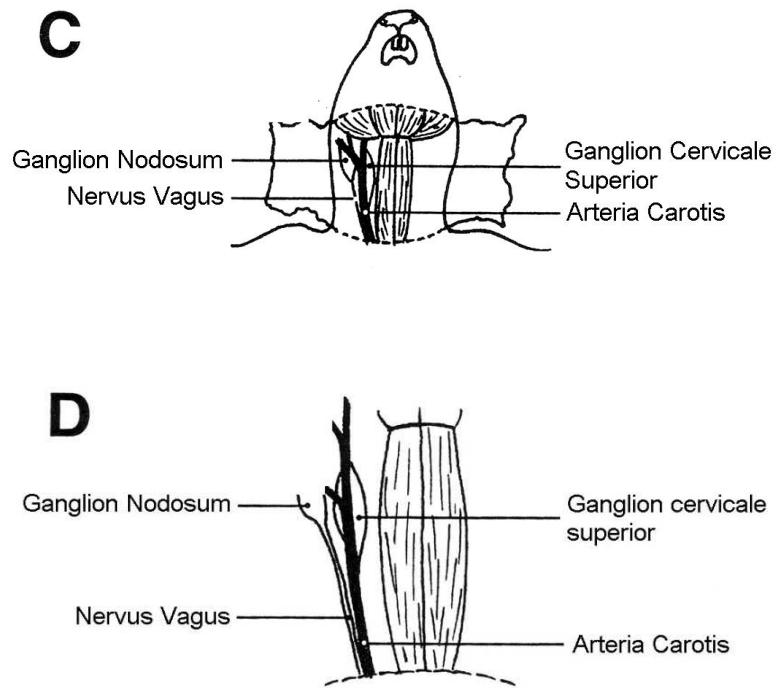


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Präparationsschritte A-D zur Entnahme der SCG.

Die NL setzte sich wie folgt zusammen und wurde in einer Petrischale auf Eis aufbewahrt :

- 9 ml Neuronal Base Medium (NBM) von PAA Cat. No. U15-24
- 1 ml Fetal calf serum (FCS)
- 20 µl PenStrep© von PAA
- 2 µl Insulin 28 U/mg Bovine von Sigma-aldrich

In dieser Nährlösung wurden die SCGs gesammelt, um anschließend mit der Verdauung des Zellverbundes beginnen zu können. Um drei Kulturen in insgesamt drei Wells einer 6-Well-Kulturschale anlegen zu können, wurden mindestens 14 neonatale Ratten bzw. 28 SCGs, bei entsprechend erfolgreicher bilateraler Entnahme benötigt.

2.1.2 Isolation der Neurozyten

Ziel war es, durch die Isolation eine Reinkultur von sympathischen Neurozyten zu erhalten. Unter dem Mikroskop wurden die SCG zu Beginn mit Pinzette und Schere von unerwünschtem Material getrennt, bis mit der enzymatischen Verdauung begonnen werden konnte. Hierzu wurden die SCG in ein 1,5 ml Sammelröhrchen überführt, welches mit der Verdauungslösung (VL) gefüllt war. Ziel dieses Schrittes war es, den Zellverbund der sympathischen Neurozyten als SCG aufzutrennen und Einzelzellen zu erhalten.

VL:

- 800 µl NBM
- 200 µl Trypsin 1:250 von PAA
- 20 µl PenStrep®
- 1,5 mg Collagenase Type: CLS II 254 U/mg von Biochrom AG

Der eigentliche Verdauungsvorgang dauerte 40 min und wurde im Brutschrank (Heraeus 6000) bei einer Temperatur von 37°C und einem CO² Gehalt von 6% durchgeführt.

Um die enzymatische Verdauung nach diesen 40 min zu stoppen, wurde das Sammelröhrchen aus dem Brutschrank entnommen und mit 150 µl FCS versetzt. Da nach diesem Verdauungsschritt gewöhnlich noch viele Zellen zu makroskopisch sichtbaren Klumpen aneinanderhafteten, folgte die mechanische Verdauung durch mehrfache Re-Suspension mit zu Beginn 1000 µl- sowie anschliessend 100 µl-Pipettenspitzen. Durch diesen Vorgang entstand eine trübe Lösung, in der Einzelzellen gelöst waren.

Um nun im folgenden Schritt nicht neurozytäre Zellen des SCG, wie zum Beispiel Schwannsche Zellen oder Fibroblasten, zu entfernen, folgte die erste Zentrifugation (Heraeus Pico 17) des Sammelröhrchens für 2 Minuten bei 3000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in einer Suspensionslösung (SL) suspendiert.

SL:

- 5 ml NBM
- 1 ml FCS
- 20 µl PenStrep©
- 2 µl Insulin

Die SL mit den gelösten Zellen wurde nun dem Vorgang des „differential adhesion“ unterzogen, bei dem die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der Zellen, in unserem Fall am Schalenboden, zunutze gemacht werden, um diese nach ihrem Typ aufzutrennen. Ziel hierbei war es nun, die Schwannschen Zellen und die Fibroblasten aus der Zellslösung zu entfernen. Es wurde daher die SL mit den gelösten Zellen in eine Petrischale gegeben und für 2 h bei 37°C und einem CO² Gehalt von 5% im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde der flüssige Überstand der Petrischale entnommen und erneut bei 3000 rpm für 2 Min in nun vier 1,5 ml Sammelröhrchen zentrifugiert. Die flüssigen Überstände wurden verworfen und das Zellsediment im Final-Base-Medium (FBM), welches zur Zellkulturanlage geeignet ist, gelöst.

FBM (steril gefiltert):

- 9 ml NBM
- 1 ml FCS
- 20 µl PenStrep©
- 2 µl Insulin
- 100 µl BrDu von Sigma Cat. No. B9285

2.1.3 Anlage der Zellkultur

Je nach verwendeter Zellmenge konnten aus der Final-Base-Medium-Zell-Lösung nun entsprechend viele Zellkulturen in 6-Well-Kulturschalen angelegt werden. Es wurden standardmäßig 3 ml der Final-Base-Medium-Zell-Lösung in ein Well gegeben. Zur besseren Haftung der Neurozyten wurden die verwendeten Wells zuvor mit Poly-L-

Ornithin von Sigma Cat. No. P4957 beschichtet. Es wurde ein 1 ml Poly-L-Ornithin pro Well verwendet, für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend 3 mal mit 3 ml PBS Dulbecco von Biochrom AG vorsichtig gewaschen, bevor die Zellen in die 6-Well-Kulturschalen gegeben werden konnten. Die Zellkulturen wurden nun ständig im Brutschrank bei 37°C mit einem CO² Gehalt von 5 % aufbewahrt.

2.1.4 Mediumwechsel

Der erste Mediumwechsel der Zellkultur erfolgte nach 2 Tagen, da erst zu diesem Zeitpunkt von einer ausreichenden Zellhaftung ausgegangen werden konnte. Beim Mediumwechsel wurden die 3ml FBM vorsichtig abgesaugt und anschließend die einzelnen Wells 2 mal mit NBM gewaschen. Anschließend wurden pro Well 3 ml der Finalen-Experimentier-Lösung (FEL) hinzugegeben.

Nach dem Mediumwechsel wurde 24 h gewartet bevor die Experimente mit den Zellkulturen durchgeführt wurden, um so den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich an das frische Medium anzupassen.

FEL:

- 10 ml NBM
- 20 µl PenStrep©
- 100 µl BrDu

2.2 Hochfrequente Stimulation

Zur hochfrequenten elektrischen Stimulation unserer Zellen verwendeten wir den externen Zellkulturstimulator C-Pace EP von Ion Optix Corporation (The Netherlands). Über vorgefertigte Kabel wird das Steuergerät mit sogenannten C-Dishes verbunden. Es können bis zu vier C-Dishes gleichzeitig am Gerät betrieben werden. C-Dishes sind, passend auf 6-Well-Kulturschalen, in Kunststoff eingegossene Kohleelektroden, wobei jeweils zwei Elektroden mit einem Abstand von 1 cm in ein Well eintauchen und die

am Gerät gewählte Spannung mit der gewählten Frequenz als Gleichstrom durch das Medium der Zellkultur leiten.



Abbildung 3: Steuergerät C-Pace EP von Ion Optix Corporation (The Netherlands) zur hochfrequenten Stimulation der Zellkulturen.

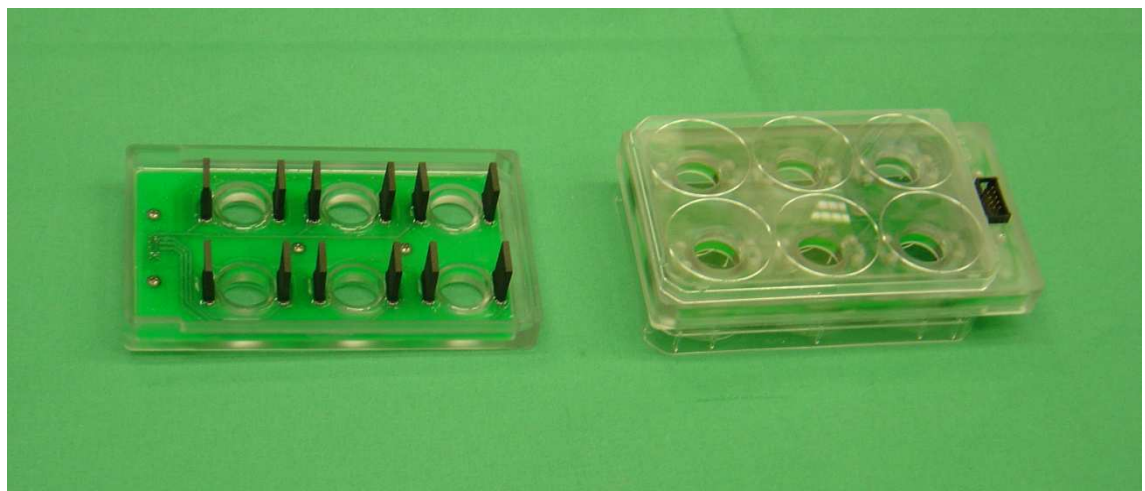


Abbildung 4: Links im Bild C-Dish von Ion Optix Corporation (The Netherlands) zum Verwenden mit 6 Well-Kulturschalen. Rechts im Bild fertig präparierte 6 Well-Kulturschale mit C-Dish und Abdeckung.

Am Steuergerät können Spannungen von 0 V bis 40 V, Frequenzen von 0 Hz bis 99 Hz und eine Impulsdauer von 0,4 ms bis 7,8 ms eingestellt werden. Die Frequenz gibt an,

wie häufig im Wechsel der elektrische Gleichstrom pro Sekunde durch das Gerät an- bzw. ausgeschaltet wird. Es liegt also ein ständig rhythmisch wechselndes elektrisches Feld vor, welches am Steuergerät durch die gewählte Spannung, die gewählte Frequenz und die gewählte Impulsdauer determiniert wird.

Ein C-Dish, das bedeutet also 6 Wells innerhalb einer Kulturschale, kann gleichzeitig nur mit den gleichen Bedingungen angesteuert werden, so dass Divergenzen durch eventuell unterschiedliche benachbarte elektrische Felder nicht zu erwarten sind. Die zu stimulierenden Zellkulturen befanden sich während der Stimulation weiter im Brutschrank, so dass die äußeren Bedingungen der Zellkultur konstant waren. Die maximale Stimulationsdauer in unseren Experimenten betrug 48 h. Es wurde mit variablen Frequenzraten von 5-99 Hz, konstanten Spannungszahlen von 2 V/cm und konstanter Impulsdauer von 1 ms stimuliert. Durch Aussparungen in den C-Dishes war es möglich, während des Stimulationsvorgangs Mediumproben abzunehmen. Um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung zu minimieren, wurden die Aussparungen während der Inkubationszeit durch Kunststoffdeckel abgedeckt.

2.3 Nativbilder

Nach der elektrischen Stimulation der Zellkulturen mit dem C-Pace EP konnten die Neurozyten mittels der Mikroskopkamera Myocam von Ion Optix, welche auf dem Mikroskop Nikon Eclipse TS 100 installiert war, in den 6-Well-Schalen fotografiert und untereinander verglichen werden. Bei einer 40-fachen Vergrößerung war die Neurozytenmorphologie eindeutig und gut zu erkennen. Die Neurozyten waren zwei Tage nach Anlage der Zellkultur als Zellrasen auf dem Boden der einzelnen Wells festgewachsen (siehe hierzu auch Abb. 13 u. 14).

2.4 Immunfluoreszenz

Um einzelne gewünschte Strukturen oder Proteine in den Neurozyten nachzuweisen, wurde die Immunfluoreszenz-Technik eingesetzt. Zuerst bindet in einem spezifischen Vorgang ein Primärantikörper als Marker an das gesuchte Protein. Er besitzt außer der proteinspezifischen Bindungsstelle eine Bindungsstelle für den Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper besitzt fluoreszierende Eigenschaften bei Bestrahlung mit spezifischem Licht einer definierten Wellenlänge. Wird nun die Zellkultur unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M mit Axiovision REL. 4.5) mit diesem Licht bestrahlt, reflektiert der gebundene Sekundärantikörper und ermöglicht so, das gesuchte Protein zu identifizieren und lokalisieren. Je nach Fragestellung wurden in den Versuchen unterschiedliche Primärantikörper verwendet; passend dazu wurden auch entsprechende Sekundärantikörper verwendet. Der Zellkern wurde in jeder Färbung mit dem Farbstoff Diamin phenylindol (DAPI) angefärbt. Die spezifischen Färbungen sind im weiteren Verlauf beschrieben. Die ersten Schritte der Herstellung der immer benötigten Lösungen wurden vor jeder Färbung identisch durchgeführt.

Blocking solution (BS):

- 10 ml PBS + 100 mg Bovines Serum Albumin (BSA)

Permeabilisierungslösung (PL):

- 1,5 µl Triton X- 100 von biomol Cat. No. 50800 in 1,5 ml BS

Paraformaldehyd 4% (PFA):

- 100 ml PBS unter Rühren auf 60°C erhitzen
- 4g PFA von Merck Cat. No. 18715.1000 dazugeben
- bis Lösung klar wird, 2-5 Tropfen 2M NaOH titrieren
- Hitzezufuhr stoppen
- mit 1M HCL auf 7,4 pH einstellen
- steril filtern

Die folgenden Schritte der Färbung sind je nach Modell des Versuchs mit unterschiedlichen AK durchgeführt worden und schlossen sich den vorherigen Schritten an. Bei jeder Färbung wurde zusätzlich zu dem verwendeten AK, wie bereits beschrieben, eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt:

- Well der Zellkultur 2 mal mit jeweils 3 ml PBS waschen
- 3 ml PFA für 5 min auf das Well geben
- Well 2 mal mit jeweils 3 ml PBS waschen
- Membranpermeabilisierung mit 1,5 ml PL
- Für eine halbe Stunde auf den Shaker bei 3-5 rpm
- Well 2 mal mit jeweils 3 ml PBS waschen
- 1,5 ml BS in das Well geben
- Primärantikörper (PAK) in das Well geben
- 12 h auf Shaker bei 3-5 rpm
- Well 2 mal mit jeweils 3 ml PBS waschen
- 1,5 ml BS in das Well geben
- 100 µl DAPI pro Well von Invitrogen Cat. No. D3571
- Sekundärantikörper (SAK)
- 1 h auf Shaker, mit Alufolie abgedeckt
- Well 2 mal mit jeweils 3 ml PBS waschen

Für die angegebenen Proteine sind folgende Typen und Mengen AK verwendet worden:

GAP-43:

- PAK: 10 µl GAP-43 AK (H-100) Santa Cruz 10786 rabbit
- SAK: 7 µl Alexa 488 goat anti-rabbit IgG von Invitrogen Cat. No. A11008

Thyrosinhydroxylase:

- PAK: 10 µl TH AK (H-196) Santa Cruz 14007 rabbit
- SAK: 7 µl Alexa 488 goat anti-rabbit IgG von Invitrogen Cat. No. A11008

Anschließend konnten die Kulturen mit den für den SAK typischen Wellenlängen (488 nm) beleuchtet und die Bilder ausgewertet werden.

2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein ELISA wurde zum Nachweis der Proteine NGF und NT-3 im Medium der Zellkulturen verwendet. Hierzu wurden Elisa-Kits der Firma R&D Systems verwendet. Dem Nachweis von NGF diene das Duo-Set Rat beta-NGF Cat. No. DY556 und dem Nachweis von NT-3 das Duo-Set Human NT-3 Cat. NO. DY267. Die benötigte Menge Medium (100µl) wurde als Probe zu gewählten Zeitpunkten den Zellkulturen entnommen. In den Experimenten wurde standardmäßig eine 96-Well-Platte verwendet.

Lösungen:

Wash Buffer (WB):

- 0,05 % Maxag Tween-20 von Rockland TW0020 in PBS (25 µl in 50 ml) pH 7,4

Reagent Diluent (RD):

- 1 % BSA in PBS (500 mg in 50 ml) pH 7,4

Capture Antibody Solution (CABS):

- Capture Antibody (CAB) für NGF (Part. No. 840334), für NT-3 (Part. No. 840210) als 72 µg Pulverform geliefert
- mit 1 ml PBS verdünnen
- als 66,66 µl aliquotieren
- Aliquot 15fach mit 933,33 µl PBS verdünnen

Detection Antibody Solution (DABS):

- Detection Antibody (DAB) für NGF (Part. No. 840335), für NT-3 (Part. No. 840211) als 18 µg Pulverform geliefert
- mit 1 ml RD verdünnen

- als 66,66 µl aliquotieren
- Aliquot 15 fach mit 933,33 µl RD verdünnen

Streptavidin-HRP Solution (SHS):

- Streptavidin-HRP (Part. No. 890803) als 1 ml Konzentrat geliefert
- 200-fach mit RD verdünnen

Substrate Solution (SS) von R&D Systems Substrate Reagent Pack Cat. No. DY999:

- 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidine)

Elisa Prozedur:

- für Endmenge CAB 144 ng, 30 µl der CABS pro Well pipettieren
- mit PBS auf 100 µl auffüllen
- 24 h bei Raumtemperatur auf den Shaker 3-5 rpm
- 3 mal mit 100 µl WB pro Well in Abständen von 5 min waschen
- 100 µl unverdünnte Mediumprobe pro Well
- 24 h bei 4°C auf den Shaker 3-5 rpm
- 3 mal mit 100 µl WB pro Well in Abständen von 5 min waschen
- Platte vorsichtig umgedreht auf Tuch klopfen
- Für Endmenge DAB 36 ng, 30 µl der DABS pro Well pipettieren
- mit RD auf 100 µl verdünnen
- für 3 h bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 mal mit 100 µl WB pro Well in Abständen von 5 min waschen
- 100 µl SHS pro Well
- 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 3 mal mit 100 µl WB pro Well in Abständen von 5 min waschen
- 100 µl SS pro Well
- Maximal 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- 50 µl Stop Solution von R&D Systems Cat. No. DY994

Zur Kontrolle und Konzentrationsbestimmung wurde außerdem zu jeder Messung eine Standardgerade angelegt.

Standardgerade Basic Solution (SGS):

- Standardgerade für NGF (Part. No. 840336), für NT3 (Part. No. 840212) geliefert als 75µg Pulver
- 37,5 µg in 500 µl RD auflösen
- in 2 µl aliquotieren
- Aliquot mit 1500 µl RD verdünnen
- SGS mit Konzentration von 100 ng/ml

Ausgehend von der SGS mit einer Konzentration von 100 ng/ml wurde noch eine Konzentrationsreihe mit 50/25/12,5/6,25/3,13/1,56/0,78 ng/ml mit jeweils einer Flüssigkeitsmenge von 100 µl angelegt.

Diese 100 µl wurden jeweils, wie die Mediumproben, unverdünnt auf mit DAB inkubierte Wells pipettiert. Die erste Spalte der 96-Well-Platte diente dazu als Standardgerade.

Anschließend erfolgte die Messung mit dem Gerät Optima von BMG Labtech. Die Excitation-Wellenlänge lag bei 450 nm und die Emission-Wellenlänge bei 520 nm.

2.6 Polymerase chain reaction (PCR)

2.6.1 RNA Isolation

Zur Isolation der gesamten RNA wurde das RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen (Cat. No. 74104) benutzt.

Inhalt des Kits:

- RLT Puffer

- RPE Puffer
- RW1 Puffer
- RNase freies Wasser
- RNeasy Qiashredder (lila)
- RNeasy Spincolumn (pink)
- Sammelröhrchen 1,5 ml / 2ml

Benötigte zusätzliche Materialien:

- Zellschaber von Sarstedt Cat. No. 831.830
- PBS Puffer
- 2-Mercaptoethanol von Carl Roth Cat. No. 4227.3

Alle Schritte sind bei Raumtemperatur unter einer Clean-Bench von Heraeus Instruments durchgeführt worden. Die Zentrifugationen erfolgten auch bei Raumtemperatur in einer Heraeus Pico 17 Zentrifuge.

Prozedur:

- Jedes Well der 6-Well-Zellkulturschale jeweils 3 mal mit 3 ml PBS waschen
- 350 µl RLT Puffer mit 1% Mercaptoethanol pro Well hinzugeben und 30 Sekunden warten
- Das entstehende Zelllysate mit einem Zellschaber vom Boden kratzen und mit einer Pipette in ein Sammelröhrchen überführen und dort durch mehrmaliges Aufsaugen mit der Pipettenspitze homogenisieren
- Die Suspension in einen Qiashredder geben und bei 13.000 rpm für 2 min in ein 1,5 ml Sammelröhrchen zentrifugieren
- Den Flüssigkeitsüberstand in ein neues Sammelröhrchen überführen, 350 µl Ethanol 70 % hinzufügen und erneut homogenisieren
- Die Suspension in ein RNeasy Spincolumn überführen, welches in ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt ist und anschließend für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugieren

- Die Flüssigkeit im 2 ml Sammelröhrchen wird verworfen und das RNeasy Spinculum wieder in das Sammelröhrchen gesteckt
- 700 µl RW1 Puffer in das Spinculum geben und bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugieren
- Das 2 ml Sammelröhrchen wird verworfen und es wird ein neues darunter gesteckt
- 500 µl RPE Puffer in das Spinculum geben und bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugieren
- Die Flüssigkeit im Sammelröhrchen wird erneut verworfen und das Spinculum wieder hineingesteckt
- 500 µl RPE Puffer in das Spinculum geben und bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugieren
- Das 2 ml Sammelröhrchen verwerfen und durch ein 1,5 ml Sammelröhrchen austauschen
- 50 µl RNase freies Wasser in das Spinculum geben und bei 10.000 rpm für eine Minute im 1,5 ml Sammelröhrchen zentrifugieren

Anschließend konnten die Proben bei -20 C° eingefroren und später weiterverwendet oder, auf Eis lagernd, einer Messung zugeführt werden.

2.6.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Messung der RNA Konzentration erfolgte mit dem Gerät Nanodrop-1000 der Firma Thermo Scientific, welches mit spectrophotometrischer Methode und UV-vis-Wellenlängen zwischen 220 – 750 nm arbeitet (68). Unter Spektrophotometrie versteht man die Messung der Absorption von Strahlung bestimmter Wellenlängen durch Materie, in unserem Fall RNA.

Es wurde anhand der Anleitung der Firma Thermo Scientific für das Gerät Nanodrop-1000 mit der Messung der Proben verfahren. Hierzu wurde bei jeder benötigten Messung eine Probe isolierter RNA, gelöst in RNase-freiem Wasser, mit gleichem Volumen (1,5 µl) der photometrischen Messung zugeführt. Mit den gewonnenen Konzentrationswerten konnte anschließend eine quantitative Transkription in cDNA erfolgen.

2.6.3 Reverse Transkription in cDNA

Die Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA erfolgte mit dem Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas-LifeSciences Cat. No. K1622. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Clean-Bench durchgeführt.

Inhalt des Kits:

- Random Hexamer Primer
- 5fach Reaction Puffer
- dNTP-Mix 10 mM
- RiboLock® RNase Inhibitor (20 u/μl)
- RevertAid® M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl)
- Oligo (dT)₁₈ Primer
- Forward GAPDH Primer, 10 μm
- Reverse GAPDH Primer, 10 μm
- Control GAPDH RNA
- DPEC-treated Water

Durch die Messung der RNA-Konzentration war es möglich, zur Umschreibung verschiedene Proben zu normieren, damit alle die gleiche absolute RNA-Menge enthielten. Innerhalb einer Probenreihe musste dieser Zielwert der Qualität, also der Höhe der RNA-Konzentration, angepasst werden. Der Zielwert lag zwischen 500 – 1000 ng. Um mit dem Kit arbeiten zu können, mussten alle Proben einer Reihe nicht nur die gleiche absolute RNA-Menge, sondern auch die gleiche Volumenmenge enthalten. So wurden die verschiedenen Proben mit DEPTC-Wasser auf einen gemeinsamen Volumenwert (50 – 80 μl) in einem 1,5 ml Sammelröhrchen aufgefüllt.

Master Mix herstellen (MM):

Pro zu messender Probe müssen die folgenden Chemikalien in angegebener Menge in ein 1,5 ml Sammelröhrchen gegeben werden, woraus dann letztendlich 7 μl MM für die Prozedur entnommen werden.

- 4 µl 5fach Reaction Puffer
- 2 µl dNTP-Mix 10 mM
- 1 µl RNasin Inhibitor

Prozedur:

- 1 µl Random-Hexamer-Primer in das Probensammelröhrchen geben und kurz herunterzentrifugieren
- Für 5 min bei 70°C schütteln und anschließend für 5 min auf Eis stellen
- 7 µl des MM in ein Probenröhrchen hinzufügen und kurz runterzentrifugieren
- Für 5 min bei 25°C schütteln
- 1 µl reverd-aid-MMuLV-RT hinzugeben
- Für 10 min bei 25°C schütteln
- Für 60 min bei 42°C schütteln
- Für 10 min bei 70°C schütteln

Anschließend konnten die Proben bei -20 C° eingefroren oder später, auf Eis lagernd, weiterverarbeitet werden.

2.6.4 Real Time PCR-Amplification

Die Real-Time-PCR-Amplification wurde mit Taq-Man-Gene-Expression-Assays der Firma Applied Biosystems vorbereitet und mit dem Gerät Step One Plus von Applied Biosystems in 96-Well optischen Reaktionsplatten (A&B Cat. No. 4306737) durchgeführt.

Vor Beginn der PCR wurde ein genauer Pipettier- und Amplifikationsplan erstellt, um spätere Pipettierfehler auf der 96-Well-Platte zu verhindern. Standardmäßig lief bei jeder Amplifikation in einer Spalte ein Assay mit den entsprechenden unterschiedlichen Proben in den Zeilen.

Materialien:

- TaqMan Gene Expression Master Mix von A&B Kat. No. 4369514 (TMM)
- TaqMan Gen Assays (GA)

Endogenous Control (B2m) Kat. No. Rn0560865_ml

NGF (Ngfb) Kat. No. Rn01533872_ml

NT-3 (Ntf3) Kat. No. Rn00579280_ml

TrkA (Ntrk1) Kat. No. Rn00572130_ml

- Step One Plus Gerät von Applied Biosystems
- PC mit SDS 1.7 Software zur Datensammlung und Analyse
- 96-Well-optische-Reaktionsplatten (A&B Cat. No. 4306737)
- RNase-freies steril gefiltertes Wasser
- Zentrifuge von Heraeus mit 96-Well-Platten Einsatz

Mastersolution herstellen (MS):

Für jedes Assay wird eine eigene MS hergestellt. Entsprechend der Anzahl der Proben, die mit einem Assay laufen, die Menge der folgenden Chemikalien in ein Sammelröhrchen pipettieren und beschriften

- 5 µl TMM
- 3,5 µl RNase freies Wasser
- 0,5 µl GA

Prozedur:

- 9 µl MS, den Assays entsprechend, in die verwendeten Reaktionswells pipettieren
- 3 µl der Probe in das jeweilige Reaktionswell pipettieren

- Die 96-Well-Platte leicht auf den Tisch klopfen, um eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen
- Die 96-Well-Platte mit Mikro-Amp Folie überkleben und glattstreichen, hierzu Materialien aus Abi Prism optical adhesive cover starter Kit Kat. No. 4313663 verwenden
- anschließend bei 1500 rpm zentrifugieren
- mit dem Step One Plus die Amplifikation nach folgendem Protokoll durchführen

Amplifikationsprotokoll:

Holding Stage	Step 1: 10 min, 95°C
---------------	----------------------

Cycling Stage	Step 1: 15 s, 95°C
	Step 2: 1 min, 60°C

Anzahl der Zyklen: 50

Die Ergebnisse sind durch den Gebrauch der vergleichenden C_T Methode ausgewertet worden, um die relative Menge RNA zu bestimmen. Die vergleichende C_T Methode ist ähnlich der Methode der Standardkurve, unterscheidet sich jedoch von ihr dadurch, dass sie arithmetische Formeln gebraucht, um die gleichen Ergebnisse relativ zu quantifizieren. (69)

2.7 Western Blot

2.7.1 Zellyse

Um anschließend die zellulären Proteine messen zu können, musste zuerst eine Lyse der SN aus der Zellkultur durchgeführt werden. Hierzu wurde der folgende Zellysepuffer hergestellt.

Nonidet-P40 (NP-40) Lysepuffer (LP):

- 20 mM Tris HCL pH 8
- 137 mM NaCl
- 10 % Glycerol
- 1 % Nonidet P-40
- Proteinase Inhibitor Cocktail von Biomol Cat. No. KI103-0001

Anschließend wurde die Lyse nach folgendem Schema durchgeführt:

- Well 3 × mit PBS waschen
- 350 µl LP hinzugeben
- Zellen mit Zellschaber abkratzen und in 1,5 ml Sammelröhrchen überführen
- Lysat mit einer spitzen Kanüle homogenisieren
- 20 min mit 12.000 RPM bei 4°C zentrifugieren
- das Pellet wird verworfen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen übernommen und anschließend auf Eis gelagert
- Proteinbestimmung mit Nanodrop (Thermo Scientific) nach Protokoll des Herstellers
- Probe anschließend für weiteren Gebrauch auf Eis lagern

2.7.2 Gele herstellen

Für die zu messenden Proteine mit Größen von 15-100 kDa wurde ein Gelprozentsatz von 10% sowohl für das Trenngel als auch das Sammelgel gewählt.

Trenngel 10%:

- 8 ml H₂O
- 5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8
- 6,6 ml Rotiphorese Gel 30 von Carl Roth Cat. No. 3029.1
- 200 µl 10% SDS von Biomol Cat. No. 51430-2
- 200 µl 10% APS von Biomol Cat. No. 50404-1
- 20 µl TEMED von Biomol Cat. No. 50406-1

Sammelgel 10%:

- 5,6 ml H₂O
- 2,5 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8
- 1,7 ml Rotiphorese Gel 30
- 100 µl 10% SDS
- 100 µl 10% APS
- 10 µl TEMED

Zunächst wurde das Trenngel in die Kammer gegossen, 1 ml Isopropanol darüber gegeben und gewartet, bis die Polymerisation beendet war.

Anschließend wurde das Sammelgel eingegossen und der Kamm von Carl-Roth Cat. No. Y001.1 in die Kammer gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass sich möglichst keine Blasen bildeten.

2.7.3 Proteinproben

Die bis jetzt auf Eis gelagerten Proben wurden kurz herunterzentrifugiert, bei 95°C für 10 Minuten erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gelagert. Zuletzt wurden sie bei 13.000 RPM für eine Minute zentrifugiert und dann auf 50 µg Protein pro Geltasche normiert. Zuvor wurde im Verhältnis 1:4 Laemmli-Buffer hinzugegeben, der wie folgt hergestellt wurde.

5-fach SDS Sample Buffer (Laemmli-Buffer):

- Tris Base 250 mM
- SDS 10%
- Glycerol 50%
- Bromphenolblau 0,025% ad 50 ml von Carl-Roth Cat. No. A512.1
- 2-Mercaptoethanol

2.7.4 Kammer beladen

Die Kammer (Mini Vertikal doppel Elektrophoresekammer von Carl-Roth Cat. No. Y001.1) wurde, nachdem die Gele mit den Taschen gegossen waren, nach folgendem Schema beladen:

- Innere Kammer mit 1-fach SDS Running Buffer (Herstellung siehe unten) befüllen
- Äußere Kammer nur halb befüllen und Ausgleich beobachten, dabei innere Kammer nicht überlaufen lassen und Taschen unter dem Buffer halten
- Kamm aus der Lösung herausnehmen
- Beladen mit den Proben (50 µg Protein pro Tasche) und Markern (10µl)
- Die Positivkontrolle beim ersten Run mitstarten
- Run starten bei: 150 V, 500 mA, 150 W für ca. 60 min, bis Lauffront (Phenolblau) am Ende angekommen ist

1 × SDS Running Buffer pH 8.3:

- Tris Base 25 mM
- Glycin 200 mM
- SDS 0,1% (w/v)

2.7.5 Blotten

Zuerst wurde der Transferbuffer (TB) und PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T) hergestellt.

10 × TB:

- Tris Base 250 mM
- Glycin 1,92 M
- Methanol 10 % (v/v)

Anschließend wurde der TB auf 1-fach verdünnt, um ihn einzusetzen.

PBS-T:

- MaxTaq Tween 20 von Rockland Cat. No. TW0020
- mit PBS auf 0,1% verdünnen

Es folgte die Blotting-Prozedur nach Schema:

- Zurechtschneiden der PVDF und Whatman Membran
- PVDF-Membran mit Methanol benetzen, wodurch sie aktiviert wird
- Whatman-Membran in Transferbuffer 1-fach einweichen
- Kammer durch Aufhebeln der Glasplatten öffnen
- Sammelgel abtrennen und Ränder schneiden
- Zwischen PVDF- und Whatman-Membran im SemidryBlotter von VWR einspannen
- Für 90 min bei 0,8-1 mA pro cm² bei konstanter Stromstärke blotten
- Blot in PBS-T für 12 h ruhen lassen

2.7.6 Blocken des Blottes

Prozedur für Blocken über 30 min:

- 10% BSA (100 ml PBS-T + 10 g BSA) bei Raumtemperatur für 30 min auf einen Rotator stellen
- Nach Blocken mit PBS-T für 5 min waschen

2.7.7 Proteindetektion

Primärantikörperlösung (PAKL) herstellen:

- 10 ml PBS-T

- 10 g BSA
- Jeweiligen PAK hinzugeben

Verwendete PAK:

- GAPDH rabbit polycl. 1:1000 10 µl in 10 ml von Santa Cruz Cat. No. Sc-25778
- NGF (H-20) rabbit 1:500 20 µl in 10 ml von Santa Cruz Cat. No. Sc-548
- NT3 (N-20) rabbit 1: 500 20 µl in 10 ml von Santa Cruz Cat. No. Sc-547
- TrkA rabbit 1:1000 10 µl in 10 ml von Santa Cruz
- GAP-43 (H-100) rabbit 1:1000 10 µl in 10 ml von Santa Cruz Cat. No. Sc-10786

Sekundärantikörperlösung herstellen:

- 10 ml PBS-T
- Jeweiligen SAK hinzugeben

Verwendete SAK:

- Goat anti-rabbit IgG 10 µl in 10 ml von Invitrogen Cat. No. G21079

Prozedur:

- Geblottete Membran für 60 min bei RT in 10 ml PAKL auf Rotator
- Anschließend 3 mal mit PBS-T für jeweils 5 min waschen
- 10 ml SAKL hinzugeben und für 60 min bei RT auf Rotator
- 3 mal mit PBS-T für jeweils 5 min waschen
- 1 mal mit PBS-T für 15 min waschen
- 1 mal mit PBS waschen

2.7.8 Enhanced Chemoluminescence (ECL)

Mit der ECL-Methode wurde nun mittels der Kamera CAS 3000 Imager von Fuji Film die absolute Proteinkonzentration bestimmt.

Einstellungen:

- Herunterkühlen auf -30 °C
- Method Tray und Method => Chemoluminescence
- Increment 10 sec
- Sensitivity: High
- Methode Digitize wählen
- Precision und Manual 1:30 sec

Zuvor wurde die geblottete Membran mit 1 ml/Blot der ECL-Reagenzien A und B aus dem ECL-Advance-Western-Blotting-Detection-Kit GE Healthcare mit der Cat. No. RPN2135 im Mischungsverhältnis 1:1 für 1 min im Dunkeln inkubiert.

Anschließend konnten die Bilder gemacht und die Ergebnisse ausgewertet werden.

2.8 Verwendete Pharmaka

2.8.1 Lidocain

Lidocain wurde verwendet, um die Depolarisation der SN in der Zellkultur zu hemmen. Als Blocker des schnellen Natriumkanals verhinderte eine Konzentration von 1 mmol/l nach Scholz et al. 1998 unter HFES effektiv die Auslösung eines Aktionspotentials (70).

2.9 Statistische Analyse

Alle Werte wurden als Mittel $\pm$ SEM ausgedrückt. Vergleiche zweier Gruppen wurden durch den studentischen T-Test durchgeführt. Zum Vergleich einer höheren Anzahl von

Gruppen wurde das 1-Way-ANOVA Verfahren, gefolgt vom LSD post-hoc Test, angewendet. P- Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 HFES beeinflusst die Expression von NGF und NT-3 in SN

3.1.1 HFES erhöht die NGF und NT-3 Sekretion von SN

Es wurde untersucht, welchen Einfluss hochfrequente elektrische Stimulation auf die Proteinsekretion von NGF und NT-3 durch sympathische Neurozyten (SN) hat. Gemessen wurde die relative Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle von 0 Hz im Mediumüberstand der Zellkulturen zum Zeitpunkt 0 h, 24 h, 48 h mit der ELISA-Technik.

Abbildung 5 zeigt in zwei Kurven den Anstieg der NGF-Proteinsekretion in Abhängigkeit von der Zeit bei 24 h und 48 h und jeweils in Abhängigkeit von der gewählten Frequenz. Es wurde die Sekretion bei fünf Frequenzen 3 Hz, 5 Hz, 20 Hz, 50 Hz und 99 Hz mit der Kontrollgruppe bei 0 Hz verglichen. Es zeigt sich ein leichter Anstieg der NGF-Proteinsekretion bei Stimulationsfrequenzen bis 20 Hz, wobei es schließlich zu einem starken Anstieg der Sekretion zwischen 20 Hz und 50 Hz kommt. Zwischen 50 Hz und 99 Hz ist nach 48 h kein deutlicher Anstieg, nach 24 h sogar ein leichter Abfall der Sekretion zu erkennen.

In **Abbildung 6** ist im Vergleich zur NGF Sekretion die Sekretion von NT-3 dargestellt. Auch hier sind die Abhängigkeit von der Zeit bei 24 h und 48 h und die Abhängigkeit von den gewählten Frequenzen 3 Hz, 5 Hz, 20 Hz, 50 Hz und 99 Hz im Vergleich zur Kontrollgruppe von 0 Hz gezeigt. Es ist ebenfalls mit der ELISA Technik gemessen worden.

Die beiden Kurven der NT-3 Sekretion bei 24 h und 48 h verhalten sich bei den verschiedenen Frequenzen ähnlich wie der Verlauf der NGF-Sekretion. Bei bis zu 20 Hz Stimulationsfrequenz kann man von einem linearen Anstieg der Kurven sprechen, der jedoch zwischen 20 Hz und 50 Hz exponentiell verläuft und zwischen 50 Hz und 99 Hz wieder leicht abflacht.

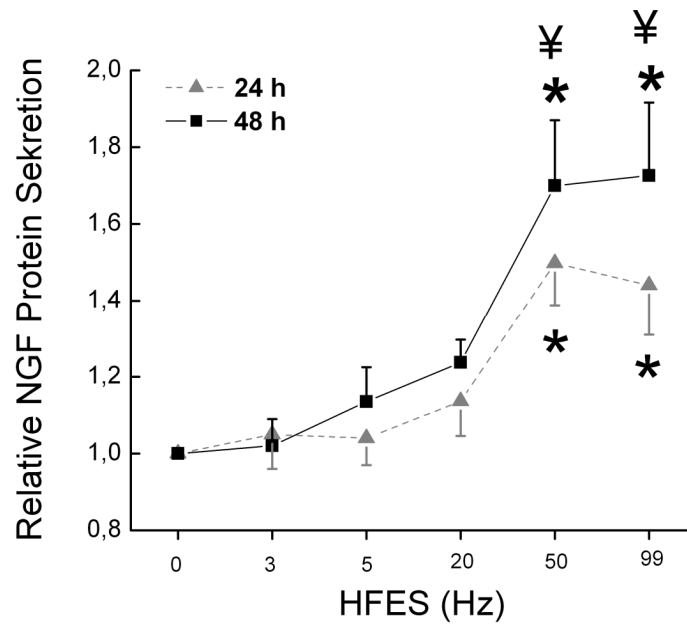


Abbildung 5: Relative NGF-Protein-Sekretion bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 24 h und nach 48 h Stimulationsdauer mit der ELISA-Methode gemessen * $p < 0.05$ vs. 0 Hz–5 Hz. # $p < 0.05$ vs. 50 Hz u. 99 Hz. ¥ $p < 0.05$ vs. 24 h. (n=15)

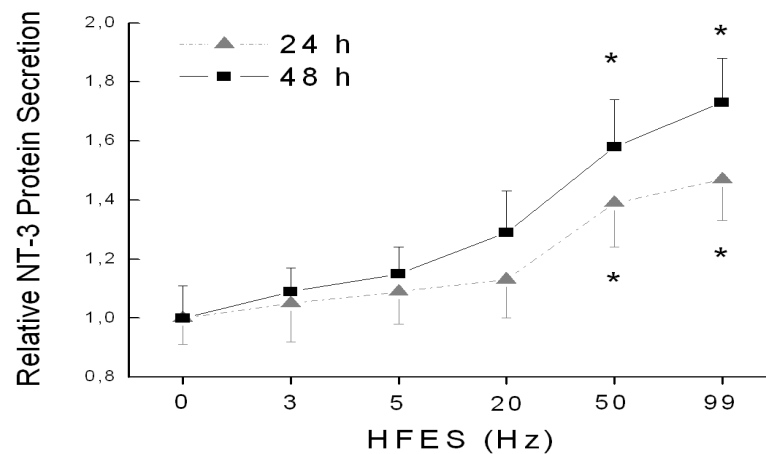


Abbildung 6 : Relative NT3-Protein-Sekretion bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 24 h und nach 48 h Stimulationsdauer mit ELISA-Methode gemessen * $p < 0.05$ vs. 0 Hz–5 Hz. # $p < 0.05$ vs. 50 Hz u. 99 Hz. (n=15)

Sowohl die Proteinsekretionsleistung der neurotrophen Faktoren NGF als auch NT-3 durch SN nimmt mit steigender Stimulationsfrequenz zu. Der stärkste Sekretionsanstieg beider Proteine liegt zwischen den Frequenzen 20 Hz und 50 Hz. Ebenso spielt die Stimulationsdauer eine Rolle. Bei fast allen gewählten Frequenzen liegt die Sekretionsleistung, sowohl von NGF als auch von NT-3, nach 48 h über der Sekretionsleistung von 24 h Stimulationsdauer. Die Faktoren der Proteinexpression bei 50 Hz und 99 Hz sind bei NT-3 und NGF signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Der maximale Faktor des Sekretionsanstiegs gegenüber der Kontrollgruppe beträgt bei NGF als auch bei NT-3 nach 48 h Stimulation bei 99 Hz etwa 1,7.

3.1.2 Anstieg der Proteine NT-3 und NGF im Zelllysate SN nach HFES

Mit der ELISA-Methode wurde bereits die erhöhte Proteinsekretion der neurotrophen Faktoren NT-3 und NGF durch SN unter HFES dargestellt. Um auch die vorhandene Gesamtproteinmenge in den Zellen nach HFES im Vergleich zur Kontrolle zu zeigen, wurde die WB-Methode gewählt. Es wurde nach 48 h HFES bei 5 Hz, bei 50 Hz und bei 0 Hz als Kontrolle die Proteinmenge von NT-3 und NGF im Zelllysate bestimmt.

In **Abbildung 7** ist die relative NGF-Protein-Expression gegenüber den Frequenzen 0 Hz, 5 Hz und 50 Hz aufgetragen, wobei 0 Hz als Kontrolle gilt. Mit steigender Stimulationsfrequenz nimmt auch die gemessene Proteinmenge im Lysate zu, wobei der Anstieg von 0 Hz auf 5 Hz mit dem Faktor 1,1 deutlich geringer ausfällt als der signifikante Anstieg bei Stimulation mit 50 Hz mit dem Faktor 1,7. Darunter sind die Nativbanden zu sehen. GAPDH diene hierbei als Standard.

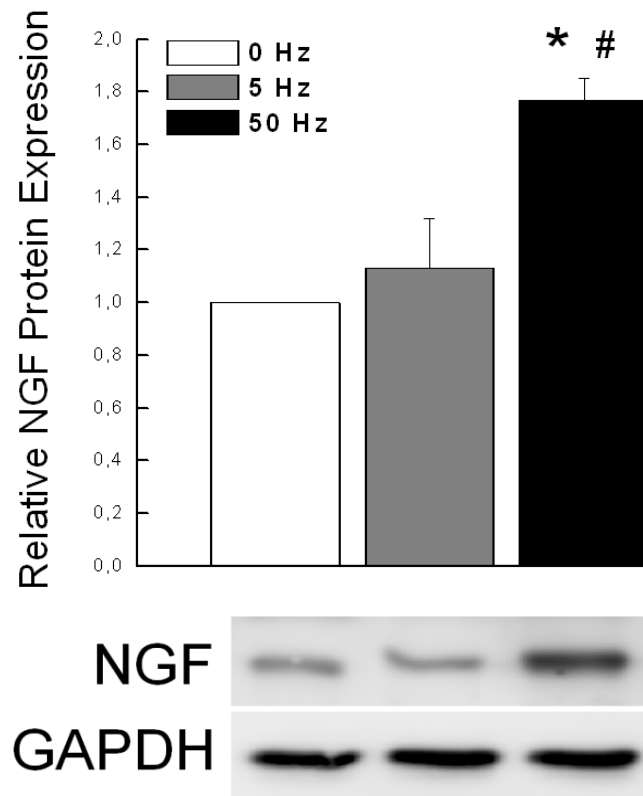


Abbildung 7: Relative NGF-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysat gemessen. Darunter zu sehen die dazugehörigen Nativbanden mit GAPDH als Positivkontrolle. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz ($n=5$)

In **Abbildung 8** ist im direkten Vergleich die relative NT-3 Protein Expression gegenüber den gleichen Frequenzen 0 Hz, 5 Hz und 50 Hz nach 48 h aufgetragen, wobei auch hier 0 Hz als Kontrolle dient. Genau wie bei NGF zeigt sich auch hier bei NT3, dass die gemessene Proteinmenge im Lysat mit höherer Stimulationsfrequenz zunimmt. Auch hier zeigt sich bei 50 Hz eine signifikante Zunahme mit dem Faktor 1,4 gegenüber der Kontrolle. Darunter sind wieder die Nativbanden zu sehen. GAPDH diente hierbei ebenfalls als Standard.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Sekretionsleistung der neurotrophen Faktoren NGF und NT3 durch SN mit steigender Frequenz zunimmt, sondern dass auch die Proteinexpression eine positive Korrelation zur Stimulationsfrequenz aufweist.

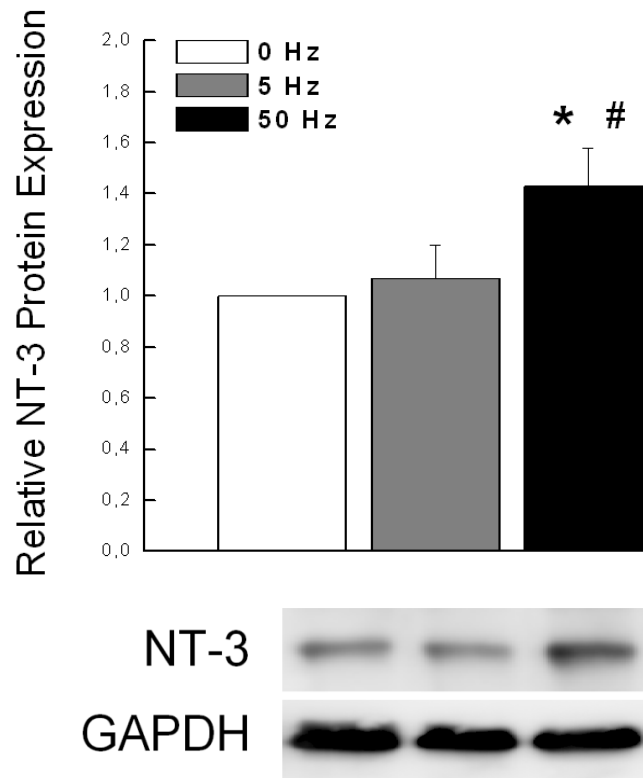


Abbildung 8: Relative NT3-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysate gemessen. Darunter zu sehen die dazugehörigen Nativbanden mit GAPDH als Positivkontrolle. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz ($n=5$)

3.1.3 Anstieg der kodierenden mRNA für NT-3 und NGF in SN durch HFES

Die bereits gezeigte signifikante Erhöhung der Proteinexpression der beiden neurotrophen Faktoren durch HFES soll durch die Untersuchung einer früheren Synthesestufe bestätigt werden. Hierzu wurde die kodierende mRNA für NGF und NT-3 untersucht. Es wurde die relative mRNA-Menge im Zelllysate der SN Zellkulturen mittels RT-PCR für NT-3 und NGF gemessen. Zur Kontrolle diente wieder die mit 0 Hz stimulierte Gruppe Zellkulturen, die mit 5 Hz und 50 Hz stimulierten Zellkulturen nach 48 h verglichen wurde.

In **Abbildung 9** ist die relative mRNA-Expression von NGF gegenüber der Frequenz aufgetragen. Die mRNA Expression steigt mit der Frequenz an, wobei der Anstieg von 0 Hz auf 5 Hz mit dem Faktor 1,35 deutlich geringer ausfällt als der signifikante Anstieg bei Stimulation mit 50 Hz mit dem Faktor 2,2.

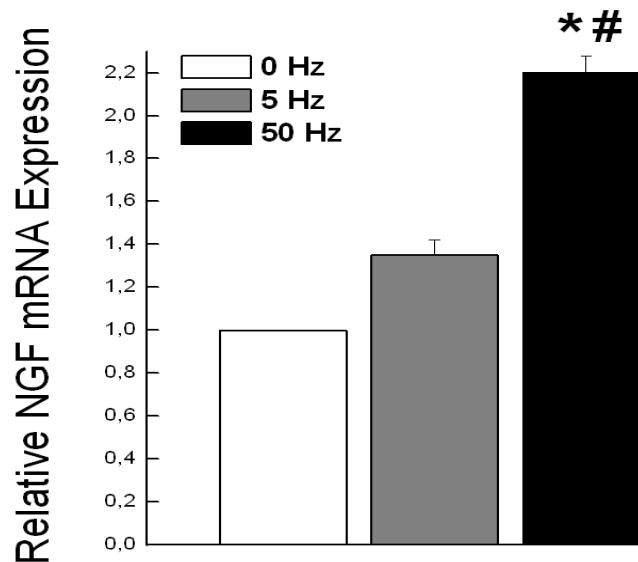


Abbildung 9: Relative NGF-mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit RT-PCR Methode im Zelllysate gemessen * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz ($n=5$)

Ähnlich verhält es sich mit der Expression der mRNA des neurotrophen Faktors NT3. Die relative mRNA-Expression hierzu ist gegenüber der Frequenz in **Abbildung 10** aufgetragen. Die Expression steigt ebenfalls mit der Frequenz an, wobei der Anstieg von 0 Hz auf 5 Hz mit dem Faktor 1,4 wieder deutlich geringer ausfällt als der signifikante Anstieg bei HFES mit 50 Hz mit dem Faktor 2,1.

Die Ergebnisse auf der Syntheseebene der mRNA korrelieren mit denen auf Proteinebene. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen sowohl der Proteinexpression als auch der mRNA-Expression und der Frequenz der hochfrequenten Stimulation.

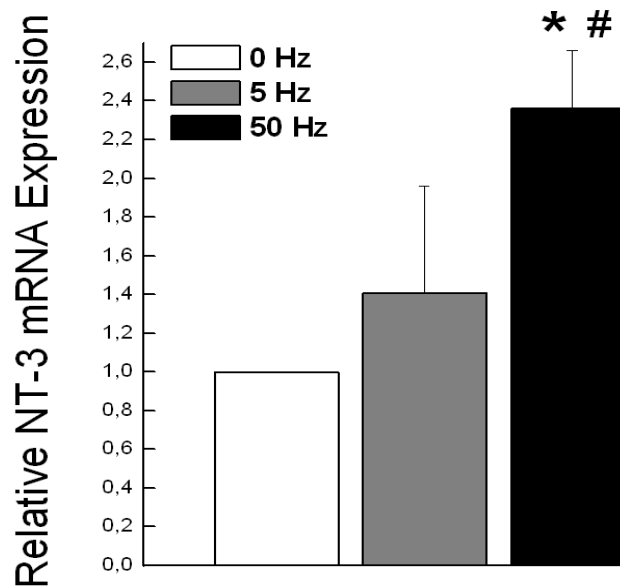


Abbildung 10: *Relative NT3-mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit RT-PCR Methode im Zelllysate gemessen * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz (n=5)*

3.1.4 Die Ausschüttung von NT-3 und NGF durch HFES ist depolarisationsabhängig

Lidocain blockiert die schnellen Natriumkanäle und wird klinisch heutzutage überwiegend zur Lokalanästhesie eingesetzt. Die Auslösung des Aktionspotentials der Zelle wird verhindert. Nach Scholz et al. 1998, gemessen mit der Patch-Clamp-Methode, verhindert eine Konzentration von 1mmol/l effektiv die Depolarisation von Neurozyten (70).

In diesem Versuch wurde die relative Proteinsekretion von NT-3 und NGF mit der ELISA-Methode gemessen. Die Zellkulturen der SN wurden mit den Frequenzen 5 Hz, 50 Hz, 99 Hz, die Kontrolle mit 0 Hz stimuliert und mit einer mit 99 Hz stimulierten Kultur mit einem lidocainhaltigen Kulturmedium (1 mmol/l) verglichen. Wie auch in den bisherigen Versuchen, zeigte sich sowohl bei NT-3 in **Abbildung 11** als auch bei NGF in **Abbildung 12** eine positive Korrelation der Stimulationsfrequenz und der relativen Proteinsekretion. Bei 99 Hz Stimulationsfrequenz war die Proteinsekretion gegenüber der Kontrollgruppe bei NT-3 als auch bei NGF mit dem Faktor 1,7 signifikant erhöht. Die Proteinsekretion der mit 99 Hz stimulierten und mit Lidocain behandelten

Kultur sank jedoch sogar im Vergleich zur Kontrollgruppe auf den Faktor 0,8 bei NT3 und 0,9 bei NGF.

Die Ergebnisse zeigen, dass die durch die HFES ausgelöste häufigere Depolarisation der Neurozyten für die Auslösung der zellinternen Kaskade zur erhöhten Ausschüttung der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 und letztendlich auch für deren Produktion verantwortlich sein muss und dass nicht lediglich die durch die HFES erzeugten elektrischen Felder allein für den Effekt sorgen.

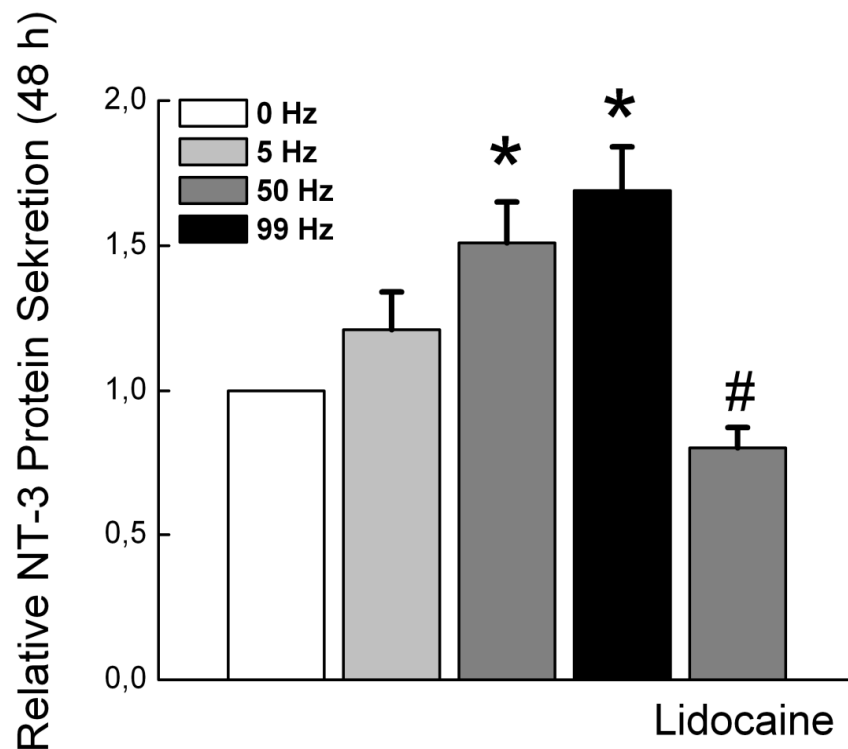


Abbildung 11: Relative NT-3-Protei-Sekretion bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit ELISA-Methode gemessen. Einsatz von Lidocain in Vergleichsgruppe bei Stimulation mit 99 Hz. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz–5 Hz. # $p < 0.05$ vs. 50 Hz and 99 Hz ($n=3$)

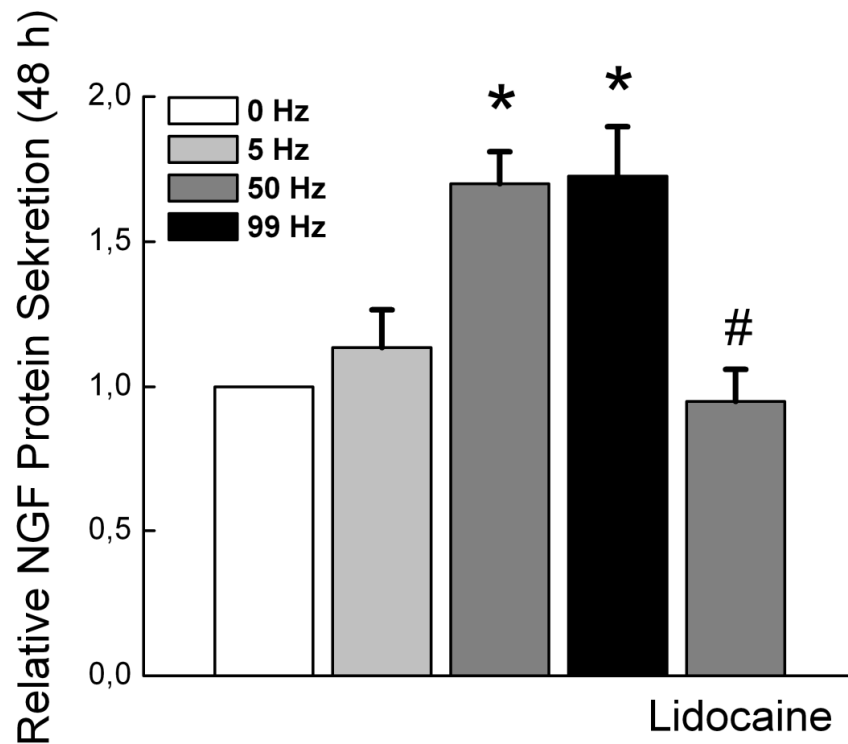


Abbildung 12: Relative NGF-Protein-Sekretion bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit ELISA-Methode gemessen. Einsatz von Lidocain in Vergleichsgruppe bei Stimulation mit 99 Hz.

* $p < 0.05$ vs. 0 Hz–5 Hz. # $p < 0.05$ vs. 50 Hz and 99 Hz ($n=3$)

3.2 HFES induziert sympathisches Nervenwachstum

3.2.1 Morphologische Darstellung im Nativpräparat

Zur Darstellung der nativen Zellkultur sind in **Abbildung 13 und 14** Ausschnitte unserer Zellkulturen von SN zu sehen. Die Aufnahmen entstanden vor der HFES und zeigen die Zellen nach dem ersten Mediumwechsel nach zwei Tagen.

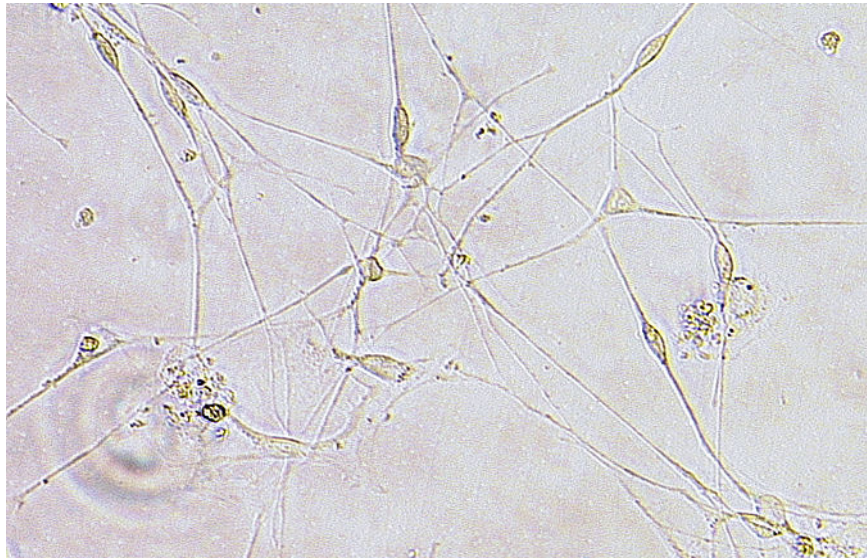


Abbildung 13: *SN in Zellkultur im Kulturmedium vor HFES bei optischer 80-facher Vergrößerung*

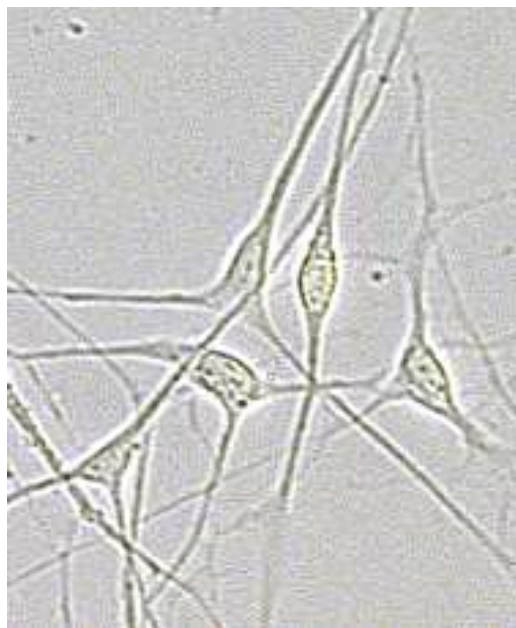


Abbildung 14: *SN in Zellkultur im Kulturmedium vor HFES bei optischer 80-facher und weiterer digitaler Vergrößerung*

3.2.2 Erhöhung des Sproutingmarkers GAP-43

Das Protein GAP-43 ist ein Zytofilament, welches die Zellstruktur von Neurozyten festigt. Beim Wachstum der Zelle wird es vermehrt exprimiert. Somit kann es in diesem Fall als Marker für sympathisches Nerve Sprouting dienen.

Mittels WB wurde es im Zelllysate der Kultur nach 48 h Stimulation gemessen.

Abbildung 15 zeigt das gemessene Ergebnis der relativen Proteinkonzentration der verschiedenen Stimulationsfrequenzen 5 Hz und 50 Hz bezogen auf die Kontrolle 0 Hz. Bereits die Stimulation mit 5 Hz lässt einen leichten Anstieg der GAP-43 Expression erkennen. Die Stimulation mit 50 Hz führt schließlich zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Zytofilaments, also somit zu stärkerem Nerve Sprouting. Darunter sind die Nativbanden dargestellt. GAPDH dient hierbei als Positivkontrolle.

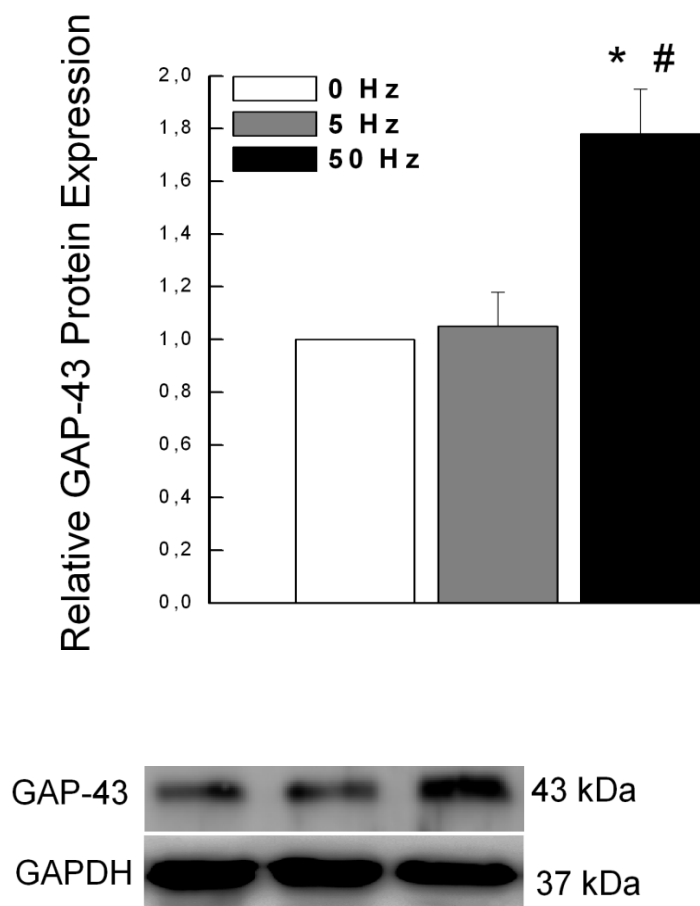


Abbildung 15: Relative GAP-43-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysate gemessen. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz ($n=5$)

3.2.3 Morphologische Darstellung mittels Immunfluoreszenz

Um zu zeigen, dass es sich bei den verwendeten Zellkulturen um weitestgehend reine sympathische Neurozyten handelt, wurden immunfluoreszenztechnische Färbungen vorgenommen, mit deren Hilfe außerdem das sympathische nerve sprouting besser gezeigt werden konnte. Um die einzelnen Bilder vergleichen zu können, wurden Bildausschnitte gewählt, die vor Beginn der Stimulation eine ähnliche Zellzahl aufwiesen.

In **Abbildung 16** sieht man bei allen drei Stimulationsfrequenzen mittels DAPI-Färbung grün gefärbte Zellkerne, um die Anzahl der Zellen sichtbar zu machen und rot gefärbtes Zytoplasma, das mittels Thyrosinhydroxylase-Färbung sympathische Neurozyten charakterisiert. Wie an diesen exemplarischen Bildausschnitten dargestellt, verhielt es sich in allen immunfluoreszenztechnisch gefärbten Zellkulturen. Über 95 % der grün gefärbten Zellkerne wiesen ein Thyrosinhydroxylase-positives Zytoplasma auf, welche die Annahme der Reinkultur bestätigten.

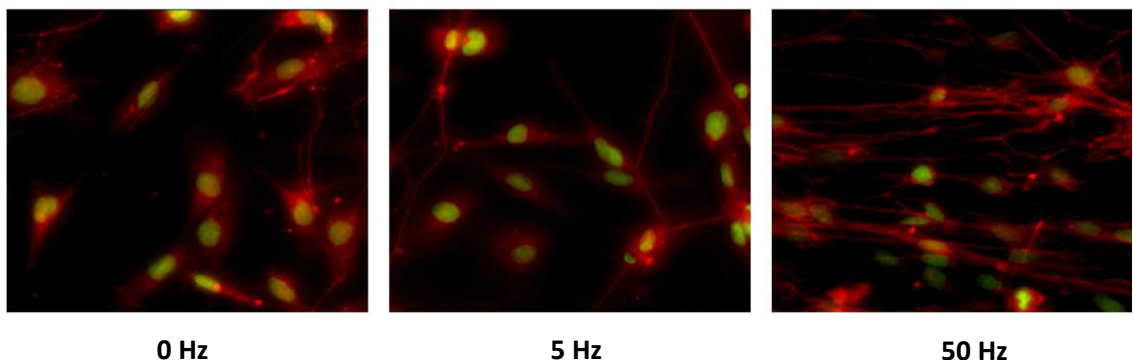


Abbildung 16: Immunfluoreszenzbilder der Zellkultur bei 80-facher optischer Vergrößerung nach HFES für 48 h. DAPI-Färbung der Zellkerne (grün) und TH-Färbung der SN (rot).

Im vorigen Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass der Sproutingmarker GAP-43 im Zelllysat nach 48 h HFES in Abhängigkeit von der Frequenz vermehrt gemessen werden konnte. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde dieses Ergebnis in **Abbildung 17** noch einmal morphologisch bestätigt und veranschaulicht. Mit Hilfe der DAPI-Färbung wurden Zellkerne in dieser Messung blau gefärbt. Das Zytofilament GAP-43 als

Sproutingmarker ist gelb angefärbt. Wie schon im WB gemessen, zeigt sich hier bei höherer Frequenz über die vermehrte Gelbfärbung eine deutlich erhöhte GAP-43 Expression, die das stärkere Nerve Sprouting bei höherer Stimulationsfrequenz bestätigt.

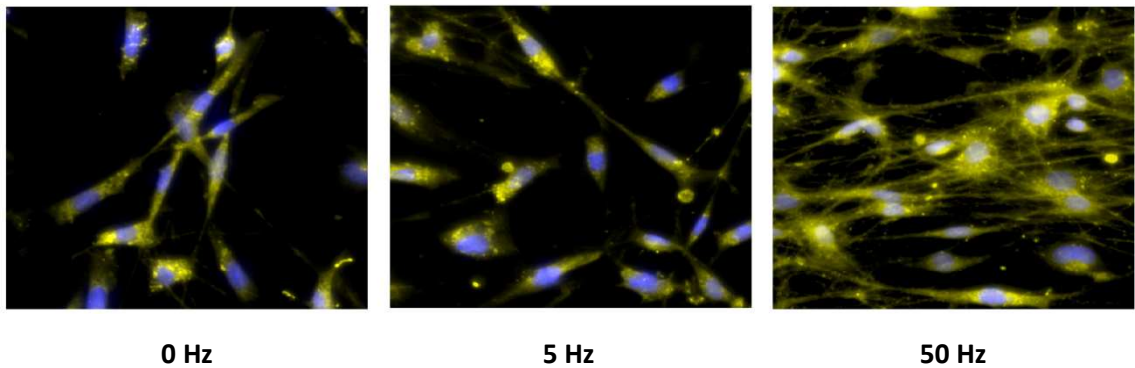


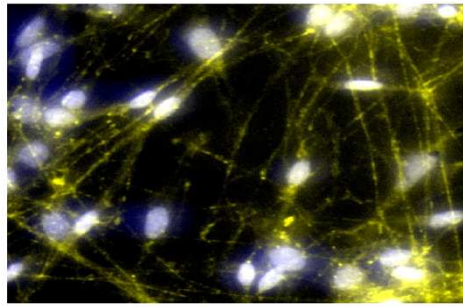
Abbildung 17: Immunfluoreszenzbilder der Zellkultur bei 80-facher optischer Vergrößerung nach HFES für 48 h. DAPI-Färbung der Zellkerne (blau) und GAP-43 Färbung (gelb)

3.2.4 SNS durch HFES ist depolarisationsabhängig

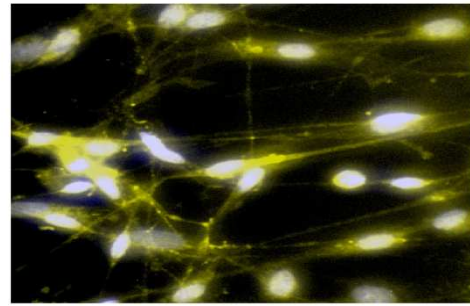
Es wurde bereits in einem vorherigen Versuch gezeigt, dass die Sekretion der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 durch SN depolarisationsabhängig ist. Dies legte die Vermutung nahe, dass das SNS ebenfalls depolarisationsabhängig ist.

Hierzu wurde zuerst eine Immunfluoreszenzfärbung von Kulturen sympathischer Neurozyten einmal nach Stimulation mit 50 Hz und einmal nach Stimulation mit 50 Hz und der Gabe des Depolarisationshemmers Lidocain (1mol/l) durchgeführt und die Bilder, wie in **Abbildung 18** dargestellt, verglichen. Vor Beginn der Stimulation wurde gewährleistet, dass die Anzahl der Zellen im Bildausschnitt ähnlich groß ist. Die Zellkerne wurden mit der DAPI-Färbung blau gefärbt und, gelb dargestellt, sieht man den Sproutingmarker GAP-43 im Zytoplasma.

Morphologisch erkennt man den deutlich wachstumshemmenden Effekt des Lidocains, der sich in der Länge der Axone sowie im Verzweigungsgrad der Dendriten widerspiegelt. Es zeigt sich, dass das qualitativ morphologische SNS depolarisationsabhängig ist.



50 Hz



50 Hz + Lidocaine

Abbildung 17: Immunfluoreszenzbilder der Zellkultur bei 80-facher optischer Vergrößerung nach HFES für 48 h. DAPI Färbung der Zellkerne (blau) und GAP-43-Färbung (gelb)

Um den Effekt quantitativ zu bestätigen, wurde mit der WB-Methode die relative Proteinexpression des Sprouting Markers GAP-43 nach Lidocaingabe (1 molar) im Zelllysate der Kultur nach 48 h Stimulation mit 50 Hz gemessen und mit der Kontrolle 0 Hz und stimulierten Kulturen mit 5 Hz und 50 Hz verglichen, dargestellt in **Abbildung 19**. Darunter sind die Nativbanden dargestellt. GAPDH dient hierbei als Positivkontrolle.

Die Stimulation mit 5 Hz bewirkte, wie schon zuvor gezeigt, einen leichten Anstieg der GAP-43-Expression und die Stimulation mit 50 Hz führte zu einem signifikanten Anstieg des Sproutingmarkers mit dem Faktor 2,2 im Vergleich zur Kontrolle mit 0 Hz. Die Gabe von Lidocain bewirkte eine Reduktion der GAP-43-Expression im Vergleich zur 0 Hz Kontrolle mit dem Faktor 0,9.

Gemessen am Sprouting Marker GAP-43 ist das SNS, ebenso wie die Produktion der neurotrophen Faktoren NGF und NT3, depolarisationsabhängig und immunfluoreszenztechnisch-morphologisch betrachtet ergibt sich das gleiche Bild.

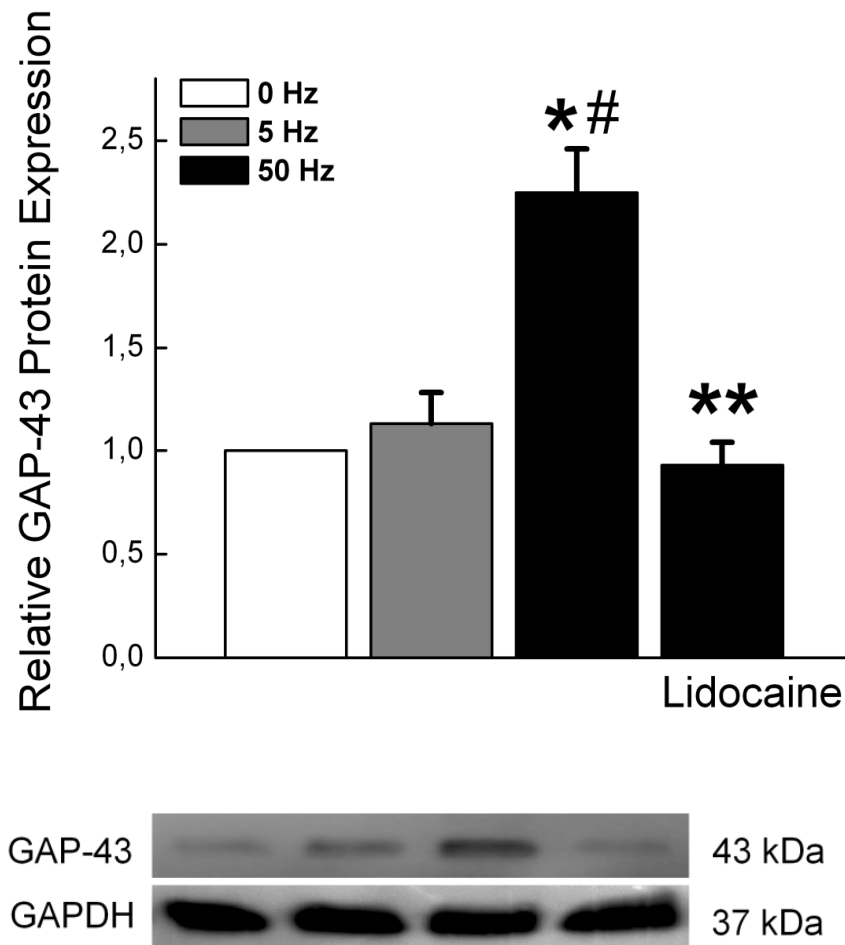


Abbildung 19: Relative GAP-43-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysate gemessen. Einsatz von Lidocain in Vergleichsgruppe bei Stimulation mit 50 Hz. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz. ** $p < 0.05$ vs. 50 Hz. (n=5)

3.3 NGF hat größere Bedeutung für SNS als NT-3

Um die Verbindung zwischen SNS durch HFES und den gleichzeitig erhöht gemessenen neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 herzustellen und um zu zeigen, welchem Faktor hierbei eine größere Bedeutung zukommt, wurden Kulturen mit neutralisierenden Antikörpern gegen NGF und NT3 angelegt. Diese wurden 48 h mit 50 Hz stimuliert und die relative GAP-43-Protein-Expression als SNS-Marker mit der Kontrolle von 0 Hz, 5 Hz und 50 Hz ohne Antikörper verglichen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 20** dargestellt. Darunter sind die Nativbanden dargestellt. GAPDH dient hierbei als Positivkontrolle.

Die GAP-43-Expression war, wie bisher gemessen bei 50 Hz ohne AK, signifikant um den Faktor 1,7 erhöht und bei 5 Hz gegenüber der 0 Hz Kontrolle leicht erhöht.

Die Kulturen mit Anti-NT-3 AK zeigten eine immer noch signifikant erhöhte GAP-43-Expression, die im Vergleich zur Expression bei 50 Hz ohne AK nur leicht erniedrigt war. Die Kulturen mit Anti-NGF AK zeigten jedoch sogar im Vergleich zur 0 Hz Kontrolle eine reduzierte GAP-43-Expression um den Faktor 0,95. Im Gegensatz zur NT-3 Neutralisation hebt eine Neutralisation von NGF im Kulturmedium SNS vollständig auf. Die Vermittlung des SNS, ausgelöst durch HFES, muss überwiegend über den Effekt des neurotrophen Faktors NGF funktionieren.

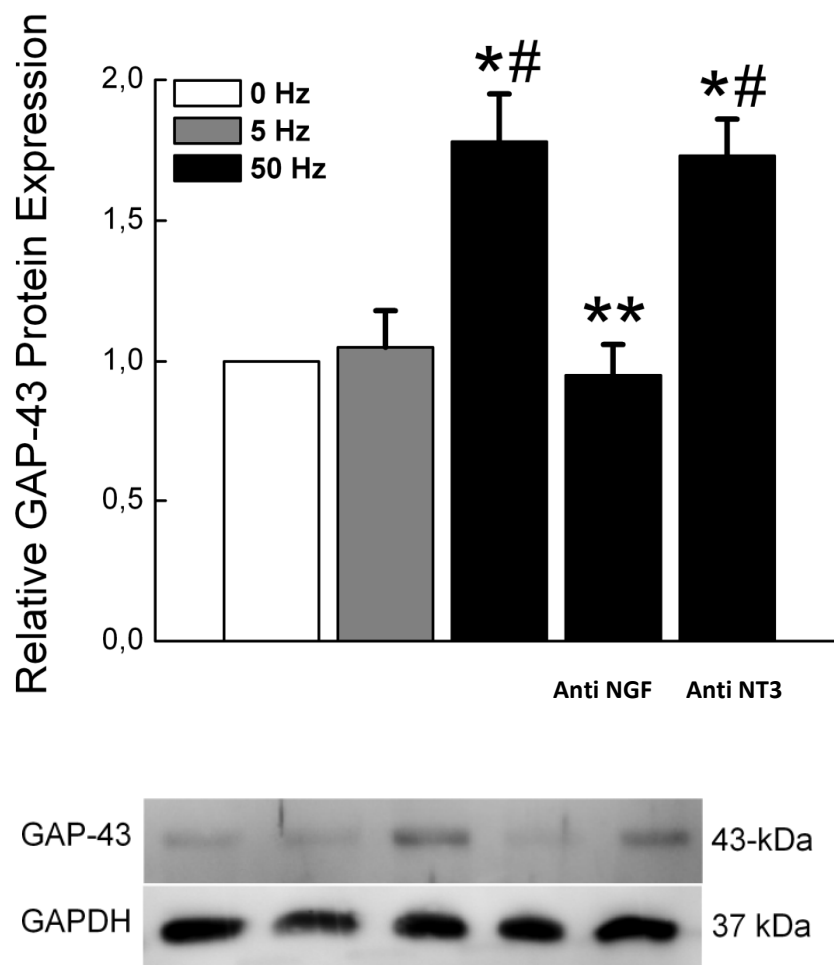


Abbildung 20: Relative GAP-43-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysate gemessen. Einsatz von neutralisierenden Antikörpern für NGF und NT-3 in den Vergleichsgruppen bei Stimulation mit 50 Hz. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz. ** $p < 0.05$ vs. 50 Hz ($n=5$)

3.4 TrkA als Rezeptor der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3

TrkA dient sowohl NGF als auch NT3 als Rezeptor an der Zelloberfläche. Über ihn können die beschriebenen Effekte der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 vermittelt werden.

3.4.1 HFES steigert depolarisationsabhängig die Expression von TrkA

Welche Auswirkungen HFES auf die Liganden des TrkA-Rezeptors hat, wurde in der Studie bereits ausführlich untersucht. Wie sich der Rezeptor bei HFES von SN verhält, wurde durch Bestimmung der relativen Proteinexpression im Vergleich zu 0 Hz Kontrolle mittels WB aus dem Zelllysat nach 48 h Stimulation untersucht.

Die Proteinexpression des Rezeptors verhielt sich parallel zur Expression seiner Liganden NGF und NT-3 und ist in **Abbildung 21** dargestellt. Darunter sind die Nativbanden dargestellt. GAPDH dient hierbei als Positivkontrolle. Bei Stimulation mit 5 Hz zeigte sich eine leichte Erhöhung der Expression gegenüber der Kontrolle mit 0 Hz. Eine Stimulation mit 50 Hz sorgte für eine signifikante Erhöhung der Expression von TrkA um den Faktor 1,8. Auch hier zeigte sich eine Depolarisationsabhängigkeit wie bei NGF, NT-3 und dem SNS. Eine Blockade der Depolarisation mit Lidocain (1mol/ml) bei Stimulation mit 50 Hz für 48 h sorgte für eine Expressionshemmung von TrkA auf den Faktor 0,9 gegenüber der Kontrolle von 0 Hz. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung der kodierenden mRNA für TrkA und ist in **Abbildung 22** dargestellt. HFES mit 50 Hz für 48 h bewirkt einen signifikanten Anstieg der mRNA für TrkA auf den Faktor 1,9 gegenüber der Kontrolle mit 0 Hz. Dieser Anstieg kann durch Lidocain vollständig gehemmt werden und sorgt sogar für ein leicht reduziertes Wachstum auf den Faktor 0,95.

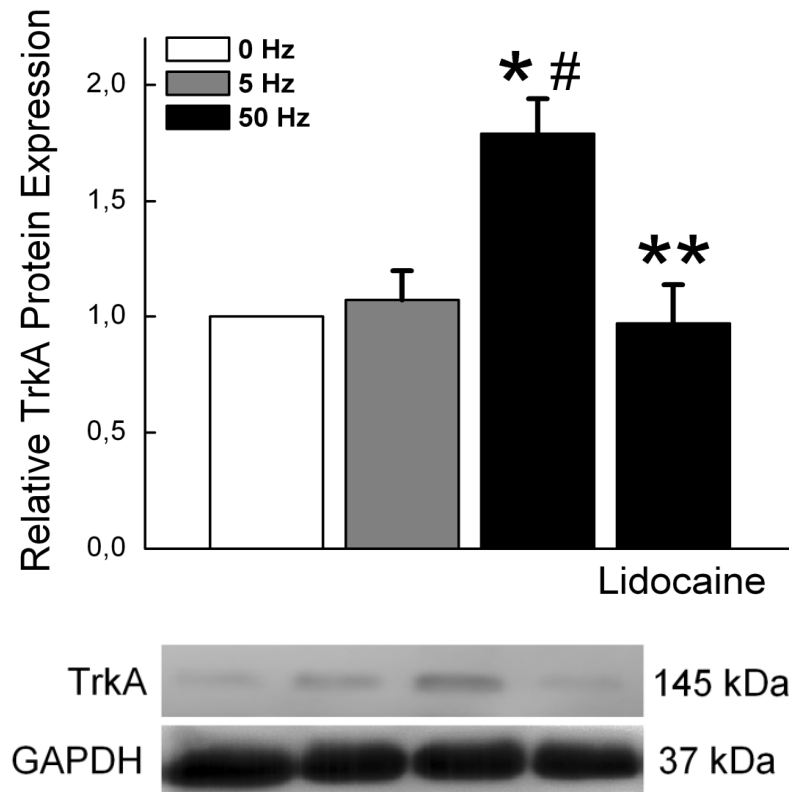


Abbildung 21: Relative TrkA-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysate gemessen. Einsatz von Lidocain in der Vergleichsgruppe bei Stimulation mit 50 Hz. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz. ** $p < 0.05$ vs. 50 Hz. (n=5)

Durch HFES werden gleichzeitig sowohl die neurotrophen Faktoren NGF und NT3 als auch TrkA als ihr Rezeptor auf der Zelloberfläche hochreguliert. Der Effekt von HFES auf den zellulären Mechanismus begünstigt SNS an beiden Stellen, auf Rezeptor- und auf Ligandenebene.

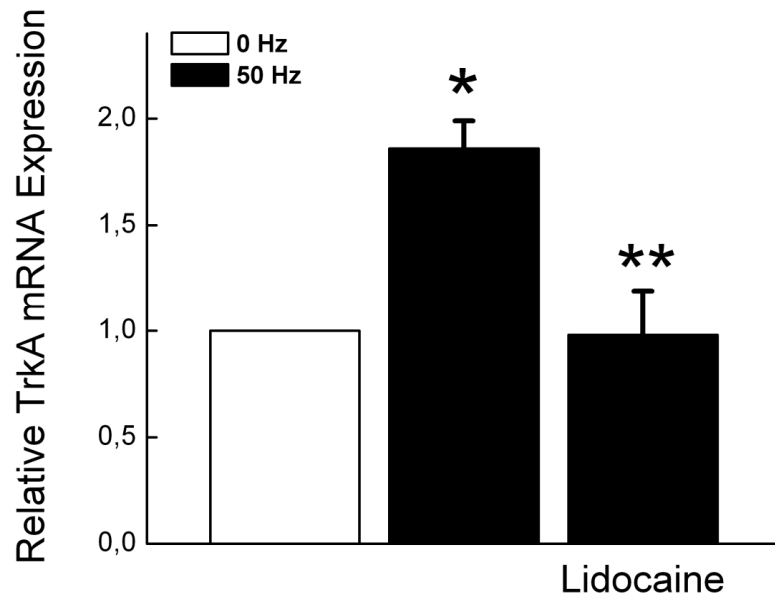


Abbildung 22: Relative TrkA-mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit RT-PCR Methode im Zelllysate gemessen * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. ** $p < 0.05$ vs. 50 Hz. (n=5)

3.4.2 TrkA vermittelt SNS

Zwar wurde durch die Versuche dieser Studie bereits gezeigt, dass NGF eine bedeutende Rolle beim SNS durch HFES innehat und es wurde schon beschrieben, dass TrkA ein NGF-Rezeptor auf der Zelloberfläche ist. Dass jedoch über ihn tatsächlich das SNS vermittelt wird, wurde erst in diesem Versuch gezeigt.

Hierzu wurde mittels WB die relative GAP-43-Proteinexpression als Wachstumsmarker im Vergleich zur Kontrolle 0 Hz gemessen. Es wurde mit 5 Hz und 50 Hz für 48 h stimuliert. Im Vergleich hierzu wurde mit 50 Hz für 48 h stimuliert, jedoch mit einem Anti-TrkA AK im Zellmedium, der die Bindungsstellen des Rezeptors blockiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 23** dargestellt. Darunter sind die Nativbanden dargestellt. GAPDH dient hierbei als Positivkontrolle.

Bei Stimulation mit 5 Hz und 50 Hz zeigten sich bekannte Ergebnisse. Bei 5 Hz war die GAP-43 Proteinexpression gegenüber der Kontrolle leicht erhöht und bei 50 Hz zeigte sich eine signifikante Erhöhung um den Faktor 1,8 gegenüber der Kontrolle.

Die Blockade des TrkA Rezeptors sorgte trotz 50 Hz Stimulationsfrequenz für ein reduziertes Wachstum im Vergleich zur 0 Hz Kontrolle mit dem Faktor 0,8.

Der für das SNS bedeutende neurotrophe Faktor NGF vermittelt demnach seine Wachstumssignale über den Rezeptor TrkA.

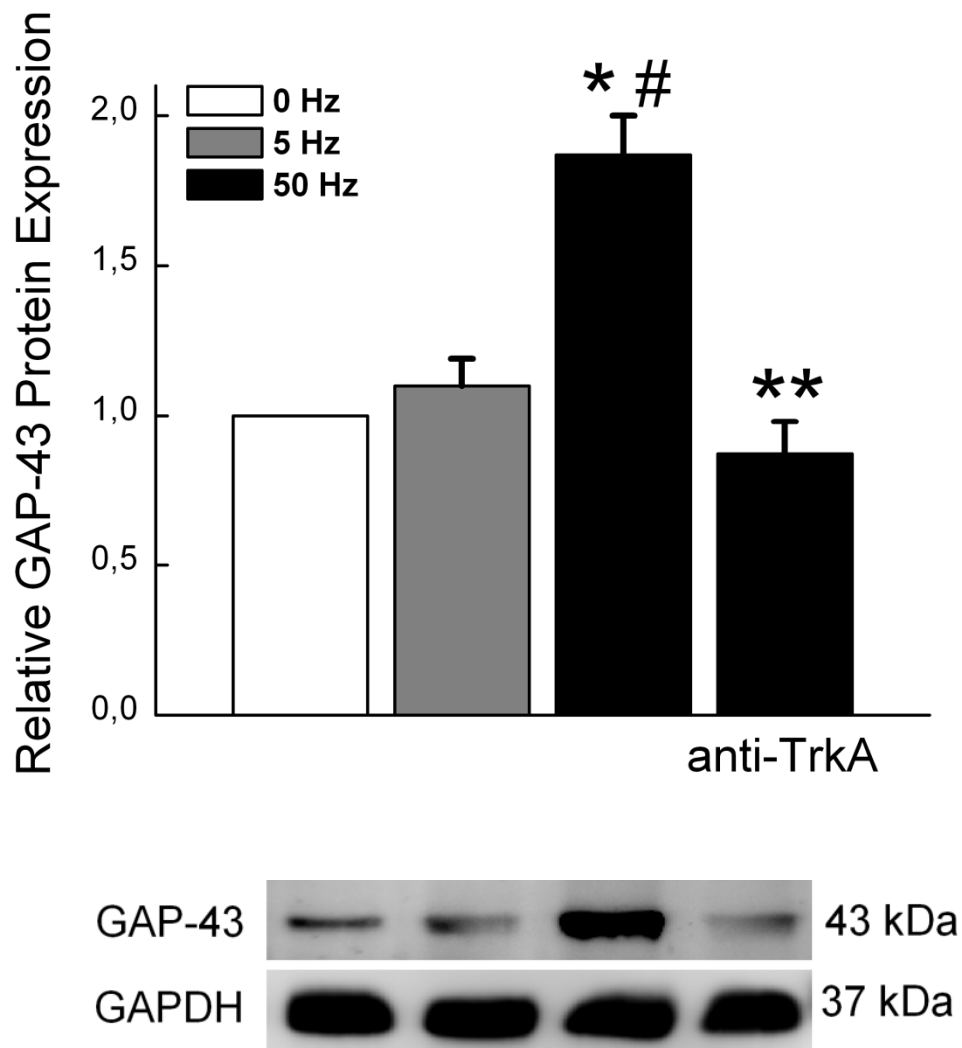


Abbildung 23: Relative GAP-43-Protein-Expression bezogen auf die Kontrolle von 0 Hz in Abhängigkeit von der Frequenz nach 48 h Stimulationsdauer mit WB-Methode im Zelllysat gemessen. Einsatz TrkA neutralisierender Antikörper in der Vergleichsgruppe bei Stimulation mit 50 Hz. * $p < 0.05$ vs. 0 Hz. # $p < 0.05$ vs. 5 Hz. ** $p < 0.05$ vs. 50 Hz. (n=5)

4. Diskussion

4.1 Hauptergebnisse dieser Studie

Diese Studie zeigt, dass HFES sympathischer Neurozyten, depolarisationsabhängig, durch eine vermehrte Produktion und Expression von NGF und dessen autokrine bzw. parakrine Wirkung über den durch HFES ebenfalls hochregulierten Rezeptor TrkA zu SNS führt.

4.2 NGF- und NT-3-Expression sowie deren Funktion

Es ist bekannt, dass der neurotrophe Faktor NGF eine entscheidende Rolle beim Überleben und der Differenzierung von SN spielt (71) (72). NGF steuert wesentlich die neuronale Innervationsdichte verschiedener Gewebe inklusive des Herzens (71) (73) (74). So scheint zum Beispiel bei der fötalen und neonatalen Entwicklung des sympathischen Nervensystems der Inselzellen des Pankreas NGF die entscheidende Rolle zu spielen (75). Als Quelle von NGF-Sekretion im Herzen selbst konnten bereits Kardiomyozyten identifiziert werden (76). Als weitere kardiale Quelle konnte kardiales mikrovaskuläres Endothel ausgemacht werden (77). Zudem konnten Hassankhani et al. 1995 zeigen, dass bei Mäusen transgenetisch erhöhte NGF-Spiegel zu einer erhöhten sympathischen Innervationsdichte am Maus Herzen führen (74). Ob allerdings sympathische Neurozyten gar selbst NGF als neurotrophen Faktor exprimieren und sezernieren können, blieb lange Zeit ungeklärt. Hasan et al. 2003 berichteten als erste, dass sympathische Neurozyten von embryonalen und neonatalen „Sprague Dawley“-Ratten NGF synthetisieren und sekretieren und dieses autokrin bzw. parakrin auf sie selbst wirkt (78). Dies konnte in der von uns durchgeführten Studie ebenfalls gezeigt werden. Die Ergebnisse von Hasan et al. 2003 zeigten darüber hinaus eine Überlebensabhängigkeit von neonatalen sympathischen Neurozyten in Kultur von exogenem NGF ab 48 h Kultivierung (78). Es wurde die Möglichkeit diskutiert, dass möglicherweise die sekretierte NGF-Menge von neonatalen sympathischen Neurozyten in Kultur für das Überleben und die Entwicklung in-vitro nicht ausreicht und zu diesem Zeitpunkt noch exogenes NGF notwendig ist. In unserer Studie wurde

NGF-freies Zellmedium verwendet und es konnte kein vermehrter Zelltod nach 48 h festgestellt werden. Ginge man von der Hypothese aus, dass HFES die NGF-Spiegel auf ein Maß hätte ansteigen lassen, dass die dadurch sekretierte NGF-Menge wieder antiapoptotisch wirkt, wird dies von der Arbeit nicht bestätigt, da auch in der nicht stimulierten Kontrollgruppe ein mind. 90 prozentiges Überleben der Zellen während der Untersuchungszeit vorlag. Eine Studie von Orike et al. 2001 zeigt ebenfalls keine Überlebensabhängigkeit sympathischer Rattenneurozyten (sieben Tage bis zwölf Wochen alt) von exogenem, also in diesem Fall im Kulturmedium enthaltenem, NGF. Wohl zeigt sie jedoch eine signifikante Wachstumsabhängigkeit (62) .

Auch der neurotrophe Faktor NT-3 wird in der Literatur als potenter Entwicklungs- und Differenzierungsfaktor für sympathische Neurozyten genannt und in Arbeiten mit sympathischen Neuroblasten von Hühnerembryos bis zu kultivierten SCG der Ratte untersucht (79) (80) (81). Es war lange ungeklärt, aus welchen Zelltypen NT3 stammt, das auf sympathische Neurozyten wirkt. Zhou et al. 1997 publizierten eine retrograde Aufnahme von endogenem NT-3 durch sympathische Neurozyten bei adulten Ratten (82). Ebenso stellten sie die NT-3-Produktion in sympathisch innerviertem Zielgewebe wie Niere, kardialer Ventrikel, kardiales Atrium, Arterien und Speicheldrüsen dar. Es zeigte sich, dass die Produktion in den verschiedenen Geweben alters- und entwicklungsabhängig war (Embryo Tag 18, postnatal Tag 3 und junge erwachsene Ratten). Eine solche Differenzierung nach Alter wurde in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt, bietet aber sicherlich Ansatzpunkte für weitere Fragestellungen, da über die HFES ein Zusammenhang zur Pathologie des VHF hergestellt werden kann, welches ebenfalls eine Altersabhängigkeit zeigt (83) . So zeigten beispielsweise Zhou et al. 1997, dass zum Beispiel gerade in den Vorhöfen und den Gefäßen mit steigendem Alter der Ratten eine erhöhte NT-3-Produktion gemessen werden konnte (82). In den sympathischen Neurozyten des SCG selbst fanden sie bei den adulten Ratten keine nennenswerte NT-3-Produktion. Im Gegensatz hierzu konnte diese Arbeit nun zeigen, dass es unter HFES zu einer Hochregulation der NT-3-Produktion durch sympathische Neurozyten kommt. Dies bestätigt wiederum, dass der Auslöser der HFES nötig ist, um für eine Hochregulation der Produktion zu sorgen und wirft an dieser Stelle die Frage auf, welche anderen Faktoren eine Hochregulation bedingen könnten und vor allen Dingen wie die Unterschiede bei Zellen unterschiedlichen Alters zu erklären sind.

Die Funktionen neurotropher Faktoren sind vielfältig und sicherlich noch nicht in ihrer Gesamtheit erforscht. Nicht nur für die Differenzierung von Neurozyten, sondern zum Beispiel auch für die Entwicklung des ovariellen Primordialfollikels zum Primärfollikel ist NT-3 ein bedeutender Faktor, wie Nilsson et al. 2009 bei der Ratte herausfanden (84). Bei allergischem Asthma spielen sogar NT-3 als auch NGF eine bedeutende Rolle für das Überleben der pulmonalen Plasmazellen (85). Weitere Forschungsergebnisse zeigen den Zusammenhang der Ausschüttung neurotropher Faktoren und Entzündungsreaktionen. Hier wurde beispielsweise in einer Arbeit von Tsai et al. 2010 der Zusammenhang zwischen der kardialen NGF-Ausschüttung und einer systemischen Entzündungsreaktion bei der Ratte gezeigt (86). Zudem gibt es Hinweise auf erhöhte kardiale NGF-Spiegel nach einem Myokardinfarkt und die Bedeutung von NGF als Pro-Survival-Faktor in der Reparationsphase (87) (88). Dies lässt sich sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren, wenn man die Hochregulation der Ausschüttung neurotropher Faktoren durch sympathische Neurozyten erst einmal als allgemeine Reaktion zur Erhöhung der Überlebensrate bei pathologischem zellulärem Stress ansieht, ohne zu Beginn eine genaue Differenzierung vorzunehmen. Die größte Gemeinsamkeit in den unterschiedlichen Wirkungsbereichen der neurotrophen Faktoren scheint ihre komplementäre antiapoptotische und wachstumsfördernde Wirkung zu sein (87) (89) (90) (91).

4.3 Der Rezeptor TrkA

Die beiden neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 sind Homodimere (92) und ihnen ist gemein, dass sie Liganden des TrkA Rezeptors sind. TrkA ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor und gehört zur Familie der tropomyosin-related-Kinase (Trk) Rezeptoren, welche die wachstumsfördernden und aktivierenden Effekte der Neurotrophine vermitteln (93). Zur Gruppe der Neurotrophine in Säugetieren gehören die vier Faktoren NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 (94). Durch Bindung und Rezeptoraktivierung werden das RAS-System, die phosphatidylinositol 3-Kinase und die Phospholipase C-Gamma1 aktiviert (91).

Außerdem können weitere Signalwege aktiviert werden, die über diese Proteine kontrolliert werden.

NGF wirkt über den TrkA-Rezeptor. NT-3 wirkt primär über den TrkC-Rezeptor, kann aber durchaus auch über TrkA seine trophische Wirkung vermitteln (95) (96). Zwar gibt es für jeden Rezeptor spezifisch bindende Liganden, aber die Wirkung auf die Zelle entfaltet sich vermutlich erst durch das Zusammenspiel mehrerer Rezeptoren, die untereinander kommunizieren (Crosstalk) (97). Sympathische Neurozyten exprimieren ebenfalls den Rezeptor TrkC als Rezeptor für NT-3 (82). Das Entwicklungsalter der Zellen scheint hier jedoch von Bedeutung zu sein für die Wirksamkeit der neurotrophen Faktoren auf das Überleben und die Differenzierung der sympathischen Neurozyten (98). So zeigten Fagan et al. 1997, dass TrkC besonders in der früheren Embryonalentwicklung von Bedeutung ist und Wyatt et al. 1997 dokumentierten, dass es ebenso Hinweise für eine altersabhängige Wirkung von NT3 über TrkA bei sympathischen Neurozyten bei Mäusen gibt (99).

Die Rezeptorexprimierung von TrkA auf sympathischen Neurozyten ist gut untersucht (100) (101). Aber auch in anderen Bereichen kommt TrkA in Verbindung mit seinem bedeutendsten Liganden NGF mehr und mehr Bedeutung zu. Bei der rheumatoiden Arthritis (102) sind in der Synovialflüssigkeit ebenso wie bei der akuten Leukämie (103) auf myeloischen hämatopoetischen Zellen erhöhte TrkA-Vorkommen gemessen worden. TrkA scheint also ebenso wie sein Ligand NGF nicht nur trophische neuronale Funktionen, sondern vielmehr auch systemische immunogene und hämatopoetische Funktionen zu vermitteln.

4.4 HFES bewirkt NGF, NT-3 und TrkA Hochregulierung in SN

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Menge der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 für SNS sorgt (104). Außerdem wurden im Hundeherzen bei HFES bereits erhöhte NGF-Spiegel (55) gemessen. Wie aber das beschriebene SNS bei VHF (105) pathophysiologisch durch molekulare Faktoren zustande kommt, wurde bis jetzt in einem Modell noch nicht genau untersucht. Diese Studie zeigt, dass HFES von SN zu einer vermehrten Expression und Sekretion der neurotrophen Faktoren NT-3 und NGF und gleichzeitig zu SNS führt. Wie anfangs beschrieben, wirken beide Faktoren antiapoptotisch und wachstumsfördernd auf die SN. HFES hat bei gleicher Frequenz für einen ähnlich großen Expressions- und Sekretionsanstieg beider neurotropher Faktoren durch die SN gesorgt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass in unserem Modell

NGF eine deutlich größere Rolle für das SNS durch HFES spielen muss als NT-3, da die Neutralisierung von NGF zu einer wesentlich größeren Hemmung des SNS führte. Die Neutralisierung von NT-3 übt nahezu keinen Effekt auf das SNS aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass NGF eine 10-fach höhere Kurzzeitwirkung am TrkA-Rezeptor als NT-3 hat und eine 20- bis 40-fache anti-apoptotische Potenz aufweist (106). Die stärkere Wirkung von NGF auf das neuronale Wachstum in diesem Modell wird darüber hinaus noch durch die verstärkte Expression von TrkA begünstigt. Ebenso wurde die altersabhängige Bedeutung der verschiedenen neurotrophen Faktoren erwähnt. Niwa et al. 2002 zeigten eine altersunabhängige durchgehende Bedeutung von NGF für die trophische Reaktion von sympathischen Rattenneurozyten in-vitro, vom Embryonalalter bis zur 24 Monate alten Ratte. Sie zeigten jedoch eine besonders auf die Embryonalphase konzentrierte trophische Bedeutung von NT-3 mit Bedeutungsverlust im Alter (107). ElShamy et al. 1996 zeigten eine besonders große Bedeutung von NT-3 für die Neurogenese von sympathischen Neurozyten (108). In unserem Modell wurden nur Zellen von gleichaltrigen Ratten verwendet, die möglicherweise in einer, wie oben erwähnt, nicht NT-3-sensitiven Entwicklungsphase waren. Außerdem wurde TrkC als Rezeptor für NT-3 nicht mit untersucht. Ein weiteres Ziel in der Zukunft könnte es sein, eine altersabhängige Ausschüttung der neurotrophen Faktoren bei HFES darzustellen, sowie darüber hinaus eine Hochregulation von TrkC bei HFES auszuschließen und damit die Signalkaskade weiter zu präzisieren. Inwieweit aber die durch HFES gemessene Hochregulierung von NT-3 etwa für einen anderen Zelltyp oder auch in einer anderen Funktion über den Rezeptor TrkA für die SN eine Rolle spielt, bleibt weiter zu untersuchen. Hinweise hierzu zeigen sich bereits in der altersabhängigen Wirkung der neurotrophen Faktoren (107). Ebenso ist das Zusammenspiel der anderen Rezeptoren der Trk-Familie in Bezug auf SNS durch HFES zu klären. Es liegt die Vermutung nahe, dass der unspezifische Trk-Rezeptor P75, der sowohl NGF als auch NT-3 als Rezeptor dient (94), möglicherweise ebenfalls in der Vermittlung des SNS durch HFES eine Rolle spielt. Hierfür spricht die bisher gefundene enge funktionelle Verbindung der beiden Rezeptoren in den Bereichen der Schmerzvermittlung durch NGF (109), der Wachstumsvermittlung durch NGF bei sensorischen Neuronen (110) und der zwingend erforderlichen Aktivierung von TrkA und P75 für das Überleben hippocampaler Neurone (111).

Betrachtet man in unserem Modell die Zellkultur der SN, kann man von einem positiven Feedbackmechanismus sprechen, da HFES sowohl den Liganden NGF als auch seinen Rezeptor TrkA hochreguliert. Die Bedeutung von TrkA für das Sprouting im vorliegenden Modell wird auch dadurch deutlich, dass eine Blockade des Rezeptors TrkA trotz weiterer HFES zu einem Wachstumsstopp führt.

HFES mit Frequenzen, die ähnlich denen bei der Pathologie des VHF sind, führen über diesen positiven Feedbackmechanismus zu einer weiteren Förderung des Sproutings. Geht man gleichzeitig davon aus, dass ein erhöhtes Sprouting auch erhöhte sympathische neuronale Aktivität bedeutet, kann man dies auf die Pathophysiologie des VHF übertragen und es bestätigt sich, dass VHF das erneute Auftreten von VHF begünstigt (112) (113). Ein durch VHF ausgelöstes neuronales Remodelling mit konsekutiver erhöhter sympathischer Aktivität am Herzen kann über die beschriebenen Mechanismen des erhöhten Ca^{2+} Einstroms Nachdepolarisationen auslösen, die Reizschwelle senken, die Leitungsfähigkeit erhöhen und somit eine kreisende Erregung begünstigen, wie Workman zusammenfasste (114).

Ein weiteres Ziel nach den Ergebnissen dieser Arbeit könnte es nun sein zu belegen, dass das durch HFES ausgelöste SNS auch tatsächlich mit erhöhter sympathischer neuronaler Aktivität einhergeht, wie es bereits in klinischen Studien gezeigt worden ist (115) (116). Hierzu würde es sich beispielsweise anbieten, in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell gleichzeitig zum SNS die Katecholaminproduktion der SN bei HFES im Zellmedium zu messen und so eine Antwort auf diese Frage zu erhalten. In diesem Zusammenhang wäre sicherlich auch eine Analyse der zeitlichen Komponente der sympathischen Aktivität und des Remodellings wichtig, um zu ergründen, was die Ursache und was die Wirkung ist. So konnten die genannten klinischen Studien (115) (116) zwar zeigen, dass es bereits nach Minuten zu einer erhöhten sympathischen Aktivität gekommen ist. Inwieweit dies allerdings Folge eines Remodellings ist oder ob diese erhöhte sympathische Aktivität gar ein Remodelling nach sich zieht, ist weiter unklar.

Vergleicht man zudem das in der Arbeit verwendete Modell der HFES mit der Pathophysiologie des VHF, zeigt sich schnell der Unterschied zwischen der Irregularität der Stimulation beim VHF und der Kontinuität im verwendeten Modell. Eine Arbeit von Saygili et al. 2011 zeigt bereits in der NGF-Ausschüttung von Kardiomyozyten von Ratten deutliche Unterschiede bei linearer und irregulärer HFES bei unterschiedlichen

Frequenzen (117). Ähnliche Hinweise gibt eine klinische Studie von Wasmund et al. 2003, die bereits einen Anstieg der sympathischen Nervenaktivität nach 3 Minuten induziertem VHF zeigt und hier ebenfalls eine höhere Nervenaktivität bei irregulärer Stimulation gegenüber regulärer Stimulation misst (115). Dies wird am klinischen Modell von Segerson et al. ebenso gezeigt, wo eine irreguläre HFES von 2 Minuten eine höhere sympathische Nervenaktivität auslöst als eine reguläre HFES (116). Inwieweit also eine genaue Annäherung über das Muster der HFES unseres Modells an die Pathophysiologie des VHF möglich ist, bleibt wohl ungeklärt. Unser Modell jedoch bietet die Möglichkeit, durch erweiterte Studien mit arrhythmischen und nicht allein hochfrequenten Stimulationsmustern, diese Fragestellung zu untersuchen.

Von elektrophysiologischer Bedeutung ist die Feststellung, dass alle in dieser Studie durch HFES gemessenen Effekte depolarisationsabhängig sind und durch eine Depolarisationsblockade verhindert werden können. Sie sind also nicht allein Folge des sich rhythmisch ändernden elektrischen Feldes, vielmehr muss dieses ein Aktionspotential in der Zelle auslösen können. Dies trifft sowohl für die Änderung der neurotrophen Faktoren NGF, NT-3 und den Rezeptor TrkA als auch für das morphologische SNS zu. Es kommt erst bei für das Rattenmodell VHF ähnlichen Frequenzen von 50 Hz zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Proteine. Zuvor ist bis zu einer Stimulationsfrequenz von 20 Hz nur ein leichter Anstieg zu erkennen. Zwischen 20 Hz und 50 Hz kommt es zu einem deutlich stärkeren Anstieg der synthetisierten und ausgeschütteten Faktoren. Die Steigerung der Proteinausschüttung zwischen 50 Hz und 99 Hz scheint ihr Maximum erreicht zu haben. Dieser Verlauf spricht dafür, dass erst eine gewisse Signalstärke die vorhandene Schwelle überwinden kann, um die beobachteten Effekte auszulösen, bis schließlich ein Maximum der Syntheseleistung erreicht ist. Dies kann im weiteren Sinne mit einer Sättigungskurve verglichen werden. Eine vermehrte Apoptose konnte, wie bereits beschrieben, in ausgewählten Abschnitten unter dem Mikroskop nach HFES nicht beobachtet werden und scheidet somit als Ursache für den Kurvenverlauf aus. In weiterführenden Arbeiten könnte sicherlich zur weiteren genauen Quantifizierung eines möglichen Zelltodes eine Immunfluoreszenzuntersuchung der Kulturen vor und nach HFES sinnvoll sein.

Für die elektrische Feldstärke an unserem Modell wählten wir gerade die doppelte Spannung, bei der Kardiomyozyten der Ratte in der Frequenz des elektrischen Feldes

kontrahierten und somit auch in dem betrachteten System Herz bei sympathischen Neurozyten Aktionspotentiale ausgelöst werden. Schließlich zeigte eine Blockade der Depolarisation einen signifikanten Effekt. Inwieweit im Myokard der Ratte nun tatsächlich diese Feldstärke vorliegt ist ungewiss. Um dies aber bei weiteren Arbeiten zu untersuchen und der Frage nachzugehen, ob eventuell die Höhe der Feldstärke auch unabhängig von der Depolarisation für die Größe der beobachteten Effekte verantwortlich ist, könnte eine Versuchstreppe der Feldstärke ähnlich der der Frequenz gefahren werden.

Die Erhöhung von NGF hat nicht nur bei SNS Bedeutung. Vielmehr zeigen sich bei Entzündungsreaktionen wie zum Beispiel Asthma bronchiale oder rheumatoider bzw. sekundärer Arthritis ebenfalls erhöhte NGF-Spiegel (118) (119) (120). Hier werden von NGF Aufgaben als Mediator zwischen Immunzellen und Nervensystem übernommen (121). Kilic et al. 2011 zeigen, dass NGF bei der chronischen Entzündung der Atemwege zusätzlich für die vermehrte Produktion von Kollagen Typ III sorgt, was eine Untersuchung dieses Zusammenhangs auch am Herzen für weitere Arbeiten über den Zusammenhang des strukturellen Remodellings als mögliches Substrat für VHF interessant macht (122).

Auf der anderen Seite zeigten, wie zu Beginn schon erwähnt, Tsai et al. 2009, dass eine gastroenterale Entzündung eine erhöhte kardiale NGF-Ausschüttung mit SNS bewirken kann (123). Ob diese wiederum zum VHF führt, ist noch unerforscht. Andere Ergebnisse zeigen, dass sogar allgemein erhöhte Entzündungswerte (CRP, IL-6, Fibrinogen) ein Frühzeichen für das Auftreten von VHF sein können (124) und eventuell in Kombination mit anderen Biomarkern als Prädiktor für das Auftreten von VHF dienen können (125). In diesem Geflecht stellt sich auf der Grundlage unserer Ergebnisse die interessante Frage, ob einer Erhöhung der gemessenen Prädiktoren schon eine Substratveränderung am Herzen zugrunde liegt oder inwieweit auch hier ein möglicherweise erhöhter NGF-Spiegel für neuronales Remodelling sorgt und wo im Körper dieses NGF synthetisiert wurde. Die Fragen müssen beantwortet werden, ob es sich tatsächlich um kardiales NGF handelt und welche Mediatoren zwischen einer Entzündungsreaktion und einer kardialen NGF-Erhöhung vermitteln (123).

Hinweise zum Zusammenhang zwischen anderen kardialen Pathologien und VHF liefert uns zum Beispiel die Tatsache, dass ein erhöhter Endothelin-1-Spiegel im Blut für eine erhöhte Freisetzung von NGF aus Kardiomyozyten sorgt (126). Erhöhte Endothelin-1-

Spiegel werden zum Beispiel bei der koronaren Herzerkrankung, der Herzinsuffizienz oder auch der arteriellen Hypertonie gemessen (127). Ein erhöhter Endothelin-1-Spiegel ist auch ein Prädiktor für erneut auftretendes VHF nach Pulmonalvenenisolation mittels Herzkatheter (128). Es zeigt sich wiederum die Bedeutung der Verbindung zwischen der Pathologie des VHF und anderen kardialen Erkrankungen sowie gerade die Bedeutung des neurotrophen Faktors NGF innerhalb dieses komplexen Systems.

4.5 Möglichkeiten in der Klinik

Sicherlich ist nach dieser Arbeit mit einem In-vitro-Modell sympathischer neonataler Rattenneurozyten noch kein direkter klinischer Einsatz der Ergebnisse zu erwarten. Jedoch ist mit dieser Arbeit ein weiterer Schritt in Richtung des Verständnisses der Pathophysiologie von VHF getan worden. Um später vielleicht etwas kausal behandeln zu können, müssen zuerst die Funktionsmechanismen verstanden werden.

Sowohl die neuen Erkenntnisse über die Bedeutung des Rezeptors TrkA für das SNS bei HFES als auch die Depolarisationsabhängigkeit der Rezeptorhochregulation und die Hochregulation der neurotrophen Faktoren lassen sicher als erstes an eine mögliche klinische Intervention denken und bieten Raum für neue Forschungsideen auf diesem Gebiet.

Durch die Studie ist gezeigt worden, dass eine TrkA-Blockade in vitro effektiv das SNS durch HFES hemmt. Dieses Ergebnis müsste nun in einem In-vivo-Modell bestätigt werden, um erst einmal mögliche weitere noch unbekannte systemische Einflüsse auf das SNS zu untersuchen. Schließlich ist bereits in der Diskussion die Frage aufgekommen, ob möglicherweise der Rezeptor P75 auch eine wichtige Rolle in der Vermittlung des SNS spielt. Trotzdem scheint die lokale TrkA-Blockade der das Herz versorgenden sympathischen Neurozyten die erste mögliche Alternative zu sein, um das durch HFES ausgelöste SNS zu blockieren und somit das neuronale Remodelling durch VHF zu verhindern. Es würde kein neuronales Substrat geschaffen, welches das erneute Auftreten von VHF begünstigen würde. Der Entstehungskreis würde an einer wichtigen Stelle unterbrochen werden. Hierzu wären bei weiteren Forschungsansätzen möglicherweise zunächst auch Untersuchungen an TrkA-Knock-Out-Modellen denkbar. Allerdings ist hier auch schon eine deutliche Beeinträchtigung der sympathischen

Nervenzellentwicklung zu erwarten, da TrkA, wie beschrieben, auch wichtige Differenzierungs- und Entwicklungsfunktionen über Neurotrophine steuert (89). Ein Ansatz mit späterer TrkA-Blockade nach abgeschlossener Differenzierung wäre sicherlich sinnvoller.

Eine andere Alternative eröffnet sich innerhalb unserer Untersuchungen durch einen früheren Eingriff in das System der Vermittlung des SNS durch HFES. Die Depolarisationsblockade durch Lidocain als Antiarrhythmikum der Klasse I war in vitro in dieser Arbeit ebenfalls eine effektive Methode zur Verhinderung des SNS. Sie war allerdings wesentlich unspezifischer, da durch den Depolarisationsblock eine Verringerung der Ausschüttung der gemessenen neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 auf Kontrollniveau bewirkt wurde. Inwieweit natürlich auch andere, möglicherweise wichtige, Signalwege der SN durch die Blockade beeinträchtigt wurden, ist aufgrund der unspezifischen Wirkung nicht zu überschauen. Ein Einsatz von Flecainid als Antiarrhythmikum der Klasse I zeigt Erfolg bei der rhythmuskontrollierenden Therapie des paroxysmalen VHF durch Reduzierung des Auftretens neuer VHF-Episoden in der Klinik (129) (130). Die vorliegende Arbeit konnte im Modell zeigen, dass durch den Einsatz dieser Substanzklasse bei kompletter Blockade der Depolarisation eine NGF-Ausschüttung und als Folge ein neuronales Remodelling verhindert werden konnte. Könnte möglicherweise dieser Ansatz einen früheren Einsatz dieser Medikamente in der Klinik bestärken, um eine Substratänderung zu verhindern, die möglicherweise das erneute Auftreten von VHF begünstigt? Um diese Frage zu beantworten, sind zuvor weitere Studien nötig. So könnte beispielsweise auch hier wieder das in dieser Arbeit verwendete Modell Hinweise liefern, wenn man in weiteren Studien unterschiedliche Konzentrationen der Antiarrhythmika der Klasse I einsetzt. Dies würde in niedrigeren Konzentrationen wieder ein teilweises Auslösen von Aktionspotentialen zulassen und möglicherweise trotz HFES ein neuronales Sprouting effektiv verhindern.

Zusammengefasst bietet das verwendete Modell zwar in der vorliegenden Arbeit noch keine exakte Darstellung der Pathophysiologie des VHF, liefert allerdings entscheidende Hinweise zum Verständnis dieser und bietet an vielen Stellen die Möglichkeit für weitere Forschungsansätze.

5. Zusammenfassung

Gegenstand: Diese Arbeit untersuchte die Ausschüttung der neurotrophen Faktoren NT3 und NGF durch sympathische Neurozyten von neonatalen Ratten bei hochfrequenter elektrischer Stimulation sowie deren neurotrophe Wirkung über den Rezeptor TrkA in einem in-vitro-Modell der Pathologie des Vorhofflimmerns.

Hintergrund: Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen unter der allein in Deutschland etwa 300.000 Menschen leiden. In der Pathogenese kommt es im Verlauf kardial zu strukturellem, neuronalem und elektrischem Remodelling. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Dysbalance zwischen sympathischer und parasympathischer neuronaler Aktivität ein Auftreten von Vorhofflimmern begünstigt. Es gibt bereits Forschungsergebnisse, die zeigen, dass hochfrequente elektrische Stimulation im Tiermodell zu vermehrter kardialer Ausschüttung von neurotrophen Faktor NGF und vermehrter sympathischer Innervation führt. Genaue molekulare Grundlagen sind hier jedoch noch nicht bekannt. Die genauere Charakterisierung zugrunde liegender intrazellulärer Signalkaskaden kann neue Therapiewege zur Verhinderung eines pathologischen neuronalen Remodellings bei VHF erschliessen.

Methodik: Als Grundlage der Arbeit diente ein Modell aus kultivierten sympathischen Neurozyten des Ganglion Cervicale Superior von neonatalen Sprague Dawley Ratten, welche rhythmischen elektrischen Feldern mit Frequenzen zwischen 5 Hz und 99 Hz mit einer Stimulationsspannung von 2 V/cm sowie einer Impulsdauer von 1 ms ausgesetzt wurden. Die Stimulationsdauer betrug 48 h. Vergleichsmessungen wurden mit lidocainhaltigem Zellmedium zur Verhinderung der Zelldepolarisation bei gleicher elektrischer Stimulation durchgeführt. Anschließend wurde mittels mikroskopischen Nativbildern und Immunfluoreszenztechnik das morphologische Nerve Sprouting der sympathischen Neurozyten untersucht. Außerdem wurde im Zellmedium mittels ELISA-Technik die Menge der durch die sympathischen Neurozyten sezernierten neurotrophen Faktoren NGF und NT3 in Abhängigkeit von der Zeit und der gewählten Frequenz untersucht. PCR und Western-Blot-Technik dienten schließlich nach hochfrequenter elektrischer Stimulation zur RNA-Bestimmung und zur zellulären Proteinbestimmung von NGF und NT3 sowie ihres Rezeptors TrkA.

Ergebnisse: Diese Arbeit zeigt, dass hochfrequente elektrische Stimulation sympathischer Neurozyten, depolarisationsabhängig, durch eine vermehrte Produktion und Expression von NGF und dessen autokrine bzw. parakrine Wirkung über den durch hochfrequente elektrische Stimulation ebenfalls hochregulierten Rezeptor TrkA zu sympathischem Nerve Sprouting führt.

Schlussfolgerung: Das Verständnis der molekularen Signalkaskade bei hochfrequenter elektrischer Stimulation von sympathischen Neurozyten ist durch die Ergebnisse dieser Arbeit erweitert worden und bietet bereits Raum für erste Ideen zur effektiven Verhinderung des sympathischen Nerve Sproutings, beispielsweise durch die Blockade des Rezeptors TrkA oder die Depolarisationsblockade durch Antiarrhythmika der Klasse I. Im nächsten Schritt ist jedoch eine weitere Annäherung des Modells an die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns durch den Einsatz arrhythmischer elektrischer Felder oder die Entwicklung eines in-vivo-Modells anzudenken.

6. Quellen

1. **Mewis, Riessen, Spyridopoulos (Hrs.).** Kardiologie Compact - Alles für Station und Facharztprüfung. s.l. : Thieme, Stuttgart, New York 2006 S. 532, 535+536.
2. **Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D.** Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. s.l. : Am J Cardiol. 1998 Oct 16;82(8A):2N-9N.
3. **Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al.** Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. JAMA 2001;285:2370 –5.
4. **Friberg J, Buch P, Scharling H, et al.** Rising rates of hospital admissions. Epidemiology 2003;14:666 –72.
5. **Herold et al.** Innere Medizin 2008. s.l. : Dr. med Gerd Herold, Köln S. 266.
6. **Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Priori SG,.** ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation--executive summary. Rev Port Cardiol. 2007 Apr;26(4):383-446.
7. **Bollmann A, Husser D, Stridh M, Holmqvist F, Roijer A, Meurling CJ, Sörnmo L, Olsson SB.** Atrial fibrillatory rate and risk of left atrial thrombus in atrial fibrillation. Europace. 2007 Aug;9(8):621-6. Epub 2007 Jun 29.
8. **Grubitzsch H, Modersohn D, Leuthold T, Konertz W.** Analysis of atrial fibrillatory activity from high-resolution surface electrocardiograms: Evaluation and application of a new system. Exp Clin Cardiol. 2008 Spring;13(1):29-35.
9. **Lin YJ, Tai CT, Kao T, Tso HW, Higa S, Tsao HM, Chang SL, Hsieh MH, Chen SA.** Frequency analysis in different types of paroxysmal atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2006 Apr 4;47(7):1401-7. Epub 2006 Mar 15.
10. **Meijler FL, Jalife J, Beaumont J, Vaidya D.** AV nodal function during atrial fibrillation: the role of electrotonic modulation of propagation. J Cardiovasc Electrophysiol. 1996 Sep;7(9):843-61.
11. **Fetsch T, Bauer P, Engberding R, Koch HP, Luki J, Meinertz T, Oeff M, Seipel L, Trappe HJ, Treese N, Breithardt G und Investigators, Prevention of Atrial Fibrillation after Cardioversion.** Prevention of atrial fibrillation after cardioversion: results of the PAFAC trial. Eur Heart J. 2004 Dec;25(23):2174; author reply 2174-5.

12. **Patten M, Maas R, Bauer P, Lüderitz B, Sonntag F, Dluzniewski M, Hatala R, Opolski G, Müller HW, Meinertz T und Investigators., SOPAT.** Suppression of paroxysmal atrial tachyarrhythmias--results of the SOPAT trial. *Eur Heart J.* 2004 Aug;25(16):1371-3.
13. **Lasch HG.** Principles of drug prevention of thrombosis. *Langenbecks Arch Chir.* 1986;369:451-7.
14. **Hart RG, Pearce LA.** Current Status of Stroke Risk Stratification in Patients With Atrial Fibrillation. *Stroke.* 2009 May 21.
15. **Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D.** Impact of atrial fibrillation on the risk of death; the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1998;98:946-952.
16. **Farré J, Wellens HJ.** Philippe Coumel: a founding father of modern arrhythmology. *Europace.* 2004 Sep;6(5):464-5. [Click here to read.](#)
17. **Andrew L Wit, Ph.D. and Penelope A. Boyden, Ph.D.** Triggered Activity and Atrial Fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007 March; 4(3 Suppl): S17–S23. .
18. **Arora R, Verheule S, Scott L, Navarrete A, Katari V, Wilson E, Vaz D, Olgin JE.** Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping. *Circulation.* 2003 Apr 8;107(13):1816-21. Epub 2003 Mar 17.
19. **Okuyama Y, Miyauchi Y, Park AM, Hamabe A, Zhou S, Hayashi H, Miyauchi M, Omichi C, Pak HN, Brodsky LA.** High resolution mapping of the pulmonary vein and the vein of marshall during induced atrial fibrillation and atrial tachycardia in a canine model of pacing-induced congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;42:348–360.
20. **Dong J, Calkins H.** Technology insight: catheter ablation of the pulmonary veins in the treatment of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005 Mar;2(3):159-66. [Click here to read .](#)
21. **Callahan TD 4th, Di Biase L, Horton R, Sanchez J, Gallingshouse JG, Natale A.** Catheter ablation of atrial fibrillation. *Cardiol Clin.* 2009 Feb;27(1):163-78, x.
22. **Willems S, Hoffmann B, Steven D, Drewitz I, Servatius H, Müllerleile K, Meinertz T, Rostock T.** Catheter ablation for atrial fibrillation: clinically established or still an experimental method? *Herz.* 2008 Sep;33(6):402-11.
23. **Kusumoto F, Prussak K, Wiesinger M, Pullen T, Lynady C.** Radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation in older patients: outcomes and complications. *J Interv Card Electrophysiol.* 2009 Jun;25(1):31-5. Epub 2009 Jan 16.
24. **Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S.** Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm.* 2009 Apr;6(4):454-60. Epub 2009 Jan 16.
25. **Rha SW, Kim YH, Hong MK, Ro YM, Choi CU, Suh SY, Kim JW, Kim EJ, Park CG, Seo HS, Oh DJ.** Mechanisms responsible for the initiation and maintenance of atrial fibrillation assessed by

non-contact mapping system. *Int J Cardiol.* 2008 Feb 29;124(2):218-26. Epub 2007 Apr 16. Click here to read .

26. **Allessie MA, Bonke FI, Schopman FJ.** Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circ Res.* 1973 Jul;33(1):54-62.

27. **Rensma PL, Allessie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ.** Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res.* 1988 Feb;62(2):395-410.

28. **Workman AJ, Kane KA, Rankin AC.** Cellular bases for human atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2008 Jun;5(6 Suppl):S1-6. Epub 2008 Jan 17.

29. **Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA.** Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995 Oct 1;92(7):1954-68.

30. **Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C, Christ T, Schüler S, Ravens U.** Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation.* 2001 Nov 20;104(21):2551-7.

31. **Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U.** The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2005 Dec 13;112(24):3697-706. Epub 2005 Dec 5.

32. **Voigt N, Maguy A, Yeh YH, Qi X, Ravens U, Dobrev D, Nattel S.** Changes in I K, ACh single-channel activity with atrial tachycardia remodelling in canine atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan;77(1):35-43. Epub 2007 Oct 26.

33. **Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S.** Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 1997 Oct;81(4):512-25.

34. **Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S.** Tachycardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 1997 Dec;81(6):1045-52.

35. **Lenaerts I, Bito V, Heinzel FR, Driesen RB, Holemans P, D'hooge J, Heidebüchel H, Sipido KR, Willems R.** Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res.* 2009 Oct 23;105(9):876-85. Epub 2009 Sep 17.

36. **Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M.** Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res.* 2002 Jan;53(1):192-201.

37. **Aldhoon B, Melenovský V, Peichl P, Kautzner J.** New insights into mechanisms of atrial fibrillation. *Physiol Res.* 2009 Feb 27.

38. **Eckstein J, Verheule S, de Groot NM, Allesie M, Schotten U.** Mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation in chronically dilated atria. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008 Jun-Jul;97(2-3):435-51. Epub 2008 Feb 16.
39. **Polyakova V, Miyagawa S, Szalay Z, Risteli J, Kostin S.** Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. *J Cell Mol Med.* 2008 Jan-Feb;12(1):189-208. Epub 2008 Jan 10.
40. **Burstein B, Nattel S.** Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb 26;51(8):802-9.
41. **Nattel S.** New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):219-26.
42. **van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, Hellemons AJ, van Veen TA, Allesie MA, Jongsma HJ.** Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2000 Jun;46(3):476-86.
43. **Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA.** Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995 Oct 1;92(7):1954-68.
44. **Coumel P.** Paroxysmal atrial fibrillation: a disorder of autonomic tone? *Eur Heart J.* 1994 Apr;15 Suppl A:9-16.
45. **Coumel P.** Autonomic influences in atrial tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1996 Oct;7(10):999-1007.
46. **Yamashita T, Murakawa Y, Sezaki K, Inoue M, Hayami N, Shuzui Y, Omata M.** Circadian variation of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.* 1997 Sep 2;96(5):1537-41.
47. **Huang JL, Wen ZC, Lee WL, Chang MS, Chen SA.** Changes of autonomic tone before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 1998 Oct 30;66(3):275-83.
48. **Liu L, Nattel S.** Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 2):H805-16.
49. **Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE.** Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation.* 2000 Mar 14;101(10):1185-91.
50. **Ogawa M, Zhou S, Tan AY, Song J, Gholmieh G, Fishbein MC, Luo H, Siegel RJ, Karagueuzian HS, Chen LS, Lin SF, Chen PS.** Left stellate ganglion and vagal nerve activity and cardiac arrhythmias in ambulatory dogs with pacing-induced congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 24;50(4):335-43. Epub 2007 Jul 10.
51. **Patrick Schauerte, MD, et al.** Catheter Ablation of Cardiac Autonomic Nerves for Prevention of Vagal Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2000;102:2774-2780.

52. **Smeets JLRM, Allesie MA, Lammers WJEP, et al.** The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium: the role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium. *Circ Res.* 1986;58:96–108.
53. **Burashnikov A, Antzelevitch C.** Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation.* 2003 May 13;107(18):2355-60. Epub 2003 Apr 14.
54. **Chen PS, Tan AY.** Autonomic nerve activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007 Mar;4(3 Suppl):S61-4. Epub 2006 Dec 15.
55. **Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, Fishbein MC, Lin SF, Chen LS, Chen PS.** Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines. *Circulation.* 2008 Aug 26;118(9):916-25. Epub 2008 Aug 12.
56. **Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS.** Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. *Circulation.* 2001 Jan 2;103(1):22-5.
57. **Hamabe A, Chang CM, Zhou S, Chou CC, Yi J, Miyauchi Y, Okuyama Y, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen LS, Chen PS.** Induction of atrial fibrillation and nerve sprouting by prolonged left atrial pacing in dogs. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2003 Dec;26(12):2247-52.
58. **Gould PA, Yii M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM.** Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006 Aug;29(8):821-9.
59. **Gong YT, Li WM, Li Y, Yang SS, Sheng L, Yang N, Shan HB, Xue HJ, Liu W, Yang BF, Dong DL, Li BX.** Probucol attenuates atrial autonomic remodeling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Chin Med J (Engl).* 2009 Jan 5;122(1):74-82.
60. **Walker RG, Foster A, Randolph CL, Isaacson LG.** Changes in NGF and NT-3 protein species in the superior cervical ganglion following axotomy of postganglionic axons. *Brain Res.* 2009 Feb 19;1255:1-8. Epub 2008 Dec 9.
61. **Zareen N, Greene LA.** Protocol for culturing sympathetic neurons from rat superior cervical ganglia (SCG).. *J Vis Exp.* 2009 Jan 30;(23). pii: 988. doi: 10.3791/988.
62. **Orike N, Thrassivoulou C, Wrigley A, Cowen T.** Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol.* 2001 Jun 15;47(4):295-305.
63. **Paxinos George.** The rat nervous system second edition. Academic Press inc. 1995 San Diego, Calif S.81-83 S.96.
64. **Reinhard Griebenow und Hartmut Gülker.** Autonomes Nervensystem und Herzrhythmusstörungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1990 S.1-3.

65. **Ciaccio EJ, Biviano AB, Whang W, Wit AL, Garan H, Coromilas J.** New methods for estimating local electrical activation rate during atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009 Jan;6(1):21-32. Epub 2008 Oct 15.
66. **Saksena S, Shankar A, Prakash A, Krol RB.** Catheter mapping of spontaneous and induced atrial fibrillation in man. *J Interv Card Electrophysiol*. 2000 Jan;4 Suppl 1:21-8.
67. **Marc Gertsch.** Das EKG: Auf einen Blick. Springer 2008 S.23.
68. **Thermo Scientific.** Technology Overview Nanodrop. [Online]
<http://www.nanodrop.com/Library/NanoDrop-Technology-Overview.pdf>.
69. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
70. **Andreas Scholz, Noboru Kuboyama, Gunter Hempelmann and Werner Vogel.** Complex Blockade of TTX-Resistant Na⁺ Currents by Lidocaine and. *J Neurophysiol* 79:1746-1754, 1998.
71. **Levi-Montalcini R.** The nerve growth factor: its role in growth, differentiation and funktion of the sympathetic adrenergic neuron. *Prog Brain Res* 45:235-258.
72. **Ernsberger U.** Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res*. 2009 Jun;336(3):349-84. Epub 2009 Apr 23.
73. **Snider WD.** Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*. 1994 Jun 3;77(5):627-38.
74. **Hassankhani A, Steinhilper ME, Soonpaa MH, Katz EB, Taylor DA, Andrade-Rozental A, Factor SM, Steinberg JJ, Field LJ, Federoff HJ.** Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Dev Biol*. 1995 May;169(1):309-21.
75. **Cabrera-Vásquez S, Navarro-Tableros V, Sánchez-Soto C, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M.** Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny. *BMC Dev Biol*. 2009 Jun 17;9:34.
76. **Rana OR, Saygili E, Meyer C, Gemein C, Krüttgen A, Andrzejewski MG, Ludwig A, Schotten U, Schwinger RH, Weber C, Weis J, Mischke K, Rassaf T, Kelm M, Schauerte P.** Regulation of nerve growth factor in the heart: the role of the calcineurin-NFAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Apr;46(4):568-78. Epub 2008 Dec 25.
77. **Lecht S, Foerster C, Arien-Zakay H, Marcinkiewicz C, Lazarovici P, Lelkes PI.** Cardiac microvascular endothelial cells express and release nerve growth factor but not fibroblast growth factor-2. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010 May;46(5):469-76. Epub 2010 Jan 29.
78. **Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, Baum L, Smith PG.** Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J Neurobiol*. 2003 Oct;57(1):38-53.

79. **Orike N, Thrasivoulou C, Wrigley A, Cowen T.** Differential regulation of survival and growth in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol.* 2001 Jun 15;47(4):295-305.
80. **Zhou XF, Rush RA.** Functional roles of neurotrophin 3 in the developing and mature sympathetic nervous system. *Mol Neurobiol.* 1996 Dec;13(3):185-97.
81. **Chalazonitis A.** Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol Neurobiol.* 1996 Feb;12(1):39-53.
82. **Zhou XF, Chie ET, Deng YS, Rush RA.** Rat mature sympathetic neurones derive neurotrophin 3 from peripheral effector tissues. *Eur J Neurosci.* 1997 Dec;9(12):2753-64.
83. **Riley AB, Manning WJ.** Atrial fibrillation: an epidemic in the elderly. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011 Aug;9(8):1081-90.
84. **Nilsson E, Dole G, Skinner M.** Neurotrophin NT3 Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition. *Reproduction.* 2009 Jul 7.
85. **Abram M, Wegmann M, Fokuhl V, Sonar S, Luger EO, Kerzel S, Radbruch A, Renz H, Zemlin M.** Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4705-12. .
86. **Tsai MS, Chung SD, Liang JT, Ko YH, Hsu WM, Lai HS, Chang KC.** Enhanced expression of cardiac nerve growth factor and nerve sprouting markers in rats following gastric perforation: the association with cardiac sympathovagal balance. *J Surg Res.* 2010 Mar 16.
87. **Meloni M, Caporali A, Graiani G, Lagrasta C, Katare R, Van Linthout S, Spillmann F, Campesi I, Madeddu P, Quaini F, Emanuelli C.** Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res.* 2010 Apr 16;106(7):1275-84. Epub 2010 Apr 1.
88. **Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C.** Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):299-311. Epub 2007 Nov 9.
89. **Andres R, Herrera-Baranda LA, Thompson J, Wyatt S, Davies AM.** Regulation of sympathetic neuron differentiation by endogenous nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Lett.* 2008 Feb 6;431(3):241-6. Epub 2007 Dec 4.
90. **Huang EJ, Reichardt LF.** Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
91. **Skaper SD.** The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008 Feb;7(1):46-62.
92. **Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY.** Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry.* 1995 Apr 4;34(13):4139-46.

93. **Barbacid M.** The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994 Nov;25(11):1386-403.
94. **Reichardt LF.** Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Sep 29;361(1473):15.
95. **Davies AM, Minichiello L, Klein R.** Developmental changes in NT3 signalling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4482-9.
96. **Rydén M, Ibáñez CF.** Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;271(10):5623-7.
97. **Yano H, Chao MV.** Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv.* 2000 Mar;74(2-3):253-60.
98. **Fagan AM, Zhang H, Landis S, Smeyne RJ, Silos-Santiago I, Barbacid M.,.** TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. *J Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6208-18.
99. **Wyatt S, Piñón LG, Ernfors P, Davies AM.,.** Sympathetic neuron survival and TrkA expression in NT3-deficient mouse embryos. *EMBO J.* 1997 Jun 2;16(11):3115-23.
100. **Hasan W, Smith HJ, Ting AY, Smith PG.** Estrogen alters trkA and p75 neurotrophin receptor expression within sympathetic neurons. *J Neurobiol.* 2005 Nov;65(2):192-204.
101. **Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, Miller FD, Kaplan DR.** APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol.* 2006 Dec;26(23):8928-41. Epub 2006 Sep 25.
102. **Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, Schmidt RE, Bernateck M, Zeidler H, Tak PP, Baeten D, Rühl M.** Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R82. Epub 2009 Jun 2.
103. **Li Z, Beutel G, Rhein M, Meyer J, Koenecke C, Neumann T, Yang M, Krauter J, von Neuhoff N, Heuser M, Diedrich H, Göhring G, Wilkens L, Schlegelberger B, Ganzer A, Baum C.** High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood.* 2009 Feb 26;113(9):2028-37. Epub 2008 Dec 4.
104. **Deng YS, Zhong JH, Zhou XF.** Effects of endogenous neurotrophins on sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia and allodynia following spinal nerve injury. *Exp Neurol.* 2000 Aug;164(2):344-50.
105. **Gould PA, Yip M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM.** Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006 Aug;29(8):821-9.

106. **Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D, Miller FD.** NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J Cell Biol.* 1997 Jan 27;136(2):375-88.
107. **Niwa H, Hayakawa K, Yamamoto M, Itoh T, Mitsuma T, Sobue G.** Differential age-dependent trophic responses of nodose, sensory, and sympathetic neurons to neurotrophins and GDNF: potencies for neurite extension in explant culture. *Neurochem Res.* 2002 Jun;27(6):485-96.
108. **ElShamy WM, Linnarsson S, Lee KF, Jaenisch R, Ernfors P.** Prenatal and postnatal requirements of NT-3 for sympathetic neuroblast survival and innervation of specific targets. *Development.* 1996 Feb;122(2):491-500.
109. **Skoff AM, Adler JE.** Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. *Exp Neurol.* 2006 Feb;197(2):430-6. Epub 2005 Nov 21.
110. **Kimpinski K, Jelinski S, Mearow K.** The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons. *Neuroscience.* 1999;93(1):253-63.
111. **Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JH, Mattson MP, Kriegstein J.** Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience.* 2002;115(4):1089-108.
112. **Stiles MK, John B, Wong CX, Kuklik P, Brooks AG, Lau DH, Dimitri H, Roberts-Thomson KC, Wilson L, De Sciscio P, Young GD, Sanders P.** Paroxysmal lone atrial fibrillation is associated with an abnormal atrial substrate: characterizing the "second factor". *J Am Coll Cardiol.* 2009 Apr 7;53(14):1182-91.
113. **Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S.** Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation.* 1999 Jul 6;100(1):87-95.
114. **Workman AJ.** Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2010 Mar;381(3):235-49. Epub 2009 Dec 4.
115. **Wasmund SL, Li JM, Page RL, Joglar JA, Kowal RC, Smith ML, Hamdan MH.** Effect of atrial fibrillation and an irregular ventricular response on sympathetic nerve activity in human subjects. *Circulation.* 2003 Apr 22;107(15):2011-5. Epub 2003 Apr 7.
116. **Segerson NM, Sharma N, Smith ML, Wasmund SL, Kowal RC, Abedin M, Macgregor JF, Pai RK, Freedman RA, Klein RC, Wall TS, Stoddard G, Hamdan MH.** The effects of rate and irregularity on sympathetic nerve activity in human subjects. *Heart Rhythm.* 2007 Jan;4(1):20-6. Epub 2006 Sep 16.

117. **Saygili E, Rana OR, Günzel C, Rackauskas G, Saygili E, Noor-Ebad F, Gemein C, Zink MD, Schwinger RH, Mischke K, Weis J, Marx N, Schauerte P.** Rate and irregularity of electrical activation during atrial fibrillation affect myocardial. *Cell Signal*. 2011 Aug 26. .
118. **Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M, Bracci Laudiero ML, Mancini MJ, Procoli A, Micera A, Sacerdoti G, Bonini S, Levi-Schaffer F, Rasi G, Aloe L.** Nerve growth factor and asthma. *Allergy*. 2002;57 Suppl 72:13-5.
119. **Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U.** Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 2010 Oct;40(2):109-26. Epub 2009 May 28.
120. **Isola M, Ferrari V, Miolo A, Stabile F, Bernardini D, Carnier P, Busetto R.** Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2011;24(4):279-84.
121. **Scuri M, Samsell L, Piedimonte G.** The role of neurotrophins in inflammation and allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010 Jul 1;9(3):173-80.
122. **Kılıç A, Sonar SS, Yildirim AO, Fehrenbach H, Nockher WA, Renz H.** Nerve growth factor induces type III collagen production in chronic allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Aug 2.
123. **Tsai MS, Chung SD, Liang JT, Ko YH, Hsu WM, Lai HS, Chang KC.** Enhanced Expression of Cardiac Nerve Growth Factor and Nerve Sprouting Markers in Rats following Gastric Perforation: the Association with Cardiac Sympatho-vagal Balance. *Shock*. 2009 May 18.
124. **Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, Kathiresan S, Rong J, Levy D, Keaney JF Jr, Wang TJ, Vasan RS, Benjamin EJ.** Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2009 Jul 1;104(1):92-6. Epub 2009 May 4.
125. **Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, Sullivan LM, Pencina MJ, Meigs JB, Tofler GH, Selhub J, Jacques PF, Wolf PA, Magnani JW, Ellinor PT, Wang TJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ.** Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community. *Circulation*. 2010 Jan 19;121(2):200-7. Epub 2010 Jan 4.
126. **Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ, Ogawa S.** Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*. 2004 Mar;113(6):876-84.
127. **Barton M, Yanagisawa M.** Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;86(8):485-98.
128. **Nakazawa Y, Ashihara T, Tsutamoto T, Ito M, Horie M.** Endothelin-1 as a predictor of atrial fibrillation recurrence after pulmonary vein isolation. *Heart Rhythm*. 2009 Jun;6(6):725-30. Epub 2009 Feb 24.

129. **Deneer VH, Borgh MB, Kingma JH, Lie-A-Huen L, Brouwers JR.** Oral antiarrhythmic drugs in converting recent onset atrial fibrillation. *Pharm World Sci.* 2004 Apr;26(2):66-78.
130. **Alboni P, Botto GL, Baldi N, Luzi M, Russo V, Gianfranchi L, Marchi P, Calzolari M, Solano A, Baroffio R, Gaggioli G.** Outpatient treatment of recent-onset atrial fibrillation with the "pill-in-the-pocket" approach. *N Engl J Med.* 2004 Dec 2;351(23):2384-91.
131. **Furukawa T, Hirao K, Horikawa-Tanami T, Hachiya H, Isobe M.** Influence of autonomic stimulation on the genesis of atrial fibrillation in remodeled canine atria not the same as in normal atria. *Circ J.* 2009 Mar;73(3):468-75. Epub 2009 Jan 16.
132. **Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D, Miller FD.** NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec;81(24):7951-5.
133. **Levi-Montalcini R.** The nerve growth factor: its role in growth, differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. *Prog Brain Res.* 1976;45:235-58.
134. **Rochlitzer S, Nassenstein C, Braun A.** The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans.* 2006 Aug;34(Pt 4):594-9.
135. **Nassenstein C, Kerzel S, Braun A.** Neurotrophins and neurotrophin receptors in allergic asthma. *Prog Brain Res.* 2004;146:347-67.
136. **Andres R, Herraiz-Baranda LA, Thompson J, Wyatt S, Davies AM.** Regulation of sympathetic neuron differentiation by endogenous nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Lett.* 2008 Feb 6;431(3):241-6. Epub 2007 Dec 4.
137. **Dai S, Zhang S, Guo YH, Chu J, Hua W, Wang FZ.** C-Reactive Protein and Atrial Fibrillation in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Clin Cardiol.* 2009 Jul 30.
138. **Vizzardi E, Nodari S, Zanini G, Manerba A, Frattini S, Madureri A, Raddino R, Dei Cas L.** High sensitivity C-reactive protein: a predictor for recurrence of atrial fibrillation after successful cardioversion. *Intern Emerg Med.* 2009 Aug;4(4):309-13. Epub 2009 Mar 14.
139. **Gedikli O, Orem C, Baykan M, Karahan C, Kucukosmanoglu M, Sahin S, Korkmaz L, Yilmaz H, Celik S.** Association between serum C-reactive protein elevation and atrial fibrillation after first anterior myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 2008 Oct;31(10):482-7.
140. **Aronson D, Boulos M, Suleiman A, Bidoosi S, Agmon Y, Kapeliovich M, Beyar R, Markiewicz W, Hammerman H, Suleiman M.** Relation of C-reactive protein and new-onset atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2007 Sep 1;100(5):753-7. Epub 2007 Jun 12.
141. **Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C.** Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):299-311. Epub 2007 Nov 9.

142. **Kaye DM, Vaddadi G, Gruskin SL, Du XJ, Esler MD.** Reduced myocardial nerve growth factor expression in human and experimental heart failure. *Circ Res.* 2000 Apr 14;86(7):E80-4.
143. **Hiltunen JO, Laurikainen A, Väkevä A, Meri S, Saarma M.** Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol.* 2001 Jun;194(2):247-53.
144. **Peng-Sheng Chen, MD and Alex Y. Tan, MD.** Autonomic nerve activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007 March ; 4(3 Suppl): S61–S64.
145. **Ni X, Li X, Fang X, Li N, Cui W, Zhang B.** NGF/TrkA-mediated Kidins220/ARMS signaling activated in the allergic airway challenge in mice. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010 Oct;105(4):299-306.

7. Publikationen

Saygili E, Schauerte P, Küppers F, Heck L, Weis J, Weber C, Schwinger RH, Hoffmann R, Schröder JW, Marx N, Rana OR. Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA. J Mol Cell Cardiol. 2010 Feb 2.

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Patrick Schauerte sowohl für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit als auch für die Überlassung dieses außerordentlich interessanten Themas.

Mein weiterer großer Dank gilt Dr. med. Erol Saygili, der mich bei dieser Arbeit in allen Fragen und Bereichen sehr gut unterstützt hat.

Außerdem möchte ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe „Kardiale Neurophysiologie“ danken, im Besonderen Dr. med. Obaida Rana. Alle haben ein schnelles Vorankommen bei der Arbeit möglich gemacht.

9. Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Medizinischen Klinik I – Kardiologie, Pneumologie, Angiologie – des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Florian Küppers
Geburtsdatum:	20.12.1983
Geburtsort:	Würselen
Anschrift:	Soerser Tal 14, 52070 Aachen
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1990 – 1994	Katholische Grundschule Übach
1994 – 2003	Carolus-Magnus-Gymnasium Übach-Palenberg
Juni 2003	Allgemeine Hochschulreife

Wehrersatzdienst:

Aug. 2003 – Feb. 2004	Altenheim St. Josef in Übach-Palenberg
Feb. 2004 – Mai 2004	Krankenhaus St. Elisabeth in Geilenkirchen

Studium:

Okt. 2004 – Nov. 2010	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
September 2007	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

Juli 2006	Med. I RWTH Aachen, Kardiologie
Februar 2008	St.Franziskus Hospital Aachen - Innere Abteilung
Juni 2008	Klinik für Unfallchirurgie, RWTH Aachen
Juli 2009	Med. I RWTH Aachen, Kardiologie

Praktisches Jahr:

Aug. 2009 – Dez. 2009	Tertial Innere Medizin, Medizinisches Zentrum der StädteRegion Aachen – Betriebsteil Bardenberg
Dez. 2009 – März 2010	Tertial Chirurgie, Schweiz, Spitalzentrum Oberwallis – Betriebsteil Visp
März 2010 – Juli 2010	Wahltertial Neurologie, Medizinisches Zentrum der StädteRegion Aachen – Betriebsteil Bardenberg

Approbation:

November 2010	Note „sehr gut“
---------------	-----------------

Ärztliche Tätigkeit:

Seit April 2011	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin des Medizinischen Zentrums der StädteRegion Aachen, Betriebsteil Bardenberg, Fachbereich Gastroenterologie
-----------------	--

Weitere Tätigkeiten:

2003 – 2009	Ehrenamtliche Tätigkeit als Mitarbeiter der Johanniter / Kreis Aachen-Heinsberg im Fachdienstbereich Hausnotruf
-------------	---