

Aus der Klinik für Herzchirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. H. Sievers

---

**S100A1-Expression bei Skelettmuskelventrikeln  
unter Anwendung verschiedener elektrischer  
Stimulationsprotokolle**

Grundlegende Untersuchungen zur Entwicklung  
muskulärer Herzunterstützungssysteme

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
David Thalmann  
aus Rheine

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N.W. Guldner

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2011

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 01.08.2011

gez. \_\_\_\_\_

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Grundlagen der Herzinsuffizienz .....	1
1.2. Herzunterstützung bei terminaler Herzinsuffizienz .....	3
1.2.1. Mechanische Herzunterstützungssysteme .....	3
1.2.1.1. Intraaortale Ballonpumpe (IABP) .....	3
1.2.1.2. HeartMate II® Left Ventricular Assist Device .....	4
1.2.2. Elektrophysiologische Herzunterstützungssysteme.....	5
1.2.2.1. Kardiale Resynchronisationstherapie (CRT).....	5
1.2.2.2. Kardiale Kontraktilitätsmodulation (CCM).....	5
1.2.3. Biologische Herzunterstützungssysteme .....	6
1.2.3.1. Kardiomyoplastik und Aortomyoplastik .....	6
1.2.3.2. Stammzelltherapie .....	7
1.2.3.3. Skelettmuskelventrikel .....	8
1.3. Physiologie des elektrisch stimulierten Skelettmuskels.....	11
1.4. Wirkung von Clenbuterol und Thyroxin auf den Skelettmuskel .....	12
1.5. Das Protein S100A1 und seine Bedeutung .....	13
1.5.1. Im Skelettmuskel.....	15
1.5.2. Im Myokard .....	15
1.5.3. Bei Tumoren und Entzündungen .....	17
1.6. Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1. Versuchstiere.....	18
2.2. Muskelschrittmacher und Elektroden.....	18
2.3. Das elastische Trainingsgerät <i>Frosch</i> .....	19
2.4. Operationsverfahren .....	21
2.5. Elektrostimulation und Fasertransformation .....	23
2.5.1. Stimulationsprotokoll zur partiellen Transformation in Typ-I-Fasern (Protokoll <i>Stim50</i> ).....	23
2.5.2. Stimulationsprotokoll zur vollständigen Transformation in Typ-I-Fasern (Protokoll <i>Stim100</i> ).....	24
2.5.3. Definition des Transformationsgrades .....	24
2.6. Schlagvolumenbestimmung der Skelettmuskelventrikel.....	25
2.7. Medikation während des dynamischen Trainings der Skelettmuskelventrikel.....	27
2.8. Biochemische Analysen.....	27

2.8.1. Gewinnung und Lagerung der Muskelproben.....	27
2.8.2. Bestimmung der schweren Myosinketten .....	27
2.8.3. Bestimmung des Proteins S100A1 .....	30
2.8.4. Densitometrische Quantifizierung der Gele und Filme .....	34
2.9. Einteilung der Versuchsgruppen.....	35
2.10. Statistik .....	35
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1. Versuchstiere und Trainingsdauer.....	36
3.2. Myostimulatoren und Elektroden .....	39
3.3. Biochemische und fluiddynamische Ergebnisse.....	39
3.3.1. Teiltransformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterolmedikation (Gruppe I).....	39
3.3.2. Vollständig transformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterolmedikation (Gruppe II).....	40
3.3.3. Vollständig transformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterol- und Triiodthyroninmedikation (Gruppe III) .....	41
3.4. Myosin-Heavy-Chain-Komposition der Skelettmuskelventrikel.....	41
3.4.1. Vor dem Training .....	41
3.4.2. Nach dem Training .....	42
3.5. Trainingsinduzierte S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel.....	43
3.6. Schlagvolumina der Skelettmuskelventrikel .....	45
3.7. S100A1-Expression und Transformationsgrad der Skelettmuskelventrikel .....	47
3.8. Schlagvolumen und S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel .....	48
3.9. Schlagvolumen und Transformationsgrad der Skelettmuskelventrikel .....	50
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>52</b>
4.1. Tiermodell .....	52
4.2. Gruppeneinteilung .....	53
4.3. Trainingsdauer.....	53
4.4. Myosin-Heavy-Chain-Komposition der Skelettmuskelventrikel.....	54
4.4.1. Vor dem Training .....	54
4.4.2. Nach dem Training .....	54
4.5. Trainingsinduzierte S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel.....	56
4.5.1. S100A1-Expression und Transformationsgrad.....	57
4.6. Schlagvolumina der Skelettmuskelventrikel .....	58
4.6.1. Schlagvolumina und S100A1-Expression.....	58

---

4.6.2. Schlagvolumina und Transformationsgrad .....	60
4.7. Ausblick .....	60
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>87</b>
8.1. Danksagung.....	87
8.2. Lebenslauf .....	88

## 1. Einleitung und Fragestellung

### 1.1. Grundlagen der Herzinsuffizienz

„Herzinsuffizienz ist charakterisiert durch die Unfähigkeit des Herzens, Blut und daher Sauerstoff in dem Maße zu den Endorganen zu transportieren, dass es den Bedürfnissen gerecht wird.“ [200].

In den westlichen Industrieländern ist die chronische Herzinsuffizienz eine der häufigsten Erkrankungen überhaupt. Alleine in Deutschland sind ca. 1,3 Millionen Menschen erkrankt, die Inzidenz liegt bei 116.000 Neuerkrankungen pro Jahr [68]. Ursachen können arterielle Hypertonie, Herzklappenvitien und Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese sein [38, 50, 82]. Am häufigsten ist die Herzinsuffizienz jedoch auf die koronare Herzerkrankung mit dadurch bedingter Myokardischämie zurückzuführen [123].

Eine internationale Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz stellt die Klassifizierung der *New York Heart Association* (NYHA) dar. Sie gibt den klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz anhand der Dyspnoe wieder. Die Einjahres-Überlebensrate der chronischen Herzinsuffizienz im Endstadium (NYHA IV) liegt bei 40-50% [121].

Neben der direkten kausalen Therapie der Herzinsuffizienz, wie z.B. der Myokardrevaskularisation bei Ischämien oder der Implantation einer Klappenprothese bei Vitien, stellt die Pharmakotherapie eine der wichtigsten Therapieoptionen dar. Hierbei werden mehrere Wirkprinzipien ausgenutzt, um den Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz zu durchbrechen.

Mehrere Studien konnten den Nutzen von ACE-Hemmern für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz belegen [37, 54, 187, 188]. Zurückgeführt wird dieses auf mehrere Gründe. Zum einen wird die durch Angiotensin II hervorgerufene Vasokonstriktion mit der Konsequenz einer weiteren Erhöhung von Vor- und Nachlast des Herzens vermindert, zum anderen verringert sich die durch Angiotensin II stimulierte Aldosteronausschüttung, die sonst zu einer Zunahme des intravasalen Volumens führen würde. Ein weiterer Effekt der ACE-Hemmer ist ihre protektive Eigenschaft in Bezug auf das kardiale Remodeling, d. h. auf Umbauvorgänge der Myokardtextur durch Angiotensin II.

Ein ähnliches Wirkungsprofil weisen die Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten auf, die nicht die Bildung, sondern die Wirkung des Angiotensin II auf Rezeptorebene inhibieren. Sie haben weder entscheidende Vor- noch Nachteile gegenüber den ACE-Hemmern [19, 122, 151, 152, 191] und werden überwiegend bei Unverträglichkeit von ACE-Hemmern eingesetzt [70].

Eine weitere Substanzgruppe zur Behandlung der Herzinsuffizienz stellen die Diuretika dar [22, 144]. Sie verringern durch eine gesteigerte Diurese das intravasale Volumen.

Dieses führt zunächst zu einer Senkung der Vorlast des Herzens. Über längere Zeit haben sie zudem einen blutdrucksenkenden Effekt und mindern dadurch die Nachlast des linken Ventrikels. Diuretika sollten stets mit einem ACE-Hemmer oder einem Angiotensin-II-Rezeptorblocker kombiniert werden, um eine weitere Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu vermeiden [70]. Aldosteron-Antagonisten als kaliumsparende Diuretika konnten bei der Therapie der Herzinsuffizienz in mehreren Studien positive Effekte zeigen. Es profitieren vor allem Patienten im Stadium NYHA III oder IV oder mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von  $< 40\%$  [153, 159].

$\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten kamen bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz lange Zeit nicht zum Einsatz. Tatsächlich können  $\beta$ -Blocker die ventrikuläre Funktion einschränken und somit zu einer akuten Dekompensation der Herzinsuffizienz führen [67]. Bei einschleichender Dosierung und langsamer Dosissteigerung werden hingegen protektive Effekte hinsichtlich Hospitalisation, Gesamtletalität und dem plötzlichen Herztod sichtbar [23, 36, 45, 97, 100, 110, 134, 135, 141, 197]. Die empfohlenen  $\beta$ -Blocker zur Behandlung der Herzinsuffizienz sind derzeit Bisoprolol, Carvedilol, Metoprololsuccinat und der hochselektive  $\beta_1$ -Blocker Nebivolol [70].  $\beta$ -Blocker zählen heute zur Standardmedikation bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz.

Ist die chronische Herzinsuffizienz so weit fortgeschritten, dass sie medikamentös nicht mehr beherrschbar ist, spricht man von einer „terminalen“ Herzinsuffizienz. Die einzige definitive Therapie der Herzinsuffizienz in diesem Stadium stellt die Herztransplantation dar. Leider steht eine zu große Nachfrage nach Spenderherzen einer zu geringen Zahl an verfügbaren Organen gegenüber. So wurden im Jahr 2008 in Europa lediglich 581 Herzen transplantiert, wobei am Ende desselben Jahres noch 1064 Patienten auf der Warteliste standen [139]. Diese dramatische Diskrepanz zwischen Organspendern und möglichen Empfängern sowie die äußerst schlechte Prognose der terminalen Herzinsuffizienz stellen die moderne Medizin vor die Aufgabe, nach anderen definitiven oder zumindest temporären Therapien (*bridge-to-transplant/bridge-to-recovery*) zu suchen. Hierzu gibt es bereits mehrere Ansätze in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

## **1.2. Herzunterstützung bei terminaler Herzinsuffizienz**

Prinzipiell gibt es verschiedene Ansätze, das Herz in seiner Pumpfunktion zu unterstützen. Mechanische Systeme können als „künstliche Blutpumpen“ das Herz entlasten. Elektrophysiologische Optionen ermöglichen durch bestimmte Stimulationsmuster und Stimulationslokalisationen eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion. Die biologischen Ansätze haben zum Ziel, aus autologem oder allogenen Material Möglichkeiten zur Herzunterstützung zu schaffen. Im Folgenden sei ein kleiner Auszug dargestellt.

### **1.2.1. Mechanische Herzunterstützungssysteme**

Zur mechanischen Herzunterstützung steht eine Vielzahl von Systemen zur Verfügung. Beispielhaft sollen hier die Intraaortale Ballonpumpe und das HeartMate II® erläutert werden.

#### **1.2.1.1. Intraaortale Ballonpumpe (IABP)**

Seit der ersten klinischen Anwendung der IABP durch Kantrowitz 1968 sind mehr als 40 Jahre vergangen [85, 86]. Trotzdem gehört sie auch heute noch mit weltweit rund 100.000 Implantationen pro Jahr zu den meist genutzten mechanischen Herzunterstützungssystemen [83]. Das Grundprinzip besteht aus dem Einbringen eines Ballonkatheters durch die A. femoralis bis vor den Abgang der linken A. subclavia. Durch eine EKG-getriggerte Insufflation des Ballons nach Schluss der Aortenklappe und eine Deflation kurz vor Öffnung der Aortenklappe werden zwei hämodynamische Effekte erzielt. Die Insufflation des Ballons verdrängt Blut aus der Aorta in die Peripherie. Dieses führt zu einer Zunahme der peripheren Durchblutung und zu einem Anstieg des diastolischen Aortendrucks (diastolische Augmentation). Da die Koronarperfusion hauptsächlich vom diastolischen Aortendruck abhängig ist [58], kann durch den Einsatz der IABP eine Steigerung der Koronardurchblutung erzielt werden [26, 39, 157]. Der zweite Effekt folgt aus der Deflation des Ballons. Diese senkt kurzfristig den Aortendruck und bewirkt für das linke Herz eine Nachlastsenkung [26, 39, 157]. Die Hauptanwendungsgebiete der IABP liegen im postoperativen kardiochirurgischen Low-Cardiac-Output-Syndrom, beim präoperativen kardiochirurgischen Hochrisikopatienten oder in der akuten Herzinsuffizienz nach Myokardischämie [25, 26, 75, 137, 138, 175, 182, 185, 192].

Da es sich bei der IABP um ein nicht vollständig implantierbares System handelt, wird sie ausschließlich am immobilen Patienten eingesetzt. Eine Langzeitanwendung für den bereits mobilisierten Patienten scheidet somit aus.

### 1.2.1.2. HeartMate II® Left Ventricular Assist Device

Das HeartMate II® der Firma Thoratec ist ein sehr junges Beispiel aus der Gruppe der mechanischen Linksherzunterstützungssysteme. Die erste klinische Anwendung des HeartMate II® in seiner jetzigen Form erfolgte 2004 durch Frazier et al. [52] in den USA. Das HeartMate II® besteht aus einer elektrisch betriebenen Axialfluss-Drehkolbenpumpe, die intraperitoneal oder präperitoneal implantiert wird und Blut aus der Spitze des linken Ventrikels über eine Anastomose in die Aorta ascendens pumpt [189]. Die maximale Förderleistung des HeartMate II® liegt mit 10 l/min [189] deutlich über dem physiologischen Ruhe-Herzminutenvolumen. Somit kann das gesamte vom rechten Ventrikel über den Pulmonalkreislauf angelieferte Blutvolumen vom HeartMate II® bewältigt werden. Ganz nach individuellen Erfordernissen ist daher eine vollständige Entlastung des linken Ventrikels möglich. Die Steuerung und Energieversorgung der Axialpumpe erfolgt über ein transkutan geführtes Kabel, die so genannte *Driveline*. Diese ist zunächst mit dem *System-Controller* verbunden, einer kleinen Überwachungseinheit, die als primäre Bedienerschnittstelle fungiert. Zur Stromversorgung wird an den *System-Controller* wiederum ein Netzteil angeschlossen. Alternativ zum Netzteil kann die elektrische Versorgung auch über Akkumulatoren erfolgen. Diese ermöglichen die Mobilisierung des Patienten und machen so einen längerfristigen Einsatz des HeartMate II® für den Patienten praktikabel. Indiziert ist das HeartMate II® zur hämodynamischen Unterstützung von Patienten, die sich aufgrund einer refraktären Linksherzdekompensation in akuter Lebensgefahr befinden [189]. Dabei ist es für den Einsatz als *bridge-to-transplant* sowie als *bridge-to-recovery* vorgesehen [189]. Bei Patienten mit einer Körperoberfläche von weniger als 1,2m<sup>2</sup> ist das HeartMate II® kontraindiziert [189]. Für die Dauer der Linksherzunterstützung ist ein strenges Antikoagulationsprotokoll einzuhalten. Ein von Amir et al. erarbeitetes Protokoll speziell für das HeartMate II® besteht in der Gabe von Warfarin bzw. Phenprocoumon nach einem Ziel-INR zwischen 2,0 und 3,0 sowie in der einmal täglichen Applikation von 100 mg Acetylsalicylsäure und der dreimal täglichen Applikation von je 75 mg Dipyridamol [9]. Der größte Nachteil des HeartMate II® besteht darin, dass es auf die oben beschriebene transkutane Führung der *Driveline* angewiesen ist. Diese Tatsache bringt ein hohes Infektionsrisiko mit sich. Die Infektionswahrscheinlichkeit beträgt allein im ersten Jahr nach Implantation 94% [204]. Infektionen im Bereich des HeartMate II® sind in der Regel äußerst schwierig zu beherrschen, da antibiotische Therapien oder chirurgische Revisionen oft nur temporäre Besserungen erzielen können. Das HeartMate II® kann daher nur selten mehr als zwei Jahre am Patienten eingesetzt werden. Eine kontinuierliche, längerfristige Kreislaufunterstützung ist also auch mit dem HeartMate II® nicht möglich.

### 1.2.2. Elektrophysiologische Herzunterstützungssysteme

Zur Therapie der Herzinsuffizienz gibt es auch Optionen mit elektrophysiologischem Ansatz. Im Folgenden sollen die kardiale Resynchronisationstherapie sowie die kardiale Kontraktilitätsmodulation kurz vorgestellt werden.

#### 1.2.2.1. Kardiale Resynchronisationstherapie (CRT)

Die CRT ist unter der Vorstellung entwickelt worden, durch eine Resynchronisation des linken und rechten Ventrikels die Arbeit des Herzens zu ökonomisieren. Eine z. B. durch Schädigungen des Reizleitungssystems oder durch dilatative Kardiomyopathien verursachte interventrikuläre Dyssynchronie kann durch Pendelbewegungen des Septum interventriculare, durch Aggravation einer bestehenden Mitralklappeninsuffizienz und durch Verkürzung der linksventrikulären Füllungsphase die Pumparbeit des Herzens in erheblichem Maße beeinträchtigen [184].

Durch eine biventrikuläre Stimulation mit individuell eingestelltem ventrikulo-ventrikulären Delay kann eine Resynchronisation der Ventrikel erreicht werden [32, 101]. Die rechtsventrikuläre Stimulation erfolgt durch eine Sonde im rechten Ventrikel, die linksventrikuläre Stimulation wird durch die Platzierung einer Elektrode im Sinus coronarius realisiert. Beide ventrikulären Sonden können daher transvenös platziert werden. Prinzipiell ist jedoch auch eine epikardiale Sondenanlage möglich.

Empfohlen wird die CRT heute für herzinsuffiziente Patienten beim Zusammentreffen folgender Kriterien [196]:

- NYHA III oder IV
- medikamentös austherapierte Herzinsuffizienz
- $EF \leq 35\%$
- linksventrikuläre Dilatation
- QRS-Komplex  $\geq 120$  ms
- Sinusrhythmus

Durch die CRT wird die körperliche Belastbarkeit der Patienten erhöht, die Dyspnoe gemildert sowie die subjektive Lebensqualität verbessert [1, 12, 31, 102].

#### 1.2.2.2. Kardiale Kontraktilitätsmodulation (CCM)

Die CCM stellt ein relativ neues Konzept zur elektrischen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz dar. Sie besteht aus einer elektrischen rechtsventrikulären Stimulation während der absoluten Refraktärzeit des Arbeitsmyokards [73]. Realisiert wird dieses durch ein implantierbares Device (z. B. *Optimizer™ III*, *Impulse Dynamics*, Orangeburg, USA) ähnlich einem Herzschrittmacher. Das CCM-Device wird in der Regel subklavikulär

implantiert und verfügt über eine Vorhofsonde und zwei rechtsventrikuläre Sonden, die über die V. subclavia positioniert werden [73].

Es wurde gezeigt, dass es unter CCM zu einer Beeinflussung der kardialen Genexpression kommt. So nimmt die mRNA-Expression des Myokards von *atrial natriuretic peptide* (ANP) und *brain natriuretic peptide* (BNP) bei herzinsuffizienten Patienten, denen ein CCM-Device implantiert wurde, signifikant ab, wohingegen es bei der Sarko(endo)plasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase-2a (SERCA-2a) zu einem deutlichen Anstieg kommt [28]. Einer durch die Herzinsuffizienz pathologisch veränderten Genexpression wird somit entgegengewirkt.

Eine weitere messbare Auswirkung der CCM-Therapie ist die positive Inotropie. Sowohl im Tiermodell als auch am Menschen konnte eine Zunahme der maximalen systolischen linksventrikulären Druckänderung pro Zeit ( $\Delta p/\Delta t_{\max}$ ) nachgewiesen werden [29, 142]. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass dieser Inotropiegewinn nicht mit einer Zunahme des myokardialen Sauerstoffverbrauches einhergeht [29]. Diese experimentell erhobenen Daten sind für den herzinsuffizienten Patienten von klinischer Relevanz. Durch die kardiale Kontraktilitätsmodulation wird die körperliche Belastbarkeit erhöht sowie eine Verbesserung der subjektiven Lebensqualität erzielt [21]. Eine Indikation zur CCM besteht bei erwachsenen Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz trotz adäquater Therapie [73].

### 1.2.3. Biologische Herzunterstützungssysteme

Parallel zu den Bemühungen, mechanische oder elektrophysiologische Lösungen für die Herzunterstützung zu finden, werden Anstrengungen unternommen, Systeme oder Verfahren biologischer Art zu entwickeln. Folgende Ausführungen sollen einen kleinen Überblick über die biologischen Möglichkeiten der Herzunterstützung geben.

#### 1.2.3.1. Kardiomyoplastik und Aortomyoplastik

Die Idee, das Herz durch körpereigene Skelettmuskeln zu unterstützen, ist bereits einige Jahrzehnte alt. Erste Versuche zielten auf eine passive Myokardunterstützung durch autologe Skelettmuskeltransplantate ab. Leriche ersetzte beim Hund infarziertes Myokard durch Skelettmuskulatur, um den Herzmuskelausfall zu kompensieren [104]. Griffith und Bates [59] versuchten 1938 in Anlehnung an Becks myokardiale Revaskularisation [16], durch auf das Herz aufgenähte Muskelstücke die Durchblutung zu verbessern. Petrowsky berichtete 1948 auf der Leningrader Onkologiekonferenz, dass er Diaphragmamuskel als freie autologe Transplantate für plastische Operationen an Herz, Ösophagus, Lunge und Leber angewandt habe [147, 148]. Bis 1966 hat Petrowsky bei über 100 Patienten die

äußere Herzwand bei Aneurysmen mit Diaphragmamuskulatur verstärkt. Dieses war die größte klinische Studie dieser Art [147].

Mit der Entwicklung von Myostimulatoren wurden erste Studien ermöglicht, die sich mit der aktiven Herzunterstützung befassten. Hierbei ist vor allem Kantrowitz zu nennen, der 1958 einen Teil des Diaphragmas um das Herz wickelte (Kardiomyoplastik) und synchron zur Systole elektrisch stimulierte. Leider konnte er keine Änderungen relevanter hämodynamischer Parameter nachweisen, sodass er den Versuch unternahm, die descendierende Aorta in ähnlicher Weise zu umwickeln (Aortomyoplastik). Dabei konnte durch elektrische Stimulation während der Diastole ein Blutdruckanstieg registriert werden. Dieses war die Geburtsstunde einer effektiven Kreislaufunterstützung, auch wenn die Wirkung infolge der Muskelermüdung nur wenige Minuten anhielt [84]. Nakamura und Glenn wiesen 1964 durch *in vivo*-Versuche darauf hin, dass der Muskelnerv unversehrt bleiben muss, um Muskelatrophien zu vermeiden. Sie zeigten zudem als erste *in vivo*, dass nach Umwickeln des Herzens mit Diaphragma der systolische Blutdruck um 20 mmHg für eine Dauer von 8 Minuten angehoben werden konnte. Dieses gelang ihnen durch eine pulssynchrone elektrische Stimulation des Diaphragmas während der Systole. Die Kardiomyoplastik, später auch unter Verwendung des M. latissimus dorsi (LDM) durch Termet 1966, konnte die Erwartungen für eine systolische Herzunterstützung jedoch nicht erfüllen. Grund hierfür war zum einen die ungünstige Geometrie der vergrößerten kranken Herzen, zum anderen das relativ kurze Zeitintervall der Systole, in dem die Kontraktion des Diaphragmas oder des LDM erfolgen musste.

#### 1.2.3.2. Stammzelltherapie

Die Idee, Krankheiten mit Zellen zu heilen ist nicht neu. Bereits 1931 prägte der Schweizer Arzt Paul Niehans den Begriff der „Zellulärtherapie“. Er erhoffte sich, durch die Infusion bestimmter Zellen, Krankheiten behandeln zu können. Erste empirische Untersuchungen wurden zu Beginn der 50er Jahre durchgeführt. Sie beschäftigten sich unter anderem mit Knochenmarkszellen zur Therapie letaler Bestrahlungen [78]. Aus diesem Ansatz entwickelte sich später die Knochenmarktransplantation zu einem standardisierten Verfahren.

Die Therapie der Herzinsuffizienz durch Stammzellen scheint von dem Ziel der Entwicklung eines Standardverfahrens hingegen noch ein Stück entfernt [190]. Die meisten Arbeiten zur Therapie der Herzinsuffizienz mit Stammzellen beschäftigen sich mit adulten Stammzellen des Knochenmarks, da deren Nutzung mit geringeren juristischen Auflagen verbunden ist als die Nutzung embryonaler Stammzellen [41]. In der aktuellen Literatur werden zur Zeit zwei grundsätzliche Therapieformen diskutiert: zum einen die

Stammzellmobilisierung, die das Ziel hat, Stammzellen aus dem Knochenmark auszuschwemmen und zum anderen die lokale Applikation autologer oder allogener Stammzellen [190].

Bei der Stammzellmobilisierung wird hauptsächlich durch die Gabe von *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) die Ausschwemmung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie gefördert [99]. Diese werden durch verschiedene Zytokine, die von geschädigtem Gewebe sezerniert werden, zu ihrem Wirkort geleitet [99]. Einige Studien konnten durch diese Therapie bezüglich der LVEF nach Myokardinfarkt [74, 98] oder bezüglich des Koronarflusses bei KHK [177] signifikante Verbesserungen gegenüber der Placebogruppe nachweisen.

Für die Methode der lokalen Applikation von Stammzellen am erkrankten Myokard, werden zunächst Stammzellen aus dem Knochenmark entnommen oder zirkulierende Progenitorzellen aus dem Blut extrahiert. Nach einer Aufarbeitung werden diese intramyokardial oder intrakoronar appliziert, wobei die letztgenannte intravasale Infusion von Stammzellen in den meisten Studien bevorzugt wird [190]. Zu dieser Art der myokardialen Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt, bei chronischer Myokardischämie oder bei chronisch ventrikulärer Dysfunktion sind bereits mehrere große Studien veröffentlicht worden [10, 11, 15, 46, 47, 51, 53, 79, 81, 109, 145, 172, 173, 180, 183, 194, 201]. Die Ergebnisse dieser Studien lassen positive Resultate in Bezug auf die LVEF, das kardiale Remodeling und die Einjahresmortalität erkennen. Weitere Erkenntnisse vor allem in Hinblick auf das Langzeit-Outcome sind unabdingbar, da es starke Anhalte für eine fehlende Nachhaltigkeit der Stammzelltherapie gibt [124]. Um die Stammzelltherapie in Zukunft etablieren zu können, sind zudem Studien notwendig, die neben den harten klinischen Parametern (wie z. B. der LVEF) auch eine klinisch relevante Verbesserung für den Patienten in den Mittelpunkt stellen [165].

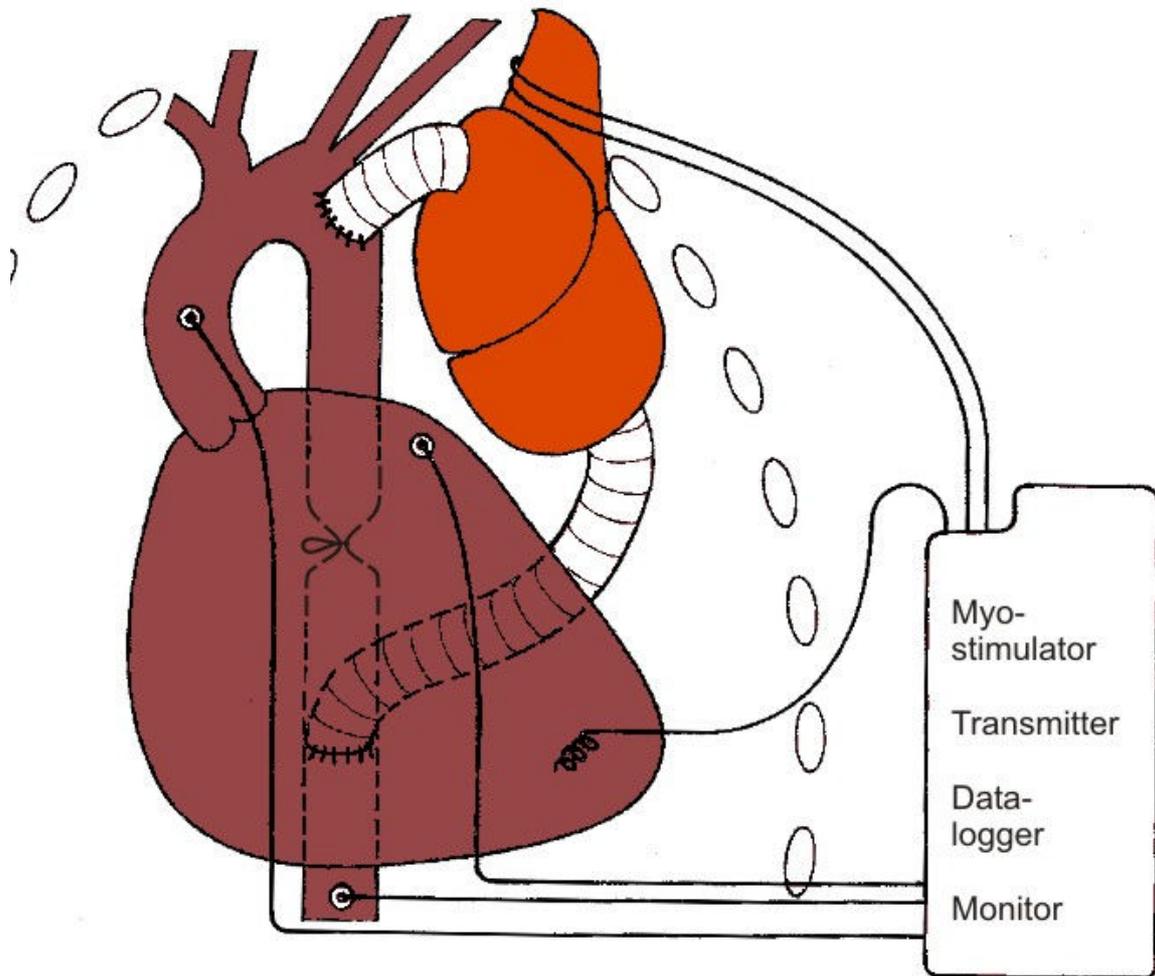
#### 1.2.3.3. Skelettmuskelventrikel

Salmons wies darauf hin, dass Skelettmuskel am effektivsten beim terminalen Herzversagen eingesetzt werden kann, wenn er als Skelettmuskelventrikel Blut pumpt [168]. D.h. ein in den Blutkreislauf integrierter künstlicher Ventrikel wird mit Skelettmuskulatur umwickelt und durch Stimulation der Muskulatur zur Kontraktion gebracht.

Damit Skelettmuskulatur langfristig über Monate oder Jahre durch wiederholte Kontraktionen den Kreislauf antreiben kann, muss sie ermüdungsfrei arbeiten. Zu jeder Kontraktion ist eine tetanische Reizung (Burststimulation) erforderlich. Langzeituntersuchungen vor allem auch an Großtieren wurden durch implantierbare Myostimulatoren mit tetanischer Stimulation möglich [40]. Die Umwandlung von ermüdbarer in unermüdbare Muskulatur nicht nur unter niederfrequenter Dauerstimulation (2-10 Hz) sondern auch unter Abgabe von herzsynchronen Bursts war zum einen die Grundlage für die Kardiomyoplastik [30] und zum anderen für effektiv pumpende Skelettmuskelventrikel [2-5].

Die Arbeitsgruppe um Larry Stephenson baut seit 1981 Skelettmuskelventrikel aus dem LDM. Der Muskel wird zunächst für 6-8 Wochen elektrisch konditioniert, d.h. um eine feste Kunststoffform gewickelt und zur isometrischen Kontraktion gebracht [113]. So soll sich eine vollständige Umwandlung der Myosin-Heavy-Chain-Isoformen (MHC) in einen unermüdbaren, reinen Typ-I-Faser Muskel ergeben [118]. Erst nach diesem Training wird der Muskel zur Formung eines in den Kreislauf integrierten Ventrikels verwendet. Diese Integration erfolgte als Linksherzunterstützung atrio-aortal, apiko-aortal und aorto-aortal sowie als Rechtsherzunterstützung cavo-pulmonal und ventriculo-pulmonal. Eine messbare Kreislaufunterstützung konnte über 27 Monate beobachtet werden. Die von Stephenson angewandte elektrische Konditionierung induzierte zwar in der Tat einen unermüdbaren Typ-I-Faser Muskel, es wurde jedoch schnell deutlich, dass diese vollständige Transformation um den Preis einer Kraftreduktion auf 10-15% sowie einer Abnahme der Muskelmasse von bis zu 50% geschah [168].

Guldner modifizierte diese elektrische Konditionierung. Er zeigte an Kälbern, dass eine auxotonische Kontraktion an einem dynamischen Trainingsgerät, dem so genannten *Frosch*, eine wesentlich größere Kraftsteigerung bei verminderter Ermüdbarkeit bewirkt [61]. Ein so trainierter LDM wäre optimal auf seine Anforderungen als Skelettmuskelventrikel angepasst. Ferner wurde auch die Geometrie der Skelettmuskelventrikel weiterentwickelt. So kam man vom „Sackventrikel“, wie von Stephenson verwendet, ab und es entstand ein von innen mit Polyurethan beschichteter „Durchgangs-“ oder „Tube-Ventrikel“. Dieser zeichnet sich durch eine verbesserte Hämodynamik aus und verfügt weiterhin über ein geringeres Risiko zur Thrombusbildung [63]. Die Arbeitsgruppe um Guldner bevorzugt die aorto-aortale Position für den Skelettmuskelventrikel. Die Implantation kann somit ohne den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt werden. Schematische Darstellung des Biomechanischen Herzens (BMH) nach Guldner siehe *Abbildung 1.1*.



**Abbildung 1.1**

Schematische Darstellung des BMH nach Guldner. Der Skelettmuskelventrikel befindet sich in aorto-aortaler Position. Zwischen der proximalen und der distalen Anastomose ist die Aorta ascendens ligiert. Der LDM wird von einem Myostimulator EKG-getriggert in der Diastole des Herzens zur Kontraktion gebracht. Die EKG-Ableitung erfolgt über eine Elektrode am Herzen.

### 1.3. Physiologie des elektrisch stimulierten Skelettmuskels

Jewell erwähnte 1954 eine Einteilung in weiße, schnell zuckende und rote, langsam zuckende Muskeln [80]. Wenige Jahre später konnte Buller nachweisen, dass sich diese Muskeltypen bei erwachsenen Versuchstieren ineinander umwandeln ließen, indem er die Nerven „schneller“ Muskeln mit Nerven „langsamer“ Muskeln vertauschte [27]. Diese bahnbrechende Erkenntnis war der erste erfolgreiche Versuch einer Muskelfaserttransformation, auch wenn Buller noch chemische Faktoren postulierte, die über die Nerven auf die Muskeln übergeleitet und für deren Transformation verantwortlich sein sollten. Erst Salmons konnte zeigen, dass tatsächlich die unterschiedliche elektrische Impulsaktivität der Motoneurone diese Transformation bewirkt, da eine entsprechende elektrische Stimulationen der Muskeln identische Ergebnisse lieferte [169, 170]. Später konnte man die Kontraktionsgeschwindigkeit der Muskeln unter anderem auf die unterschiedlichen Isoformen des MHC zurückführen [160, 161]. Bis heute sind beim Säugetier neun Isoformen der MHC bekannt [13]. Für die Skelettmuskulatur von Relevanz sind hierbei die „schnellen“ Isoformen IIa, IIx (Synonym IIc) und IIb, sowie die „langsame“ Isoform I [176]. Muskelfasern des Typ I (MHC I) weisen einen oxidativen Stoffwechsel auf, wohingegen Typ-II-Fasern (MHC II) einen überwiegend anaeroben Stoffwechsel zeigen (Ausnahme Typ IIa) [56]. Muskeln mit vorwiegendem Anteil an MHC I werden in der Natur für Haltearbeiten eingesetzt, die eine geringe Muskelermüdung erfordern, jedoch keine hohe Kraft (Langlauftyp). Muskeln mit einem hohen Anteil an Typ-II-Fasern finden sich häufig dort, wo es auf schnelle, kräftige Bewegungen ankommt, jedoch eine rasche Muskelermüdung in Kauf genommen wird (Sprintertyp).

Durch die grundsätzliche Erkenntnis, dass sich die Expression der unterschiedlichen Myosin-Isoformen und damit wichtige Eigenschaften des Skelettmuskels durch elektrische Stimulation beeinflussen lassen, war ein wichtiger Schritt für die Entwicklung suffizienter Skelettmuskelventrikel getan [95, 150, 167]. Es zeigte sich, dass Skelettmuskeln, die kontinuierlich höherfrequent stimuliert wurden, sich vollständig in einen reinen Typ-I-Muskel umwandeln. Zwar erhielt man so einen ermüdungsresistenten Muskel, doch leider führte diese Transformation gleichfalls zu einer Abnahme der Muskelmasse, der Kontraktionskraft sowie der Kontraktionsgeschwindigkeit [166, 168]. Eine Lösung aus dieser Zwickmühle entwickelte Lopez-Guajardo [106], indem sie das Prinzip der kontinuierlichen Stimulation verließ und die Auswirkungen intermittierender Stimulationsmuster untersuchte. Es gelang ihr, Skelettmuskel von Kaninchen in der Art zu trainieren, dass es nicht zu einer vollständigen Transformation in Typ-I-Fasern kam. Folge war ein Muskel, der hinsichtlich der Eigenschaft Ermüdbarkeit der Kontrollgruppe signifikant überlegen war, zugleich jedoch keine signifikanten Nachteile hinsichtlich Muskelmasse, Muskelkraft oder Kontraktionsgeschwindigkeit aufwies.

#### 1.4. Wirkung von Clenbuterol und Thyroxin auf den Skelettmuskel

Clenbuterol ist aus dem Bereich der Viehmast, der Bodybuilder- sowie der Dopingszene als ein muskelaufbauendes und muskelkraftstärkendes  $\beta_2$ -Sympathomimetikum bereits langjährig bekannt. Diese anabole Wirkung auf die Skelettmuskulatur geht hierbei auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese sowie eine gehemmte Proteinolyse zurück. Clenbuterol ist in der Lage, die Muskelkraft und Energieabgabe von Skelettmuskelventrikeln erheblich zu vergrößern [62]. Zudem belegen mikroskopische Untersuchungen eine 30%ige Muskelfaserhypertrophie [146]. Eine Rückverwandlung von Typ-I in Typ-II-Muskelfasern unter Clenbuterol wie sie Maltin [117] beschreibt, konnte bei elektrischer Stimulation am *Frosch* unter der gewählten Dosis bisher nicht beobachtet werden [93].

Das in der Schilddrüse gebildete Thyroxin ( $T_4$ ) wird in der Peripherie deiodiert [94]. Dabei entsteht das biologisch inaktive, reverse Triiodthyronin ( $rT_3$ ) und das biologisch aktive Triiodthyronin ( $T_3$ ) [94]. Die Schilddrüsenhormone sind in der Lage, den Grundumsatz des Organismus um bis zu 100% zu steigern [195]. Mögliche kraftsteigernde Wirkungen auf den Skelettmuskel können dabei auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Unter Thyroxin wird eine Zunahme der Kapillardichte, der Mitochondrien und der oxidativen Enzyme [179] sowie ein Anstieg der verfügbaren Energie innerhalb der Muskelzelle beobachtet [96]. Dieses ist möglicherweise mit einer Steigerung der oxidativen Kapazität des Skelettmuskels verbunden.

Auch im Calciumstoffwechsel der Skelettmuskelzelle spielt Thyroxin eine besondere Bedeutung. Bei dauerhafter elektrischer Stimulation von Skelettmuskulatur wurde eine drastische Reduktion der Calciumspeicherkapazität beobachtet [149]. Thyroxin ist in der Lage, sowohl die Calciumspeicherkapazität der Muskelfaser als auch die Calciumaufnahme-geschwindigkeit zu erhöhen [48]. Da Calcium eine zentrale Funktion im Kontraktionsablauf eines Muskels besitzt, könnte demnach eine Erhöhung des Calcium-Stoffwechsels durch Thyroxin die muskuläre Kontraktionskraft steigern.

Thyroxin wirkt außerdem der Downregulation von  $\beta$ -Adrenorezeptoren, die unter Clenbuterol-Dauergabe beobachtet wird [91], entgegen [120]. Somit könnte der leistungssteigernde Clenbuterol-Effekt auf die Muskulatur zusätzlich unterstützt werden.

### 1.5. Das Protein S100A1 und seine Bedeutung

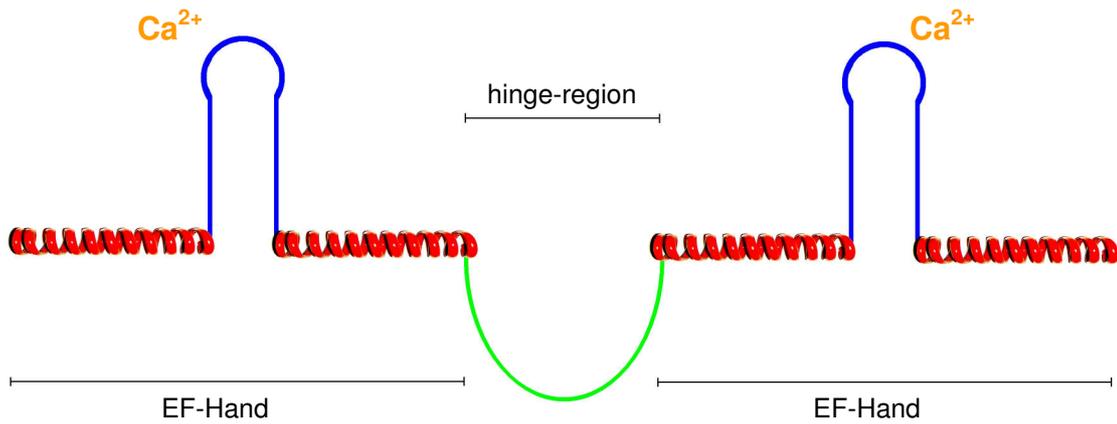
Calcium spielt – als *second messenger* der Muskelzelle – eine wesentliche Rolle innerhalb der komplexen Abläufe einer Muskelkontraktion. Damit die Muskelzelle überhaupt auf Calcium reagieren kann, sind Sensoren notwendig, die in Abhängigkeit der intrazellulären Calciumkonzentration weitere Prozesse in Gang setzen können. Diese Aufgabe übernehmen calciumbindende Proteine. Den meisten dieser Proteine ist eine bestimmte Sekundärstruktur gemein, die so genannte EF-Hand [42]. Sie besteht aus einem  $\alpha$ -Helix–Loop– $\alpha$ -Helix–Motiv. Moews und Kretsinger waren die ersten, die 1975 diese Struktur röntgenkristallographisch im Parvalbumin des Karpfenmuskels nachwiesen [125]. Die S100-Proteine stellen die größte Subgruppe aller calciumbindenden Proteine mit EF-Hand-Motiv dar [171]. Jedes S100-Protein besteht aus zwei EF-Hand-Motiven, die über eine Scharnierregion (*hinge-region*) miteinander verbunden sind [76, 77]. Die schematische Struktur der S100-Proteine zeigt *Abbildung 1.2*.

Die meisten S100-Proteine lagern sich zu Homo- oder Heterodimeren zusammen [43, 156]. Durch Calciumbindung an ein S100-Protein vollzieht dieses eine Konformationsänderung bei der die Helices voneinander wegklappen [116, 140]. Das Protein exponiert daraufhin eine hydrophobe Oberfläche, die eine Interaktion mit Zielproteinen ermöglicht (*Abbildung 1.3*) [116, 140].

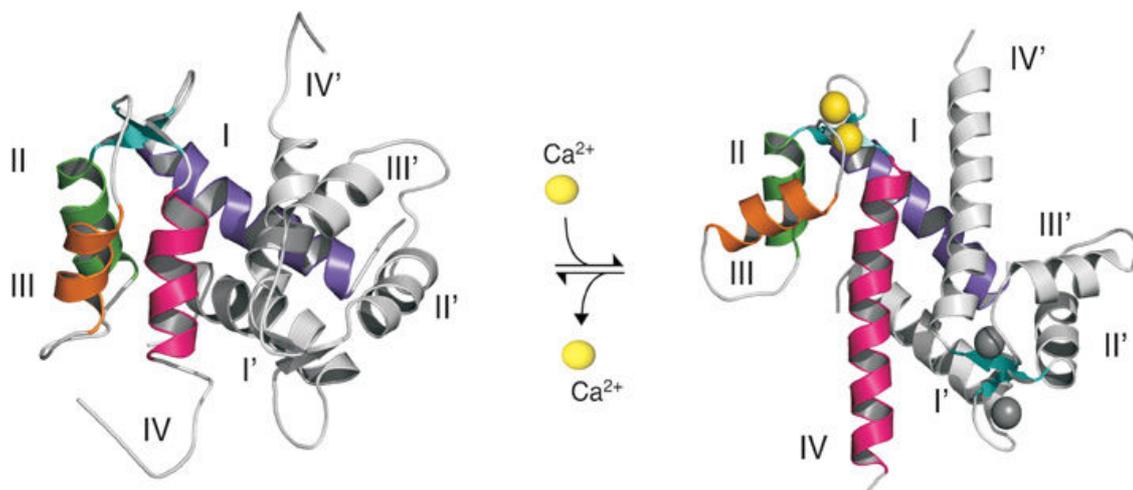
Von den S100-Proteinen sind 25 Isoformen bekannt. Der Großteil von ihnen liegt auf Chromosom 1, dazu zählen S100A1 - S100A18 [171], benannt nach der Reihenfolge auf dem codierenden DNA-Strang [174].

Die calciumabhängigen, intrazellulären Funktionen der S100-Proteine lassen sich in vier Aufgaben unterteilen [42]: (i) die Steuerung von Phosphorylierungen durch Proteinkinasen, (ii) die Modulation von Enzymaktivitäten, (iii) die Realisierung einer Calciumhomöostase sowie (iv) die Aufrechterhaltung von Zellstruktur und -motilität.

Das Protein S100A1 erreicht in der Skelettmuskulatur und im Myokard die höchsten Konzentrationen [87]. Es liegt frei im Cytoplasma vor, wobei eine starke Assoziation zum kontraktilen Apparat und zum sarkoplasmatischen Retikulum sowohl im Skelettmuskel [112] als auch im Myokard [65] nachgewiesen werden konnte. Die Entdeckung dieser Tatsache ließ bereits eine Funktion von S100A1 im Bereich der elektromechanischen Kopplung von Muskelzellen wahrscheinlich erscheinen.

**Abbildung 1.2**

Schematische Darstellung der Sekundärstruktur eines S100-Proteins (Monomer). S100-Proteine bestehen aus zwei EF-Hand Motiven, die durch die so genannte „hinge-region“ (grün) miteinander verbunden sind. Das EF-Hand-Motiv besteht wiederum aus zwei  $\alpha$ -Helices (rot) und einem Loop (blau). An der Loopregion kann jeweils ein Calciumion binden.

**Abbildung 1.3** aus: [171]

Darstellung der calciuminduzierten Konformationsänderung eines S100-Homodimers. Links ein calciumfreies Homodimer („apo“-Form), rechts die calciumgebundene Form. Durch die calciuminduzierte Konformationsänderung wird die Beeinflussung von Zielproteinen ermöglicht. Mit römischen Ziffern sind jeweils die vier  $\alpha$ -Helices eines Monomers bezeichnet. Jedes Monomer kann zwei Calciumionen binden.

### 1.5.1. Im Skelettmuskel

Es konnte gezeigt werden, dass S100A1 in Anwesenheit von freiem Calcium die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ryanodinrezeptoren des Skelettmuskels (RyR1) um das 6-fache erhöhen kann [193]. Folge ist eine verstärkte RyR1-vermittelte sarkoplasmatische Calciumfreisetzung während der Kontraktion [49, 132, 193]. Erst Most wies 2003 nach, dass diese verstärkte Calciumfreisetzung tatsächlich einen direkten Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften des Skelettmuskels hat [132]. Es zeigte sich eine S100A1-dosisabhängige Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft [132]. Interessant war, dass sich dieser Effekt am Mäusemodell beim „langsamen“ Muskel (M. soleus, vorwiegend Typ-I-Muskelfasern) ebenso wie beim „schnellen“ Muskel (M. extensor digitorum longus, vorwiegend Typ-II-Muskelfasern) gleichermaßen darstellte [132]. Bei den kontraktilitätssteigernden Eigenschaften des S100A1 scheint also die Muskelfaserzusammensetzung keine wesentliche Rolle zu spielen. Most erklärte dieses durch die Expression der gleichen Isoform des Ryanodinrezeptors (RyR1) in „schnellen“ und in „langsamen“ Muskeln [132].

### 1.5.2. Im Myokard

Ähnlich wie am Skelettmuskel hat S100A1 die Fähigkeit, auch den kardialen Ryanodinrezeptor (RyR2) in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration zu beeinflussen. S100A1 hat damit im Myokard – analog zum Skelettmuskel – die Eigenschaft, den RyR2-vermittelten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu verstärken [89]. Zudem konnte eine Assoziation von S100A1 zum SERCA-2a-Phospholamban-Komplex der Herzmuskelzelle gezeigt werden [90]. Die inhibitorische Wirkung von Phospholamban (PLB) auf die SERCA-2a könnte dabei durch S100A1 abgeschwächt werden [130]. In der Diastole resultiert so eine effektivere Calciumresequstration mit der Folge einer positiven lusitropen Wirkung sowie einer optimalen Bereitstellung von Calcium im sarkoplasmatischen Retikulum für die folgende Systole [127].

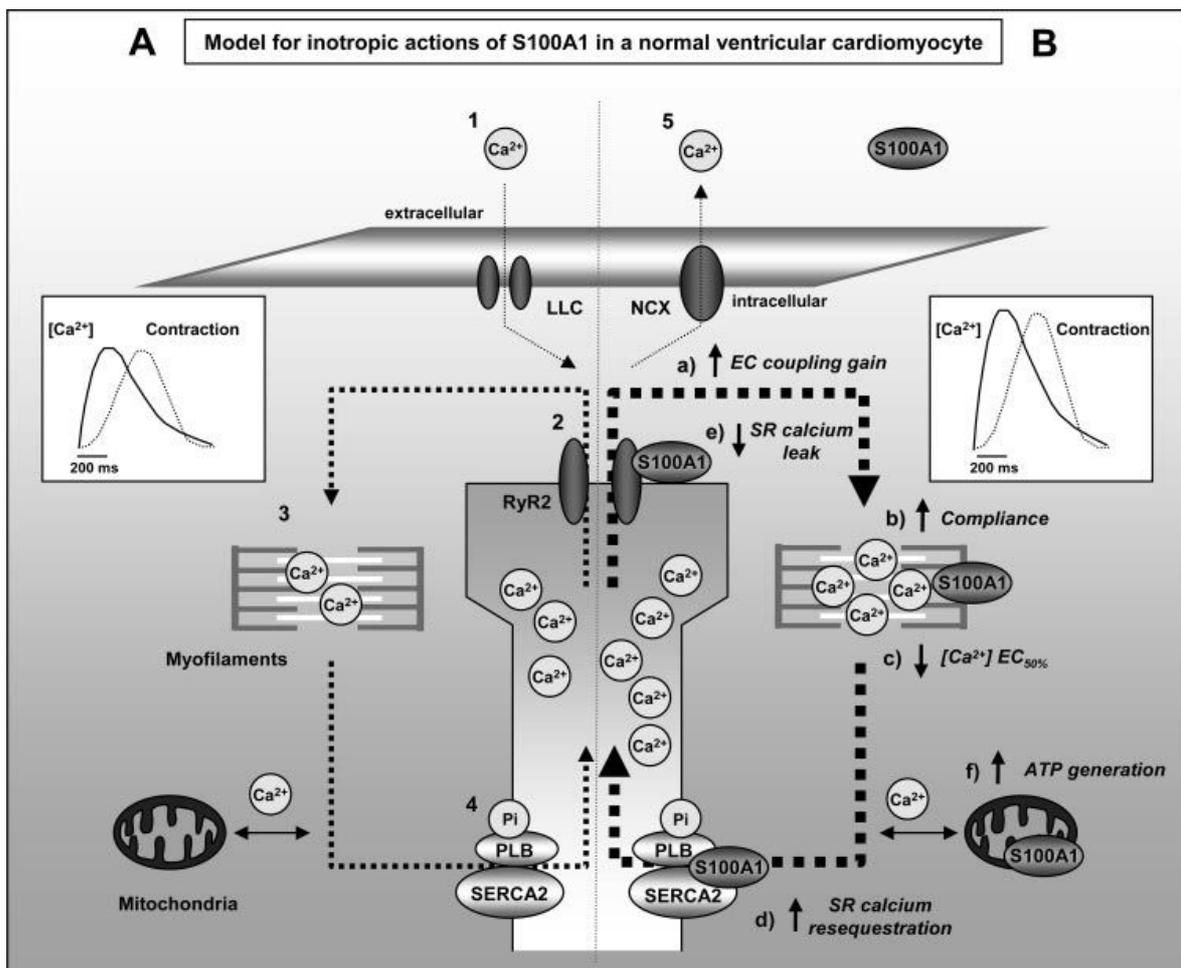
Interaktionen von S100A1 mit kardialen Myofilamenten wies unter anderen Yamasaki nach. Er zeigte, dass durch S100A1 die Compliance der Myofilamente gesteigert werden kann [203]. Außerdem wird die Calciumsensitivität der Myofilamente reduziert, was zu einer schnelleren diastolischen Dissoziation des Calciums von den Myofilamenten führt [127].

S100A1 konnte weiterhin in kardialen Mitochondrien nachgewiesen werden [20, 65], wo es pH- und calciumabhängig die ATP-Synthese steigert [20].

Neben der Aufdeckung der molekularen Mechanismen konnte gezeigt werden, dass die S100A1-vermittelten Wirkungen tatsächlich therapeutisch genutzt werden können. Pleger wies am Rattenmodell nach, dass nach künstlich erzeugten Myokardinfarkten eine durch

Gentherapie gesteigerte S100A1-Expression zu einer Verbesserung der LV-Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe führt [155]. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde deutlich, dass transgene Mäuse, die eine kardiale Überexpression von S100A1 aufwiesen, nach Induktion eines Myokardinfarktes vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz partiell geschützt waren [133].

Die beschriebenen S100A1-vermittelten Wirkungen innerhalb des Myokards gibt *Abbildung 1.4* wieder.



**Abbildung 1.4** aus: [130]

Bedeutung von S100A1 in der Herzmuskelzelle. Linke Bildhälfte (A) Kontraktionszyklus ohne S100A1-Interaktion, rechte Bildhälfte (B) Darstellung der unterschiedlichen Effekte von S100A1 innerhalb der Herzmuskelzelle. S100A1 führt über eine Bindung an den kardialen Ryanodinrezeptor (RyR2) zu einer verstärkten systolischen  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum a). Die Interaktion von S100A1 mit Myofilamenten reduziert deren Rigidität b), was zu einer gesteigerten Compliance des Ventrikels führt. Die Calciumsensitivität der Myofilamente wird durch S100A1 herabgesetzt c). Dieses erlaubt eine schnellere diastolische Dissoziation des Calciums mit der Folge einer positiven Lusitropie. S100A1 hebt die inhibitorische Wirkung von Phospholamban (PLB) auf die Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase

(SERCA) auf d), daraus resultiert eine verbesserte Calciumresequestration. Des Weiteren minimiert S100A1 die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 in der Diastole und verringert so das sarkoplasmatische „Calciumleck“ e). In den Mitochondrien der Herzmuskelzelle wird durch S100A1 die Produktion von ATP gesteigert f).

### 1.5.3. Bei Tumoren und Entzündungen

In den letzten Jahren sind die S100-Proteine auch in anderen Bereichen zunehmend in klinisches Interesse gerückt. Veränderte Expressionen dieser Proteinfamilie werden bei neoplastischen Erkrankungen wie dem Mammakarzinom [103] oder dem malignen Melanom [114] beobachtet. Des Weiteren sind Assoziationen zu der Psoriasis [24, 55], der zystischen Fibrose [107, 111], chronisch inflammatorischen Prozessen [88, 143], dem M. Alzheimer [178] und der Trisomie 21 [8] bekannt.

## 1.6. Fragestellung

Um muskuläre Blutpumpen (Biomechanische Herzen [BMH]) in Zukunft klinisch anwenden zu können, ist ihre Zuverlässigkeit hinsichtlich Ausdauer und Pumpleistung unabdingbar. Bei der Entwicklung solcher verlässlich arbeitender Herzunterstützungssysteme könnte – biochemisch gesehen – das Protein S100A1 eine Schlüsselrolle einnehmen, da es regulative Funktionen im Bereich der elektro-mechanischen Kopplung von Muskelzellen erfüllt [6, 130, 158]. So ist S100A1 in der Lage, die Inotropie des Herzens zu steigern [163] sowie infarziertes Myokard vor der Ausbildung einer Herzinsuffizienz partiell zu schützen [133]. In der Skelettmuskulatur konnte eine S100A1-abhängige Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft nachgewiesen werden [132]. Aufgrund dieser muskulären Kraftsteigerung von S100A1 ist es von Interesse, das Expressionsverhalten von S100A1 in elektrisch stimulierten Skelettmuskelventrikeln zu messen. Bei unseren Untersuchungen soll im chronischen Tiermodell an elektrisch stimulierten Skelettmuskelventrikeln der Zusammenhang zwischen elektrisch induzierter Fasertransformation und der Expression von S100A1 sowie die Korrelation zwischen der Expression von S100A1 und der Schlagvolumenentwicklung evaluiert werden. Diese grundlegenden Versuche sollen zum Verständnis und zur Weiterentwicklung elektrisch stimulierter Herzunterstützungssysteme beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Die Wahl des Tiermodells fiel auf männliche Burenziegen. Sie stellen sich als vorteilhaft dar, da sie als Fleischziegen über einen kräftigen LDM verfügen und einen breiten Thorax besitzen, der die Implantation eines Skelettmuskelventrikel ermöglicht. Um Rankämpfe und somit Verletzungen der Tiere untereinander zu vermeiden, wurde 4-6 Wochen vor der Operation eine Kastration der Tiere mit beidseitiger Orchidektomie durchgeführt.

Die Ziegen wurden in der Versuchstierhaltung der Universität zu Lübeck (Leitung: Dr. med. vet. R. Noel) tierärztlich betreut. Sie standen unter ständiger Aufsicht des Tierschutzbeauftragten des Regierungspräsidiums Schleswig-Holstein mit Sitz in Kiel. Die Genehmigungen der Tierversuche liegen unter den Aktenzeichen V 742-722-41-122-6 (38-5/03) sowie V 362-722-41-122-6 (35-4/05) vor.

### 2.2. Muskelschrittmacher und Elektroden

Bei der elektrischen Stimulation des LDM kamen zwei unterschiedliche Schrittmacher zum Einsatz. Für das Stimulationsprotokoll *Stim50* (Kapitel 2.5.1.) verwendeten wir den Myostimulator *Itrel II 7424* (*Medtronic*, Minneapolis, USA), da dieser Programmierungen tageszeitbezogener Aktivitäten zulässt. Das Stimulationsprotokoll *Stim100* (Kapitel 2.5.2.) realisierten wir mit Hilfe des Myostimulators *7220* (*Teletronics*, Denver, USA).

Als Stimulationselektroden verwendeten wir für beide Protokolle die intramuskulären Elektroden *IML 02* (*Osypka*, Grenzach, Deutschland) und *SP 5591* (*Medtronic*, Minneapolis, USA). Die proximale Elektrode ließ eine muskuläre Kontaktfläche über eine Länge von 3cm und die distale Elektrode über eine Länge von 9cm zu. Diese differierenden Kontaktlängen erklärten sich aus der unterschiedlichen Muskelschlauchbreite des LDM.

### 2.3. Das elastische Trainingsgerät *Frosch*

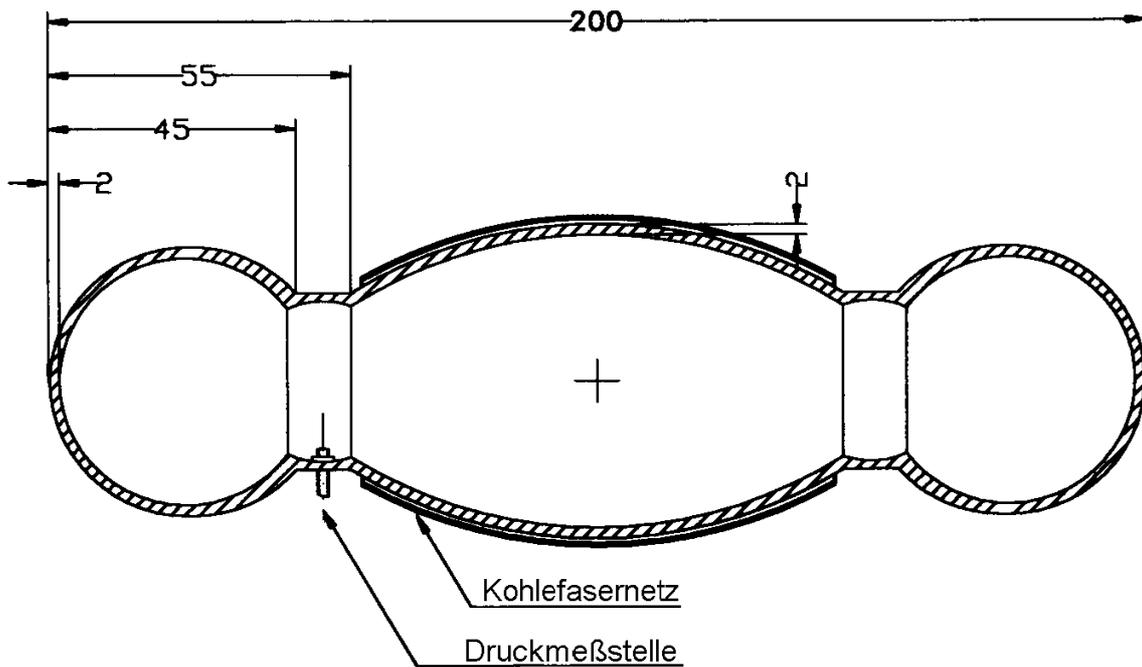
Damit ein intrathorakales dynamisches Training des LDM realisiert werden konnte, wurde ein Trainingsgerät benötigt, das mehrere Voraussetzungen erfüllen musste. Zum einen musste das Gerät biokompatibel sein, sich sterilisieren lassen und Volumen gegen einen definierten elastischen Widerstand verschieben können, um eine körperkreislaufähnliche Compliance zu imitieren. Diese liegt beim gesunden Menschen im großen arteriellen Gefäßsystem etwa bei 1,07 ml/mmHg [199]. Des Weiteren sollte das Trainingsgerät eine exakte sowie einfache Messung des Schlagvolumens (SV) ermöglichen.

Diese Anforderungen konnten mit einem aus Silikon gefertigten elastischen Trainingsgerät, dem so genannten *Frosch*, erfüllt werden (*Abbildung 2.1* und *2.2*). Der von uns verwendete Silikonkautschuk setzt sich dabei aus folgenden Komponenten zusammen:

- 70% Elastomer Dow Corning MDX 4-4210
- 20% Silicone Fluid Dow Corning 200 Fluid 100CS
- 10% Curing Agent Dow Corning MDX 4-4210

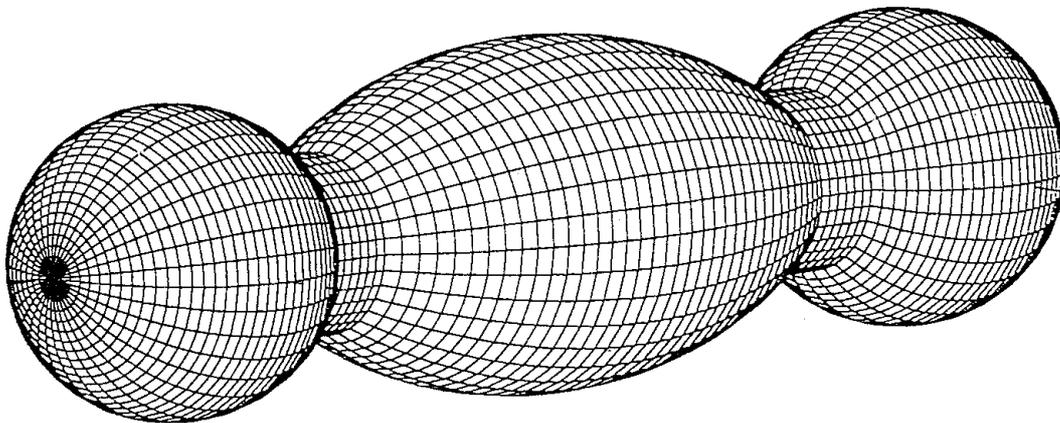
Der *Frosch* besteht aus drei zusammenhängenden Kammern. Die Zentralkammer mit 90 mm Länge und einem Maximaldurchmesser von 54 mm umfasst ein Volumen von ca. 150 ml. Die beiden 45 mm langen Seitenblasen umfassen jeweils 50 ml. Im Übergang einer der beiden Seitenblasen zur Zentralkammer mündet ein Katheter ins Lumen des *Frosches*, der den Druck zu einer subcutan implantierten Druckmesskammer (Port) weiterleitet. Die beschriebenen Dimensionen des *Frosches* ergaben sich durch die Abmessungen des LDM und dem zur Verfügung stehenden Platz im Thorax der Versuchstiere. Die Befüllung des *Frosches* erfolgte unter sterilen Bedingungen mit physiologischer Kochsalzlösung unter Antibiotikazusatz (Gentamicin) als Infektionsprophylaxe. Während des Kontraktionszyklus des Skelettmuskelventrikels war es nun möglich, Volumen aus der Zentralkammer in die Seitenblasen des *Frosches* zu verschieben und in der Relaxationsphase bedingt durch die Elastizität der *Frosch*-Blasen in die Zentralkammer zurückzuführen (*Abbildung 2.5*). Ein äußeres Kohlefasernetz verhinderte die Überdehnung der Zentralkammer.

Zur Validierung der Genauigkeit der Schlagvolumenbestimmung wurde das direkte und das indirekte Messverfahren auf einem eigens dafür entwickelten Teststand überprüft. Dieser erlaubte den simultanen Vergleich des berechneten mit dem gemessenen Schlagvolumen [92].



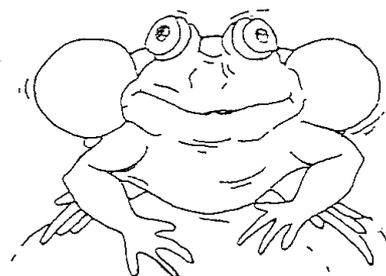
**Abbildung 2.1** aus: [60]

Technische Zeichnung des von Guldner et al. entwickelten dynamischen Trainingsgerätes, dem so genannten „Frosch“. Die Zentralkammer fasst ein Volumen von ca. 150 ml, die beiden Seitenkammern fassen jeweils ca. 50 ml.



**Abbildung 2.2** aus: [60]

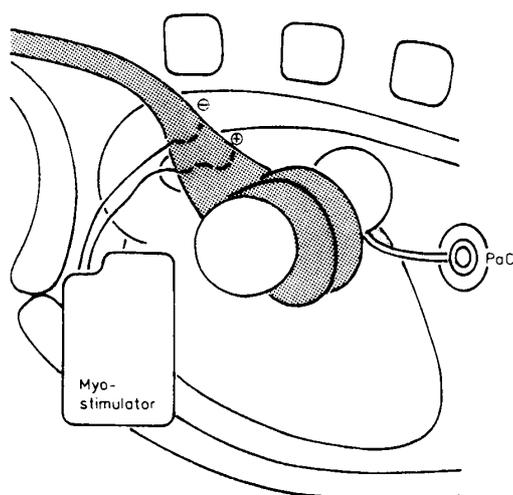
Dreidimensionale Darstellung des dynamischen Trainingsgerätes. In Anlehnung an die Schallblasen eines Frosches als „Frosch“ bezeichnet.



## 2.4. Operationsverfahren

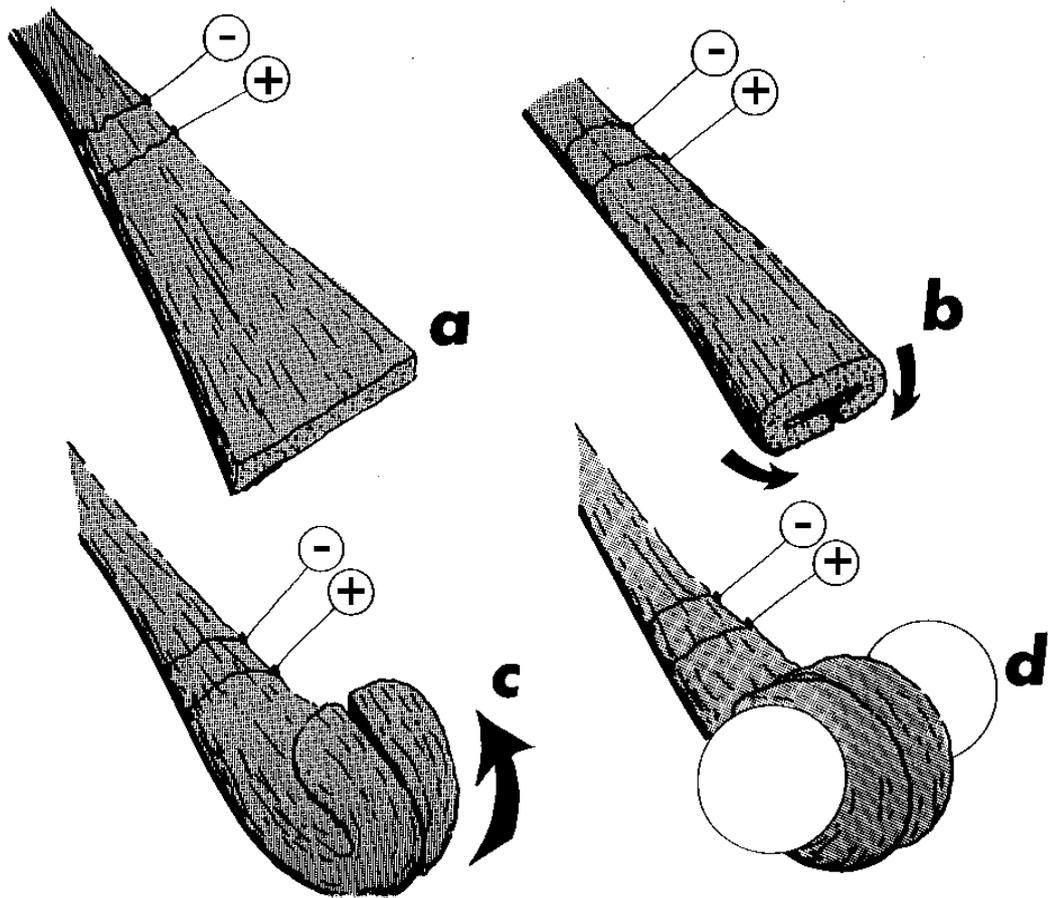
Die Narkoseeinleitung erfolgte unter einer intramuskulären Injektion eines Gemisches aus 25 mg Xylazinhydrochlorid (*Rompun*<sup>®</sup>, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 115 mg Ketamin (*Ursotamin*<sup>®</sup>, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). Ein zentral liegender, über die V. jugularis eingeführter Katheter erlaubte die Gabe von Infusionen und weiteren Pharmaka. Die Präparation des LDM erfolgte über einen dem Verlauf der fünften Rippe folgenden Hautschnitt. Anschließend wurde der Sehnenansatz am Humerus partiell durchtrennt und unter sorgfältiger Schonung des versorgenden Gefäß-Nervenbündels an der Thoraxwand durch Nähte fixiert. Darauf folgend wurden die beiden Muskelelektroden wellenförmig um die Endäste des N. thoracodorsalis platziert. Der Abstand beider Elektroden betrug ca. 6 cm.

Das mobilisierte Ende des LDM wurde um den *Frosch* gewickelt. Um einen doppellagigen Muskelschlauch zu erhalten, erfolgte das Einschlagen der Muskelränder nach innen (*Abbildung 2.4*). Somit lagen Blutgefäße und Nerven zwischen beiden Muskelschichten. Um ein seitliches Abrutschen des Muskels vom Trainingsgerät zu verhindern, wurde dieser mittels Nähten an zwei Ringen aus Teflonfilz fixiert, die im Halsbereich der *Frosch*-Blasen gelegen waren. Nach der partiellen Resektion der zweiten und dritten linken Rippe wurde der um das Trainingsgerät genähte Skelettmuskelventrikel in der Thoraxhöhle versenkt. Der als Druckmesskammer fungierende Portkatheter wurde subcutan fixiert. Die Muskelelektroden wurden mit dem Myostimulator verbunden und zusammen mit diesem subcutan platziert. Eine Übersicht über das implantierte Trainingsgerät gibt *Abbildung 2.3*.



**Abbildung 2.3** aus: [60]

Schematische Übersicht über das implantierte Trainingsgerät. Der LDM ist um den „Frosch“ gewickelt. Unter elektrischer Stimulation durch den Myostimulator wird der LDM zur Kontraktion gebracht. Dieses führt zu einem Druckanstieg im „Frosch“-Lumen, der über einen subcutan implantierten Portkatheter (PaC) gemessen werden kann.



**Abbildung 2.4** aus: [60]

Operatives Vorgehen bei der Implantation des „Frosches“. Der freipräparierte LDM (a) wird zu einem Muskelschlauch gefaltet und vernäht (b). Anschließend wird der Muskelschlauch um die Zentralkammer des Trainingsgerätes gewickelt (c). Die Fixation des Muskelschlauches am Trainingsgerät erfolgt über eine Vernähung des Muskelschlauches mit zwei Teflonfilzringen (hier nicht sichtbar), die zwischen Zentralkammer und Seitenblasen des „Frosches“ angebracht sind (d).

## 2.5. Elektrostimulation und Fasertransformation

Im Unterschied zum Herzschrittmacher zeichnet sich der Muskelschrittmacher durch ein tetanisches Erregungsmuster, die so genannte Burststimulation, aus. Diese ist notwendig, um den Skelettmuskel gleichmäßig zur Kontraktion zu bringen. Dabei ist durch die Pulse pro Burst die Dauer einer Muskelkontraktion beeinflussbar. Durch die Anzahl der Bursts pro Minute (bpm) lässt sich die Anzahl der Muskelkontraktionen pro Minute festlegen. Für die elektrische Stimulation des LDM kamen zwei verschiedene Protokolle zum Einsatz.

### 2.5.1. Stimulationsprotokoll zur partiellen Transformation in Typ-I-Fasern (Protokoll *Stim50*)

In Anlehnung an die Erkenntnisse von Lopez-Guajardo, die eine Stimulationsobergrenze für eine optimale elektrische Stimulation am Skelettmuskel des Kaninchens nachweisen konnte [106], entwickelten wir ein Stimulationsmuster, dass für den LDM von Burenziegen ähnliche Ergebnisse zeigen konnte. Als Stimulationsobergrenze legten wir hierzu ein Tagesmittel von 0,7 Hz fest. Dieses entspräche bei einer kontinuierlichen Stimulation 42 Pulsen pro Minute oder – bei 6 Pulsen pro Burst – 7 Bursts pro Minute (bpm).

Zwei Wochen vor der Implantation des *Frosches* begannen wir mit einer elektrischen, niederfrequenten Dauerstimulation des N. thoracodorsalis bei 2 Hz und 7 V. Eine Woche vor der geplanten *Frosch*-Implantation wurde diese Stimulation auf eine Burststimulation mit 8 bpm bei 6 Pulsen pro Burst (Pulsfrequenz 33 Hz) umprogrammiert. Diese insgesamt zweiwöchige präoperative Stimulation induziert relative Ischämien, die ein Kapillarrwachstum im LDM fördern [14, 71]. Zudem kommt es zur Ausbildung von intramuskulären Anastomosen zwischen dem Stromgebiet der A. thoracodorsalis und den Interkostalarterien [14, 64]. Insgesamt entsteht somit eine optimierte Muskelperfusion, welche Voraussetzung für eine suffiziente Pumpleistung von Skelettmuskelventrikeln ist [2, 14, 61].

Die präoperative Stimulation wurde bis zur Operation beibehalten und intraoperativ auf eine Burststimulation zunächst mit 3 bpm bei 6 Pulsen pro Burst und einer Spannung von 2-5 V eingestellt. Die Pulse innerhalb eines Burst erfolgten mit einer Frequenz von 33 Hz. Eine Woche nach der Operation erfolgte die Stimulation mit 6 bpm und 5 V bei sonst gleichen Parametern. Bis zur 7. postoperativen Woche wurde die Stimulation langsam auf 30 bpm gesteigert (*Tabelle 2.1*). Um die Grenzstimulation von 0,7 Hz nicht zu überschreiten, erfolgte die Stimulation ab 7 bpm im Tag-Nacht-Rhythmus und war nur 12 Stunden pro Tag aktiv. Weiterhin wurde während der aktiven Phasen vom Muskelschrittmacher alle 15 Minuten eine zehnmütige Pause eingelegt. Diese

intermittierende Stimulation soll die *on-demand*-Aktivität zukünftiger, in den Kreislauf integrierter Skelettmuskelventrikel simulieren.

**Tabelle 2.1** Stimulationsprotokoll „Stim50“

post-OP Woche	Bursts pro Minute (bpm)	Pulse pro Burst [ n ]	Pulsbreite [ $\mu$ s ]	Amplitude [ V ]	Pulsfrequenz [ Hz ]
-2	-	-	-	7	2
-1	8	6	210	7	33
1	3	6	210	2-5	33
2	6	6	210	2-5	33
3	10	6	210	7-8	33
4	15	6	210	7-8	33
5	20	6	210	7-8	33
6	25	6	210	7-8	33
ab 7	30	6	210	7-8	33

### 2.5.2. Stimulationsprotokoll zur vollständigen Transformation in Typ-I-Fasern (Protokoll *Stim100*)

Die elektrische Stimulation begann erst mit der Implantation des *Frosches* und wurde in den postoperativen Tagen langsam von 3 auf 40bpm und von 6 auf 17 Pulse pro Burst erhöht. Eine präoperative Stimulation gab es in diesem Stimulationsprotokoll nicht. Die einzelnen Pulse hatten eine Dauer von 100-200 $\mu$ s und erfolgten mit einer Frequenz von 50Hz. Die Spannung betrug je nach Reizschwelle 2,5-10V. Die elektrische Stimulation erfolgte kontinuierlich ohne Pausen.

### 2.5.3. Definition des Transformationsgrades

Um die elektrisch induzierte Transformation der Muskelfasern am LDM besser beschreiben zu können, führten wir den Begriff des „Transformationsgrades“ (TG) ein. Der Transformationsgrad bildet sich aus der Differenz des Anteils an MHC-Typ-I zwischen der prospektiven und der trainierten Muskelprobe nach Gleichung (2.1).

$$(2.1) \quad TG = MHC_{train} [\%] - MHC_{pros} [\%]$$

MHC<sub>train</sub> [%] : Anteil der Isoform Typ-I an den gesamt-MHC **nach** dem Training

MHC<sub>pros</sub> [%] : Anteil der Isoform Typ-I an den gesamt-MHC **vor** dem Training

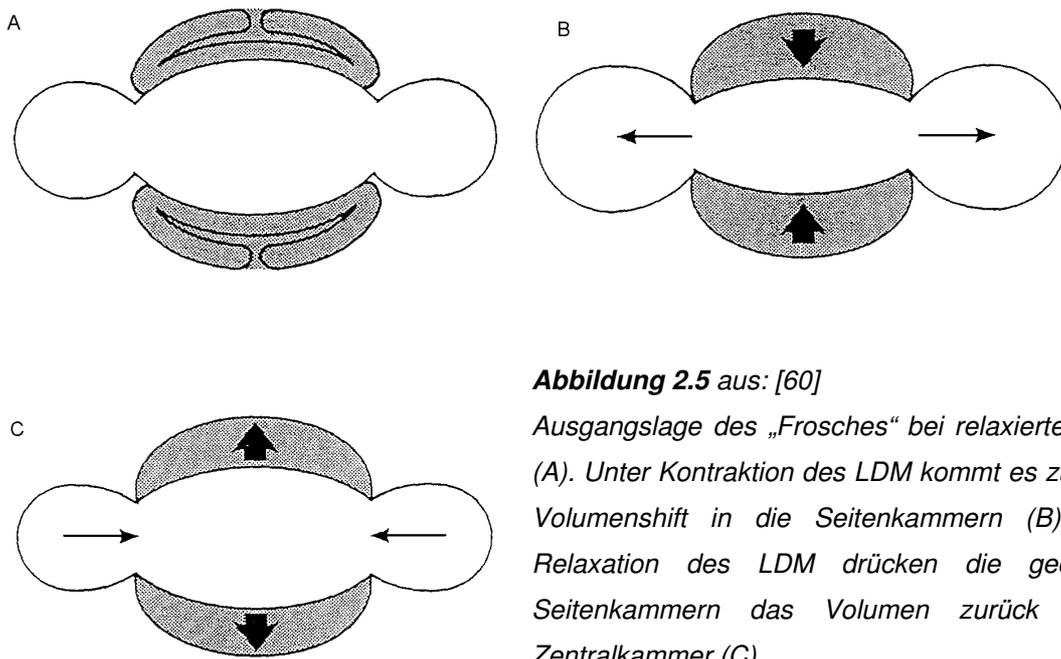
## 2.6. Schlagvolumenbestimmung der Skelettmuskelventrikel

Beim dynamischen Training von Skelettmuskelventrikeln wird während der elektrischen Konditionierung Volumen gegen einen elastischen Widerstand gepumpt. Dieses wird erreicht, indem der LDM um die Zentralkammer des *Frosches* gewickelt wird, die er bei Kontraktion komprimieren kann. Folge ist ein aus der Zentralkammer in die Seitenblasen gerichteter Volumenshift. Während der Relaxation des Muskels befördern die gespannten Seitenblasen das Volumen zurück in die Zentralkammer und bringen den Skelettmuskelventrikel so in seine Ausgangslage (*Abbildung 2.5*). Dieses Pendelvolumen soll unter optimalen Bedingungen dem Schlagvolumen eines in den Kreislauf integrierten Skelettmuskelventrikels entsprechen [92], daher ist in der vorliegenden Arbeit stets vom Schlagvolumen die Rede.

Bei bekannter Compliance des *Frosches* und bekannter Druckdifferenz während eines Kontraktionszyklus ließ sich das Schlagvolumen errechnen. Die Druckverhältnisse im Inneren des *Frosches* ließen sich durch Anstechen des Ports mit einer Portnadel und Anschließen eines Drucksensors darstellen. Über den Port konnte dem *Frosch* zudem Volumen zugeführt oder entnommen werden. Zunächst erfolgte die Compliancemessung des *Frosches*. Um einen Nullpunkt zu definieren, wurde der *Frosch*-Innendruck durch Volumenkorrektur gegen den umgebenden Atmosphärendruck auf Null eingestellt. Fraktioniert über den Port zugegebene Volumina führten zu entsprechenden Druckanstiegen, die sich als Ruhedehnungskurve darstellen ließen und dokumentiert wurden.

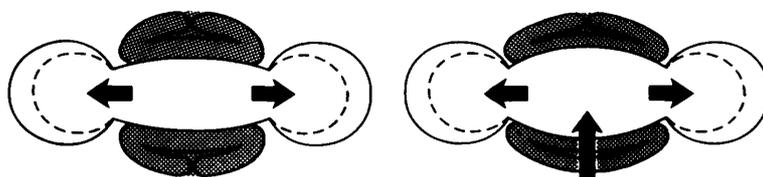
Nach Registrierung der Ruhedehnungskurve wurde der Innendruck des *Frosches* durch eine Volumenkorrektur auf 60 mmHg gegen den Atmosphärendruck eingestellt. Anschließend wurde der Myostimulator aktiviert und die Druckkurven der entstehenden Kontraktionen aufgezeichnet.

Die Berechnung der jeweiligen Schlagvolumina geschah mit einer eigens dafür entwickelten Software [92]. Das Computerprogramm ermöglichte die korrekte Ermittlung des Schlagvolumens aufgrund der Kontraktionsdrücke sowie der dazugehörigen Ruhedehnungskurven (*Abbildung 2.6*).

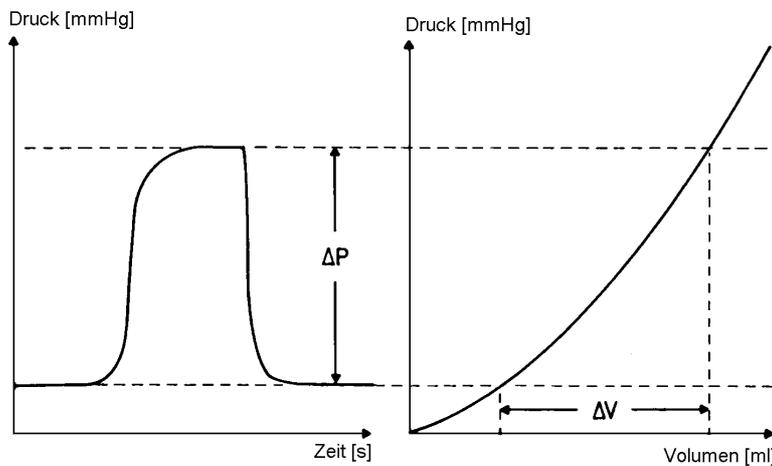


**Abbildung 2.5** aus: [60]

Ausgangslage des „Frosches“ bei relaxiertem LDM (A). Unter Kontraktion des LDM kommt es zu einem Volumenshift in die Seitenkammern (B). Nach Relaxation des LDM drücken die gedehnten Seitenkammern das Volumen zurück in die Zentralkammer (C).



Interne Volumenverschiebung  $\Delta V$  = Externe Volumenzugabe  $\Delta V$   
 Druckanstieg  $\Delta P$  = Druckanstieg  $\Delta P$



**Abbildung 2.6** aus: [60]

Durch die Kontraktion des LDM wird die Zentralkammer des „Frosches“ komprimiert. Folge ist ein Druckanstieg  $\Delta P$  im „Frosch“-Lumen. Durch externe Volumenzugabe lässt sich ebenfalls ein Druckanstieg erzeugen, die so genannte Ruhe-dehnungskurve. Sind beide Druckverläufe bekannt, lässt sich das Schlagvolumen  $\Delta V$  ermitteln.

## 2.7. Medikation während des dynamischen Trainings der Skelettmuskelventrikel

Alle Ziegen erhielten in den ersten beiden postoperativen Wochen täglich von montags bis freitags 150 µg Clenbuterol per os. Ab der dritten Woche senkten wir die Dosis auf dreimal wöchentlich 150 µg (montags, mittwochs, freitags).

Die Tiere der Gruppe III erhielten neben dem oben beschriebenen Clenbuterolschema zusätzlich von montags bis freitags täglich 25 µg Triiodthyronin per os. Ab der dritten postoperativen Woche senkten wir die Dosis auf dreimal wöchentlich 25 µg (montags, mittwochs, freitags).

## 2.8. Biochemische Analysen

### 2.8.1. Gewinnung und Lagerung der Muskelproben

Die Entnahme der Muskelproben aus dem LDM erfolgte vor dem Training (prospektiv) und nach Abschluss des Trainings (trainiert) am *Frosch*. Sie wurden aus den Muskelabschnitten des LDM entnommen, die für die Komprimierung des *Frosch*-Volumens relevant waren. Anschließend wurden sie in kleine Stücke von ca. 1 cm<sup>3</sup> Volumen geschnitten und in flüssigem Stickstoff kältefixiert. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung geschah in 15 ml Falconröhrchen bei -80 °C.

### 2.8.2. Bestimmung der schweren Myosinketten

#### Geräte und Reagenzien:

- Laborwaage *SBC 32, Scaltec*
- Mikro-Dismembrator S, *B.Braun Biotech International*
- Hoefer-Elektrophoresekammer *SE600, Pharmacia Biotech*
- Zentrifuge *Biofuge fresco, Heraeus Instruments*
- pH-Meter *766 Calimatic, Knick*
- Acrylamid
- Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- Adenosintriphosphat (ATP)
- Bis-Acrylamid *Liquacryl®*
- Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)
- Glycerin
- H<sub>2</sub>O tridest
- Isopropanol

- KCl
- Mercaptoethanol
- $MgCl_2$
- Na-Pyrophosphat
- Natrium–Laurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH-Wert mit HCl eingestellt (TRIS-HCl)

#### Verwendete Lösungen:

A1 Extraktionspuffer pH 8,5

- 100 mM Na-Pyrophosphat
- 5 mM EGTA
- 5 mM  $MgCl_2$
- 300 mM KCl
- 5,9 mM ATP

A2 Lysepuffer pH 6,8

- 10 Vol.-% Glycerin
  - 5 Vol.-% Mercaptoethanol
  - 2,3 Vol.-% SDS
- in 0,0625 M TRIS-HCl

#### Extraktion:

Die Myosinpräparation erfolgte nach Weeds et al. [108, 198]. Von den Muskelproben wurden jeweils ca. 100 mg abgewogen. Anschließend wurden sie eine Minute lang mit einer Frequenz von 3.000/min unter Stickstoffkühlung dismembriert. Es erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ l Extraktionspuffer (A1) pro mg Muskelgewebe. Die Proben tauten ungefähr 15 Minuten bei Raumtemperatur auf. Nun folgte eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C. Der Überstand wurde entnommen und im Verhältnis 1:1 mit 10%igem Glycerin verdünnt. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben mittels *Bio-Rad Protein-Assay* photometrisch bestimmt. Im kommenden Arbeitsschritt wurden die Proben mit dem Lysepuffer (A2) auf einen Gesamtproteingehalt von 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt. Die weitere Lagerung bis zum Auftragen auf das Elektrophoresegel erfolgte bei -20 °C.

Herstellung des Elektrophoresegels:

Das Elektrophoresegel bestand aus zwei übereinander geschichteten Kompartimenten, einem oberen vorgeschalteten Sammelgel und dem unteren eigentlichen Trenngel. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 ml 40 % Acrylamid
- 0,21 ml 2 % Bis-Acrylamid
- 2,5 ml 500 mM TRIS-HCl pH 6,7
- 0,1 ml 10 % SDS
- 6,08 ml H<sub>2</sub>O tridest
- 0,1 ml 10 % APS
- 0,01 ml TEMED

Der Trenngelansatz setzte sich wie folgt zusammen [69, 202]:

- 5,625 ml 40 % Acrylamid
- 1,125 ml 2 % Bis-Acrylamid
- 7,5 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8,6
- 0,3 ml 10 % SDS
- 12,85 ml 70 % Glycerin
- 2,47 ml H<sub>2</sub>O tridest
- 0,06 ml 10 % APS
- 0,03 ml TEMED

Im Nachfolgenden ist die Reihenfolge der Arbeitsschritte zur Gelherstellung aufgeführt:

1. Volumina für Trenn- und Sammelgel TEMED ansetzen
2. Montage der Glasplattenhalterung und Einsetzen der Spacer
3. Trenngelansatz mit TEMED versetzen und Gießen des Trenngels
4. anschließendes Überschichten mit Isopropanol (ca. 3 mm Höhe)
5. Erstarrungszeit (mind. 20 min) abwarten
6. Isopropanol durch abgießen entfernen
7. Plazieren des Kammes (Negativform für die Slots zum Einbringen der Proben)
8. Zusatz von TEMED zum Sammelgelansatz
9. Gießen des Sammelgels

10. Erstarrungszeit (mind. 20 min) abwarten
11. Entfernen des Kammes
12. Instillieren von 3 µl der zu bestimmenden Proben in die Slots

#### Gelelektrophoretische Auftrennung:

Die Trennung erfolgte in der Elektrophoresekammer bei Raumtemperatur und einer eingestellten Stromspannung von 150V für 16 Stunden. Billeter et al. sowie weitere Untersucher konnten durch Single-fiber-dissection mit anschließender Elektrophorese zeigen, dass mit der durchgeführten Methode die schweren Ketten zur Darstellung kommen [18, 181, 186].

#### Fixierung und Färbung des Gels:

Nach Herauslösung des Gels aus der Elektrophoresekammer erfolgt die Fixation in 50% Methanol über einen Zeitraum von 24 Stunden. Mit der Silberfärbung nach Oakley, die sich das Verbinden reduzierten Silbers mit dem Myosin zunutze macht, wurden die Banden angefärbt [136].

### **2.8.3. Bestimmung des Proteins S100A1**

#### Geräte und Reagenzien:

- Blotmembran *Immobilon-P Transfer Membrane*, Millipore
- Dismembrator *Mikro-Dismembrator S*, B.Braun Biotech International
- Elektrophoresegel 6% und 6-20% *Novex<sup>®</sup> Tris-Glycine Gels*, Invitrogen
- Elektrophoresekammer *XCell SureLock<sup>™</sup>*, Invitrogen
- Fotofilm *Hyperfilm<sup>™</sup> ECL*, Amersham Biosciences
- Laborwaage *SBC 32*, Scaltec
- Nassblotkammer, Eigenbau
- pH-Meter *766 Calimatic*, Knick
- Transformator *Electrophoresis Power Supply EPS 601*, Amersham Pharmacia Biotech
- Zentrifuge *Biofuge fresco*, Heraeus Instruments
- alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin *AvidX-AP*, Tropix
- primärer Antikörper rabbit-IgG anti-S100A1 *SA 5632*, Eurogentec

- sekundärer Antikörper goat anti-rabbit-IgG  
*Biotin-SP-conjugated Affini Pure, Dianova*
- Bromphenolblau
- $\text{CaCl}_2$
- *CSPD<sup>®</sup> Ready-to-Use substrate solution, Tropix*
- Ethylenbis(oxyethylnitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- Glycerin
- *I-Block<sup>TM</sup>, Tropix*
- $\beta$ -Mercaptoethanol
- Methanol
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- NaCl
- Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)
- *Nitro-Block<sup>TM</sup>, Tropix*
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
- Proteinaseinhibitor *Mini-Complete<sup>TM</sup> Proteinase-Inhibitor, Roche*
- Taurin
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH-Wert mit HCl eingestellt (TRIS-HCl)
- *Tween<sup>®</sup> 20, Bio-Rad*

#### Verwendete Lösungen:

- B1 Phosphate Buffered Saline (PBS) 10fach
- 0,58 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,17 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - 0,68 M NaCl
- B2 Extraktionspuffer pH 7,4
- 5 mM EGTA
  - 5 mM EDTA
  - 1 mM PMSF
  - 1 Tablette Proteinaseinhibitor pro 100 ml  
in einfacher PBS (B1)

- B3 Probenpuffer pH 6,8
- 0,5 M TRIS-HCl
  - 5 % SDS
  - 10 % Glycerin
  - 0,05 % Bromphenolblau
  - 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol
- B4 Anodenpuffer pH 8,6
- 0,1 M TRIS-HCl
- B5 Elektrophoresepuffer pH 8,6
- 0,1 M TRIS-HCl
  - 0,1 M Taurin
  - 0,1 % SDS
- B6 Tank-Blot-Puffer
- 20 % Methanol
  - 15 mM TRIS
  - 15 mM Taurin
- B7 Tris Buffered Saline (TBS) 10fach pH 7,6
- 0,025 M TRIS-HCl
  - 0,15 M NaCl
  - 1 mM  $\text{CaCl}_2$
- B8 Blockierpuffer
- 0,2 % I-Block™
  - 10 % TBS 10fach
  - 0,1 % Tween® 20
- B9 Assaypuffer 10fach pH 9,5
- 1 M Tris-HCl
  - 1 M NaCl

### Extraktion:

Die semiquantitativen Analysen des Proteins S100A1 erfolgten nach einem modifizierten Protokoll von Ehlermann [44].

Von den Muskelproben wurden jeweils ca. 100 mg abgewogen. Anschließend wurden sie eine Minute lang mit einer Frequenz von 3.000/min unter Stickstoffkühlung dismembriert. Es erfolgte die Zugabe von 3 µl Extraktionspuffer (B2) pro mg Muskelgewebe. Die Proben tauten ungefähr 15 Minuten bei Raumtemperatur auf. Nun folgte eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C. Der Überstand wurde entnommen und sein Proteingehalt mittels *Bio-Rad Protein-Assay* photometrisch bestimmt. Im kommenden Arbeitsschritt wurden die Proben mit dem Probenpuffer (B3) auf einen Gesamtproteingehalt von 5 µg/µl verdünnt.

### Gelelektrophorese:

Die Lanes eines 6-20% Tris-Glycin Gels wurden mit jeweils 50 µg Gesamtprotein (entspricht 10 µl der Probe) gefüllt. In den äußersten Lanes der Gele lief jeweils der Marker mit. Die Gele liefen bei Raumtemperatur für 2 Stunden bei einer Spannung von 90 V und einer maximalen Stromstärke von 50 mA. In Anlehnung an die Vorgehensweise auf unserem Campus [17, 154] und nach persönlicher Beratung kam bei der Gelelektrophorese des S100A1 keine Ladekontrolle zum Einsatz.

### Blotten:

Anschließend erfolgte das Blotten in einer selbstgebauten Nassblotkammer auf eine PVDF-Membran. Die PVDF-Membran wurde zuvor in einer 100%igen Methanol-Lösung aktiviert. Der Blot lief bei Raumtemperatur für 2 Stunden bei 50 V und einer maximalen Stromstärke von 240 mA. Bei allen Blots kam der Tank-Blot-Puffer (B6) zum Einsatz.

### Antikörper-Inkubation:

Die PVDF-Membran wurde nach dem Blotten mit einfacher TBS-Lösung (B7) abgewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Blockierpuffer (B8) für 60 Minuten. Die primären Antikörper wurden mit Blockierpuffer 1:40.000 verdünnt. Die PVDF-Membran wurde darin für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 2 Minuten in Blockierpuffer (B8) gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden mit Blockierpuffer (B8) 1:40.000 verdünnt und die PVDF-Membran darin für 60 Minuten inkubiert. Nun erfolgte wieder ein zweimaliges, fünfminütiges

Waschen der Membran mit Blockierpuffer (B8). Im Folgenden wurde die Membran für 60 Minuten in *AVIDx-AP<sup>TM</sup>* – verdünnt mit Blockierpuffer (B8) 1:20.000 – inkubiert. Weiterhin wurde die Membran dreimal jeweils 5 Minuten in Blockierpuffer (B8) sowie zweimal für jeweils 2 Minuten in einfachem Assaypuffer (B9) gewaschen. Die Membran wurde nun mit ca. 3 ml eines Gemisches aus 20 Teilen *CSPD<sup>®</sup> Ready-to-Use substrate solution* und einem Teil *Nitro-Block<sup>TM</sup>* gleichmäßig für 5 Minuten benetzt. Das bei der Umsetzung des Substrates durch die alkalische Phosphatase (*AVIDx-AP<sup>TM</sup>*) entstehende Licht wurde benutzt, um einen Fotofilm zu schwärzen.

#### Spezifität des S100A1-Antikörpers:

Der Antikörper SA 5632 kam bei uns als primärer Antikörper zum Nachweis des Proteins S100A1 zum Einsatz. Es handelt sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper des Typs IgG aus dem Kaninchen. Dieser bindet spezifisch an die Aminosäuren 42 - 54 des humanen S100A1 [131]. Eine Kreuzreaktion mit dem S100A1-Protein aus Maus, Ratte und Kaninchen konnte bereits nachgewiesen werden [127]. Eine zusätzliche Kreuzreaktion mit dem S100A1 der Ziege ist hochwahrscheinlich [162], da die Genstruktur der S100-Proteine bei allen Vertebraten hochkonserviert ist und sich diese daher unter den verschiedenen Spezies kaum unterscheiden [119]. Zudem exponiert das Protein S100A1 aufgrund des Kontaktes zur PVDF Membran eine hydrophobe Oberfläche, die die spezifischen Epitope für den Antikörper beinhaltet. Diese Epitope sind *in vivo* für weitere Proteininteraktionen verantwortlich und sind daher zwischen den Spezies identisch [126]. Der genannte Antikörper ist bereits in zahlreichen medizinischen Dissertationen und Publikationen unter der gleichen Methode wie in der Vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen [17, 20, 128, 129, 132, 154, 155]. Hierbei fiel er durch eine hohe Spezifität und Zuverlässigkeit auf.

#### **2.8.4. Densitometrische Quantifizierung der Gele und Filme**

Die Gele und entwickelten Filme wurden eingescannt und als *tif*-Dateien gespeichert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software *Gel-Pro Analyser 3.0* (*MediaCybernetics*, Bethesda, USA).

## 2.9. Einteilung der Versuchsgruppen

Die Ziegen wurden retrospektiv in drei Gruppen eingeteilt, die sich hinsichtlich Medikation und Stimulationsmuster unterschieden. Die Tiere der Gruppe I (n=6) erhielten lediglich Clenbuterol und wurden nach dem Stimulationsmuster *Stim50* trainiert. Tiere der Gruppe II (n=6) erhielten ebenfalls ausschließlich Clenbuterol, wurden aber nach dem Stimulationsmuster *Stim100* trainiert. Gruppe III (n=5) beinhaltete Tiere, die sowohl Clenbuterol als auch Thyroxin bekamen und nach dem Stimulationsmuster *Stim100* trainiert wurden (*Tabelle 2.2*).

**Tabelle 2.2:** Gruppeneinteilung

	<b>Stimulationsmuster <i>Stim50</i></b>	<b>Stimulationsmuster <i>Stim100</i></b>
<b>Clenbuterol + Triiodthyronin</b>	-	Gruppe III (n=5)
<b>Clenbuterol</b>	Gruppe I (n=6)	Gruppe II (n=6)

## 2.10. Statistik

Zur Auswertung der Statistik wurde das Programm *SPSS Statistics 18* (*SPSS Inc.*, Chicago, USA) verwendet. Aufgrund der geringen Fallzahlen gingen wir stets von nicht-normalverteilten Stichproben aus. Für die Berechnung der Signifikanzen kam daher bei unverbundenen Stichproben der U-Test nach Mann-Whitney und bei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test zur Anwendung.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Versuchstiere und Trainingsdauer

Alle Tiere überstanden die Implantation des *Frosches* unbeschadet. Sie erholten sich von der Operation innerhalb kurzer Zeit, sodass ihnen bereits wenige Tage nach der Operation ein schmerzfreies Bewegen in den Stallungen und auf den Weiden möglich war. Der einseitige Ausfall des LDM wurde von den Tieren ohne weitere Probleme toleriert. Vor Beginn und nach Abschluss des dynamischen Trainings wurden jeweils Proben aus dem LDM entnommen. Diese bezeichnen wir in der vorliegenden Arbeit mit „prospektiv“ und „trainiert“. Es erfolgten Analysen zur MHC-Komposition und zur Expression des Proteins S100A1. Zudem wurde das Schlagvolumen des *Frosches* am Trainingsende bestimmt, um dieses mit den biochemischen Eigenschaften des LDM am Trainingsende vergleichen zu können.

Als Trainingsdauer zählte die Zeit von der Implantation bis zur Explantation des *Frosches*. Der *Frosch* wurde beim Auftreten von Komplikationen wie Infektionen oder Leckagen explantiert. Aus dieser Tatsache ergab sich für alle Tiere eine unterschiedlich lange Trainingsdauer. Die *Tabellen 3.1* bis *3.3* geben für jedes Tier die Trainingsdauer und den Grund des Trainingsendes wieder.

Gruppe III wurde mit einem Mittelwert von  $206,2 \pm 68,6$  Tagen am längsten trainiert, gefolgt von Gruppe II mit  $188,0 \pm 59,3$  Tagen. Das Training der Tiere in Gruppe I fiel im Mittel mit  $93,3 \pm 32,6$  Tagen am kürzesten aus.

Die Differenz der Trainingsdauer zwischen den Gruppen I und II war mit  $p=0,016$  sowie zwischen den Gruppen I und III mit  $p=0,011$  signifikant. Lediglich zwischen den Gruppen II und III bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,855$ ).

**Tabelle 3.1**

Trainingsdauer und Grund des Trainingsendes

Gruppe I (n=6) Clenbuterol, Stimulationsprotokoll „Stim50“

Name	Trainingsdauer [d]	Grund des Trainingsendes
Merkur	65	großflächige Infektion um Narbe und Schrittmacher (SM)
Heinz	101	SM-Tasche infiziert
Heino	141	SM-Tasche perforiert
Vincente	59	Leckage des <i>Frosches</i>
Leo	119	SM-Tasche perforiert
Pipo Langstrumpf	75	Perikardtamponade, linke Lunge teilkollabiert
<b>Mittelwert</b>	<b>93,3</b>	
<b>Standardabweichung</b>	<b>32,6</b>	

**Tabelle 3.2**

Trainingsdauer und Grund des Trainingsendes

Gruppe II (n=6) Clenbuterol, Stimulationsprotokoll „Stim100“

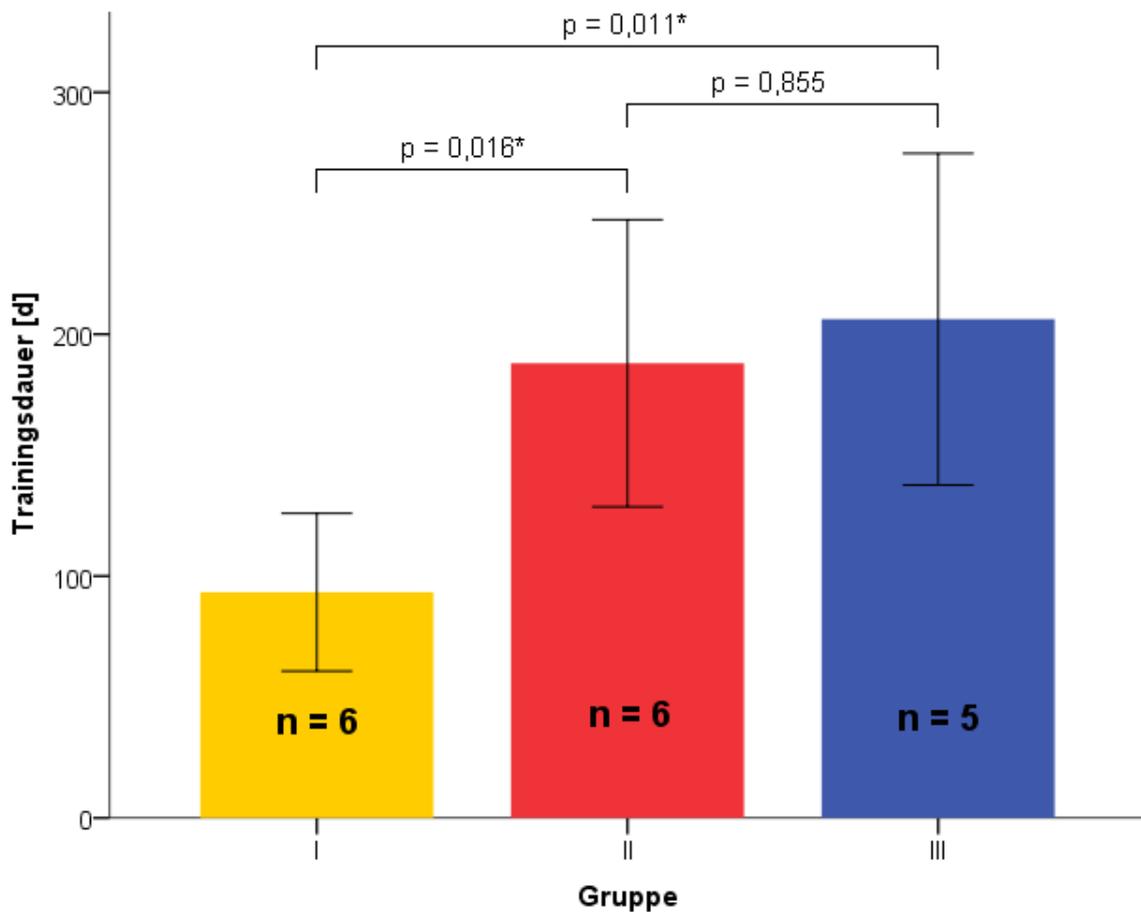
Name	Trainingsdauer [d]	Grund des Trainingsendes
Lolly	196	deszendierende Portinfektion
Ringo Starr	196	Pneumonie
Danni	204	SM-Tasche perforiert
Nina	81	Leckage des <i>Frosches</i>
Hanna	187	SM-Tasche perforiert
Gerhard Schröder	264	SM-Tasche perforiert
<b>Mittelwert</b>	<b>188,0</b>	
<b>Standardabweichung</b>	<b>59,3</b>	

**Tabelle 3.3**

Trainingsdauer und Grund des Trainingsendes

Gruppe III (n=5) Clenbuterol + Triiodthyronin, Stimulationsprotokoll „Stim100“

Name	Trainingsdauer [d]	Grund des Trainingsendes
Horst Janssen	182	SM-Tasche infiziert
Max Ernst	120	SM-Tasche infiziert
Hamburger	185	Portinfektion
Antoni Tapies	243	SM-Tasche perforiert
Andy Warhol	301	Pneumonie
<b>Mittelwert</b>	<b>206,2</b>	
<b>Standardabweichung</b>	<b>68,6</b>	

**Abbildung 3.1**Darstellung der Trainingsdauer aller drei Gruppen (Fehlerindikator:  $\pm 1$  SD).

### 3.2. Myostimulatoren und Elektroden

Prä- und unmittelbar postoperativ wurden die Myostimulatoren auf ihre ordnungsgemäße Funktion überprüft. Die Implantation der Elektroden und Myostimulatoren gestaltete sich bei allen Versuchstieren problemlos. Im Trainingsverlauf kam es bei vier Ziegen zu Fehlfunktionen des Myostimulators, die einen Austausch des Aggregates erforderlich machten. Dieser erfolgte jeweils innerhalb einer Woche.

Im Trainingsverlauf konnten zudem fünf Elektrodenbrüche bzw. -dislokationen beobachtet werden. Ein Ersatz der Elektroden erfolgte ebenfalls innerhalb einer Woche.

### 3.3. Biochemische und fluiddynamische Ergebnisse

Die *Tabellen 3.4 bis 3.6* zeigen eine Übersicht über die biochemischen und fluiddynamischen Ergebnisse der drei Versuchsgruppen. Aufgeführt ist jeweils der prospektive und trainierte MHC-Typ-I-Anteil der Muskelprobe (die Differenz zu 100% ist stets als MHC-Typ-II zu betrachten), der Transformationsgrad (Kapitel 2.5.3.), die trainierte, relative S100A1-Konzentration im Vergleich zur prospektiven Probe sowie das Schlagvolumen des *Frosches* am Trainingsende.

#### 3.3.1. Teiltransformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterolmedikation

##### (Gruppe I)

Unter Anwendung des Stimulationsprotokolls *Stim50* konnte in allen Versuchstieren der Gruppe I ein relativer Anstieg des MHC-Typ-I-Anteils auf ca. 50% beobachtet werden. Lediglich im LDM von Heino wiesen wir eine Reduktion des MHC-Typ-I-Anteils um 6 Prozentpunkte nach. Heino zeigte somit als einziges Tier einen negativen Transformationsgrad. Die Mittelwerte des prospektiven und trainierten relativen MHC-Typ-I-Anteils unterschieden sich innerhalb der Gruppe I nicht signifikant voneinander ( $p=0,075$ ).

Die relative S100A1-Konzentration zeigte sich nach dem Training innerhalb der Gruppe I uneinheitlich. Sie reichte von einer Halbierung (Heino) bis fast zu einer Verdreifachung (Leo) im Vergleich zu den jeweiligen prospektiven Proben.

**Tabelle 3.4**

Gruppe I (n=6) Clenbuterol, Stimulationsprotokoll „Stim50“

Name	MHCI pros [%]	MHCI train [%]	TG	S100A1 [%]	SV [ml]
Merkur	24,2	45,8	21,6	194,8	30,5
Heinz	41,7	43,2	1,5	95,5	17,8
Heino	57,1	51,1	-6,0	49,1	13,4
Vincente	44,6	51,1	6,5	117,7	27,7
Leo	24,9	46,8	21,9	256,5	44,4
Pipo Langstrumpf	23,7	44,0	20,3	180,5	32,9
<b>Mittelwert</b>	<b>36,0</b>	<b>47,0</b>	<b>11,0</b>	<b>149,0</b>	<b>27,8</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>13,9</b>	<b>3,4</b>	<b>12,0</b>	<b>75,5</b>	<b>11,1</b>

### 3.3.2. Vollständig transformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterolmedikation (Gruppe II)

Unter Anwendung des Stimulationsprotokolls *Stim100* fiel bei allen Versuchstieren der Gruppe II außer bei Hanna der MHC-Typ-II-Anteil unter die Nachweisgrenze. Der LDM dieser Tiere wurde somit in einen reinen Typ-I-Muskel transformiert. Die Mittelwerte des MHC-Typ-I-Anteils zwischen den prospektiven und den trainierten Proben unterschieden sich in Gruppe II signifikant voneinander ( $p=0,028$ ).

Die S100A1-Konzentration innerhalb der Gruppe II stieg nach dem Training auf ein Vielfaches im Vergleich zur untrainierten Probe an.

**Tabelle 3.5**

Gruppe II (n=6) Clenbuterol, Stimulationsprotokoll „Stim100“

Name	MHCI pros [%]	MHCI train [%]	TG	S100A1 [%]	SV [ml]
Lolly	36,3	100,0	63,7	510,5	13,2
Ringo Starr	35,8	100,0	64,2	563,6	18,2
Danni	58,4	100,0	41,6	412,5	17,3
Nina	42,7	100,0	57,3	505,0	12,3
Hanna	26,8	96,0	69,2	510,0	22,3
Gerhard Schröder	27,4	100,0	72,6	526,5	11,4
<b>Mittelwert</b>	<b>37,9</b>	<b>99,3</b>	<b>61,4</b>	<b>504,7</b>	<b>15,8</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>11,7</b>	<b>1,6</b>	<b>11,0</b>	<b>42,4</b>	<b>4,2</b>

### 3.3.3. Vollständig transformierte Skelettmuskelventrikel mit Clenbuterol- und Triiodthyroninmedikation (Gruppe III)

Auch in Gruppe III wurde durch das Stimulationsprotokoll *Stim100* eine vollständige Transformation der Muskelfasern in Richtung Typ-I-Fasern induziert. Bei jeder trainierten Muskelprobe dieser Gruppe fiel der MHC-Typ-II-Anteil unter die Nachweisgrenze. Der Unterschied zwischen prospektiver und trainierter MHC-Komposition erwies sich als signifikant ( $p=0,043$ ). Durch das dynamische Training kam es im Mittel zu einer Versiebenfachung der S100A1-Konzentration.

**Tabelle 3.6**

Gruppe III ( $n=5$ ) Clenbuterol + Thyroxin, Stimulationsprotokoll „Stim100“

Name	MHCI pros [%]	MHCI train [%]	TG	S100A1 [%]	SV [ml]
Horst Janssen	26,5	100,0	73,5	758,0	33,3
Max Ernst	26,9	100,0	73,1	714,0	27,5
Hamburger	32,8	100,0	67,2	702,4	18,0
Antoni Tapies	28,7	100,0	71,3	692,9	10,0
Andy Warhol	34,3	100,0	65,7	640,0	52,0
<b>Mittelwert</b>	<b>29,8</b>	<b>100,0</b>	<b>70,2</b>	<b>701,5</b>	<b>28,2</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,5</b>	<b>0,0</b>	<b>3,5</b>	<b>42,4</b>	<b>16,0</b>

### 3.4. Myosin-Heavy-Chain-Komposition der Skelettmuskelventrikel

Die prospektiven und trainierten Muskelproben des LDM wurden gelelektrophoretisch hinsichtlich der MHC-Komposition nach Typ-I und Typ-II analysiert. Die Intensität der Bande des MHC-Typ-I addiert mit der Bande des MHC-Typ-II wurde als 100% definiert. Hieraus ergab sich der jeweilige relative MHC-Typ-I und -Typ-II-Anteil in Prozent. *Abbildung 3.3* gibt die Ergebnisse wieder.

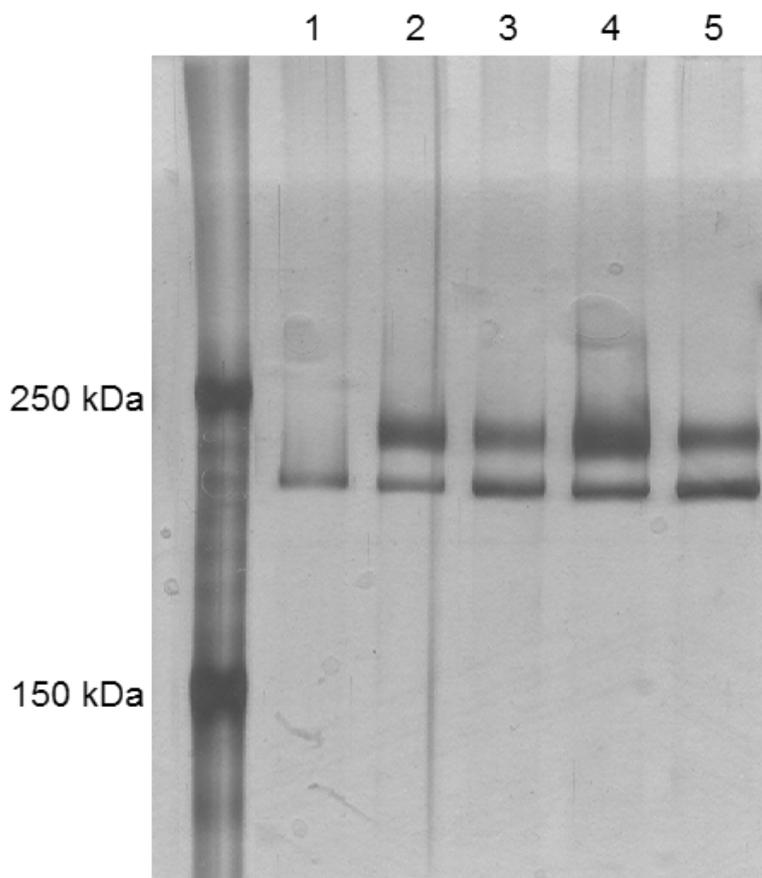
#### 3.4.1. Vor dem Training

Die MHC-Komposition des LDM war in allen drei Gruppen vor dem Training ähnlich. Den höchsten prospektiven MHC-Typ-I-Anteil wies die Gruppe II mit  $37,9 \pm 11,7\%$  auf, den niedrigsten die Gruppe III mit  $29,8 \pm 3,5\%$ . Gruppe I lag mit einem mittleren MHC-Typ-I-Anteil von  $36,0 \pm 13,9\%$  zwischen den Gruppen II und III.

Für den Unterschied der prospektiven MHC-Zusammensetzung zwischen Gruppe I und Gruppe II war keine Signifikanz nachzuweisen ( $p=0,522$ ). Auch im Vergleich der Gruppe I mit der Gruppe III zeigte sich keine Signifikanz ( $p=1,000$ ). Gleiches galt zwischen den Gruppen II und III ( $p=0,144$ ). Die Ausgangssituation bezüglich der MHC-Komposition ist somit für alle Gruppen gleich.

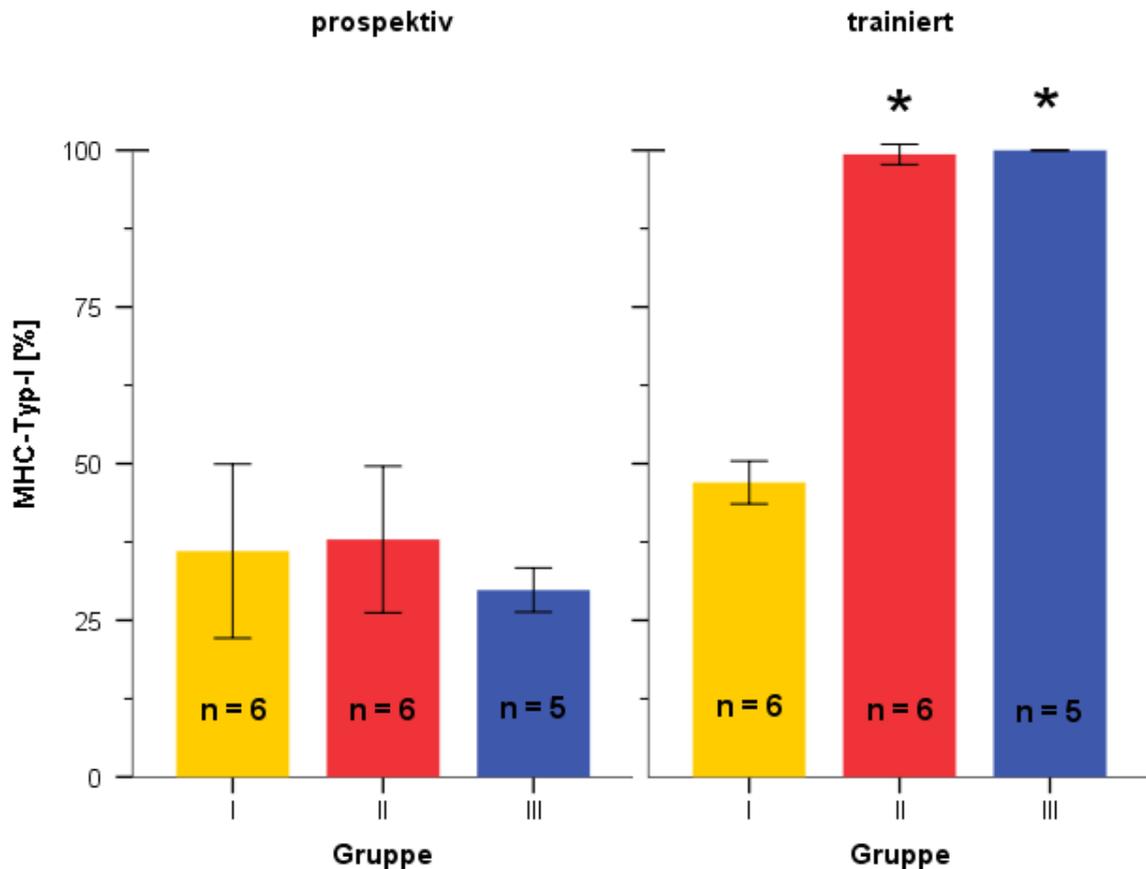
### 3.4.2. Nach dem Training

Durch die elektrische Stimulation konnte in allen LDM mit Ausnahme von Heino (Gruppe I) eine relative Erhöhung der MHC-Typ-I-Fraktion induziert werden. Wie hoch diese Erhöhung ausfiel, hing dabei vom gewählten Stimulationsprotokoll ab. So zeigten die Tiere der Gruppe I, deren Training durch das Stimulationsmuster *Stim50* erfolgte, eine MHC-Komposition von lediglich  $47,0 \pm 3,4\%$  Typ-I. Wesentlich größere relative MHC-Typ-I-Anteile wurden in den Gruppen beobachtet, für die das Stimulationsprotokoll *Stim100* gewählt wurde. Dazu zählten die Gruppe II mit  $99,3 \pm 1,6\%$  und die Gruppe III mit  $100 \pm 0\%$ . Der geringe Unterschied dieser beiden Gruppen war nicht signifikant ( $p=0,361$ ). Eine Signifikanz der Unterschiede konnte nur zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Stimulationsprotokollen festgestellt werden, d. h. zwischen den Gruppen I und II ( $p=0,003$ ) sowie zwischen den Gruppen I und III ( $p=0,004$ ).



**Abbildung 3.2**

*Elektrophoresegel der MHC-Analysen (Auszug). Die jeweils oberen Banden repräsentieren den MHCII-Anteil, die unteren den MHCI-Anteil. Lane 2+4: untrainierte MHC-Komposition (überwiegend MHCII). Lane 1: vollständig transformierte MHC-Komposition (nach Training laut Protokoll *Stim100*). Lane 3+5: teiltransformierte MHC-Komposition (nach Training laut Protokoll *Stim50*).*



**Abbildung 3.3**

Darstellung der MHC-Typ-I-Komposition der drei Gruppen vor (prospektiv) und nach dem Training (trainiert) (Fehlerindikator:  $\pm 1$  SD). Die Gruppen II und III weisen signifikante Unterschiede zwischen prospektiver und trainierter MHC-Komposition auf. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des MHC-Typ-II-Anteils verzichtet, dieser stellt stets die Differenz zu 100 % dar.

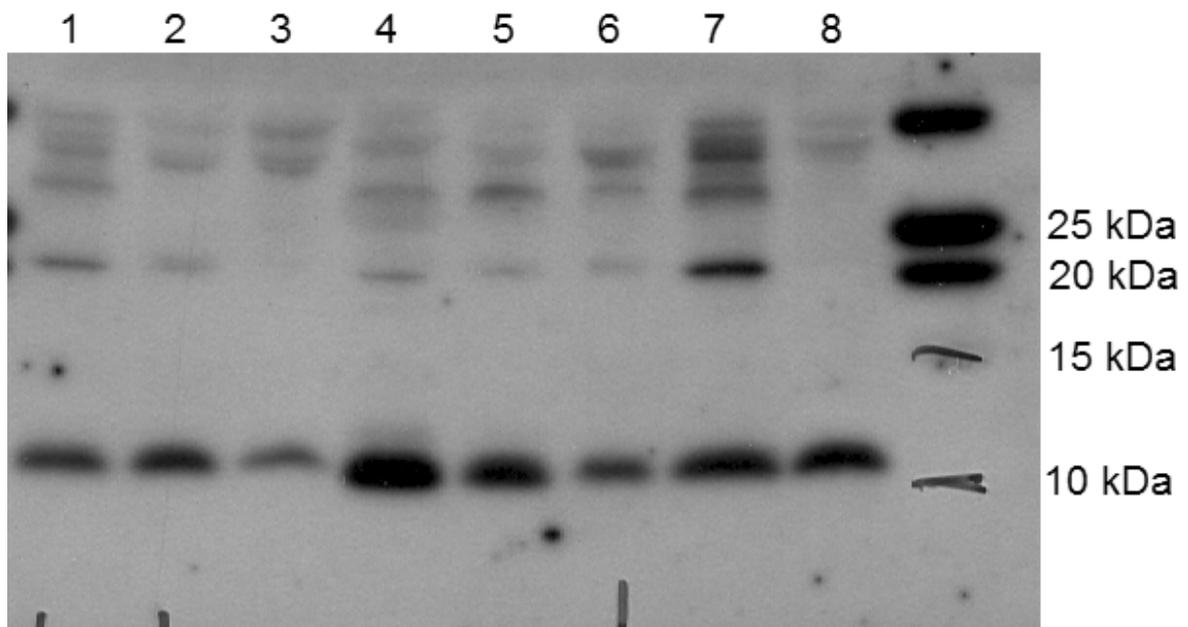
### 3.5. Trainingsinduzierte S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel

Das Protein S100A1 wurde gelelektrophoretisch mit Hilfe eines Immunoassays semiquantitativ bestimmt. Hierzu verglichen wir die Intensität der prospektiven S100A1-Bande mit der Intensität der zugehörigen trainierten Bande des gleichen Tieres. Die Intensität der trainierten Bande wurde anschließend als Prozentwert der prospektiven Bande des jeweiligen Tieres angegeben. Dementsprechend bedeutet eine relative S100A1-Konzentration von 100 %, dass die S100A1-Konzentration genau so hoch ist wie in der untrainierten (prospektiven) Probe.

Abbildung 3.5 stellt die erhobenen Ergebnisse grafisch dar. In allen LDM konnte durch die elektrische Stimulation am *Frosch* die Expression von S100A1 gesteigert werden. In Gruppe III ergab sich durch das Training eine mittlere S100A1-Expression von

701,5 ± 42,4%. In der Gruppe II fiel die Erhöhung der S100A1-Expression etwas geringer aus. Hier stieg der S100A1-Gehalt auf 504,7 ± 50,0% an. Den geringsten Zuwachs verzeichnete die Gruppe I. Durch das Stimulationsprotokoll *Stim50* konnte in dieser Gruppe lediglich ein Zuwachs auf 149,0 ± 75,5% der prospektiven S100A1-Expression gezeigt werden.

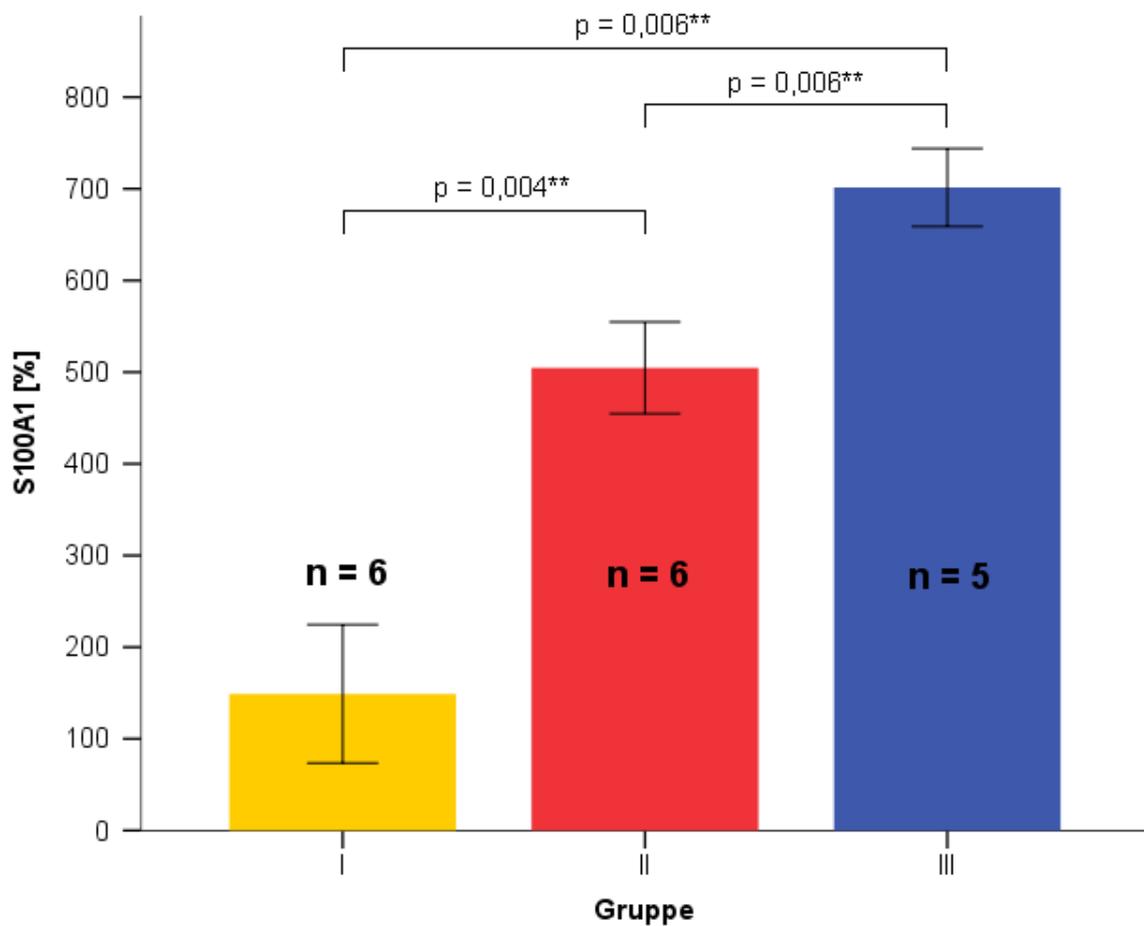
Die beschriebenen Unterschiede zwischen allen drei Gruppen erwiesen sich als hochsignifikant. Im Vergleich der Gruppen I und II lag die Signifikanz bei  $p=0,004$ . Zwischen den Gruppen I und III konnte eine Signifikanz von  $p=0,006$  und zwischen den Gruppen II und III ebenfalls eine Signifikanz von  $p=0,006$  beobachtet werden.



**Abbildung 3.4**

Belichteter Film des Immunoblot der S100A1-Analysen (Auszug). Die S100A1-Banden liegen ungefähr auf Höhe der 10 kDa-Bande der Markerlane. Lane 3+1: Versuchstier Pipo Langstrumpf, untrainiert+trainiert. Der S100A1-Gehalt hat sich durch das Training bei diesem Versuchstier fast verdoppelt. Lane 6+4: Versuchstier Lolly, untrainiert+trainiert. Durch das Training kam es hier zu einem massiven Anstieg des Proteins S100A1. Lane 7+8: Versuchstier Heinz, untrainiert+trainiert ohne wesentlichen Unterschied zwischen der trainierten und untrainierten Probe.

Anmerkung: Die 10 und 15 kDa Banden der Marker-Lane waren zu schwach um den Fotofilm ausreichend zu schwärzen, sodass sie von der Blotmembran 1:1 abgepaust wurden (auf der Blotmembran waren sie deutlich sichtbar).



**Abbildung 3.5**

Darstellung der relativen S100A1-Konzentration der drei Gruppen nach dem Training (Fehlerindikator:  $\pm 1$  SD). Die untrainierten (prospektiven) Proben sind jeweils als 100% definiert. Alle Gruppen unterscheiden sich hochsignifikant voneinander.

### 3.6. Schlagvolumina der Skelettmuskelventrikel

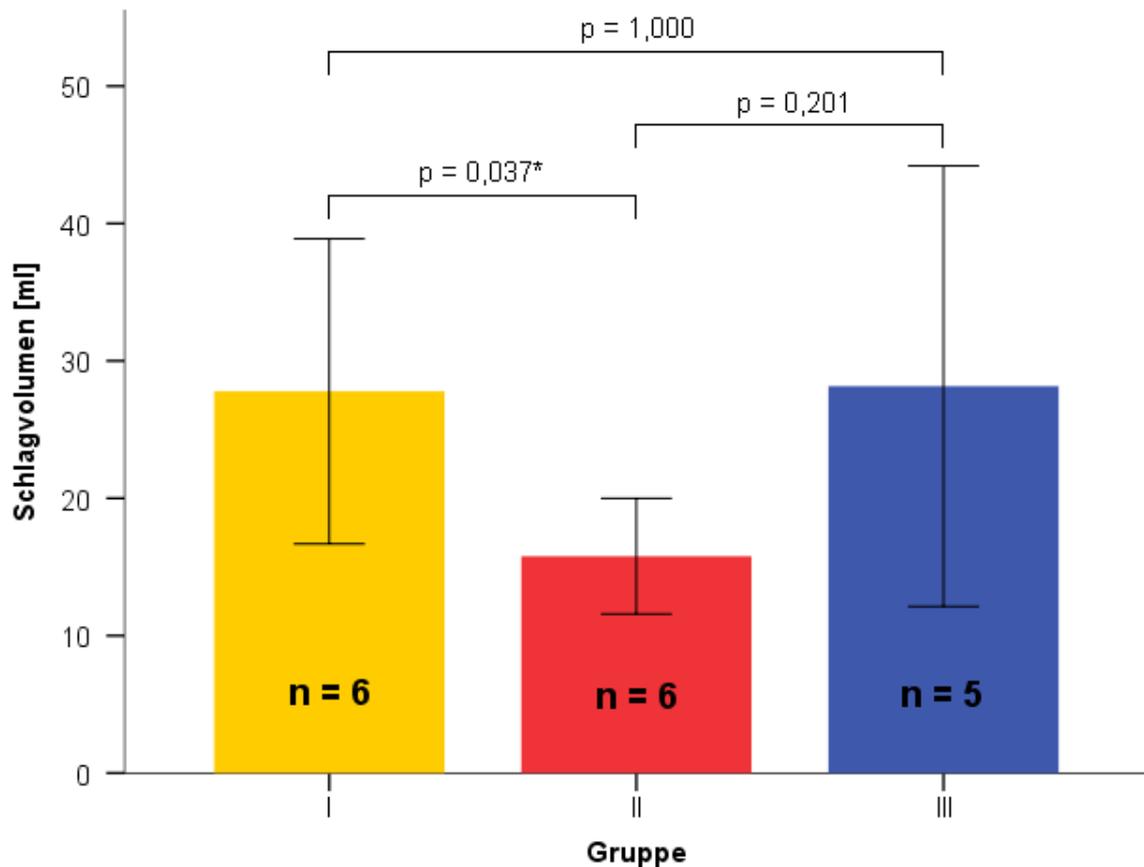
Um die biochemischen Eigenschaften der trainierten Muskeln nach dem Training mit dem Schlagvolumen vergleichen zu können, bestimmten wir dieses ebenfalls am Ende des Trainings. *Abbildung 3.6* gibt die Ergebnisse wieder.

Die Entwicklung des Schlagvolumens zeigte hinsichtlich des gewählten Stimulationsprotokolls oder der applizierten Medikation keinen eindeutigen Trend. Zudem differierten die registrierten Schlagvolumina innerhalb der Gruppen stark, was besonders in den Gruppen I und III zu hohen Standardabweichungen führte.

Gruppe III wies am Trainingsende mit  $28,2 \pm 16,0$  ml das höchste Schlagvolumen auf. Gruppe I zeigte ein nur wenig geringeres Schlagvolumen von  $27,8 \pm 11,1$  ml. Das

niedrigste mittlere Schlagvolumen fand sich in Gruppe II, das mit  $15,8 \pm 4,2$  ml nur gut die Hälfte des Schlagvolumens der Gruppe III ausmachte.

Eine Signifikanz der Unterschiede im Schlagvolumen bestand ausschließlich zwischen der Gruppe I mit dem höchsten und der Gruppe II mit dem niedrigsten Schlagvolumen ( $p=0,037$ ). Zwischen den Gruppen I und III ( $p=1,000$ ) sowie den Gruppen II und III ( $p=0,201$ ) war keine Signifikanz der Unterschiede im Schlagvolumen nachweisbar.



**Abbildung 3.6**

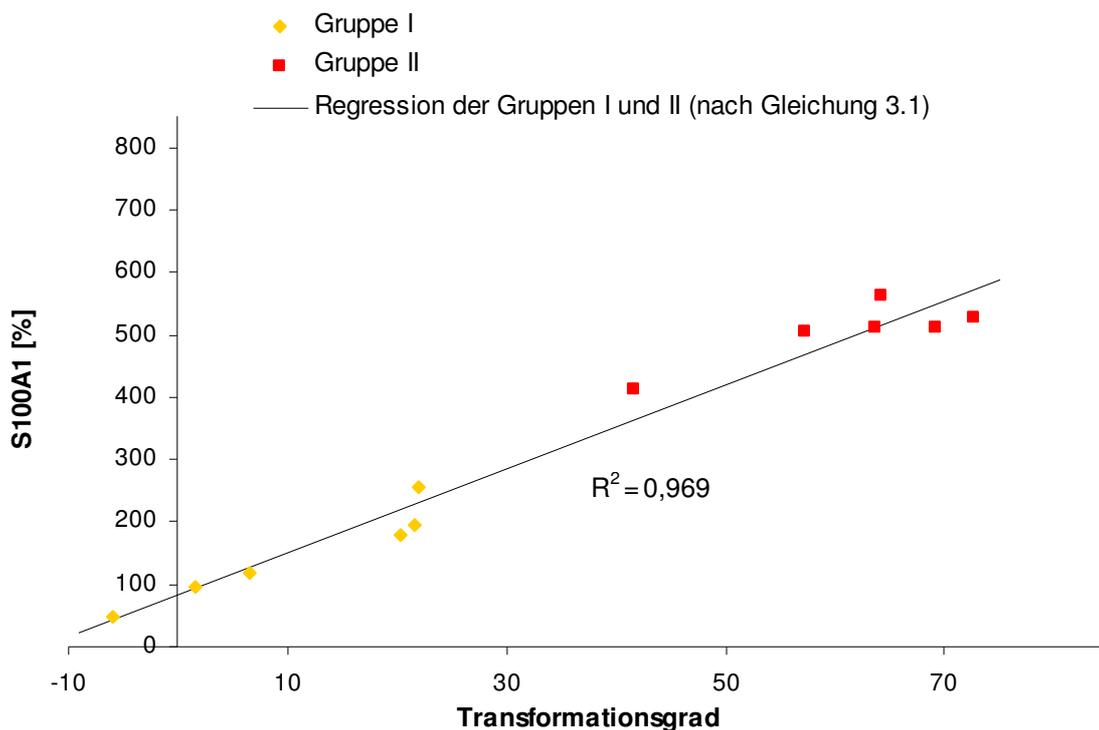
Darstellung der Schlagvolumina am Ende des Trainings (Fehlerindikator:  $\pm 1$  SD). Signifikant unterschiedliche Schlagvolumina zeigen sich lediglich zwischen den Gruppen I und II.

### 3.7. S100A1-Expression und Transformationsgrad der Skelettmuskelventrikel

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Transformationsgrad und der Expression des Proteins S100A1 darstellen zu können, wurden die Ergebnisse der einzelnen Tiere zueinander in Relation gesetzt (*Abbildung 3.7* und *3.8*).

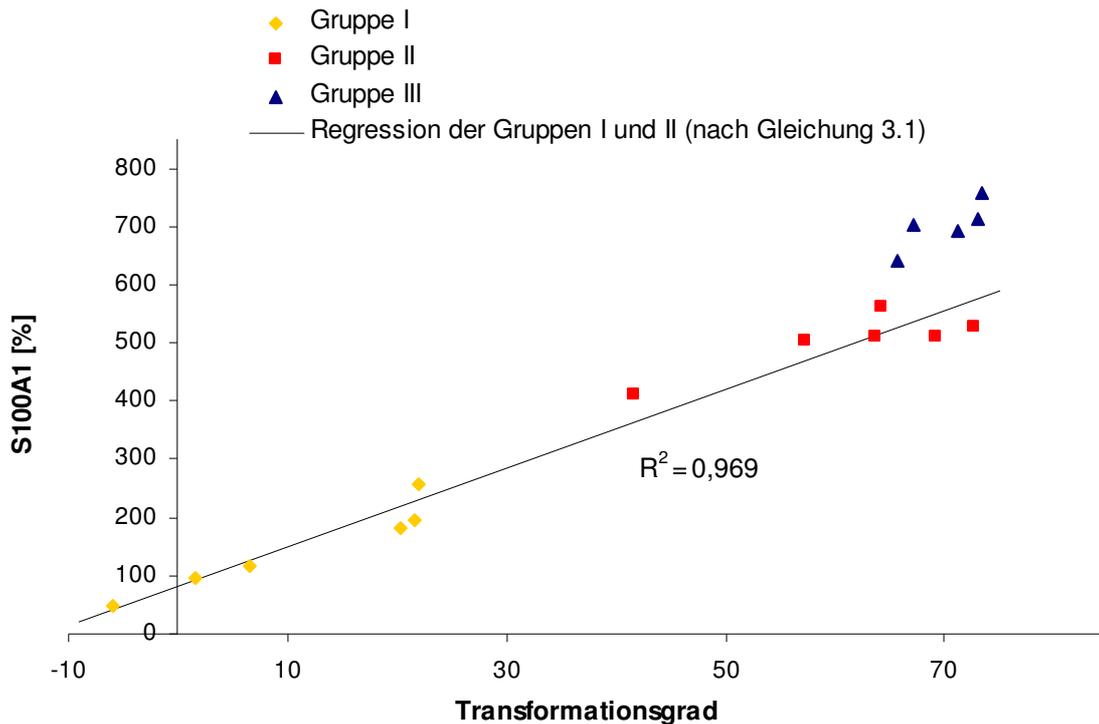
Die S100A1-Expression stieg in allen Gruppen mit größer werdendem Transformationsgrad an. Wir gingen – unter Ausschluss der Gruppe III aufgrund der unterschiedlichen Medikation – von einer linearen Abhängigkeit der S100A1-Expression vom Transformationsgrad aus. Diese Korrelation wurde durch die Regressionsgleichung (3.1) mit  $R^2=0,969$  beschrieben. Zu beachten ist, dass das Versuchstier Heino aus der Gruppe I trotz eines negativen Transformationsgrades des LDM dem Trend der Regression folgte.

$$(3.1) \quad S100A1 [\%] = f(TG) = 6,740 \times TG + 82,85 \quad (R^2 = 0,969)$$



**Abbildung 3.7**

Darstellung der relativen S100A1-Konzentration in Abhängigkeit des Transformationsgrades. Abgebildet sind die Ergebnisse der Gruppen I und II. Die Regressionsgerade resultiert aus den Messdaten beider Gruppen.



**Abbildung 3.8**

Darstellung der relativen S100A1-Konzentration in Abhängigkeit des Transformationsgrades. Hier die Darstellung aller drei Versuchsgruppen. Die Ergebnisse der Gruppe III passen größenordnungsmäßig in die Regression der Gruppen I und II.

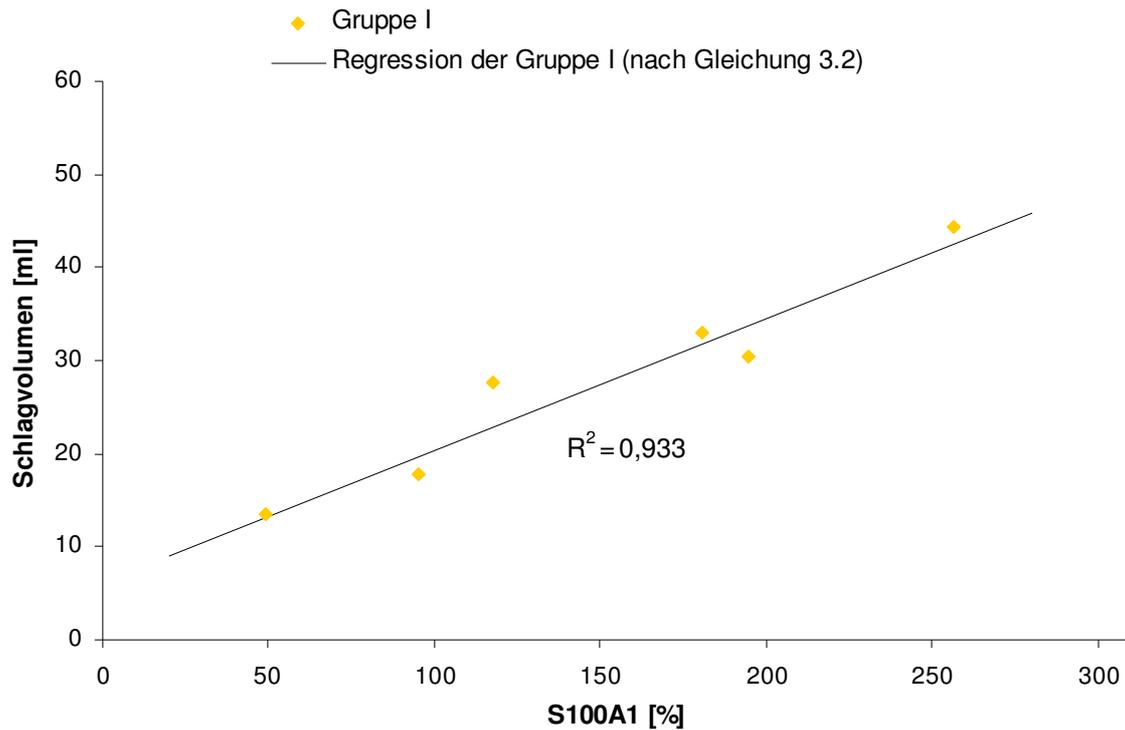
### 3.8. Schlagvolumen und S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel

Um die Auswirkung einer veränderten S100A1-Expression auf das Schlagvolumen der *Frösche* evaluieren zu können, wurden die Daten der einzelnen Versuchstiere zueinander in Relation gestellt (Abbildung 3.9 und 3.10).

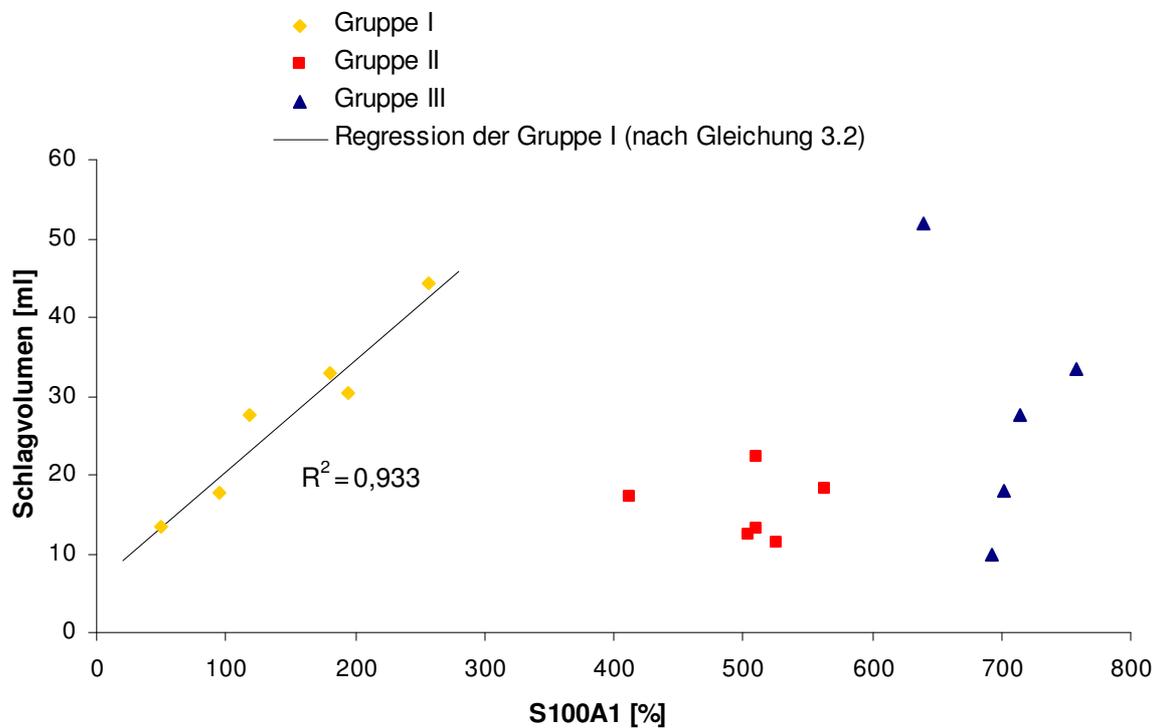
Innerhalb der Gruppe I stieg das Schlagvolumen mit zunehmender S100A1-Expression des LDM an. Wir legten für diesen Zusammenhang wiederum eine lineare Korrelation zu Grunde, aus der sich die Regressionsgleichung (3.2) mit  $R^2 = 0,933$  ergab.

Für die Gruppen II und III wurden keine Abhängigkeiten des Schlagvolumens von der S100A1-Expression beobachtet.

$$(3.2) \quad SV [ml] = f_{(S100A1)} = 0,142 \times S100A1[\%] + 6,61 \quad (R^2 = 0,933)$$

**Abbildung 3.9**

Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit der relativen S100A1-Konzentration innerhalb der Gruppe I.

**Abbildung 3.10**

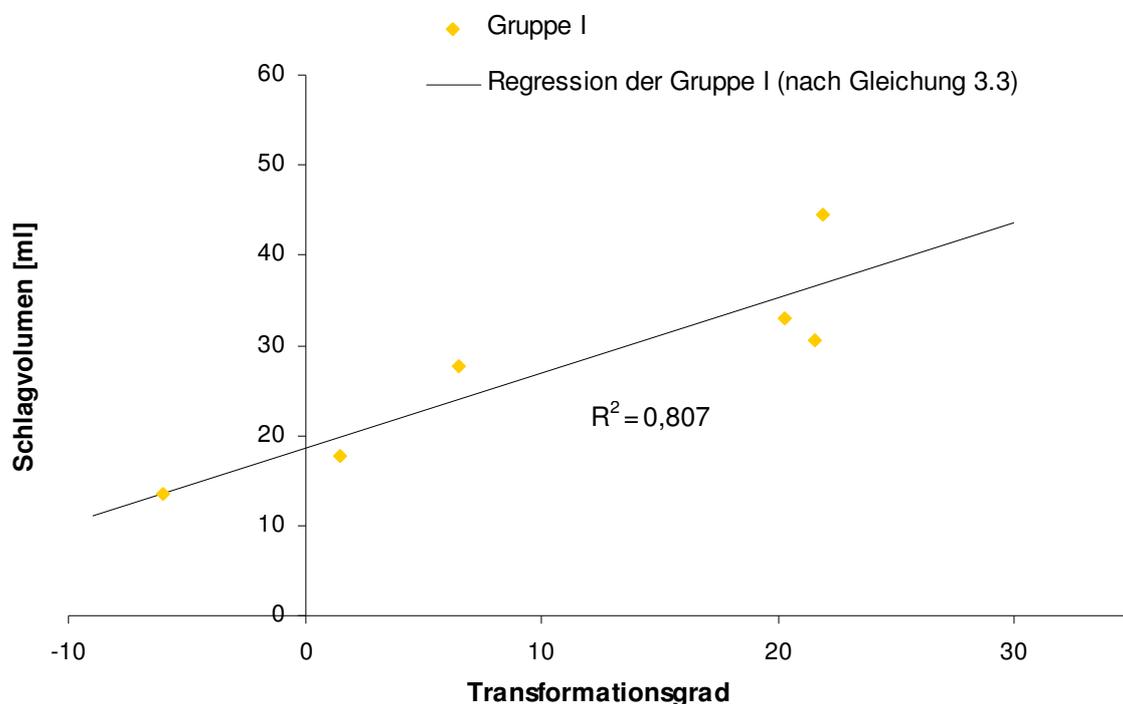
Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit der relativen S100A1-Konzentration aller drei Gruppen. Gruppe I zeigt eine lineare Korrelation. Innerhalb der Gruppen II und III zeigt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen relativer S100A1-Konzentration und Schlagvolumen.

### 3.9. Schlagvolumen und Transformationsgrad der Skelettmuskelventrikel

Um die Auswirkung der durch elektrisches Training veränderten MHC-Komposition der LDM auf die Entwicklung des Schlagvolumens zu untersuchen, stellten wir das Schlagvolumen jedes Versuchstieres in Abhängigkeit des Transformationsgrades dar (Abbildung 3.11 und 3.12).

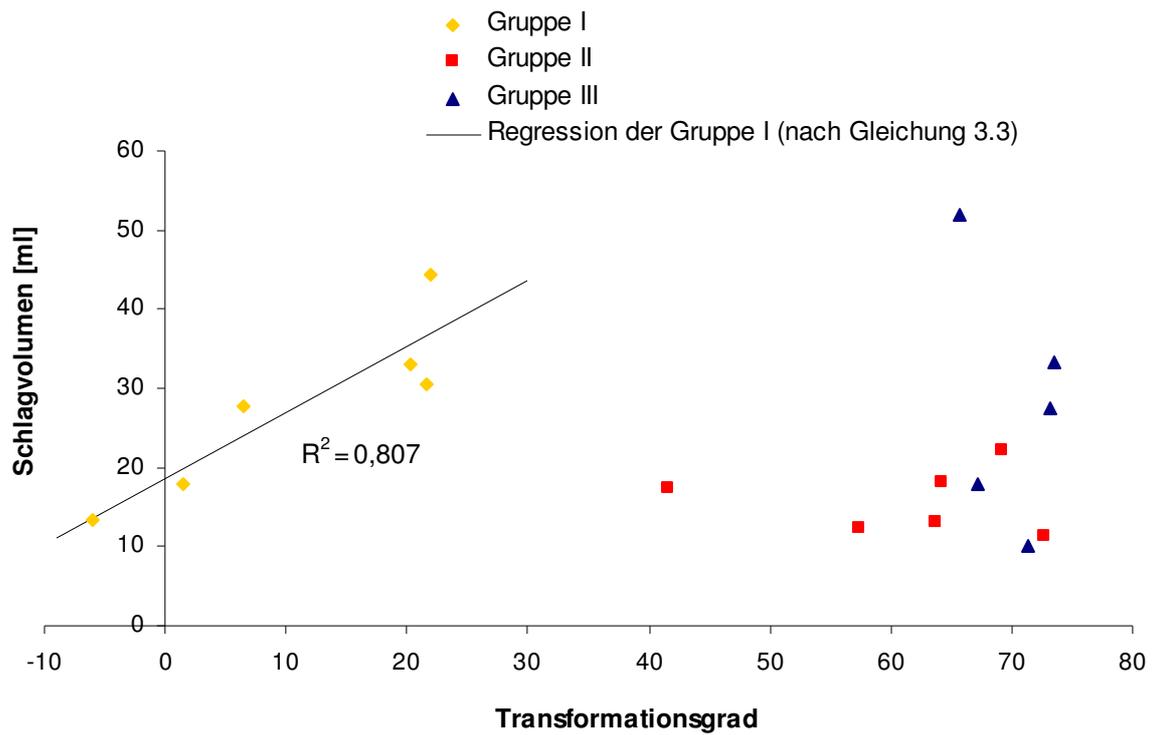
Wiederum war nur in Gruppe I eine eindeutige Abhängigkeit erkennbar. Das Schlagvolumen stieg mit zunehmendem Transformationsgrad an. Wir unterstellten eine lineare Korrelation, aus der sich die Gleichung (3.3) mit  $R^2=0,807$  ergab. Das Versuchstier Heino aus der Gruppe I folgte trotz eines negativen Transformationsgrades des LDM auch hier dem Trend der Regression. Es wurden keine eindeutigen Abhängigkeiten zwischen Schlagvolumen und Transformationsgrad in den Gruppen II und III festgestellt.

$$(3.3) \quad SV [ml] = f_{(TG)} = 0,833 \times TG + 18,65 \quad (R^2 = 0,807)$$



**Abbildung 3.11**

Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit des Transformationsgrades innerhalb der Gruppe I.



**Abbildung 3.12**

Darstellung des Schlagvolumens in Abhängigkeit des Transformationsgrades. Für Gruppe I ergibt sich eine lineare Korrelation. Für die Gruppen II und III kann kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden.

## 4. Diskussion

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass durch elektrische Skelettmuskelstimulation die S100A1-Expression dieser Muskeln gesteigert werden kann. Die relative S100A1-Konzentration korrelierte dabei linear mit dem elektrisch induzierten Transformationsgrad (Definition Kapitel 2.5.) der Muskeln. In der Gruppe der mit dem Protokoll *Stim50* stimulierten Tiere zeigte sich das entwickelte Schlagvolumen der *Frösche* als lineare Funktion der relativen S100A1-Konzentration. In dieser Gruppe konnte weiterhin ein direkter linearer Zusammenhang von Transformationsgrad und Schlagvolumen nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen lassen sich Erkenntnisse für die Anwendung des BMH am Menschen ableiten.

### 4.1. Tiermodell

In früheren Untersuchungen zum dynamischen Training von Skelettmuskelventrikeln sind Kälber als Versuchstiere zum Einsatz gekommen [61]. Da Kälber im Wachstum befindlich sind, können die gewonnenen Ergebnisse nicht auf Organismen mit ausgewachsener Muskulatur übertragen werden [33, 34]. Dieses spielt insofern eine Rolle, als dass muskulöse Herzunterstützungssysteme bei erwachsenen Patienten angewandt werden sollen. Aus folgenden Gründen entschieden wir uns für ausgewachsene Burenziegen.

1. Burenziegen weisen als so genannte Fleischziegen eine besonders stark ausgeprägte Muskulatur auf. Die Masse des LDM beträgt beim Bock etwa 300g. Diese Muskelmasse liegt deutlich über derjenigen der sonstigen Hausziegen.
2. Entsprechend des höheren Körpergewichtes der Burenziegen im Vergleich zur Hausziege weisen sie auch ein größeres Thoraxvolumen auf. Dieses ist von Bedeutung, da der Skelettmuskelventrikel intrathorakal unter Vermeidung einer Irritation des Herzens platziert werden muss.
3. Anhand histologischer und histochemischer Analysen bei verschiedenen Tierarten wie Hund, Schwein und Ziege im Vergleich zur menschlichen Muskulatur, konnten Iannuzzo und Mitarbeiter feststellen, dass der LDM der Ziege der humanen Muskulatur in Bezug auf MHC-Komposition, myofibrilläre ATPase-Aktivität, mitochondriale Enzymaktivität sowie Gehalt an 72-kD-Heat-Shock-Protein am ähnlichsten ist [35, 72].
4. Aufgrund von Größe und Gewicht von Burenziegen (50-100Kg) ist eine Übertragbarkeit bezüglich der Größe der Skelettmuskelventrikel vom Tiermodell auf den erwachsenen Menschen möglich.

5. Da während des Langzeitversuches Messungen am über 20-30 Minuten stillstehenden Tier erforderlich waren, eignen sich die vom Temperament eher ruhigen Ziegen besser als beispielsweise Hunde, Schweine und Schafe.

## 4.2. Gruppeneinteilung

Für die vorliegende Arbeit wurden 17 Ziegen retrospektiv in drei Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Medikation und des elektrischen Stimulationsprotokolls. Zwei Gruppen wurden mit Clenbuterol, eine weitere mit Clenbuterol und Triiodthyronin ( $T_3$ ) behandelt. Für die elektrische Muskelstimulation kamen die Protokolle *Stim50* in einer Gruppe und *Stim100* in den beiden anderen Gruppen zur Anwendung. Den Gruppen I und II wurden jeweils 6 Tiere, der Gruppe III 5 Tiere zugeteilt.

Das retrospektive Studiendesign der vorliegenden Arbeit rechtfertigen wir mit dem erheblichen Arbeits- und Materialaufwand, der mit chronischen Großtierversuchen verbunden ist.

## 4.3. Trainingsdauer

Als Trainingsdauer zählten die Tage von der Implantation bis zur Explantation des *Frosches*. Das Ende des Trainings und die Explantation des *Frosches* erfolgten, wenn eine Fortführung des Experimentes nicht mehr möglich war. Gründe hierfür waren Leckagen des *Frosches*, Infektionen im Bereich des Schrittmachers und *Frosches* sowie ernstere Erkrankungen der Versuchstiere. Diese Umstände führten zwischen allen drei Gruppen zu einer unterschiedlichen mittleren Trainingsdauer. Lediglich zwischen den Gruppen II und III war dieser Unterschied nicht signifikant.

Für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wäre eine einheitliche Trainingsdauer aller Tiere wünschenswert gewesen. Diese konnte jedoch nicht realisiert werden, da die Evaluation der S100-Proteine, MHC-Komposition und Schlagvolumina nur einen kleinen Teilaspekt der aufwendigen Großtierversuche darstellte.

Ein Störeinfluss durch die unterschiedliche Trainingsdauer kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die kürzeste Trainingsdauer (Vincente, Gruppe I) immerhin knapp zwei Monate beträgt. Wir gehen davon aus, dass nach einem solch langen Zeitraum eine Art *steady state* bezüglich S100A1-Expression, MHC-Komposition und Schlagvolumen erreicht wird. Ein über diesen

Zeitraum fortgeführtes Training wird unseres Erachtens nur noch sehr geringe zusätzliche Effekte aufweisen.

In der Diskussion aller gemessener Parameter wird ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Trainingsdauer jedoch berücksichtigt.

#### **4.4. Myosin-Heavy-Chain-Komposition der Skelettmuskelventrikel**

Skelettmuskeln setzen sich in unterschiedlichem Ausmaß aus weißen, schnell kontrahierenden und roten, langsam kontrahierenden Muskelfasern zusammen [80]. Zwischen diesen Fasern bestehen neben den Stoffwechseleigenschaften auch Unterschiede bezüglich der Expression verschiedener Isoformen der schweren Myosinketten [57, 160]. Aus den Proben des LDM erfolgte, wie von Weeds und Taylor 1969 und 1975 beschrieben, eine biochemische Präparation der MHC [108, 198]. Die Isoformen Typ-I und Typ-II der schweren Myosinketten zeigten aufgrund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten während der Gelelektrophorese deutlich voneinander getrennte Banden. Die unterschiedlichen MHC-Typ-II-Isoformen (IIb, IIx und IIa) konnten dabei nicht voneinander unterschieden werden. Die Intensität der Typ-I- und der Typ-II-Bande zusammen wurde als 100% definiert und der Anteil der einzelnen Bande als Prozentwert angegeben.

##### **4.4.1. Vor dem Training**

Die prospektive MHC-Komposition des LDM zeigte mit den Ergebnissen von Ianzzo vergleichbare Werte [72]. Erwartungsgemäß bestanden zwischen allen drei Gruppen vor dem Training keine signifikanten Unterschiede. Eine Beeinflussung des resultierenden Schlagvolumens und der S100A1-Expression durch präexistente Gruppenunterschiede hinsichtlich der MHC-Zusammensetzung konnten somit ausgeschlossen werden.

##### **4.4.2. Nach dem Training**

Mit Ausnahme von Heino (Gruppe I) wiesen alle Tiere nach dem Training einen höheren relativen Anteil an MHC-Typ-I auf als vor dem Training. Für die Abnahme des Typ-I-Anteils bei Heino können zwei wesentliche Gründe verantwortlich sein. Zum einen könnte ein Fehler bei der Bestimmung der MHC-Komposition der prospektiven und/oder trainierten Muskelproben vorgelegen haben, zum anderen wäre es möglich, dass durch die elektrische Stimulation tatsächlich eine Rücktransformation in Richtung eines Typ-II-Muskels stattgefunden hat.

In allen trainierten LDM der Gruppen II und III (außer bei Hanna) fiel der MHC-Typ-II-Anteil unter die Nachweisgrenze. In diesen Gruppen wurde die Bildung reiner Typ-I-Muskeln induziert. Die MHC-Zusammensetzung der trainierten LDM der Gruppen II und III war im Vergleich zu den prospektiven Ergebnissen signifikant unterschiedlich.

Die trainierten LDM der Ziegen aus Gruppe I zeigten eine unvollständige Transformation, die im Vergleich zu den prospektiven Ergebnissen nicht signifikant war. Zwar stieg auch in dieser Gruppe der relative MHC-Typ-I-Anteil an, jedoch zeigte sich diese Änderung im Vergleich zu den Gruppen II und III als wesentlich geringer. Wir vermuten, dass der trotz des Trainings verbliebene MHC-Typ-II-Anteil in Gruppe I größtenteils aus MHC-Typ-IIa besteht. Zwar konnten wir die unterschiedlichen MHC-II-Isoformen mit unseren Methoden nicht unterscheiden, doch legen Arbeiten von Lopez-Guajardo und Aigner diese Vermutung nahe. Aigner entdeckte, dass es eine zeitliche Reihenfolge der durch elektrische Stimulation induzierten MHC-Transformation gibt [7]. Dabei wandeln sich die Isoformen IIb und IIx zuerst um. Die Isoform IIa transformiert sich chronologisch zuletzt.

Lopez-Guajardo wies durch bestimmte, dem Stimulationsprotokoll *Stim50* ähnliche, elektrische Stimulationsmuster eine Induktion der Expression von MHC-IIa-Isoformen auf Kosten der Typ-IIx/IIb-Isoformen nach [106].

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Trainingsdauer zwischen den Gruppen fällt auf, dass in der signifikant am kürzesten trainierten Gruppe (Gruppe I) die MHC-Zusammensetzung durch das Training am wenigsten beeinflusst wurde, wohingegen in den wesentlich länger trainierten Gruppen (Gruppen II und III) dieser trainingsbedingte Unterschied wesentlich höher ausfiel. Dadurch stellt sich die Frage, ob die beobachteten, trainingsbedingten Änderungen der MHC-Komposition durch das gewählte Stimulationsmuster oder lediglich durch die Trainingsdauer erklärt werden können.

Wir gehen davon aus, dass die trainierten MHC-Kompositionen vom jeweils gewählten Stimulationsprotokoll *Stim50* oder *Stim100* abhängig sind. Zwar konnte gezeigt werden, dass die elektrisch induzierte Muskelfasertransformation von der Stimulationsdauer abhängig ist [115], jedoch konnte unter elektrischer Stimulation von Kaninchenmuskulatur mit einem dem Stimulationsprotokoll *Stim100* ähnlichen Muster eine vollständige MHC-Typ-I-Induktion bereits nach 42 Tagen nachgewiesen werden [105]. Die mittlere Trainingsdauer der Gruppe I lag jedoch deutlich über 42 Tagen. Eine Beeinflussung der trainierten MHC-Komposition durch die unterschiedliche Trainingsdauer ist daher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist hingegen, dass die verschiedenen Stimulationsprotokolle *Stim50* und *Stim100* für die unterschiedlichen MHC-Kompositionen der Gruppen nach dem Training verantwortlich waren. Dieses würde den Ergebnissen von Lopez-Guajardo entsprechen, die mit unterschiedlichen Stimulationsprotokollen bei gleicher Trainingsdauer verschiedene MHC-Kompositionen induzieren konnte [105, 106].

#### **4.5. Trainingsinduzierte S100A1-Expression der Skelettmuskelventrikel**

Die Analysen der S100A1-Expression erfolgten semiquantitativ nach einem Protokoll von Ehlermann [44]. Zu den Vorteilen gegenüber der quantitativen Bestimmung von S100A1 zählt die relativ einfache Durchführbarkeit bei geringem Kosten- und Materialaufwand. Der Nachteil semiquantitativer Analysen liegt in einer eingeschränkten Vergleichbarkeit gewonnener Ergebnisse. Für die vorliegende Arbeit bedeutet dieses, dass wir zwar die Entwicklung der S100A1-Expression jedes Tieres beschreiben können, nicht jedoch die Ausgangssituation vor dem Training zwischen allen Gruppen bzw. Tieren. Wir müssen daher voraussetzen, dass die absolute S100A1-Konzentration aller Tiere bzw. aller Gruppen vor dem Training ähnlich ist und keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die absolute S100A1-Konzentration in „langsamen“ Muskeln um ein Vielfaches höher ist als in Muskeln, die vorwiegend aus „schnellen“ Fasern bestehen [66, 112, 205]. In diesen Studien wurden bei Ratten und Mäusen Muskeln, die physiologischerweise „langsam“ sind (z.B. M. soleus), mit Muskeln des gleichen Tieres verglichen, die physiologischerweise einen vorwiegend „schnellen“ Fasertyp aufweisen (z.B. M. rectus femoris). Unsere Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass diese Unterschiede der S100A1-Konzentrationen in Abhängigkeit des Muskeltyps auch innerhalb desselben Muskels bestehen können, wenn dieser als „schneller“ Muskel durch elektrische Stimulation in einen „langsamen“ Typ-I-Muskel transformiert wird. Dieses Prinzip passt zu den Erkenntnissen von Salmons, der zeigen konnte, dass ein Skelettmuskel, der durch elektrische Stimulation zu einem „langsamen“ Muskel transformiert wurde, sich in vielen Eigenschaften nicht von einem „von Natur aus“ „langsamen“ Muskel unterscheidet [169]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass zu diesen Eigenschaften ebenfalls die S100A1-Konzentration des Skelettmuskels gehört.

Die Gruppe I wies aufgrund ihrer unvollständigen Transformation in einen Typ-I-Muskel einen wesentlich geringeren Anstieg der S100A1-Expression auf als die vollständig zu Typ-I-Muskeln umgewandelten Gruppen II und III.

Der hochsignifikante Unterschied der relativen S100A1-Konzentration zwischen den Gruppen II und III kann nicht durch die Faserzusammensetzung erklärt werden, da beide Gruppen eine vollständige Transformation zeigen. Der Unterschied ist weiterhin nicht auf die Differenz der durchschnittlichen Trainingsdauer zurückzuführen, da sich diese nicht signifikant unterscheiden. Neben der relativ geringen Fallzahl könnte die unterschiedliche Medikation der Gruppen eine Erklärung bieten. Die zusätzliche Gabe von Triiodthyronin in der Gruppe III wäre somit für die hochsignifikante Differenz in der S100A1-Expression zwischen den Gruppen II und III verantwortlich. Zwar konnte gezeigt werden, dass Triiodthyronin den Calciumstoffwechsel der Skelettmuskulatur beeinflussen kann [48], jedoch wurde dabei kein Zusammenhang mit S100-Proteinen belegt.

#### 4.5.1. S100A1-Expression und Transformationsgrad

Um eine bessere Auflösung des Zusammenhangs zwischen S100A1-Expression und MHC-Komposition erreichen zu können, setzten wir die Ergebnisse der einzelnen Tiere miteinander in Relation (Kapitel 3.7.). Da die S100A1-Expression semiquantitativ bestimmt wurde und sich somit aus dem Vergleich von prospektiver und trainierter Probe ergab, verglichen wir diese mit der Differenz der MHC-Komposition aus prospektiver und trainierter Probe. Zu diesem Zweck definierten wir den Begriff des Transformationsgrades (Kapitel 2.5.3.).

Die Gruppen I und II zeigten zwischen beiden Parametern einen Zusammenhang. Mit steigendem Transformationsgrad erhöhte sich die relative S100A1-Konzentration. In Gruppe III war ein solcher Zusammenhang nicht erkennbar. Ein fehlender Zusammenhang von Transformationsgrad und S100A1-Expression konnte in Gruppe III aufgrund der geringen Spannweite des Transformationsgrades dennoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Abhängigkeit der S100A1-Expression vom Transformationsgrad kann in den Gruppen I und II mit guter Näherung durch eine lineare Regression beschrieben werden. Die Rechtfertigung einer gemeinsamen Regression der Gruppen I und II sehen wir darin, dass die Gruppen medikamentös gleich behandelt wurden und die sich unterscheidenden Stimulationsmuster der Gruppen I und II die unterschiedlichen Transformationsgrade bedingen. Auffällig ist, dass die Tiere der Gruppe III dem Trend der Regression aus Gruppe I und II folgten. Wir halten es daher für wahrscheinlich, dass auch in dieser Gruppe ein linearer Zusammenhang von Transformationsgrad und S100A1-Expression besteht, der aber aufgrund der geringen Spannweite des Transformationsgrades in Gruppe III nicht sichtbar wurde.

Heino aus der Gruppe I zeigte trotz eines unerwartet negativen Transformationsgrades eine Expression von S100A1, die dem Trend der linearen Regression folgt (*Abbildung 3.7* und *3.8*). Dieses stützt die Theorie, dass der LDM von Heino durch die elektrische Stimulation tatsächlich rücktransformiert wurde und kein Fehler bei der MHC-Bestimmung vorlag.

#### 4.6. Schlagvolumina der Skelettmuskelventrikel

Die Messung des Schlagvolumens der Skelettmuskelventrikel erfolgte über die Aufzeichnung der Ruhedehnungskurve sowie über die Registrierung des Kontraktionsdrucks. Um die jeweils am Trainingsende entnommenen Muskelproben hinsichtlich der MHC-Komposition sowie der S100A1-Expression mit dem Schlagvolumen vergleichen zu können, erfolgte die Ermittlung des Schlagvolumens ebenfalls am Trainingsende. Wicht dabei das zuletzt gemessene Schlagvolumen aufgrund der das Trainingsende bedingenden Umstände (z. B. Leckagen *des Frosches*) maßgeblich vom in der Woche zuvor gemessenen Schlagvolumen ab, so sahen wir letztgenanntes Schlagvolumen als verbindlich an.

Aufgrund der hohen Standardabweichung der Gruppe III erwiesen sich die Schlagvolumina lediglich zwischen den Gruppen I und II als signifikant unterschiedlich. Gründe für diesen signifikanten Unterschied können weder die Stimulationsmuster bzw. die MHC-Komposition noch die unterschiedliche Trainingsdauer zwischen diesen Gruppen liefern. Zwar unterscheiden sich die Gruppen I und II hinsichtlich des Stimulationsprotokolls und der MHC-Komposition, jedoch weist Gruppe III das gleiche Stimulationsprotokoll und die gleiche MHC-Komposition wie Gruppe II auf, zeigt jedoch gleichzeitig ein mit Gruppe I vergleichbares Schlagvolumen. Ebenso kann die Trainingsdauer keine Erklärung der signifikanten Schlagvolumendifferenz der Gruppen I und II bieten, da die Gruppen I und III trotz hoher Unterschiede der Trainingsdauer ein ähnliches Schlagvolumen aufweisen.

Wider Erwarten der Erkenntnisse von Most et al., der eine S100A1-dosisabhängige Steigerung der Kontraktionskraft des Skelettmuskels nachweisen konnten [132], zeigten die Gruppen II und III trotz einer hohen Steigerung der S100A1-Expression geringe Schlagvolumina im Vergleich zur Gruppe I. Neben der Induktion der Expression von S100A1 hat die elektrische Stimulation nach dem Protokoll *Stim100* also mindestens einen weiteren Effekt auf den LDM, der dem durch S100A1 vermittelten Potential zur Kraftsteigerung [132] entgegenwirken muss.

##### 4.6.1. Schlagvolumina und S100A1-Expression

Um die entwickelten Schlagvolumina hinsichtlich der S100A1-Expression besser beschreiben zu können, entschlossen wir uns, neben der gruppenspezifischen Auswertung die Ergebnisse der einzelnen Tiere miteinander in Relation zu setzen (Kapitel 3.8.). Bei dieser Auswertung zeigte sich innerhalb der Gruppe I eine mit den Ergebnissen von Most [132] im Einklang stehende Erhöhung des Schlagvolumens in Abhängigkeit der relativen S100A1-Konzentration. Diese Abhängigkeit ließ sich in den von uns

beobachteten Grenzen mit guter Näherung durch eine lineare Regression beschreiben. Für die Gruppen II und III zeigte sich kein eindeutiger Zusammenhang von Schlagvolumen und S100A1-Expression. In Gruppe II kann ein solcher Zusammenhang allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Spannweite der S100A1-Expression dieser Gruppe relativ gering war. Innerhalb der Gruppe III kann hingegen ein Zusammenhang von Schlagvolumen und S100A1-Expression mit höherer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da diese Gruppe zwar ebenfalls eine sehr geringe Spannweite der S100A1-Expression aufweist, diese jedoch mit einer erheblichen Variation des Schlagvolumens einhergeht.

Aufgrund des Zusammenhangs von S100A1-Expression und entwickeltem Schlagvolumen in der Gruppe I unter Annahme eines Fehlens dieses Zusammenhangs in den Gruppen II und III muss der bereits oben geforderte weitere Effekt der elektrischen Stimulation, der dem durch S100A1 vermittelten Potential zur Kraftsteigerung entgegenwirkt, bei dem Stimulationsprotokoll *Stim100* vorhanden sein, beim Protokoll *Stim50* jedoch fehlen.

Ein solcher subversiver Effekt könnte die Reduktion der Muskelmasse sein. Salmons konnte zeigen, dass diese bei einem dem *Stim100* ähnlichen elektrischen Stimulationsprotokoll bis zu 50% betragen kann [168]. Gleichzeitig konnte er bei intermittierenden, dem Protokoll *Stim50* ähnlichen Stimulationen einen Erhalt der Muskelmasse nachweisen [106]. Die Reduktion der Muskelmasse könnte also einer der kritischen Faktoren sein, die die S100A1-vermittelte Steigerung der Kontraktionskraft limitiert. Ein Muskel könnte folglich dann optimal auf seinen Einsatz für das BMH vorbereitet werden, wenn die elektrische Stimulation in einem Bereich erfolgt, der einerseits zu einer hohen Expression von S100A1 führt, andererseits jedoch keine wesentliche Reduktion der Muskelmasse zur Folge hat.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied der Stimulationsprotokolle ist die präoperative Stimulation. Das Stimulationsprotokoll *Stim50* beinhaltet eine Konditionierung des LDM. Diese bereitet den Skelettmuskel wie bereits unter Kapitel 2.5.1. beschrieben auf eine erhöhte Arbeitsbelastung vor. Absolute Ischämien unter elektrischer Stimulation, die zu Nekrosen führen, können somit verhindert werden. Dem Stimulationsprotokoll *Stim100* fehlt diese Konditionierung. Möglicherweise ist daher eine Destruktion des LDM unter Stimulation anzunehmen. Diese Überlegung ist eine weitere Erklärung für die niedrigen Schlagvolumina trotz hoher relativer S100A1-Konzentration der Gruppen II und III.

#### 4.6.2. Schlagvolumina und Transformationsgrad

Da wir eine lineare Beziehung zwischen dem Transformationsgrad und der Expression von S100A1 sowie innerhalb der Gruppe I eine lineare Beziehung zwischen Schlagvolumen und S100A1-Expression nachweisen konnten, untersuchten wir weiterhin, inwieweit eine direkte lineare Beziehung zwischen Transformationsgrad und entwickeltem Schlagvolumen innerhalb der Gruppe I besteht (Kapitel 3.9.). Hierbei konnten wir die Beziehung zwischen beiden Parametern innerhalb der Gruppe I durch eine lineare Regression beschreiben. Dieser Zusammenhang von Transformationsgrad und Schlagvolumen ist für die Entwicklung von BMH von besonderer Bedeutung, da er impliziert, dass ein möglichst großes Schlagvolumen dann erreicht wird, wenn die prospektive MHC-Komposition der Muskulatur einen möglichst geringen Typ-I-Anteil aufweist.

#### 4.7. Ausblick

Unsere Arbeit konnte zeigen, dass unter der Voraussetzung einer Clenbuterolmedikation sowie unter Anwendung des Stimulationsprotokolls *Stim50* das Schlagvolumen eines Skelettmuskelventrikels linear mit dem Transformationsgrad zunimmt. Um ein möglichst hohes Schlagvolumen zu erreichen, muss daher ein großer Transformationsgrad angestrebt werden. Dieser ergibt sich nach Gleichung (2.1) (Kapitel 2.5.3.) dann, wenn (i) der prozentuale Anteil an MHC-Typ-I vor dem Training niedrig und (ii) nach dem Training hoch ist. Da der MHC-Typ-I-Anteil nach dem Training bereits maßgeblich durch das Stimulationsprotokoll *Stim50* festgelegt ist, ergibt sich ein hoher Transformationsgrad allein dann, wenn der prospektive MHC-Typ-I-Anteil möglichst gering ist.

Für die Anwendung des BMH am Menschen bedeutet dieses, dass vor der geplanten Implantation für den Patienten eine Einschätzung der Effektivität des Skelettmuskelventrikels getroffen werden kann. Durch eine Biopsie des LDM ließe sich der MHC-Typ-I-Anteil des Muskels bestimmen und so eine Effektivitätsabschätzung des geplanten BMH vornehmen. Hierdurch könnte ein Patientengut definiert werden, welches in besonderer Weise von der Implantation eines BMH profitieren würde.

Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass der LDM vom Menschen mit  $43 \pm 5\%$  über einen physiologischerweise höheren prospektiven MHC-Typ-I-Anteil verfügt als der von Ziegen [72]. Die Anwendung des Stimulationsprotokolls *Stim50* am Menschen würde somit vermutlich zu einem geringen Transformationsgrad und folglich zu einem geringen Anstieg des Schlagvolumens führen.

Gegenstand weiterer Forschungen muss daher sein, inwieweit das Stimulationsprotokoll *Stim50* intensiviert werden darf, ohne die Korrelation von Schlagvolumen und S100A1-

Expression bzw. von Schlagvolumen und Transformationsgrad aufzuheben, wie dieses beim Protokoll *Stim100* der Fall ist.

Unsere Beobachtung der S100A1-konzentrationsabhängigen Steigerung des Schlagvolumens weist eine Bedeutung der S100A1-Gentherapie möglicherweise auch im Zusammenhang mit dem BMH auf. Die S100A1-Gentherapie, deren Möglichkeiten bisher vorwiegend am tierischen Myokard oder an *engineered heart tissues* untersucht wurden, zeigt in diesen Bereichen ein beachtliches Potential [155, 164]. Eventuell könnte ein in ähnlicher Weise gentherapeutisch behandelter LDM die Pumpleistung von BMH steigern.

## 5. Zusammenfassung

### Hintergrund

Das Protein S100A1 wurde als wichtiger Regulator zahlreicher Vorgänge im Bereich der elektromechanischen Kopplung von Muskelzellen identifiziert. Für Skelettmuskulatur konnte eine S100A1-abhängige Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft nachgewiesen werden. Zudem ist S100A1 in der Lage, die Inotropie des Herzens zu steigern sowie infarziertes Myokard vor der Ausbildung einer Herzinsuffizienz partiell zu schützen.

Aufgrund dieser muskulären Kraftsteigerung durch S100A1 könnte das Protein eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung Biomechanischer Herzen (BMH) einnehmen. Diese Arbeit soll die Expression von S100A1 in der Muskulatur unterschiedlich elektrisch stimulierter Skelettmuskelventrikel (SMV) untersuchen. Außerdem soll geklärt werden, inwieweit S100A1 das Schlagvolumen der SMV beeinflussen kann.

### Material und Methoden

Wir entwickelten ein elastisches Trainingsgerät, welches für das Muskeltraining die Situation eines in den Kreislauf integrierten BMH simulieren konnte und dabei die Bestimmung des Schlagvolumens zuließ. Die Wahl des Tiermodells fiel auf Burenziegen. Retrospektiv wurden 17 Ziegen in drei Gruppen eingeteilt, die sich hinsichtlich elektrischer Muskelstimulation und Medikation unterschieden. Jeder Ziege wurde jeweils ein elastisches Trainingsgerät implantiert. Vor Beginn sowie nach Ende des Muskeltrainings entnahmen wir Proben aus dem trainierten Abschnitt des M. latissimus dorsi (LDM), die hinsichtlich S100A1-Expression und Myosin-Heavy-Chain-Komposition (MHC) analysiert wurden. Am Trainingsende wurde das Schlagvolumen jedes Skelettmuskelventrikels bestimmt.

### Ergebnisse

1. Die relative S100A1-Konzentration in den Proben des trainierten LDM stieg unabhängig vom gewählten Stimulationsmuster und der Begleitmedikation (Clenbuterol/Thyroxin) bei allen Tieren an.
2. In den Gruppen der lediglich mit Clenbuterol behandelten Tiere erwies sich die relative S100A1-Konzentration als lineare Funktion des Transformationsgrades ( $R^2 = 0,969$ ).
3. Das Schlagvolumen der Gruppe der teiltransformierten Tiere (50% MHC-Typ-I, 50% MHC-Typ-II) zeigte sich als lineare Funktion der relativen S100A1-Konzentration ( $R^2 = 0,933$ ).

4. Das Schlagvolumen der Gruppe der teiltransformierten Tiere (50% MHC-Typ-I, 50% MHC-Typ-II) zeigte sich weiterhin als lineare Funktion des Transformationsgrades ( $R^2 = 0,807$ ).

### **Schlussfolgerung**

Die elektrische Stimulation von Skelettmuskelventrikeln steigert im LDM in Abhängigkeit der MHC-Transformation die relative S100A1-Konzentration. Unter Anwendung eines Stimulationsmusters, dass zu einer Teiltransformation der MHC-Isoformen führt (50% Typ-I, 50% Typ-II), erhöht sich das Schlagvolumen der SMV proportional zur relativen S100A1-Konzentration.

Für die Klinik bedeuten diese Ergebnisse, dass durch die Analyse von MHC-Kompositionen aus Muskelbiopsien ein Patientengut definiert werden kann, bei dem der Einsatz eines BMH mit hoher Wahrscheinlichkeit besonders effektiv ist.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
BMH	Biomechanisches Herz
bpm	Bursts pro Minute
CCM	kardiale Kontraktilitätsmodulation
CRT	kardiale Synchronisationstherapie
EC	elektromechanische Kopplung
IABP	Intraaortale Ballonpumpe
KHK	koronare Herzkrankheit
LDM	Musculus latissimus dorsi
LLC	L-Typ-Calcium-Kanal
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MHC	Myosin-Heavy-Chain
MHCI	Myosin-Heavy-Chain Isoform I
MHCII	Myosin-Heavy-Chain Isoform II
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NYHA	New York Heart Association
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
PLB	Phospholamban
PaC	Port-A-Cath, Portkatheter
rpm	Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodinrezeptor
SD	Standardabweichung
SERCA	Sarko(endo)plasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase
SM	(Muskel-) Schrittmacher
SMV	Skelettmuskelventrikel
SV	Schlagvolumen
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TG	Transformationsgrad (Definition Kapitel 2.5.3.)

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, Delurgio DB, Leon AR, Loh E, Kocovic DZ, Packer M, Clavell AL, Hayes DL, Ellestad M, Trupp RJ, Underwood J, Pickering F, Truex C, McAtee P, Messenger J. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2002;346(24):1845-1853.
2. Acker M, Anderson WA, Hammond RL, DiMeo F, Jr., McCullum J, Staum M, Velchik M, Brown WE, Gale D, Salmons S, et al. Oxygen consumption of chronically stimulated skeletal muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94(5):702-709.
3. Acker MA, Anderson WA, Hammond RL, Chin AJ, Buchanan JW, Morse CC, Kelly AM, Stephenson LW. Skeletal muscle ventricles in circulation. One to eleven weeks' experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94(2):163-174.
4. Acker MA, Hammond RL, Mannion JD, Salmons S, Stephenson LW. An autologous biologic pump motor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;92(4):733-746.
5. Acker MA, Hammond RL, Mannion JD, Salmons S, Stephenson LW. Skeletal muscle as the potential power source for a cardiovascular pump: assessment in vivo. *Science.* 1987;236(4799):324-327.
6. Adhikari BB, Wang K. S100A1 modulates skeletal muscle contraction by desensitizing calcium activation of isometric tension, stiffness and ATPase. *FEBS Lett.* 2001;497(2-3):95-98.
7. Aigner S, Pette D. Fast-to-slow transition in myosin heavy chain expression of rabbit muscle fibres induced by chronic low-frequency stimulation. *Symp Soc Exp Biol.* 1992;46:311-317.
8. Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science.* 1988;239(4845):1311-1313.
9. Amir O, Bracey AW, Smart FW, Delgado RM, 3rd, Shah N, Kar B. A successful anticoagulation protocol for the first HeartMate II implantation in the United States. *Tex Heart Inst J.* 2005;32(3):399-401.

10. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1222-1232.
11. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009-3017.
12. Auricchio A, Stellbrink C, Sack S, Block M, Vogt J, Bakker P, Huth C, Schondube F, Wolfhard U, Bocker D, Krahnfeld O, Kirkels H. Long-term clinical effect of hemodynamically optimized cardiac resynchronization therapy in patients with heart failure and ventricular conduction delay. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(12):2026-2033.
13. Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol.* 2001;90(1):345-357.
14. Barron DJ, Etherington PJ, Winlove CP, Jarvis JC, Salmons S, Pepper JR. Combination of preconditioning and delayed flap elevation: evidence for improved perfusion and oxygenation of the latissimus dorsi muscle for cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(3):852-861.
15. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation.* 2005;112(9 Suppl):1178-183.
16. Beck CS. The Development of a New Blood Supply to the Heart by Operation. *Ann Surg.* 1935;102(5):801-813.
17. Bernotat J. Beeinflussung der sarkoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Aktivität im Herz- und Skelettmuskel durch das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein S100A1. *Med. Diss. Lübeck.* 2004.

18. Billeter R, Heizmann CW, Howald H, Jenny E. Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur J Biochem.* 1981;116(2):389-395.
19. Bissessor N, White H. Valsartan in the treatment of heart failure or left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(4):425-430.
20. Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ, Aebi U, Schoenenberger CA. Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4365-4373.
21. Borggrefe MM, Lawo T, Butter C, Schmidinger H, Lunati M, Pieske B, Misier AR, Curnis A, Bocker D, Remppis A, Kautzner J, Stuhlinger M, Leclercq C, Taborsky M, Frigerio M, Parides M, Burkhoff D, Hindricks G. Randomized, double blind study of non-excitatory, cardiac contractility modulation electrical impulses for symptomatic heart failure. *Eur Heart J.* 2008;29(8):1019-1028.
22. Brater DC. Benefits and risks of torasemide in congestive heart failure and essential hypertension. *Drug Saf.* 1996;14(2):104-120.
23. Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM, French WJ, Leatherman G, Kantrowitz NE, Orie J, Smucker ML, Marshall G, Kelly P, et al. Dose-response of chronic beta-blocker treatment in heart failure from either idiopathic dilated or ischemic cardiomyopathy. Bucindolol Investigators. *Circulation.* 1994;89(4):1632-1642.
24. Brodersen DE, Etzerodt M, Madsen P, Celis JE, Thogersen HC, Nyborg J, Kjeldgaard M. EF-hands at atomic resolution: the structure of human psoriasin (S100A7) solved by MAD phasing. *Structure.* 1998;6(4):477-489.
25. Buckley MJ, Craver JM, Gold HK, Mundth ED, Daggett WM, Austen WG. Intra-aortic balloon pump assist for cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1973;48(1 Suppl):III90-94.
26. Buckley MJ, Leinbach RC, Kastor JA, Laird JD, Kantrowitz AR, Madras PN, Sanders CA, Austen WG. Hemodynamic evaluation of intra-aortic balloon pumping in man. *Circulation.* 1970;41(5 Suppl):II130-136.

27. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol.* 1960;150:417-439.
28. Butter C, Rastogi S, Minden HH, Meyhofer J, Burkhoff D, Sabbah HN. Cardiac contractility modulation electrical signals improve myocardial gene expression in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(18):1784-1789.
29. Butter C, Wellnhofer E, Schlegl M, Winbeck G, Fleck E, Sabbah HN. Enhanced inotropic state of the failing left ventricle by cardiac contractility modulation electrical signals is not associated with increased myocardial oxygen consumption. *J Card Fail.* 2007;13(2):137-142.
30. Carpentier A, Chachques JC. Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case. *Lancet.* 1985;1(8440):1267.
31. Cazeau S, Leclercq C, Lavergne T, Walker S, Varma C, Linde C, Garrigue S, Kappenberger L, Haywood GA, Santini M, Bailleul C, Daubert JC. Effects of multisite biventricular pacing in patients with heart failure and intraventricular conduction delay. *N Engl J Med.* 2001;344(12):873-880.
32. Cazeau S, Ritter P, Bakdach S, Lazarus A, Limousin M, Henao L, Mundler O, Daubert JC, Mugica J. Four chamber pacing in dilated cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1994;17(11 Pt 2):1974-1979.
33. Chekanov VS, Karakozov P, Rieder M, Zander G. Age related skeletal muscle response to electrical stimulation. *ASAIO J.* 2000;46(4):474-481.
34. Chekanov VS, Tchekanov GV, Rieder MA, Cheng Q, Smith LM, Zander GL, Christensen CW, McConchie S, Jacobs G, Schmidt DH. Skeletal muscle of a growing organism has a greater transformation after electrical stimulation than adult skeletal muscle. *ASAIO J.* 1996;42(5):M630-636.
35. Chiu RC, Kochamba G, Walsh G, Dewar M, Desrosiers C, Dionisopoulos T, Brady P, Ianuzzo CD. Biochemical and functional correlates of myocardium-like transformed skeletal muscle as a power source for cardiac assist devices. *J Card Surg.* 1989;4(2):171-179.
36. CIBIS Investigators and Committees. A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation.* 1994;90(4):1765-1773.

37. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991;325(5):303-310.
38. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J.* 1999;20(6):421-428.
39. De Vivie R, Kettler D, Hellberg K, Klaess G, Kontokollias J, Sonntag H. Prevention of heart failure in dogs during arterial hypoxaemia by means of intra-aortic balloon pumping. *Resuscitation.* 1974;3(4):241-248.
40. Dewar ML, Drinkwater DC, Wittnich C, Chiu RC. Synchronously stimulated skeletal muscle graft for myocardial repair. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984;87(3):325-331.
41. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(2):208-216.
42. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1450(3):191-231.
43. Drohat AC, Amburgey JC, Abildgaard F, Starich MR, Baldisseri D, Weber DJ. Solution structure of rat apo-S100B(beta beta) as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 1996;35(36):11577-11588.
44. Ehlermann P, Redweik U, Blau N, Heizmann CW, Katus HA, Remppis A. Separation of low molecular weight proteins with SDS-PAGE using taurine as a new trailing ion. *Gen Physiol Biophys.* 2001;20(2):203-207.
45. Eichhorn EJ, Heesch CM, Barnett JH, Alvarez LG, Fass SM, Grayburn PA, Hatfield BA, Marcoux LG, Malloy CR. Effect of metoprolol on myocardial function and energetics in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24(5):1310-1320.
46. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late

- revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(8):1712-1721.
47. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, Emmrich F, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Schuler G, Hambrecht R. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res.* 2005;97(8):756-762.
  48. Everts ME, Clausen T. Effects of thyroid hormones on calcium contents and <sup>45</sup>Ca exchange in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1986;251(3 Pt 1):E258-265.
  49. Fano G, Marsili V, Angelella P, Aisa MC, Giambanco I, Donato R. S-100a0 protein stimulates Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Lett.* 1989;255(2):381-384.
  50. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342(15):1077-1084.
  51. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;95(7):742-748.
  52. Frazier OH, Delgado RM, 3rd, Kar B, Patel V, Gregoric ID, Myers TJ. First clinical use of the redesigned HeartMate II left ventricular assist system in the United States: a case report. *Tex Heart Inst J.* 2004;31(2):157-159.
  53. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, Baffour R, Aggarwal A, Weissman NJ, Cerqueira M, Waksman R, Serruys P, Battler A, Moses JW, Leon MB, Epstein SE. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol.* 2006;97(6):823-829.
  54. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA.* 1995;273(18):1450-1456.

55. Gazel A, Rosdy M, Bertino B, Tornier C, Sahuc F, Blumenberg M. A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis. *J Invest Dermatol.* 2006;126(12):2647-2657.
56. Graziotti GH, Rios CM, Rivero JL. Evidence for three fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in the adult llama (*Lama glama*). *J Histochem Cytochem.* 2001;49(8):1033-1044.
57. Greaser ML, Moss RL, Reiser PJ. Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J Physiol.* 1988;406:85-98.
58. Gregg DE. Physiology of the coronary circulation. Introduction to a symposium. *Ohio Med.* 1962;58:1005-1010.
59. Griffith GC, Bates W. A ventricular perforation in transplanting a new blood supply. *New Int Clinics.* 1938;2:17.
60. Guldner NW. Entwicklung eines im Kreislauf trainierbaren Biomechanischen Herzens. *Med. Habil. Schr. Lübeck.* 1997.
61. Guldner NW, Eichstaedt HC, Klapproth P, Tilmans MH, Thuaudet S, Umbrain V, Ruck K, Wyffels E, Bruyland M, Sigmund M, et al. Dynamic training of skeletal muscle ventricles. A method to increase muscular power for cardiac assistance. *Circulation.* 1994;89(3):1032-1040.
62. Guldner NW, Klapproth P, Grossherr M, Stephan M, Rumpel E, Noel R, Sievers HH. Clenbuterol-supported dynamic training of skeletal muscle ventricles against systemic load: a key for powerful circulatory assist? *Circulation.* 2000;101(18):2213-2219.
63. Guldner NW, Siemens HJ, Schramm U, Kraatz E, Thuaudet S, Kuppe H, Sievers HH. First clinical application of the Medos-HIA ventricular support system: monitoring of the thrombotic risk by means of the biomarker prothrombin fragment F1 + 2 and scanning electron microscopy evaluation. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15(3):291-296.
64. Guldner NW, Tilmans MH, DeHaan H, Ruck K, Bressers H, Messmer BJ. Development and training of skeletal muscle ventricles with low preload. *J Card Surg.* 1991;6(1 Suppl):175-183.

65. Haimoto H, Kato K. S100a0 (alpha alpha) protein in cardiac muscle. Isolation from human cardiac muscle and ultrastructural localization. *Eur J Biochem.* 1988;171(1-2):409-415.
66. Haimoto H, Kato K. S100a0 (alpha alpha) protein, a calcium-binding protein, is localized in the slow-twitch muscle fiber. *J Neurochem.* 1987;48(3):917-923.
67. Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25(5):1154-1161.
68. Hezzentrum Bad Oeynhausen. <http://herzzentrum-badoeynhausen.de/de/zentrum/presse/detailansicht.php?id=303>. (Tag des Zugriffs: 10.03.2010).
69. Hoh JKY, Kwan BTS, Dunlop C, Kim BH: *Effects of nerve cross-union and cordotomy on myosin isoenzymes in fast-twitch and slow-twitch muscles of the rat.* In: Pette D: *Plasticity of muscle.* 1. Aufl., 339-352, Walter de Gruyter, Berlin, 1979.
70. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol.* 2005;94(8):488-509.
71. Hudlicka O. What makes blood vessels grow? *J Physiol.* 1991;444:1-24.
72. Ianuzzo CD, Ianuzzo SE, Chalfoun N, Feild M, Locke M, Fernandez J, Chiu RC. Cardiomyoplasty: comparison of latissimus dorsi muscles of three large mammals with that of human. *J Card Surg.* 1996;11(1):30-36.
73. Impulse Dynamics. Optimizer III System Ärztehandbuch. 2009.
74. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation.* 2005;112(9 Suppl):I73-80.
75. Ishihara M, Sato H, Tateishi H, Uchida T, Dote K. Intraaortic balloon pumping as the postangioplasty strategy in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1991;122(2):385-389.

76. Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem.* 1978;89(2):379-388.
77. Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. *Eur J Biochem.* 1981;116(1):79-86.
78. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science.* 1951;113(2940):510-511.
79. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9505):113-121.
80. Jewell PA, Zaimis EJ. A differentiation between red and white muscle in the cat based on responses to neuromuscular blocking agents. *J Physiol.* 1954;124(3):417-428.
81. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet.* 2004;363(9411):751-756.
82. Kannel WB, Belanger AJ. Epidemiology of heart failure. *Am Heart J.* 1991;121 (3 Pt 1):951-957.
83. Kantrowitz A. Origins of intraaortic balloon pumping. *Ann Thorac Surg.* 1990;50(4):672-674.
84. Kantrowitz A, Mc Kinnon WM. The experimental use of the diaphragm as an auxiliary myocardium. *Surg Forum.* 1958;9:266-268.
85. Kantrowitz A, Tjonneland S, Freed PS, Phillips SJ, Butner AN, Sherman JL, Jr. Initial clinical experience with intraaortic balloon pumping in cardiogenic shock. *JAMA.* 1968;203(2):113-118.

86. Kantrowitz A, Tjonneland S, Freed PS, Phillips SJ, Butner AN, Sherman JL, Jr. Intraaortic balloon pumping. *JAMA*. 1968;203(11):988.
87. Kato K, Kimura S. S100a0 (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta*. 1985;842(2-3):146-150.
88. Kerkhoff C, Klempt M, Kaefer V, Sorg C. The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem*. 1999;274(46):32672-32679.
89. Kettlewell S, Most P, Currie S, Koch WJ, Smith GL. S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(6):900-910.
90. Kiewitz R, Acklin C, Schafer BW, Maco B, Uhrig B, Wuytack F, Erne P, Heizmann CW. Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(2):550-557.
91. Kim YS, Sainz RD. Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci*. 1992;50(6):397-407.
92. Klapproth P, Guldner NW, Sievers HH. Stroke volume validation and energy evaluation for the dynamic training of skeletal muscle ventricles. *Int J Artif Organs*. 1997;20(10):580-588.
93. Klempien I. Analyse schwerer Myosinketten dynamisch trainierter Skelettmuskelventrikel mit unterschiedlicher Pumpleistung. *Med. Diss. Lübeck*. 2001.
94. Knepel W: *Schilddrüsenthapeutika*. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl., 715, Urban & Fischer, München, 2005.
95. Kraus WE, Torgan CE, Taylor DA. Skeletal muscle adaptation to chronic low-frequency motor nerve stimulation. *Exerc Sport Sci Rev*. 1994;22:313-360.
96. Kruk B, Brzezinska Z, Kaciuba-Uscilko H, Nazar K. Thyroid hormones and muscle metabolism in dogs. *Horm Metab Res*. 1988;20(10):620-623.
97. Krum H, Sackner-Bernstein JD, Goldsmith RL, Kukin ML, Schwartz B, Penn J, Medina N, Yushak M, Horn E, Katz SD, et al. Double-blind, placebo-controlled

- study of the long-term efficacy of carvedilol in patients with severe chronic heart failure. *Circulation*. 1995;92(6):1499-1506.
98. Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, Voth M, Fritzenwanger M, Opfermann T, Pachmann K, Krack A, Sayer HG, Gottschild D, Werner GS. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005;150(1):115.
  99. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9):973-981.
  100. Lechat P, Packer M, Chalon S, Cucherat M, Arab T, Boissel JP. Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation*. 1998;98(12):1184-1191.
  101. Leclercq C, Cazeau S, Le Breton H, Ritter P, Mabo P, Gras D, Pavin D, Lazarus A, Daubert JC. Acute hemodynamic effects of biventricular DDD pacing in patients with end-stage heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(7):1825-1831.
  102. Leclercq C, Walker S, Linde C, Clementy J, Marshall AJ, Ritter P, Djiane P, Mabo P, Levy T, Gadler F, Bailleul C, Daubert JC. Comparative effects of permanent biventricular and right-univentricular pacing in heart failure patients with chronic atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2002;23(22):1780-1787.
  103. Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K, Sager R. Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(6):2504-2508.
  104. Leriche R, Fontaine R. Essai expérimental de traitement de certains infarctus du myocarde et de l'anévrisme du coeur par une greffe de muscle strié. *Bull Soc Nat Chir*. 1933;59:229-232.
  105. Lopez-Guajardo A, Sutherland H, Jarvis JC, Salmons S. Dynamics of stimulation-induced muscle adaptation: insights from varying the duty cycle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2000;21(8):725-735.
  106. Lopez-Guajardo A, Sutherland H, Jarvis JC, Salmons S. Induction of a fatigue-resistant phenotype in rabbit fast muscle by small daily amounts of stimulation. *J Appl Physiol*. 2001;90(5):1909-1918.

107. Lorenz E, Muhlebach MS, Tessier PA, Alexis NE, Duncan Hite R, Seeds MC, Peden DB, Meredith W. Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir Med.* 2008;102(4):567-573.
108. Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol.* 1969;42(1):1-29.
109. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-1209.
110. Macdonald PS, Keogh AM, Aboyoun CL, Lund M, Amor R, McCaffrey DJ. Tolerability and efficacy of carvedilol in patients with New York Heart Association class IV heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(4):924-931.
111. MacGregor G, Gray RD, Hilliard TN, Imrie M, Boyd AC, Alton EW, Bush A, Davies JC, Innes JA, Porteous DJ, Greening AP. Biomarkers for cystic fibrosis lung disease: application of SELDI-TOF mass spectrometry to BAL fluid. *J Cyst Fibros.* 2008;7(5):352-358.
112. Maco B, Brezova A, Schafer BW, Uhrík B, Heizmann CW. Localization of the Ca(2+)-binding S100A1 protein in slow and fast skeletal muscles of the rat. *Gen Physiol Biophys.* 1997;16(4):373-377.
113. Macoviak JA, Stephenson LW, Armenti F, Kelly AM, Alavi A, Mackler T, Cox J, Palatianos G, Edmunds LH, Jr. Electrical conditioning of in situ skeletal muscle for replacement of myocardium. *J Surg Res.* 1982;32(5):429-439.
114. Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1997;74(4):464-469.
115. Maier A, Gorza L, Schiaffino S, Pette D. A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast-to-slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 1988;254(1):59-68.
116. Maler L, Potts BC, Chazin WJ. High resolution solution structure of apo calyculin and structural variations in the S100 family of calcium-binding proteins. *J Biomol NMR.* 1999;13(3):233-247.

117. Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Smith FG, Lobley GE, Reeds PJ. Clenbuterol, a beta agonist, induces growth in innervated and denervated rat soleus muscle via apparently different mechanisms. *Biosci Rep.* 1987;7(6):525-532.
118. Mannion JD, Stephenson LW. Potential uses of skeletal muscle for myocardial assistance. *Surg Clin North Am.* 1985;65(3):679-687.
119. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322(4):1111-1122.
120. Martin WH, 3rd, Korte E, Tolley TK, Saffitz JE. Skeletal muscle beta-adrenoceptor distribution and responses to isoproterenol in hyperthyroidism. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 1):E504-510.
121. Massie BM, Shah NB. Evolving trends in the epidemiologic factors of heart failure: rationale for preventive strategies and comprehensive disease management. *Am Heart J.* 1997;133(6):703-712.
122. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation.* 1999;100(10):1056-1064.
123. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart.* 2000;83(5):596-602.
124. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation.* 2006;113(10):1287-1294.
125. Moews PC, Kretsinger RH. Terbium replacement of calcium in carp muscle calcium-binding parvalbumin: an x-ray crystallographic study. *J Mol Biol.* 1975;91(2):229-232.
126. Most P. Der Antikörper SA 5632 zum Nachweis des Proteins S100A1 in Burenziegen. *Persönliche Mitteilung.* 2010.

127. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PM, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13889-13894.
128. Most P, Boerries M, Eicher C, Schweda C, Ehlermann P, Pleger ST, Loeffler E, Koch WJ, Katus HA, Schoenenberger CA, Remppis A. Extracellular S100A1 protein inhibits apoptosis in ventricular cardiomyocytes via activation of the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem*. 2003;278(48):48404-48412.
129. Most P, Pleger ST, Volkens M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D, Loffler E, Janssen PM, Eckhart AD, Martini J, Williams ML, Katus HA, Remppis A, Koch WJ. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest*. 2004;114(11):1550-1563.
130. Most P, Remppis A, Pleger ST, Katus HA, Koch WJ. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(2):R568-577.
131. Most P, Remppis A, Pleger ST, Loffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockman HA, Duncan SJ, Katus HA, Koch WJ. Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33809-33817.
132. Most P, Remppis A, Weber C, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Kirsch W, Weber M, Uttenweiler D, Smith GL, Katus HA, Fink RH. The C terminus (amino acids 75-94) and the linker region (amino acids 42-54) of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1 differentially enhance sarcoplasmic Ca<sup>2+</sup> release in murine skinned skeletal muscle fibers. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26356-26364.
133. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Volkens M, Heierhorst J, Remppis A, Pleger ST, DeGeorge BR, Jr., Eckhart AD, Feldman AM, Koch WJ. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114(12):1258-1268.
134. No authors listed. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999;353(9146):9-13.

135. No authors listed. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999;353(9169):2001-2007.
136. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1980;105(2):361-363.
137. Ohman EM, Califf RM, George BS, Quigley PJ, Kereiakes DJ, Harrelson-Woodlief L, Candela RJ, Flanagan C, Stack RS, Topol EJ. The use of intraaortic balloon pumping as an adjunct to reperfusion therapy in acute myocardial infarction. The Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *Am Heart J*. 1991;121(3 Pt 1):895-901.
138. Ohman EM, George BS, White CJ, Kern MJ, Gurbel PA, Freedman RJ, Lundergan C, Hartmann JR, Talley JD, Frey MJ, et al. Use of aortic counterpulsation to improve sustained coronary artery patency during acute myocardial infarction. Results of a randomized trial. The Randomized IABP Study Group. *Circulation*. 1994;90(2):792-799.
139. Oosterlee A, Rahmel A. *Annual Report 2008*: Eurotransplant International Foundation; 2009.
140. Otterbein LR, Kordowska J, Witte-Hoffmann C, Wang CL, Dominguez R. Crystal structures of S100A6 in the Ca(2+)-free and Ca(2+)-bound states: the calcium sensor mechanism of S100 proteins revealed at atomic resolution. *Structure*. 2002;10(4):557-567.
141. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(21):1349-1355.
142. Pappone C, Rosanio S, Burkhoff D, Mika Y, Vicedomini G, Augello G, Shemer I, Prutchi D, Haddad W, Aviv R, Snir Y, Kronzon I, Alfieri O, Ben-Haim SA. Cardiac contractility modulation by electric currents applied during the refractory period in patients with heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2002;90(12):1307-1313.
143. Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol*. 1999;66(4):549-556.

144. Patterson JH, Adams KF, Jr., Applefeld MM, Corder CN, Masse BR. Oral torsemide in patients with chronic congestive heart failure: effects on body weight, edema, and electrolyte excretion. Torsemide Investigators Group. *Pharmacotherapy*. 1994;14(5):514-521.
145. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110(11 Suppl 1):II213-218.
146. Petrou M, Wynne DG, Boheler KR, Yacoub MH. Clenbuterol induces hypertrophy of the latissimus dorsi muscle and heart in the rat with molecular and phenotypic changes. *Circulation*. 1995;92(9 Suppl):II483-489.
147. Petrovsky BV. Surgical treatment of cardiac aneurysms. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1966;7(2):87-91.
148. Petrovsky BV. The use of diaphragm grafts for plastic operations in thoracic surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1961;41:348-355.
149. Pette D: *The dynamic state of muscle fibres*. In: Pette D: *Proceedings of the international symposium*. 1. Aufl., 509-519, Walter de Gruyter, Berlin, 1990.
150. Pette D, Vrbova G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1992;120:115-202.
151. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*. 2000;355(9215):1582-1587.
152. Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snively DB, Chang PI. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet*. 1997;349(9054):747-752.
153. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J. The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating

- acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2001;15(1):79-87.
154. Pleger ST. Entwicklung klinisch experimenteller Ansätze zur therapeutischen Nutzung des kalziumbindenden Proteins S100A1 im Herzen. *Med. Diss. Lübeck.* 2004.
155. Pleger ST, Remppis A, Heidt B, Volkens M, Chuprun JK, Kuhn M, Zhou RH, Gao E, Szabo G, Weichenhan D, Muller OJ, Eckhart AD, Katus HA, Koch WJ, Most P. S100A1 gene therapy preserves in vivo cardiac function after myocardial infarction. *Mol Ther.* 2005;12(6):1120-1129.
156. Potts BC, Smith J, Akke M, Macke TJ, Okazaki K, Hidaka H, Case DA, Chazin WJ. The structure of calyculin reveals a novel homodimeric fold for S100 Ca(2+)-binding proteins. *Nat Struct Biol.* 1995;2(9):790-796.
157. Powell WJ, Jr., Daggett WM, Magro AE, Bianco JA, Buckley MJ, Sanders CA, Kantrowitz AR, Austen WG. Effects of intra-aortic balloon counterpulsation on cardiac performance, oxygen consumption, and coronary blood flow in dogs. *Circ Res.* 1970;26(6):753-764.
158. Prosser BL, Wright NT, Hernandez-Ochoa EO, Varney KM, Liu Y, Olojo RO, Zimmer DB, Weber DJ, Schneider MF. S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptor and modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Biol Chem.* 2008;283(8):5046-5057.
159. RALES. Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *Am J Cardiol.* 1996;78(8):902-907.
160. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity and myosin heavy chains of developing rabbit muscle fibers. *J Biol Chem.* 1985;260(27):14403-14405.
161. Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem.* 1985;260(16):9077-9080.
162. Remppis A. Der Antikörper SA 5632 zum Nachweis des Proteins S100A1 in Burenziegen. *Persönliche Mitteilung.* 2010.

163. Remppis A, Most P, Loffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Pleger S, Borries M, Reppel M, Fischer J, Koch WJ, Smith G, Katus HA. The small EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein S100A1 increases contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling in rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol.* 2002;97 Suppl 1:156-62.
164. Remppis A, Pleger ST, Most P, Lindenkamp J, Ehlermann P, Schweda C, Loffler E, Weichenhan D, Zimmermann W, Eschenhagen T, Koch WJ, Katus HA. S100A1 gene transfer: a strategy to strengthen engineered cardiac grafts. *J Gene Med.* 2004;6(4):387-394.
165. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1274-1277.
166. Salmons S. Exercise, stimulation and type transformation of skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 1994;15(3):136-141.
167. Salmons S, Henriksson J. The adaptive response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve.* 1981;4(2):94-105.
168. Salmons S, Jarvis JC. Cardiac assistance from skeletal muscle: a critical appraisal of the various approaches. *Br Heart J.* 1992;68(3):333-338.
169. Salmons S, Sreter FA. Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature.* 1976;263(5572):30-34.
170. Salmons S, Vrbova G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol.* 1969;201(3):535-549.
171. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J.* 2006;396(2):201-214.
172. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(8):1690-1699.
173. Schachinger V, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S23-28.

174. Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*. 1995;25(3):638-643.
175. Scheidt S, Wilner G, Mueller H, Summers D, Lesch M, Wolff G, Krakauer J, Rubenfire M, Fleming P, Noon G, Oldham N, Killip T, Kantrowitz A. Intra-aortic balloon counterpulsation in cardiogenic shock. Report of a co-operative clinical trial. *N Engl J Med*. 1973;288(19):979-984.
176. Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1994;77(2):493-501.
177. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104(17):2012-2017.
178. Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL, Halliday GM. Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27(11):1554-1563.
179. Sillau AH. Capillarity and oxygen diffusion distances of the soleus muscle of guinea pigs and rats. Effects of hyperthyroidism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1985;82(2):471-478.
180. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361(9351):45-46.
181. Staron RS, Pette D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry*. 1986;86(1):19-23.
182. Stone GW, Marsalese D, Brodie BR, Griffin JJ, Donohue B, Costantini C, Balestrini C, Wharton T, Esente P, Spain M, Moses J, Nobuyoshi M, Ayres M, Jones D, Mason D, Grines L, O'Neill WW, Grines CL. A prospective, randomized evaluation of prophylactic intraaortic balloon counterpulsation in high risk patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty. Second Primary Angioplasty in Myocardial Infarction (PAMI-II) Trial Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(7):1459-1467.

183. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(9):1651-1658.
184. Sundell J, Engblom E, Koistinen J, Ylitalo A, Naum A, Stolen KQ, Kalliokoski R, Nekolla SG, Airaksinen KE, Bax JJ, Knuuti J. The effects of cardiac resynchronization therapy on left ventricular function, myocardial energetics, and metabolic reserve in patients with dilated cardiomyopathy and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(6):1027-1033.
185. Talley JD, Ohman EM, Mark DB, George BS, Leimberger JD, Berdan LG, Davidson-Ray L, Rawert M, Lam LC, Phillips HR, Califf RM. Economic implications of the prophylactic use of intraaortic balloon counterpulsation in the setting of acute myocardial infarction. The Randomized IABP Study Group. Intraaortic Balloon Pump. *Am J Cardiol.* 1997;79(5):590-594.
186. Termin A, Staron RS, Pette D. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. *Eur J Biochem.* 1989;186(3):749-754.
187. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 1987;316(23):1429-1435.
188. The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991;325(5):293-302.
189. Thoratec Corporation. Betriebsanleitung HeartMate II®. 2007.
190. Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C. Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Dtsch Arztebl.* 2007;104(23):A 1663-1670.
191. Tonkon M, Awan N, Niazi I, Hanley P, Baruch L, Wolf RA, Block AJ. A study of the efficacy and safety of irbesartan in combination with conventional therapy, including ACE inhibitors, in heart failure. Irbesartan Heart Failure Group. *Int J Clin Pract.* 2000;54(1):11-14, 16-18.

192. Torchiana DF, Hirsch G, Buckley MJ, Hahn C, Allyn JW, Akins CW, Drake JF, Newell JB, Austen WG. Intraaortic balloon pumping for cardiac support: trends in practice and outcome, 1968 to 1995. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;113(4):758-764; discussion 764-759.
193. Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, Prestipino G, Ronjat M, Zorzato F. Interaction of S100A1 with the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry.* 1997;36(38):11496-11503.
194. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003;361(9351):47-49.
195. Ulmer HV: *Energiehaushalt.* In: Schmidt RF, Thews G, Lang F: *Physiologie des Menschen.* 28. Aufl., 641, Springer-Verlag, Berlin, 2000.
196. Vardas PE, Auricchio A, Blanc JJ, Daubert JC, Drexler H, Ector H, Gasparini M, Linde C, Morgado FB, Oto A, Sutton R, Trusz-Gluza M. Guidelines for cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: The Task Force for Cardiac Pacing and Cardiac Resynchronization Therapy of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J.* 2007;28(18):2256-2295.
197. Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, Camerini F, Fowler MB, Silver MA, Gilbert EM, Johnson MR, Goss FG, Hjalmarson A. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet.* 1993;342(8885):1441-1446.
198. Weeds AG, Taylor RS. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature.* 1975;257(5521):54-56.
199. Westerhof N, Elzinga G, Sipkema P. An artificial arterial system for pumping hearts. *J Appl Physiol.* 1971;31(5):776-781.
200. WHO. Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians. 1995.
201. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial

- infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364(9429):141-148.
202. Wünsche W, Keding B. Modifikation des von Hoh beschriebenen Gelansatzes zur Myosinanalyse. *Persönliche Mitteilung*. 1994.
203. Yamasaki R, Berri M, Wu Y, Trombitas K, McNabb M, Kellermayer MS, Witt C, Labeit D, Labeit S, Greaser M, Granzier H. Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J*. 2001;81(4):2297-2313.
204. Zierer A, Melby SJ, Voeller RK, Guthrie TJ, Ewald GA, Shelton K, Pasque MK, Moon MR, Damiano RJ, Jr., Moazami N. Late-onset driveline infections: the Achilles' heel of prolonged left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(2):515-520.
205. Zimmer DB. Examination of the calcium-modulated protein S100 alpha and its target proteins in adult and developing skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1991;20(4):325-337.

## 8. Anhang

### 8.1. Danksagung

Ich habe schnell gemerkt, dass eine solche Arbeit niemals nur das Werk eines Einzelnen sein kann.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Norbert W. Guldner, den ich sehr, sehr schätze. Für die Vergabe des Themas und die überaus offenherzige, vorbehaltlose Unterstützung über all die Jahre möchte ich mich bei ihm herzlichst bedanken. Die unzähligen Gespräche mit ihm, nicht nur über Fachliches, haben mich stets beflügelt.

Herrn Prof. Dr. med. H. H. Sievers möchte ich für die kontinuierliche Förderung meines Projektes danken.

Die Arbeit mit programmierbaren Myostimulatoren, Elektroden, Computern und Ähnlichem erfordert ein fundiertes technisches Verständnis. Ich schulde Herrn Dr.-Ing. Peter Klapproth für seinen außerordentlich engagierten Einsatz bei allen technischen Belangen großen Dank. Bei ihm stieß ich mit Fragen und Problemen immer auf ein offenes Ohr.

Frau Britta Keding ist ohne Zweifel so etwas wie die gute Seele dieser Arbeit. Ihr möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Sie führte mich in die Laborarbeit ein und half mir nach allen Kräften mit den biochemischen Analysen. Trotz all meiner Fragen verlor sie dabei nie Ihr ausgesprochen hilfsbereites und freundliches Gemüt.

Meiner ehemaligen Mitdotorandin Frau Dr. med. Catrina Hansen möchte ich für ihre große Unterstützung danken. Die Zusammenarbeit mit ihr war stets ein großer Spaß.

Herrn Dr. med. Martin Großherr danke ich für die Durchführung der Intubationsnarkosen bei den Ziegen.

Herrn Dr. med. vet. Ralph Noell und seinen Mitarbeitern der gemeinsamen Tierhaltung möchte ich für die exzellente Betreuung der Versuchstiere meinen Dank aussprechen.

Frau Katharina Buck-Gramcko danke ich sehr für die unzähligen kleinen Denkanstöße.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Angelika und Klaus danken, ohne die ich niemals so weit gekommen wäre.

## 8.2. Lebenslauf

NAME:	David Thalmann	
GEBURTSDATUM:	16. September 1981	
GEBURTSORT:	Rheine	
STAATSANGEHÖRIGKEIT:	deutsch	
FAMILIENSTAND:	ledig	
SCHULAUSSBILDUNG:	1988 bis 1992 Michaelschule städtische Gemeinschafts-Grundschule Rheine	
	1992 bis 2001 städtisches Emsland-Gymnasium Rheine	
SCHULABSCHLUSS:	Juni 2001 allgemeine Hochschulreife	
PREISE:	Juli 2001 Buchpreis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft	
	Juli 2001 Winckler-Preis der Stadt Rheine	
WEHRDIENST:	Juli 2001 bis August 2002	
STUDIUM:	Oktober 2002 bis September 2004 vorklinischer Abschnitt Humanmedizin Philipps-Universität Marburg	
	September 2004 Ärztliche Vorprüfung	
	Oktober 2004 bis Oktober 2008 klinischer Abschnitt Humanmedizin Universität zu Lübeck	

---

PRAKTISCHES JAHR:	20. August bis 9. Dezember 2007 Klinik für Herzchirurgie, Universität zu Lübeck Prof. Dr. med. Sievers
	10. Dezember 2007 bis 30. März 2008 Abteilung für Innere Medizin, Klinikum Itzehoe Prof. Dr. med. Kentsch
	31. März bis 20. Juli 2008 Klinik für Allgemeinchirurgie, Sana Klinik Lübeck Prof. Dr. med. Blöchle
ÄRZTLICHE PRÜFUNG:	20. November 2008
ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT:	seit April 2009 Assistenzarzt Kardiologie akut, Herz- und Gefäßzentrum Bad Bevensen