

Eine computermodellgestützte Analyse der  
elektrophysiologischen Effekte von Gap-Junction-  
Lateralisierung und zellulärer Hypertrophie in kardialem  
Gewebe

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
– Dr. med. –

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Thomas Seidel

angefertigt am: Herzzentrum Leipzig

Betreuer: Professor Dr. med. Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.11.2011



## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung in die Thematik	1
1.1.1 Aktiv-dynamische Eigenschaften des Myokards	1
1.1.2 Passiv-statische Eigenschaften des Myokards	2
1.1.3 Veränderungen bei Herzkrankheiten	3
1.1.4 Ableitung der Rationale für die vorliegende Arbeit	5
1.2 Ziel der Arbeit	7
1.3 Methodik	9
1.3.1 Das Einzelzellmodell	9
1.3.2 Das Multizellmodell	14
1.3.3 Validierung des Modells	16
1.3.4 Simulation und Analyse der Erregungsausbreitung	17
1.4 Ergebnisse	23
1.4.1 Einfluss der Zellgröße auf die Erregungsausbreitung	23
1.4.2 Einfluss der Gap-Junction-Verteilung auf die Erregungsausbreitung	31
1.4.3 Risiko für unidirektionalen Leitungsblock	36
1.5 Schlussfolgerungen und Diskussion	38
1.6 Ausblick	41
<b>2. Publikation</b>	<b>42</b>
A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue	42
<b>3. Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
Abstract	58
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>5. Anlagen</b>	<b>70</b>
Supporting Material der Publikation	70
<b>6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit</b>	<b>91</b>





## ***Bibliographische Beschreibung***

Seidel, Thomas

### **Eine computermodellgestützte Analyse der elektrophysiologischen Effekte von Gap-Junction-Lateralisierung und zellulärer Hypertrophie in kardialem Gewebe**

Universität Leipzig, Dissertation

98 S.<sup>1</sup>, 90 Lit.<sup>2</sup>, 37 Abb., 8 Tab., 1 Publikation, 1 Anlage

Referat:

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit Entstehungsmechanismen kardialer Arrhythmien auf der Grundlage pathologisch veränderten Myokards. Es wurde eine systematische Analyse der elektrophysiologischen Veränderungen, die als Folge von Gap-Junction-Lateralisierung und zellulärer Hypertrophie auftreten, durchgeführt. Die Analyse beruht auf einem mathematischen Computermodell, das zur Simulation der Aktionspotentialausbreitung innerhalb einer Einzelzellschicht humaner ventrikulärer Kardiomyozyten entwickelt wurde. Ausgehend von bestehenden Einzelzellmodellen wurde ein räumlich und zeitlich hoch aufgelöstes Multizellmodell generiert und in der Programmiersprache Object Pascal implementiert. Nach Validierung des Modells wurde es zur gezielten, an experimentellen Daten orientierten Manipulation geometrischer Eigenschaften der Zellen (Länge, Durchmesser) und des Zellverbandes (Anordnung der Zellen untereinander) sowie der Gap-Junction-Verteilung genutzt. Die Analyse der elektrophysiologischen Effekte im Vergleich zur Kontrolle fand sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Bedingungen, die pathologischen Veränderungen entsprechen (Entkopplung der Gap-Junctions, verringerte Aktivität des schnellen Natriumkanals, erhöhte Inhomogenität), statt. Es zeigte sich, dass ein größerer Zelldurchmesser bzw. erhöhte laterale Gap-Junction-Leitfähigkeit (Simulation von kardialer Hypertrophie bzw. Connexin-Lateralisierung) die Entstehungswahrscheinlichkeit eines unidirektionalen Leitungsblocks erhöhte. Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit in hypertrophierten Zellen war zudem weniger stabil als in normalen Zellen. Beide Effekte gehören zu den Hauptursachen der Entstehung und Aufrechterhaltung ventrikulärer Arrhythmien. Die Ergebnisse der Arbeit erklären somit Ursachen des erhöhten Arrhythmierisikos in pathologisch veränderten und hypertrophierten Herzen und liefern eine theoretische Grundlage für zukünftige Studien.

---

<sup>1</sup> Seitenzahl insgesamt

<sup>2</sup> Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben



# **1. Einleitung**

## **1.1 Einführung in die Thematik**

Herzkrankheiten wie hypertrophe Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz sind mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Arrhythmien und plötzlichen Herztod assoziiert [36, 40, 56, 80, 83, 87]. Arrhythmien sind eine Folge veränderten elektrophysiologischen Verhaltens, d. h. einer gestörten Erregungsbildung oder einer gestörten Erregungsleitung. Das elektrophysiologische Verhalten des Herzmuskelgewebes ergibt sich aus so genannten aktiven (dynamischen) und passiven (statischen) elektrophysiologischen Eigenschaften und ist daher von einer Vielzahl von Faktoren abhängig.

### **1.1.1 Aktiv-dynamische Eigenschaften des Myokards**

Zu den aktiv-dynamischen Eigenschaften gehören transmembranäre Ionenströme zwischen dem intrazellulären Raum der Herzmuskelzellen und dem extrazellulären Raum, denn diese Ionenströme können innerhalb sehr kurzer Zeit durch Öffnen oder Schließen der Ionenkanäle, durch die sie fließen, im Sinne einer aktiven Regulation moduliert werden. Treibende Kraft für jeden Ionenstrom ist dabei immer entweder ein elektrochemisches Potential zwischen intra- und extrazellulärem Raum oder ein energieabhängiger Prozess, der Ionen auch entgegen des elektrochemischen Potentials transportieren kann. Der Regulationsmechanismus selbst, das heißt wann ein Kanal offen und wann er geschlossen ist, ist ein stochastischer Prozess, wenn man einen einzelnen Kanal betrachtet. Es lässt sich also nie mit absoluter Sicherheit vorhersagen, ob der Kanal geöffnet oder geschlossen ist, sondern nur eine entsprechende Wahrscheinlichkeit angeben. Da jede Zelle bis zu mehrere Tausend Kanäle enthält, lässt sich das Gesamtverhalten der Kanäle einer Zelle jedoch deterministisch beschreiben, denn in der Summe erscheint es dann, als könnten die Kanäle entweder vollständig geöffnet sein, vollständig geschlossen sein, aber auch jeden Zwischenwert annehmen. Der Öffnungszustand der Kanäle spiegelt sich physikalisch betrachtet als elektrischer Widerstand bzw. dessen Kehrwert, der elektrischen Leitfähigkeit, wider. Wenn alle Kanäle geöffnet sind, ist die Leitfähigkeit maximal. Diese maximale Leitfähigkeit ist eine spezifische Größe für jeden transmembranären Ionenstrom. Wenn alle Kanäle geschlossen sind, ist die Leitfähigkeit gleich Null. Die Leitfähigkeit kann außer vom Membranpotential und den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen sowie molekularen Mechanismen auch von der Zeit abhängen. Das bedeutet, dass manche Ionenströme einen typischen Zeitverlauf zeigen. Den Zeitverlauf

bezeichnet man als Kinetik. Sofern die Zeitkonstanten dieser Kinetiken sich im Bereich weniger Hundert Millisekunden befinden, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Aktionspotentialen und der Weiterleitung der Erregung. Da sowohl die Spannungsgradienten und die Gradienten der Ionenkonzentrationen zwischen Intra- und Extrazellularraum als auch die Kinetiken der transmembranären Ionenströme auf aktiven und z. T. energieabhängigen Mechanismen basieren, sollen sie hier als aktiv-dynamische Eigenschaften bezeichnet werden.

### **1.1.2 Passiv-statische Eigenschaften des Myokards**

Zu den passiv-statischen Eigenschaften gehören intra- und interzelluläre elektrische Widerstände, die Gap-Junction-Verteilung entlang der Zellmembran, die Zellgröße und -geometrie sowie die Gewebezusammensetzung (z. B. Grad der Fibrose). Eine besondere Rolle spielen hierbei die Verbindungskanäle zwischen den Intrazellularräumen benachbarter Herzmuskelzellen, die so genannten Gap-Junctions, weil sie nicht nur für den elektrischen Widerstand zwischen den Zellen verantwortlich sind, sondern auch, weil sie durch ihre Anordnung entlang der Zellmembran eine Richtungsabhängigkeit der Erregungsausbreitung (Anisotropie) bewirken. Gap-Junctions sind Proteinkomplexe, die aus je zwei Untereinheiten, den Connexonen, zusammengesetzt sind. Jedes der beiden Connexone bildet eine Hälfte des Kanals. Ein Connexon einer Zelle verbindet sich jeweils mit dem gegenüberliegenden Connexon der Nachbarzelle zu einer vollständigen Verbindung der beiden Interzellularräume. Jedes Connexon ist wiederum aus mehreren Proteinen, den Connexinen aufgebaut, von denen es verschiedene Unterarten gibt. Durch die Kanäle, die von den Gap-Junctions gebildet werden, können intrazelluläre Ströme fließen, sofern ein elektrochemischer Gradient vorhanden ist. Dies ist während der Erregungsausbreitung im Herzmuskelgewebe der Fall. Die Größe des elektrischen Widerstandes, den die Gap-Junctions bewirken, beeinflusst in hohem Maße die Geschwindigkeit und Art der Erregungsausbreitung. Einige wissenschaftliche Studien zeigen, dass auch der Gap-Junction-Widerstand einer Regulation innerhalb relativ kurzer Zeitintervalle unterliegen kann [24]. Da allerdings umstritten ist, ob diese Regulation überhaupt Auswirkungen auf die Erregungsausbreitung hat [12, 84], und weil die Zeitkonstanten zudem oft über 500 ms liegen, was die Dauer eines Aktionspotentialen übersteigt, spielen mögliche aktive Eigenschaften der Gap-Junctions im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle für die Erregungsausbreitung. Mit den passiv-statischen Eigenschaften sind hier also all diejenigen Parameter gemeint, die zwar auch einen großen Einfluss auf die Entstehung von Aktionspotentialen und

die Erregungsausbreitung besitzen, aber keiner signifikanten kurzfristigen Regulation unterliegen.

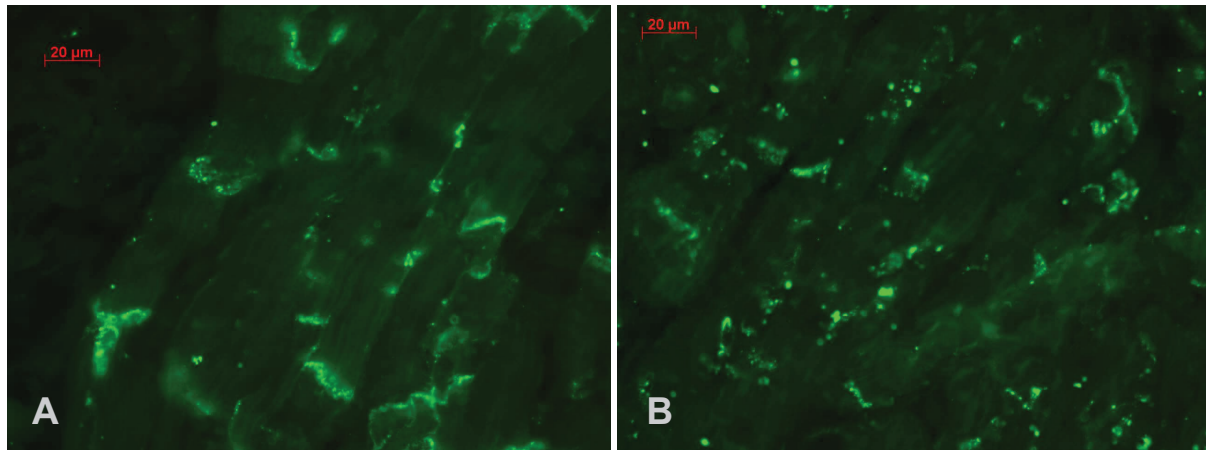
### **1.1.3 Veränderungen bei Herzkrankheiten**

Es ist bekannt, dass im Rahmen kardialer Erkrankungen einerseits Veränderungen der aktiven Eigenschaften auftreten, wie z. B. eine verlängerte Dauer des Aktionspotentials als Folge unterschiedlicher Expression und Aktivität der membranständigen Ionenkanäle und Ionenpumpen [4, 33, 55]. Andererseits verändern sich auch die passiven Eigenschaften, was eine Folge zellulärer Hypertrophie [1, 7, 62], einem erhöhten Anteil an Fibroblasten und Kollagen [13] und veränderter Anordnung der Gap-Junction-Kanäle [2, 16, 38, 39, 51, 52, 61] sein kann.

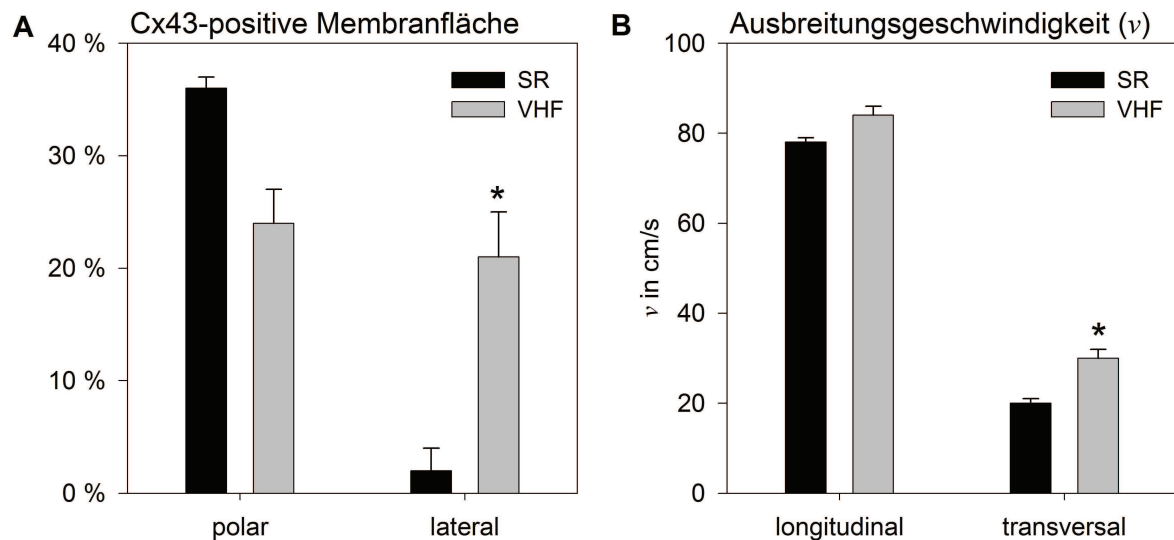
Es besteht Konsens darüber, dass diese Veränderungen, z. B. im Rahmen des so genannten kardialen Remodelings bei Herzerkrankungen, die Entstehung von ventrikulären und supraventrikulären Arrhythmien begünstigen [14, 29, 30, 47, 57, 81]. Die Ursachen und Entstehungsmechanismen sind jedoch vielfältig und konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es konnte u. a. gezeigt werden, dass hypertrophierte Herzen zu verlängerten QT-Intervallen neigen [78]. Diese sind mit einem erhöhten Risiko für plötzlichen Herztod assoziiert [21], was auf einer Verlängerung der vulnerablen Phase für einen unidirektionalen Leitungsblock beruhen kann [35]. Während es mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gut möglich ist, Veränderungen der Transmembranströme und ihrer Kinetiken zu messen [10, 37, 48, 50, 77], ist es experimentell bisher kaum möglich, die Effekte veränderter passiver Eigenschaften (Zellgröße, Gap-Junction-Anordnung) isoliert zu untersuchen, weil sich in pathologisch verändertem Myokard immer dynamische und strukturelle Effekte überlagern. Des Weiteren erfassen mehrkanalige Aktionspotentialmessungen nur wenige nicht unmittelbar benachbarte Zellen, während Mapping-Analysen mit einer Vielzahl epikardialer Elektroden zwar ein Gesamtbild der Erregungsausbreitung liefern, jede Elektrode aber nur das Potential einer Fläche erfassen kann, die mehr als 1 mm<sup>2</sup> beträgt und somit ein Summenpotential vieler Einzelzellen darstellt. Bisher ist es experimentell noch nicht möglich, die Erregungsausbreitung und die Membranpotentiale auf zellulärer Ebene im Gewebeverband zu messen, weswegen Computersimulationen und mathematische Modelle die einzige Möglichkeit darstellen, die methodische Lücke zwischen Patch-Clamp-Technik und Mapping-Experimenten zu schließen [11].

Es wurde beschrieben, dass hypertrophe, ischämische und inflammatorische kardiale Erkrankungen zumeist mit einer veränderten qualitativen und quantitativen zellulären Verteilung der Gap-Junction bildenden Connexine einhergehen. Viele Autoren beschreiben eine so genannte Lateralisierung der Connexine. Insbesondere nimmt der Anteil von membranständigem Connexin an der Längsseite der Kardiomyozyten zu Ungunsten des Anteils an den Zellpolen

zu [2, 38, 39, 43, 51, 61, 65, 69]. Als schwierig erweist sich die Beantwortung der Frage, ob die lateralisierten Connexin-Moleküle auch funktionelle Gap-Junctions bilden, weil es bisher experimentell nur unter großem Aufwand möglich ist, am selben Präparat gleichzeitig eine quantitative (histologische) und eine funktionelle (elektrophysiologische) Messung durchzuführen. Es gibt nur wenige Arbeiten, die einen Schluss auf die Funktionalität lateralisierter Gap-Junctions zulassen. So konnten Polontchouk et al. [53] zeigen, dass nach einer 24stündigen Stimulation der Vorhöfe von Ratten mit 10 Hz eine Connexin43-Lateralisierung auftrat und gleichzeitig die transversale Leitungsgeschwindigkeit erhöht war, während die longitudinale Geschwindigkeit nahezu unverändert blieb. Rojas Gomez et al. [59] fanden heraus, dass eine Stimulation des alpha-1-adrenergen Systems kardialer Myozyten von Ratten zu einem Anstieg der zellulären Connexin43-Menge führte, welcher mit einer Erhöhung der interzellulären Gap-Junction-Leitfähigkeit einherging, was mit Hilfe von Doppelzell-Patch-Clamp-Experimenten nachgewiesen wurde. Beide Arbeiten liefern einen Hinweis auf vorhandene Funktionalität. Die Publikation, die Gegenstand dieser Arbeit ist [64], liefert einen weiteren Hinweis auf die vorhandene Funktionalität lateralisierten Connexins: Gewebeproben aus den Vorhöfen von jeweils 7 Patienten mit Sinusrhythmus und mit Vorhofflimmern wurden hinsichtlich der zellulären Verteilung von Connexin43 und der Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung analysiert (siehe Abbildung 1). Die Ergebnisse zeigten, dass eine signifikant erhöhte laterale Connexin43-Menge mit einer signifikant erhöhten transversalen Geschwindigkeit (siehe Abbildung 2) korrelierte, was einen Rückschluss auf funktionelle lateralisierte Gap-Junctions auch in humanem Myokard zulässt. Gleichwohl gibt es Studien, die zeigen, dass lateralisiertes Connexin mit einer verringerten Geschwindigkeit einhergehen kann [2, 49]. Zudem wurde beobachtet, dass neben den quantitativen Veränderungen der lateralen Connexin-Menge auch eine gleichmäßigere (uniforme) Verteilung des Connexins entlang der lateralen Zellmembran auftritt [8], so dass die in gesundem Myokard beobachtete Konzentration lateraler Gap-Junctions in der Nähe der Zellpole aufgehoben ist (siehe auch Abbildung 9, S. 19).



**Abbildung 1.** Beispiele der Immunhistologie für Connexin-43 (*grün*) in Gewebeproben von menschlichen Vorhöfen. Die Proben wurden von Patienten mit Sinusrhythmus (**A**) bzw. mit Vorhofflimmern (**B**) gewonnen. Die Abbildung wurde dem Supporting Material von Seidel et al. 2010 [64] entnommen.



**Abbildung 2.** Experimentelle Daten, die aus Vorhofzellen von Patienten mit Sinusrhythmus (SR) oder mit Vorhofflimmern (VHF) gewonnen wurden. **A** zeigt den Anteil der Connexin43-positiven Membranfläche, der mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen im Bereich der Zellpole (*polar*) und der Zellseiten (*lateral*) bestimmt wurde. **B** zeigt die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v$ ), die mit Hilfe von Mapping-Experimenten in longitudinaler Richtung und in transversaler Richtung bestimmt wurde. Signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) zwischen VHF und SR sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.

#### 1.1.4 Ableitung der Rationale für die vorliegende Arbeit

Die kausalen Zusammenhänge zwischen kardialer Hypertrophie und veränderten zellulären Ionenströmen einerseits und erhöhtem Arrhythmierisiko andererseits sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass die Zellgröße einen starken Einfluss auf die Erre-



gungsausbreitung hat [18, 22, 31, 72]. Eine Studie von Spach et al. [72] kam zu dem Ergebnis, dass eine Vergrößerung der Zelle in einer erhöhten Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung resultiert, was konsistent mit den Ergebnissen von Ghaly et al. [22] ist, welche zeigten, dass eine verringerte Zellgröße mit niedrigerer Geschwindigkeit einhergeht. Im Gegensatz dazu erhielten jedoch McIntyre et al. [45] eine negative Korrelation zwischen Zelldurchmesser und Geschwindigkeit in ventrikulärem humanen Myokard. Dies erscheint paradox, denn eine Vergrößerung des Zelldurchmessers verringert den intrazellulären Widerstand und somit den Gesamtwiderstand des Gewebes. Dies zeigt, dass die Auswirkungen einer veränderten Zellgröße komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Unklar bleibt auch der Einfluss der GJ-Lateralisierung auf die Erregungsausbreitung. Es ist nicht bekannt, ob die Connexin-Lateralisierung als eine pathologische Reaktion, d. h. eine Fehlregulation, der Zelle aufgefasst werden sollte, oder ob sie einen zellulären Kompensationsmechanismus darstellt, der den elektrophysiologischen Veränderungen der Grunderkrankung entgegenwirkt [27, 38, 66, 67].

Eine gezielte experimentelle Untersuchungen der beschriebenen Faktoren ist bisher unmöglich, weil in pathologisch verändertem Myokard stets mehrere Parameter gleichzeitig verändert sind. Zu diesem Zweck bieten sich daher mathematisch-biophysikalische Modelle an, die alle wesentlichen Eigenschaften kardialer Zellen beziehungsweise Zellverbände und der Erregungsausbreitung abbilden. Ihr Vorteil ist die Möglichkeit der isolierten Variation einzelner Parameter und Eigenschaften sowie der exakten Erfassung ihrer Auswirkungen. So lassen sich Ursache-Wirkung-Beziehungen aufklären, experimentelle Ergebnisse besser interpretieren und auf eine theoretische Grundlage stellen. Es lassen sich auch Hypothesen formulieren, die anhand zukünftiger Experimente überprüft werden können. Zudem sind Modelle der kardialen Erregungsausbreitung in der Lage, die methodische Verbindung zwischen Mapping-Experimenten und der Patch-Clamp-Technik herzustellen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein zu diesen Zwecken geeignetes Modell entwickelt. Mit Hilfe des Modells werden allgemeine sowie Arrhythmie-spezifische Veränderungen der kardialen Erregungsausbreitung in Abhängigkeit von Zellform, Zellgröße, Zellanordnung und Gap-Junction-Verteilung untersucht.



## 1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel war es, zunächst ein geeignetes Modell zu entwickeln, mit dessen Hilfe die elektrophysiologischen Effekte der genannten Faktoren (zelluläre Hypertrophie, Gap-Junction-Lateralisierung, Anordnung der Zellen untereinander, etc.) analysiert werden konnten. Die Anforderungen, die an ein solches Modell gestellt werden, stehen in engem Zusammenhang mit der Fragestellung. Da in der vorliegenden Arbeit die geometrischen Verhältnisse von Kardiomyozyten, ihre Größe und ihre Anordnung im Gewebeverband von besonderer Bedeutung waren, war es notwendig, bestehende Einzelzellmodelle [44, 55] weiterzuentwickeln und so zu einem Zellverband zu integrieren, dass jede Einzelzelle in mehreren Dimensionen diskretisiert und räumlich beliebig hoch aufgelöst werden konnte. Dabei sollte es möglich sein, geometrische Eigenschaften der Zellen, insbesondere des Zellradius und der Zelllänge und der zellulären Verteilung von Gap-Junctions, abzubilden.

Zwei weitere wichtige Eigenschaften kardialen Gewebes – Anisotropie und das Auftreten von Inhomogenitäten – sollten ebenso berücksichtigt werden. Unter Anisotropie versteht man eine Richtungsabhängigkeit von Gewebeeigenschaften. Im Falle der kardialen Erregungsausbreitung heißt das, dass die longitudinale Geschwindigkeit etwa zwei- bis dreimal höher ist als die transversale Geschwindigkeit. Unter pathologischen Bedingungen kann sich dieses Verhältnis ändern [74, 75, 76]. Inhomogenitäten bezeichnen im weiteren Sinne jede räumliche Unregelmäßigkeit des Gewebes. Dazu gehören beispielsweise anatomische Hindernisse wie Blutgefäße oder Bereiche mit einem hohen Anteil an fibrotischem Gewebe. Es gibt aber auch funktionelle Inhomogenitäten, z. B. in der Akutphase einer kardialen Ischämie. Bestimmte Bereiche des Myokards weisen dann ein verändertes Aktionspotential auf oder sind nicht mehr erregbar. Bei genauerer, d. h. mikroskopischer, Betrachtung des Myokards fällt allerdings auf, dass auch im gesunden Gewebe bereits Inhomogenitäten auftreten. Dazu gehört, dass der Stromfluss und die Erregungsausbreitung zwar makroskopisch betrachtet gleichmäßig verlaufen, nicht jedoch mikroskopisch betrachtet. Auf zellulärer Ebene ist durch den Wechsel zwischen Erregungsausbreitung innerhalb einer Zelle (geringer elektrischer Widerstand, hohe Geschwindigkeit) und zwischen zwei Zellen (hoher Widerstand, geringe Geschwindigkeit) eine natürliche Diskontinuität und damit Inhomogenität vorhanden. Der hohe Widerstand zwischen zwei Zellen entspricht dem Gap-Junction-Widerstand.

Das Modell sollte daher aus zwei Gründen so konzipiert werden, dass Inhomogenitäten simuliert werden konnten: Einerseits um die Möglichkeit zu schaffen, in späteren Studien kardiale

Ischämien und anatomische Besonderheiten zu simulieren, andererseits um die für diese Arbeit wichtige inhärente Diskontinuität des Myokards zu berücksichtigen.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es – nach Validierung des Modells – dieses dazu zu nutzen, um folgende Parameter systematisch zu verändern und die sich daraus ergebenden Auswirkungen auf die kardiale Erregungsausbreitung zu analysieren:

- Zellgröße (Veränderung von Länge und Durchmesser)
- Gap-Junction-Leitfähigkeit (Menge funktionellen Connexins)
- Geometrische Verteilung der Gap-Junctions

Dabei sollten die Parameter jeweils einzeln als auch in Kombination verändert werden und unter folgenden Bedingungen analysiert werden:

- Normale (gesunde) Bedingungen
- Verringerte interzelluläre Kopplung
- Reduzierte Erregbarkeit
- Erhöhte Inhomogenität
- Übergang von planarer zu elliptischer Ausbreitung der Erregungswelle (z. B. als Folge eines nicht erregbaren Bereiches oder anatomischer Gegebenheiten)

Diese Bedingungen gehören zusammen mit anderen pathologischen Veränderungen (z. B. Ischämie, Ionenkanal- und Elektrolytstörungen) zu den am häufigsten auftretenden Ursachen kardialer Arrhythmien [35]. Mit Hilfe des Modells sollte untersucht werden, ob allein die Zellgröße und -geometrie bereits zu Mechanismen beiträgt, die Arrhythmien verursachen können. Und falls ja, so sollten die kausalen Zusammenhänge aufgeklärt werden.

Eine weitere Zielsetzung bestand darin, die Folgen einer Lateralisierung von Gap-Junctions zu analysieren. Ebenso wie bei der Zellgröße und -geometrie sollte neben allgemeinen Auswirkungen der Lateralisierung zusätzlich arrhythmogene Potentiale aufgedeckt werden.

Im Zusammenhang mit der Simulation von Gap-Junction-Lateralisierung stellte sich zudem die Frage, ob das in dieser Arbeit entwickelte zweidimensionale Modell einen Vorteil gegenüber räumlich ebenso hoch aufgelösten, aber eindimensionalen Modellen [41, 85] hatte.

## 1.3 Methodik

Um ein Multizellmodell kardialen Gewebes zu entwickeln, ist es zunächst notwendig die elektrophysiologischen Abläufe, die innerhalb einer einzelnen Zelle stattfinden, zu simulieren. In diesem Bereich sind seit den ersten mathematischen Beschreibungen der Aktionspotentialentstehung mittels Gating-Variablen [28] immense Fortschritte gemacht worden. Bis heute werden ständig verbesserte Einzelzellmodelle vorgestellt [3, 44, 55, 79]. Diese Fortschritte können nicht zuletzt auf die Erkenntnisse, die mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik [48] gewonnen wurden, zurückgeführt werden.

Für die Modellierung von Gewebe müssen jedoch Tausende dieser Zellen räumlich und auch zeitlich miteinander gekoppelt werden. Die komplexen mathematischen Berechnungen, die bereits bei der Simulation einer Einzelzelle sehr zeitaufwendig sind, werden daher um ein Vielfaches komplexer. Daraus wird ersichtlich, dass Multizellmodelle erst nach der Entwicklung leistungsfähiger Computer möglich wurden und es sich aus diesem Grund bei der Simulation von kardialen Gewebe um eine relativ junge Methode handelt [15, 42, 60, 73].

In der vorliegenden Arbeit wird ausgehend von einem Einzelzellmodell ein zweidimensionales Modell entwickelt, das ein räumliches Gitter aufweist, dessen Punkte 10  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt sind. Eine zylinderförmige Zelle mit einem Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 80  $\mu\text{m}$  wird entsprechend durch mindestens 16 Gitterpunkte repräsentiert.

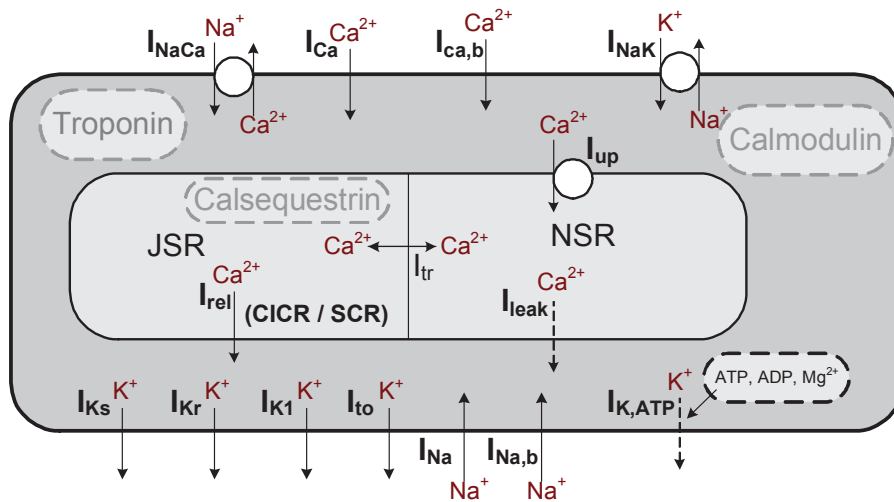
### 1.3.1 Das Einzelzellmodell

Für die Simulation von Aktionspotentialen müssen alle relevanten transmembranären Ströme (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1) simuliert werden. Die spezifische Membrankapazität,  $C_m$ , wurde mit 0,01 pF/ $\mu\text{m}^2$  angenommen [44, 55]. Die Veränderung des Membranpotentials pro Zeiteinheit ist dann:

$$\frac{\partial\varphi}{\partial t} = \frac{1}{C_m} I_m$$

$\varphi$  ist das Membranpotential,  $t$  ist die Zeit, und  $I_m$  ist die Summe aller Ionenströme zwischen dem intra- und extrazellulären Raum (transmembranäre Ströme):

$$I_m = I_{\text{Na}} + I_{\text{Ca}} + I_{\text{to}} + I_{\text{K1}} + I_{\text{Kr}} + I_{\text{Ks}} + I_{\text{Na, b}} + I_{\text{Ca, b}} + I_{\text{NaK}} + I_{\text{NaCa}}$$



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung des Zellmodells und der simulierten Ionenströme und Ionenpumpen sowie der intrazellulären Mechanismen der Calciumpufferung (Troponin, Calmodulin, Calsequestrin).<sup>3</sup> Die Aktivität der ATP-abhängigen Ionenpumpen wird über die intrazelluläre ATP- und Magnesiumkonzentration reguliert und kann im Modell variiert werden. Auch der  $\text{Na}^+$ /Protonen-Austauscher (NHE) kann optional simuliert werden.

<sup>3</sup>  $I_{\text{NaCa}}$ , Natrium-Calcium-Austauscher;  $I_{\text{Ca}}$ , L-Typ-Calcium-Strom;  $I_{\text{Ca,b}}$ , Calciumhintergrundstrom;  $I_{\text{NaK}}$ , von der Natrium-Kalium-ATPase generierter Strom;  $I_{\text{Ks}}$ , langsam aktivierender Kaliumstrom;  $I_{\text{Kr}}$ , schnell aktivierender Kaliumstrom;  $I_{\text{K1}}$ , Einwärts-Gleichrichter-Kaliumstrom;  $I_{\text{to}}$ , transienter Auswärtskaliumstrom;  $I_{\text{Na}}$ , schneller Natriumeinstrom;  $I_{\text{Na,b}}$ , Natriumhintergrundstrom;  $I_{\text{K,ATP}}$ , ATP-abhängiger Kaliumstrom;  $\text{NSR}$ , Network Sarcoplasmic Reticulum;  $\text{JSR}$ , Junctional Sarcoplasmic Reticulum;  $I_{\text{rel}}$ ,  $\text{CICR}$ , Calcium-induzierte Calciumfreisetzung;  $\text{SCR}$ , spontane Calciumfreisetzung;  $I_{\text{leak}}$ , Calciumleckstrom;  $I_{\text{tr}}$ , Calcium-Transferstrom zwischen NSR und JSR;  $\text{ATP}$ , Adenosintriphosphat;  $\text{ADP}$ , Adenosindiphosphat. Siehe auch Tabelle 1.

Abkürzung	Ionenstrom
$I_{Na}$	Schneller Natriumeinstrom
$I_{Ca}$	Strom durch den L-Typ-Calcium-Kanal
$I_{to}$	Transient Outward Current (Kaliumstrom)
$I_{K1}$	Inward Rectifier Current (Kaliumstrom)
$I_{Kr}$	Rapidly Activating Current (Kaliumstrom)
$I_{Ks}$	Slowly Activating Current (Kaliumstrom)
$I_{Na,b}$	Natriumhintergrundstrom
$I_{Ca,b}$	Calciumhintergrundstrom
$I_{NaK}$	Strom, der durch die Natrium-Kalium-ATPase generiert wird
$I_{NaCa}$	Strom, der durch den Natrium-Calcium-Austauscher generiert wird
$I_{rel}$	Strom der Calciumfreisetzung aus dem JSR in das Zytoplasma <sup>4</sup>
$I_{up}$	Calciumstrom vom Zytoplasma in das NSR
$I_{tr}$	Strom des Calciumtransfers vom NSR in das JSR
$I_{leak}$	Calciumleckstrom vom NSR in das Zytoplasma

**Tabelle 1.** Auflistung aller im Modell berücksichtigten transmembranären und intrazellulären Ionenströme. *NSR*, Network Sarcoplasmatic Reticulum; *JSR*, Junctional Sarcoplasmatic Reticulum.

Die Gleichungen für zeit- und spannungsabhängige Ionenströme wurden vom Priebe-Beuckelmann-Modell [55] übernommen. Die Kinetiken der Ionenkanäle sind darin in Anlehnung an die von Hodgkin und Huxley 1963 vorgestellten Formalismen [28] beschrieben:

$$\frac{\partial y}{\partial t} = \alpha_y - y(\alpha_y + \beta_y)$$

wobei  $y$  für die Gating-Variable steht. Die Funktionen für die Berechnung von  $\alpha_y$  und  $\beta_y$  hängen vom Membranpotential  $\varphi$  ab und genügen im Allgemeinen folgender Form:

$$f(\varphi) \cdot e^{g(\varphi)}$$

Hier sind  $f(\varphi)$  und  $g(\varphi)$  meist lineare Funktionen, die nur von dem Membranpotential  $\varphi$  sowie einigen experimentell bestimmbar Parametern (Konstanten) abhängen. Als Beispiel

<sup>4</sup> Dieser Strom wird durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert (Calcium Induced Calcium Release, CICR) oder kann bei Überladung der Calciumspeicher auch spontan auftreten (Spontaneous Calcium Release, SCR)

sei im Folgenden die Gleichung zur Berechnung von  $\alpha_m$  und  $\beta_m$  des  $m$ -Gates des schnell öffnenden Natriumkanals ( $I_{Na}$ ) dargestellt:

$$\alpha_m = \frac{0,32\text{mV}^{-1} \cdot (\varphi + 47,13\text{mV})}{1 - e^{-0,1\text{mV}^{-1} \cdot (\varphi + 47,13\text{mV})}}, \beta_m = 0,08 \cdot e^{-\frac{\varphi}{11\text{mV}}}$$

Für Details sei auf das Supporting Material im Anhang sowie auf entsprechende Publikationen [28, 44, 55] verwiesen.

Des Weiteren wurden intra- und extrazelluläre Ionenkonzentrationen und ihre dynamischen Veränderungen während des Aktionspotentials berücksichtigt. Das heißt, jeder Ionenstrom  $I_s$  verändert Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulären Raum:

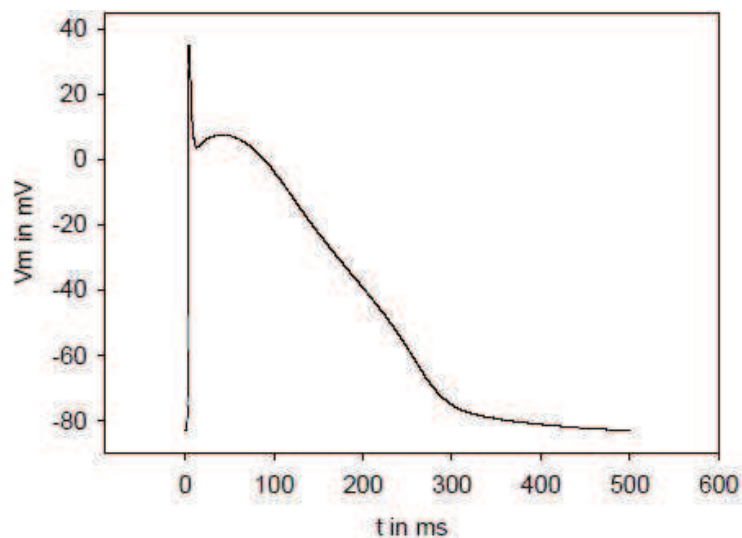
$$\frac{\partial [s]_i}{\partial t} = -\frac{I_s A_m}{Fz_s V_{myo}}, \quad \frac{\partial [s]_o}{\partial t} = \frac{I_s A_m}{Fz_s V_{cleft}}$$

Hier stehen  $[s]_i$  and  $[s]_o$  für die Konzentration von Ionensorte  $s$  im intra- bzw. extrazellulären Raum.  $A_m$  ist die Fläche der Zellmembran,  $V_{myo}$  das zytoplasmatische Volumen und  $V_{cleft}$  das Volumen des extrazellulären Spaltes. Die Ionenkonzentrationen, die für die Initialisierung aller Simulationen verwendet wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt. Sie entsprechen den Werten, die sich nach 10minütiger Stimulation des Einzelzellmodells bei einer Frequenz von 1 Hz und unter Normalbedingungen einstellten.

Ion	Domäne	Konzentration
Ca <sup>++</sup>	intrazellulär	0,2 µmol/l
Ca <sup>++</sup>	extrazellulär	2,0 mmol/l
Ca <sup>++</sup>	NSR	1,0 mmol/l
Ca <sup>++</sup>	JSR	1,0 mmol/l
Na <sup>+</sup>	intrazellulär	9,0 mmol/l
Na <sup>+</sup>	extrazellulär	145,0 mmol/l
K <sup>+</sup>	intrazellulär	140,0 mmol/l
K <sup>+</sup>	extrazellulär	5,4 mmol/l
Mg <sup>++</sup>	intrazellulär	1,0 mmol/l
Mg <sup>++</sup>	extrazellulär	1,0 mmol/l

**Tabelle 2.** Ionenkonzentrationen, mit denen das Modell initialisiert wurde. *NSR*, Network Sarcoplasmatic Reticulum; *JSR*, Junctional Sarcoplasmatic Reticulum.

Ein mit dem Modell generiertes Aktionspotential hat unter Normalbedingungen die in Abbildung 4 gezeigte Form.



**Abbildung 4.** Beispielhafte Darstellung eines ventrikulären Aktionspotentials.  $V_m$  ist das Membranpotential,  $t$  die Zeit. Es wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  ms für eine Dauer von 4 ms stimuliert. Der Stimulationsstrom betrug  $I_{stim} = 10$  pA/pF.

### 1.3.2 Das Multizellmodell

Zur Simulation interzellulärer Ströme über Gap-Junctions wurde ein Monodomain-Modell gewählt, in welchem der extrazelluläre Raum als geerdet betrachtet wird. Eine solche Annahme ist sinnvoll, da einerseits Bidomain-Modelle mit einem festen Verhältnis von intra- zu extrazellulärer Anisotropie auf Monodomain-Modelle reduziert werden können und da andererseits der Unterschied zwischen den Ergebnissen von Bi- und Monodomainmodellen häufig vernachlässigbar klein ist [26, 54]. Die partielle Differentialgleichung in zwei Dimensionen hat folgende Form:

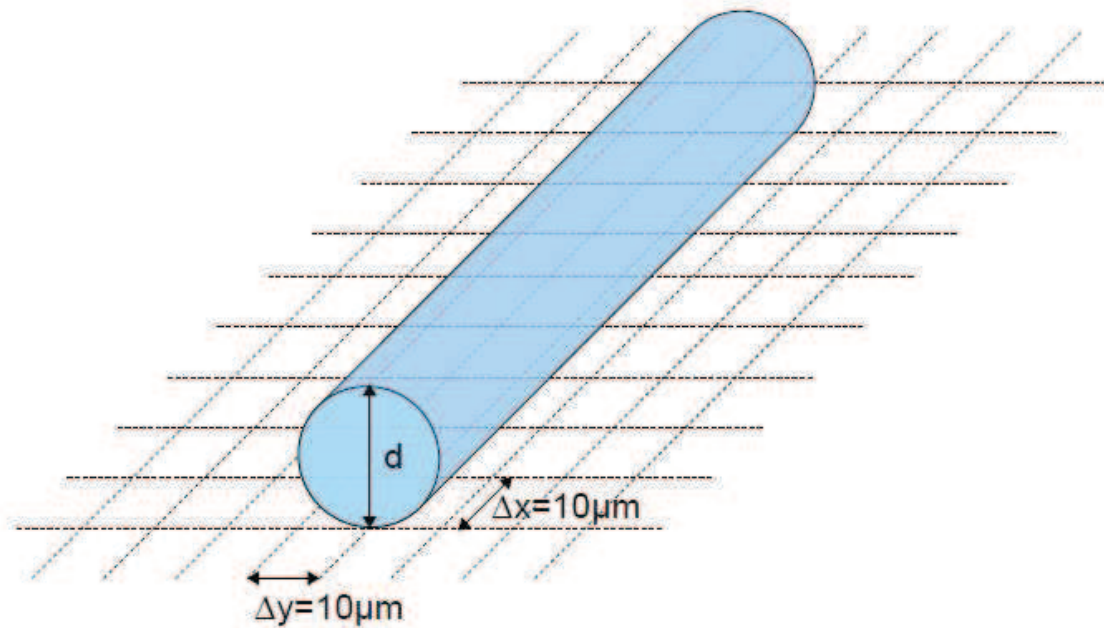
$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = \frac{1}{C_m R_{CG} R_{AV}} \left( \frac{\partial}{\partial x} \left( \sigma_x \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left( \sigma_y \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right) \right)$$

Hier ist  $\varphi$  das elektrische Membranpotential,  $t$  ist die Zeit,  $C_m$  die spezifische Membrankapazität in pF/ $\mu\text{m}^2$ ,  $R_{CG}$  das Verhältnis von kapazitiv wirksamer zu geometrisch berechneter Membranfläche,  $R_{AV}$  das Verhältnis von Membranfläche zum Volumen der Zelle,  $x$  und  $y$  sind die beiden räumlichen Dimensionen.  $\sigma_x$  und  $\sigma_y$  sind die spezifischen elektrische Leitfähigkeiten in  $x$ - bzw.  $y$ -Richtung in S/m. Sie sind im Allgemeinen keine Konstanten, sondern hängen vom Ort ab.

Die räumlich-zeitliche Diskretisierung wurde unter Wahrung der Möglichkeit, lokale Inhomogenitäten und Anisotropie zu berücksichtigen, mit Hilfe einer kompakten Finite-Differenzen-Methode [90] realisiert. Eine detailliertere Beschreibung des Modells kann dem Supporting Material im Anhang entnommen werden.

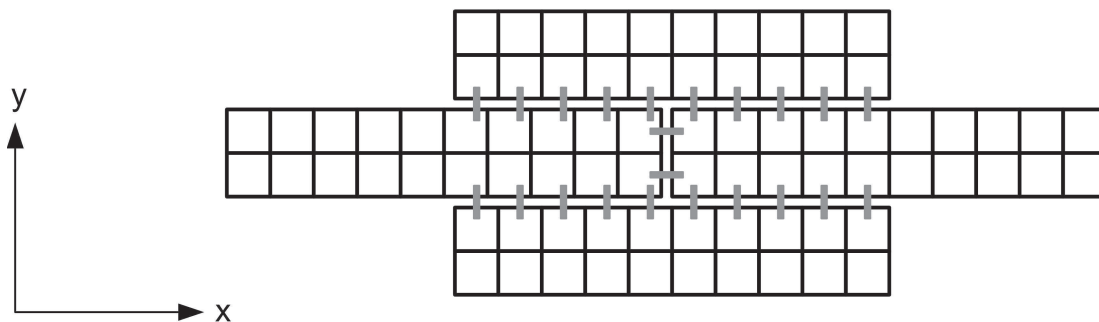
Die räumliche Diskretisierung wurde mit  $\Delta x = \Delta y = 10 \mu\text{m}$  so gewählt, dass Untereinheiten der Zellen aufgelöst und geometrische Veränderungen von Länge und Durchmesser simuliert werden konnten. Alle Zellen wurden als zylinderförmig angenommen (siehe Abbildung 5).





**Abbildung 5.** Die Zellen des Modells wurden als geometrische Zylinder aufgefasst und räumlich in  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  große Segmente in  $x$ - und  $y$ -Richtung ( $\Delta x$  und  $\Delta y$ ) diskretisiert. Die Länge der abgebildeten Zelle beträgt  $80\ \mu\text{m}$ , ihr Durchmesser ( $d$ ) beträgt  $20\ \mu\text{m}$ .

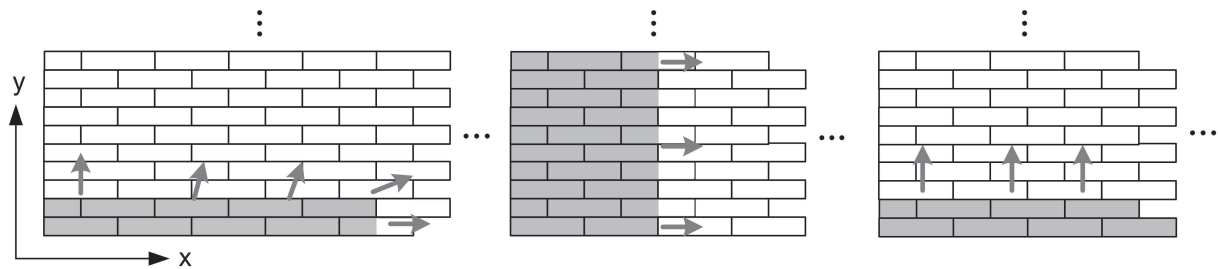
Die zweidimensionale Zellanordnung, entsprechend einer Einzelzellschicht, wird in Abbildung 6 veranschaulicht.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung von in der  $x$ - $y$ -Ebene liegenden Zellen. *Quadrate* stellen einzeln simulierte Zellsegmente der Größe  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  dar. Die *grauen Balken* zwischen den Zellen entsprechen den Gap-Junctions, welche als ohmsche Widerstände simuliert wurden.

Für die Simulationen wurde eine Monozellschicht der Größe  $4\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$  bis  $8\ \text{mm} \times 8\ \text{mm}$  gewählt, was einem Gewebeverband von bis zu 40.000 Zellen entsprach. Die Maße wurden so gewählt, dass Randeffekte keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Die zeitliche Auflösung aller Simulationen entsprach  $\Delta t = 0,001\ \text{ms}$  (1 MHz). Eine höhere zeitliche Auflösung wurde vorher getestet. Sie änderte die Ergebnisse jedoch nicht.

Für die Analyse elliptischer Ausbreitungswellen wurden Zellen in der Nähe des Koordinatenursprungs stimuliert, so dass die sich ergebende Welle dem Viertel einer Ellipse entsprach. Um eine planare Erregungsausbreitungswelle in longitudinaler und transversaler Richtung zu erhalten, wurden die Zellen am linken beziehungsweise unteren Rand der Gewebeschicht stimuliert (siehe Abbildung 7).



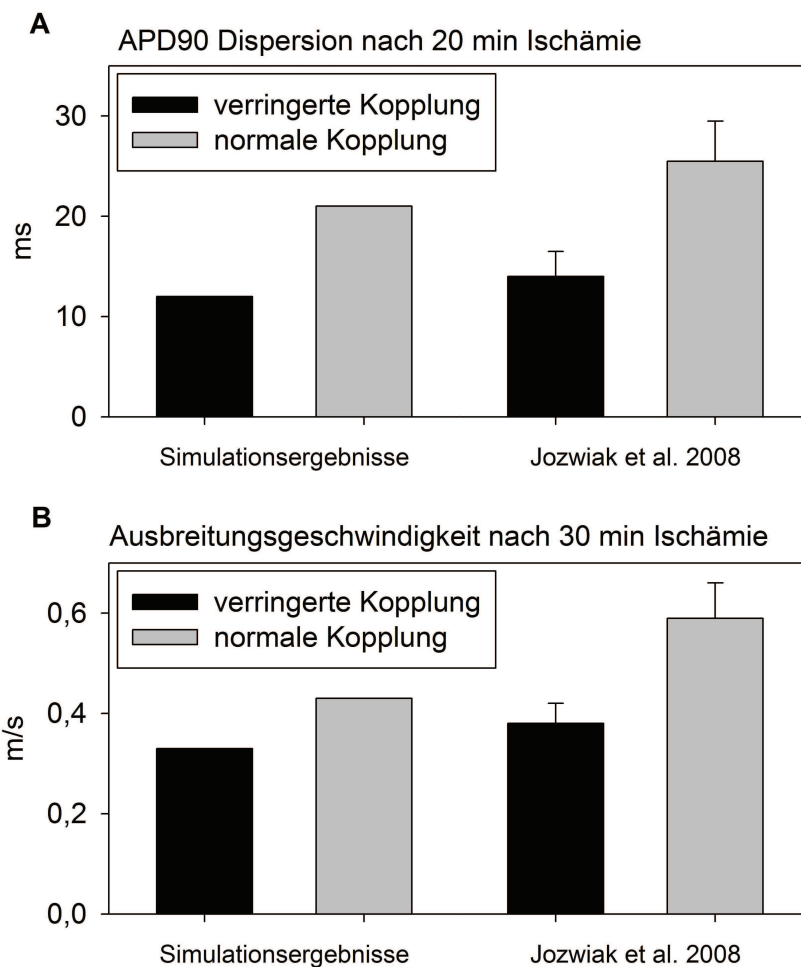
**Abbildung 7.** Schematische Darstellung der Stimulationsbereiche (*grau*), die zur Erregungsausbreitung elliptischer Wellen (*links*) sowie longitudinaler (*Mitte*) und transversaler (*rechts*) planarer Wellen führten. *Graue Pfeile* verdeutlichen die Ausbreitungsrichtungen der Erregung.

### 1.3.3 Validierung des Modells

Zur Validierung des Modells wurden die zellulären Parameter und Parameter des Gewebes (Eingabewerte) mit zahlreichen Daten aus der Literatur abgeglichen [1, 2, 7, 9, 23, 34, 38, 39, 43, 45, 46, 51, 61, 62, 65, 69, 86, 88, 89]. Im Anschluss daran wurden Ergebnisse des Modells unter gesunden Bedingungen (gesundes Myokard) mit Ergebnissen ähnlicher Modelle [68, 70] und mit experimentellen Daten [7, 9, 34, 45, 88, 89] verglichen. In allen Bereichen wurde eine hohe Übereinstimmung gefunden. So lag beispielsweise die Ausbreitungsgeschwindigkeit, die anhand des Modells in gesundem Myokard berechnet wurde, longitudinal bei 59 cm/s und transversal bei 16 cm/s. In Experimenten betragen die Geschwindigkeiten meist 40 cm/s bis 60 cm/s longitudinal und 15 cm/s bis 25 cm/s transversal [9, 34, 45, 88].

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob das Modell auch dann experimentellen Daten standhält, wenn pathologische Veränderungen simuliert werden. Hierzu wurden Ischämiezonen eines Durchmessers von 5 mm bis 10 mm simuliert und die Erregungsausbreitung sowie die Erregungsrückbildung hinsichtlich Geschwindigkeit, Aktionspotentialdauer und Anzahl erregter Zellen analysiert. Die Simulationsergebnisse wurden im Anschluss mit experimentellen Daten verglichen, die von Mapping-Experimenten an ischämischen Herzen von Kaninchen stammten [32]. Die hohe Übereinstimmung, die zwischen Experiment und Modell gefunden wurde (siehe Abbildung 8), lässt auf eine gute Parameterwahl und Robustheit des Modells schließen, denn selbst die komplexen Auswirkungen einer kardialen Ischä-

mie konnten adäquat abgebildet werden. Die Ergebnisse hierzu wurden bereits öffentlich vorgestellt [63].



**Abbildung 8.** Die obere Abbildung (**A**) zeigt die Dispersion (Standardabweichung) der Aktionspotentialdauer<sup>5</sup> (APD90) in der Randzone des Ischämiebereichs 20 min nach Beginn der Ischämie. Die untere Abbildung (**B**) zeigt die longitudinale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit in der Randzone des Ischämiebereichs 30 min nach Beginn der Ischämie. In der Simulation (*links*) und im Experiment (*rechts*) zeigten sich jeweils annähernd gleiche Werte. Die experimentellen Daten entstammen der Studie von Jozwiak et al. [32]. Die Simulationsergebnisse wurden mit Hilfe des Modells gewonnen, welches in dieser Arbeit verwendet wurde [63].

### 1.3.4 Simulation und Analyse der Erregungsausbreitung

Zur Analyse aller im folgenden geschilderten Simulationen wurden die Aktivierungszeitpunkte aller Zellen und subzellulären Segmente aufgezeichnet. Als Aktivierungszeitpunkt wurde der Zeitpunkt während des Aktionspotentialaufstrichs definiert, zu dem die Leitfähigkeit des

<sup>5</sup> In der zitierten Studie von Jozwiak et al. [32] wurden Mapping-Experimente mit 256 Kanälen durchgeführt, mit deren Hilfe der Zeitraum zwischen Beginn der Aktivierung und Ende der Aktivierungsrückbildung (ARI = „activation-recovery interval“) bestimmt wurde. Dieser Zeitraum entspricht der Aktionspotentialdauer.

schnellen Natriumstroms ( $I_{Na}$ )  $\geq 50$  % des Maximums betrug ( $m$ -Gate  $\geq 0,5$ ). Des Weiteren erfolgte eine Analyse interzellulärer und intrazellulärer Ströme und Ladungsverschiebungen sowie die Aufzeichnung von maximaler Anstiegsgeschwindigkeit (Aufstrich) des Aktionspotentials, Ruhemembranpotential und maximalem Wert des Membranpotentials. Zum Zwecke der Auswertung wurden die Daten in einer relationalen Datenbank gespeichert und mit Hilfe der Abfragesprache SQL ausgewertet.

### Zellgröße

Um Effekte der Zellgröße zu untersuchen, wurden normale Zellen (Länge / Durchmesser: 80  $\mu\text{m}$  / 20  $\mu\text{m}$ ) als Kontrolle definiert [51, 61, 62] und entweder der Zelldurchmesser auf 40  $\mu\text{m}$  (breite Zellen) oder die Zelllänge auf 160  $\mu\text{m}$  (lange Zellen) erhöht. Geometrische Parameter können Tabelle 3 entnommen werden.

	$l$	$d$	$A_m$	$V$	$C$	$A_m/V$
Normale Zellen	80 $\mu\text{m}$	20 $\mu\text{m}$	5655 $\mu\text{m}^2$	25133 $\mu\text{m}^3$	113 pF	0.225 $\mu\text{m}^{-1}$
Breite Zellen	80 $\mu\text{m}$	40 $\mu\text{m}$	12566 $\mu\text{m}^2$	100531 $\mu\text{m}^3$	251 pF	0.125 $\mu\text{m}^{-1}$
Lange Zellen	160 $\mu\text{m}$	20 $\mu\text{m}$	10681 $\mu\text{m}^2$	50265 $\mu\text{m}^3$	214 pF	0.213 $\mu\text{m}^{-1}$

**Tabelle 3.** Geometrische Parameter und Kapazität von normalen und vergrößerten Zellen.  $l$ , Länge;  $d$ , Durchmesser;  $A_m$ , geometrische Membranfläche;  $V$ , Volumen;  $C$ , Kapazität;  $A_m/V$ , Verhältnis von Membranfläche zu Volumen.

In diesem Zusammenhang musste entschieden werden, ob bei einer Vergrößerung der Zellen – und somit der Zellmembranfläche – die Anzahl an funktionellen Gap-Junctions proportional zur Zellmembran mitwachsen sollte, oder ob die Anzahl funktioneller Gap-Junctions konstant bleiben sollte. Im ersten Fall würde das Verhältnis zwischen Gap-Junction-Leitfähigkeit und Membranfläche sowie -kapazität konstant bleiben (Annahme I). Im zweiten Fall würde nur die absolute Leitfähigkeit konstant bleiben, das Verhältnis zwischen Gap-Junction-Leitfähigkeit und Membranfläche sowie -kapazität sich jedoch verringern (Annahme II). Experimentelle Daten zeigen, dass in hypertrophem Herzgewebe sowohl Annahme I als auch Annahme II zutreffen können [2, 16, 38, 39, 51, 52, 61]. Aus diesem Grund wurden beide Fälle simuliert (siehe Tabellen 4 und 5) und die Ergebnisse verglichen.

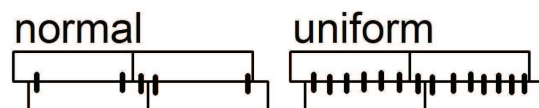
	Annahme I	Annahme II
Anzahl der Gap-Junctions pro Zelle	$\sim A_m$	konstant
Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ )	$\sim A_m$	konstant

**Tabelle 4.** Bei einer Vergrößerung des Zelldurchmessers oder der Länge wurden jeweils zwei verschiedene Annahmen gemacht. Annahme I ging davon aus, dass die Anzahl und die Leitfähigkeit der Gap-Junctions proportional zur Membranfläche ( $A_m$ ) größer wird. Annahme II ging davon aus, dass beide Werte jeweils konstant bleiben.

#### Gap-Junction-Leitfähigkeit und -Lateralisierung

Um den Einfluss von Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) und -Lateralisierung auf die Erregungsausbreitung zu untersuchen, wurden zuerst die als normal definierten Zellen (polare  $g_{GJ}$  3,7  $\mu$ S, laterale  $g_{GJ}$  2,6  $\mu$ S) analysiert. Anschließend wurde auf der Basis experimenteller Daten [49, 61, 64] die laterale  $g_{GJ}$  auf bis zu 13  $\mu$ S erhöht. Unter beiden Bedingungen (normale und erhöhte laterale  $g_{GJ}$ ) wurde jeweils eine normale geometrische Verteilung der Gap-Junctions (Konzentration in der Nähe des Zellpols) als auch eine pathologischen Bedingungen entsprechende [2, 38, 49, 51] uniforme Verteilung simuliert, d. h. eine gleichmäßige Verteilung entlang der lateralen Zellmembran (siehe Abbildung 9). Auch hier wurden demnach zwei Fälle unterschieden, weil eine Erhöhung der histologisch bestimmten lateralen Gap-Junction-Menge einerseits allein durch Umverteilung der im Polbereich vorhandenen Gap-Junctions hin zu den Seiten, andererseits auch durch eine Neubildung lateraler Gap-Junctions möglich ist [2, 49, 53, 59, 61].

Gap-Junctions wurden stets als passive ohmsche Widerstände simuliert, weil aktive Effekte im Rahmen des sogenannten Gap-Junction-Gatings erst ab einem Zeitraum von 200 ms bis 2000 ms möglich wären und zudem umstritten ist, ob sie überhaupt einen Effekt auf die Erregungsausbreitung besitzen [12, 24, 84]. Da in dieser Arbeit allein die Erregungsausbreitung (weniger als 100 ms) untersucht wurde, konnten derartige Effekte vernachlässigt werden.



**Abbildung 9.** Normale (*links*) und uniforme (*rechts*) Verteilung der lateralen Gap-Junctions (*schwarze Balken*) entlang der lateralen Zellmembran. Die *Rechtecke* symbolisieren die in der *x-y*-Ebene liegenden Zellen.

### Simulation gesunder und pathologischer Bedingungen

Alle genannten Zell- und Gewebeparameter wurden unter als gesund definierten Bedingungen (hohe Homogenität, 100 % interzelluläre Kopplung bzw. 100 %  $g_{GJ}$ , 100 % Erregbarkeit, planare Ausbreitung der Erregungswelle) simuliert und untereinander verglichen. Die als 100 % Kopplung bzw. 100 %  $g_{GJ}$  definierten zellulären Parameter können Tabelle 5 entnommen werden.

	$g_{IC}$		$g_{GJ}$		$g_{GJ}/C$	$R_{GJ}/R_{IC}$		$\rho$	
	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>T</i>		<i>L</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>T</i>
	( $\mu S$ )	( $\mu S$ )	( $\mu S$ )	( $\mu S$ )		( $nS/pF$ )			( $\Omega cm$ )
Normale Zellen	2,6	42	3,7	2,6	111	0,7	16	256	2575
Breite Zellen I	10,5	42	8,2	5,8	111	1,3	7	341	1242
Breite Zellen II	10,5	42	3,7	2,6	50	2,8	16	575	2575
Lange Zellen I	1,3	84	7,0	4,9	111	0,2	17	178	2716
Lange Zellen II	1,3	84	3,7	2,6	59	0,4	32	203	5000
GJ-Lateralisierung	2,6	42	3,7	13,0	295	0,7	3	256	635

**Tabelle 5.** Elektrophysiologische Parameter bei 100 % Kopplung (= 100 %  $g_{GJ}$ ). *L*, longitudinal; *T*, transversal;  $g_{IC}$ , intrazelluläre Leitfähigkeit;  $g_{GJ}$ , Gap-Junction-Leitfähigkeit;  $g_{GJ}/C$ , Verhältnis von gesamter zellulärer  $g_{GJ}$  zur Zellkapazität;  $R_{GJ}/R_{IC}$ , Verhältnis von Gap-Junction-Widerstand zu intrazellulärem Widerstand;  $\rho$ , spezifischer Gewebewiderstand; *I*, Annahme I; *II*, Annahme II; *GJ*, Gap-Junction.

Im Anschluss wurde jeweils schrittweise eine elektrische Entkopplung der Zellen durchgeführt, was mittels einer Erhöhung der elektrischen Gap-Junction-Widerstände simuliert wurde und somit zu einer Verringerung der Gap-Junction-Ströme führte. Der Grad der Entkopplung, welcher zum Ausbleiben der Erregungsweiterleitung (Leitungsblock) führte, wurde aufgezeichnet. Auch das Verhalten der longitudinalen und transversalen Geschwindigkeiten und Veränderungen der anisotropen Eigenschaften wurden analysiert. Diese Daten dienten dazu, eine Aussage über die Anfälligkeit der verschiedenen Bedingungen gegenüber zellulärer Entkopplung, wie sie z. B. bei Azidose auftritt [23], zu treffen.

Um eine Verringerung der Erregbarkeit der Zellen zu simulieren, wurde die maximale Leitfähigkeit des schnellen Natriumeinstroms ( $I_{Na}$ ) von 100 % (16 mS/ $\mu F$ ) graduell bis auf Werte unter 15 % reduziert.

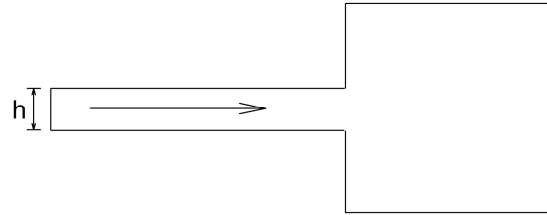
### *Erhöhung der strukturellen Inhomogenität*

Neben Inhomogenitäten der Aktionspotentialdauer und -form [32], treten in geschädigtem oder krankhaftem Myokard strukturelle Inhomogenitäten auf, beispielsweise durch Fibrose [6, 13, 17, 71]. Diese können zur partiellen Entkopplung von Gewebebereichen führen. Um derartige Veränderungen zu modellieren, wurden die Zellen so initialisiert, dass Bereiche hoher interzellulärer Kopplung (hohe Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung) in enger Nachbarschaft zu Bereichen verringerter Kopplung (geringe Geschwindigkeit) simuliert werden konnten. Auswirkungen auf das elektrophysiologische Verhalten wurden unter verschiedenen Bedingungen (Zellgröße, Gap-Junction-Verteilung) analysiert.

### *Provokation unidirektionaler Leitungsblöcke*

Sogenannte Current-Source-Current-Sink-Mismatches (Missverhältnisse zwischen Stromquellen und -senken) können zu einem unidirektionalen Leitungsblock führen. Ein akzeptiertes Modell zur Untersuchung derartiger Phänomene, ist die Gewebeexpansion [19, 35, 58]. Darunter versteht man in diesem Zusammenhang eine abrupte Erweiterung des Gewebedurchmessers, welche zum Übergang von planarer zu elliptischer Ausbreitung der Erregungswelle führt. Dies kann z. B. als Folge eines nicht erregbaren Bereiches oder eines anatomischen Hindernisses auftreten [20].

Um die Anfälligkeit der simulierten Bedingungen für einen Leitungsblock zu bestimmen, wurde der minimale Durchmesser  $h$  des schmalen Gewebestreifens bestimmt, welcher gerade noch ausreichte, um die Erregungsleitung im Bereich des größeren Gewebedurchmessers aufrecht zu erhalten (siehe Abbildung 10). Je größer  $h$  war, desto größer war folglich das Risiko für einen Leitungsblock.



**Abbildung 10.** Schematische Darstellung der Simulation einer Erweiterung des Gewebedurchmessers (Gewebeexpansionsmodell). Im Bereich der Durchmessererweiterung kommt es zum Übergang einer planaren Erregungswelle in eine elliptische Erregungswelle.  $h$  bezeichnet den Durchmesser des in den nicht erregten Bereich (*rechts*) führenden Gewebestranges. Der *Pfeil* verdeutlicht die Richtung der Erregungsausbreitung. Innerhalb des Gewebestranges ist die Erregungsausbreitung noch planar (ungekrümmte Erregungsfront). Im Bereich der Gewbeerweiterung entsteht eine Krümmung der Erregungsfront und die Ausbreitungsform wird elliptisch.

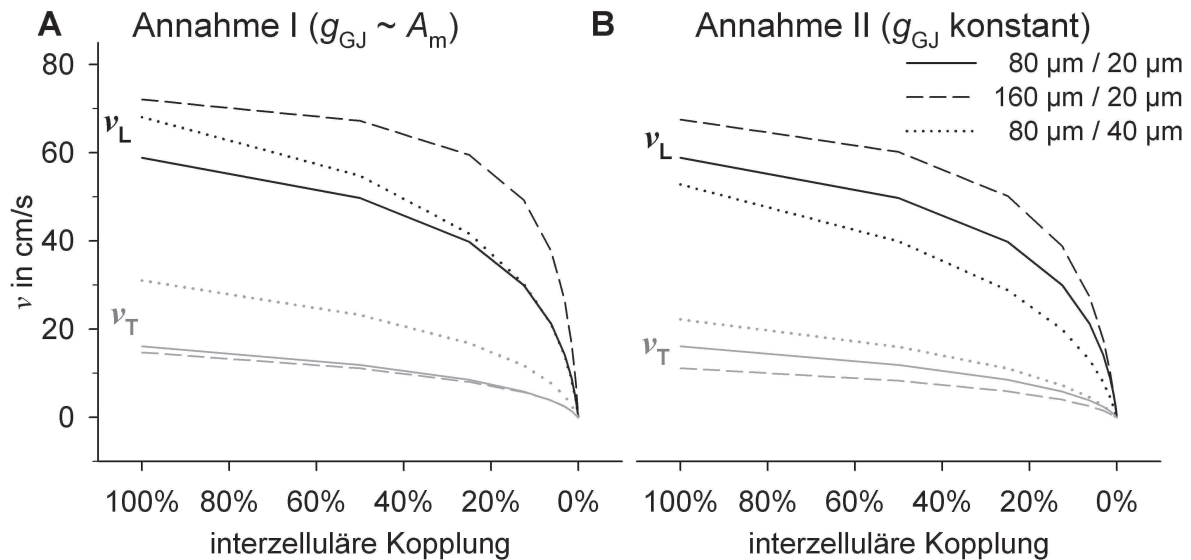


## 1.4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zusammengefasst, dargestellt und interpretiert. Da eine Zielsetzung der Arbeit darin bestand, kausale Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern aufzudecken, haben die Ergebnisse selbst oft einen erklärenden Charakter. Zusätzliche Details sind in der Publikation sowie im Supporting Material im Anhang zu finden.

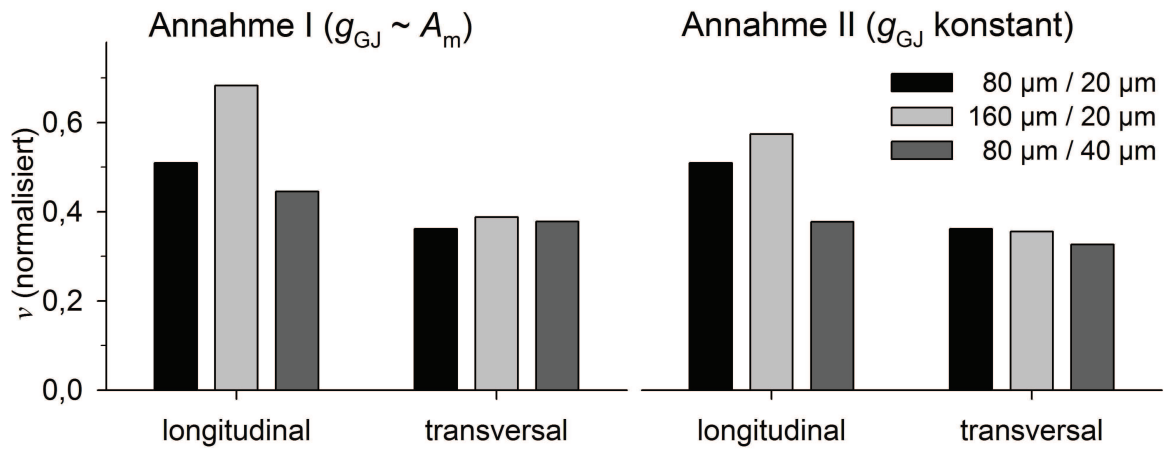
### 1.4.1 Einfluss der Zellgröße auf die Erregungsausbreitung

Die Analyse der Erregungsausbreitung von normalen Zellen (80  $\mu\text{m}$  lang und 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser) im Vergleich zu breiten Zellen (80  $\mu\text{m}$  lang und 40  $\mu\text{m}$  Durchmesser) zeigte, dass sich die longitudinale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit im Gewebe ( $v_L$ ) von rund 59 cm/s auf 68 cm/s erhöhte. Dies geschah allerdings nur, wenn proportional zur Zunahme der Zellkapazität auch die Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) erhöht wurde (Annahme I, siehe Abbildung 11A). Im Gegensatz dazu verringerte sich  $v_L$  in breiten Zellen auf 52 cm/s, wenn die Leitfähigkeit unverändert blieb (Annahme II, siehe Abbildung 11B).

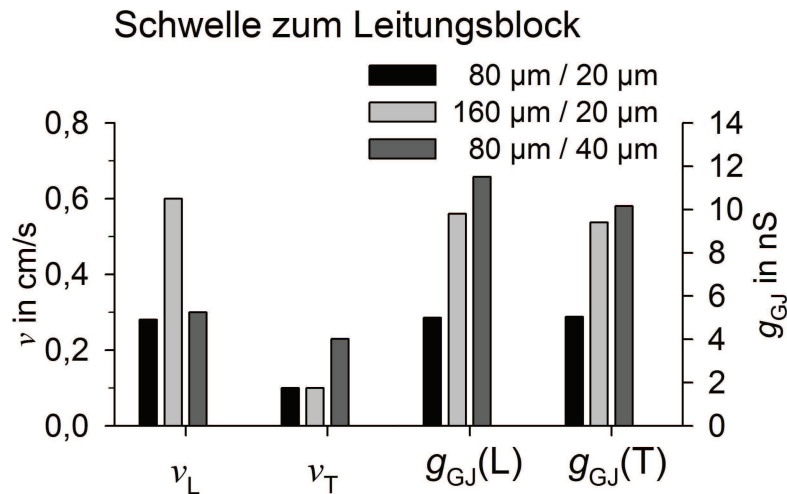


**Abbildung 11.** Dargestellt sind die Ausbreitungsgeschwindigkeiten in longitudinaler Richtung ( $v_L$ , schwarz) und in transversaler Richtung ( $v_T$ , grau), die im simulierten Gewebe unter gradueller Reduktion der interzellulären Kopplung bestimmt wurden. Dabei wurde die Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) schrittweise von 100 % bis zum Auftreten eines Leitungsblocks reduziert. Normale Zellen (Länge / Durchmesser: 80  $\mu\text{m}$  / 20  $\mu\text{m}$ , durchgehende Linien), lange Zellen (160  $\mu\text{m}$  / 20  $\mu\text{m}$ , gestrichelte Linien) und breite Zellen (80  $\mu\text{m}$  / 40  $\mu\text{m}$ , gepunktete Linien) wurden simuliert. Die Veränderung der Zellgrößen geschah entweder unter Annahme I (A), d. h.  $g_{GJ}$  war proportional zur Membranfläche ( $A_m$ ), oder unter Annahme II (B), d. h.  $g_{GJ}$  war bei allen Zellgrößen konstant.

Ein Unterschied bestand außerdem im Verhalten der Geschwindigkeit bei gradueller Entkopplung der Gap-Junctions:  $v_L$  verringerte sich in breiten Zellen (Annahme I und Annahme II) signifikant schneller als in normalen Zellen, so dass  $v_L$  selbst unter Annahme I bei weniger als 20 % Kopplung geringer war als in normalen Zellen (unter 40 cm/s). Ein Leitungsblock trat bereits bei signifikant höherer  $g_{GJ}$  auf (normale Zellen: 5 nS, breite Zellen: 12 nS). Interessanterweise hatte eine Vergrößerung der Zelllänge auf 160  $\mu\text{m}$  bei unverändertem Durchmesser (20  $\mu\text{m}$ ) unter beiden Annahmen (I und II) zunächst einen ähnlichen Effekt auf  $v_L$  (ca. 70 cm/s) wie eine Zunahme des Zelldurchmessers unter Annahme I. Bei gradueller Entkopplung zeigte sich aber, dass  $v_L$  wesentlich stabiler war und nur sehr langsam abfiel (siehe Abbildung 12). Allerdings trat auch in langen Zellen bereits bei höherer  $g_{GJ}$  ein Leitungsblock auf (10 nS) als in normalen Zellen (5 nS, siehe Abbildung 13).



**Abbildung 12.** Gezeigt wird die relative Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v$ ) in longitudinaler und in transversaler Richtung bei einer Reduktion der Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) um 75 % im Vergleich zum Ausgangswert (normalisiert auf die Geschwindigkeit bei normaler  $g_{GJ}$ ). Es wurden normale Zellen (Länge / Durchmesser: 80  $\mu$ m / 20  $\mu$ m, *schwarz*), lange Zellen (160  $\mu$ m / 20  $\mu$ m, *hellgrau*) und breite Zellen (80  $\mu$ m / 40  $\mu$ m, *dunkelgrau*) untersucht. Man erkennt deutlich die verstärkte Abnahme der longitudinalen Geschwindigkeit in breiten Zellen, unabhängig davon, ob Annahme I (**A**) oder Annahme II (**B**) zugrunde lag.  $A_m$ , Zellmembranfläche.



**Abbildung 13.** Die Schwelle zum Leitungsblock wurde bestimmt, indem die Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) graduell reduziert wurde. Die minimale  $g_{GJ}$  repräsentiert die kleinstmögliche longitudinale ( $L$ ) oder transversale ( $T$ ) Leitfähigkeit der Zelle, bei der noch Aktionspotentiale weitergeleitet wurden. Die entsprechenden minimalen Geschwindigkeiten in longitudinaler ( $v_L$ ) und transversaler Richtung ( $v_T$ ) werden ebenfalls gezeigt. Simuliert wurden wiederum normale Zellen (Länge / Durchmesser: 80 µm / 20 µm, *schwarz*), lange Zellen (160 µm / 20 µm, *hellgrau*) und breite Zellen (80 µm / 40 µm, *dunkelgrau*). Es wird deutlich, dass ein Leitungsblock bei vergrößerten Zellen bereits bei höheren Leitfähigkeiten und Geschwindigkeiten auftritt. Annahme I und Annahme II zeigten die gleichen Werte, weil nur die Zellgröße (d. h. die Zellkapazität) entscheidend war.

Diese Ergebnisse können als eine erhöhte Anfälligkeit bzw. Sensitivität breiter Zellen gegenüber Entkopplung interpretiert werden. Im Gegensatz dazu weisen lange Zellen eine stabile Erregungsausbreitung auf. Was das Risiko für das Entstehen eines Leitungsblockes betrifft, wirken sich jedoch sowohl eine Vergrößerung der Länge als auch des Durchmessers der Zellen negativ aus.

Eine tiefer gehende Analyse zeigte, dass zwei Mechanismen für die erhöhte Anfälligkeit der breiten Zellen (großer Durchmesser) verantwortlich waren: Ein verändertes Verhältnis von Zelllänge zu Zelldurchmesser einerseits und eine erhöhte Zellkapazität andererseits.

Es stellte sich heraus, dass das entscheidende Kriterium für das Verhalten während leichter Entkopplung ( $> 25\%$  von  $g_{GJ}$ ) das Verhältnis von Zelllänge zu Zelldurchmesser ist. Je kleiner dieses Verhältnis in longitudinaler bzw. transversaler Richtung ist, desto instabiler ist die longitudinale bzw. transversale Ausbreitungsgeschwindigkeit. Dies kann wie folgt erklärt werden: Je größer der Zelldurchmesser ist, desto geringer ist der intrazelluläre Widerstand (siehe auch Tabelle 5) und desto höher wird folglich der Anteil des Gap-Junction-Widerstandes ( $= 1 / g_{GJ}$ ) am Gesamtwiderstand ( $R_{ges} = R_{GJ} + R_{IZ}$ )<sup>6</sup>. Wenn nun der Gap-Junction-Widerstand

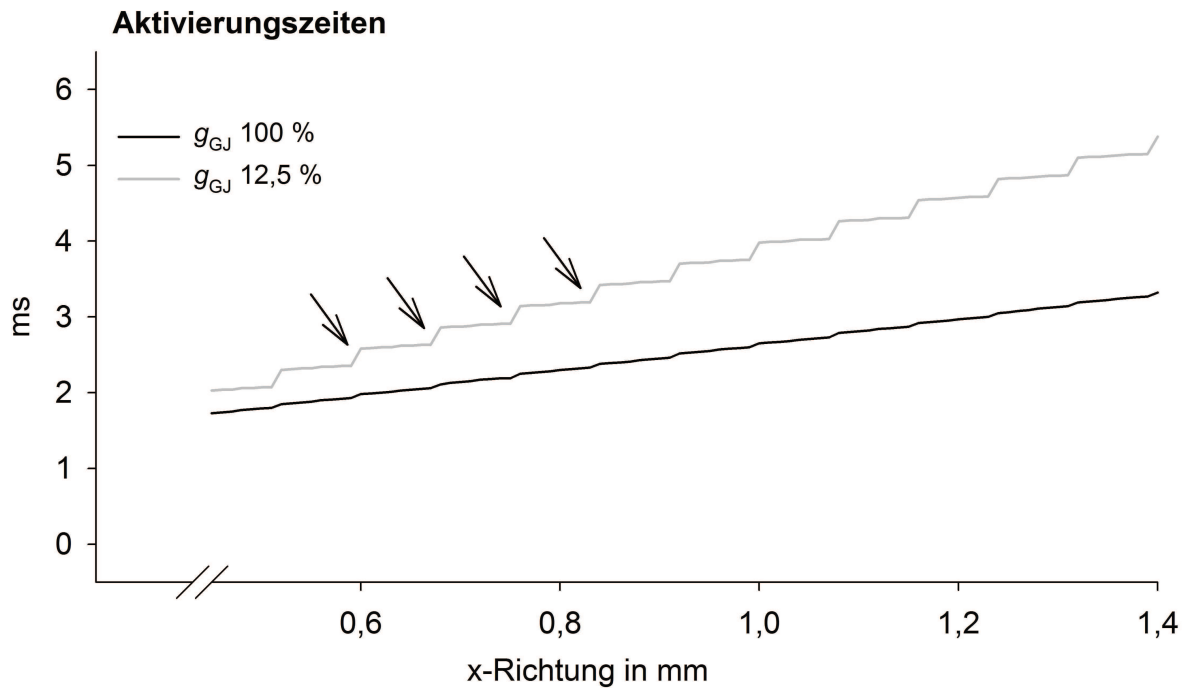
<sup>6</sup>  $R_{ges}$ : Gesamtwiderstand einer Zelle in entweder longitudinaler oder transversaler Richtung  $R_{GJ}$ : Gap-Junction-Widerstand,  $R_{IZ}$ : intrazellulärer Widerstand

erhöht wird (Entkopplung), erhöht sich der Gesamtwiderstand um einen höheren Anteil als es bei einem höheren intrazellulärem Widerstand der Fall wäre. Die Folge ist, dass bei Entkopplung die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit verhältnismäßig schneller abnimmt, also weniger stabil ist.

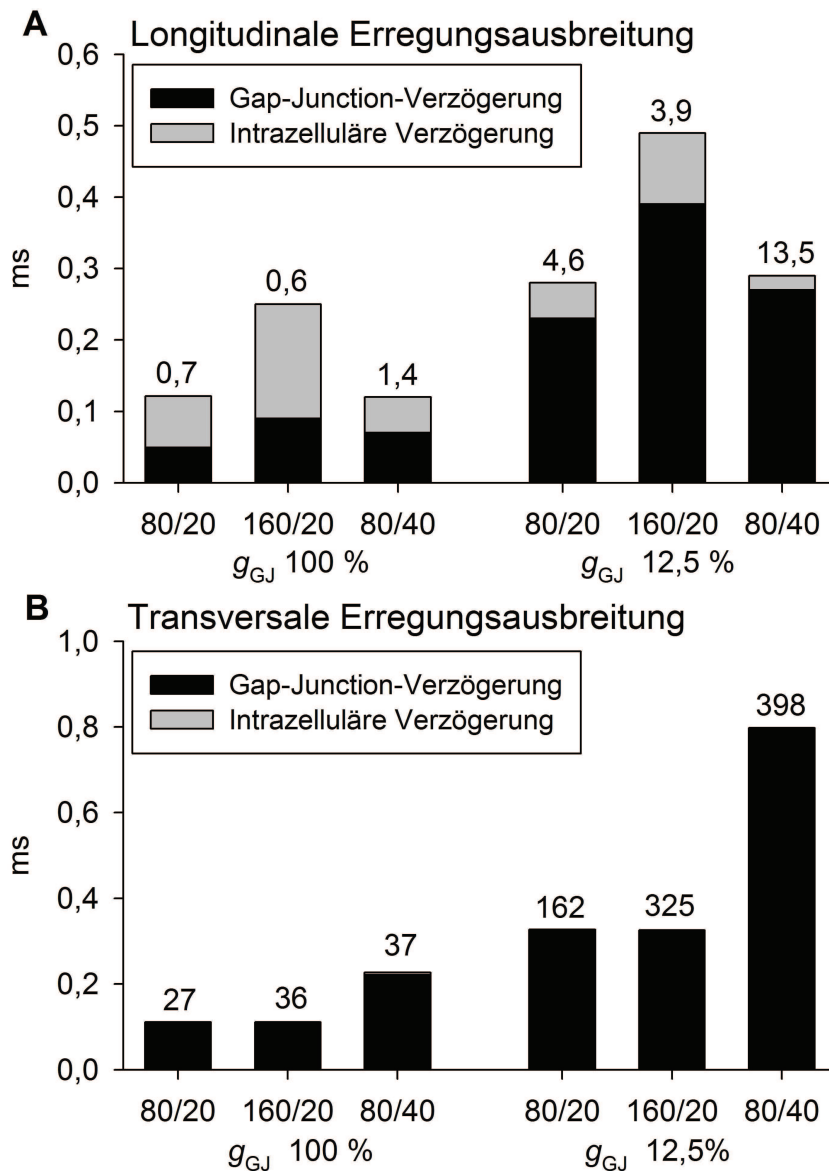
Gleichzeitig steigt mit zunehmendem Zelldurchmesser auch die Kapazität der Zelle, weil die Membranfläche zunimmt. Die Membranfläche und die Kapazität wachsen nahezu proportional zum Radius  $r$ , während aber die axiale Querschnittsfläche der Zelle proportional zu  $r^2$  wächst. Der intrazelluläre Widerstand fällt entsprechend stärker ab als die Kapazität der Zelle zunimmt. Damit lassen sich die Unterschiede zwischen Annahme I (Verhältnis aus  $g_{GJ}$  und Kapazität konstant) und Annahme II ( $g_{GJ}$  konstant) erklären: Da unter Annahme I das Verhältnis aus  $g_{GJ}$  und Zellkapazität konstant blieb, bewirkte die Vergrößerung des Zelldurchmessers eine starke Reduktion des Gesamtwiderstandes (sowohl der Gap-Junction- als auch der intrazelluläre Widerstand waren erniedrigt). Daher erhöhte sich die Geschwindigkeit von 59 cm/s (normale Zellen) auf 68 cm/s. Auch unter Annahme II verringerte sich der Gesamtwiderstand, weil  $g_{GJ}$  konstant blieb und durch den größeren Zelldurchmesser der intrazelluläre Widerstand ebenso wie unter Annahme I kleiner wurde. Die Reduktion des Gesamtwiderstandes war aber weniger stark ausgeprägt und konnte nicht die Zunahme der Zellkapazität kompensieren. Dies bewirkte, dass die Geschwindigkeit von 59 cm/s (normale Zellen) auf 52 cm/s abfiel. Da aber Zellen mit erhöhtem Durchmesser, d. h. verringertem Länge-Durchmesser-Verhältnis, selbst unter Annahme I ein größeres Verhältnis von Gap-Junction-Widerstand zu intrazellulärem Widerstand aufweisen, fiel die Geschwindigkeit bei gradueller Entkopplung unter beiden Annahmen (I und II) schneller ab als in normalen Zellen (siehe Abbildungen 11 und 12).

Eine weitere Folge eines verringerten Länge-Durchmesser-Verhältnisses ist, dass die Zellen schneller (d. h. schon bei hohen Gap-Junction-Leitfähigkeiten) von der kontinuierlichen zur diskontinuierlichen Erregungsausbreitung übergehen und dadurch Effekte der Zellkapazität eher zum Tragen kommen. Unter diskontinuierlicher Erregungsausbreitung versteht man eine Aktivierung der Zellen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, d. h., dass die elektrische Kapazität jeder Zelle als Einheit fungiert und zufließende Ströme nur dann ein Aktionspotential induzieren können, wenn sie ausreichen, um die gesamte Zellkapazität auf das Schwellenpotential aufzuladen. Im Normalfall ist die Erregungsleitung aber kontinuierlich, d. h., dass zunächst nur ein Teil der Zelle aktiviert ist, sich in diesem Teil die Natriumkanäle öffnen, und jede Zelle auf diese Weise zu ihrer eigenen Depolarisation beiträgt (siehe Abbildungen 14 und 15). Findet dies – wie bei diskontinuierlicher Leitung – nicht mehr statt, wird der Einfluss der

Zellkapazität größer, denn die Zellkapazität ist die kleinste kapazitive Einheit, die von zufließenden Strömen auf das Schwellenpotential aufgeladen werden muss. Folglich sind große Zellen mit großer Kapazität von einer Reduktion der interzellulären Ströme stärker betroffen als kleine Zellen mit kleinen Kapazitäten. In der Folge tritt eine starke Reduktion der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit auf. Das entscheidende Kriterium für das Verhalten während starker Entkopplung ( $< 25\%$  von  $g_{GJ}$ ) ist demnach die Zellkapazität, weil bei sehr hohem Gap-Junction-Widerstand der Anteil des intrazellulären Widerstandes vernachlässigbar klein wird und dadurch Effekte des Länge-Durchmesser-Verhältnisses wegfallen. Die minimale Leitfähigkeit, die zur Aufrechterhaltung der Erregungsleitung notwendig war (Schwelle zum Leitungsblock), war sowohl bei langen als auch bei breiten Zellen höher als in normalen Zellen und korrelierte positiv mit den Kapazitäten: Die minimale Leitfähigkeit war 12 nS, 10 nS und 5 nS in breiten, langen und normalen Zellen, während die Zellkapazitäten entsprechend 251 pF, 214 pF und 113 pF waren. Konstant war somit das Verhältnis von Leitfähigkeit zu Kapazität, bei dem ein Leitungsblock auftrat: 45 pS/pF.



**Abbildung 14.** Dargestellt sind die Aktivierungszeiten in subzellulärer Auflösung (alle  $10\ \mu\text{m}$ ) während longitudinaler Erregungsausbreitung in normalen Zellen (Länge / Durchmesser:  $80\ \mu\text{m} / 20\ \mu\text{m}$ ). Die x-Richtung entspricht der Längsachse der Zellen. Die Erregungsausbreitung wurde einmal bei hoher Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ} 100\%$ , *schwarze Linie*) und einmal bei partieller Entkopplung ( $g_{GJ} 12,5\%$ , *graue Linie*) analysiert. *Pfeile* markieren beispielhaft die interzelluläre Verzögerung bei partieller Entkopplung. Man erkennt deutlich die hohe Kontinuität der Erregungsausbreitung bei hoher  $g_{GJ}$  und die Diskontinuität mit vergrößerten interzellulären Verzögerungen und kurzen intrazellulären Verzögerungen bei niedriger  $g_{GJ}$ .



**Abbildung 15.** Dargestellt sind die Verzögerungen der Erregungsausbreitung entlang der Gap-Junctions (*schwarz*) sowie innerhalb der Zellen (*grau*) in longitudinaler Richtung (**A**) und in transversaler Richtung (**B**). Die intrazelluläre Verzögerung ist die Zeitdauer vom Beginn der Aktivierung einer Zelle bis zur vollständigen Aktivierung der Zelle. Die Gap-Junction-Verzögerung ist die Zeitdauer von der vollständigen Aktivierung einer Zelle bis zum Beginn der Aktivierung der Folgezelle. Aktivierung wurde definiert als die 50prozentige Öffnung der schnellen Natriumkanäle ( $m\text{-Gate} \geq 0,5$ ). Die Zahlen über den Balken repräsentieren das Verhältnis von Gap-Junction- zu intrazellulärer Verzögerung und stellen ein Maß für die Diskontinuität dar. Bei longitudinaler Ausbreitung ist deutlich der Unterschied zwischen hoher (100 %) und niedriger (12,5 %) Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) zu erkennen, ebenso wie der Unterschied zwischen breiten (80/40) und normalen (80/20) bzw. langen (160/20) Zellen<sup>7</sup>. In transversaler Richtung ist bereits bei hoher  $g_{GJ}$  ein hoher Grad an Diskontinuität vorhanden (intrazelluläre Verzögerungen nahezu Null und daher in Abb. B nicht erkennbar). Dies erklärt, warum der Effekt einer Zellvergrößerung auf den Abfall der longitudinalen Geschwindigkeit bei Entkopplung stärker ist als auf die transversale Geschwindigkeit (siehe Abbildung 12).

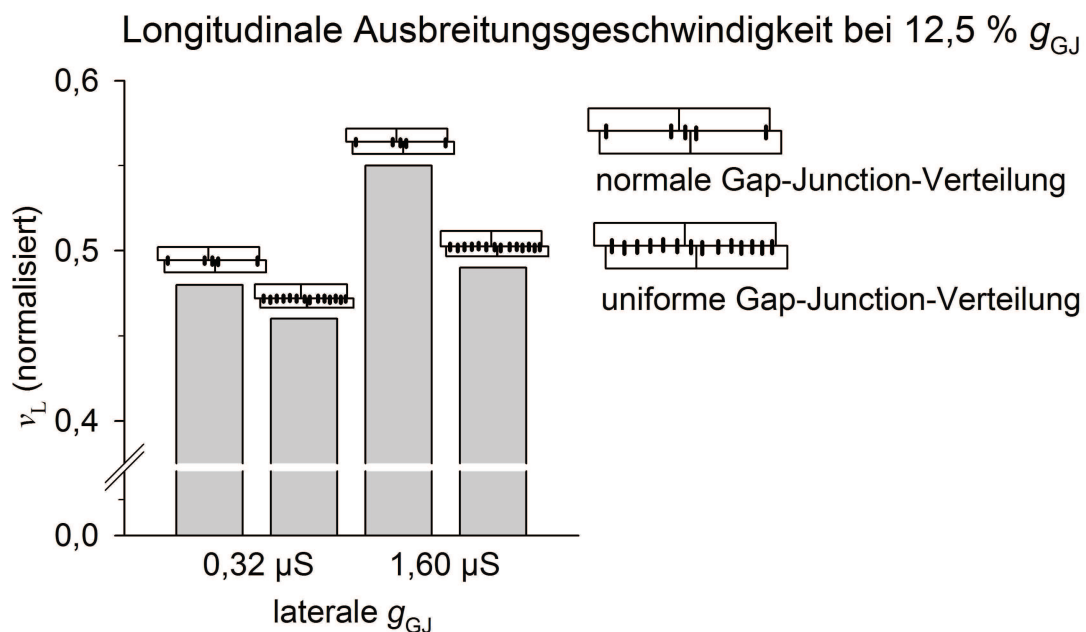
<sup>7</sup> Für diese Untersuchung wurde von den Annahmen I und II abgewichen: Um Effekte unterschiedlicher Geschwindigkeiten zwischen den Zellgruppen zu reduzieren, wurde diejenige Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) als 100 % definiert, welche notwendig war, um die longitudinale (59 cm/s) und transversale (16 cm/s) Ausbreitungsgeschwindigkeit der normalen Zellen zu erreichen.



### 1.4.2 Einfluss der Gap-Junction-Verteilung auf die Erregungsausbreitung

Bei normaler Gap-Junction-Leitfähigkeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Ausbreitungsgeschwindigkeiten zwischen normaler und uniformer (siehe auch Abbildung 9) Gap-Junction-Verteilung. Wurde die laterale Leitfähigkeit allerdings erhöht oder verringert, erwies sich die uniforme Verteilung als stärker abhängig von der Leitfähigkeit. Eine fünffache Erhöhung (von  $2,6 \mu\text{S}$  auf  $13 \mu\text{S}$ ) erhöhte die transversale Ausbreitungsgeschwindigkeit von  $16 \text{ cm/s}$  auf  $30 \text{ cm/s}$  (+ 87 %) bei normaler Verteilung, jedoch von  $18 \text{ cm/s}$  auf  $40 \text{ cm/s}$  (+ 122 %) bei uniformer Verteilung.

Während eine Erhöhung der transversalen Ausbreitungsgeschwindigkeit bei erhöhter Gap-Junction-Leitfähigkeit grundsätzlich zu erwarten war, wirkte sie sich überraschenderweise auch auf die longitudinale Geschwindigkeit aus. Eine erhöhte laterale Leitfähigkeit stabilisierte die Längsgeschwindigkeit bei Entkopplung. Dieser Effekt war bei normaler Gap-Junction-Verteilung stärker ausgeprägt als bei uniformer Verteilung (siehe Abbildung 16).



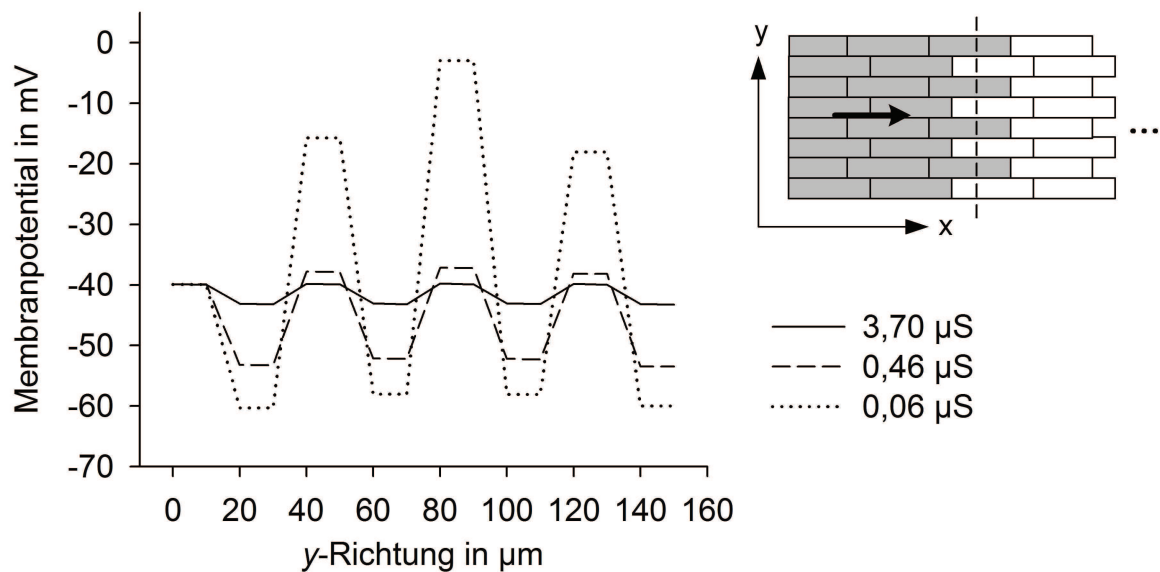
**Abbildung 16.** Die longitudinale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v_L$ ) wurde bei 12,5 % der normalen Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) ermittelt und auf ihren Ausgangswert (bei 100 %  $g_{GJ}$ ) normalisiert. Dies geschah einmal bei normaler lateraler  $g_{GJ}$  ( $2,6 \mu\text{S}$  /  $0,32 \mu\text{S}$  bei 100 % / 12,5 %  $g_{GJ}$ ) und einmal bei 5fach erhöhter lateraler  $g_{GJ}$  ( $13 \mu\text{S}$  /  $1,6 \mu\text{S}$ ). Jeweils wurde entweder eine normale Gap-Junction-Verteilung oder eine uniforme Verteilung, wie bei Gap-Junction-Lateralisierung beobachtet, simuliert (siehe Skizzen innerhalb der Abbildung). Das Ergebnis zeigt, dass eine Erhöhung der lateralen  $g_{GJ}$   $v_L$  stabilisierte und dass dieser Effekt bei normaler Gap-Junction-Verteilung signifikant stärker ausgeprägt war.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass eine hohe laterale Leitfähigkeit bei normaler Gap-Junction-Verteilung (Konzentration im Polbereich der Zelle) sowohl die longitudinale

als auch die transversale Geschwindigkeit stabilisierte, und zwar nicht nur gegenüber verringerten, sondern auch gegenüber erhöhten Leitfähigkeiten. Eine uniforme Verteilung der lateralen Gap-Junctions (Simulation von Connexin-Lateralisierung) hingegen erhöhte die Abhängigkeit der transversalen Geschwindigkeit von der lateralen Leitfähigkeit.

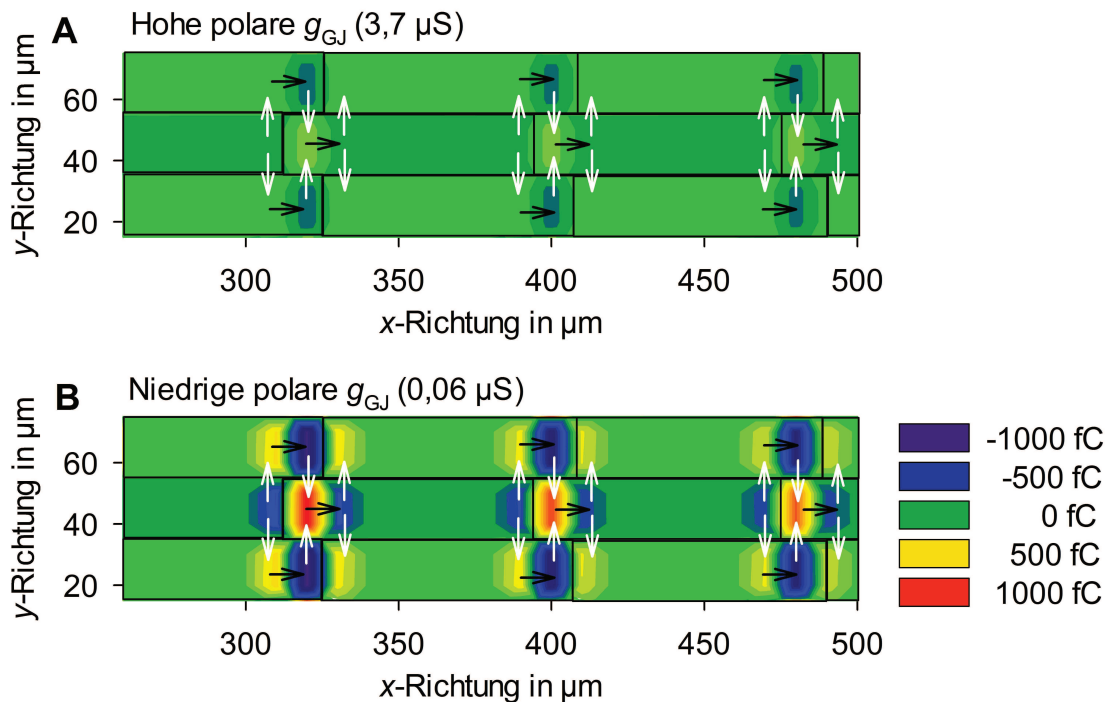
Bei näherer Untersuchung zeigte sich, dass die Stabilisierung der longitudinalen Geschwindigkeit durch erhöhte laterale Gap-Junction-Leitfähigkeit eine Folge von zweidimensionalen Effekten ist, die auch bei planarer (eindimensionaler) Erregungsausbreitung im Gewebe auftreten. Sie beruhen auf der geometrischen Anordnung von Kardiomyozyten im Gewebe und werden durch die sich überlappenden Zellen bzw. Zellausläufer (siehe Abbildung 17) ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Spannungsgradient in transversaler Richtung in der Nähe der Zellpole auftritt, so dass laterale Gap-Junctions zur longitudinalen Ausbreitung beitragen. Bei geringer polarer Gap-Junction-Leitfähigkeit wächst dieser Beitrag, weil dann einerseits die Spannungsgradienten größer werden und andererseits durch eine langsamere Ausbreitungsgeschwindigkeit und erhöhte interzelluläre Verzögerungen (siehe Abbildung 15) die Zeitdauer größer wird, während der die transversalen Spannungsgradienten vorhanden sind. Folglich wird der Betrag der transversalen Ströme größer (höherer Spannungsgradient), und die transversal fließende Ladung erhöht sich, was durch den länger andauernden Stromfluss verstärkt wird (siehe Abbildung 18). Durch diesen Effekt ist es möglich, dass bei völligem Fehlen polarer Gap-Junctions eine longitudinale Erregungsausbreitung stattfindet (siehe auch Figure 7B der Publikation) und dass eine Verringerung der polaren Gap-Junction-Anzahl und -Leitfähigkeit kompensiert werden kann.

## Transversaler Spannungsgradient während longitudinaler Ausbreitung



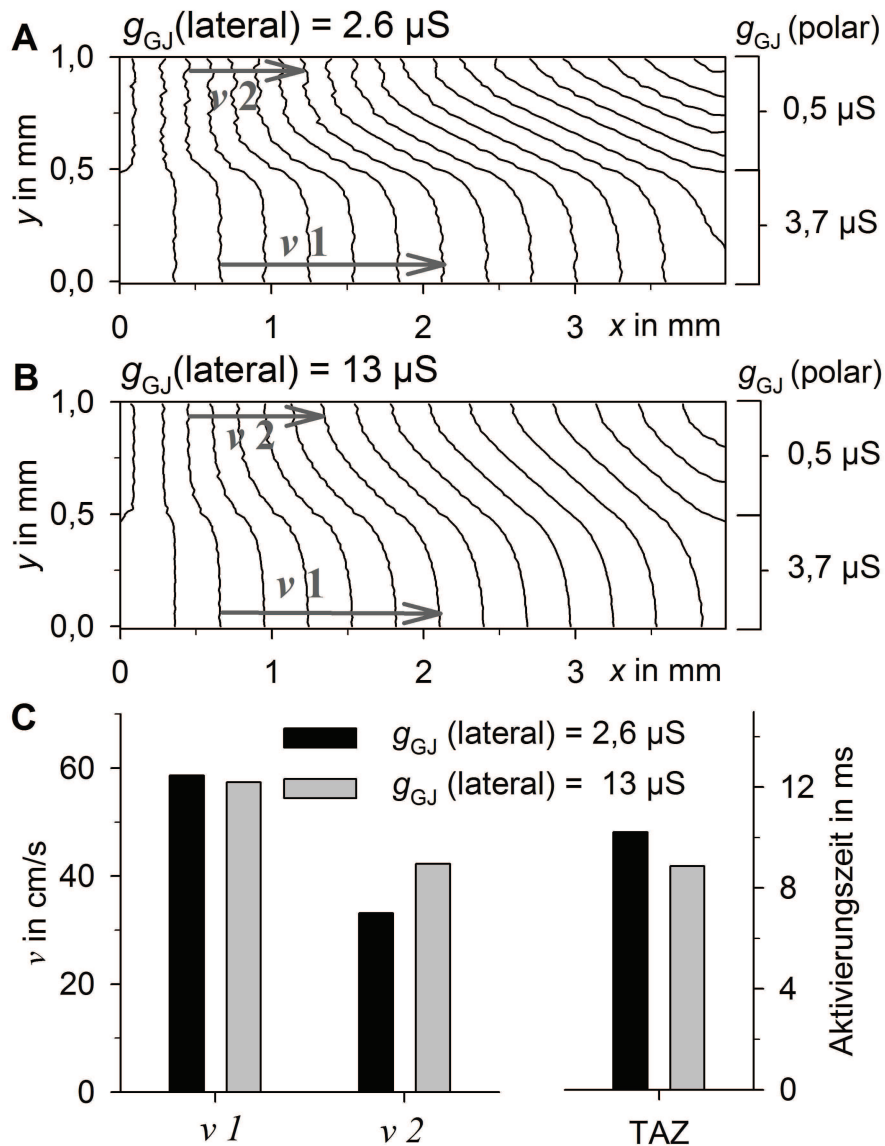
**Abbildung 17.** Während longitudinaler Ausbreitung der Erregung (in  $x$ -Richtung) wurde untersucht, ob sich transversale Spannungsgradienten (in  $y$ -Richtung) ergeben. Dies geschah bei hoher ( $3,7 \mu\text{S}$ ), mittlerer ( $0,46 \mu\text{S}$ ) und niedriger ( $0,06 \mu\text{S}$ ) polarer (longitudinaler) Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ). Dabei stellte sich heraus, dass transversale Spannungsgradienten auftreten und diese umso größer waren, je geringer die polare  $g_{GJ}$  war. Die Skizze innerhalb der Abbildung verdeutlicht, dass die transversalen Spannungsgradienten eine Folge der Zellanordnung sind (graue Rechtecke stellen die aktivierten Zellen dar). Die sich überlappenden polaren Enden der Zellen führen dazu, dass durch die Leitungsverzögerung, die an Gap-Junctions auftritt, in transversaler Richtung aktivierte und nicht aktivierte Bereiche gegenüberliegen. Bei geringer polarer  $g_{GJ}$  wird die Verzögerung an den polaren Gap-Junctions größer, so dass die transversalen Spannungsgradienten über einen längeren Zeitraum vorhanden sind (siehe auch Abbildung 15). Dies bedeutet, dass laterale Gap-Junctions auch zur longitudinalen Erregungsausbreitung beitragen und dass dieser Beitrag umso größer ist, je geringer die polare  $g_{GJ}$  ist, weil dann die Spannungsgradienten größer und über einen längeren Zeitraum vorhanden sind.

## Ladungsaufnahme in transversaler Richtung



**Abbildung 18.** Während longitudinaler Erregungsausbreitung (in x-Richtung von links nach rechts) wurden alle inter- und intrazellulären Ströme vom Beginn der Stimulation bis zur vollständigen Aktivierung des Gewebes aufgezeichnet und über die Zeit integriert. So konnte die Aufnahme ( $> 0$  fC) oder Abgabe ( $< 0$  fC) positiver Ladungen in Bezug zur Umgebung an jedem Zellsegment ermittelt werden. Es wurde zwischen in x- und y-Richtung fließenden Strömen unterschieden. Die Abbildung zeigt einen Gewebeausschnitt und die in y-Richtung aufgenommene oder abgegebene Ladungsmenge bei hoher (**A**) oder niedriger (**B**) polarer Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ). *Schwarze Linien* verdeutlichen die Zellgrenzen. *Weiße Pfeile* symbolisieren Ströme, die über Gap-Junctions fließen. *Schwarze Pfeile* symbolisieren intrazelluläre Ströme. Es ist erkennbar, dass bei niedriger polarer  $g_{GJ}$  eine hohe Ladungsmenge in y-Richtung, d. h. in transversaler Richtung, fließt, obwohl es sich um longitudinale Erregungsausbreitung handelt. Diese Ladungsmenge ist signifikant größer als bei hoher polarer  $g_{GJ}$ . Über laterale Gap-Junctions, die nahe der Zellpole lokalisiert waren, floss folglich bei niedriger polarer  $g_{GJ}$  eine größere Ladungsmenge als bei hoher polarer  $g_{GJ}$ , wodurch die Stabilisierung der longitudinalen Geschwindigkeit durch erhöhte laterale  $g_{GJ}$  erklärt wird (siehe Abbildung 16).

Im makroskopischen Bereich zeigte sich in ähnlicher Weise eine Stabilisierung der Längsgeschwindigkeit beim Auftreten von Inhomogenitäten (schlecht leitende Bereiche neben normalem Gewebe). Dadurch wurde die Gesamtaktivierungszeit des inhomogenen Gewebes reduziert, wenn die laterale Leitfähigkeit hoch war (siehe Abbildung 19). In homogenem Gewebe hatte sie jedoch keine Auswirkungen.



**Abbildung 19.** Ein Gewebestreifen der Größe  $4 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  wurde mit verschiedenen polaren Gap-Junction-Leitfähigkeiten ( $g_{GJ}$ ,  $3,7 \mu\text{S}$  und  $0,5 \mu\text{S}$ ) simuliert. Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v$ ) wurde in den Bereichen hoher polarer  $g_{GJ}$  ( $v_1$ ) und niedriger polarer  $g_{GJ}$  ( $v_2$ ) bestimmt. Die Bereiche der Messung sind durch *graue Pfeile* verdeutlicht. **A** zeigt die Isochronen bei einer lateralen  $g_{GJ}$  von  $2,6 \mu\text{S}$ . **B** zeigt die Isochronen bei einer lateralen  $g_{GJ}$  von  $13 \mu\text{S}$ . Der Isochronenabstand beträgt  $0,5 \text{ ms}$ . **C** zeigt die Geschwindigkeiten  $v_1$  und  $v_2$  sowie die totale Aktivierungszeit des Gewebes (*TAZ*) bei normaler (*schwarz*) und erhöhter (*grau*) lateraler  $g_{GJ}$ . Es ist erkennbar, dass eine Erhöhung der lateralen  $g_{GJ}$  die Krümmung der Erregungswelle verringert, die longitudinale Geschwindigkeit  $v_2$  im Bereich der schlechteren polaren Kopplung erhöht und somit die Aktivierungszeit verringert.

Eine erhöhte laterale Leitfähigkeit (Simulation von Gap-Junction-Lateralisierung) bewirkt demnach eine Stabilisierung der longitudinalen Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit. Dies geschieht sowohl auf einer mikroskopischen und auf einer makroskopischen Ebene. Die Lateralisierung kann auf diese Weise Inhomogenitäten ausgleichen und in diesem Zusam-

menhang als ein Mechanismus angesehen werden, der sich stabilisierend auf Geschwindigkeit und Aktivierungszeit auswirkt.

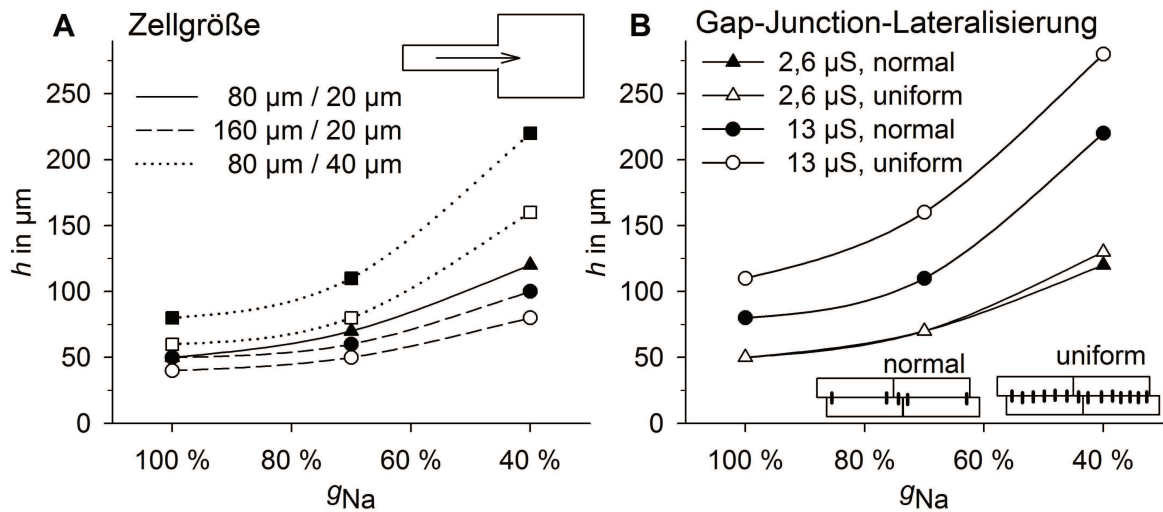
### 1.4.3 Risiko für unidirektionalen Leitungsblock

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sich die durch Veränderungen der Zellgröße, der lateralen Gap-Junction-Leitfähigkeit und -Verteilung beobachteten Effekte der Erregungsausbreitung auf das Arrhythmierisiko auswirken können. Hierzu wurde das etablierte Modell der Gewebeexpansion (engl.: „tissue expansion model“) gewählt, bei dem eine plötzliche Erweiterung des Gewebedurchmessers (z. B. in der Nähe eines anatomischen Hindernisses) ein Missverhältnis zwischen Stromquellen (erregtes Gewebe) und Stromsenken (nicht erregtes Gewebe) provozieren kann. Ursache ist, dass der nicht erregte Bereich insgesamt eine sehr hohe Kapazität im Vergleich zum erregten Bereich aufweist. Dadurch ist es möglich, dass die Ladung, die vom erregten zum nicht erregten Bereich aufgrund des Potentialunterschiedes fließt (interzelluläre Ströme) nicht ausreicht, um den nicht erregten Bereich auf das Schwellenpotential aufzuladen. Die Folge ist ein so genannter unidirektionaler Leitungsblock. Ein solcher Leitungsblock tritt definitionsgemäß nicht auf, wenn die Erregungswelle aus der anderen Richtung (um 180 Grad gedreht) kommt, denn in diesem Fall würde eine sehr große Stromquelle einer kleinen Stromsenke gegenüber stehen. Je eher also im Bereich einer Gewebeexpansion ein unidirektionaler Leitungsblock auftritt, desto höher ist das Arrhythmierisiko. Das Maß für dieses Risiko ist der minimale Durchmesser des erregten Gewebes, der ausreicht, um im nicht erregten Gewebe eine Weiterleitung der Erregungswelle zu induzieren. Je kleiner der minimale Durchmesser ist, desto unwahrscheinlicher ist ein Leitungsblock, weil der Größenunterschied zwischen Stromsenke und -quelle dann sehr groß sein müsste, um zum Leitungsblock zu führen. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich in diesem Zusammenhang eine Verringerung der Verfügbarkeit der schnellen Natriumkanäle ( $I_{Na}$ ) auswirkte.

Es stellte sich heraus, dass ein Leitungsblock bei Zellen mit vergrößertem Durchmesser (d. h. verringertem Länge-Durchmesser-Verhältnis) eher auftrat als bei normalen Zellen oder Zellen mit vergrößertem Länge-Durchmesser-Verhältnis. Des Weiteren vergrößerten sich diese Unterschiede, wenn zusätzlich die Natriumkanalverfügbarkeit reduziert wurde. Die genannten Effekte waren jeweils unter Annahme I stärker ausgeprägt als unter Annahme II.

Eine Erhöhung der lateralen Gap-Junction-Leitfähigkeit bewirkte eine ausgeprägte Zunahme des Leitungsblockrisikos, welches noch deutlich größer war, wenn die lateralen Gap-Junctions uniform angeordnet waren (Simulation von Connexin-Lateralisierung). Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.





**Abbildung 20.** Das Modell der Gewebeexpansion (siehe Skizze innerhalb Abbildung A) wurde wie beschrieben genutzt, um die Anfälligkeit für einen unidirektionalen Leitungsblock unter Variation der schnellen Natriumkanalverfügbarkeit ( $g_{Na}$ ) zu bestimmen. Je höher der kritische Gewebedurchmesser ( $h$ ) des Gewebestranges sein muss, um die Erregung aufrecht zu erhalten, desto höher ist das Leitungsblockrisiko.

In Abhängigkeit von der Zellgröße (**A**) zeigte sich, dass breite Zellen (Länge / Durchmesser: 80  $\mu m$  / 40  $\mu m$ , *gepunktete Linie*) eine stärkere Neigung zum Leitungsblock aufweisen als normale Zellen (80  $\mu m$  / 20  $\mu m$ , *durchgehende Linie*). Dieser Effekt potenzierte sich, wenn  $g_{Na}$  reduziert wurde und war unter Annahme I (*gefüllte Symbole*) signifikant erhöht gegenüber Annahme II (*offene Symbole*). Umgekehrt erwiesen sich lange Zellen (160  $\mu m$  / 20  $\mu m$ , *gestrichelte Linie*) als weniger anfällig für einen Leitungsblock.

In Abhängigkeit von der Gap-Junction-Lateralisierung (**B**) zeigte sich, dass eine Erhöhung der lateralen Leitfähigkeit von 2,6  $\mu S$  auf 13  $\mu S$  das Leitungsblockrisiko signifikant erhöhte und dass dieser Effekt verstärkt wurde, wenn  $g_{Na}$  verringert wurde. Eine uniforme Verteilung der Gap-Junctions (*offene Symbole*) verstärkte den Effekt zusätzlich. Bei normaler Leitfähigkeit (2,6  $\mu S$ ) hatte eine uniforme Gap-Junction-Verteilung gegenüber der normalen Verteilung (*gefüllte Symbole*) jedoch kaum Auswirkungen.

Während sich eine Vergrößerung des Zelldurchmessers vor allem unter Annahme II ( $g_{GJ}$  konstant) negativ auf die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung auswirkte, war die Anfälligkeit für einen unidirektionalen Leitungsblock unter Annahme I ( $g_{GJ}$  proportional zur Membranfläche) erhöht. Die Lateralisierung der Gap-Junctions zeigte neben möglichen positiven Effekten (Stabilisierung der Geschwindigkeit, Ausgleich von Inhomogenitäten) ebenfalls ein hohes Risiko für das Entstehen eines unidirektionalen Leitungsblocks.

## 1.5. Schlussfolgerungen und Diskussion

Die vorliegende Arbeit präsentiert ein Modell, mit dessen Hilfe das komplexe Zusammenspiel zwischen Zellgröße, Zellanordnung und Gap-Junction-Verteilung aufgezeigt wird. Es wird gezeigt, dass Zellgröße und -form sowie laterale Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) wichtige Faktoren sind, die die longitudinale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v_L$ ) und die Auswirkungen von elektrischer zellulärer Entkopplung modulieren.

Kleine Zellen und Zellen mit einem großen Länge-Durchmesser-Verhältnis scheinen Eigenschaften zu besitzen, die sich positiv auf  $v_L$ , die Effekte von Entkopplung und das Leitungsblockrisiko auswirken. Die Ursachen hierfür wurden in dieser Studie ausführlich untersucht und aufgeklärt. Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit sind mit Daten anderer Studien vereinbar und liefern neue Interpretationsmöglichkeiten. So fanden Ghaly et al. [22] und Nygren et al. [49] eine „verringerte Leitungsreserve“ zusammen mit einer Connexin-Lateralisierung und verkürzten Zellen in Herzen bei Diabetes mellitus. Die Erklärung ist, dass verkürzte Zellen ein kleineres Länge-Durchmesser-Verhältnis besitzen und so anfälliger für Entkopplung werden. Spach et al. [72] fanden eine positive Korrelation zwischen Zellgröße und Ausbreitungsgeschwindigkeit, während McIntyre et al. [45] eine negative Korrelation nachwies. Beides ist mit Hinblick auf das Verhältnis von  $g_{GJ}$  zu Zellkapazität (vgl. Annahme I und II, siehe Tabellen 4 und 5) erklärbar: Ein erhöhter Zelldurchmesser erhöht  $v_L$ , wenn  $g_{GJ}$  proportional zur Membranfläche größer wird. Ein erhöhter Zelldurchmesser verringert jedoch  $v_L$ , wenn  $g_{GJ}$  konstant bleibt.

Dies zeigt, dass es wichtig sein kann, das Verhältnis von  $g_{GJ}$  zur Zellkapazität (siehe Tabelle 5) und die geometrischen Eigenschaften der Zellen bei der Untersuchung von Herzerkrankungen stärker als bisher im Blick zu behalten. Eine wichtige Erkenntnis, die daraus hervorgeht, ist, dass geometrisch-morphologische Daten und elektrophysiologische Daten nur dann sinnvoll interpretiert werden können, wenn sie in Kombination vorhanden sind. Hierzu sei beispielhaft auf die Unterschiede der Leitungsgeschwindigkeiten bei veränderter Zellgröße einerseits und veränderter (Annahme I) oder konstanter (Annahme II) Gap-Junction-Leitfähigkeit verwiesen. Eine alleinige Messung der Zellgröße oder eine alleinige Messung der Gap-Junction-Leitfähigkeit hätten keine Schlussfolgerung auf die Leitungsgeschwindigkeit erlaubt, weil das Verhältnis zwischen der Zellgröße bzw. Zellkapazität und der Leitfähigkeit entscheidend ist. In ähnlicher Weise zeigen die Ergebnisse, dass eine alleinige morphologische Beschreibung von Connexin-Lateralisierung keinen Hinweis auf das elektrophysiologische Verhalten zulässt. Dies wäre nur dann möglich, wenn neben der morphologischen Be-



schreibung eine quantitative Messung des Connexins und eine elektrophysiologische Messung der interzellulären Leitfähigkeiten oder der Erregungsleitungsgeschwindigkeiten vorhanden wäre. Zukünftig sollten daher – wenn auch mit relativ hohem Aufwand – bei entsprechenden Fragestellungen Kombinationsexperimente (funktionelle Elektrophysiologie und Morphologie / Histologie) durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern zudem Hinweise auf die Entstehungsmechanismen von Arrhythmien in hypertrophen Herzen. Es konnte gezeigt werden, dass sich insbesondere eine Vergrößerung des Zelldurchmessers nachteilig auf das elektrophysiologische Verhalten des Gewebes auswirken kann. Dazu gehören eine höhere Anfälligkeit gegenüber Entkopplung, wie sie zum Beispiel bei Azidose im Rahmen einer Ischämie auftreten kann [23], und ein erhöhtes Risiko für unidirektionale Leitungsblöcke. Es kann geschlussfolgert werden, dass eine Vergrößerung des Zelldurchmessers das arrhythmogene Potential erhöht. Diese Erkenntnis ist deshalb neu, weil erstmalig gezeigt werden konnte, dass die Zellgeometrie allein arrhythmogene Folgen haben kann, ohne dass Veränderungen der Ionenströme notwendig sind.

Dass allein die Hypertrophie von Kardiomyozyten schon eine potentielle arrhythmogene Wirkung haben kann, könnte nicht nur erklären, dass Herzkrankheiten, die mit Hypertrophie einhergehen, ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien und plötzlichen Herztod aufweisen. Dazu gehören z. B. eine kardiale Hypertrophie bei Aortenstenose oder bei schlecht eingestellter arterieller Hypertonie [25, 40, 80, 83]. Dieser Zusammenhang könnte außerdem auch erklären, warum im Rahmen physiologischer Anpassung erworbene kardiale Hypertrophien, z. B. bei Hochleistungssportlern, mit einer erhöhten Inzidenz maligner Arrhythmien assoziiert sind [5, 82].

Des Weiteren zeigt die Arbeit Effekte des Gap-Junction-Remodelings (Gap-Junction-Lateralisierung) auf makroskopischer und mikroskopischer (zellulärer) Ebene. Einerseits könnte das Remodeling ein Kompensationsmechanismus der Zellen bei erhöhter Inhomogenität des Gewebes sein, weil eine erhöhte laterale Leitfähigkeit Inhomogenitäten ausgleichen und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregung stabilisieren konnte. Auch die Aktivierungszeit des Gewebes reduzierte sich. Jedoch zeigte sich auch, dass das Remodeling ebenso wie zelluläre Hypertrophie ein arrhythmogenes Potential besitzt, da es das Auftreten eines Leitungsblocks wahrscheinlicher machte. Die Anordnung von Gap-Junctions entlang der Zellmembran hatte einen zum Teil signifikanten Einfluss auf die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit, ohne, dass Unterschiede der Leitfähigkeit vorhanden waren (siehe Abbildungen 16 und 20B). Man hätte in einem Doppelzell-Patch-Clamp-Experiment also keinen Un-

terschied feststellen können. Dies zeigt, dass auch hier die Kombination von morphologischen und funktionellen Daten notwendig ist, um Aussagen über die Erregungsleitung machen zu können. Wie im Kapitel „Einführung in die Thematik“ dargestellt, sind bisher nur sehr wenige experimentelle Studien vorhanden, die derartige Messungen kombiniert haben [49, 53, 59, 64]. Den Zusammenhang zwischen veränderter Anordnung der Gap-Junctions bzw. der Connexine und ihrer Funktionalität herzustellen scheint daher eine Herausforderung für zukünftige experimentelle Studien zu sein.

## 1.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen nicht nur potentielle Ursachen von Arrhythmien in durch Hypertrophie oder Gap-Junction-Lateralisierung verändertem Myokard, sondern weisen auch auf die Notwendigkeit hin, in experimentellen Studien geometrisch-morphologische und elektrophysiologische Parameter gleichzeitig zu erfassen. Mit Hilfe des vorgestellten Modells konnte gezeigt werden, dass dies bei den beiden untersuchten, potentiell pathogenen Faktoren notwendig ist: bei Veränderungen der Zellgröße ebenso wie bei Veränderungen der Anzahl und Anordnung von Gap-Junctions (kardiales Remodeling).

Das Modell wurde so konzipiert, dass eine Erweiterung und Parameteränderung jederzeit möglich ist, so dass Ergebnisse von Experimenten eingearbeitet werden können. In zukünftigen Studien könnten neben strukturellen Veränderungen auch Veränderungen von Ionenkanälen, Elektrolytverschiebungen und kardiale Ischämie simuliert werden und zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen beitragen. Einige Vorarbeiten dazu liegen bereits vor [63]. Auch die Simulation von Pharmaka, insbesondere der so genannten Antiarrhythmika, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Als Beispiel seien hier eine Simulation der Wirkung von Digitalisglykosiden (Blockade der Natrium-Kalium-ATPase), von Calciumkanalblockern (Blockade des L-Typ-Calcium-Kanals) oder von Klasse-I-Antiarrhythmika (Blockade von Natriumkanälen) genannt.

Jedoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass Modelle stets nur eine Vereinfachung der in Realität ablaufenden Vorgänge sind und daher immer in engem Zusammenhang mit experimentellen Daten interpretiert werden sollten. Wenn die Möglichkeit besteht, einen Sachverhalt experimentell zu untersuchen, sollte daher meist dem Experiment der Vorzug gegeben werden. Sehr vorteilhaft ist eine Kombination von experimentellen Daten und von Daten, die mit Hilfe von Modellen generiert werden, weil mögliche Fehler in Experiment oder Modell auf diese Weise schnell aufgedeckt werden können. In zukünftigen Studien könnte daher versucht werden, die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weiteren experimentellen Prüfungen zu unterziehen. Ebenso sollte das Modell ständig an den neuesten Kenntnisstand angepasst werden.

Spezifische methodische Grenzen des Modells werden im Supporting Material (Anhang) beschrieben und diskutiert.

## **2. Publikation**

### **A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue**

Autoren: Thomas Seidel, Aida Salameh, Stefan Dhein

Erschienen in: Biophysical Journal, Volume 99(9), 2821 – 2830

Erscheinungsdatum: 03. November 2010

## A Simulation Study of Cellular Hypertrophy and Connexin Lateralization in Cardiac Tissue

Thomas Seidel,<sup>†\*</sup> Aida Salameh,<sup>‡</sup> and Stefan Dhein<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Clinic for Cardiac Surgery, and <sup>‡</sup>Department of Pediatric Cardiology, University of Leipzig, Heart Center, Leipzig, Germany

**ABSTRACT** Many cardiac diseases coincide with changes in cell size and shape. One example of such a disease is cardiac hypertrophy. It is established that cardiac impulse propagation depends on the cell size, as well as other factors, but interrelations between conduction velocity (CV), cell size, and gap junction (GJ) conductance ( $g_{GJ}$ ) are complex. Furthermore, cardiac diseases are often accompanied by connexin (Cx) lateralization. To analyze the effects of cell size and Cx lateralization in cardiac disease, a two-dimensional computer simulation of ventricular myocytes based on the Luo-Rudy model was used. Control cells (80  $\mu\text{m}/20 \mu\text{m}$  (length/diameter)), long cells (160  $\mu\text{m}/20 \mu\text{m}$ ), and wide cells (80  $\mu\text{m}/40 \mu\text{m}$ ) were simulated as was a redistribution of lateral GJs (constant lateral  $g_{GJ}$  and increased lateral  $g_{GJ}$ ). CV in long cells showed high stability, i.e., it declined very slowly when  $g_{GJ}$  was gradually reduced. Wide cells, however, were more affected by reduced  $g_{GJ}$ , resulting in early transition to discontinuous propagation and low CV. Conduction block occurred earlier in enlarged cells than in control cells due to increased cell capacitance. Increased lateral  $g_{GJ}$  stabilized longitudinal CV, which was a result of two-dimensional effects during planar wave propagation. Therefore, Cx lateralization may compensate for cardiac inhomogeneities. High lateral  $g_{GJ}$  and enhanced cell diameter increased the susceptibility to conduction block at tissue expansion, providing a substrate for arrhythmia.

### INTRODUCTION

Hypertrophic heart diseases coincide with ventricular arrhythmia and increased mortality due to sudden cardiac death (1–6). Arrhythmogenesis depends on multiple factors, because the electrophysiological behavior of cardiac tissue is a result of active and passive properties. Active properties include transmembrane ionic currents and channel kinetics, and passive properties include intercellular and intracellular resistances, gap junction (GJ) distribution, degree of fibrosis, and cell geometry. Electrical remodeling, of  $\text{K}^+$  channels, e.g., in hypertrophied and failing hearts can result in prolonged duration of action potentials (7–9), widening the vulnerable window for unidirectional conduction block and increasing the risk of arrhythmia. Hypertrophied hearts tend to prolonged QT intervals (10), which are known to be associated with sudden cardiac death (11). However, effects of increased cell size and GJ distribution in hypertrophied hearts are difficult to study experimentally. It is known that cell size can have a strong effect on impulse propagation (12–15). In a study by Spach et al. (13), an increase in cell size resulted in higher conduction velocity ( $\theta$ ), in accordance with findings of Ghali et al. (15), who showed that decreased cell size can negatively affect  $\theta$ . In contrast, McIntyre et al. (16) found a negative correlation between cell diameter and  $\theta$  in human ventricular tissue, which seems paradoxical, because an increase in cell diameter reduces the intracellular resistance. This indicates that the effects of cell size may be complex and are not completely understood. This study shall therefore provide a systematic

analysis of effects of cell size on cardiac impulse propagation. Since impulse propagation strongly depends on GJ conductance ( $g_{GJ}$ ), it was appropriate to take into account the finding that hypertrophic, ischemic, and inflammatory cardiac diseases are often accompanied by altered cellular GJ distribution, with an increased number of connexin43 GJs (Cx43s) at cell sides (17–24), leading to an increased ratio of lateral to polar Cx43s (lateralization). Atrial fibrillation can also be accompanied by Cx lateralization (25). However, it is difficult to assess whether lateralized Cx builds a functional GJ. There are few studies of this issue. Polontchouk et al. (26) have shown that after stimulating rat atria for 24 h at a stimulation rate of 10 Hz, Cx43 was lateralized together with an increase in transverse  $\theta$  ( $\theta_T$ ), giving evidence of functionality, whereas longitudinal  $\theta$  ( $\theta_L$ ) was unchanged. In this study, we provide experimental evidence that this may also occur in human atria, although there are studies showing that Cx lateralization can be accompanied by decreased  $\theta$  (19,27). Besides quantitative alterations, a more uniform spatial distribution of lateral Cx is observed (28). It is hardly possible to investigate separately the effects of altered cell size and GJ distribution in experiment, because usually they are accompanied by additional alterations, e.g., altered transmembrane currents (7–9) or fibrosis (29). Computer simulations make it possible to vary isolated parameters. Therefore, a two-dimensional (2D) computer model based on the Priebe-Beuckelmann (9) and Luo-Rudy (30) models was used. Different types of hypertrophy and different degrees of GJ lateralization were simulated and analyzed under normal and pathological conditions.

Submitted May 14, 2010, and accepted for publication September 3, 2010.

\*Correspondence: seidel-th@gmx.de

Editor: Randall L Rasmusson.

© 2010 by the Biophysical Society  
0006-3495/10/11/0001/10 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2010.09.010

## METHODS

### Mapping and immunostaining of atrial human tissue

A detailed description of Cx43 immunostaining and mapping experiments can be retrieved from the Supporting Material.

### Computer model

For details, see the Supporting Material. A 2D computer simulation model with each cell composed of several cell segments  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  in size was used (Fig. 1). Different degrees of overlapping are discussed in Fig. S2 in the Supporting Material. Control cells were assigned a length and diameter of  $80 \mu\text{m}$  and  $20 \mu\text{m}$ , respectively (23,24,31), polar and lateral  $g_{\text{GJ}}$  of  $3.7 \mu\text{S}$  and  $2.6 \mu\text{S}$ , respectively, and cytoplasmic resistivity of  $1.5 \Omega\text{m}$  (32,33). Throughout the simulations, transmembrane current densities and kinetics were assumed to be unaltered. It is known that  $\theta$  in elliptic waves can be smaller than in planar waves (34). Both were simulated, revealing a difference of 3–7%. If not otherwise specified, all results obtained were for planar waves.

### Simulating hypertrophy and Cx lateralization

#### Junctional conductance

Hypertrophied cells have a greater membrane area ( $A_m$ ) and, thus, a higher cell capacitance. If GJ density (number of GJs/ $A_m$ ) remains constant,  $g_{\text{GJ}}$  will increase proportionally to  $A_m$ . If the number of GJs remains constant,  $g_{\text{GJ}}$  will remain constant. Because experimental data indicate that both situations may occur (35,17–19,23,24,36), both were simulated. Increased  $g_{\text{GJ}}$  is simulated under assumption I, and constant  $g_{\text{GJ}}$  under assumption II. Regarding Cx lateralization, it was necessary to decide whether a lateralization of Cx involves creation of new GJs or only redistribution of the existing GJs. Experimental studies suggest that both occur (19,27,24,26,37), so both were simulated. GJs were simulated as passive ohmic resistors.

#### Cellular parameters

Hypertrophy is often accompanied by increased cell diameter (31,38). To examine this effect, cell diameter was increased from  $20 \mu\text{m}$  to  $40 \mu\text{m}$ . Because cell length may also be increased (31) or decreased (27) in hypertrophy, it was increased from  $80 \mu\text{m}$  to  $160 \mu\text{m}$  (see Table 1). Cell capacitance increased from  $113 \text{ pF}$  in control cells to  $214 \text{ pF}$  in long and  $251 \text{ pF}$  in wide cells, corresponding well with experimental data (29,38). Table 2 shows the electrophysiological parameters.

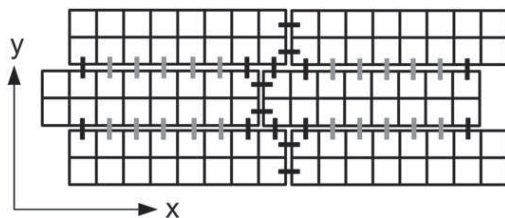


FIGURE 1 Schematic illustration of the bricklike cell arrangement and GJ distribution used in the simulations. Squares represent cell segments of  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ . Horizontal and vertical bars between blocks of cell segments indicate longitudinal and transverse GJs, respectively. Control cells had a nonuniform lateral GJ distribution, i.e., 90% of the lateral conductance was restricted to GJs near the cell poles (black vertical bars). Under simulation conditions of uniform connexin distribution, gray and black GJs had the same conductance.

TABLE 1 Geometrical parameters of control cells and enlarged cells

	$l$	$d$	$A_m$	$V$	$C$	$A_m/V$
Control	$80 \mu\text{m}$	$20 \mu\text{m}$	$5655 \mu\text{m}^2$	$25133 \mu\text{m}^3$	$113 \text{ pF}$	$0.225 \mu\text{m}^{-1}$
Increased width	$80 \mu\text{m}$	$40 \mu\text{m}$	$12566 \mu\text{m}^2$	$100531 \mu\text{m}^3$	$251 \text{ pF}$	$0.125 \mu\text{m}^{-1}$
Increased length	$160 \mu\text{m}$	$20 \mu\text{m}$	$10681 \mu\text{m}^2$	$50265 \mu\text{m}^3$	$214 \text{ pF}$	$0.213 \mu\text{m}^{-1}$

Parameters represented are as follows:  $l$ , length;  $d$ , diameter;  $A_m$ , geometrical membrane area;  $V$ , volume,  $C$ , capacitance;  $A_m/V$ , area/volume ratio.

#### Cx lateralization

Some studies have shown that Cx lateralization is accompanied by increased  $\theta_T$  in ventricular and atrial tissue from rats (26,37), indicating functional Cx and increased lateral  $g_{\text{GJ}}$ . In this study we provide evidence that this is also possible in human cardiac tissue (Fig. 2). Recent experimental findings show that in diseased hearts, lateral Cx can be increased up to fivefold (24,27). Human tissue samples indicated an even more pronounced increase in atrial fibrillation (Fig. 2). Therefore, Cx lateralization was simulated by a fivefold increase in lateral  $g_{\text{GJ}}$ . However, since some studies show that Cx lateralization can coincide with unchanged or diminished total Cx (18,19,23,27), we also simulated a redistribution with constant lateral  $g_{\text{GJ}}$  (Fig. 1).

#### Conduction block

Polar and lateral  $g_{\text{GJ}}$  were gradually reduced from 100% until the conduction block. Conductance was defined as 100% of coupling (Table 2). Maximum sodium channel conductivity ( $g_{\text{Na}}$ ) was gradually reduced from 100% ( $16 \text{ mS}/\mu\text{F}$ ) to 10% ( $1.6 \text{ mS}/\mu\text{F}$ ). A common method for assessing susceptibility to conduction block is the tissue expansion model (39,40). The critical width ( $h_c$ ) of a 4-mm-long cell strand (current source) sufficient to maintain propagation in the bulk area ( $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ; current sink) was determined.

#### Limitations

See the Supporting Material.

## RESULTS

### Mapping and immunostaining of atrial human tissue

Atrial tissue samples ( $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ ) of patients with sinus rhythm (SR) and atrial fibrillation (AF) were paced at a central electrode ( $1 \text{ Hz}$ ,  $0.6 \text{ mA}$ ,  $1\text{-ms}$  pulses) and simultaneously mapped using 64 electrodes. Immunohistological and morphometric analysis revealed that in SR,  $36 \pm 1\%$  of the polar membrane length was positive for Cx43, whereas only  $2 \pm 2\%$  of the lateral membrane was Cx43-positive. In AF, lateral Cx43 expression was strongly increased to  $21 \pm 4\%$  ( $p < 0.05$ ), whereas polar expression was slightly diminished to  $24 \pm 3\%$  (Fig. 2 A). Mapping data revealed that  $\theta_L$  was  $78 \pm 1 \text{ cm/s}$  in SR and  $84 \pm 2 \text{ cm/s}$  in AF (not significant).  $\theta_T$ , which was  $20 \pm 1 \text{ cm/s}$  in SR, significantly increased to  $30 \pm 2 \text{ cm/s}$  ( $p < 0.05$ ) in AF (Fig. 2 B). Micrographs of immunostaining are given in Fig. S1.

**TABLE 2** Electrophysiological parameters of simulated conditions

	$g_{IC}$		$g_{GJ}$		$g_{GJ}/C$ nS/pF	$R_{GJ}/R_{IC}$		$\rho$	
	$L$ ( $\mu S$ )	$T$ ( $\mu S$ )	$L$ ( $\mu S$ )	$T$ ( $\mu S$ )		$L$	$T$	$L$ ( $\Omega$ cm)	$T$ ( $\Omega$ cm)
Control	2.6	42	3.7	2.6	111	0.7	16	256	2575
Increased width I	10.5	42	8.2	5.8	111	1.3	7	341	1242
Increased width II	10.5	42	3.7	2.6	50	2.8	16	575	2575
Increased length I	1.3	84	7.0	4.9	111	0.2	17	178	2716
Increased length II	1.3	84	3.7	2.6	59	0.4	32	203	5000
GJ lateralization	2.6	42	3.7	13.0	295	0.7	3	256	635

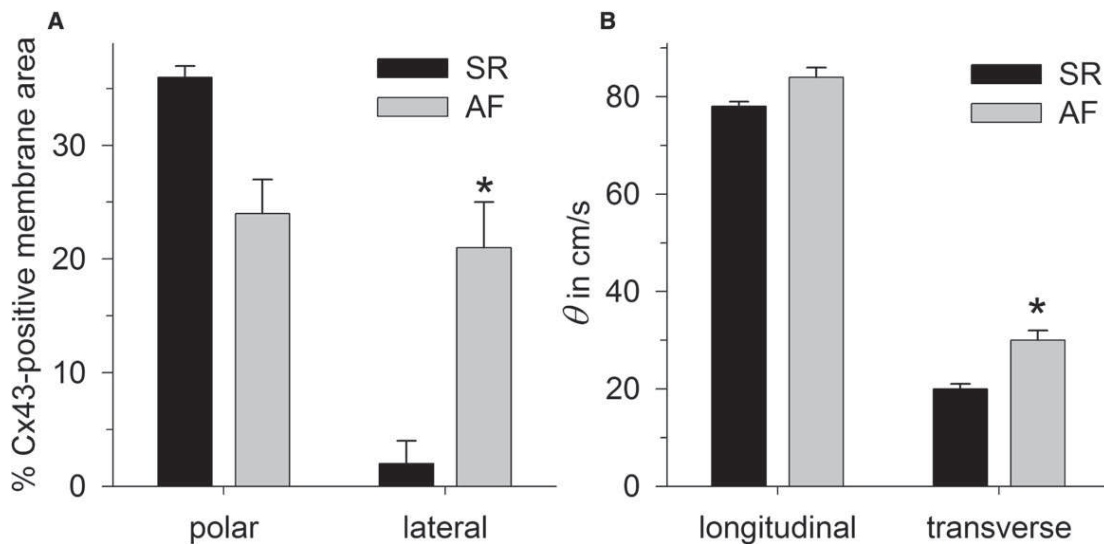
Parameters are for 100% of coupling.  $L$ , longitudinal;  $T$ , transverse;  $g_{IC}$ , intracellular conductance;  $g_{GJ}$ , gap junction conductance;  $g_{GJ}/C$ , ratio of total cellular  $g_{GJ}$  in two dimensions to cell capacitance;  $R_{GJ}/R_{IC}$ , ratio of junctional to intracellular resistance;  $\rho$ , tissue resistivity.

### Effects of increased cell size

#### Assumption I: increased $g_{GJ}$

In control cells (length/diameter of 80  $\mu m$ /20  $\mu m$ ),  $\theta_L$  was 59 cm/s and  $\theta_T$  was 16 cm/s. When we assumed that  $g_{GJ}$  increases proportionally to  $A_m$  (Fig. 3 A), both enhanced length (160  $\mu m$ /20  $\mu m$ ) and enhanced diameter (80  $\mu m$ /40  $\mu m$ ) led to a comparable increase in  $\theta_L$ : +22% in long cells (72 cm/s) and +15% in wide cells (68 cm/s). However, wide cells showed a much faster reduction of  $\theta_L$  during gradual uncoupling. As a result,  $\theta_L$  in wide cells dropped below  $\theta_L$  in control cells when coupling was  $\leq 15\%$  and  $\theta_L \leq 30$  cm/s. In contrast,  $\theta_L$  in long cells declined very slowly. At 12.5% of coupling,  $\theta_L$  was reduced to 51% (30 cm/s) in control cells, only to 68% (49 cm/s) in long cells, and to 44% (30 cm/s) in wide cells (Fig. 3 C). One explanation for this is that the increase in  $\theta_L$  in wide and in long cells is based on different mechanisms. Increased cell length prolongs the distance between GJs, i.e., the proportion of intracellular resistance ( $R_{IC}$ ) to total resistance becomes greater. Accordingly, longitudinal tissue resistivity ( $\rho$ ) and

the ratio of GJ resistance ( $R_{GJ}$ ) to  $R_{IC}$  are lower than in the control, i.e., the effect of  $g_{GJ}$  on  $\rho$  is smaller. An increase in diameter, however, increases longitudinal  $\rho$ . Higher  $\theta_L$  is the result of an approximately twofold lower ratio of  $A_m$  to cell volume ( $A_m/V$ ). See Tables 1 and 2 for details. Since a twofold increase in diameter results in a fourfold smaller  $R_{IC}$ , the  $R_{GJ}/R_{IC}$  ratio is greater in wide cells. As a result,  $\theta_L$  decreases faster in wide cells than in control cells.  $\theta_T$  was considerably higher in wide cells (31 cm/s) than in control cells (16 cm/s), because apart from lowering the  $A_m/V$ , the longer distance between GJs decreases transverse  $\rho$ . Long cells revealed a  $\theta_T$  similar to that of control cells (15 cm/s vs. 16 cm/s), because transverse  $\rho$  and  $A_m/V$  were almost unchanged. In contrast to  $\theta_L$ , the relative decrease of  $\theta_T$  during gradual uncoupling was comparable in all groups (Fig. 3 C), a result of the higher  $R_{GJ}/R_{IC}$  ratios in the transverse direction:  $R_{GJ}$  represents almost 100% of the transverse  $\rho$ , i.e., an increase in  $R_{GJ}$  by a given factor increases transverse  $\rho$  by the same factor in all groups. Note that this is a reason why anisotropy ( $\theta_L/\theta_T$ ) becomes greater at lower  $g_{GJ}$  (see Fig. S3).



**FIGURE 2** Experimental data obtained from atrial tissue samples from patients with sinus rhythm (SR) and atrial fibrillation (AF). (A) Percentage of the Cx43-positive membrane area, detected by immunostaining at cell poles (*polar*) and cell sides (*lateral*). (B) Conduction velocities ( $\theta$ ) obtained from mapping in longitudinal and transverse directions. An asterisk indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between SR and AF.



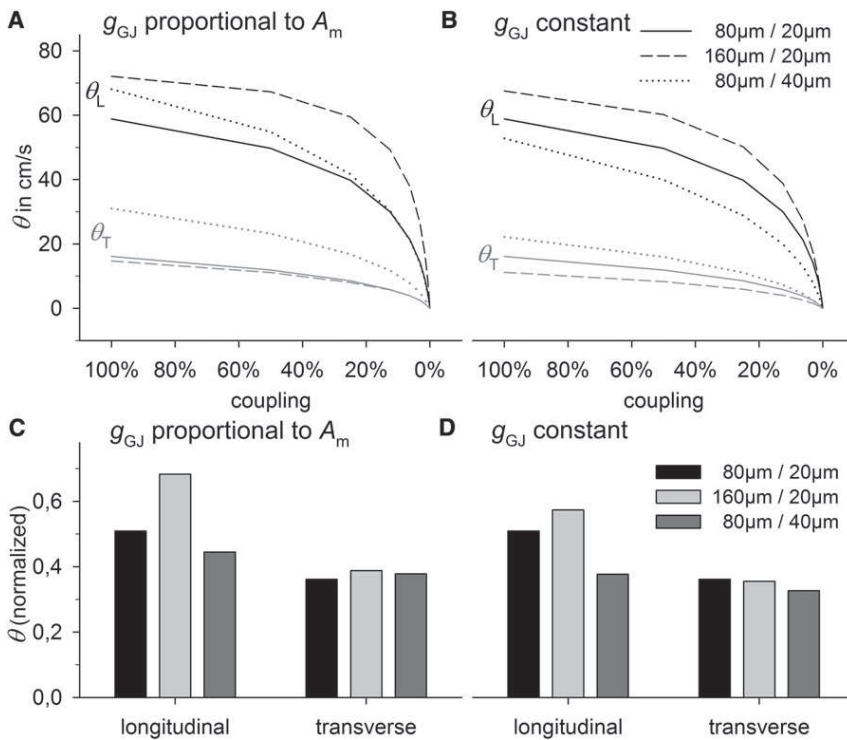


FIGURE 3  $\theta_L$  and  $\theta_T$  in control cells (80  $\mu$ m/20  $\mu$ m (length/width)), long cells (160  $\mu$ m/20  $\mu$ m), and wide cells (80  $\mu$ m/40  $\mu$ m) with gradual reduction in coupling. Cell size was increased, assuming that  $g_{GJ}$  is proportional to  $A_m$  (left) and that  $g_{GJ}$  remains constant (right). (A and B) Plots of absolute values of  $\theta_L$  and  $\theta_T$  versus coupling. (C and D)  $\theta_L$  and  $\theta_T$  at 12.5% of coupling, normalized to their values at 100% of coupling.

**Assumption II: constant  $g_{GJ}$**

When we assumed constant  $g_{GJ}$ , the ratio of  $g_{GJ}$  to cell capacitance was lower in enlarged cells (Table 2). Accordingly,  $\theta$  was lower than under assumption I (Fig. 3 B). However,  $\theta_L$  in long cells was higher (68 cm/s) than in control cells (59 cm/s), which was a result of a still lower longitudinal  $\rho$  (Table 2). The  $R_{GJ}/R_{IC}$  ratio was also still lower than in control cells, i.e.,  $\theta_L$  decreased more slowly during gradual uncoupling, but less significantly compared to assumption I (Figs. 3 C and D). Regarding  $\theta_T$ , there was a considerable reduction to 11 cm/s (–30%). Wide cells at constant  $g_{GJ}$  revealed decreased  $\theta_L$  (52 cm/s) and higher  $\theta_T$  (22 cm/s).  $\theta_L$  declined even faster than under assumption I (Fig. 3 D). It is interesting to note that long cells under assumption II had the same  $\theta_L$  (68 cm/s) as did wide cells under assumption I (compare Fig. 3, A and B), although  $g_{GJ}$  was more than twofold higher in wide cells and cell capacitance was similar. At lower  $g_{GJ}$  (25% of coupling),  $\theta_L$  was even higher in long cells compared to wide cells (50 cm/s vs. 41 cm/s).

**Gradual uncoupling**

As indicated by Fig. 3, cell size affected the sensitivity to uncoupling:  $\theta_L$  declined faster in wide cells with both increased and constant  $g_{GJ}$ , suggesting a mechanism independent of  $g_{GJ}$ . To analyze cell-size effects independent of  $\theta$ , in the following simulations,  $g_{GJ}$  was adapted in enlarged cells to obtain the same  $\theta$  ( $\pm 5\%$ ) as in control cells. Fig. 4

gives insight into the basic effects of uncoupling. At high coupling (Fig. 4 A), the membrane potential ( $\phi$ ) spreads almost continuously, because  $R_{IC}$  and  $R_{GJ}$  are in the same order of magnitude. As a result, there is a steady spatial curve at the wave front, leading to continuous impulse propagation, indicated by continuous activation time curves (Fig. 4 A, inset). There were no differences among the different cell sizes, and the curve of discrete cells corresponded well to the ideal curve of a continuous model with the same average  $\rho$ . The distance over which  $\phi$  spreads is characterized by the space (also the length) constant ( $\lambda$ ), which is the distance from the point of maximum  $\phi$  ( $\phi_{max}$ ) to the point where  $\phi = \phi_{max}/e$ , i.e., where  $\phi$  is  $\sim 37\%$  of  $\phi_{max}$ . At 100% of coupling and  $\theta_L \sim 60$  cm/s,  $\lambda$  was  $\sim 300$   $\mu$ m, which was almost fourfold longer than the length of control cells. Thus, the discrete tissue character did not interfere with the impulse propagation. However, at low coupling (Fig. 4 B),  $\lambda$  becomes smaller because of increased  $\rho$ . Cable theory predicts that  $\lambda$  is proportional to  $1/\sqrt{\rho}$ . An eightfold increase of  $\rho$  would lead to an approximately threefold decrease in  $\lambda$ . Accordingly, at 12.5% of coupling and a velocity of  $\sim 30$  cm/s,  $\lambda$  was  $\sim 100$   $\mu$ m in the continuous model. This was in the range of the cell length. Fig. 4 B shows that when  $\lambda$  was equal to or smaller than the cell length, impulse propagation became discontinuous. Low coupling, with  $R_{GJ} \gg R_{IC}$ , does not allow a steady spatial spread of  $\phi$ . In contrast, cells become equipotential with high  $\phi$  gradients along GJs. Each cell acts as a minimum discrete capacitance, being depolarized and



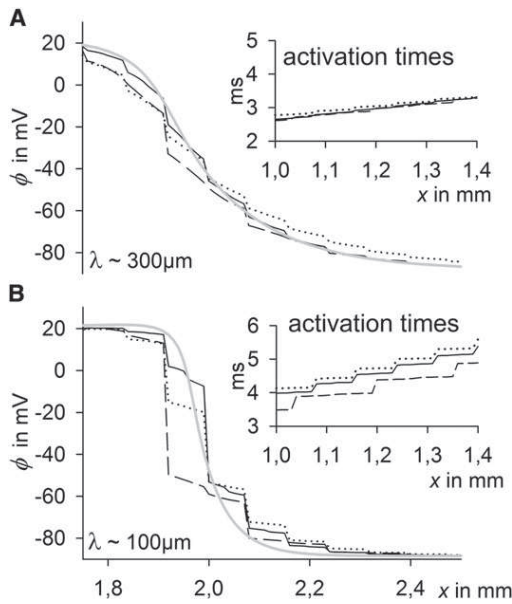


FIGURE 4 Membrane potential ( $\phi$ ) curves in the  $x$ -direction during longitudinal impulse propagation of control cells (black solid line), long cells (dashed line), and wide cells (dotted line), and a continuous model (gray solid line) in which resistivity is that same as in the control cell.  $g_{GJ}$  was adapted in enlarged cells to obtain the same  $\theta_L$  and  $\theta_T$  at 100% of coupling as in the control ( $\pm 5\%$ ). (Insets) Activation times in the  $x$ -direction (right), and  $\lambda$  (left), the space constant. (A) 100% of coupling. (B) 12.5% of coupling.

activating at once. As a result,  $\lambda$  cannot drop below the cell length and  $\theta$  becomes lower than predicted by the cable theory (where  $\theta$  is proportional to  $1/\sqrt{\rho}$ ). As an indicator for discontinuous propagation we calculated junctional and intracellular activation time delays (JD and ID). A high JD/ID ratio indicates discontinuity. During longitudinal propagation, control cells and cells of increased length revealed similar values: their respective JD/ID ratios were 0.7 and 0.6 at 100% of coupling and 4.6 and 3.9 at 12.5% of coupling. In contrast, wide cells showed significantly higher values: 1.4 at 100% of coupling and 13.5 at 12.5% of coupling, i.e., propagation in wide cells became discontinuous earlier. This is an additional explanation of why  $\theta_L$  decreased most rapidly in wide cells (Fig. 3). During transverse propagation, ID was already negligible at 100% of coupling, with very high JD/ID ratios (between 27 and 37), indicating that in the transverse direction there is always discontinuous propagation. This fits with the result that  $\theta_T$  showed a similar decay during gradual uncoupling in all cell size groups and that  $\theta_T$  was more affected than  $\theta_L$  by uncoupling (Fig. 3) (for details, see Fig. S4).

#### Conduction block

As described above,  $\lambda$  cannot drop below a certain value in a medium with discrete capacitive units, i.e., below cell length in longitudinal and below cell width in transverse propagation. A consequence would be that the whole-cell

capacitance must be charged until its activation threshold, i.e., the lowest charge ( $Q$ ) that must be provided by already-activated cells is proportional to the cell size. To verify this prediction, we calculated the  $Q$  accumulated by nonactivated tissue in front of the activation wave (Fig. 5 A). At 100% of coupling, equal values were obtained from different cell sizes and a continuous model with the same  $\rho$ . At 12.5% of coupling, tissue with discrete elements (cells) accumulated more  $Q$  than did the continuous model and enlarged cells accumulated more than did control cells. This was more pronounced at 1.56% of coupling. As expected, long cells, having the highest discrete capacitance/tissue width in the longitudinal direction, revealed the highest  $Q$  accumulation. Accordingly, in the transverse direction, wide cells showed the highest  $Q$  values (not shown). Coupling was further reduced until conduction block occurred (Fig. 5 B). Minimum  $\theta_L$  and  $\theta_T$  correlated well with the cell length and width, respectively. Block occurred at  $\sim 5$  nS in control cells,  $\sim 10$  nS in long cells, and  $\sim 12$  nS in wide cells, corresponding well to the minimum discrete capacitance ( $C$ ), i.e.,  $C_{\text{cell}}$  (113 pF, 214 pF, and 251 pF, respectively). Thus,  $g_{GJ}/C_{\text{cell}}$  was constant ( $\sim 45$  pS/pF). Note that in a continuous model there is no conduction block. If block occurs, a smaller value of  $\Delta x$  or  $\Delta y$ , reducing the minimum capacitive unit, always allows conduction to be maintained.

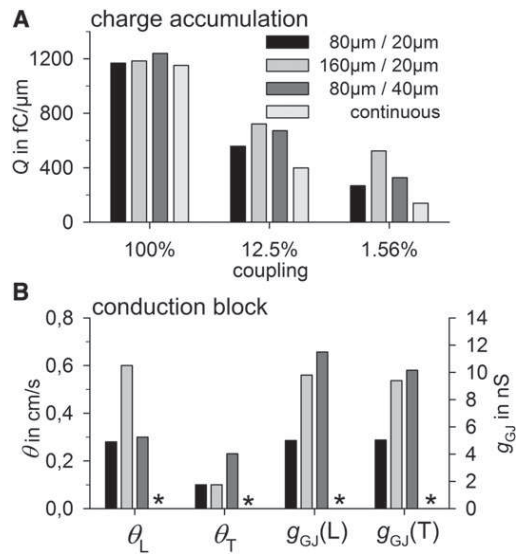


FIGURE 5 (A) Charge accumulated by nonactivated cells during longitudinal impulse propagation at 100%, 12.5%, and 1.56% of coupling in control cells (80  $\mu\text{m}/20 \mu\text{m}$ ), long cells (160  $\mu\text{m}/20 \mu\text{m}$ ), and wide cells (80  $\mu\text{m}/40 \mu\text{m}$ ), and in a continuous model with the same resistivity as the control. Note that this charge corresponds to the area under the curve ( $\phi$ ) in Fig. 4 within the  $x$ -interval from the point where  $\phi \sim -40$  mV to  $x_{\text{max}}$ , multiplied by the specific membrane capacity (in  $\text{pF}/\mu\text{m}^2$ ). For details, see Fig. S5, Fig. S6, and Fig. S7. (B) Minimum longitudinal ( $L$ ) and transverse ( $T$ )  $\theta$  and minimum  $g_{GJ}$  directly before conduction block due to uncoupling. There is no block in a continuous model (asterisks).

**Reduced excitability**

To analyze the influence of reduced membrane excitability on different cell sizes,  $g_{Na}$  was reduced gradually from 100% (16 mS/ $\mu$ F) to 10% (1.6 mS/ $\mu$ F). The effect of reduced  $g_{Na}$  on the spatial curve of  $\varphi$  is contrary to the effect of reduced  $g_{GJ}$ . Whereas a reduction of  $g_{GJ}$  decreased the space constant ( $\lambda$ ), a reduction of  $g_{Na}$  led to an increase in  $\lambda$ . As a consequence, the effects of low  $g_{Na}$  did not differ from those in a continuous model and did not reveal differences in enlarged cells. Conduction block occurred at 13% of  $g_{Na}$  in all groups (Fig. S8).

**GJ lateralization**

Fig. 6 shows the effects of fivefold-enhanced lateral  $g_{GJ}$  (from 2.6 to 13  $\mu$ S) under conditions of normal lateral GJ distribution (Fig. 6 A) and uniform lateral GJ distribution (Fig. 6 B). It is interesting to note that under normal distribution conditions, enhanced lateral  $g_{GJ}$  increased not only  $\theta_T$ , from 16 cm/s to 30 cm/s, but also  $\theta_L$ , from 59cm/s to 63cm/s. Furthermore, it stabilized both  $\theta_L$  and  $\theta_T$  against uncoupling (Fig. 6 C). Under conditions of uniform GJ distribution, enhanced lateral  $g_{GJ}$  had a negligible effect on  $\theta_L$  but increased  $\theta_T$  to 40 cm/s, 33% higher than with normal GJ distribution, but lower lateral  $g_{GJ}$  (2.6  $\mu$ S) effected an increase in  $\theta_T$  of only 12% (from 16 to 18 cm/s) under uniform compared to normal distribution. Hence, at a given  $\theta_T$ , uniform distribution is more strongly affected by  $g_{GJ}$ . The reason is that if lateral GJs are concentrated near the cell poles (normal distribution), currents must flow in the

longitudinal cell direction also to activate the downstream cell (zig-zag-like), whereas this is not necessary if GJs are uniformly distributed (for better understanding, see Fig. 6, A and B, insets, or Fig. 1). As a result, longitudinal intracellular resistance ( $R$ ) contributes to total  $R$  during transverse impulse propagation. Thus, if lateral  $g_{GJ}$  is changed, the resulting change in total  $R$  is higher in cells with uniform lateral GJ distribution.

**Microscopic effects**

Increased lateral  $g_{GJ}$  was able to stabilize  $\theta_L$  against uncoupling (Fig. 6 C), i.e., it enhanced  $\theta_L$  more when coupling and  $\theta_L$  were low. This effect is a result of overlapping cells and the decrease of the space constant  $\lambda$  at low  $g_{GJ}$  (Fig. 7). As a consequence of cell arrangement, the activation wave front is not completely planar (Fig. 7 A, inset). Thus, there is a  $\varphi$  gradient in the transverse direction, which is the driving

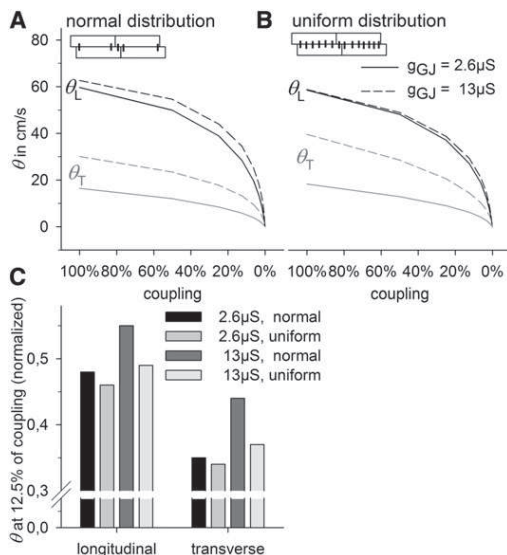


FIGURE 6 Effects of increased lateral  $g_{GJ}$  on  $\theta_L$  and  $\theta_T$ . Lateral  $g_{GJ}$  was increased from 2.6  $\mu$ S to 13  $\mu$ S. (A) Normal lateral GJ distribution with 90% of lateral  $g_{GJ}$  near the poles (see inset). (B) Uniform lateral GJ distribution. (C)  $\theta_L$  and  $\theta_T$  at 12.5% of coupling, normalized to their values at 100% of coupling.

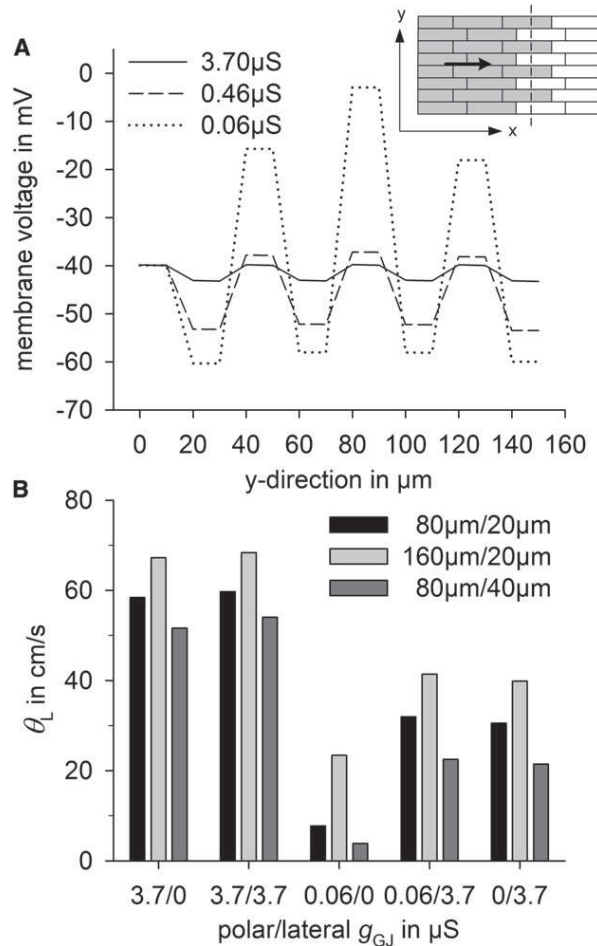


FIGURE 7 (A) Membrane potential gradients in the transverse direction (y) during longitudinal impulse propagation (see inset, where activated cells are gray) at 100%, 12.5%, and 1.56% of coupling in control cells, with polar and lateral  $g_{GJ}$ s of 3.7  $\mu$ S, 0.46  $\mu$ S, and 0.06  $\mu$ S, respectively. (B) Effects of polar and lateral  $g_{GJ}$  on  $\theta_L$  in control cells (80  $\mu$ m/20  $\mu$ m), long cells (160  $\mu$ m/20  $\mu$ m), and wide cells (80  $\mu$ m/40  $\mu$ m).

force for lateral currents. A smaller  $\lambda$  in the longitudinal direction (low coupling) causes higher transverse  $\varphi$  gradients, i.e., the driving force for lateral currents increases as coupling decreases. Accordingly, high lateral  $g_{GJ}$  had more of an effect at low polar  $g_{GJ}$  (Fig. 7 B). Note that high lateral  $g_{GJ}$  was able to partially counteract cell-size effects at low polar  $g_{GJ}$ . At polar  $g_{GJ}$  0.06  $\mu\text{S}$  and lateral  $g_{GJ}$  0  $\mu\text{S}$ , control cells, long cells, and wide cells had  $\theta_L$  values of 8 cm/s, 23 cm/s, and 4 cm/s, respectively. That is,  $\theta_L$  was around sixfold higher in long than in wide cells. If lateral  $g_{GJ}$  was 3.7  $\mu\text{S}$ ,  $\theta_L$  values were 32 cm/s, 41 cm/s, and 23 cm/s, respectively, i.e.,  $\theta_L$  was less than twofold higher in long than in wide cells.

### Macroscopic effects

Similar effects of increased lateral  $g_{GJ}$  were observed on a more macroscopic scale (Fig. 8). To simulate heterogeneity, a tissue stripe of 4 mm  $\times$  1 mm was initialized with differing polar  $g_{GJ}$  and stimulated to obtain longitudinal propagation. In the upper half of the stripe, polar  $g_{GJ}$  was

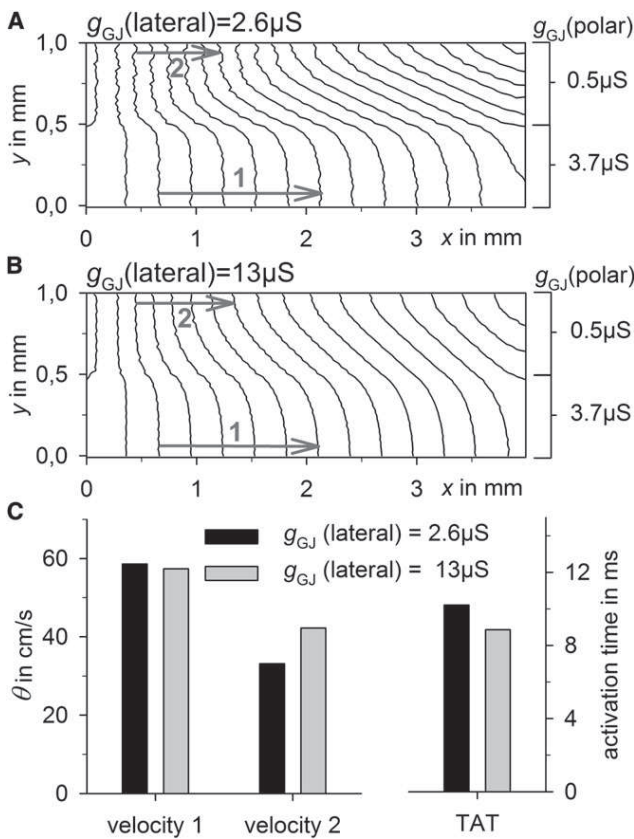


FIGURE 8 A tissue stripe of 4 mm  $\times$  1 mm was simulated with different polar  $g_{GJ}$ s (3.7  $\mu\text{S}$  and 0.5  $\mu\text{S}$ ).  $\theta$  was measured in the areas of high polar coupling (velocity 1) and low polar coupling (velocity 2) (gray arrows). (A) Isochrones of tissue activation for a lateral  $g_{GJ}$  of 2.6  $\mu\text{S}$ . (B) Isochrones of tissue activation for a lateral  $g_{GJ}$  of 13  $\mu\text{S}$ . Distance between isochrones is 0.5 ms. (C) Velocity 1, velocity 2, and tissue activation time (TAT) at normal (black) and increased (gray) lateral  $g_{GJ}$ .

decreased to 12.5% (0.5  $\mu\text{S}$ ), whereas it was normal in the lower half (3.7  $\mu\text{S}$ ) (Fig. 8 A). A fivefold increase in lateral  $g_{GJ}$  from 2.6  $\mu\text{S}$  to 13  $\mu\text{S}$  was able to smooth the activation wavefront (Fig. 8 B) and to enhance  $\theta_L$  in the partially uncoupled area from 33 cm/s to 42 cm/s, whereas  $\theta_L$  was unchanged in the well-coupled area (58 cm/s). Furthermore, the tissue activation time was reduced from 10.2 ms to 8.8 ms (Fig. 8 C).

### Conduction block at tissue expansion

We concluded by investigating the susceptibility of different cell sizes and degrees of GJ lateralization to conduction block at elliptic wave propagation, using a tissue expansion model (see Fig. 9 A, inset). The critical width of a cell strand at which propagation could be maintained in the expanded area,  $h_c$ , was determined. Fig. 9 A plots  $h_c$  at different cell

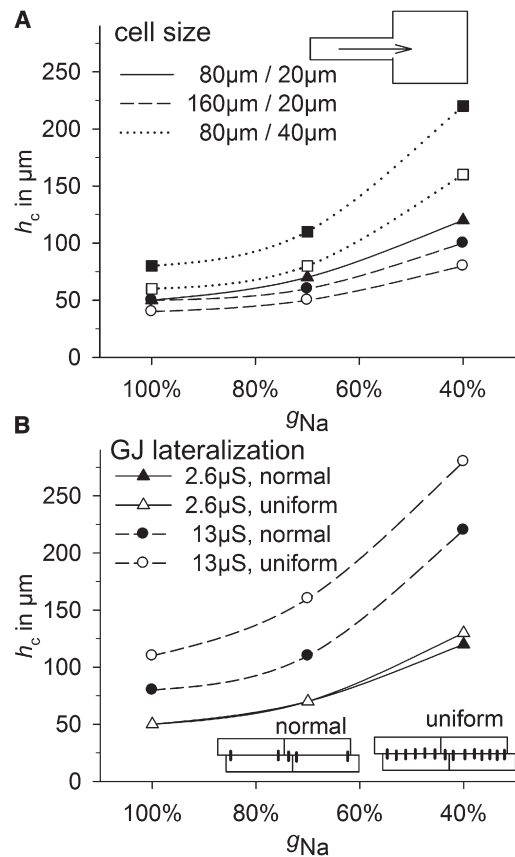


FIGURE 9 Susceptibility to conduction block determined by a tissue expansion model. The critical width ( $h_c$ ) of a 4-mm-long source strand at which propagation can be maintained in the 4 mm  $\times$  4 mm bulk area (see inset in A) was determined at 100%, 70%, and 40% of the maximum sodium channel conductance ( $g_{Na}$ ). (A)  $h_c$  versus  $g_{Na}$  in control cells (80  $\mu\text{m}$ /20  $\mu\text{m}$ ; solid line), long cells (160  $\mu\text{m}$ /20  $\mu\text{m}$ ; dashed lines), and wide cells (80  $\mu\text{m}$ /40  $\mu\text{m}$ ; dotted lines). Assumption I ( $g_{GJ}$  proportional to  $A_m$ ) is represented by solid symbols, and assumption II (constant  $g_{GJ}$ ) by open symbols. (B)  $h_c$  versus  $g_{Na}$  in control cells with normal (solid symbols) or uniform (open symbols) GJ distribution (insets) while lateral  $g_{GJ}$  was 2.6  $\mu\text{S}$  (solid lines) or 13  $\mu\text{S}$  (dashed lines).



sizes against  $g_{Na}$ , showing that with increased cell diameter,  $h_c$  increases from 50  $\mu\text{m}$  (control) to 80  $\mu\text{m}$  (+60%) if  $g_{GJ}$  is proportional to  $A_m$  (assumption I). A reduction of  $g_{Na}$  to 40% potentiated this, leading to an  $h_c$  of 120  $\mu\text{m}$  in control and 220  $\mu\text{m}$  (+83%) in wide cells. If  $g_{GJ}$  was constant (assumption II), the effects were similar but less significant. In long cells, however,  $h_c$  was equal to or smaller than the control cell value at both increased and constant  $g_{GJ}$ . GJ lateralization (Fig. 9 B) was able to increase  $h_c$  strikingly. Whereas at normal lateral  $g_{GJ}$  (2.6  $\mu\text{S}$ ), a uniform lateral GJ distribution had no effect, at fivefold-higher  $g_{GJ}$  (13  $\mu\text{S}$ ),  $h_c$  increased from 50  $\mu\text{m}$  to 80  $\mu\text{m}$  (+60%) with normal GJ distribution and 110  $\mu\text{m}$  (+120%) with uniform GJ distribution. When  $g_{Na}$  was reduced to 40%, this effect became more pronounced:  $h_c$  increased from 120  $\mu\text{m}$  in control to 220  $\mu\text{m}$  (+83%) with normal and 280  $\mu\text{m}$  (+133%) with uniform GJ distribution.

## DISCUSSION

This study demonstrates that there is a complex interplay between cell size, cell arrangement, and gap junction (GJ) distribution, showing that cell size, shape, and lateral GJ conductance ( $g_{GJ}$ ) are important factors in modulating the influence of uncoupling on conduction velocity ( $\theta$ ).

Cell size not only affected  $\theta$  at normal conditions, but also modulated the effects of partial uncoupling on  $\theta$ . Increasing the cell diameter or the cell length led to an approximately twofold-higher cell capacitance ( $C_{cell}$ ) but resulted in significant differences in  $\theta_L$  and  $\theta_T$ .  $\theta_L$  in long cells was high and showed a very slow decline during uncoupling, whereas  $\theta_L$  in wide cells decreased much more quickly. We were able to show that there are two underlying mechanisms. On the one hand, long cells have a lower  $R_{GJ}/R_{IC}$  ratio, i.e., total  $R$  is less affected by increased  $R_{GJ}$ , contrary to the situation in wide cells. On the other hand, impulse propagation in wide cells becomes discontinuous more rapidly, also reducing  $\theta_L$ . Spach et al. (13) supposed that increasing cell size at a given  $g_{GJ}$  increases discontinuity. The results of this study confirm that supposition for increased diameter but not for increased length. However,  $\theta_T$  was significantly greater in wide cells, resulting in lower anisotropy and higher risk of conduction block at tissue expansion (Fig. 9), which is a result of mismatches between current sources and sinks (34,39,40). It was also shown that  $C_{cell}$  is directly related to the occurrence of conduction block at very low  $g_{GJ}$ , since  $C_{cell}/g_{GJ}$  was constant. The discontinuous nature of propagation does not allow capacitive units smaller than the cell size, leading to earlier block (at higher  $\theta$  and at higher  $g_{GJ}$ ) in enlarged cells. In summary, small cells and cells with a high length/width ratio seem to have advantageous properties regarding  $\theta_L$ , anisotropy ( $\theta_L/\theta_T$ ), effects of uncoupling, and conduction blocks. This fits well with the results of Ghaly et al. (15) and Nygren et al. (27), who found a “reduced conduction reserve”, together

with Cx lateralization and shorter cells, in diabetic hearts. Unfortunately, they did not discriminate between  $\theta_L$  and  $\theta_T$  and did not measure  $g_{GJ}$ . This study explains that reduced conduction reserve (Fig. 3 and Table 2), since shorter cells are more affected by uncoupling due to an increased  $R_{GJ}/R_{IC}$  ratio. The aforementioned studies (15,27) also found higher sensitivity to reduced  $g_{Na}$ , which cannot be explained by altered cell size (Fig. S8). Spach et al. (29) demonstrated a positive correlation between cell size and  $\theta$ , whereas McIntyre et al. (16) found a negative correlation. Both can be explained by the results of this study. Increased diameter reduces  $\theta_L$  if  $g_{GJ}$  remains constant, whereas it increases  $\theta_L$  if  $g_{GJ}$  is proportional to  $A_m$ , suggesting that  $g_{GJ}/C_{cell}$  and  $A_m/V$  (Tables 1 and 2) are more important in analyzing cardiac disease than is  $g_{GJ}$ .

Lateral GJ distribution proved to be crucial not only for  $\theta_T$  but also for  $\theta_L$ . It has been shown by other authors (41,42) that a bricklike cell arrangement can increase  $\theta_L$ , but those studies lacked a detailed explanation of why this would be the case. This study provides a systematic insight and explains this mechanism, showing that the 2D effects present in planar wave propagation cannot be taken into account by one-dimensional models (Fig. 7). High lateral  $g_{GJ}$  can stabilize  $\theta_L$  against uncoupling (Figs. 6 and 7) and can balance out inhomogeneities on a microscopic and a macroscopic scale, decreasing activation time (Fig. 8). Therefore, GJ lateralization may be a compensating mechanism in cardiac disease, which is often accompanied by increased inhomogeneity, e.g., due to fibrosis (29). However, there may also be negative effects of increased lateral  $g_{GJ}$ . As indicated by Fig. 9, the susceptibility to conduction block at tissue expansion becomes significantly higher, as do the effects of reduced  $g_{Na}$ . Cx lateralization with constant  $g_{GJ}$  decreased  $\theta_L$  slightly and increased  $\theta_T$  by up to 30%, in accordance with other studies (28), but also allowed much higher  $\theta_T$  (Fig. 6). The question remains whether lateralized Cx increases lateral  $g_{GJ}$ . Experimental data show that Cx43 lateralization coincides with enhanced  $\theta_T$  in human atria (Fig. 2), giving a rationale for the simulations. However, the findings discussed here refer to ventricular hypertrophy. In vivo, hypertrophy is often accompanied by fibrosis, with collagen separating lateral cell strands, reducing  $\theta_T$  (29), i.e.,  $\theta_T$  can hardly be used as an indicator of lateral  $g_{GJ}$  in hypertrophied ventricles. However, fibrotic strands are not evenly distributed, i.e., areas showing the changes obtained from simulations of high lateral  $g_{GJ}$  may be adjacent to areas with transverse uncoupling.

## CONCLUSIONS

The  $g_{GJ}/C_{cell}$  ratio and the cell shape can be more important than absolute values, indicating a lack of experimental data regarding the combination of geometrical and functional measurements, because there are very few data on the functionality of lateralized Cx and on specific alterations of cell

size, shape, and  $g_{GJ}$  in cardiac diseases. This study required several assumptions. Some effects of increased cell size and GJ lateralization found in this study, e.g., the higher risk of conduction block in wide cells and cells with GJ lateralization, as well as the faster decline of  $\theta_L$  in wide cells, are proarrhythmic. It is important to note that cardiac diseases often coincide with altered transmembrane currents (7–9,43), higher degrees of inhomogeneity, and fibrosis (29,44–46), which may further increase the risk of arrhythmia. Taking this into account together with cell-size effects could be the subject of further studies.

## SUPPORTING MATERIAL

Additional methods, results, references, and eight figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(10\)01111-2](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(10)01111-2).

This research was supported by the Faculty of Medicine of the University of Leipzig (T.S.).

## REFERENCES

- Kozhevnikov, D. O., K. Yamamoto, ..., N. El-Sherif. 2002. Electrophysiological mechanism of enhanced susceptibility of hypertrophied heart to acquired torsade de pointes arrhythmias: tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circulation*. 105:1128–1134.
- Tomaselli, G. F., and E. Marbán. 1999. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 42:270–283.
- Winterton, S. J., M. A. Turner, ..., D. J. Sheridan. 1994. Hypertrophy causes delayed conduction in human and guinea pig myocardium: accentuation during ischaemic perfusion. *Cardiovasc. Res.* 28:47–54.
- Qin, D., Z. H. Zhang, ..., N. el-Sherif. 1996. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ. Res.* 79:461–473.
- Kohya, T., H. Yokoshiki, ..., A. Kitabatake. 1995. Regression of left ventricular hypertrophy prevents ischemia-induced lethal arrhythmias. Beneficial effect of angiotensin II blockade. *Circ. Res.* 76:892–899.
- Virmani, R., A. P. Burke, and A. Farb. 2001. Sudden cardiac death. *Cardiovasc. Pathol.* 10:211–218.
- Beuckelmann, D. J., M. Näbauer, and E. Erdmann. 1993. Alterations of  $K^+$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.* 73:379–385.
- Kääb, S., J. Dixon, ..., G. F. Tomaselli. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*. 98:1383–1393.
- Priebe, L., and D. J. Beuckelmann. 1998. Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ. Res.* 82:1206–1223.
- Swynghedauw, B., C. Baillard, and P. Milliez. 2003. The long QT interval is not only inherited but is also linked to cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 81:336–345.
- George, Jr., A. L. 2009. Common genetic variants in sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 6(11, Suppl):S3–S9.
- Joyner, R. W. 1982. Effects of the discrete pattern of electrical coupling on propagation through an electrical syncytium. *Circ. Res.* 50:192–200.
- Spach, M. S., J. F. Heidlage, ..., R. C. Barr. 2000. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ. Res.* 86:302–311.
- Fast, V. G., and A. G. Kléber. 1994. Anisotropic conduction in monolayers of neonatal rat heart cells cultured on collagen substrate. *Circ. Res.* 75:591–595.
- Ghaly, H. A., P. M. Boyle, ..., A. Nygren. 2010. Simulations of reduced conduction reserve in the diabetic rat heart: response to uncoupling and reduced excitability. *Ann. Biomed. Eng.* 38:1415–1425.
- McIntyre, H., and C. H. Fry. 1997. Abnormal action potential conduction in isolated human hypertrophied left ventricular myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 8:887–894.
- Kostin, S., S. Dammer, ..., J. Schaper. 2004. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc. Res.* 62:426–436.
- Kostin, S., M. Rieger, ..., J. Schaper. 2003. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol. Cell. Biochem.* 242:135–144.
- Akar, F. G., R. D. Nass, ..., G. F. Tomaselli. 2007. Dynamic changes in conduction velocity and gap junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293:H1223–H1230.
- Sepp, R., N. J. Severs, and R. G. Gourdie. 1996. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 76:412–417.
- Smith, J. H., C. R. Green, ..., N. J. Severs. 1991. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am. J. Pathol.* 139:801–821.
- Luke, R. A., and J. E. Saffitz. 1991. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J. Clin. Invest.* 87:1594–1602.
- Peters, N. S., C. R. Green, ..., N. J. Severs. 1993. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*. 88:864–875.
- Salameh, A., S. Krautblatter, ..., J. Janousek. 2009. The signal transduction cascade regulating the expression of the gap junction protein connexin43 by  $\beta$ -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 158:198–208.
- Kostin, S., G. Klein, ..., J. Schaper. 2002. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc. Res.* 54:361–379.
- Polontchouk, L., J. A. Haefliger, ..., S. Dhein. 2001. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:883–891.
- Nygren, A., M. L. Olson, ..., Y. Shimoni. 2007. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. *J. Physiol.* 580:543–560.
- Cabo, C., and P. A. Boyden. 2009. Extracellular space attenuates the effect of gap junctional remodeling on wave propagation: a computational study. *Biophys. J.* 96:3092–3101.
- Dhein, S., and S. B. Hammerath. 2001. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364:397–408.
- Luo, C. H., and Y. Rudy. 1994. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ. Res.* 74:1071–1096.
- Sawada, K., and K. Kawamura. 1991. Architecture of myocardial cells in human cardiac ventricles with concentric and eccentric hypertrophy as demonstrated by quantitative scanning electron microscopy. *Heart Vessels*. 6:129–142.
- Botchway, A. N., M. A. Turner, ..., C. H. Fry. 2003. Electrophysiological effects accompanying regression of left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 60:510–517.
- Cascio, W. E., G. X. Yan, and A. G. Kléber. 1990. Passive electrical properties, mechanical activity, and extracellular potassium in arterially perfused and ischemic rabbit ventricular muscle. Effects of calcium entry blockade or hypocalcemia. *Circ. Res.* 66:1461–1473.
- Kléber, A. G., and Y. Rudy. 2004. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol. Rev.* 84:431–488.

35. Peters, N. S. 1996. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin. Sci.* 90:447–452.
36. Dupont, E., T. Matsushita, ..., N. J. Severs. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33:359–371.
37. Rojas Gomez, D. M., J. S. Schulte, ..., S. Dhein. 2008.  $\alpha$ -1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 377:77–85.
38. Aiello, E. A., M. C. Villa-Abrille, ..., H. E. Cingolani. 2004. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286:H1229–H1235.
39. Fast, V. G., and A. G. Kléber. 1995. Block of impulse propagation at an abrupt tissue expansion: evaluation of the critical strand diameter in 2- and 3-dimensional computer models. *Cardiovasc. Res.* 30:449–459.
40. Rohr, S., J. P. Kucera, ..., A. G. Kléber. 1997. Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science.* 275:841–844.
41. Hubbard, M. L., W. Ying, and C. S. Henriquez. 2007. Effect of gap junction distribution on impulse propagation in a monolayer of myocytes: a model study. *Europace.* 9 (Suppl 6):vi20–vi28.
42. Hand, P. E., B. E. Griffith, and C. S. Peskin. 2009. Deriving macroscopic myocardial conductivities by homogenization of microscopic models. *Bull. Math. Biol.* 71:1707–1726.
43. Chorvatova, A., R. Snowdon, ..., M. Hussain. 2004. Effects of pressure overload-induced hypertrophy on TTX-sensitive inward currents in guinea pig left ventricle. *Mol. Cell. Biochem.* 261:217–226.
44. Ehrlich, J. R., S. Nattel, and S. H. Hohnloser. 2002. Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13:399–405.
45. Spach, M. S., and J. P. Boineau. 1997. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 20:397–413.
46. Boldt, A., U. Wetzel, ..., S. Dhein. 2004. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart.* 90:400–405.

### **3. Zusammenfassung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel:

Eine computermodellgestützte Analyse der elektrophysiologischen Effekte von Gap-Junction-Lateralisierung und zellulärer Hypertrophie in kardialem Gewebe

eingereicht von:

Thomas Seidel

angefertigt am:

Herzzentrum Leipzig, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

betreut von:

Professor Dr. med. Stefan Dhein

Monat und Jahr der Einreichung:

Februar 2011

Viele Herzkrankheiten, die mit strukturellen Veränderungen des Myokards einhergehen, z. B. hypertrophe Kardiomyopathien, sind mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Arrhythmien und plötzlichen Herztod assoziiert. Arrhythmien sind eine Folge veränderten elektrophysiologischen Verhaltens, d. h. einer gestörten Erregungsbildung oder einer gestörten Erregungsleitung.

Hypertrophe Kardiomyopathien, aber auch die chronische Herzinsuffizienz und andere Kardiomyopathien, gehen mit Veränderungen von Größe und Form der Kardiomyozyten einher. Außerdem kann bei den meisten dieser Erkrankungen ein so genanntes Remodeling der Gap-Junctions beobachtet werden. Darunter versteht man eine vom gesunden Myokard abweichende Anzahl und geometrische Anordnung der Gap-Junction bildenden Proteine (Connexine). Insbesondere wird eine Connexin-Lateralisierung beschrieben, was bedeutet, dass eine erhöhte Menge an Connexin entlang der lateralen (seitlichen) Zellmembranen gefunden wird.

Folglich besteht ein Zusammenhang zwischen veränderter Zellgröße sowie Connexin-Lateralisierung einerseits und Arrhythmien andererseits. Bisläng ist jedoch unklar, ob es sich um einen direkten kausalen Zusammenhang handelt. Es ist bereits bekannt, dass die kardiale Erregungsausbreitung neben anderen Faktoren von der Zellgröße abhängen kann. Tiefergehende und vor allem kausale Zusammenhänge sind bisher allerdings nicht bekannt. Ebenso ist bisher unklar, in welchem Maße sich eine Connexin- bzw. Gap-Junction-Lateralisierung auf die kardiale Erregungsausbreitung auswirkt. Zudem weisen die Zusammenhänge zwischen Erregungsausbreitung, Zellgröße und Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) eine sehr hohe Komplexität auf, weshalb sie bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnten.

Das Problem, das sich beim Versuch diese Zusammenhänge zu untersuchen stellt, ist, dass es bisher experimentell nicht möglich ist, gezielt einzelne Parameter, z. B. die Zellgröße oder  $g_{GJ}$ , isoliert im intakten Gewebe zu variieren und deren Auswirkungen zu erfassen. Es existiert zudem noch eine experimentelle Lücke zwischen kardialen Mapping-Experimenten, welche die Erregungsausbreitung auf makroskopischer Ebene messen, und Patch-Clamp-Experimenten, welche nur wenige Einzelzellen erfassen können.

Für eben diese beiden Probleme bieten sich biophysikalische Computermodelle der kardialen Erregungsausbreitung an. Sie können einerseits die Lücke zwischen Mapping- und Patch-Clamp-Experimenten schließen, indem sie präzise den Bereich zwischen mikroskopischer und makroskopischer Ebene abbilden. Andererseits erlauben es Modelle, sehr gezielt einzelne Parameter oder definierte Kombinationen von Parametern zu verändern, um direkt ihre Auswirkungen zu analysieren.

Die Ziele dieser Arbeit waren es, zunächst ein geeignetes Modell zu erschaffen und es zu validieren. Anschließend sollte eine umfangreiche systematische Analyse des Einflusses von Zellgröße, geometrischer Anordnung der Zellen und von Connexin-Lateralisierung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften ventrikulären Myokards durchgeführt werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob und wie durch die möglichen Einflüsse auf die Erregungsausbreitung das Arrhythmierisiko erhöht werden kann. Zu den untersuchten Eigenschaften gehörten Veränderungen der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit, das Risiko für unidirektionale Leitungsblocks und das Verhalten bei einer Entkopplung der Zellen.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup> Unter Entkopplung wird eine Reduktion der Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{GJ}$ ) verstanden. Die longitudinale Richtung der Kardiomyozyten ist identisch mit dem Faserverlauf des Myokards, während die transversale Richtung quer zu Zellen und Fasern verläuft. Man unterscheidet zwischen longitudinaler und transversaler Ausbreitungsrichtung und -geschwindigkeit, weil im gesunden Herzen die longitudinale Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung rund zwei- bis dreimal höher ist als die transversale Geschwindigkeit. Diesen Umstand bezeichnet man als Anisotropie.



Zu den Anforderungen, die das Modell erfüllen musste, gehörte vor allem eine hohe räumliche Auflösung in mindestens zwei Dimensionen, so dass zellgeometrische Eigenschaften wie Länge, Durchmesser und räumliche Anordnungen der Zellen abgebildet werden konnten. Die Auflösung musste auch deshalb die subzelluläre Ebene (im Bereich weniger Mikrometer) erfassen, weil nur auf diese Weise eine unterschiedliche Verteilung der Gap-Junctions entlang der Zellmembran simuliert werden konnte. Bisherige Modelle dieses räumlichen Auflösungsgrades waren meist eindimensional. Daher wurde ein zweidimensionales Computermodell zur Simulation ventrikulären kardialen Gewebes entwickelt und in der Programmiersprache Object Pascal implementiert. Es basiert auf den Einzelzellmodellen von Luo und Rudy (1994) sowie von Priebe und Beuckelmann (1998). Die räumliche Integration wurde mit Hilfe einer kompakten Finite-Differenzen-Methode realisiert.

Zellen normaler Größe (Länge / Durchmesser: 80  $\mu\text{m}$  / 20  $\mu\text{m}$ ), lange Zellen (160  $\mu\text{m}$  / 20  $\mu\text{m}$ ) und breite Zellen (80  $\mu\text{m}$  / 40  $\mu\text{m}$ ) wurden simuliert, um Effekte zellulärer Hypertrophie zu untersuchen. Bei einer Vergrößerung der Zellen wurde zwischen zwei Fällen unterschieden: entweder wurde die Gap-Junction-Leitfähigkeit ( $g_{\text{GJ}}$ ) proportional zur Membranfläche erhöht (Annahme I), oder  $g_{\text{GJ}}$  blieb konstant (Annahme II). Um Auswirkungen einer Connexin-Lateralisierung zu analysieren, wurde eine Umverteilung des Connexins entlang der lateralen Zellmembran (normale oder uniforme Verteilung) simuliert und entweder mit konstanter oder mit erhöhter lateraler  $g_{\text{GJ}}$  kombiniert, da experimentelle Studien zeigen, dass beide Fälle eintreten können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die longitudinale Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit ( $v$ ) in langen Zellen sehr stabil war, d. h., sie fiel bei schrittweiser Reduktion von  $g_{\text{GJ}}$  (graduelle Entkopplung) nur sehr langsam ab. Bei gradueller Entkopplung von breiten Zellen hingegen zeigte  $v$  in longitudinaler Richtung einen signifikant stärkeren Abfall. Das Muster der Erregungsausbreitung bei breiten Zellen war zudem durch einen höheren Grad an Diskontinuität<sup>9</sup> gekennzeichnet, insbesondere unter Annahme II. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die entscheidenden Parameter für die Vorhersage des Diskontinuitätsgrades das Verhältnis von Zelllänge zu Zelldurchmesser sowie das Verhältnis von Gap-Junction-Widerstand zu intrazellulärem Widerstand sind. Diese Verhältnisse hatten eine höhere Aussagekraft als die

---

<sup>9</sup> Unter diskontinuierlicher Erregungsausbreitung versteht man eine Aktivierung der Zellen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, d. h., dass die elektrische Kapazität jeder Zelle als Einheit fungiert und zufließende Ströme nur dann ein Aktionspotential induzieren können, wenn sie ausreichen, um die gesamte Zellkapazität auf das Schwellenpotential aufzuladen. Im Normalfall ist die Erregungsleitung aber kontinuierlich, d. h., dass zunächst nur ein Teil der Zelle aktiviert ist, sich in diesem Teil die Natriumkanäle öffnen, und jede Zelle auf diese Weise zu ihrer eigenen Depolarisation beiträgt. Findet dies – wie bei diskontinuierlicher Leitung – nicht mehr statt, sinkt  $v$  und das Risiko für einen Leitungsblock steigt.

entsprechenden Einzelwerte. Je geringer das Länge-Durchmesser-Verhältnis und je größer das Widerstandsverhältnis von Gap-Junctions zu Intrazellularraum waren, desto anfälliger waren die Zellen gegenüber einer Entkopplung. Ein Leitungsblock als Folge starker Entkopplung trat in vergrößerten (langen / breiten) Zellen eher auf als in Zellen der Kontrolle. Es stellte sich heraus, dass die Ursache in der erhöhten Zellkapazität lag (214 pF / 251 pF bzw. 113 pF).

Eine Erhöhung der lateralen  $g_{GJ}$  stabilisierte überraschenderweise die longitudinale  $v$  sowohl auf mikroskopischer als auch auf makroskopischer Ebene, was nach näherer Untersuchung auf zweidimensionale Effekte zurückzuführen war, die auch während planarer Ausbreitung der Erregungswelle auftreten. Diese Effekte beruhen auf der geometrischen Anordnung von Kardiomyozyten im Gewebe, denn sie sind eine Folge der sich überlappenden Zellen bzw. Zellausläufer. Es konnte gezeigt werden, dass bei geringer longitudinaler  $v$  ein größerer Spannungsgradient in transversaler Richtung in der Nähe der Zellpole auftritt, so dass laterale Gap-Junctions zur longitudinalen Ausbreitung beitragen können. Aus diesem Grund verringerte sich  $v$  bei gradueller Entkopplung langsamer, wenn die laterale  $g_{GJ}$  hoch war. Daher könnte die Connexin-Lateralisierung einen Kompensationsmechanismus für Inhomogenitäten darstellen.

Bei erhöhter lateraler  $g_{GJ}$  ebenso wie bei vergrößertem Zelldurchmesser war die Wahrscheinlichkeit für Missverhältnisse zwischen Stromquellen und Stromsenken<sup>10</sup> signifikant erhöht. Dies äußerte sich in einem erhöhten Risiko für das Entstehen eines unidirektionalen Leitungsblocks bei Erweiterungen des Gewebedurchmessers (Gewebeexpansion). Die simulierten Veränderungen (Hypertrophie, Connexin-Lateralisierung) besitzen aus diesem Grund ein erhöhtes arrhythmogenes Potential.

Aus dieser Arbeit lässt sich schließen, dass das vorgestellte elektrophysiologische Modell ventrikulären Gewebes einer Validierung gegen experimentelle Ergebnisse standhält. Es kann leicht erweitert und an neueste experimentelle Daten angepasst werden. Mit Hilfe des Modells können einerseits Ursache-Wirkung-Beziehungen aufgeklärt werden und experimentelle Daten vor einen theoretischen Hintergrund gestellt werden. Andererseits ist das Modell auch prädiktiv und kann genutzt werden, um Ideen und Thesen für zukünftige Experimente und Studien zu entwickeln.

---

<sup>10</sup> Missverhältnisse zwischen Stromquellen und -senken, die beispielsweise in der Nähe von Erweiterungen des Gewebedurchmessers im Bereich anatomischer Hindernisse auftreten, können zur unidirektionalen Unterbrechung der Erregungsleitung führen. Die Ursache ist, dass bei der so genannten Gewebeexpansion ein großer nicht erregter Bereich (Stromsenke) von Strömen depolarisiert werden muss, die aus einem kleineren bereits erregten Bereich (Stromquelle) kommen. Ist die Ladungsmenge, die von diesen Strömen transportiert wird, zu klein, um eine Aktionspotentialweiterleitung zu induzieren, entsteht ein Leitungsblock.

Es wird ein deutlicher Hinweis auf die Notwendigkeit erbracht, zukünftige Experimente so zu konzipieren, dass geometrisch-morphologische Messungen und elektrophysiologische Messungen kombiniert werden können. Es wird gezeigt, dass eine Interpretation isolierter Parameter kaum möglich ist, weil das Verhältnis mehrerer Parameter zueinander eine entscheidende Rolle spielt. Außerdem beschreibt und erklärt die Arbeit erstmals, dass auch während planarer (d. h. eindimensionaler) Ausbreitung der Erregungswelle zweidimensionale Effekte auf Zellebene auftreten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass selbst planare Erregungsausbreitung nicht vollständig mit Hilfe eindimensionaler Modelle abgebildet werden kann.

Ein besonderes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass zellgeometrische Veränderungen allein in der Lage sind das Arrhythmierisiko zu erhöhen, ohne dass zusätzliche Veränderungen der Zell- oder Gewebeeigenschaften (z. B. veränderte Ionenströme oder Fibrose) notwendig wären. Die daran beteiligten Entstehungsmechanismen werden ausführlich analysiert und erlauben einen neuartigen Einblick in das komplexe Zusammenspiel zwischen der Elektrophysiologie auf zellulärer Ebene und auf Gewebsebene.

Dass allein die Hypertrophie von Kardiomyozyten schon eine potentielle arrhythmogene Wirkung haben kann, könnte nicht nur erklären, dass Herzkrankheiten, die mit Hypertrophie einhergehen, ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien und plötzlichen Herztod aufweisen. Dazu gehören z. B. eine kardiale Hypertrophie bei Aortenstenose oder bei schlecht eingestellter arterieller Hypertonie. Es könnte außerdem auch erklären, warum im Rahmen physiologischer Anpassung erworbene kardiale Hypertrophien, z. B. bei Hochleistungssportlern, mit einer erhöhten Inzidenz maligner Arrhythmien assoziiert sind. Diese Zusammenhänge könnten in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

## Abstract

Many cardiac diseases which are accompanied by structural changes of the myocardium, e.g. hypertrophic cardiomyopathies, are associated with an increased risk of ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. Arrhythmias result from altered electrophysiological behavior, i.e. from impaired impulse generation or impaired impulse propagation.

Especially hypertrophic cardiomyopathies but also chronic heart failure and other cardiomyopathies are accompanied by changes in the size and shape of the cardiomyocytes. Additionally, so-called remodeling of the gap junctions can be observed in most of these diseases, which – as compared to healthy myocardium – refers to a change in the geometrical arrangement and the number of gap junction-building proteins (connexins). In particular, connexin lateralization is described, i.e. an increased amount of connexin along the lateral cell membrane.

Thus, a change in cell size and connexin lateralization are related to arrhythmia. However, it is still unclear whether this is the result of a causal relationship. It is already known that cardiac impulse propagation can depend on the cell size but deeper insights or causal relationships are still unknown. It is also unclear, how connexin lateralization or gap junction lateralization affects cardiac impulse propagation. Furthermore, interrelations between impulse propagation, cell size and gap junction conductivity ( $g_{GJ}$ ) are very complex and therefore remain to be not fully understood.

The problem encountered when trying to investigate these interrelations is that up to now no experimental method exist which allows the variation of single parameters, e.g. cell size or  $g_{GJ}$ , within intact tissue and the analysis of their effects without changing other parameters, too. Furthermore, there is still a gap between cardiac mapping experiments, which allow impulse propagation to be measured on a macroscopic level, and patch-clamp experiments, which allow only one or a few single cells to be analyzed.

Biophysical computer models of cardiac impulse propagation are able to solve those problems. On the one hand, they can close the gap between cardiac mapping and patch-clamp experiments by merging the microscopic and the macroscopic levels in simulation. On the other hand, they allow the variation of isolated parameters or specific combinations of parameters and the immediate analysis of their effects.

First, this study aimed at developing an adequate model and validating such model. Subsequently, the effects of cell size, geometrical cell arrangements and connexin lateralization on the electrophysiological properties of ventricular myocardium were thoroughly and syste-

matically analyzed. Another aim was to investigate whether and how possible effects on impulse propagation could increase the risk of arrhythmia. The properties analyzed included changes in conduction velocity, unidirectional conduction blocks and the behavior during cellular uncoupling.<sup>11</sup>

Special requirements to be fulfilled by the model included high spatial resolution in at least two dimensions as geometrical properties of the cells, e.g. the length, the diameter and the spatial arrangement, had to be simulated. The resolution had to be high enough to cover the subcellular level as different distributions of gap junctions can be simulated only on this level. Previous models with such a degree of spatial resolution were often one-dimensional. Therefore, a 2-dimensional computer model for the simulation of ventricular cardiac tissue was created and implemented in the programming language Object Pascal. It is based on the single-cell models by Luo and Rudy (1994) and Priebe and Beuckelmann (1998). Spatial integration was implemented using a compact finite-difference method.

Normal cells (length/diameter: 80 $\mu\text{m}$ /20 $\mu\text{m}$ ), long cells (160 $\mu\text{m}$ /20 $\mu\text{m}$ ) and wide cells (80 $\mu\text{m}$ /40 $\mu\text{m}$ ) were simulated in order to analyze the effects of cellular hypertrophy. Increasing the cell size, two different cases were defined: either the gap junction conductance ( $g_{\text{GJ}}$ ) was increased proportionally to the membrane area (assumption I) or  $g_{\text{GJ}}$  remained constant (assumption II). In order to analyze the effects of connexin lateralization, a redistribution of connexin along the lateral cell membrane was simulated (normal or uniform distribution). Both distributions were combined with either constant or increased lateral  $g_{\text{GJ}}$  as experimental studies provide evidence that both cases may occur.

The results showed that the longitudinal conduction velocity (CV) in long cells was very stable, i.e. it decreased only slowly over a gradual reduction of  $g_{\text{GJ}}$  (gradual uncoupling). In wide cells, however, longitudinal CV decreased significantly faster. Additionally, the pattern of impulse propagation revealed a higher degree of discontinuity<sup>12</sup> in wide cells, especially under assumption II. This study shows that the crucial parameters for predicting the degree of

---

<sup>11</sup> Uncoupling is the reduction of the gap junction conductivity ( $g_{\text{GJ}}$ ). The longitudinal axis of cardiomyocytes is identical with the orientation of the myocardial fibers. The transverse direction is perpendicular to the cell axis and the orientation of fibers. Distinguishing between longitudinal and transverse direction and conduction velocity (CV) is important because in healthy myocardium the longitudinal CV is two- to threefold higher than the transverse CV. This is called anisotropy.

<sup>12</sup> Discontinuous impulse propagation is characterized by an all-or-nothing principle regarding the activation of cells, i.e. the capacitance of each cell acts as a unit. As a result, depolarizing currents are only able to induce action potential propagation if they carry enough charge to depolarize the whole cell capacitance above the threshold potential. Normally, however, impulse propagation is continuous, i.e. initially only a part of the cell is activated. As a consequence, sodium channels open in this part allowing each cell to contribute to its own depolarization. If this does not happen (during discontinuous propagation) CV decreases and the risk of conduction block increases.

discontinuity are the ratio of cell length to cell diameter and the ratio of gap junction resistance to intracellular resistance. Those ratios were more important than their corresponding single values. The smaller the length-to-diameter ratio and the higher the ratio of gap junction resistance to intracellular resistance, the more sensitive to uncoupling were the cells. Conduction block as a result of strong uncoupling occurred earlier in increased (long / wide) cells than in control cells. It could be shown that the reason for this finding was the increased cell capacitance (214pF / 251pF and 113pF, respectively).

Surprisingly, an increase in lateral  $g_{GJ}$  stabilized the longitudinal CV on the microscopic and on the macroscopic level. Deeper analysis showed that this was the result of two-dimensional effects occurring also during planar (i.e. 1-dimensional) propagation of the excitation wave. These effects arise from the geometrical arrangement of cardiomyocytes in the tissue as they result from overlapping cells and cell poles. It was found that at low longitudinal CV a higher voltage gradient in transverse direction occurs, allowing lateral gap junctions to contribute to longitudinal impulse propagation. This explains why CV decreased more slowly when lateral  $g_{GJ}$  was high. Therefore, connexin lateralization could be a compensating mechanism smoothing inhomogeneities.

Increased lateral  $g_{GJ}$  and increased cell diameter led to a significantly higher risk of current-source-current-sink mismatches<sup>13</sup>. As a result, the risk of unidirectional conduction blocks, e.g. near expansion of the tissue diameter, was increased. Therefore, the simulated myocardial changes (cellular hypertrophy, connexin lateralization) have an increased arrhythmogenic potential.

As a conclusion, the presented electrophysiological model withstands validation against experimental results. The model can easily be upgraded by adapting it to latest experimental data. Using this model, causal chains can be identified and a theoretical background provided for experimental data. Furthermore, the model can also be predictive, providing ideas and theses for future experiments and studies.

This study provides considerable evidence for the need to combine geometrical and morphological measurements with electrophysiological measurements in future studies. This study shows that it is hardly possible to correctly interpret single parameters as it turned out that interpretation will only make sense when looking at ratios of parameters. Additionally, it

---

<sup>13</sup> Mismatches between current sources and current sinks, e.g. near expansions of the tissue diameter in the area of anatomical obstacles, can lead to unidirectional failure of impulse propagation (unidirectional conduction block). This occurs because due to tissue expansion a large non-activated area (current sink) must be depolarized by currents from a small activated area (current source). The mismatch can result in a conduction block if the charge carried by these currents is too small to induce action potential propagation in the large area.

is shown and explained for the first time that two-dimensional effects are present on a cellular level during planar (i.e. one-dimensional) impulse propagation. As a conclusion, even one-dimensional planar wave propagation cannot be sufficiently simulated by one-dimensional models.

This study also provides evidence that changes in the cell geometry alone (without other changes occurring in cell or tissue properties, e.g. altered ionic currents or fibrosis) can increase the risk of arrhythmia. The mechanisms involved are thoroughly and systematically analyzed allowing novel insights into the complex interplay between electrophysiology on the tissue level and on the cellular level.

The finding that hypertrophy of cardiomyocytes alone may have arrhythmogenic effects can explain why cardiac diseases accompanied by hypertrophy are associated with a higher risk of arrhythmia and sudden cardiac death, e.g. cardiac hypertrophy due to aortic stenosis or due to poorly controlled hypertension. This finding may also explain why cardiac hypertrophy resulting from physiological adaptation processes, e.g. in the athlete's heart, is also associated with a higher incidence of malign arrhythmia. Further investigation of these interrelations should be the aim of future studies.



#### 4. Literaturverzeichnis

- [1] Aiello, E. A., M. C. Villa-Abrille, E. M. Escudero, E. L. Portiansky, N. G. Pérez, M. C. de Hurtado, H. E. Cingolani. 2004. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286:H1229–H1235.
- [2] Akar, F. G., R. D. Nass, S. Hahn, E. Cingolani, M. Shah, G. G. Hesketh, D. DiSilvestre, R. S. Tunin, D. A. Kass, G. F. Tomaselli. 2007. Dynamic changes in conduction velocity and gap junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H1223–H1230.
- [3] Beeler, G. W., H. Reuter. 1977. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J Physiol*. 268:177–210.
- [4] Beuckelmann, D. J., M. Nabauer, E. Erdmann. 1993. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*. 73:379–385.
- [5] Bille, K., D. Figueiras, P. Schamasch, L. Kappenberger, J. I. Brenner, F. J. Meijboom, E. J. Meijboom. 2006. Sudden cardiac death in athletes: the Lausanne Recommendations. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 13:859–875.
- [6] Boldt, A., U. Wetzel, J. Lauschke, J. Weigl, J. Gummert, G. Hindricks, H. Kottkamp, S. Dhein. 2004. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart*. 90:400–405.
- [7] Botchway, A. N., M. A. Turner, D. J. Sheridan, N. A. Flores, C. H. Fry. 2003. Electrophysiological effects accompanying regression of left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 60:510–517.
- [8] Cabo, C., P. A. Boyden. 2009. Extracellular space attenuates the effect of gap junctional remodeling on wave propagation: a computational study. *Biophys J*. 96:3092–3101.
- [9] Cascio, W. E., G. X. Yan, A. G. Kléber. 1990. Passive electrical properties, mechanical activity, and extracellular potassium in arterially perfused and ischemic rabbit ventricular muscle. Effects of calcium entry blockade or hypocalcemia. *Circ Res*. 66:1461–1473.
- [10] Cerbai, E., L. Sartiani, P. De Paoli, A. Mugelli. 2000. Isolated cardiac cells for electropharmacological studies. *Pharmacol Res*. 42:1–8.



- [11] Clayton, R. H., O. Bernus, E. M. Cherry, H. Dierckx, F. H. Fenton, L. Mirabella, A. V. Panfilov, F. B. Sachse, G. Seemann, H. Zhang. 2010. Models of cardiac tissue electrophysiology: Progress, challenges and open questions. *Prog Biophys Mol Biol*. [Epub ahead of print]
- [12] Desplantez, T., E. Dupont, N. J. Severs, R. Weingart. 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol*. 218:13–28.
- [13] Dhein, S., S. B. Hammerath. 2001. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 364:397–408.
- [14] Dhein, S. 2006. Role of connexins in atrial fibrillation. *Adv Cardiol*. 42:161–174.
- [15] Diaz, P. J., Y. Rudy, R. Plonsey. 1983. A model study of the effect of the intercalated discs on discontinuous propagation in cardiac muscle. *Adv Exp Med Biol*. 161:79–89.
- [16] Dupont, E., T. Matsushita, R. A. Kaba, C. Vozzi, S. R. Coppen, N. Khan, R. Kaprielian, M. H. Yacoub, N. J. Severs. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 33:359–371.
- [17] Ehrlich, J. R., S. Nattel, S. H. Hohnloser. 2002. Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 13:399–405.
- [18] Fast, V. G., A. G. Kléber. 1994. Anisotropic conduction in monolayers of neonatal rat heart cells cultured on collagen substrate. *Circ Res*. 75:591–595.
- [19] Fast, V. G., A. G. Kléber. 1995. Block of impulse propagation at an abrupt tissue expansion: evaluation of the critical strand diameter in 2- and 3-dimensional computer models. *Cardiovasc Res*. 30:449–459.
- [20] Fast, V. G., A. G. Kléber. 1997. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res*. 33:258–271.
- [21] George, A. L. Jr. 2009. Common genetic variants in sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 6:S3–S9.
- [22] Ghaly, H. A., P. M. Boyle, E. J. Vigmond, Y. Shimoni, A. Nygren. 2010. Simulations of reduced conduction reserve in the diabetic rat heart: response to uncoupling and reduced excitability. *Ann Biomed Eng*. 38:1415–1425.

- [23] Hagen, A., A. Dietze, S. Dhein. 2009. Human cardiac gap-junction coupling: effects of antiarrhythmic peptide AAP10. *Cardiovasc Res.* 83:405–415.
- [24] Harris, A. L., D. C. Spray, M. V. Bennett. 1981. Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J Gen Physiol.* 77:95–117.
- [25] Hennersdorf, M. G., B. E. Strauer. 2001. Arterial hypertension and cardiac arrhythmias. *J Hypertens.* 19:167–177.
- [26] Henriquez, C. S. 1993. Simulating the electrical behavior of cardiac tissue using the bi-domain model. *Crit Rev Biomed Eng.* 21:1–77.
- [27] Hervé, J. C., S. Dhein. 2006. Pharmacology of cardiovascular gap junctions. *Adv Cardiol.* 42:107–131.
- [28] Hodgkin, A. L., A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117:500–544.
- [29] Janse, M. J. 2004. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 61:208–217.
- [30] Jin, H., A. R. Lyon, F. G. Akar. 2008. Arrhythmia mechanisms in the failing heart. *Pacing Clin Electrophysiol.* 31:1048–1056.
- [31] Joyner, R. W. 1982. Effects of the discrete pattern of electrical coupling on propagation through an electrical syncytium. *Circ Res.* 50:192–200.
- [32] Jozwiak, J., S. Dhein. 2008. Local effects and mechanisms of antiarrhythmic peptide AAP10 in acute regional myocardial ischemia: electrophysiological and molecular findings. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 378:459–470.
- [33] Kaab, S., J. Dixon, J. Duc, D. Ashen, M. Nabauer, D. J. Beuckelmann, G. Steinbeck, D. McKinnon, G. F. Tomaselli. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation.* 98:1383–1393.
- [34] Kléber, A. G., M. J. Janse, F. J. Wilms-Schopmann, A. A. Wilde, R. Coronel. 1986. Changes in conduction velocity during acute ischemia in ventricular myocardium of the isolated porcine heart. *Circulation.* 73:189–198.
- [35] Kléber, A. G., Y. Rudy. 2004. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev.* 84:431–488.

- [36] Kohya, T., H. Yokoshiki, N. Tohse, M. Kanno, H. Nakaya, H. Saito, A. Kitabatake. 1995. Regression of left ventricular hypertrophy prevents ischemia-induced lethal arrhythmias. Beneficial effect of angiotensin II blockade. *Circ Res.* 76:892–899.
- [37] Kornreich, B. G. 2007. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol.* 9:25–37.
- [38] Kostin, S., M. Rieger, S. Dammer, S. Hein, M. Richter, W. P. Klövekorn, E. P. Bauer, J. Schaper. 2003. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem.* 242:135–144.
- [39] Kostin, S., S. Dammer, S. Hein, W. P. Klovekorn, E. P. Bauer, J. Schaper. 2004. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res.* 62:426–436.
- [40] Kozhevnikov, D. O., K. Yamamoto, D. Robotis, M. Restivo, N. El-Sherif. 2002. Electrophysiological mechanism of enhanced susceptibility of hypertrophied heart to acquired torsade de pointes arrhythmias: tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circulation.* 105:1128–1134.
- [41] Kucera, J. P., S. Rohr, Y. Rudy. 2002. Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res.* 91:1176–1182.
- [42] Lesh, M. D., M. Pring, J. F. Spear. 1989. Cellular uncoupling can unmask dispersion of action potential duration in ventricular myocardium. A computer modeling study. *Circ Res.* 65:1426–1440.
- [43] Luke, R. A., J. E. Saffitz. 1991. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest.* 87:1594–1602.
- [44] Luo, C. H., Y. Rudy. 1994. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential, I: simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* 74:1071–1096.
- [45] McIntyre, H., C. H. Fry. 1997. Abnormal action potential conduction in isolated human hypertrophied left ventricular myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 8:887–894.
- [46] Müller, A., T. Schaefer, W. Linke, T. Tudyka, M. Gottwald, W. Klaus, S. Dhein. 1997. Actions of the antiarrhythmic peptide AAP10 on intercellular coupling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356:76–82.

- [47] Nattel, S., D. Li. 2000. Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ Res.* 87:440–447.
- [48] Neher, E., B. Sakmann. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature.* 260:799–801.
- [49] Nygren, A., M. L. Olson, K. Y. Chen, T. Emmett, G. Kargacin, Y. Shimoni. 2007. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. *J Physiol.* 580:543–560.
- [50] Pelzer, D., W. Trautwein. 1987. Currents through ionic channels in multicellular cardiac tissue and single heart cells. *Experientia.* 43:1153-1162.
- [51] Peters, N. S., C. R. Green, P. A. Poole-Wilson, N. J. Severs. 1993. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation.* 88:864–875.
- [52] Peters, N. S. 1996. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci (Lond.).* 90:447–452.
- [53] Polontchouk, L., J. A. Haefliger, B. Ebel, T. Schaefer, D. Stuhlmann, U. Mehlhorn, F. Kuhn-Regnier, E. R. De Vivie, S. Dhein. 2001. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol.* 38:883–891.
- [54] Potse, M., B. Dubé, J. Richer, A. Vinet, R. M. Gulrajani. 2006. A comparison of monodomain and bidomain reaction-diffusion models for action potential propagation in the human heart. *IEEE Trans Biomed Eng.* 53:2425–2435.
- [55] Priebe, L., D. J. Beuckelmann. 1998. Simulation Study of Cellular Electric Properties in Heart Failure. *Circ Res.* 82:1206–1223.
- [56] Qin, D., Z. H. Zhang, E. B. Caref, M. Boutjdir, P. Jain, N. El-Sherif. 1996. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res.* 79:461–473.
- [57] Rivard, K., P. Paradis, M. Nemer, C. Fiset. 2008. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res.* 78:53–62.

- [58] Rohr, S., J. P. Kucera, V. G. Fast, A. G. Kléber. 1997. Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science*. 275:841–844.
- [59] Rojas Gomez, D. M., J. S. Schulte, F. W. Mohr, S. Dhein. 2008. Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377:77–85.
- [60] Rudy, Y., W. L. Quan. 1987. A model study of the effects of the discrete cellular structure on electrical propagation in cardiac tissue. *Circ Res*. 61:815–823.
- [61] Salameh, A., S. Krautblatter, S. Karl, K. Blanke, D. R. Gomez, S. Dhein, D. Pfeiffer, J. Janousek. 2009. The signal transduction cascade regulating the expression of the gap junction protein connexin43 by beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 158:198–208.
- [62] Sawada, K., K. Kawamura. 1991. Architecture of myocardial cells in human cardiac ventricles with concentric and eccentric hypertrophy as demonstrated by quantitative scanning electron microscopy. *Heart Vessels*. 6:129–142.
- [63] Seidel, T., S. Dhein. 2009. Effects of maintained cell coupling during myocardial ischemia - A theoretical model explaining experimental effects of the gap junction opener AAP10. *Proceedings of the Joint Meeting of the British Pharmacological Society and the German Pharmacological Society*.
- [64] Seidel, T., A. Salameh, S. Dhein. 2010. A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue. *Biophys J*. 99:2821–2830.
- [65] Sepp, R., N. J. Severs, R. G. Gourdie. 1996. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 76:412–417.
- [66] Severs, N. J. 2001. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med*. 5:355–366.
- [67] Severs, N. J. 2002. Gap junction remodeling in heart failure. *J Card Fail*. 8:S293–S299.
- [68] Shaw, R. M., Y. Rudy. 1997. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res*. 81:727–741.
- [69] Smith, J. H., C. R. Green, N. S. Peters, S. Rothery, N. J. Severs. 1991. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease: An immunohistochemical study of

human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol.* 139:801–821.

- [70] Spach, M. S., J. F. Heidlage. 1995. The stochastic nature of cardiac propagation at a microscopic level: an electrical description of myocardial architecture and its application to conduction. *Circ Res.* 76:366–380.
- [71] Spach, M. S., J. P. Boineau. 1997. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol.* 20:397–413.
- [72] Spach, M. S., J. F. Heidlage, P. C. Dolber, R. C. Barr. 2000. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size: experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ Res.* 86:302–311.
- [73] Spach, M. S., P. C. Dolbe, J. F. Heidlage, J. M. Kootsey, E. A. Johnson. 1987. Propagating depolarization in anisotropic human and canine cardiac muscle: apparent directional differences in membrane capacitance. A simplified model for selective directional effects of modifying the sodium conductance on  $V_{max}$ , tau foot, and the propagation safety factor. *Circ. Res.* 60:206–219.
- [74] Spach, M. S., M. E. Josephson. 1994. Initiating reentry: the role of nonuniform anisotropy in small circuits. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 5:182–209.
- [75] Spach, M. S. 1999. Anisotropy of cardiac tissue: a major determinant of conduction? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 10:887–890.
- [76] Spach, M. S, J. F. Heidlage, P. C. Dolber, R. C. Barr. 2001. Changes in anisotropic conduction caused by remodeling cell size and the cellular distribution of gap junctions and Na(+) channels. *J Electrocardiol.* 34 Suppl:69–76.
- [77] Sperelakis, N. 1988. Patch clamp and single-cell voltage clamp techniques and selected data. *Mol Cell Biochem.* 80:3–7.
- [78] Swynghedauw, B., C. Baillard, P. Milliez. 2003. The long QT interval is not only inherited but is also linked to cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 81:336–345.
- [79] ten Tusscher, K. H, D. Noble, P. J. Noble, A. V. Panfilov. 2004. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H1573–H1589.

- [80] Tomaselli, G. F., E. Marbán. 1999. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 42:270–283.
- [81] Tsuji, Y., S. Zicha, X. Y. Qi, I. Kodama, S. Nattel. 2006. Potassium channel subunit remodeling in rabbits exposed to long-term bradycardia or tachycardia: discrete arrhythmogenic consequences related to differential delayed-rectifier changes. *Circulation.* 113:345–355.
- [82] Varró, A., I. Baczkó. 2010. Possible mechanisms of sudden cardiac death in top athletes: a basic cardiac electrophysiological point of view. *Pflugers Arch.* 460:31–40.
- [83] Virmani, R., A. P. Burke, A. Farb. 2001. Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol.* 10:211–218.
- [84] Wang, H. Z., J. Li, L. F. Lemanski, R. D. Veenstra. 1992. Gating of mammalian cardiac gap junction channels by transjunctional voltage. *Biophys J.* 63:139–151.
- [85] Wang, Y., Y. Rudy. 2000. Action potential propagation in inhomogeneous cardiac tissue: safety factor considerations and ionic mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H1019–H1029.
- [86] Weingart, R., P. Maurer. 1988. Action potential transfer in cell pairs isolated from adult rat and guinea pig ventricles. *Circ Res.* 63:72–80.
- [87] Winterton, S. J., M. A. Turner, D. J. O'Gorman, N.A. Flores, D. J. Sheridan. 1994. Hypertrophy causes delayed conduction in human and guinea pig myocardium: accentuation during ischaemic perfusion. *Cardiovasc Res.* 28:47–54.
- [88] Yao, J. A., D. E. Gutstein, F. Liu, G. I. Fishman, A. L. Wit. 2003. Cell coupling between ventricular myocyte pairs from connexin43-deficient murine hearts. *Circ Res.* 93:736–743.
- [89] Yao, J. A., W. Hussain, P. Patel, N. S. Peters, P. A. Boyde, A. L. Wit. 2003. Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. *Circ Res.* 92:437–443.
- [90] Zhao, J., Y. Jin, L. Ma, R. M. Corless. 2006. A highly efficient and accurate algorithm for solving the partial differential equations in cardiac tissue models. *Proceedings of the International Conference on Mathematical Biology.* 81–86.

## **5. Anlagen**

### **Supporting Material der Publikation**

Das Supporting Material der Publikation war ebenso wie der gedruckte Hauptartikel Gegenstand des Review-Prozesses. Im Hauptartikel wird mehrfach auf das Supporting Material verwiesen. Es enthält zusätzliche und detaillierte Informationen zur Methodik und eine Diskussion der Grenzen des Modells. Des Weiteren enthält es Ergebnisse, die zu einem tieferen biophysikalischen Verständnis der in der Publikation präsentierten Ergebnisse beitragen. Dazu gehören 9 zusätzliche Abbildungen.



## **SUPPORTING MATERIAL**

### **A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue**

Thomas Seidel, Aida Salameh, and Stefan Dhein

## **INDEX**

### **DETAILED METHODS**     (*page 2*)

Mapping and immunostaining of atrial human tissue (incl. Figure S1)

The single cell / membrane model

Spatial and temporal integration in 2D

Simulating 2D myocardium

Analytical data

Limitations of the model

### **ADDITIONAL RESULTS**   (*page 10*)

Figure S2

Figure S3

Figure S4

Figure S5

Figure S6

Figure S7

Figure S8

### **REFERENCES**             (*page 17*)

## DETAILED METHODS

### Mapping and immunostaining of atrial human tissue

We obtained tissue samples (10mm×10mm) from 14 patients suffering from mitral valve disease (both male and female, aged 40-75 years) either with atrial fibrillation (n=7) or without (n=7), i.e., sinus rhythm, undergoing cardiac surgery. The patients did not receive beta-blockers or any anti-arrhythmic drugs. Written informed consent was obtained from all patients in this study. The institutional Ethical Committee approved the study. The investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Atrial tissue from all patients was obtained from the right atrial free wall during cardiac surgery, placed in cold Tyrode solution and was transported directly to the lab. For mapping the tissue was fixed, superfused with Tyrode solution ( $\text{Na}^+$  161.02;  $\text{K}^+$  5.36;  $\text{Ca}^{2+}$  1.8,  $\text{Mg}^{2+}$  1.05;  $\text{Cl}^-$  147.86;  $\text{HCO}_3^-$  23.8;  $\text{PO}_4^{3-}$  0.42 and glucose 11.1mmol  $\text{l}^{-1}$ ; equilibrated with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  (pH=7.4)) and 64 electrodes (rectangular, 1mm spacing) were placed on the top of the tissue. Centrally two electrodes were placed for pacing using rectangular pulses of 1Hz, 0.6mA, and 1ms duration. The resulting activation wavefront was analyzed with respect to the fiber orientation. For analysis we used our mapping system HAL4, determined the activation times as  $t(dV/dt_{\min})$  and constructed 0.25ms isochrones from which  $\theta_L$  and  $\theta_T$  were calculated as described previously (1,2). Formalin fixed, paraffin embedded tissue sections of 5 $\mu\text{m}$  thickness were immunostained for Cx43 as described (3) using rabbit anti-Cx43 antibodies (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:2000 with Dako Cytomation Antibodies Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) at 4°C overnight and FITC-labelled polyclonal swine anti-rabbit secondary antibodies diluted 1:32 in Tris-buffered saline for 1h at 4°C. The specificity was controlled by omitting the primary antibodies. The sections were investigated at 1,000× magnification using a commercial image analysis system (Zeiss Vision) and Zeiss Axiolab fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). The slices were discarded when the imaging plane was not parallel to the long axis of the fibers. For evaluation, the longitudinal cell axis, the left and the right cell pole was determined. We measured the length of the plasma membrane of each cell at the cell pole and in the middle as well as the length of the immunofluorescence-positive membrane in each part of the cell. From these data we calculated the ratio between positively stained membrane length and plasma membrane length for the cell pole and the lateral side of the cell as described (3).

**Figure S1**

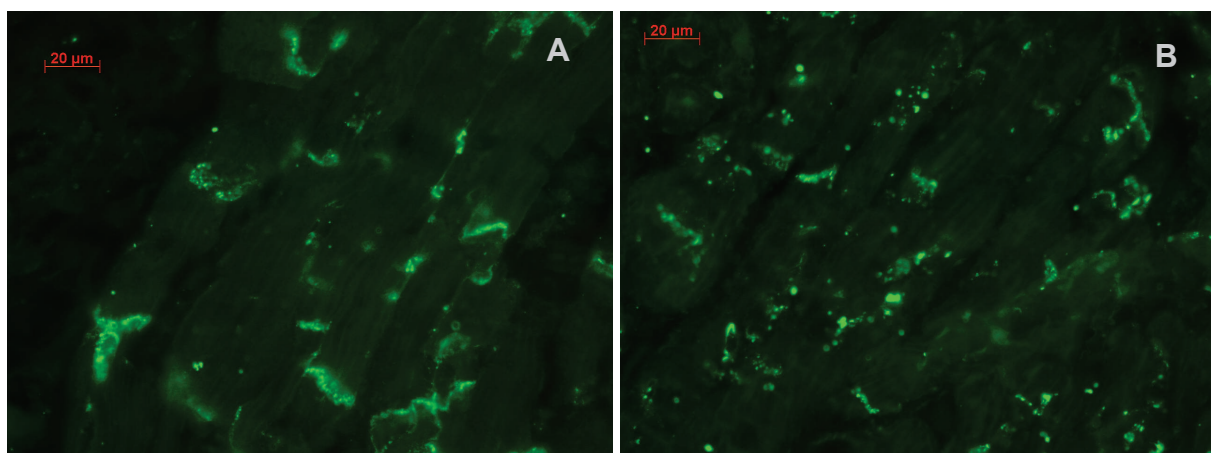


FIGURE S1 Examples of original immunohistology for Cx43 (green) in human left atrium (free wall). Samples were obtained from patients with sinus rhythm (A) or with atrial fibrillation (B).

### The single cell / membrane model

For each membrane segment, total transmembrane current,  $I_m$  in pA/ $\mu\text{m}^2$ , was calculated using the Priebe-Beuckelmann model (4) of human cardiomyocytes, which is based on the dynamic Luo-Rudy-II model (5).

Specific membrane capacity,  $C_m$ , was 0.01pF/ $\mu\text{m}^2$ . Thus, the voltage change per time is

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \frac{1}{C_m} I_m$$

$I_m$  is the sum of all ionic currents across the cell membrane:

$$I_m = I_{\text{Na}} + I_{\text{Ca}} + I_{\text{to}} + I_{\text{Kl}} + I_{\text{Kr}} + I_{\text{Ks}} + I_{\text{Na,b}} + I_{\text{Ca,b}} + I_{\text{NaK}} + I_{\text{NaCa}}$$

Extracellular space is assumed to be grounded. Thus, transmembrane voltage is identical with intracellular voltage.

Equations for time- and voltage-dependent currents are adopted from the Priebe-Beuckelmann model. Gated channels are described by Hodgkin-Huxley (6) type formalism:

$$\frac{\partial y}{\partial t} = \alpha_y - y(\alpha_y + \beta_y)$$

where  $y$  stands for the gating variable.  $\alpha_y$  and  $\beta_y$  depend on the transmembrane voltage  $\phi$ .

### Ionic concentrations

The model is dynamic, i.e. each ionic current  $I_s$  changes ionic concentrations in the extracellular and intracellular space:

$$\frac{\partial [s]_i}{\partial t} = - \frac{I_s A_m}{F z_s V_{\text{myo}}}, \quad \frac{\partial [s]_o}{\partial t} = \frac{I_s A_m}{F z_s V_{\text{left}}}$$

where  $[s]_i$  and  $[s]_o$  is the concentration of ion species  $s$  in intracellular and extracellular space, respectively,  $A_m$  denotes membrane area,  $V_{\text{myo}}$  the myoplasmatic volume and  $V_{\text{left}}$  the extracellular volume. However, since in this study only a very short period of time was simulated (less than 500ms), changes in ionic concentrations were marginal. Initial ionic concentrations which were chosen for simulations can be retrieved from Table S1.

Ion	Domain	Concentration
Ca <sup>++</sup>	intracellular	0.3 $\mu\text{mol/l}$
Ca <sup>++</sup>	extracellular	2.0mmol/l
Ca <sup>++</sup>	NSR	1.5mmol/l
Ca <sup>++</sup>	JSR	1.5mmol/l
Na <sup>+</sup>	intracellular	10.0mmol/l
Na <sup>+</sup>	extracellular	145.0mmol/l
K <sup>+</sup>	intracellular	140.0mmol/l
K <sup>+</sup>	extracellular	5.4mmol/l

**TABLE S1** Initial ionic concentrations.

## ***Spatial and temporal integration in 2D***

The continuity equation expressing charge conservation in 2D is given by

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = - \left( \frac{\partial \vec{J}}{\partial x} + \frac{\partial \vec{J}}{\partial y} \right) \quad (1)$$

where  $\rho$  is the charge density in C/m<sup>3</sup>,  $t$  is the time,  $\vec{J}$  is the current density in A/m<sup>2</sup> and  $x$  and  $y$  are the two spatial dimensions.

Ohm's law is given by

$$\vec{J} = \vec{E}\sigma \quad (2)$$

where  $\vec{E}$  is the electrical field in V/m and  $\sigma$  is the specific conductivity in S/m.

$\vec{E}$  is calculated by

$$\vec{E} = - \nabla \Phi \quad (3)$$

where  $\Phi$  is the electrical potential in V and  $\nabla$  is the Nabla vector, i.e., the gradient.

If  $\sigma$  is constant, Eq. 1, Eq. 2 and Eq. 3 result in:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \sigma \left( \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial y^2} \right) \quad (4)$$

Division by the specific membrane capacity,  $C_m$ , the ratio of capacitive to geometric membrane area  $R_{CG}$ , and the ratio of geometrical membrane area to volume,  $R_{AV}$ , leads to:

$$\frac{\partial \Phi}{\partial t} = \frac{\sigma}{C_m R_{CG} R_{AV}} \left( \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial y^2} \right) \quad (5)$$

where  $D = \sigma / (C_m R_{CG} R_{AV})$  is the diffusion coefficient.

Replacing  $\Phi$  by the transmembrane voltage  $\varphi$ , we get the common partial differential equation for two dimensions:

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \varphi}{\partial y^2} \right) \quad (6)$$

It should be noted that Eq. 4, Eq. 5 and Eq. 6 are only valid if  $D$  is a constant. Generally,  $\sigma$  is a tensor depending on space and time. This results in a more complex equation:

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = D^* \left( \frac{\partial}{\partial x} \left( \sigma_{x,y} \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left( \sigma_{x,y} \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right) \right) \quad (6^*)$$

Note that we used Eq. 6\* in order to allow the simulation of anisotropic, inhomogeneous cardiac tissue with  $\sigma$  being a function of space and time.  $D^*$  ( $=C_m R_{CG} R_{AV}$ ), which depends on cell geometry,

was assumed to be constant over space and time in each simulation. But it altered with the chosen cell geometry (see Table 1 in the main article).

However, for better understanding and clearness, only the discretization of Eq. 6 is shown below.

The rectangular domain of interest,  $\Omega = [0, X; 0, Y]$ , is divided into  $(N + 1) \times (M + 1)$  rectangles of  $\Delta x \times \Delta y$  in size, where  $\Delta x = \Delta y$  and  $N = \frac{X}{\Delta x} - 1, M = \frac{Y}{\Delta y} - 1$ . The index for  $x$  is  $i$  with  $i=0..N$ , the index for  $y$  is  $j$  with  $j=0..M$ . Each grid point  $(i,j)$  represents a cell segment. A compact finite difference scheme with non-flux boundary conditions (7) for solving the right-hand side of Eq. 6 is as follows:

$$\frac{\partial^2 \varphi_{i-1,j}}{\partial x^2} + 10 \frac{\partial^2 \varphi_{i,j}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \varphi_{i+1,j}}{\partial x^2} = \frac{12\varphi_{i-1,j} - 24\varphi_{i,j} + 12\varphi_{i+1,j}}{(\Delta x)^2} \quad (7)$$

$$2 \frac{\partial^2 \varphi_{0,j}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \varphi_{1,j}}{\partial x^2} = \frac{-6\varphi_{0,j} + 6\varphi_{1,j}}{(\Delta x)^2} \quad (8)$$

$$2 \frac{\partial^2 \varphi_{N,j}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \varphi_{N-1,j}}{\partial x^2} = \frac{-6\varphi_{N,j} + 6\varphi_{N-1,j}}{(\Delta x)^2} \quad (9)$$

Equation 7 is for interior points, Eq. 8 and Eq. 9 are for boundary points. The error in  $x$ - and  $y$ -direction is of 4<sup>th</sup> order at interior points and of 2<sup>nd</sup> order at boundary points. For the  $y$ -direction, the equations are analog.

For discretization of the left-hand side of Eq. 6, a time step of  $\Delta t = 0.001\text{ms}$  was used. Smaller time steps were tested. They increased the temporal resolution but did not change the results. The fully implicit scheme of Eq. 6 is as follows:

$$\frac{\varphi^{t+\Delta t} - \varphi^t}{\Delta t} = D \left( \frac{\partial^2 \varphi^{t+\Delta t}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \varphi^{t+\Delta t}}{\partial y^2} \right) \quad (10)$$

Equation 7, Eq. 8, Eq. 9 and Eq. 10 can be written in matrix form and were solved by common linear matrix algorithms.

## Simulating 2D myocardium

Based on the mathematical principles described above, a computer simulation model of a two-dimensional (2D) cellular monolayer of ventricular cardiomyocytes lying in the  $x$ - $y$ -plane was created. Each grid point of the 2D mesh represented a cell segment with a size of  $\Delta x$  in  $x$ -direction and of  $\Delta y$  in  $y$ -direction. If not otherwise specified,  $\Delta x = \Delta y = 10 \mu\text{m}$  was used. Cell segments were interconnected via intracellular resistivities if belonging to the same cell and via junctional resistances if belonging to adjacent cells. This approach is similar to the discontinuous model of Spach et al. (8) and can be recognized as an extension of the one-dimensional Shaw-Rudy model (9) to two dimensions. Specific membrane capacity,  $C_m$ , had a constant value of  $0.01 \text{pF}/\mu\text{m}^2$  and was always multiplied by the ratio of capacitive to geometric membrane area,  $R_{CG} = 2$ . Cells were assumed to be cylindrical. Thus, total membrane capacity per cell,  $C_{\text{cell}}$ , was calculated by  $C_{\text{cell}} = C_m \times R_{CG} \times A_m$ , with  $A_m = 2\pi r(l+r)$  being the geometrical membrane area of a cell with the radius  $r$  and the length  $l$ . Each segment had a capacity of  $C_{\text{segment}} = C_m \times R_{CG} \times V_{\text{segment}} \times R_{AV}$  with  $V_{\text{segment}}$  being the volume per segment.  $R_{AV}$  of a cylinder is calculated by  $R_{AV} = A/V = (2\pi r l + 2\pi r^2) / (\pi r^2 l) = 2/r + 2/l$ . Geometrical parameters are shown in Table 1 in the main article.

Cytoplasmic resistivity was set to  $1.5 \Omega\text{m}$  (8-11), corresponding to  $0.67 \text{S/m}$ , extracellular space was assumed to be grounded. Polar and lateral junctional resistances were varied between  $0.08 \text{M}\Omega$  and  $1000 \text{M}\Omega$ , translating into gap junction conductances ( $g_{GJ}$ ) between  $13 \mu\text{S}$  and  $1 \text{nS}$ , respectively. Total  $g_{GJ}$  per cell, was defined as the gap junction conductance sum of all membrane segments belonging to one cell. In control cells, polar  $g_{GJ}$  was  $3.7 \mu\text{S}$ , lateral  $g_{GJ}$  was  $2.6 \mu\text{S}$ . These values were chosen because dual-cell patch clamp experiments demonstrated that the ratio of polar-to-lateral  $g_{GJ}$  is  $\sim 1$  (12,13) and conduction velocities similar to or slightly higher than those measured in healthy myocardium (11,13-15) were obtained ( $\theta_L = 0.59 \text{m/s}$  and  $\theta_T = 0.16 \text{m/s}$ ;  $\theta_L/\theta_T = 3.6$ ). Electrophysiological parameters are shown in Table 2 in the main article. Conductance values defined as 100% of coupling were higher than those mostly measured in dual-cell patch clamp experiments (13,16-18), where intercellular conductances mainly range between  $50 \text{nS}$  and  $500 \text{nS}$ . However, they are in agreement with gap junction conductances that were necessary in other computer simulations to obtain conduction velocities of approx.  $50 \text{cm/s}$  in longitudinal direction: Shaw et al. (9) obtained a  $\theta_L$  of  $52 \text{cm/s}$  with  $2.5 \mu\text{S}$ , Spach et al. (8) obtained a  $\theta_L$  of  $48 \text{cm/s}$  with  $0.8 \mu\text{S}$ . Using a polar  $g_{GJ}$  of  $2.5 \mu\text{S}$  we obtained exactly the same value ( $52 \text{cm/s}$ ) as Shaw et al (9).

A possible explanation for the apparent discrepancy between models and real tissue may be an overestimation of myocardial conduction velocity: End-to-end conductances of  $350 \text{nS}$  still resulted in conduction velocities around  $0.4 \text{m/s}$ , which is not unrealistic. It should also be noted that in a mono-domain model as used in this study, the extracellular space does not contribute to impulse propagation, i.e., in a bi-domain model same velocities might be obtained at lower  $g_{GJ}$ . Furthermore, it may be possible that isolated cell pairs which are used for dual-cell voltage clamp experiments are partially uncoupled, i.e., show a lower  $g_{GJ}$  than they would have in intact tissue.

### Cell arrangement

In cardiac tissue, cells are usually not regularly aligned (Fig. S2 A) but rather arranged brick-like (Fig. S2 B and C), with overlapping cell ends. Furthermore, cells are often branched near their poles, presenting jutting ends. It has been shown that brick-like arrangement allows lateral gap junctions to contribute to longitudinal propagation via zigzag conduction patterns and that jutting ends can also modulate transverse and longitudinal conduction velocity (19,20). However, since the objective of this study was to simulate cellular hypertrophy, irregular cell forms as they are essential for jutting ends, would have required further assumptions and might have interfered with increased cell width. Therefore, only regular cell forms were simulated. In order to verify the influence of different degrees of overlapping (Fig. S2), two different degrees were simulated and compared with respect to electrophysiological behavior. Note that in all other simulations, the grade of overlapping as



Supporting Material: A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue shown in Fig. S2 B was used, because it corresponds best to histological findings.

## **Analytical data**

### *Activation time*

Activation time was defined as the point in time when the m-gate of the fast sodium channel had reached a value  $\geq 0.5$  and was recorded for each cell segment, allowing the calculation of conduction velocities and activation patterns both on tissue and cellular level. Other authors use  $\varphi \geq -40\text{mV}$  as activation threshold. However, we could find that our definition corresponds better to the time of maximum upstroke velocity of the transmembrane potential and that conduction velocities were independent of the activation criterion. A cell was fully activated when all its segments were activated.

### *Conduction velocity*

Conduction velocity ( $\theta$ ) between two cells was calculated dividing the spatial distance by the activation time difference. Transverse  $\theta$ ,  $\theta_T$ , was measured between membrane segments at  $y$ -position 80 and 160. Longitudinal  $\theta$ ,  $\theta_L$ , was measured between membrane segments at  $x$ -position 100 and 260.

### *Charge and axial currents*

In- and outflowing intra- and intercellular currents ( $I_{\text{in}}$  and  $I_{\text{out}}$ ) were recorded for each cell segment. The net current ( $I_{\text{net}} = I_{\text{in}} - I_{\text{out}}$ ) provides information about the charge a segment is accumulating from or emitting to other cells and cell segments. The time integral of  $I_{\text{net}}$  was interpreted as the depolarizing charge,  $Q_{\text{net}}$ , a cell segment had accumulated ( $Q_{\text{net}} > 0$ ) or emitted ( $Q_{\text{net}} < 0$ ) with respect to the tissue. Note that this charge does not involve the charge which is gained or lost by transmembrane currents ( $I_{\text{ion}}$ ). It is therefore an indicator of current sources ( $Q_{\text{net}} < 0$ ) and current sinks ( $Q_{\text{net}} > 0$ ) with respect to the tissue. The interval of integration always began at  $t=0\text{ms}$  (time of stimulation) and ended at a point in time which was of interest. See also Figure S5 for explanation. The model was verified summing up the charges from intercellular and from transmembrane currents over the interval of a whole action potential. The sum was zero, indicating that the law of charge conservation was not violated.

### *Intracellular and junctional delay*

The activation time difference between two adjacent cell segments belonging to different cells was defined as junctional (GJ) delay. The activation time difference between the last activated and the first activated cell segment within one cell was defined as intracellular delay.

### *Conduction block*

If after having applied the stimulation current and before all cells were activated the transmembrane voltage of all cells had fallen below  $-60\text{mV}$ , conduction block was manifested.

### *Minimum stimulation current*

The minimum magnitude of the stimulation current ( $I_{\text{stim}}$ ) which was sufficient to induce stable impulse propagation, was determined by holding the stimulation time ( $t_{\text{stim}}$ ) and the stimulation area ( $A_{\text{stim}}$ ) constant while  $I_{\text{stim}}$  was gradually increased starting from zero. Interestingly, minimum  $I_{\text{stim}}$  was almost equal to the “charge wave” traveling in front of the activation wave front (see Fig. S7).



## Limitations of the model

### *Calculation of membrane-area-to-volume ratio*

For a cylindrical cell with the radius  $r$  and the length  $l$ , we get:

$$R_{AV} = \frac{A}{V} = \frac{2\pi rl + 2\pi r^2}{\pi r^2 l} = \frac{2}{r} + \frac{2}{l}$$

This is the average for a whole cell. But within a cell, near cell poles and lateral borders,  $R_{AV}$  could be higher, whereas it could be lower in the middle of the cell. However, it is not clear if the whole volume of a cell equally contributes to electrical conductance or if there are areas with lower or higher conductivity. So it is difficult to assess whether the decrease in  $R_{AV}$  when cell radius increases, is linear or not. Therefore, it seemed reasonable to assume a linear relation and to assume that each segment of a cell has the same  $R_{AV}$  value. Multiplying  $R_{AV}$  with the specific membrane capacity  $C_m$  (and its correction factor  $R_{CG}=2$ ) and the intracellular resistivity  $\rho_{ic}$  results in the intracellular diffusion coefficient  $D$ :

$$D_{ic} = 1/(R_{AV} \times C_m \times R_{CG} \times \rho_{ic})$$

Since  $l > r$ ,  $R_{AV}$  is mainly determined by the cell radius, i.e.,  $D_{ic}$  is approx. proportional to  $r$ .

Accordingly, a twofold increase in  $r$  leads to an approx. twofold increase in  $D_{ic}$ .

### *Transmembrane currents*

In normal and in hypertrophied cells, all transmembrane ionic channels were assumed to have the same density per membrane area, i.e., specific maximum conductivities were unchanged. Also current channel kinetics were assumed to be unchanged. It is known that in hypertrophied hearts and in heart failure ionic currents and ionic concentrations can be altered. Especially the fast sodium current ( $I_{Na}$ ) and the L-type calcium current ( $I_{Ca}$ ) would have great effect on impulse propagation. Yet, there is data suggesting that  $I_{Ca}$  remains unchanged (21), while data regarding  $I_{Na}$  are controversial (22,23). Mere hypertrophy would rather decrease the densities of these currents leading to decreased conduction velocities and earlier conduction block, which could potentiate the effects found in this study. Changes in repolarizing currents, e.g.,  $I_{K1}$ , were less important for this study, because repolarization was not analyzed. But the aim was to analyze the effects of connexin lateralization and of cellular hypertrophy, so transmembrane current densities were held constant.

### *Simulation of gap junctions and connexin lateralization*

Active behavior of gap junctions was not incorporated for several reasons. It is known that gap junction conductance can be modulated metabolically, especially by the pH-value and by intracellular  $Ca^{++}$ . Furthermore, many studies show a voltage-dependent gating behavior of gap junction channels, especially when high potential gradients (usually  $>50mV$ ) are applied over time intervals of  $>1000ms$ . But since the simulated conditions didn't include metabolic alterations or ischemia and since the time interval was in the range of between 100 and 500ms, it was decided to model gap junctions as passive ohmic resistances. Simulating connexin lateralization, functionality of lateral gap junctions was assumed, i.e., histological data showing an increase of connexin43-positive membrane area was directly translated into a corresponding increase in gap junction conductivity because there are some studies giving evidence for functionality (13,24). In order to take into account the possibility that lateral GJ conductance remains unchanged, we also simulated altered GJ distribution with constant conductance.

### *2D versus 3D*

In order to reduce the model to 2D, neighboring cells in  $z$ -direction were assumed to be equipotential (no-flow conditions). In 3D, GJ lateralization and hypertrophy would not only affect currents in  $y$ - but also in  $z$ -direction. Thus, in 3D tissue, the effects of hypertrophy and connexin lateralization which were observed in 2D would probably be more distinct. Increased lateral currents would not only flow in  $y$ -direction but also in  $z$ -direction and might lead to conduction block very early if  $g_{Na}$

is reduced and to a strongly reduced conduction velocity under conditions of cellular uncoupling. E.g., Fast et al. (25), demonstrated that the critical strand diameter at tissue expansion decreased more than twofold in 3D as compared to 2D. However, all results obtained from 2D simulations would have the same tendency in 3D, only the magnitude could be different. The aim of this study was to get an mechanistic insight into effects of the varied parameters and therefore a computationally efficient 2D model was chosen.

#### *Inhomogeneities*

In real myocardium, especially in diseased myocardium, there would probably be variations not only in cardiomyocytes but as well in the intercellular matrix and in the number of fibroblasts (1). We decided to incorporate no inhomogeneities and no fibroblasts in order to avoid interferences. Within the simulated tissue, all cells were assumed to be equal, i.e., no variability regarding cell size, arrangement or transmembrane currents was simulated. Taking variability and fibrosis into account could be the aim of a further study.

#### *Mono-domain versus bi-domain*

In this study, the extracellular space was assumed to be grounded, which would correspond to a monolayer of cells within an extracellular bath. It has been recently shown that the extracellular space may attenuate effects of alterations in gap junction conductances and distribution (26). Extracellular space might also contribute to intercellular currents, leading to lower  $g_{GJ}$  at a given conduction velocity. But there is not much experimental data on this issue and it seems probable that basic effects and mechanisms would remain the same.

#### *Cx43-immunostaining and mapping of human atrial cells*

As already described in the methods section of the main article, immunostaining does not provide a good quantitative measurement of the gap junction number. Furthermore, it doesn't give any functional data. We therefore measured longitudinal and transverse conduction velocities, showing that the "increase" of lateral Cx43 was accompanied by an increase in lateral velocity. This gives evidence of functionality, but still isn't a proof. There might be other alterations leading to increased lateral velocity, e.g., changes in transmembrane currents. In further studies, it would be necessary to combine immunostaining with double-cell patch clamp experiments in order to obtain GJ conductances.

## ADDITIONAL RESULTS

Figure S2

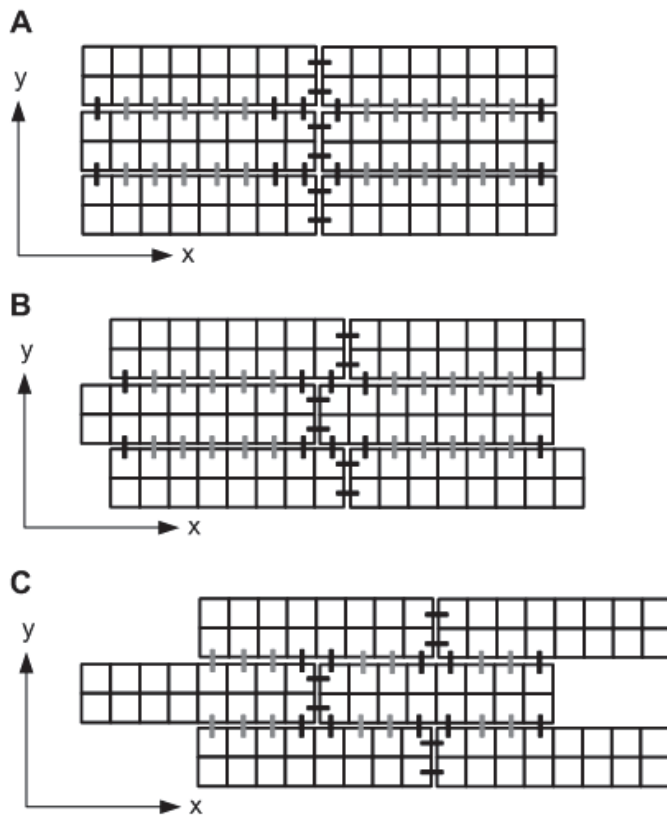


FIGURE S2 Different degrees of cellular overlapping: No overlapping (*A*), minimum degree of overlapping (*B*) and maximum degree of overlapping (*C*). Black horizontal bars indicate polar gap junctions (GJ), black and gray vertical bars indicate transverse GJ. GJ lateralization is characterized by a uniform lateral GJ distribution, i.e., gray and black vertical bars indicate the same conductance. In normal cells, GJ indicated by gray bars cover only 10% of lateral  $g_{GJ}$ , i.e., 90% of lateral  $g_{GJ}$  is provided by lateral GJ near the cell poles (black vertical bars).

If there is no overlapping (*A*), lateral GJ conductance cannot contribute to longitudinal propagation on a cellular level because upstream and downstream cells are only interconnected via polar GJ. If lateral conductance is concentrated near the poles, a small overlap (*B*) is enough to let almost 50% of the lateral GJ conductance contribute to longitudinal propagation, which has stabilizing effects on longitudinal conduction velocity (see Figs. 6 and 7 in the main article). But if lateral conductance is distributed uniformly over the lateral cell side, only a small percentage of the lateral conductance can contribute to longitudinal propagation. A small overlap seems to be the most realistic assumption, since it corresponds best to histological findings, and was therefore used in all simulations. However, if an overlap of 50% of the cell length (*C*) was simulated, there was no difference between normal and uniform lateral GJ distribution because in both cases 50% of the lateral GJ could contribute to longitudinal propagation.

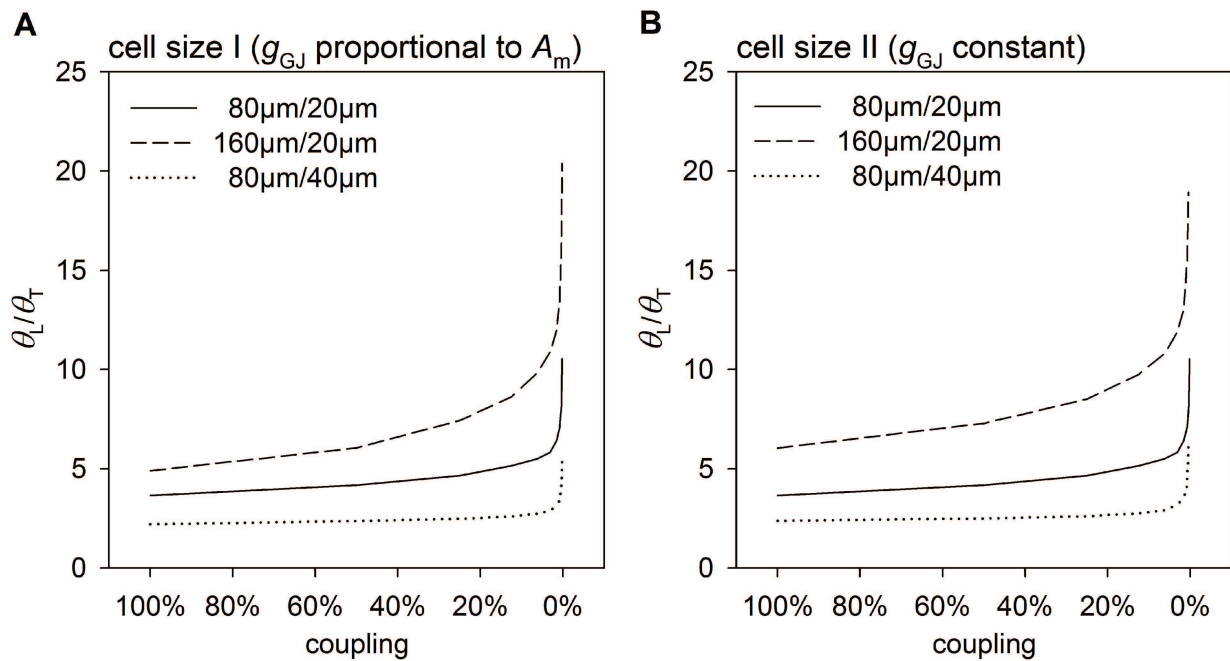
**Figure S3**

FIGURE S3 Effects of cell size on the ratio of longitudinal ( $\theta_L$ ) to transverse ( $\theta_T$ ) conduction velocity at different grades of junctional coupling. (A) Increased cell size assuming that gap junction conductance ( $g_{GJ}$ ) per membrane area ( $A_m$ ) remains constant, i.e., enlarged cells had greater  $g_{GJ}$ . (B) Increased cell size assuming constant  $g_{GJ}$ .

The  $\theta_L/\theta_T$ -ratio was strongly affected by the cell size and by the ratio of cell length to cell width. At 100% of coupling,  $\theta_L/\theta_T$  was  $\sim 3.6$  in control cells, which had a ratio of length to width of 4.  $\theta_L/\theta_T$  was  $\sim 5$  in long cells, which had a ratio of length to width of 8.  $\theta_L/\theta_T$  was  $\sim 2.2$  in wide cells, which had a ratio of length to width of 2. Thus, the length-to-width ratio of a cell may be an approximation of the  $\theta_L/\theta_T$ -ratio. However, reducing intercellular coupling increased  $\theta_L/\theta_T$  slightly in the range between 100% and 20% of coupling, followed by a very fast increase if coupling was below 20%.

Figure S4

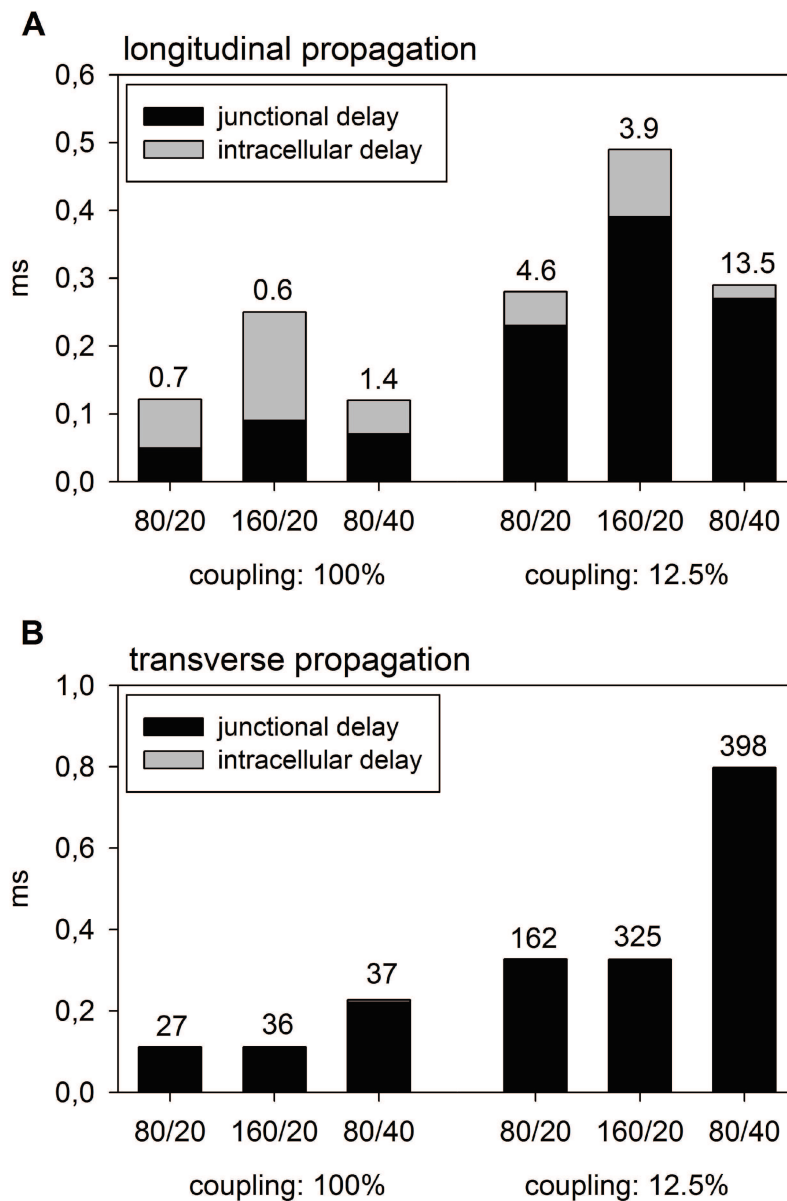


FIGURE S4 Junctional (*black*) and intracellular delays (*gray*) at 100% and 12.5% of coupling in control cells (length/width in  $\mu\text{m}$ : 80/20), long cells (160/20) and wide cells (80/40).  $g_{\text{GJ}}$  was adapted in enlarged cells to obtain the same conduction velocity at 100% of coupling as the control. Numbers above the bars indicate the ratio of junctional to intracellular delay. (A) Longitudinal propagation. (B) Transverse propagation.

A high ratio of junctional to intracellular delay indicates discontinuity. During longitudinal propagation (A), control cells and cells of increased length revealed similar values at high and low coupling: the ratio of junctional to intracellular delay was 0.7 and 0.6 at 100% of coupling and 4.6 and 3.9 at 12.5% of coupling, respectively. In contrast, wide cells showed significantly higher values: 1.4 at 100% of coupling and 13.5 at 12.5% of coupling, i.e., propagation in wide cells became earlier discontinuous. During transverse propagation (B), intracellular delay was already negligible at 100% of coupling, with very high ratios of junctional to intracellular delay (ranging between 27 and 37), indicating that in transverse direction there is always discontinuous propagation. This fits to the result that  $\theta_{\text{T}}$  showed a similar decay during gradual uncoupling in all cell size groups and that  $\theta_{\text{T}}$  is more affected by uncoupling than  $\theta_{\text{L}}$ , leading to increased ratio of  $\theta_{\text{L}}$

Supporting Material: A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue to  $\theta_r$  at lower coupling.

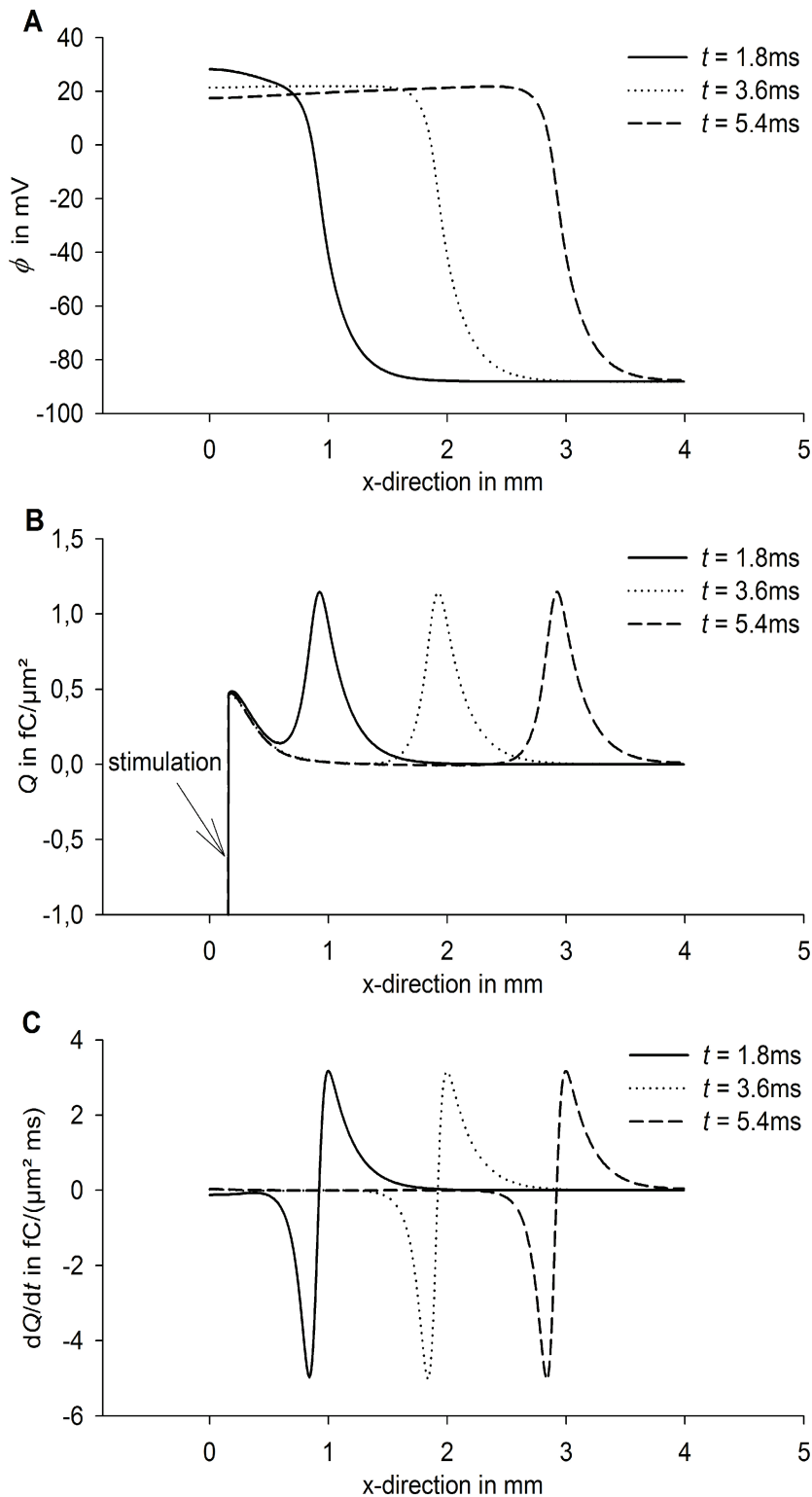
**Figure S5**

FIGURE S5 Impulse propagation in longitudinal direction under control conditions. Shown are membrane voltage (A), accumulated charge  $Q$  with respect to the tissue (B) and axial currents, i.e.,  $dQ/dt$  (C), at different points in time ( $t = 1.8\text{ms}$ ,  $3.6\text{ms}$  and  $5.4\text{ms}$ ). Note that B is the time integral of C over the period from  $t = 0\text{ms}$  until the point in time which is shown.

Each cell or cell segment accumulates charge from upstream cells until its activation (inflection points in B, points of zero-crossing in C). After its activation, it emits the same amount of charge to downstream cells ( $dQ/dt < 0$ ), i.e., during stable AP propagation in planar waves the charge balance



Supporting Material: A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue behind the wave front is zero. In elliptic waves, this is not the case. See also Figs. S6 and S7.

Figure S6

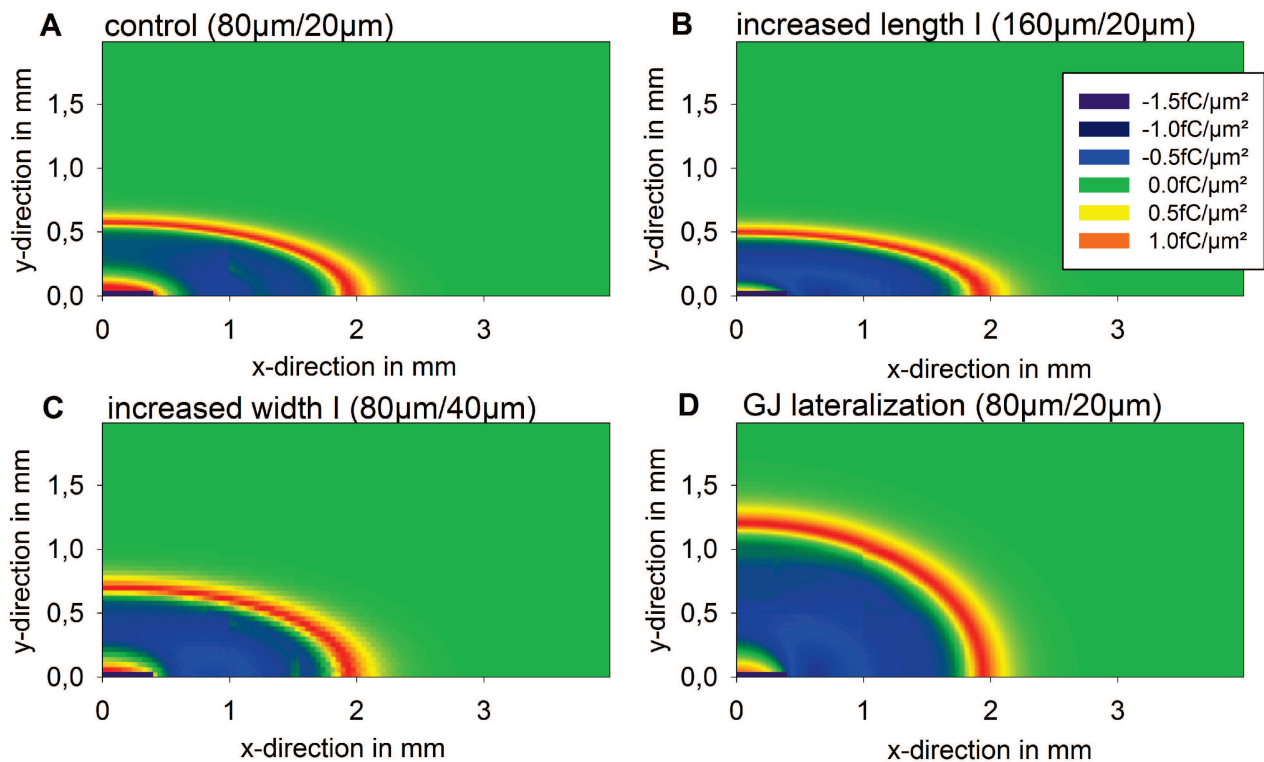


FIGURE S6 Elliptic wave propagation. Shown is the depolarizing charge ( $Q$ ) in fC per  $\mu\text{m}^2$  of membrane area which was accumulated ( $Q>0$ , current sinks) or emitted ( $Q<0$ , current sources) by each cell segment with respect to the tissue. Currents between segments and cells were integrated from  $t=0\text{ms}$  (time of stimulation) to the point in time at which the cell at  $(x,y)$ -position  $(2\text{mm},0\text{mm})$  was fully activated. Stimulation site was at position  $(0,0)$  causing the artifact. Control cells (A) were  $80\mu\text{m}$  long,  $20\mu\text{m}$  wide and had a lateral  $g_{\text{GJ}}$  of  $2.6\mu\text{S}$ . Increased cell length (B) and increased cell width (C) were simulated with constant  $g_{\text{GJ}}$  per membrane area (assumption I). GJ lateralization (D) was simulated by a fivefold increase in lateral  $g_{\text{GJ}}$  from  $2.6\mu\text{S}$  to  $13\mu\text{S}$ .

Note that it is a general property of elliptic wave propagation that the charge balance behind the wave front is negative (*blue area*), i.e., cells emit more charge to the non-activated tissue than they accumulate before their own activation. This charge is gained from the extracellular space by depolarizing transmembrane currents ( $I_{\text{Na}}$ ). The reason is that due to the curvature of the wave front there is an accelerated (non-constant) increase of activated tissue area per unit time. The area of current sink (yellow and red,  $Q>0$ ) is increased in C and D, which is in accordance with the increased susceptibility to conduction block at tissue expansion, as shown in Figure 9 in the main article. Fig. S7 indicates the correlation between the stimulation current and charge accumulation by non-activated cells.

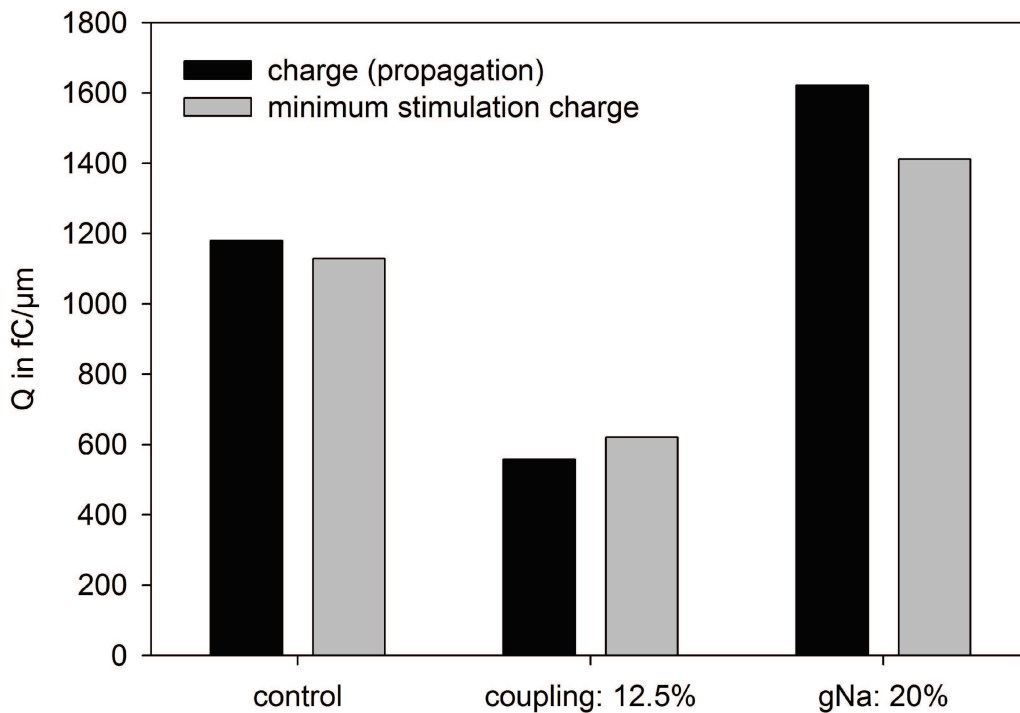
**Figure S7**

FIGURE S7 Correlation between the minimum stimulation charge (*gray*) which must be applied to the tissue in order to induce stable impulse propagation, and the total charge which is accumulated in front of the impulse wave during impulse propagation (*black*). Note that the charge indicated by the black bars corresponds to the area under the curve in Figure S5 B. The point in time is irrelevant because the curve does not change its shape or magnitude (Fig. S5 B). The unit fC/μm is the result of integrating over the tissue length. The stimulation charge  $Q_{stim}$  is calculated from the product of the stimulation current ( $I_{stim}$ , in pA per μm<sup>2</sup> of membrane area), the time interval of its application ( $t_{stim}$ ), and the membrane area of its application ( $A_{stim}$ ), with  $A_{stim} = V_{stim} \times R_{AV}$ .  $V_{stim}$  is the tissue volume which was stimulated,  $R_{AV}$  is the ratio of membrane area to tissue volume. For planar wave propagation, it is reasonable to normalize  $Q_{stim}$  to the tissue width and depth. Furthermore, different cell geometries can be compared by normalizing to  $R_{AV}$ . Thus, we get:  $Q_{stim} = I_{stim} \times t_{stim} \times l_{stim}$ . The minimum  $Q_{stim}$  was constant within a certain range of  $I_{stim}$ ,  $t_{stim}$  and  $l_{stim}$  and only depended on the tissue properties. A minimum  $Q_{stim}$  of 1000fC/μm means that at least 1000fC must be applied to the stimulation site in tissue which has 1μm<sup>2</sup> of membrane area per 1μm of length (in the direction of planar wave propagation). The example shown here is for cells with a length/diameter of 80μm/20μm and for longitudinal propagation.

Note that minimum  $Q_{stim}$  and  $Q_{propagation}$  are nearly equal, suggesting an analogy to the activation energy of a chemical reaction. While uncoupling reduced  $Q_{stim}$  and  $Q_{propagation}$ , a reduction of  $g_{Na}$  led to an increase, which is in good accordance with the findings during tissue expansion. High  $g_{GJ}$  and low  $g_{Na}$  increase the stimulation charge and, thus, the critical width of the source strand (Fig. 9 in the main article).

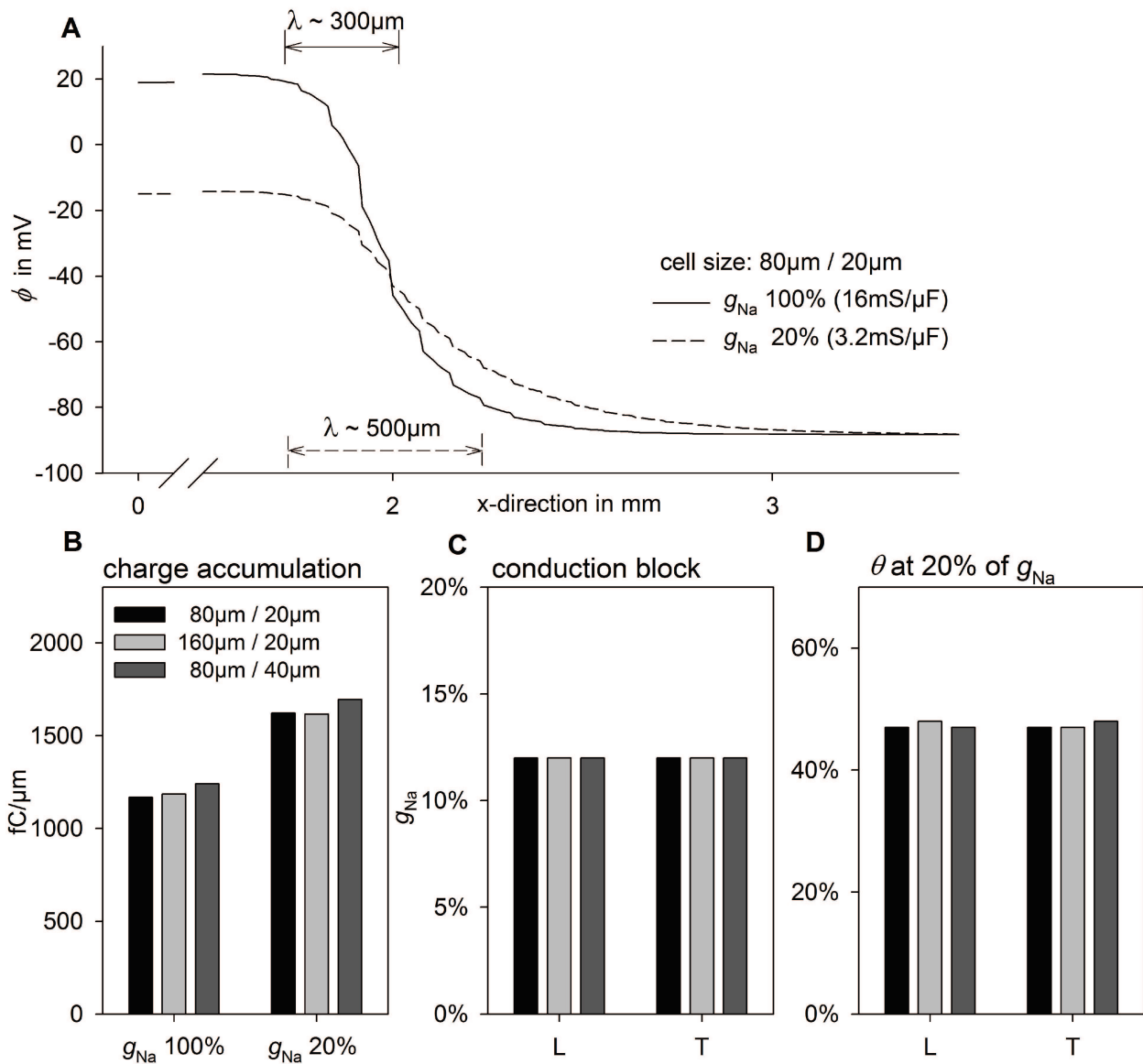
**Figure S8**

FIGURE S8 Effects of decreased maximum sodium channel conductance ( $g_{\text{Na}}$ ) on different cell sizes. (A) Membrane potential ( $\phi$ ) in x-direction during longitudinal impulse propagation in control cells at 100% ( $16\text{mS}/\mu\text{F}$ ) and 20% of  $g_{\text{Na}}$  ( $3.2\text{mS}/\mu\text{F}$ ). Reducing  $g_{\text{Na}}$  increased the space constant ( $\lambda$ ) and decreased maximum  $\phi$ . (B) The charge which was accumulated by non-activated cells during longitudinal propagation in control cells ( $80\mu\text{m}/20\mu\text{m}$ ), long cells ( $160\mu\text{m}/20\mu\text{m}$ ) and wide cells ( $80\mu\text{m}/40\mu\text{m}$ ) at 100% and 20% of  $g_{\text{Na}}$ . Note that this charge corresponds to the area under the curve in A, in the interval from the point where  $\phi$  is approx.  $-40\text{mV}$  to  $x_{\text{max}}$ , multiplied by the specific membrane capacity (in  $\text{pF}/\mu\text{m}^2$ ) (C) Value of  $g_{\text{Na}}$  at which conduction block occurred during longitudinal (L) and transverse (T) impulse propagation. (D) Longitudinal (L) and transverse (T) conduction velocities ( $\theta$ ) at 20% of  $g_{\text{Na}}$ , normalized to their values at 100% of  $g_{\text{Na}}$ .

As a reduction of  $g_{\text{Na}}$  increases the space constant (A), there is no different behavior of control cells, long cells or wide cells because impulse propagation remains continuous. As a result, the charge which was accumulated in front of activated cells was greater (B) at low  $g_{\text{Na}}$ . Conduction block occurred at 13% of  $g_{\text{Na}}$  in all groups (C) and a reduction of  $g_{\text{Na}}$  to 20% decreased longitudinal and transverse velocity uniformly to  $\sim 48\%$  independently of the cell size (D).

## REFERENCES

1. Dhein, S., and S. B. Hammerath. 2001. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 364:397-408.
2. Jozwiak, J., and S. Dhein. 2008. Local effects and mechanisms of antiarrhythmic peptide AAP10 in acute regional myocardial ischemia: electrophysiological and molecular findings. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 378:459-470.
3. Polontchouk, L., J. A. Haefliger, B. Ebelt, T. Schaefer, D. Stuhlmann, U. Mehlhorn, F. Kuhn-Regnier, E. R. De Vivie, and S. Dhein. 2001. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol.* 38:883-891.
4. Priebe, L., and D. J. Beuckelmann. 1998. Simulation Study of Cellular Electric Properties in Heart Failure. *Circ Res.* 82:1206-1223.
5. Luo, C. H., and Y. Rudy. 1994. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential, I: simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* 74:1071-1096.
6. Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117:500-544.
7. Zhao, J., Y. Jin, L. Ma, and R. M. Corless. 2006. A highly efficient and accurate algorithm for solving the partial differential equations in cardiac tissue models. Proceedings of the International Conference on Mathematical Biology. 81-86.
8. Spach, M. S., and J. F. Heidlage. 1995. The stochastic nature of cardiac propagation at a microscopic level: an electrical description of myocardial architecture and its application to conduction. *Circ Res.* 76:366-380.
9. Shaw, R. M., and Y. Rudy. 1997. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res.* 81:727-741.
10. Botchway, A. N., M. A. Turner, D. J. Sheridan, N. A. Flores, and C. H. Fry. 2003. Electrophysiological effects accompanying regression of left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 60:510-517.
11. Cascio, W. E., G. X. Yan, and A. G. Kleber. 1990. Passive electrical properties, mechanical activity, and extracellular potassium in arterially perfused and ischemic rabbit ventricular muscle. Effects of calcium entry blockade or hypocalcemia. *Circ Res.* 66:1461-1473.
12. Yao, J. A., W. Hussain, P. Patel, N. S. Peters, P. A. Boyde, and A. L. Wit. 2003. Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. *Circ Res.* 92:437-43.
13. Yao, J.A., D. E. Gutstein, F. Liu, G. I. Fishman, and A. L. Wit. 2003. Cell coupling between ventricular myocyte pairs from connexin43-deficient murine hearts. *Circ Res.* 93:736-43.
14. Kleber, A. G., M. J. Janse, F. J. Wilms-Schopmann, A. A. Wilde, and R. Coronel. 1986. Changes in conduction velocity during acute ischemia in ventricular myocardium of the isolated porcine heart. *Circulation.* 73:189-198.
15. McIntyre, H., and C. H. Fry. 1997. Abnormal action potential conduction in isolated human hypertrophied left ventricular myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 8:887-894.
16. Weingart, R., and P. Maurer. 1988. Action potential transfer in cell pairs isolated from adult rat and guinea pig ventricles. *Circ Res.* 63:72-80.
17. Hagen, A., A. Dietze, and S. Dhein. 2009. Human cardiac gap-junction coupling: effects of antiarrhythmic peptide AAP10. *Cardiovasc Res.* 83:405-415.
18. Müller, A., T. Schaefer, W. Linke, T. Tudyka, M. Gottwald, W. Klaus, and S. Dhein. 1997. Actions of the antiarrhythmic peptide AAP10 on intercellular coupling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356:76-82.
19. Hubbard, M. L., W. Ying, and C. S. Henriquez. 2007. Effect of gap junction distribution on impulse propagation in a monolayer of myocytes: a model study. *Europace.* 9:vi20-vi28.

20. De Bakker, J. M., F. J. Van Capelle, M. J. Janse, S. Tasseron, J. T. Vermeulen, N. De Jonge, and J. R. Lahpor. 1993. Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation. *Circulation*. 88:915-926.
21. Benitah, J. P., J. L. Alvarez, and A. M. Gómez. 2010. L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 48:26-36.
22. Sakakibara, Y., T. Furukawa, D. H. Singer, H. Jia, C. L. Backer, C. E. Arentzen, and J. A. Wasserstrom. 1993. Sodium current in isolated human ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 265:H1301-1309.
23. Chorvatova A, Snowdon R, Hart G, Hussain M. 2004. Effects of pressure overload-induced hypertrophy on TTX-sensitive inward currents in guinea pig left ventricle. *Mol Cell Biochem*. 261:217-226.
24. Rojas Gomez, D. M., J. S. Schulte, F. W. Mohr, and S. Dhein. 2008. Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377:77-85.
25. Fast, V. G., and A. G. Kléber. 1995. Block of impulse propagation at an abrupt tissue expansion: evaluation of the critical strand diameter in 2- and 3-dimensional computer models. *Cardiovasc Res*. 30:449-459.
26. Cabo, C., and P. A. Boyden. 2009. Extracellular space attenuates the effect of gap junctional remodeling on wave propagation: a computational study. *Biophys J*. 96:3092-3101.

## **6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift



## **7. Danksagung**

Als ich Ende 2006 auf der Suche nach einer medizinischen Doktorarbeit war, wusste ich noch nicht, dass ich die Fähigkeiten und das Wissen, welche ich im Grundstudium der Informatik und in einigen Tätigkeiten als Programmierer erworben hatte, im medizinischen Bereich würde einsetzen können. Von einem Kommilitonen erfuhr ich, dass Professor Dhein vom Herzzentrum Leipzig einen Doktoranden mit Programmierkenntnissen suchte. So kam es, dass ich mich im Dezember 2006 bei ihm vorstellte und er mir eine Arbeit von Beeler und Reuter, die 1977 eines der ersten komplexeren kardialen Einzelzellmodelle beschrieb, mitgab. Ich programmierte das Modell nach und entwickelte schnell Interesse an kardialer Modellierung. Einen besonderen Dank richte ich daher an meinen Betreuer Professor Dr. med. Stefan Dhein, der mich an Thematik und Methodik herangeführt hat. Unsere zahlreichen Diskussionen haben wesentlich zur Entstehung einiger Ideen, die innerhalb dieser Arbeit umgesetzt wurden, beigetragen.

PD Dr. med. Aida Salameh möchte ich für die Unterstützung bei der Gewinnung der histomorphologischen Daten danken. Ihre auch von langjähriger klinischer Tätigkeit geprägte Sicht auf die Fragestellungen und Ergebnisse war bei der Ausarbeitung von klinischen Aspekten hilfreich.

Ich bedanke mich außerdem bei Professor Dr. med. Friedrich Wilhelm Mohr, dem Klinikdirektor des Herzzentrums Leipzig, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, technischer Geräte und die finanzielle Unterstützung bei Dienstreisen und Kongressen.

Zudem möchte ich mich für die Unterstützung durch ein einjähriges Stipendium von der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig bedanken, welches mir die Möglichkeit gab die notwendige Zeit für eigene Ideen und deren Umsetzung zu finden.

Leipzig, im Februar 2011