

**Aus dem Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann-**

**Untersuchungen von Erregungsleitungsstörungen, die zum  
plötzlichen Herztod in Phytansäure akkumulierenden  
*Sterol Carrier Protein 2- / Sterol Carrier Protein x*-defizienten  
Mäusen führen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor rerum medicinalium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Johannes Theodor Wiekowski  
aus Harderberg, Niedersachsen

**-2003-**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.-G. Pauels

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Juli 2003

**Aus dem Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann-  
Referent: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-G. Pauels**

## **ZUSAMMENFASSUNG**

**Untersuchungen von Erregungsleitungsstörungen, die zum plötzlichen Herztod in Phytansäure  
akkumulierenden *Sterol Carrier Protein 2-* / *Sterol Carrier Protein x*-defizienten Mäusen führen**

**-Johannes Theodor Wiekowski-**

Bei einem genetisch veränderten Mausmodell (*Sterol Carrier Protein-2/ Sterol Carrier Protein-x*-defiziente Maus) wurde durch die Fütterung mit einer verzweigt-kettigen gesättigten Fettsäure (Phytansäure) neben der schon bekannten erhöhten Akkumulation dieser Fettsäure im Serum eine stark erhöhte Anreicherung dieser Fettsäure in der Phosphatidylcholin-Schicht der Lipidmembranen des Myokards nachgewiesen. Die Einlagerung der Phytansäure in die Membranlayer der Myokardzellen führte zu letalen bradykarden Rhythmusstörungen im Sinne von Reizleitungsstörungen, die sich im konventionellen Oberflächen-EKG und der telemetrischen Datenerfassung (Langzeit-EKG) nachweisen ließen.

Eine gestörte AV-Knoten-Funktion (Reizleitungsstörung) wurde durch die Untersuchungen am isolierten Herzen ohne verändertes monophasisches Aktionspotential bestätigt.

Expressionsstudien aus Gesamt-RNS des Myokards Phytol gefütterter Mäuse für verschiedene Connexine zeigte eine reduzierte Expression von Connexin43, das sowohl in den Vorhöfen, als auch im Ventrikelmyokard und den Purkinje-Fasern exprimiert wird.

Mit Hilfe immunzytometrischer Studien auf Kryoschnitten des Ventrikelmyokards der Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse konnte eine Veränderung der Größe, Anordnung (Muster) und Anzahl von Connexin43 gezeigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung der Expression für Connexin43 durch die Akkumulation der verzweigt-kettigen Fettsäure (Phytansäure) in die Membranlayer der Myokardzellen mit zu den interessanten Effekten führen, die zu den pathogenetischen Mechanismen der beobachteten Reizleitungsstörungen beitragen und zum Ereignis des plötzlichen Herztodes führen. Diese Untersuchungen könnten eine Erklärung für die plötzlichen Todesfälle bei Reifsumpatienten sein.

In früheren Ligandenbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass Phytansäure mit hoher Affinität an rekombinantes *PPAR $\alpha$*  bindet und zu einer Regulation der Transkription durch das Kernhormonrezeptordimer *RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$*  (*Retinoid X Receptor alpha / Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) führt. Dieses Kernhormonrezeptordimer beeinflusst sowohl kardiale Expressionsmuster als auch den kardialen Energiestoffwechsel nachhaltig. Zur Klärung der pathogenetischen Rolle von *PPAR $\alpha$*  sollen deshalb Untersuchungen an *SCP2/SCPx/PPAR $\alpha$* -defizienten Mäusen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungsmethoden folgen.

Für die tierexperimentellen Untersuchungen liegt eine Genehmigung der Bezirksregierung Münster mit dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 vom 22. Juni 1999 vor.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2003.

*Der Fortschritt der Wissenschaft  
besteht nur darin,  
dass sie die Erscheinungen,  
in denen das vielgestaltige Leben abläuft,  
immer genauer beschreibt,  
uns Leben entdecken lässt,  
wo wir früher keine Annahmen,  
und uns instand setzt,  
uns den erkannten Ablauf des Willens  
zum Leben in der Natur auf diese  
oder jene Art nutzbar zu machen.  
Was aber Leben ist,  
vermag keine Wissenschaft zu sagen.*

*Albert Schweitzer (Kultur und Ethik. Kulturphilosophie II [1923])*

Gewidmet meinen Eltern, in Liebe und Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis Juli 2002 am Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt und mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft – Sonderforschungsbereiche – und Mitteln des Institutes für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gefördert.

Ich danke Herrn Universitäts-Professor Dr. G. Assmann vom Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Arterioskleroseforschung.

Herrn PD. Dr. U. Seedorf danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Mönning für die vielen fachlichen Anleitungen und die ständige Diskussionsbereitschaft in einer freundschaftlich kollegialen Atmosphäre. Ebenso danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Dissertationsmanuskripts.

Bei Herrn Dr. F. Kannenberg und Herrn Dr. M. Fobker bedanke ich mich für die Unterstützung der Durchführung der HPLC- und Gaschromatographischen Verfahren.

Frau Dr. G. Plenz danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der RNA-Expressionsanalysen und den Immunzytochemischen Methoden zur Darstellung von Connexinen.

Für die Unterstützung beim Umgang mit den Datenverarbeitungsprogrammen bin ich Herrn Dr. H.-J. Bruns zu Dank verpflichtet.

Bei allen Mitgliedern der „Mäuseklinik“ bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Hier möchte ich ganz besonders Frau vet. med. L. Fortmüller und Frau D. Holtmannspötter hervorheben.

Besonderer Dank gilt Uta für die fachliche medizinische und biologische Kritikbereitschaft, für die Durchsicht des Dissertationsmanuskripts, sowie für ihr Verständnis während der Erstellung dieser Arbeit.

### 1. Einleitung

1.1 Der plötzliche Herztod	1
1.2 Die Refsumsche Erkrankung	3
1.3 Phytansäureakkumulation und Abbau	4
1.4 Die <i>SCP2/SCPx</i> -defiziente Maus	5
1.5 Elektrophysiologie des Herzens	
Ursprung und Ausbreitung der Erregung	7
1.6 Elektrophysiologie der Myokardzelle	9
1.7 Connexine	10
1.8 Das Elektrokardiogramm	13
1.9 Das Oberflächen-Elektrokardiogramm	15
1.10 Die telemetrische Datenerfassung bei Kleintieren	16
1.11 Ziel dieser Studie	17

### 2. Material und Methoden

2.1 Diätetische Studien	18
2.2 Abbildungen und Statistische Auswertungen	18
2.3 Oberflächen-EKG und telemetrische Langzeit-EKG Studien bei Mäusen	18
2.4 Oberflächen-EKG	18
2.5 Telemetrische Erfassung des Elektrokardiogramms bei Mäusen	19
2.5.1 Transmitter-Implantation	20
2.5.1.1 Präoperative Maßnahmen und Anästhesie	20
2.5.1.2 Operation	20
2.5.1.3 Postoperative Maßnahmen	22
2.5.1.4 Röntgenanalysen	23
2.5.2 Telemetrische Erfassung des Elektrokardiogramms und der Temperatur	23
2.6 Isolierung von Gesamt-RNS aus Gewebe	23
2.6.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	25
2.6.2 Phenol/Chloroformextraktion	25
2.7 Northern-Blot-Analysen	26
2.7.1 Gelelektrophorese	26
2.7.2 Kapillartransfer	27
2.7.2.1 Nachweis der Transfereffizienz	28
2.8 <i>Cx40/Cx43</i> -Sondenherstellung	28
2.8.1 Hybridisierung	30
2.8.2 Immunologischer Nachweis	32
2.9 Quantitative Analyse von Fettsäuren	33
2.9.1 Herzexplantation	33
2.9.2 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographische-(HPLC)-Analyse und Fraktionierung der Phospholipide	34
2.9.3 Identifizierung und Quantifizierung von Fettsäuren mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie	35
2.9.3.1 Probenvorbereitung und Derivatisierung	35
2.9.3.2 Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse der Fettsäuremethylester (FAME)	35

2.10 Histologische Arbeitsmethoden	36
2.10.1 Probenvorbereitung / Herzentnahme	36
2.10.2 Herstellung von Gewebeschnitten	37
2.10.3 Immunzytochemie	37
2.10.3.1 Immunfluoreszenzmarkierung	37

### 3. Ergebnisse

3.1 Arbeitsablauf	38
3.2 Oberflächen-Elektrokardiogramm bei <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten Mäusen und <i>C57Bl/6</i> -Wildtyp-Mäusen	39
3.3 Auswertung der Oberflächen-Elektrokardiogramme von <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten und Wildtyp-Mäusen	41
3.4 Telemetrische Aufzeichnung des Elektrokardiogramms bei freilaufenden Mäusen	43
3.4.1 Überprüfung der Transmitter-Implantation	43
3.4.2 Telemetrisch erfasstes Elektrokardiogramm einer <i>C57Bl/6</i> -Wildtyp-Maus vor und nach einer Phytoldiät	44
3.4.3 Verlauf eines telemetrisch erfassten Elektrokardiogramms einer <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten Maus vor und unter Diät mit 0,5mg/g Phytol für einen Fütterungszeitraum von 15 Tagen	45
3.5 Auswertung der telemetrischen Aufzeichnung der Elektrokardiogramme von <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten und Wildtyp-Mäusen	48
3.6 Telemetrische Aufzeichnung der Körpertemperatur bei Mäusen	49
3.7 Einfluss der Phytolfütterung auf die Repolarisationsphase des Herzens	51
3.8 Identifizierung von Expressionsunterschieden der Gene für Connexin40 und Connexin43 im Myokard zwischen <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Phytoldiät	52
3.9 Quantitative Analysen der Phospholipidfraktionen aus Herzgewebe von Mäusen	55
3.10 Gaschromatographie mit anschließender Massenspektroskopie	56
3.11 Auswertung der Gaschromatographischen Untersuchungen	57
3.12 Identifizierung von histologischen Veränderungen im Myokardgewebe von <i>SCP2/SCPx</i> -defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach Phytoldiät	59
3.13 Cx43 markierte Gewebeschnitte aus dem Myokard von Mäusen	61

### 4. Diskussion

4.1 Probleme bei Auswertungen von Mäuse-Elektrokardiogrammen	62
4.2 Der plötzliche Herztod	63
4.3 Auswirkungen einer verringerten Expression der Connexine	64
4.3.1 Connexin40	64
4.3.2 Connexin43	65
4.4 Analysen der Oberflächen-EKG Auswertungen	66
4.5 Analysen der telemetrisch erfassten Elektrokardiogramme	67

## **Inhaltsverzeichnis**

---

4.6 Telemetrisch erfasste Körpertemperatur und Messung des Körpergewichts	68
4.7 Gaschromatographische Analyse der Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Fractionen	69
4.8 Immunzytochemie	70
4.9 Ausblicke	70
<b>5. Literatur</b>	<b>72-78</b>
<b>6. Anhang</b>	
6.1 Berechnung der Körpertemperatur aus den telemetrisch erfassten Signalen	79
6.2 Connexin40 Zugangs-Nr.: U03486 (Genebank)	80
6.3 Connexin43 Zugangs-Nr.: X52947 (Genebank)	80
6.4 Abkürzungsverzeichnis	82
6.5 Genehmigungsbescheid für die tierexperimentelle Arbeit	84
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>85</b>

## 1. Einleitung

Sowohl arrhythmogene als auch antiarrhythmogene Effekte sind für viele Fettsäuren bekannt; der genaue ätiologische Einfluss auf den plötzlichen Herztod ist nur unzureichend untersucht. Insbesondere ist ein Zusammenhang zwischen Fettsäuren und dem Erregungsleitungssystem sowie dem Bradykardie bedingten plötzlichen Herztod bisher noch nicht bekannt.

### 1.1 Der plötzliche Herztod

Der plötzliche Herztod ist eine häufig auftretende und gefürchtete Erscheinungsform von verschiedenen Herzerkrankungen. Die Definition des plötzlichen Herztodes ist ein unerwartetes Erliegen der kardiorespiratorischen Funktionen. Symptome, die auf das Ereignis des plötzlichen Herztodes hinweisen könnten, treten einige Minuten bis maximal 24 Stunden vorher auf (Kuller, Bharati [1] [2]). Für den plötzlichen Herztod können die pathogenetischen Ursachen in vier große Gruppen unterteilt werden, welche in Tabelle 1 zusammengestellt sind [3].

**Tabelle 1: Die wesentlichen pathogenetischen Ursachen für den plötzlichen Herztod** (modifiziert nach Kishel & Virmani, 1987).

<b>Herzsystem</b>	<b>Pathogenetische Ursachen</b>
Koronararterien	Arteriosklerose, Spasmen, Thrombose, angeborene Abnormalitäten, Trauma, Dissektion, Hypoplasie
Myokard	Kardiomyopathien, Entzündungen, Infiltrate, Dysplasie
Herzklappen	Mitralklappenprolaps, Aortenstenose, Endokarditis
Leitungssystem	Abnormalitäten im Sinusknoten, Atrioventrikular-Knoten und His-Bündel, akzessorische Leitungsbahnen

Die schwere Arteriosklerose mit Beteiligung der Hauptkranzgefäße stellt die häufigste pathogenetische Ursache für den Herztod dar [3] [4]. Weitere Ursachen können Myokarditien, hypertrophe Kardiomyopathien und Kollagenosen sein. Etwa 50-75% der Ursachen für den plötzlichen Herztod werden für das Kammerflimmern beschrieben [5]. Für einen Teil der plötzlichen Todesfälle werden Veränderungen im Erregungsleitungssystem des Herzens ursächlich verantwortlich gemacht [1], bei denen der Pathologe keine andere Todesursache feststellen kann. Diese Ursache wird insbesondere bei jungen Patienten diagnostiziert und nimmt mit 15 % der plötzlichen Todesfälle einen nicht ganz unbedeutenden Platz der pathogenetischen Ursachen für den plötzlichen Herztod ein. Hier werden häufig Asystolie, Bradykardie und elektromechanische Entkopplung als die direkte Ursache des plötzlichen Herztodes beschrieben [6]. Bisher sind aber die Gründe vieler dieser pathologisch auffälligen Abnormitäten nicht bekannt. Allgemein ist davon auszugehen, dass viele dieser Dysfunktionen des Herzens auf pathologische Veränderungen des Erregungsleitungssystems zurückzuführen sind. Diese Veränderungen können, wie schon tierexperimentell belegt, durch den Einbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren in die Phospholipidmembran der Kardiomyozyten auftreten [7]. Durch den Einbau der mehrfach ungesättigten Fettsäuren kann es durch Bindung an die Kanalproteine zu einer Modulation der Ionenkanäle kommen [8]. Die Regulation der Ionenkanäle durch Bindung von Fettsäuren an die Kanalproteine konnte insbesondere für Prostaglandine (auch als Eicosanoid bezeichnet) und  $\Omega$ -n-3 Fettsäuren nachgewiesen werden [9]; [10]; [11]; [12]. Die im Fett von marinen Vertebraten und anderen in der See lebenden Tieren vorkommenden mehrfach ungesättigten n-3 Fettsäuren, auch PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids) genannt, spielen eine wichtige Rolle in der Verminderung von koronaren Herzerkrankungen. Zwei dieser Fettsäuren, die Eicosapenten- (C20:6n-3, EPA) und die Docosahexansäure (C22:6n-3, DHA) sind Hauptbestandteile der von Eskimos aufgenommenen Fette. Epidemiologische Studien zeigten eine drastisch geringere Sterblichkeit an kardiologischen Defekten in dieser Bevölkerung gegenüber Bevölkerungsgruppen der westlichen Welt. Neben antiarteriosklerotischen Effekten der n-3 Fettsäuren werden seit Mitte der neunziger Jahre hauptsächlich antiarrhythmische Effekte der n-3 Fettsäuren für die verringerten kardiologischen Defekte und den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht [13]. Koronare

Herzerkrankungen mit Todesfolge sind die hauptsächlichen Gründe aller Todesfälle in den westlichen Nationen, dabei handelt es sich bei 50-60% um plötzliche Todesfälle durch letale ventrikuläre Arrhythmien. EPA und DHA kommen kaum als Fette in der Nahrung der westlichen Bevölkerung vor. Anstelle dieser Fettsäuren werden tierische Fette (Landsäuger) Sonnenblumen- und Olivenöl verzehrt, die zu keiner Prävention des plötzlichen Herztodes führen, sondern dieses Ereignis teilweise sogar noch verstärken [14] [15], [16].

Auswirkungen einer Exposition mit verzweigtkettigen Fettsäuren auf das kardi-ale Leitungssystem und die zum plötzlichen Herztod führenden Mechanismen wurden bisher nicht untersucht. In der „Paris Prospective Study“ wurden nicht-verzweigtkettige Fettsäuren als ein möglicher Risikofaktor für den plötzlichen Herztod vorgestellt [17]. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Patienten mit der Refsumschen Erkrankung eine verzweigtkettige gesättigte Fettsäure (Phytansäure) akkumulieren und 10-20% dieser Patienten an einem plötzlichen Tod versterben [18], [19].

## 1.2 Die Refsumsche Erkrankung

Erhöhte Serumkonzentrationen an Phytansäure werden bei zahlreichen peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen beobachtet [18]. Die für die Thematik dieser Arbeit wichtigste Stoffwechselerkrankung ist die Refsumsche Krankheit (*Heredopathia atactica polyneuritiformis*). Patienten mit dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung akkumulieren Phytansäure in allen Organen [20] bis zu einer Serumkonzentration von 1 mM gegenüber einem Normalwert zwischen 10-20  $\mu$ M [21]. Die Akkumulation von Phytansäure beruht bei Patienten mit Refsumscher Krankheit auf der Mutation im Gen der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase, so dass Phytansäure bzw. Phytanoyl-CoA zwar zu dem Ort der peroxisomalen  $\alpha$ -Oxidation gelangen, aber der 1. Schritt der  $\alpha$ -Oxidation durch die defekte Phytanoyl-CoA-Hydroxylase blockiert ist [22], [23]. Im Verlauf der Erkrankung manifestieren sich bei den Patienten mit Refsumscher Krankheit zahlreiche Defekte wie Neuropathien, Ataxien, Blindheit, Taubheit und ungeklärte plötzliche Todesfälle (20% der Patienten) [18], [19], [21], [22]. Als auslösende Faktoren für einen Schub werden neben fiebrigen Erkrankungen auch

Operationen und Schwangerschaften diskutiert. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, verstirbt etwa die Hälfte der Patienten um das 30. Lebensjahr [18]. Neurologische Schädigungen treten wahrscheinlich bedingt durch die Einlagerung der verzweigt-kettigen Phytansäure in die hochgeordneten Strukturen von Lipidmembranen [24] und dementsprechend auch in die Myelinzellen der neurologischen Leitungsbahnen auf. Zur Blindheit bei Patienten mit dieser Krankheit kann es daher kommen, da Phytansäure im Serum und den parenchymalen Geweben akkumuliert und als potenter Rezeptoraktivator mit den Derivaten „all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic-acid“ der RXR-Rezeptorbindungsstelle für das Vitamin A konkurriert. Diese Tatsache führt zu den intestinalen Symptomen einer Vitamin A Hypervitaminose und folgend durch Einlagerung von Vitamin A in die Retina zu *Retinitis pigmentosa* [25], [26]. Es wird vereinzelt über kardial manifestierte Störungen der Erregungsausbreitung und -rückbildung und auch über eine schwere Herzinsuffizienz im Verlauf der Erkrankung berichtet [19]. Es ist allerdings nicht bekannt, weshalb 20% der Patienten plötzlich ohne erkennbaren Grund versterben [18],[2]. In diesem Zusammenhang können Störungen der atrioventrikulären und intraventrikulären Erregungsleitung als Ursache für diese plötzlichen Todesfälle diskutiert werden.

### 1.3 Phytansäureakkumulation und Abbau

Bei der Phytansäure (3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadecansäure) handelt es sich um eine verzweigt-kettige gesättigte Fettsäure, die aufgrund der Methylgruppe am C<sub>3</sub>-Atom nicht direkt über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden kann, sondern vorher über die peroxisomale  $\alpha$ -Oxidation in die um ein C-Atom verkürzte Pristansäure überführt werden muss [27]. Phytansäure entsteht durch die Oxidation von Phytol. Dieses Isoprenoid-Alkohol wird bei der Esterhydrolyse der Chlorophyll-Seitenkette gebildet [28]. Die Abspaltung des Phytolrestes vom Ring IV des Chlorophylls geschieht ausschließlich mikrobiell im Pansen von Wiederkäuern. Phytansäure gelangt also fast ausschließlich über Milch und Fleischprodukte, aber nicht über den Verzehr von pflanzlicher Nahrung in den Organismus [29], [30]. So enthält zum Beispiel Butter eine Phytansäurekonzentration bis zu 0,1%, da Kühe durch ihre Futtermittelaufnahme große Mengen Chlorophyll inkorporieren [31]. Die Herkunft und der oxidative Abbau von Phytansäure ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Da ein Anstieg von

Phytansäure im Serum bei zahlreichen peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen beobachtet wird [18], ist davon auszugehen, dass die  $\alpha$ -Oxidation von Phytansäure überwiegend in den Peroxisomen stattfindet [32], [33].

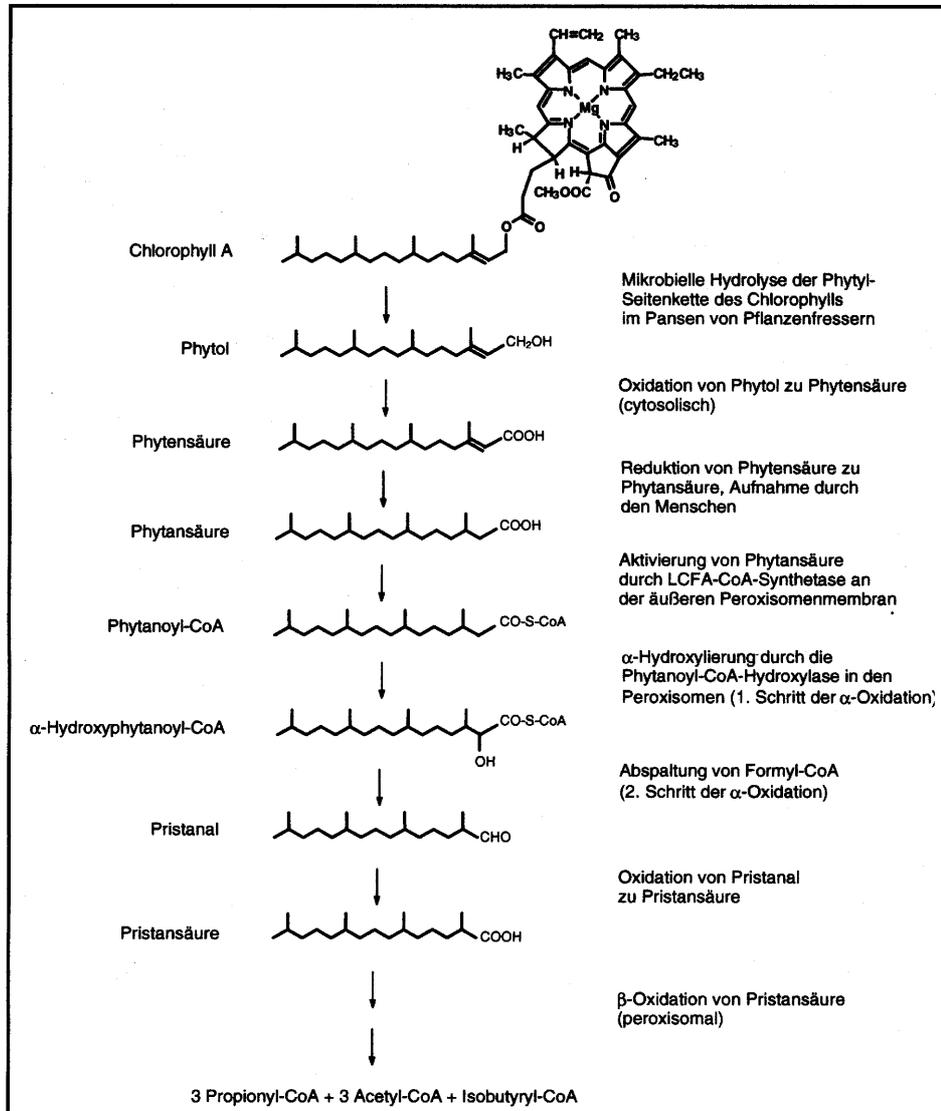


Abbildung 1: Entstehung und peroxisomaler Abbau von Phytansäure.

### 1.4 Die SCP2/SCPx-defiziente Maus

Um die Hintergründe der plötzlichen Todesfälle bei Patienten mit der Refsumschen Erkrankung aufzuklären, wurden *Sterol Carrier Protein-2/Sterol Carrier Protein-x*-defiziente Mäuse untersucht, die aufgrund ihres veränderten genetischen Hintergrunds Phytansäure akkumulieren. Da Mäuse in der Laborhaltung gewöhnlich keine Milchprodukte zu sich nehmen und auch Fleischprodukte von

Wiederkäuern nicht auf der natürlichen Nahrungsliste von Mäusen stehen, enthält die gewöhnliche Mausnahrung nur wenig Phytansäure (<0,02%). Durch eine mit Phytol angereicherte Nahrung wurde deshalb der Phänotyp der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus beeinflusst. Phytol wird dabei in Wildtyp- (+/+), sowie in „*knockout*“-Mäusen (-/-) quantitativ in Phytansäure umgewandelt [28].

Die *SCP2/SCPx*-defiziente-, eine sog. „*knockout*“-Maus (-/-) wurde mittels homologer Rekombination hergestellt [34]. In Bezug auf die phänotypische Charakterisierung der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus gingen dieser Arbeit zahlreiche Untersuchungen voraus. Die aufgrund der *in-vitro*-Transfereigenschaften von *SCP2* und *SCPx* für Cholesterin ermittelten Daten konnten in dem *SCP2/SCPx*-defizienten Mausmodell gegenüber Wildtyp-Mäusen (+/+) nicht bestätigt werden [34]. Auch eine aufgrund der *in-vitro*-Daten zu erwartende Störung bei der Synthese und dem Transport von Steroidhormonen ließ sich insofern nicht bestätigen, da die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse lebensfähig sind und genauso wie die Wildtyp-Mäuse ihre Fortpflanzungsfähigkeit in einem Alter von 6-8 Wochen erreichen. Untersuchungen zur Glucosekonzentration zeigten eine leichte Hypoglykämie [35] und in Übereinstimmung mit den *in-vitro*-Daten konnte zwar eine veränderte Zusammensetzung der Galle mit ungewöhnlichen Gallensäuren [36] nachgewiesen werden, ohne das die Konzentration an Gallensäuren jedoch stark erniedrigt ist. Weiterhin wurde eine starke Peroxisomenproliferation in der Leber beobachtet [37], [28].

Ein für diese Arbeit interessanter katabolischer Effekt der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse ist die Akkumulation von Phytansäure (3, 7, 11, 15-Tetramethylhexacecansäure) bis zu einer 3-fach erhöhten Konzentration im Serum gegenüber Wildtyp-Mäusen [28]. Der Anstieg der Phytansäurekonzentration ist durch die Entdeckung zu erklären, dass das Sterol-Carrier-Protein-2 (*SCP2*) Phytansäure und insbesondere Phytanoyl-CoA mit hoher Affinität bindet [38], [39] und bedingt durch den Verlust des *SCP2*'s kommt es zu einer fehlenden peroxisomalen Bindung von Phytansäure, was wiederum einen verminderten Abbau von Phytansäure durch die  $\alpha$ -Oxidation bedingt [28].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beziehen sich hauptsächlich auf die durch die Akkumulation von Phytansäure provozierten elektrophysiologischen Veränderungen im Herzen der Maus, die mittels elektrokardiographischer Aufzeichnung registriert wurden.

## 1.5 Elektrophysiologie des Herzens

### Ursprung und Ausbreitung der Erregung

Die Herzerregung beginnt im Sinusknoten, durchläuft die Vorhöfe und breitet sich anschließend über das ventrikuläre Erregungsleitungssystem auf die Kammermuskulatur aus.

Die Funktionselemente des Herzens sind die Herzmuskelfasern, so bezeichnet man eine Kette von hintereinander geschalteten Myokardzellen, die von einer gemeinsamen sarkolemmalen Hülle umgeben sind. Im Myokard sind zwei Grundtypen von Herzmuskelfasern zu unterscheiden. Den einen Typ bilden die Fasern des Arbeitsmyokards der Vorhöfe und der Ventrikel. Diese leisten die Pumparbeit des Herzens und bilden anteilig die Hauptmasse des Herzens. Neben den Fasern des Arbeitsmyokards existieren Fasern des spezifischen Erregungsbildungs- und Leitungssystems, die besondere Aufgaben im Dienste der Erregung erfüllen. Man findet diesen Typ der Herzmuskelfasern in verschiedenen Strukturen des Herzens, wie dem Sinusknoten (SA-Knoten), dem Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), dem His-Bündel, dem rechten und linken Schenkel und den Purkinje-Fasern.

Als erregbare Strukturen besitzen die Herzmuskelfasern ein Ruhepotential, reagieren auf überschwellige Reizung mit einer Erregung in Gestalt eines Aktionspotentials und sind in der Lage, Aktionspotentiale ohne Abschwächung fortzuleiten.

Dabei ist das Herz in der Lage, Erregungen autorhythmisch auszulösen. Diese Eigenschaft bezeichnet man als Autorhythmie. Die Fähigkeit zur spontanen rhythmischen Auslösung von Erregungen ist im Wesentlichen auf die Fasern des spezifischen Erregungsbildungs- und Leitungssystems beschränkt.

Die Erregungsausbreitung geht normalerweise vom Sinusknoten aus, von dort breitet sich die Erregung über die Arbeitsmuskulatur der Vorhöfe aus. Bei der Passage in die Ventrikel erfolgt zunächst eine Verzögerung der Erregungsausbreitung am AV-Knoten, wird dann aber schnell über das anschließende His-Bündel, die Bündelschenkel und deren Endlaufverzweigungen, den Purkinje-Fasern, weitergeleitet, so dass verschiedene Regionen der Herzkammern gleichzeitig, bzw. rasch nacheinander von der Erregung erfasst werden.

Bei einem sinu-atrikulären Block (SA-Block) wird die Erregung nicht auf die Vorhöfe weitergeleitet und der AV-Knoten übernimmt ersatzweise als sekundäres Erregungsbildungszentrum die Schrittmacherfunktion. Im Falle einer kompletten Unterbrechung der Reizüberleitung von den Vorhöfen auf die Herzkammern (AV-Block) kann immer noch ein tertiäres Zentrum im ventrikulären Erregungsleitungssystem als Schrittmacher der Kammerautonomie einspringen. Bei einem totalen AV-Block III° schlagen dabei die Vorhöfe und die Kammern unabhängig voneinander – die Vorhöfe mit der Frequenz des Sinusknotens, die Kammern mit der niedrigeren Eigenfrequenz eines tertiären Autonomiezentrums –.

Ein AV-Block II° liegt vor, wenn die Leitungsblockierung alternierend erfolgt, so dass z.B. nur jede zweite oder dritte Vorhoferregung auf die Kammern übergeleitet wird. Gelegentlich findet man, dass das PQ-Intervall von Schlag zu Schlag länger wird, bis schließlich ein Kammerkomplex ausfällt. Tritt dieses Ereignis periodisch auf, spricht man von einer *Wenckebach-Periode*.

Von einem AV-Block I° spricht man bei einer Verlängerung des PQ-Intervalls über einen gewissen Wert (bei Menschen > 200 ms).

## 1.6 Elektrophysiologie der Myokardzelle

Für die Erregungsausbreitung im Herzen ist ein Aktionspotential der Herzmuskelzellen mit ausgeprägter Plateauphase charakteristisch. Dieses Aktionspotential entsteht vor allem durch Veränderungen der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - Leitfähigkeit. Im Gegensatz zu den Aktionspotentialen am Nerv von etwa 1 ms oder am Muskel etwa 10 ms beträgt die Dauer des Aktionspotentials am Herzmuskel mehr als 200 ms.

Das Aktionspotential beginnt mit einer sehr schnellen positiven Potentialänderung und wird nur dann ausgelöst, wenn die Membran zuvor im Gleichgewichtspotential der  $\text{K}^+$ -Ionen (Ruhepotential) lag. Aufgrund der überschwelligigen Depolarisation kommt es zu einem erhöhten Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Extrazellularraum in das Zellinnere und einer Depolarisation der Membran. In Folge der Depolarisation kommt es auch zu einer erhöhten  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit, und die Membran repolarisiert durch den  $\text{K}^+$ -Ausstrom.

Basis der Erregung ist also eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran für  $\text{Na}^+$ -Ionen, welche durch die Depolarisation zur Schwelle ausgelöst wird. Maßgeblich für die Repolarisation ist die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit der Membran. Diese kann durch Gabe von Pharmaka erniedrigt werden, was eine Verlangsamung des Aktionspotentials zur Folge hat. Zur Wiederherstellung der Ionenkonzentrationen im Extrazellularraum und dem Zellinneren dienen Ionenpumpen und Transportmechanismen.

Die Potentialabhängigkeit der Membranströme wird in charakteristischer Weise durch Konzentrationsänderungen von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verschoben. Durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Extrazellularraum wird das Ruhepotential stabilisiert, so dass nun eine höhere Konzentration von  $\text{Na}^+$ -Ionen im Zellinneren notwendig wird, um die Membran zu depolarisieren. Physikalische Grundlage der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist ihre Reaktionsfähigkeit mit den fixierten Ladungen der Plasmamembranoberfläche, die Teile der Phospholipide und Glykolipide sind. Diese bilden eine Ionenladungswolke um die Zellmembran, in der großordnungsmäßig die Hälfte des Membranpotentials abfällt.

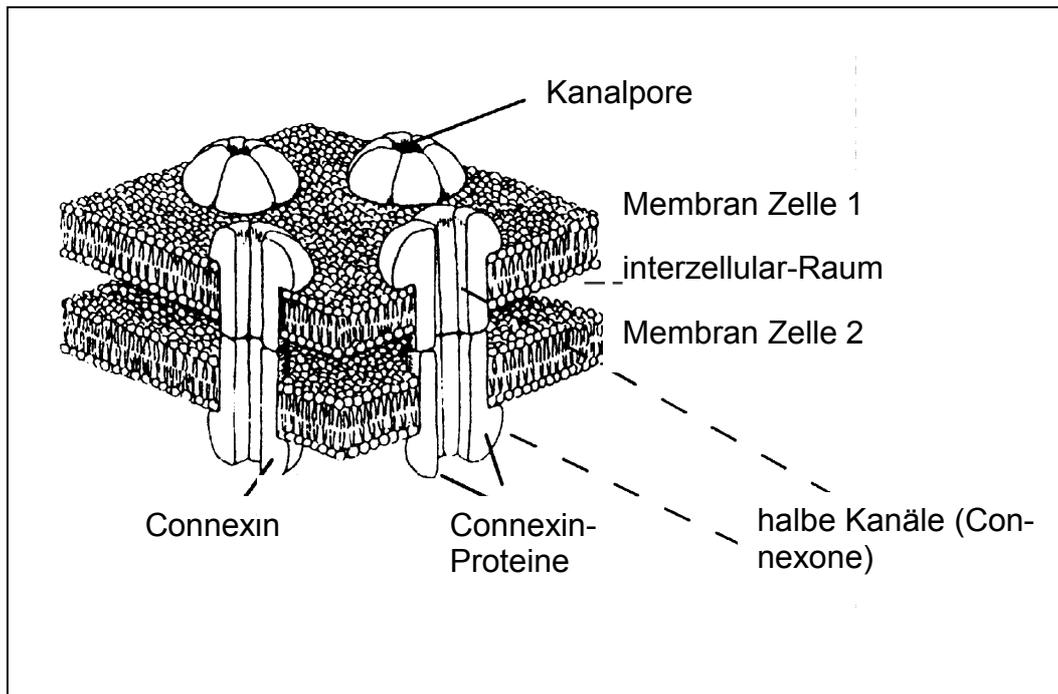
Damit die Erregung zwischen den Zellen weitergeleitet werden kann, sind diese über Zellkopplungen („gap-junctions“) miteinander verbunden. Durch die „gap-junctions“ werden die aneinander liegenden Zellen zu einem funktionellen Zell-

verband gekoppelt. In diesen Zellverbänden läuft die Erregung von Zelle zu Zelle, ohne dass an den Zellgrenzen eine Verzögerung oder eine Verkleinerung des Aktionspotentials sichtbar wäre.

## 1.7 Connexine

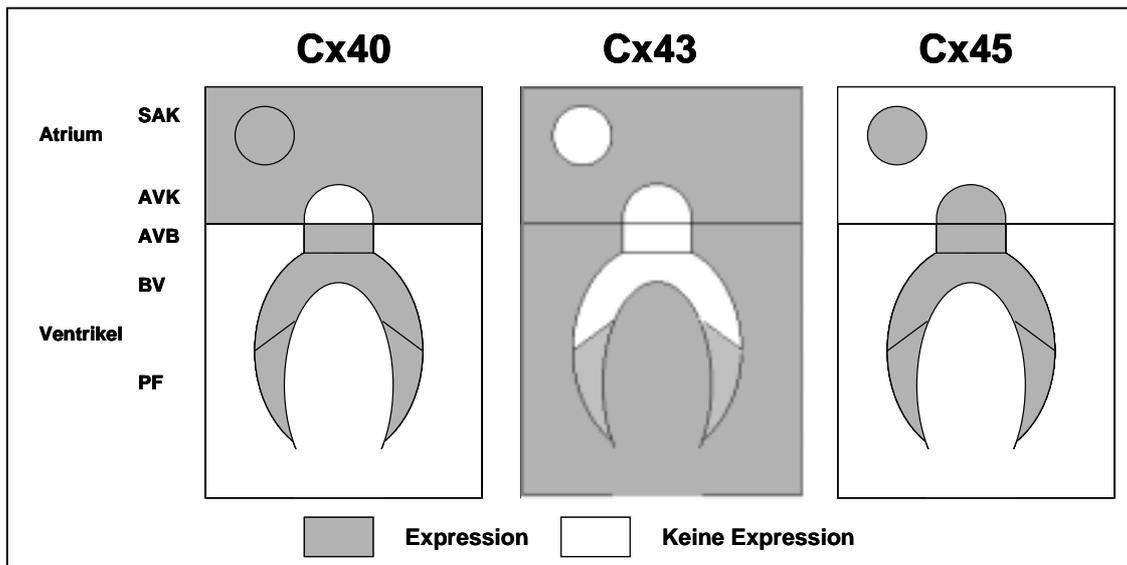
Kardiomyozyten sind elektrisch durch „gap-junctions“ miteinander gekoppelt, dabei bilden „gap-junctions“ einen Bestandteil der transmembranen Kanäle, so dass die benachbarten Zellen miteinander kommunizieren können. Diese transmembranen Kanäle sind in allen vielzelligen Systemen zu finden. Sie dienen als Brücke für die direkte Zell-zu-Zell-Übertragung von Ionen und kleineren Molekülen und haben somit eine wichtige Schlüsselfunktion sowohl für Gewebsdifferenzierung und -entwicklung, wie auch für den Erhalt des Zellverbandes [40], [41], [42]. In erregbaren Geweben, wie Muskel- oder Herzgewebe bieten „gap-junctions“ Kopplungsmöglichkeiten mit geringem elektrischen Widerstand zwischen den Zellen. Zwischen den Kardiomyocyten vermitteln diese Kanäle eine geordnete Ausbreitung des Erregungspotentials, welches die Kontraktion der Herzkammern bestimmt.

Einen Bestandteil von „gap-junction“-Kanälen zwischen den Myokardzellen bilden sogenannte Connexine. Diese Proteine sind hochgradig konserviert mit großer Homologie zwischen verschiedenen Spezies [40], [42]. Insgesamt sind 13 verschiedene Connexine für Säuger identifiziert worden. Die folgende Abbildung (Abbildung 2) zeigt die Eingliederung der Connexine in die Phospholipid-Bilayer (Membranen) von Zellen und deren Ausbildung zu „gap-junction“-Kanälen, welche zur Verbindung der Zellen führen.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von „gap-junction“-Strukturen.** Die Abbildung zeigt mehrere Kanäle, die zwei Zellen miteinander verbinden, mit dem Querschnitt durch zwei Connexine. Es ist zu erkennen, dass sich die Connexine aus mehreren Connexinproteinen bilden, die die Kanalpore bilden. Zwei Hälften (Connexone) aus benachbarten Zellen bilden das Connexin.

Elektrophysiologische Untersuchungen über transfizierte Zellen mit Connexinen zeigten, dass die durch verschiedene Connexine gebildeten „gap-junctions“ unverwechselbar in ihrem Verhalten bezüglich der Leitfähigkeit und in ihren molekularen Eigenschaften, wie ihrer Permeabilität zu unterscheiden sind [43], [44]. In den meisten Geweben, so auch im Herzen, werden mehrere Klassen von Connexinen exprimiert. Dadurch ist eine funktionelle Unterteilung von „gap-junctions“ in speziellen Regionen des Organs oder des Zellverbandes gegeben. Die folgende Abbildung 3 stellt schematisch die unterschiedliche Expression von Connexin40 (Cx40), Connexin43 (Cx43) und Connexin45 (Cx45) in den verschiedenen Regionen eines Säugerherzens dar.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Expression von Connexinen (Cx40, Cx43, Cx45) im Herzen von Säugern nach A.A.B. van Veen et al. / Cardiovascular Research 2001. **SAK** = sinu-atrialer Knoten; **AVK** = atrio-ventrikularer Knoten; **AVB** = atrioventrikuläres Bündel (HIS-Bündel); **BV** = rechte und linke Abzweigung des atrioventrikulären Bündels; **PF** = Purkinje Fasern.

Diese speziellen Anpassungen der Kommunikation der Zellen untereinander ist besonders bei der Entwicklung des Organs aus einem Zellverband und bei adaptiven physiologischen Prozessen notwendig. Hauptbestandteil der Connexine im Herzen von Säugern ist das Connexin43. Es findet sich neben Connexin45 in großen Mengen im Ventrikel und im Vorhof des Herzens. Zusätzlich findet man aber in speziellen Regionen des Erregungsleitungssystems und der Vorhöfe Connexin40, das sich von den electrophysiologischen Eigenschaften gegenüber Connexin43 unterscheidet. Die halbmaximale Erregung für Connexin40 liegt bei +/- 50 mV [45], [46], die für Connexin43 bei +/- 60 mV [47], [48], [49], [50]. Zudem ist Connexin40 selektiv für Kationen [51], [52]. Diese Ionen-selektivität ist für Connexin43 nicht bekannt [53].

Neben Arrhythmien und bei Herzinfarkt ist bei vielen Erkrankungen des Herzens bekannt, dass diese Erregungsleitungsstörungen des Herzens mit einer Veränderung der Expression der Connexine korrelieren.

Da die 6-Kanal-Oberflächen-EKG-Registrierungen bei *SCP2/SCPX*-defizienten Mäusen unter phytolreicher Diät zeigen konnten, dass es im Zuge dieser Diät zu pathologisch auffälligen Veränderungen bezüglich des Erregungsleitungssystems kommt, ist davon auszugehen, dass die Zell-zu-Zell Kommunikation gestört ist, was mit funktionellen Veränderungen der Connexine oder ihrer An-

zahl zusammenhängen kann. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Fettsäuren und Substanzen negativ auf die Zell-Zell-Verbindung ausüben können, indem es zum Verschluss von „gap-junctions“ kommt [54].

## 1.8 Das Elektrokardiogramm

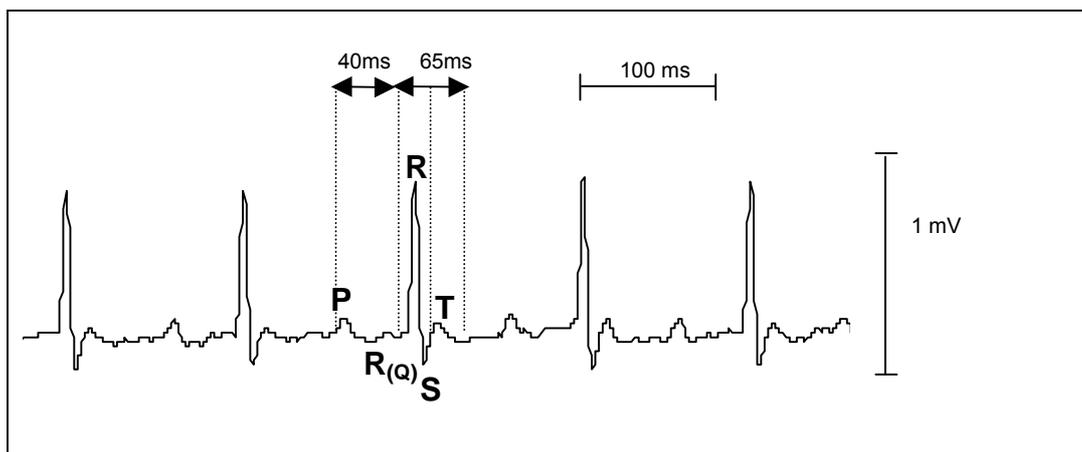
Immer mehr Bedeutung bekommt die elektrophysiologische Charakterisierung bei Kleintieren. Dabei werden, wie auch schon dieser Arbeit vorausgegangen, Oberflächen-Elektrokardiogramme zum Beispiel von Mäusen abgeleitet, echokardiologische Aufzeichnungen gemacht, oder Untersuchungen an isolierten Herzen durchgeführt.

Als Folge der Erregung des Arbeitsmyokards entstehen Potentialschwankungen im Herzen, die sich über die Extrazellulärflüssigkeit bis an die Körperoberfläche ausbreiten. Die Veränderung der Potentialdifferenzen (=Spannungen) spiegeln die zeitlichen Veränderungen von Größe und Richtung dieser Ströme wider, welche zwischen verschiedenen Stellen der Körperoberfläche mit extrazellulären Elektroden abgegriffen und gemessen werden können. Potentialschwankungen im Bereich von 1 mV werden so von der EKG-Registrierung erfasst. Das Elektrokardiogramm stellt die Aufzeichnung solcher Potentialdifferenzen zwischen definierten Messpunkten in Abhängigkeit von der Zeit dar und ist Ausdruck der Herzerregung und Rückbildung. Aussagen über die Herzmechanik sind mit dieser Methode nur indirekt zu machen. Durch den Ausdruck elektrischer Vektoren definierter Größe (Potentialdifferenz) und Richtung (minus nach plus) lässt sich so aus den zahlreichen Potentialunterschieden der Myokardzelle zu jedem Zeitpunkt der Herzaktion ein hieraus resultierender Summations- oder Integralvektor rekonstruieren, der die Hauptrichtung der Ausbreitung oder der Rückbildung der Erregung beschreibt. Nach der allgemeinen Terminologie der Extremitätenableitung nach *Einthoven* zwischen dem rechten Arm und dem linken Bein zeigt das normale Mäuse-EKG einen Kurvenverlauf entsprechend der Abbildung 4. Entgegen dem menschlichen EKG findet sich bei der Ableitung des Maus-EKG's keine Q-Zacke. Diese ist definiert als negativer Ausschlag, der der R-Zacke vorausgeht und leitet den Kammerkomplex ein. Im

weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Intervall für die Überleitung der Vorhoferregung auf die Ventrikel in Analogie zu dem beim menschlichen EKG verwendeten Begriff als  $PR_{(Q)}$  bezeichnet.

Es finden sich somit Ausschläge in positiver und negativer Ausrichtung, die mit **P** bis **T** bezeichnet sind. Dabei ist die P-Welle Ausdruck der Erregungsausbreitung in den Vorhöfen. Die Erregung der Herzvorhöfe geht vom primären Erregungsbildungszentrum, dem Sinusknoten, aus und wird über internodale Faserbündel weitergeführt. Im EKG wird diese Erregungsausbreitung durch die P-Wellen-Dauer dargestellt.

Die Kopplung zwischen der Erregungsausbreitung der Vorhöfe, übergehend in die Ventrikel, wird über das sekundäre Erregungsbildungszentrum, dem Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), hergestellt. Er liegt im rechten Vorhof im Bereich des Vorhofseptums und mündet in das His-Bündel im interventrikularen Septum. Um die Erregung an die Ventrikel weiterleiten zu können, muss eine gewisse Erregungsschwelle überschritten werden, bis der AV-Knoten „überfließt“ und die Erregungweiterleitung über das *His*-Bündel und den rechten und linken *Tawara*-Schenkel in die Ventrikel führt.



**Abbildung 4: Maus-EKG-Registrierung nach Einthoven.** Die angegebenen Zeiten geben die maximale Dauer am normalen Herzen einer Wildtyp-Maus *C57Bl/6* bei einer Ruhfrequenz von 450/min an. Erregungsausbreitung (Depolarisationsphase) : P-Welle = Ausbreitung der Erregung über die Vorhöfe ,  $R_{(Q)}RS$  = Kammerkomplex:  $R_{(Q)}$  = Beginn der Erregungsausbreitung über die Ventrikel, R = Haupterregungsausbreitung über die Ventrikel, S = Ende der Erregungsausbreitung an der Basis der Ventrikel. Erregungsrückbildung (Repolarisationsphase) des Myokards: T = Erregungsrückbildung im Ventrikelmyokard.

Der Atrioventrikularknoten ist somit der wichtigste Faktor für die Geschwindigkeit der Überleitung der Erregung von den Vorhöfen zu den Herzkammern.

Kommt es zur Erregung der Herzkammern, entspricht dieses Ereignis dem QRS-Komplex des EKG's. Vereinbarungsgemäß werden innerhalb des QRS-Komplexes positive Ausschläge immer mit R bezeichnet, negative Ausschläge mit Q, wenn sie der R-Zacke vorausgehen; mit S, wenn sie der R-Zacke nachfolgen. Die R-Zacke gilt hierbei als elektrische Herzachse, die häufig mit der anatomischen Herzachse übereinstimmt und damit Aussagen über den Lagetyp des Herzens erlaubt. Da, wie schon beschrieben, kein negativer Ausschlag im Maus-EKG der R-Zacke vorausgeht, wird der Kammerkomplex in dieser Arbeit mit  $R_{(Q)}RS$  bezeichnet und entspricht dem QRS-Komplex beim menschlichen EKG.

Das ST-Segment signalisiert die anhaltende Erregung des gesamten Ventrikelmyokards und geht in die T-Welle über, die Ausdruck für die Erregungsrückbildung im ventrikulären Arbeitsmyokards ist. Beim Maus-EKG geht hingegen die T-Welle gewöhnlich direkt aus dem  $R_{(Q)}RS$ -Komplex ohne ST-Strecke hervor.

Das EKG spiegelt somit Depolarisations- und Repolarisations-Vorgänge des Myokards in Form von Vektoren wider, die in ihrer Addition den oben beschriebenen Kurvenverlauf in Abhängigkeit von der Spannung [mV] zur Zeit [ms] ergeben.

## 1.9 Das Oberflächen-Elektrokardiogramm

Bei Oberflächenelektrokardiographischen Untersuchungen konnten bei einigen der SCP2/SCPx-defizienten Mäuse schon am zwölften Tag einer Phytoldiät höhergradige AV-Knoten-Blockierungen bei bradykardem Sinusrhythmus mit massiver Erregungsrückbildungsstörung festgestellt werden.

Da viele dieser Mäuse kurz nach dem Auftreten dieser Beobachtungen unter Beibehaltung von massiven EKG-Veränderungen verstarben, erhärtete das die Arbeitshypothese, dass die Akkumulation von Phytansäure Einfluss auf die Erregungsleitung und Erregungsrückbildung des Herzens hat, und die vorzeitigen

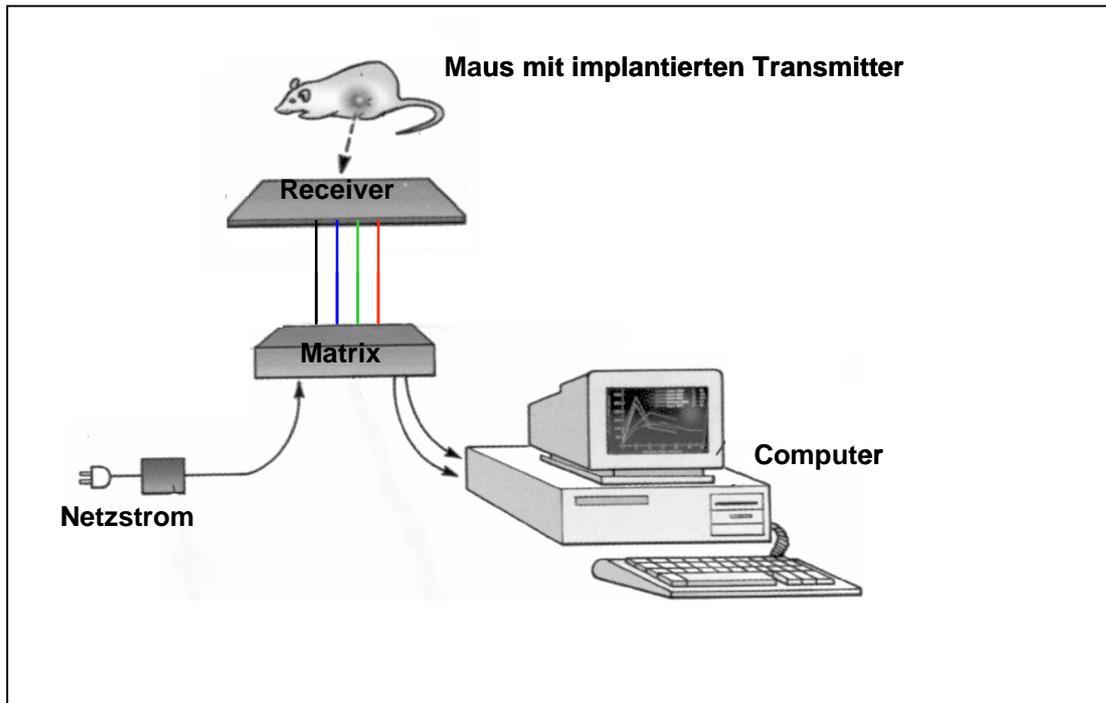
Todesfälle bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen, durch einen rhythmusbedingten plötzlichen Herztod zu erklären sind.

Die Aussagekraft dieser Untersuchungen muss dabei allerdings eingeschränkt werden, da für die Ableitung eine Narkotisierung der Tiere notwendig war. Die Folge der Anästhesie bewirkt dabei eine Verlangsamung der Herzfrequenz, was eine indirekte Beeinflussung elektrokardiophysiologischer und elektrokardiographischer Parameter zur Folge hat.

Durch die Möglichkeit der telemetrischen Erfassung des Elektrokardiogramms bei Kleintieren ist es deshalb erstmals möglich, Aufzeichnungen am freilaufenden Tier unter physiologischen Bedingungen zu machen.

### **1.10 Die telemetrische Datenerfassung bei Kleintieren**

Durch Implantation eines Senders (Transmitter) in den Peritoneal-Raum des Tieres und der subkutanen Verkabelung des Tieres (siehe Abbildung 10 im Ergebnisteil, Röntgenbild) ist es möglich, Körperfunktionen über einen Receiver aufzunehmen und diese über eine Matrix in digitale Daten zu wandeln, um sie dann an einen Computer weiterzuleiten. Die so erfassten Daten können dann mittels spezieller Software registriert und analysiert werden. Je nach der Art des implantierten Transmitters, ist es möglich die Aktivität, die Körpertemperatur, den Blutdruck oder das Elektrokardiogramm des Tieres zu erfassen. Die Erfassung der Daten kann so unter Ausschluss von Stress für die Tiere wie z.B. der Anästhesie erfolgen. Durch die Bewegungsfreiheit der Tiere ist es weiterhin möglich Versuchsbedingungen durchzuführen, die körperliche Belastungen, Belastungen durch Umweltfaktoren (Temperatur, Luftveränderung etc.) oder den zirkadianen Rhythmus der Tiere vorsehen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der telemetrischen Datenerfassung, Receiver** = Empfänger der telemetrischen Daten, die von dem Transmitter aufgenommen werden; **Matrix** = wandelt die analogen Daten des Empfängers in digitale Daten um und leitet diese an einen Computer. Die vier Kabelverbindungen zwischen Receiver und Matrix stellen vier Kanäle zur Aufzeichnung verschiedener Körperfunktionen dar.

### 1.11 Ziel dieser Studie

Die mittels Telemetrie bei den Mäusen aufgezeichneten Elektrokardiogramme sollen Aufschlüsse darüber geben, welche kardiologischen Auswirkungen eine Akkumulation der verzweigtkettigen gesättigten Fettsäure (Phytansäure) hat. Eventuell kann über diese Fragestellung die Ursache für die plötzlichen Todesfälle bei Refsum Patienten erklärt werden. Darüber hinaus sollen Expressionsstudien für verschiedene Connexine und deren Immunzyto-chemische Darstellung Aufschluss über die ursächlichen Veränderungen des Erregungsleitungssystems des Herzens durch die akkumulierte Phytansäure bringen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Diätetische Studien

SCP2/SCPx-defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund *C57Bl/6* wurden mit einer Standarddiät (Altromin, Hannover, Deutschland) gefüttert. Bestandteile dieser Diät waren 0,8 mg/g verschiedener Sterole, hauptsächlich Cholesterin und  $\beta$ -Sitosterol, 0,075 mg/g Phytol und 0,2 mg/g Phytansäure. Zusätzlich zu den schon vorhandenen Bestandteilen wurde dem Futter ein Anteil von 5 mg/g Phytol (Aldrich) hinzugesetzt.

Für die Fütterungsstudien wurden die Mäuse in Einzelkäfigen gehalten und die Futteraufnahme, das Körpergewicht, die Körpertemperatur und die Elektrokardiogramme täglich aufgezeichnet.

### 2.2 Abbildungen und Statistische Auswertung

Die Abbildungen wurden mit Origin 5.0 für Windows angefertigt. Die zugrundeliegende Statistik erfolgte mit SPSS 10.0 für Windows. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert. Die statistische Auswertung erfolgte nach den Parametern des T-Tests und dem Mann Whitney-U-Test.

### 2.3 Oberflächen-EKG und telemetrische Langzeit-EKG Studien bei Mäusen

Für die Erfassung der EKG Daten dienten sowohl Wildtyp-Mäuse als auch SCP2/SCPx-defiziente Mäuse, beide mit dem genetischen Hintergrund *C57Bl/6*, welche unter einer Standard Labor-Diät aufgezogen wurden.

### 2.4 Oberflächen- EKG

Für die Abnahme des Elektrokardiogramms mussten die Mäuse ruhiggestellt werden. Dazu wurden die Mäuse gewogen und mit einer intraperitonealen Gabe von in NaCl-Lösung gelösten Ketamin in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (Ketanest PARKE-DAVIS & Company, München, Germany) und Xylazin in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (Xylazinhydrochlorid, SANOFI-CEVA GmbH, Düsseldorf, Germany) anästhesiert. Um Stress und Unterkühlung

zu vermeiden und die negative Wirkung einer zu großen Adrenalinausschüttung auf die Mäuse zu minimieren, wurden diese in der Einschlafphase der Anästhesie auf eine 41°C vorgewärmte Platte gesetzt und durch das Überstülpen einer Abdeckung beruhigt. Durch Abtasten der Hinterläufe mit einer Pinzette wurde überprüft, ob sich die Maus in Narkose befindet. Danach erfolgte die Fixierung der Maus, auf dem Rücken liegend, auf die Wärmeplatte. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich alle untersuchten Mäuse in der gleichen Lage auf der Wärmeplatte befanden, um gleiche Herzlagetypen miteinander vergleichen zu können.

Die Abnahme des Elektrokardiogramms erfolgte über die Extremitäten mittels Krokodilklemmen, bei kleineren Tieren unter 25 g Körpergewicht mittels Drahtschlaufen. Dafür wurde der rechte Vorderlauf und der linke Vorderlauf sowie der linke Hinterlauf der Maus in der Reihenfolge für die zweite Ableitung (rot, gelb, grün), sowie der Schwanz der Maus für die Erdung, zur Verminderung des Hintergrundrauschens verbunden. Für einen optimalen Kontakt zur Hautoberfläche der Extremitäten wurden die Krokodilklemmen bzw. Drahtschlaufen mit einer Elektrodencreme (Marquette Hellige GmbH, Deutschland) beschichtet und mit dem Flachstecker eines mobilen EKG-Gerätes der Firma Siemens (Mega-card EKG-Gerät) verbunden. Ein sechs-Kanal-Elektrokardiogramm mit 20 mm/mV Verstärkung und 100 mm/s Vorschub konnte so aufgezeichnet werden. Die auf einem TFT-Bildschirm dargestellten Elektrokardiogramme wurden für die Auswertung über einen integrierten Drucker auf Millimeter-Papier ausgedruckt. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten wurden mittels manueller Ausmessung der Datenpunkte erhoben.

## **2.5 Telemetrische Erfassung des Elektrokardiogramms bei Mäusen**

Zur telemetrischen Datenerfassung bei Tieren ist es notwendig, diese mit einem Sender (Transmitter) auszustatten, welcher die empfangenen Körpersignale kabellos an einen Empfänger (Receiver) sendet.

## 2.5.1 Transmitter-Implantation

### 2.5.1.1 Präoperative Maßnahmen und Anästhesie

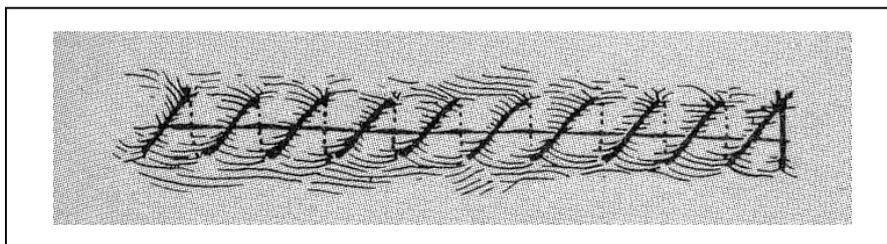
Vor der Operation wurden die Mäuse gewogen und mit einer intraperitonealen Gabe von in NaCl-Lösung gelösten Ketamin in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (Ketanest PARKE-DAVIS & Company, München, Germany) und Xylazin in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (Xylazinhydrochlorid, SANOFI-CEVA GmbH, Düsseldorf, Germany) anästhesiert. Um den Stress für die Mäuse bis zum Wirkungseintritt der Narkose so gering wie möglich zu halten, wurden die Mäuse nach der intraperitonealen Injektion des Anästhetikums auf eine 41°C warme Wärmeplatte gesetzt und eine Haube übergestülpt. Nach erfolgreicher Narkotisierung erfolgte die Entfernung des Fells der Bauchdecke, der rechten Achsel und der linken Hüfte mittels eines Rasierers. Um diese Stellen für den chirurgischen Eingriff weiter vorzubereiten, wurden die nach der Rasur übriggebliebenen Haare mit einer Haarentfernungscreme (pilca med creme, ASID BONZ, Böblingen) entfernt. Das so vorbereitete Tier konnte nun auf einen vorgeheizten Operationstisch (41°C) mit steriler OP-Unterlage (klinidrape®, Mölnlycke) mittels eines Tape-Bands, auf dem Rücken liegend, an den vier Extremitäten fixiert werden. Die Stellen des chirurgischen Eingriffs wurden mit Jodlösung desinfiziert.

Zur Kontrolle der Narkose und der Stabilität der Mäuse diente die Aufzeichnung gemäß der Oberflächen-EKG-Registrierung.

### 2.5.1.2 Operation

Mit einem 1,5 bis 2 cm langen Einschnitt in die Oberhaut der Bauchdecke wurde die Maus vorsichtig von cranial nach caudal geöffnet, um so die Unterhaut mit der *Linea alba* freizulegen. Um Blutungen während der Operationen zu vermeiden, ist es notwendig, eine Inzision in die Bauchhöhle längs der *Linea alba* vorzunehmen. Damit die im Bereich des Eintritts in die Bauchhöhle befindlichen Organe nicht verletzt wurden, erfolgte der Schnitt entlang der *Linea alba* mit einer Löffelschere, wobei der Löffel der Schere unter der Haut entlanggeführt wurde. Um den Transmitter (TA10ETA-F20, DSI, St. Paul, MN, USA) in

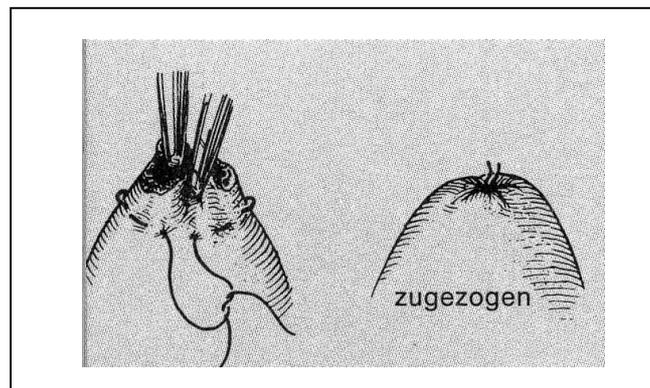
die so geöffnete Bauchhöhle einzuführen, wurde der Schnitt mit Haken gespreizt. Nach Platzierung des Transmitters, mit den Kabelenden zum Kopf der Maus, erfolgte dessen vorläufige Fixierung mit einer Pinzette und anschließend die Verankerung des Transmitters an der Unterhaut der Bauchdecke mit einem nicht resorbierbaren Polypropylen-Faden (ETHICON, Prolene 4/0, Johnson&Johnson Intl.). Vor der Schließung des Schnittes der Unterhaut wurden die beiden Kabel so gelegt, dass sie aus der Bauchhöhle treten, um *subcutan* an die rechte Schulter und die linke Hüfte verlegt werden zu können. Dazu erfolgte eine kleine Inzision rechts seitlich oberhalb des Transmitters, um einen Austritt für das rote Kabel, welches zur rechten Schulter führt, zu schaffen. Für das weiße Kabel, welches an die linke Hüfte führt, war ein solcher Schnitt nicht notwendig, da es durch die fortlaufende Naht der muskulären Bauchdecke geführt wurde. Um die Kabel an der rechten Schulter und der linken Hüfte zu fixieren, erfolgte dort jeweils ein kleiner Schnitt in die Haut. Durch diese Einschnitte wurde eine Kanüle *subcutan* in Richtung der abdominalen Platzierung des Transmitters geschoben und die Kabel zu dem Punkt ihrer Fixierung durch diese Kanüle geführt. Nach Entfernung der Kanüle erfolgte der Verschluss der abdominalen Operationswunde mit einem resorbierbaren Vicryl-Faden (ETHICON, Vicryl 4/0, Johnson&Johnson Intl.). Für diese Inzision wurde die Technik der fortlaufenden schrägen Naht angewandt, Abbildung 25.



**Abbildung 25** : Fortlaufende Naht, schräg zur Inzision (Ethicon, Chirurgische Knotentechnik)

Um die Kabelenden am Muskelgewebe zu fixieren, mussten diese vorher abisoliert werden, damit ein Kontakt des Drahtes zum Gewebe erfolgen konnte. Die Kabelenden wurden vor der Fixierung mit einer Kappe abgedeckt, um Störsignale zu vermindern und den Austritt des Kabels durch die Oberhaut zu verhindern. Mit einem nichtresorbierbaren Polypropylen-Faden erfolgte die Fixierung der Kabel im Untergewebe der rechten Schulter und der linken Hüfte. Vor dem Vernähen der Einschnitte erfolgte die Überprüfung der Funktions-

tüchtigkeit des Transmitters und die richtige Platzierung der Drähte, indem der Transmitter mit einem starken Magneten angeschaltet wurde (durch den Magneten wird innerhalb des Transmitters ein Magnetschalter betätigt). Über einen AM-Radioempfänger konnten nun akustisch die vom Transmitter ausgestrahlten EKG-Signale empfangen werden. Mit der Technik der Tabaksbeutelnaht wurden für die Beendigung der Operation die beiden Einschnitte für die Fixierung der Drähte mit einem Vicryl-Faden vernäht, Abbildung 26.



**Abbildung 26:** Tabaksbeutelnaht mit versenkter Naht (Ethicon, Chirurgische Knotentechnik).

### 2.5.1.3 Postoperative Maßnahmen

Nach der Operation wurden die Mäuse gewogen und zur besseren Regenerierung und zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes mit 2 ml Sterofundin-Lösung (Braun Melsange AG, Germany) *subcutan* im oberen Rückenbereich unter-spritzt. Danach wurden die Mäuse für 24 Stunden unter eine Infrarot Wärme-lampe gesetzt und mit einem AM-Radioempfänger überwacht. Bevor die so operierten Mäuse für die Langzeit-EKG-Studien auf der Telemetrie-Anlage eingesetzt werden konnten, mussten sie ihr Ausgangsgewicht vor der Operation erreichen.

#### **2.5.1.4 Röntgenanalysen**

Zur Überprüfung der Lage der Transmitter und dem korrekten Sitz der Elektroden wurden die operierten Mäuse mit einem Durchleuchtungs-C-Bogen der Firma Siemens (Siremobil 3 H) geröntgt. Die Lage des Transmitters und der Kabel konnte über ein Standbild auf einem Monitor ausgewertet und zur Dokumentation auf einem Video Grafikprinter UP 860 CE (Ziehm) ausgedruckt werden.

#### **2.5.2 Telemetrische Erfassung des Elektrokardiogramms und der Temperatur**

Die operierten Mäuse wurden zur Erfassung des Elektrokardiogramms und der Körpertemperatur in Einzelkäfigen auf einen Telemetrie Receiver (RA1010, DSI, St. Paul, MN, USA) positioniert, welcher das analoge Signal empfing und an eine Matrix weiterleitete. In der Matrix erfolgte die Umwandlung des analogen Signals in ein digitales Signal und wurde so an einen Rechner weitergeleitet. Mit einer modifizierten Labview-Software (Innere Med C) ließ sich so das empfangene Signal in einem Elektrokardiogramm darstellen. Für die Erfassung der Temperatur wurden die über einen zweiten Kanal gesendeten Signale über eine entsprechende Eichgrade in die Temperatur übersetzt (s. Anhang).

#### **2.6 Isolierung von Gesamt-RNS aus Gewebe**

Die RNS-Isolation erfolgte nach der CsCl-Methode von Chirgwin et. al, (1979) [55]. Dazu wurde 0,1 g Herzgewebe von Mäusen in flüssigem Stickstoff gefroren und unter Stickstoff gemörsert. Das feine Pulver wurde in die Guanidin-Lösung gegeben (100 mg/ml). Unter mehrfachem Schütteln inkubierte die Suspension für 1 h bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile mittels Zentrifugation (4500 x g; 10 min).

Die DNS wurde geschert, indem das Lysat mehrfach durch eine Injektionsnadel (20G) aufzogen wurde. Ein Zentrifugationsröhrchen wurde mit 4 ml Cäsiumchloridlösung gefüllt und das Lysat vorsichtig darüber geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für 16-20 h bei 20°C und 139439 x g. Danach erfolgte die Ab-

nahme des Überstandes; darauf folgte das Trocknen des RNS-Pellets für 10-15 min. Die Aufnahme der RNS erfolgte in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ . Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot abgenommen und der Rest bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ergeben sich aus den folgenden Tabellen.

**Tabelle 3: Cäsiumchloridlösung**

CsCl	5,7 M
EDTA	0,1 M
DEPC	200 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	1 l

Cäsiumchlorid in 0,1 M EDTA bei pH 7,5 lösen; DEPC hinzufügen und schüteln; 4 h bei Raumtemperatur inkubieren; Lösung autoklavieren (der Verlust durch Verdunstung wird durch Auffüllen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  ausgeglichen).

**Tabelle 4: Citratlösung**

Tri-Natriumcitratdihydrat	0,75 M
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	1 l
pH	7,0

**Tabelle 5: DTT-Lösung**

1,4-Dithio-DL-threitol (1 M)	15,4 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	100 ml

**Tabelle 6: Guanidinstammlösung**

Guanidinthiocyanat	125 g
Citratlösung	8,8 ml
N-Lauroylsarcosin	13,2 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	146 ml

### Guanidinlösung:

1 M DTT-Lösung im Verhältnis 1:100 mit Guanidinstammlösung mischen

**Tabelle 7:  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$**

DEPC	2,5 ml
<i>Aqua bidest.</i>	5 l

Tabelle 8 : N-Lauroylsarcosinlösung

N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz	35 g
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	100 ml

### 2.6.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleotide zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine dagegen bei 280 nm. Über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (Optische Dichte) lässt sich eine Aussage machen, inwiefern die aufgearbeitete RNS durch Proteine verunreinigt ist. Liegt der Quotient: OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> über 1,8, ist von keiner Verunreinigung durch Proteine auszugehen. Die Konzentration der RNS-Aufarbeitung berechnet sich nach folgender Formel:

Tabelle 9: Berechnung der Nukleinsäurekonzentration

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} * \text{VF} * x * 1/1000$$

**A<sub>260</sub>** : Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

**VF** : Verdünnungsfaktor

**X** : Konstante, für RNS = 40

### 2.6.2 Phenol-/Chloroformextraktion

Eine Phenol/Chloroformextraktion wurde durchgeführt, um Proteine von Nukleinsäuren zu trennen. Der Lösung wurde ein Volumen Phenol/Chloroform (24:1) zugefügt, gemischt und 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase konnte abgenommen und die organische Phase, sowie die in der Interphase vorhandenen Proteine, verworfen werden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Nach Zugabe von Chloroform und erneuter Zentrifugation (5 min) wurde die wässrige Phase abermals abgenommen und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3M; pH 4,8) und 2,5 Volumen Ethanol versetzt. Nach einer

Inkubation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 1 h wurde die Lösung zentrifugiert ( $16000 \times g$ ; 30 min), das Pellet getrocknet und in einer geeigneten Menge  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  aufgenommen.

## 2.7 Northern-Blot-Analysen

### 2.7.1 Gelelektrophorese

#### Formamid (deionisiert):

100 ml der Formamid-Lösung wurden mit 5 g  $\text{AG}^{\circledR}$  501-X8 *Resin* (Maniatis) [56] versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Anionen-/Kationen-Austauschermaterial wurde abfiltriert und die Flüssigkeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 10: Probenpuffer**

Formamid (deionisiert, pH 7,0)	100 $\mu\text{l}$
5 x RNS-Puffer	40 $\mu\text{l}$
Formaldehyd	35,2 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	24,8 $\mu\text{l}$

**Tabelle 11: RNS-Agarose/Formaldehydgel**

Agarose	1,1 % (w/v)
Formaldehyd	21 % (v/v)
5 x RNS-Puffer	20 % (v/v)

5 x RNS-Puffer und Formaldehyd im Wasserbad auf  $60^{\circ}\text{C}$  erwärmen; Agarose in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  in der Mikrowelle lösen; Lösungen bis zum Gebrauch im Wasserbad auf  $60^{\circ}\text{C}$  halten; in horizontal ausgerichteten Gelschlitten gießen; Gel mindestens 15 min bei Raumtemperatur aushärten lassen.

**Tabelle 12: 5 x RNS-Puffer**

MOPS	0,2 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	5 mM
pH	7,0

MOPS und Natriumacetat in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  lösen; pH-Wert einstellen; mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  auffüllen und Lösung autoklavieren.

### 1 x RNS-Laufpuffer:

5 x RNS-Laufpuffer mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  1:5 verdünnen.

2–10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNS wurden in 7  $\mu\text{l}$  RNS-Probenpuffer resuspendiert, mit 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) und 2  $\mu\text{l}$  Gelladepuffer versetzt und in einem RNS-Agarose/Formaldehydgel bei 10 V/cm aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 10 min bei 60°C denaturiert und auf Eis gestellt. Die Elektrophorese dauerte 4 h. Anschließend wurden die Gele auf einem Transilluminator photographiert. Danach erfolgte der Kapillartransfer der Proben auf eine Nylonmembran.

### 2.7.2 Kapillartransfer

Der Transfer der RNS auf eine positiv geladene Nylonmembran (Tropix-Serva) erfolgte durch Kapillarblot. Dazu wurde eine Glasplatte so auf die Ränder zweier Glasschalen platziert, dass sie eine Brücke bildete. Die beiden Glasschalen wurden mit 20 x SSC-Puffer gefüllt. Als Docht für den SSC-Puffer diente „Whatman“-Papier, dessen Enden in die Glasschalen hineinreichten und auf einer Glasplatte lagen. Darauf wurde das Gel und dann die Nylonmembran geschichtet. Die Membran wurde mit Lagen saugfähigen Papiers bedeckt und diese durch ein Gewicht beschwert. Nach erfolgtem Transfer der RNS auf die Membran (10-16 h) wurde zur Fixierung der RNS die Membran für 2,5 min mit UV-Licht (254 nm; 0,3 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt.

**Tabelle 13: 20 x SSC-Puffer (Transferpuffer)**

Tri-Natriumcitratdihydrat	0,3 M
NaCl	3 M
DEPC	0,05 % (v/v)
pH	7,0

Die Salze wurden in *Aqua bidest.* gelöst, der pH-Wert eingestellt und mit *Aqua bidest.* auf das Endvolumen aufgefüllt. Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurde hin-

zufügt. Vor dem Autoklavieren des Ansatzes erfolgte eine Inkubation der Lösung für 4h bei Raumtemperatur.

### 2.7.2.1 Nachweis der Transfereffizienz

#### Methylenblauammlösung:

Um die Effizienz des Transfervorgangs zu überprüfen wurde die Membran mit einer Methylenblaulösung für 5-10 min gefärbt. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch Zugabe von 25 %igen Ethanol ausgewaschen. Nach dem Trocknen konnte die Position der 28 S-rRNS und der 18 S-rRNS mit Bleistift markiert und die Membran photographiert werden. Die so vorbereitete Membran wurde für die Hybridisierung eingesetzt.

Zur Vorbereitung einer 1 %igen Methylenblaulösung wurde Methylenblau mit Natriumacetatlösung und  $H_2O_{DEPC}$  wie in Tabelle 14 gelöst.

**Tabelle 14: Methylenblaulösung**

Natriumacetatlösung (3 M)	16,6 ml
Methylenblauammlösung (25 %)	4 ml
Mit $H_2O_{DEPC}$ auf 100 ml auffüllen.	

## 2.8 Cx40/Cx43-Sondenherstellung

Die Sonden wurden über eine *in vitro*-Transkription der klonierten cDNS hergestellt. Für die Herstellung der cDNS dienten Proben aus menschlichem Material. Diese wurden für die Amplifikation von Connexin40 und Connexin43 verwendet. Die Sequenz für Connexin40 wurde aus der Datenbank *Genebank* mit der Kennung # *U03486* ermittelt (siehe Anhang). Aus der „upstream“ Sequenz 39-58 wurde der eine Primer gebildet und für den gegenläufigen Primer 2 die „downstream“ Sequenz 1241-1260 plus einer angehängten Restriktionsstelle für *EcoRI* ausgewählt. Die Sequenz für Connexin43 wurde aus der Datenbank *Genebank* mit der Kennung # *UX52947* ermittelt (siehe Anhang). Aus der „upstream“ Sequenz 171-190 wurde der eine Primer gebildet und für den gegenläufigen Primer 2 die „downstream“ Sequenz 1817-1836 ausgewählt. Die so gebildeten Amplifikate wurden in den Vektor *pT7/T3 $\alpha$ -18* ligiert und zur Amplifikation in

Bakterien (*DH5 $\alpha$* -Stamm) appliziert. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium angezogen und anschließend mittels Plasmidpräparation die Plasmide für Connexin40 und Connexin43 isoliert.

Die aus dieser Plasmidpräparation gewonnene Plasmid-DNS diente für die Herstellung der Connexin40- und Connexin43-Sonden. Dazu wurden jeweils 1  $\mu$ g des Plasmids durch Restriktionsverdau linearisiert. Die für die einzelnen Plasmide verwendeten Restriktionsenzyme und die verwendete RNS-Polymerase ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 15: Verwendete Enzyme und die verwendete RNS-Polymerase zur Herstellung von RNS-Sonden aus den zur Verfügung gestellten Plasmidpräparationen.**

Plasmid	Restriktionsenzym	RNS-Polymerase
<i>Cx40 pT7/T3<math>\alpha</math>-18</i>	<i>HindIII</i>	SP6
<i>Cx43 pT7/T3<math>\alpha</math>-18</i>	<i>PstI</i>	SP6

Nach der Restriktion wurde das Plasmid durch eine Phenol/Chloroform-extraktion (s.o.) gereinigt und anschließend mit Ethanol (70%) gefällt. Die Menge der präzipitierten DNS wurde photometrisch bestimmt.

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem DIG-RNA-Labeling-Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH. Zu ca. 100-500 ng Plasmid-DNS wurde der *in vitro* Transkriptionsmix (Tabelle 16) zugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend wurden 2  $\mu$ l DNase I dazugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 16: *In vitro*-Transkriptionsmix**

Gereinigte Plasmid-DNS	1 $\mu$ g
10 x NTP Labeling Mix	2 $\mu$ l
10 x Transkriptionspuffer	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Ad 18 $\mu$ l
RNA-Polymerase (SP6 20 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l

Zum Beenden der Reaktion erfolgte die Zugabe von 2  $\mu$ l EDTA (200 mM; pH 8,0).

Die so markierte RNS wurde mit 0,1 Volumen LiCl und 2,5 Volumen Ethanol (100%) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht präzipitiert und anschließend für 15 min bei  $15339 \times g$  zentrifugiert, das Ethanol entfernt und das Pellet mit  $100 \mu\text{l}$  70 %igen Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet im Vakuum getrocknet und in  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  resuspendiert.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz der Sonden diente  $1 \mu\text{l}$  der so erhaltenen Lösungen. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe in 6 Schritten hergestellt. Eine markierte Kontroll-RNS mit bekannter Konzentration, die Bestandteil des DIG RNA *Labeling Kits* ist, wurde in gleicher Weise verdünnt. Je  $1 \mu\text{l}$  der Verdünnungsstufen wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen („Dot-Blot“), anschließend die RNS auf die Membran durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert ( $254 \text{ nm}$ ;  $0,3 \text{ J/cm}^2$ ) und die Membran 30 min mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen und unter Anwendung eines Chemilumineszenzverfahrens (s. Anleitung zum Dig RNA *Labeling Kit*, Roche Diagnostics) wurde die Verdünnungsreihe durch die Belichtung auf einem Röntgen-Film dargestellt.

### 2.8.1 Hybridisierung

Die Bindung (Hybridisierung) der Sonde erfolgte durch komplementäre Basenpaarung mit der auf der Membran fixierten mRNS. Dazu wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und in einem Hybridisierungsofen für 2 h bei  $72^{\circ}\text{C}$  in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die in der Hybridisierungslösung gelöste Sonde ( $50 \text{ ng/ml}$ ) wurde bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert, kurz auf Eis gestellt und dann gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal für 15 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  in  $2 \times \text{SSC}$ -Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte mit  $0,1 \times \text{SSC}$ -Waschpuffer für jeweils 30 min bei  $70^{\circ}\text{C}$ . Daran schloss sich die Detektion gemäß dem „DIG System User Guide“ (Boehringer Mannheim) unter Verwendung des Chemilumineszenzsubstrates *CDP-Star*<sup>®</sup> (Tropix-Serva) und *Hyperfilm*<sup>TM</sup>-Röntgenfilm (Amersham) an. Die für die Hybridisierung notwendigen Lösungen wurden nach folgenden Angaben hergestellt:

**Tabelle 17: Blockingreagenzstammlösung**

Blockingreagenz	10 g
1 x Maleinsäurepuffer	100 ml
DEPC	50 µl

Blockingreagenz in 1 x Maleinsäurepuffer geben und durch vorsichtiges Erwärmen auf 70°C lösen; DEPC hinzugeben und schütteln; Lösung 4 h bei Raumtemperatur inkubieren, autoklavieren und bei -20°C lagern.

**Tabelle 18: Blockingreagenz**

Blockingreagenzstammlösung	1 ml
1 x Maleinsäurepuffer	9 ml

**Tabelle 19: Prähybridisierungslösung**

Blockingreagenz	10,0 g
Formamid (deionisiert, pH 7)	125 ml
SDS (20 %)	2,5 ml
N-Lauroylsarcosinlösung (35 %)	710 µl
20 x SSC-Puffer	62,5 ml

Substanzen unter leichtem Erwärmen in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> lösen und mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 250 ml auffüllen.

**Tabelle 20: Hybridisierungslösung mit Sonde**

Sondenlösung	50 ng/ml
Hybridisierungslösung	10 ml

Entsprechendes Volumen der Sondenlösung mit 200 µl Hybridisierungslösung vermischen; Lösung 10 min auf 100 °C erhitzen und anschließend kurz auf Eis stellen, mit Hybridisierungslösung auf 10 ml auffüllen und gut durchmischen.

**Tabelle 21: 2 x SSC-Waschpuffer**

20 x SSC-Puffer	50 ml
SDS-Lösung (20 %)	2,5 ml

Mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 500 ml auffüllen

**Tabelle 22: 0,1 x SSC-Waschpuffer**

20 x SSC-Puffer	2,5 ml
SDS-Lösung (20 %)	2,5 ml

Mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 500 ml auffüllen.

An die Hybridisierungsreaktion schloss sich der immunologische Nachweis an.

### 2.8.2 Immunologischer Nachweis

Der Immunologische Nachweis erfolgte über die Detektion der hybridisierten Sonden an der auf der Membran fixierten RNS.

Dazu wurde die Membran für 1 min in Maleinsäurepuffer geschwenkt und dann für 30-60 min mit Puffer 2 (Blockingreagenz) inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit dem Anti-DIG-AP-Puffer für 30 min an. Dazu wurde die Membran luftblasenfrei mit der Lösung in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte für 15 min mit Tween<sup>®</sup>20-Puffer. Auf einer Folie wurde CSPD<sup>®</sup>-Lösung gleichmäßig verteilt (100 µl/cm<sup>2</sup>), die Membran darauf gelegt und 5 min inkubiert. Mit einer zweiten Folie wurde die überschüssige CSPD<sup>®</sup>-Lösung herausgedrückt, die Membran in Folie eingeschweißt und bei 37°C 15 min inkubiert, um die alkalische Phosphatase zu aktivieren. Anschließend erfolgte für 2 min bis 12 h die Belichtung eines Röntgenfilms. Die für den Immunologischen Nachweis notwendigen Lösungen und deren Zusammensetzung finden sich in den folgenden Tabellen 23-27.

**Tabelle 23: Anti-DIG-AP-Puffer**

Anti-DIG-AP	1 µl
Blockingreagenz	10 ml

**Tabelle 24: CSPD<sup>®</sup>-Lösung**

CSPD <sup>®</sup> -Stammlösung	10 µl
Diethanolaminpuffer	990 µl

**Tabelle 25: Diethanolaminpuffer**

Diethanolamin	100 mM
pH	10,0

**Tabelle 26: 5x Maleinpuffer**

Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
DEPC	0,05 % (v/v)
pH	7,5

Zum Lösen der Salze Natriumhydroxidplättchen zusetzen; pH-Wert einstellen, DEPC hinzufügen und die Lösung autoklavieren.

**Puffer 2:**

Blockingreagenz 1% in 1x Maleinsäurepuffer.

**Tabelle 27: Tween®20-Puffer**

<b>Tween®20</b>	300 µl
1 x Maleinsäurepuffer	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	80 ml

**2.9 Quantitative Analyse von Fettsäuren****2.9.1 Herzexplantation**

Für die Herzexplantation dienten Mäuse, die für einen Zeitraum von 15 Tagen mit einer 0,5 % Phytol angereicherten Diät gefüttert wurden. Vor der Entnahme der Herzen wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Gabe von Ketamin/NaCl (50mg/kg) und Xylazin/NaCl (10mg/kg) anästhesiert und anschließend kardiovaskulär mit einer PBS/Heparin-Lösung perfundiert. Dazu wurde die Maus mit einem Schnitt in die Bauchdecke eröffnet, um dann mit einem fortlaufenden Schnitt durch das Zwerchfell über das Sternum den Thoraxraum zu öffnen. Der rechte und der linke Rippenbogen wurden mit Nadeln zur Seite gesteckt und durch eine Butterfly-Nadel die Perfusionslösung über die

linke Herzkammer in den Blutkreislauf der Maus geleitet. Der Austritt der Perfusionslösung erfolgte über einen kleinen Schnitt in der rechten Herzkammer. Nach erfolgter Perfusion erfolgte die Explantation des Herzens und die Überführung in 5 ml eiskalte PBS-Lösung. Die Aufschließung und Homogenisierung des Gewebes erfolgte mittels eines Sonopuls-Verfahrens 3 x 1 min bei halber Leistung und 50% Zykluslänge auf Eis.

### **2.9.2 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographische- (HPLC)-Analyse und Fraktionierung der Phospholipide**

Zur Auftrennung der underivatisierten Phospholipide wurde das homogenisierte Herzgewebe mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)-Analyse fraktioniert und die Phosphatidylethanolamin- und die Phosphatidylcholin-Fractionen gesammelt. Die HPLC-Analyse erfolgte auf einem Kontron (Neufahrn, Germany) Flüssigkeits-Chromatograph Modell 422 und einem Dioden Detektor Modell 440.

Die Separation der Proben erfolgte über eine 5 µm Nucleosil 100-Si Säule (25 cm x 4 mm ID) (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in Anlehnung an die Methode von Nissen und Kreysel [56]. Die Phospholipide wurden bei einer Absorption von 193 nm detektiert und mit einem Fraktionssammler FRAC-100 der Firma Pharmacia (Schweden) gesammelt. Die Einbringung der Proben erfolgte mittels eines Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA) 100 µl Spiral Injektors. Für die Quantifizierung der Phospholipide diente ein interner Standard. Dazu wurde 1mg/ml Di-Lauroyl-Phosphatidylethanolamin zu den Proben gegeben, so dass anhand eines Vergleiches der Fläche unter dem Peak des internen Standards zu der Fläche unter dem Peak der Phospholipidfraktionen der Probe eine Quantifizierung erfolgen konnte

Die so gesammelten und quantifizierten Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylcholin-Fractionen aus dem Herzgewebe der Maus dienten nun der weiteren Untersuchung mittels gaschromatographischen und massenspektroskopischen Verfahrens.

### **2.9.3 Identifizierung und Quantifizierung von Fettsäuren mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie**

#### **2.9.3.1 Probenvorbereitung und Derivatisierung**

Die Analyse der Fettsäuren erfolgte mittels eines gekoppelten gaschromatographischen und massenspektroskopischen Verfahrens, wobei die Fettsäuren in Form ihrer Methylester (FAME = fatty acid methyl ester) getrennt wurden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die so in ihrer veresterten Form vorliegenden Fettsäuren einen geringeren Siedepunkt und eine höhere Flüchtigkeit besitzen und zu einer geringeren Adsorption und Zersetzung auf der Säule neigen.

Für die Methode der inneren Kalibrierung mit Fremdschubstanz wurden 50 µl der Proben mit einem Gemisch aus 1 ml Methanol/Toluene 4:1 (v/v) und einer definierten Menge von 20 ng/µl Nonadecanoic-Fettsäure als interner Standard verdünnt und unter ständigem Röhren für die Veresterung der freien Fettsäuren unter saurer Katalase 100 µl Acetylchlorid langsam hinzupipettiert. Durch Erhitzen dieses Reaktionsgemisches auf 100°C für 1 Stunde erfolgte der Abzug des Methanols und nach Abkühlung des Gemisches auf Raumtemperatur die Neutralisierung mit 3 ml einer 6 %igen Natriumcarbonat-Lösung. Nach anschließenden Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 10 min erfolgte die Abnahme der organischen Phase aus dem Überstand. 1 µl aus dieser organischen Phase wurde für die gaschromatographische und massenspektrometrische Auswertung der Fettsäuremethylester verwendet.

#### **2.9.3.2 Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse der Fettsäuremethylester (FAME)**

Die gaschromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten in einem GCQ-System der Firma Thermoquest (Egelsbach, Germany) ausgestattet mit einer CP-Sil 88 Silica Kapillarsäule (50 m x 0,25 mm ID, 0,2 µm Filmstärke, Varian-Chrompack, Darmstadt, Germany). Als Trägergas für die Proben diente Helium mit einer konstanten Geschwindigkeit von 30 cm/s. Die Ofentemperatur wurde für 1 min bei 80°C gehalten und dann in Schritten von

6°C pro Minute bis zu einer Temperatur auf 140°C erhöht und für 15 min gehalten. Anschließend erfolgte eine Erhöhung auf eine Temperatur von 240°C in Schritten von 3°C pro Minute. Zur Injektion der Analyten diente ein auf 260°C erhitzter Splitinjektor mit Strömungsteilung von 1:30. Bei dieser Technik wird nur ein Teil des Probenvolumens in die Säule überführt. Der restliche Teil verlässt die Injektionskammer über die Splitteilung. Die Parameter zur Ionisierung der Substanzen sahen wie folgt aus: EI 70 eV, Aufnahme im „fullscan“ Modus im Bereich 50-500 u, einem für die Gaschromatographische Quantifizierung spezifischen AGC Ziel-Wert von 50 und „high adjustment“ bei 30%. Die Quantifizierung erfolgte über die Kalkulation der Peakfläche bei einer eingesetzten Scanrate von 1:3 Scan/s gegenüber dem verwendeten internen Standard. So kann über die bekannte Konzentration des internen Standards der Gehalt der zu bestimmenden Substanzen über das Verhältnis der Signalintensitäten berechnet werden.

Die für die Quantifizierung erforderliche Berechnung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe der GCQ data processing software 2.2.

## **2.10 Histologische Arbeitsmethoden**

### **2.10.1 Probenvorbereitung / Herzentnahme**

Für die Herzexplantation dienten Mäuse, die für einen Zeitraum von 15 Tagen mit einer 0,5 % Phytol angereicherten Diät gefüttert wurden. Vor der Entnahme der Herzen wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Gabe von Ketamin/NaCl (50mg/kg) und Xylazin/NaCl (10mg/kg) anästhesiert. Durch den geöffneten Thoraxraum wurde das Herz zügig entnommen und durch Injektion in die linke und rechte Herzkammer mit einer PBS/Heparin-Lösung gespült und anschließend mit Kryolösung/PBS 1:1 ausgespritzt. Um das Herz einzubetten, wurde eine Einbettschale zuvor mit Kryolösung zu  $\frac{1}{4}$  gefüllt und angefroren. In die so vorbereitete Schale wurde das präparierte Herz gelegt, ausgerichtet und mit Kryolösung überschichtet. Das in die Kryolösung eingebettete Herz wurde dann zum Einfrieren in eine Schale mit Isopenthan auf flüssigen Stickstoff gegeben. Die weitere Lagerung der präparierten Gewebe erfolgte bei -80°C.

## 2.10.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Herstellung von Gewebeschnitten kryokonservierter Proben (Schnittdicke ca. 3-5µm) erfolgte am Kryostat bei einer Kammer- und Präparatetemperatur von -20 bis -25°C. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

## 2.10.3 Immunzytochemie

### 2.10.3.1 Immunfluoreszenzmarkierung

Immunfluoreszenzmarkierungen zur Identifizierung der Expression von Connexin40 und Connexin43 wurden unter Verwendung der in der Tabelle 28 verwendeten Antikörper an auf Objektträgern überführten Kryoschnitten durchgeführt.

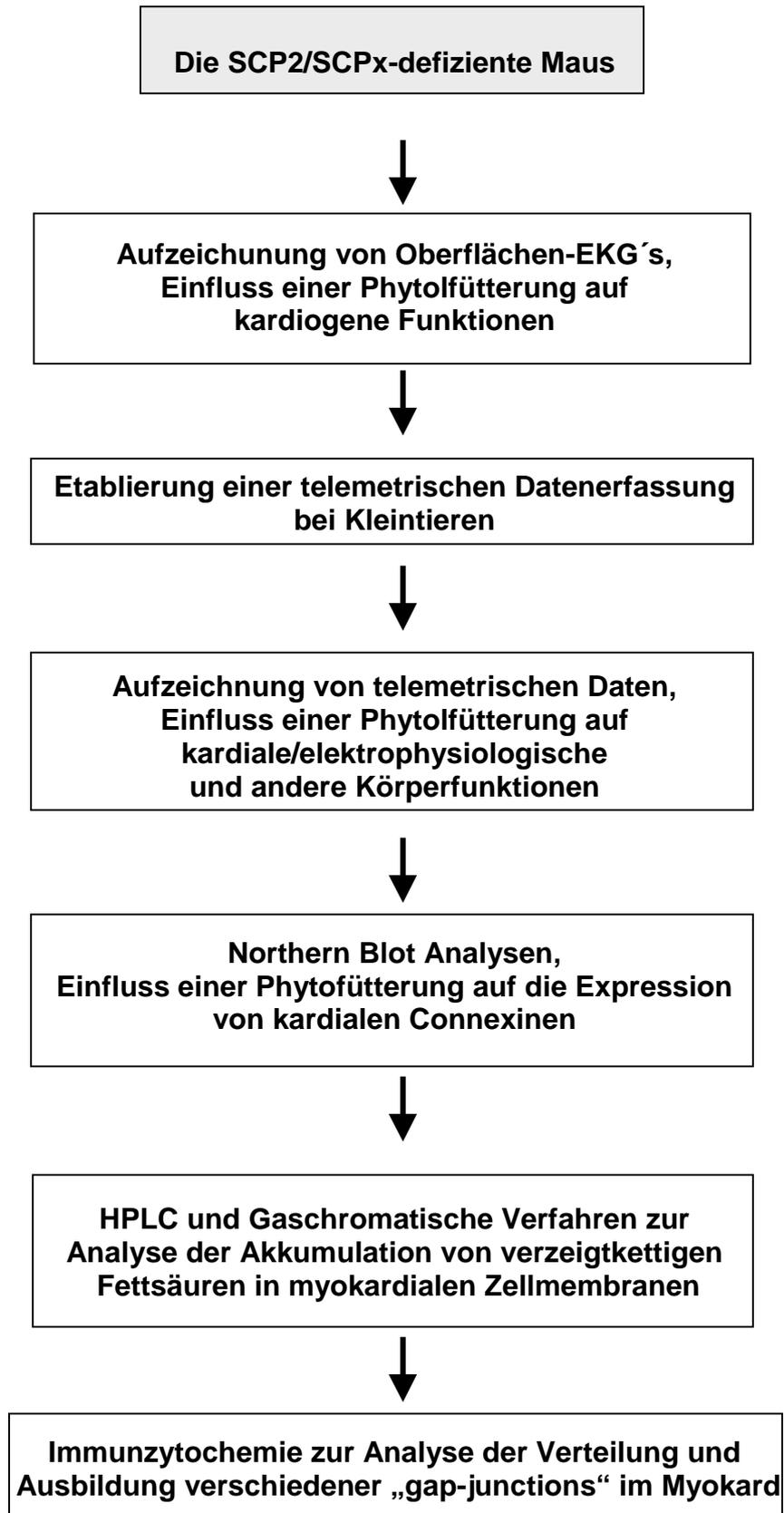
Die Markierungen erfolgten auf Eis. Im ersten Schritt wurden die Kryoschnitte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 1 h mit 0,5% Blockingreagenz in PBS inkubiert. Über Nacht erfolgte die Bindung des primären Antikörpers 1:10 und 1:200 (anti Cx40 oder anti Cx43) in PBS mit 0,5% Blockingreagenz (w/v). Zum Entfernen ungebundener Primärantikörper wurden die Kryoschnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte durch Inkubation der Kryoschnitte für 1 h mit dem in PBS mit 0,5% Blockingreagenz verdünnten fluoreszenzmarkierten sekundär Antikörper (1:1000). Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und die Kryoschnitte unter Fluoromount eingedeckt. Die Immunmarkierungsergebnisse wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und zur Darstellung mit einer CCD-Kamera fotografiert.

**Tabelle 28: Auflistung der Primär- und Sekundär-Antikörper zur Detektion von Connexin 40 und Connexin43 in der Maus**

Primär Antikörper	Maus anti rat Anti Cx40	Connexin40 Chemicon
Primär Antikörper	Maus anti rat Anti Cx43	Connexin43 Chemicon
Sekundär Antikörper	Esel anti Maus Cy3	Chemicon

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Arbeitsablauf:



### 3.2 Oberflächen-Elektrokardiogramm bei *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen und *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen

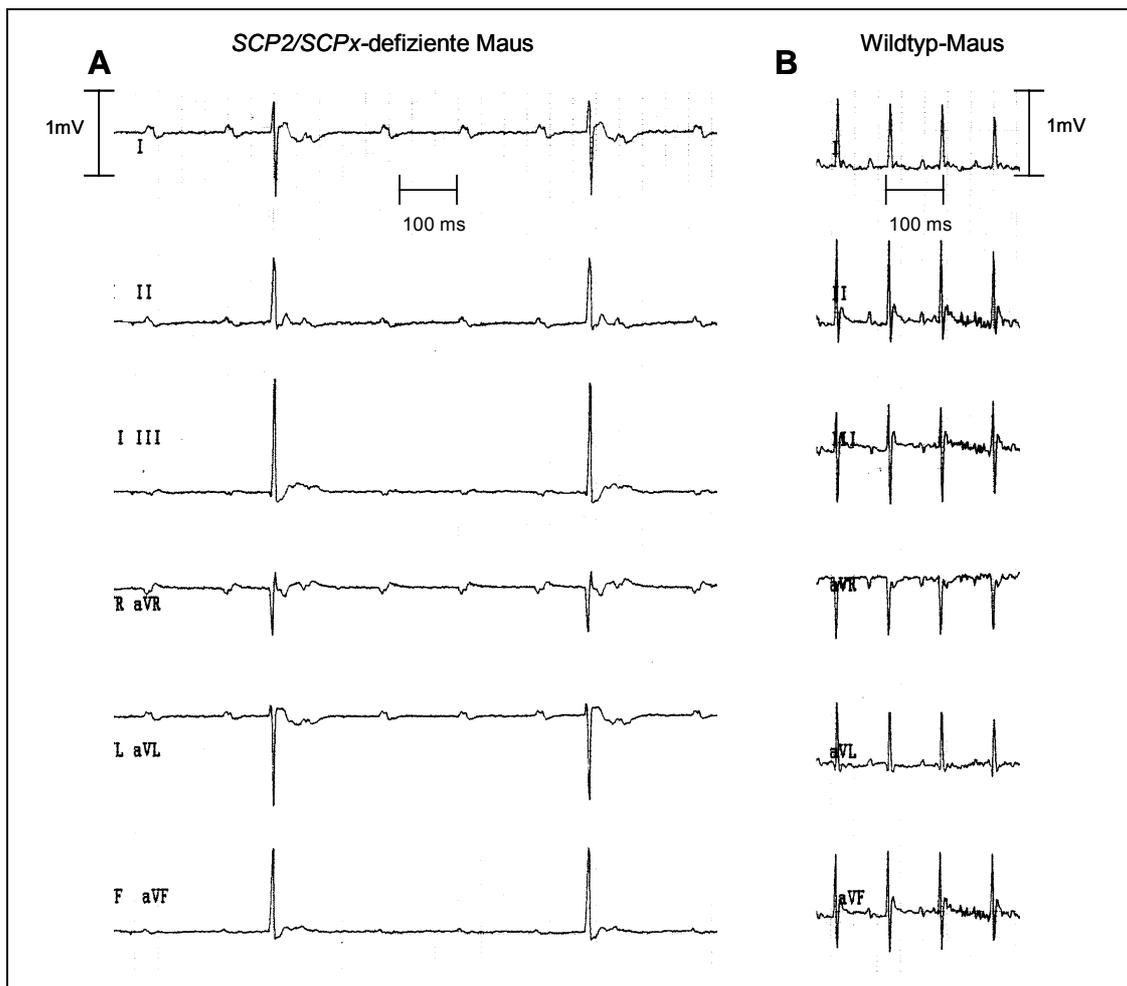
Da es durch das deletierte *Scp2*-Gen in den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen zu einer fehlenden peroxisomalen Bindung von Phytansäure [38], [39] und damit auch zu einem verminderten Abbau von Phytansäure durch die peroxisomale  $\alpha$ -Oxidation [28] kommt, wird ein großer Teil dieser verzweigtkettigen gesättigten Fettsäure im Serum und in den Organen der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse akkumuliert. Um diesen Effekt und die damit eventuell sich entwickelnden kardiologischen Dysfunktionen zu verstärken, wurden die Mäuse für die anstehenden Versuche mit einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol gefüttert.

Dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Charakterisierung kardialer Funktionen in *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen vorausgegangen. Dazu wurden 6-Kanal-Oberflächen-EKG-Registrierungen an *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse, die unter phytolreicher Diät gehalten wurden, durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnten bei einigen der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse Veränderungen im EKG schon am zwölften Tag der Diät dokumentiert werden. Zu diesen Veränderungen zählten eine höhergradige AV-Knoten-Blockierung bei pathologisch langsamen Sinusrhythmus mit deutlicher Erregungsrückbildungsstörung (Abbildung 9). Auch Unterschiede zur Erregungsausbreitung im Kammerkomplex gegenüber Wildtyp-Mäusen konnte mit dieser Methode für die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse dokumentiert werden

Für die Erstellung der Oberflächen-Elektrokardiogramme wurden die Mäuse, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, anästhesiert. Unter Narkose erfolgte die 6 Kanal-Ableitung des Elektrokardiogramms über die Extremitäten der Maus. Um die Effekte der Akkumulation von Phytansäure in Bezug auf die kardiologischen Auswirkungen zu messen, wurden über die Extremitäten der Maus Oberflächen-EKGs vor und während einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol abgeleitet.

Als Kontrollgruppe dienten für jedes Experiment Wildtyp-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund *C57Bl/6*, die in gleicher Weise wie die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse gefüttert, behandelt, operiert und anästhesiert wurden.

Wie in der folgenden Abbildung eines 6-Kanal-Oberflächen-EKGs zu erkennen ist, werden durch die Fütterung der *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäuse mit 0,5 mg/g Phytol enthaltende Diät keine elektrokardiographischen Veränderungen hervorgerufen, während die Phytolfütterung bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen massive elektrophysiologische Störungen, bis hin zum kompletten AV-Block hervorruft.



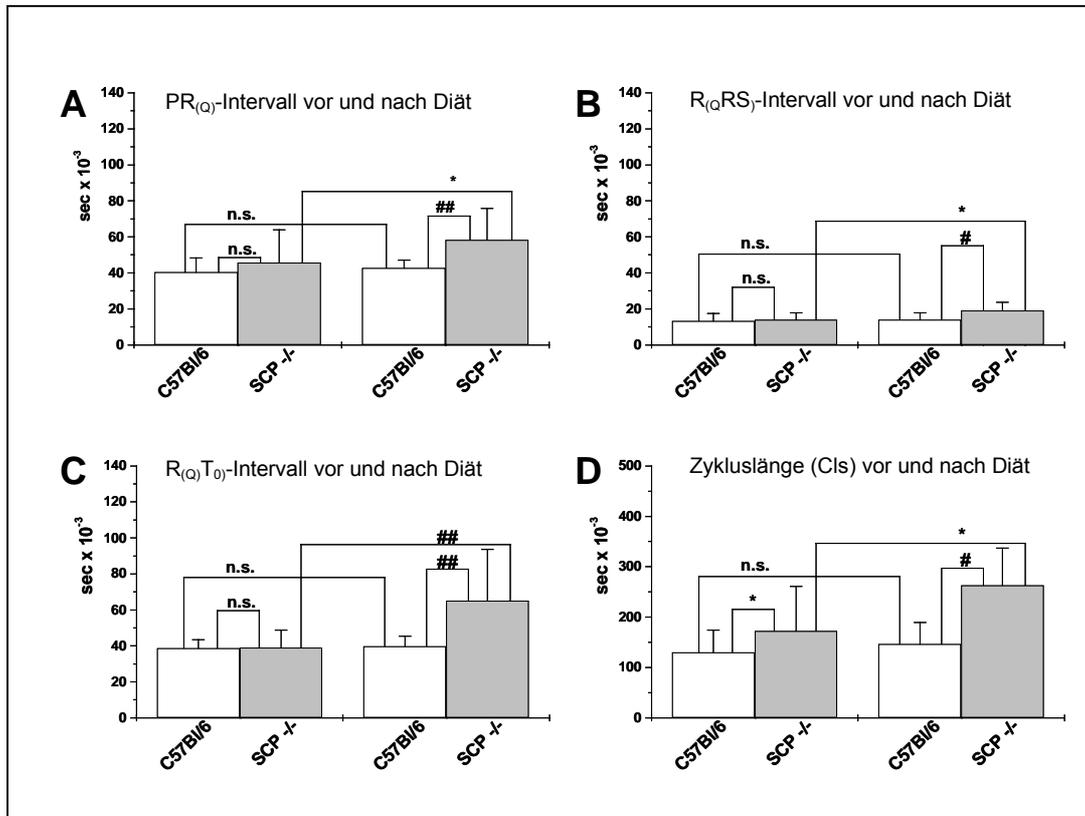
**Abbildung 8:** A) 6-Kanal-Oberflächen-EKG-Registrierung einer *SCP2/SCPx*-defizienten Maus unter einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol am Tag 15. Kompletter Atrioventrikulärer-Block III°, langsamer Sinusrhythmus mit deutlichen Erregungsrückbildungs-Störungen. B) 6-Kanal-Oberflächen-EKG-Registrierung einer *C57Bl/6*-Wildtyp Maus unter einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol am Tag 15. Es sind keine Anomalien im EKG zu erkennen. Zykluslänge, Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung entsprechen dem Normalbefund vor Diät.

Es konnten massive Erregungsausbreitungsstörungen bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät registriert werden, welche ursächlich für das Versterben der Tiere waren.

Die Abbildung 9 gibt die Auswertung verschiedener EKG-Intervalle, die Aufschluss über die Erregungsausbreitung im Herzen geben, wider.

### 3.3 Auswertung der Oberflächen-Elektrokardiogramme von *SCP2/SCPx*-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Die elektrokardiographischen Untersuchungen der mit 0,5 mg/g Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse zeigten deutliche Defekte im Oberflächenelektrokardiogramm. Massive Reizleitungsstörungen von den Vorhöfen auf den Kammerkomplex traten unter der Diät auf. Das  $PR_{(Q)}$ -Intervall stieg von knapp 40 ms auf über 65 ms an. Auch eine Verbreiterung des Kammerkomplexes  $R_{(Q)}RS$  von 15 ms auf über 20 ms weist auf eine Störung der Erregungsausbreitung in den Ventrikeln des Herzens bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Diät hin. Erregungsrückbildungsstörungen der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse unter Diät zeigte die Veränderung des Intervalls  $R_{(Q)}T_{(0)}$ , welches sich fast um das Doppelte verbreiterte. Insgesamt weisen diese Veränderungen im EKG auf Erregungsleitungs- und Erregungsrückbildungsstörungen und einen verlangsamten Herzrhythmus hin, was sich auch aus der Analyse der Zykluslänge vor und nach Diät ergibt. Die für Wildtyp-Mäuse und *SCP2/SCPx*-defiziente Mäuse unter Normaldiät gemessene Zykluslänge von 100 ms veränderte sich drastisch unter der Phytoldiät bei den *knockout*-Mäusen auf über 300 ms, so dass hier von einem sinusbradykarden Rhythmus gesprochen wird, der neben den anderen Defekten mutmaßlich verantwortlich für das Versterben der Tiere gemacht werden konnte. Solche Veränderungen, wie bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät, traten bei den Wildtyp-Mäusen nicht auf. Reizleitungs- oder Erregungsrückbildungsstörungen wurden bei den Wildtyp-Mäusen vor und unter Diät nicht registriert. Die Zykluslänge von 100 ms blieb unter der Phytoldiät konstant bei diesen Mäusen (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Oberflächen-EKG-Parameter von Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) und SCP2/SCPx-defizienten Mäusen (SCP -/-) vor und nach einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol über einen Zeitraum von 18 Tagen. A) Reizleitung von den Vorhöfen auf die Ventrikel;  $PR_{(Q)}$ -Intervall B) Erregungsausbreitung in den Ventrikeln;  $R_{(Q)RS}$ -Intervall C) Erregungsrückbildung;  $R_{(Q)T_0}$ -Intervall D) Zykluslänge.**

Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für C57Bl/6 n=19-34 Versuchstiere und SCP -/- n=22 Versuchstiere.

n.s. keine Signifikanz zwischen den gepaarten Proben.

\* ( $p < 0,05$ ); # ( $p < 0,01$ ); ## ( $p < 0,001$ ).

Vor der Diät fanden sich, außer in dem Intervall für die Zykluslänge, keine Unterschiede in den EKG-Parametern zwischen den Wildtyp-Mäusen und den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen. Unter der Diät verlängerten sich alle EKG-Intervalle nur bei den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen, während die EKG-Intervalle bei den Wildtyp-Mäusen unverändert blieben.

Um zu überprüfen, ob die Reizleitungsstörungen der elektrokardiographischen Aufzeichnung durch die Anästhesie und den Lagetyp der Mäuse bei der Abnahme der Elektrokardiogramme an den Extremitäten bestimmt wird, wurde das System der elektrokardiographischen Aufzeichnung an sich frei bewegenden Mäusen, mittels der Telemetrie, angewandt.

### 3.4 Telemetrische Aufzeichnung des Elektrokardiogramms bei freilaufenden Mäusen

#### 3.4.1 Überprüfung der Transmitter-Implantation

Vor Beginn der telemetrischen Versuche musste sichergestellt werden, dass die Elektroden der Transmitter an ihren vorgesehenen Orten sitzen. Dazu wurden die Mäuse mittels eines Röntgenapparates durchleuchtet. Die Abbildung 10 zeigt den korrekten Sitz eines Transmitters 2 Wochen nach der Implantation.



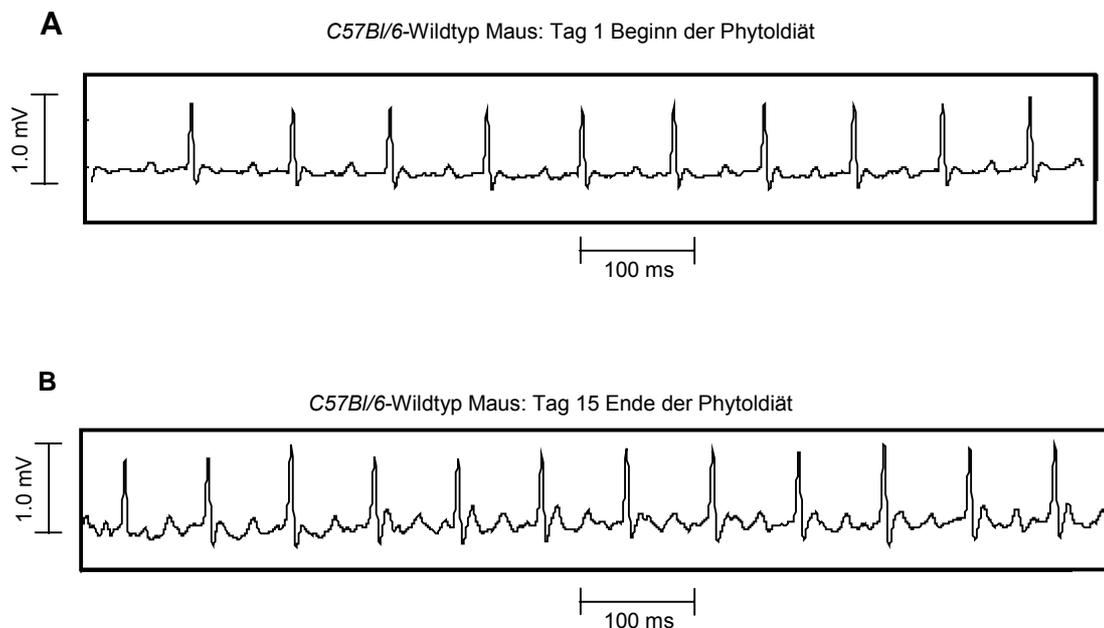
**Abbildung 10: a.P.-Röntgenbild einer Maus mit implantiertem Transmitter.** Der Transmitter ist abdominal korrekt implantiert und leicht zur rechten Hüfte verschoben. Die Kabel für die Ableitung des Elektrokardiogramms führen zur rechten Schulter und zur linken Hüfte der Maus, das Elektrokardiogramm wird so entsprechend der II. Ableitung nach *Einthoven* aufgezeichnet.

Nach erfolgter Überprüfung der Lage des Transmitters wurden die Mäuse für die weiteren Versuche zur telemetrischen Datenerfassung eingesetzt.

### 3.4.2 Telemetrisch erfasstes Elektrokardiogramm einer *C57Bl/6*-Wildtyp-Maus vor und nach einer Phytoldiät

Die folgenden Abbildungen zeigen die telemetrisch erfassten Elektrokardiogramme von *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen vor und während einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol.

Um Einflüsse der für die Implantation des Transmitters notwendigen Operation auf die telemetrischen Daten ausschließen zu können, wurden die Mäuse erst nach Erreichen ihres Ausgangsgewichts mit der 0,5 mg/g Phytol enthaltenen Diät gefüttert und die Daten aufgezeichnet.

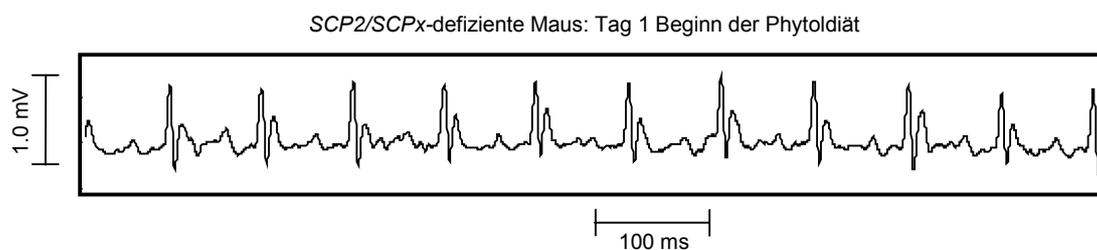


**Abbildung 11: EKG-Ausschnitte aus einem Langzeit Elektrokardiogramm mit telemetrischer Abnahme bei einer *C57Bl/6*-Wildtyp-Maus vor und unter einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol.** Tag 1 (A) u.15 (B) geben die Zeitpunkte der Aufzeichnung des EKGs während des Fütterungszeitraumes wieder. Es fanden sich keine Unterschiede im Rhythmus, der Zykluslänge und den Intervallen für die De- und Repolarisationsphasen des Herzens.

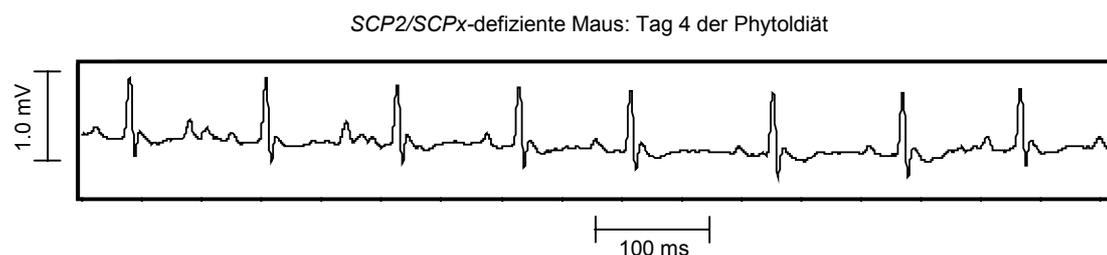
Wie im Vergleich der Abbildung 11 A zu 11 B zu erkennen ist, zeigten sich keine außergewöhnlichen Veränderungen des Elektrokardiogramms einer *C57Bl/6*-Wildtyp-Maus nach einer 15tägigen Phytolfütterung (B) im Vergleich zu der Aufzeichnung des EKGs vor der Phytoldiät (A).

### 3.4.3 Verlauf eines telemetrisch erfassten Elektrokardiogramms einer *SCP2/SCPx*-defizienten Maus vor und unter Diät mit 0,5mg/g Phytol für einen Fütterungszeitraum von 15 Tagen

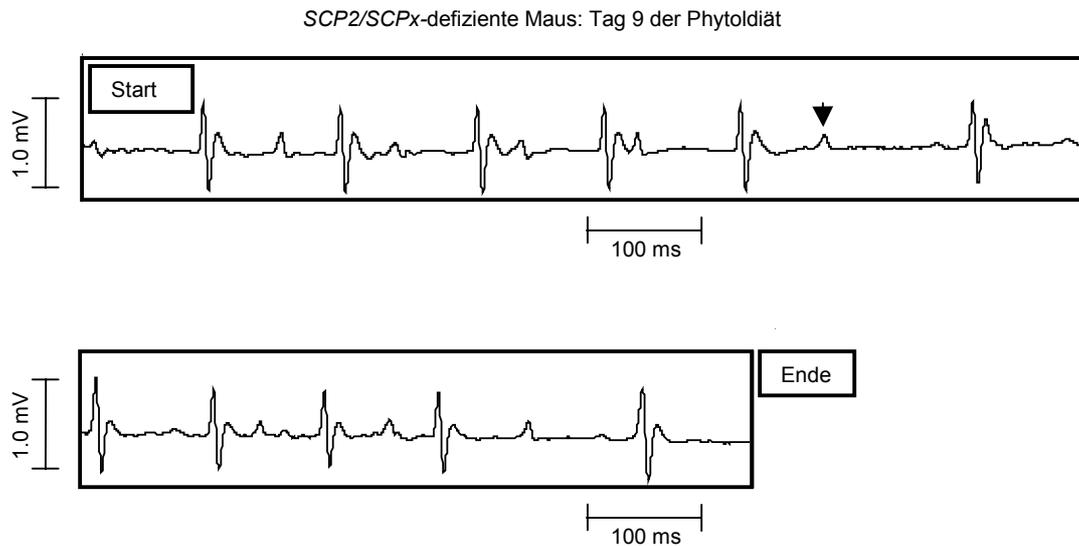
Im Gegensatz zu dem oben gezeigten Elektrokardiogramm einer Wildtyp-Maus zeigten sich, wie auch schon in der Auswertung der Oberflächenelektrokardiogramme zu entnehmen ist, massive pathologische Veränderungen einzelner Parameter im telemetrisch aufgezeichneten Elektrokardiogramm der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus unter einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol.



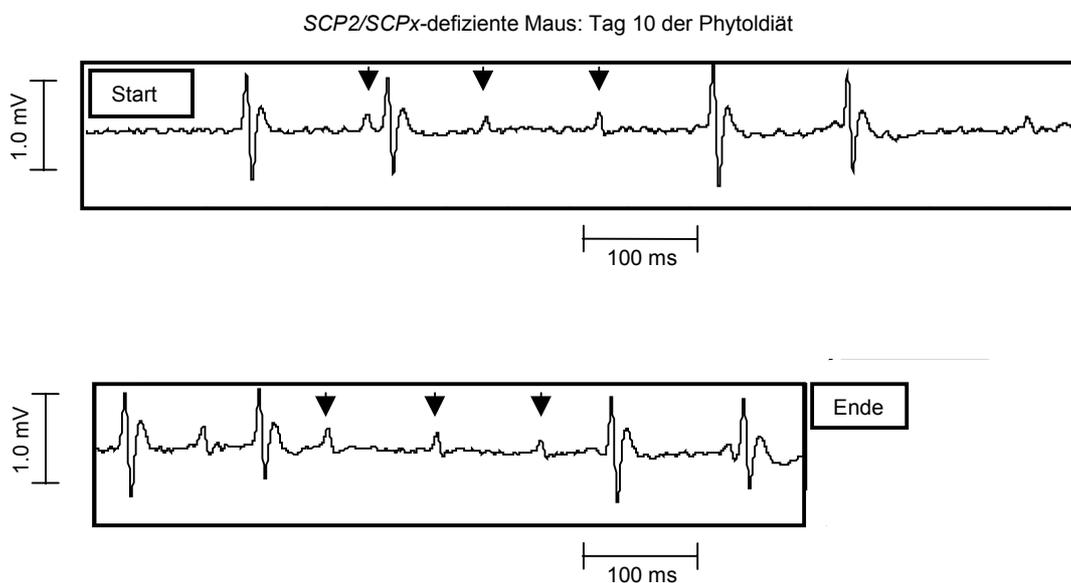
**Abbildung 12:** Tag 1 vor Beginn der Diät. Das EKG der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus entspricht dem normalen EKG-Befund einer Wildtyp-Maus.



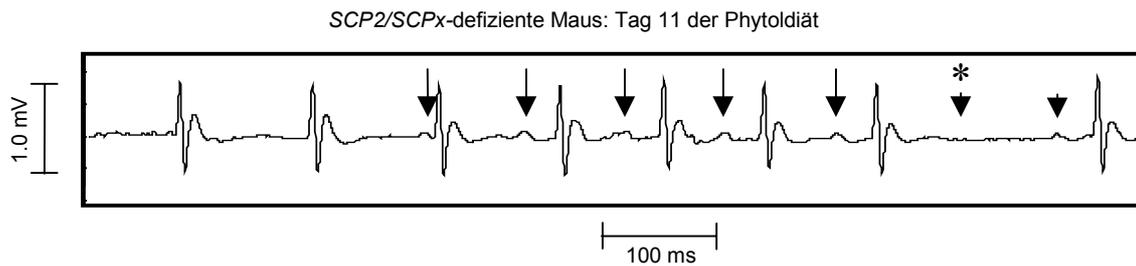
**Abbildung 13:** Tag 4 der Diät. Im Gegensatz zum Ausgangs-EKG (Abb. 12) sind Auffälligkeiten, wie Bradykardie, verbreiterte T-Wellen, und eine leichte Verbreiterung des Kammerkomplexes zu erkennen.



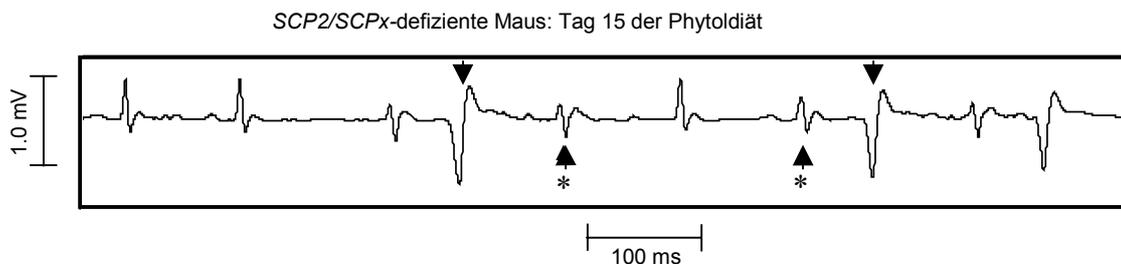
**Abbildung 14: Tag 9** der Diät. AV-Block II° (Wenckebach) charakterisiert durch die Zunahme des  $PR_{(Q)}$ -Intervalls mit Überleitungsblockierung der Vorhoferregung auf die Ventrikel (Pfeil: P-Welle ohne nachfolgenden Kammerkomplex). Verlängerte Repolarisationsphase als Ausdruck einer erhöhten und verbreiterten T-Welle, fortschreitende Bradykardie, verbreiteter Kammerkomplex.



**Abbildung 15: Tag 10** der Diät. Die Pfeile markieren das Ereignis kompletter AV-Blöcke, AV-Block III°. Es liegt eine vollständige Unterbrechung der Vorhof-Kammer-Leitung zugrunde, Vorhöfe und Kammern sind dissoziiert. Die T-Welle ist stark erhöht, die Bradykardie weiter fortgeschritten. Der Kammerkomplex ist verbreitert.



**Abbildung 16: Tag 11** der Diät. Die Pfeile markieren die Vorhoferregung: Es handelt sich um einen Sinu-atrialen Block II° (Wenckebach) mit fortlaufender Verlängerung des PQ-Intervalls und anschließendem Fehlen der P-Welle (markierter Pfeil) und des Kammerkomplexes (Mobitz-Typ I, Wenckebach).

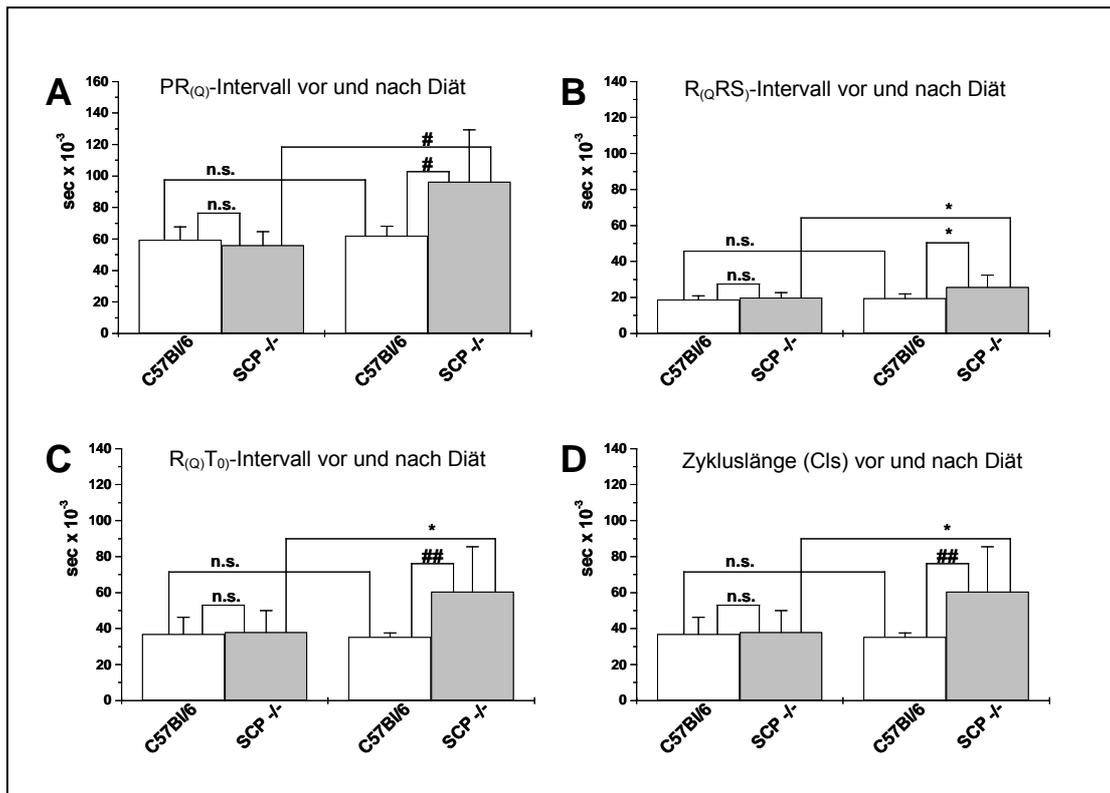


**Abbildung 17: Tag 13** der Diät. Ventrikulärer Ersatzrhythmus (Pfeile), Fusionskomplex aus supra- und ventrikulärer Erregungsfront bei intermittierenden AV-Block III°, eventuelle (im Mäuse-EKG schwer diagnostizierbare) Schenkelblöcke (markierte Pfeile).

Die Auswertung der Elektrokardiogramme ergab signifikante Veränderungen der Reizleitung von der Vorhoferregung auf die Ventrikel und Erregungsausbreitungsstörungen in den Ventrikeln, sowie Sinusbradykardie bei den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen unter der Phytoldiät. Diese Veränderungen im Elektrokardiogramm traten bei den Wildtypmäusen mit und ohne Phytoldiät und bei SCP2/SCPx-defizienten Mäusen unter Normaldiät nicht auf.

### 3.5 Auswertung der telemetrischen Aufzeichnung der Elektrokardiogramme von *SCP2/SCPx*-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Wie auch schon die elektrokardiographischen Untersuchungen im Oberflächen-EKG der mit 0,5 mg/g Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse gezeigten massiven Defekte, wie Reizleitungsstörungen von den Vorhöfen auf den Kammerkomplex und die Erregungsausbreitungsstörungen in den Ventrikeln, wie auch die fortschreitende Sinusbradykardie mit Verlängerung der Zykluslänge, konnten mit den telemetrisch erfassten Elektrokardiogrammen die gleichen Tendenzen der Veränderung der Intervalle für die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse unter der Phytoldiät festgestellt werden. Es konnten deutliche Veränderungen im  $PR_{(Q)}$ -Intervall bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen nach der Diät mit 0,5 mg/g Phytol diagnostiziert werden. Die Länge des  $PR_{(Q)}$ -Intervalls stieg von 40 ms vor der Diät auf über 65 ms unter der Diät an. Die Verbreiterung des  $R_{(Q)}$ RS-Komplexes von 10 ms vor der Diät auf 20 ms unter der Diät weist auf Erregungsausbreitungsstörungen in den Ventrikeln hin. Wie auch schon für die Analyse der Oberflächenelektrokardiogramm-Daten konnte unter der telemetrischen Datenerfassung der Erregungsrückbildung eine Verbreiterung des  $R_{(Q)}T_{(0)}$ -Intervalls auf das Doppelte von 40 ms vor der Diät auf bis zu 80 ms nach der Diät bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen beobachtet werden. Die aus den telemetrischen Daten ermittelte Zykluslänge veränderte sich bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen von ca. 150 ms auf fast 300 ms (s. Abb. 18). Die für die Wildtyp-Mäuse telemetrisch erfassten Elektrokardiogramme wiesen, wie auch schon für die Daten aus der Oberflächen-EKG Registrierung gezeigten Analysen, keine Unterschiede in den Intervallen der Elektrokardiogramme vor und unter der Diät auf (s. Abb. 18).



**Abbildung 18: Langzeit-EKG-Parameter (Telemetrie) von Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) und SCP2/SCPx-defizienten Mäusen (SCP-/-) vor und nach einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol über einen Zeitraum von 18 Tagen. A) Reizleitung von den Vorhöfen auf die Ventrikel; PR<sub>(Q)</sub>-Intervall B) Erregungsausbreitung in den Ventrikeln; R<sub>(Q)</sub>RS-Intervall C) Erregungsrückbildung; R<sub>(Q)</sub>T<sub>(0)</sub>-Intervall D) Zykluslänge.**

Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für C57Bl/6 n=8 Versuchstiere und SCP-/- n=10 Versuchstiere.

n.s. keine Signifikanz zwischen den gepaarten Proben.

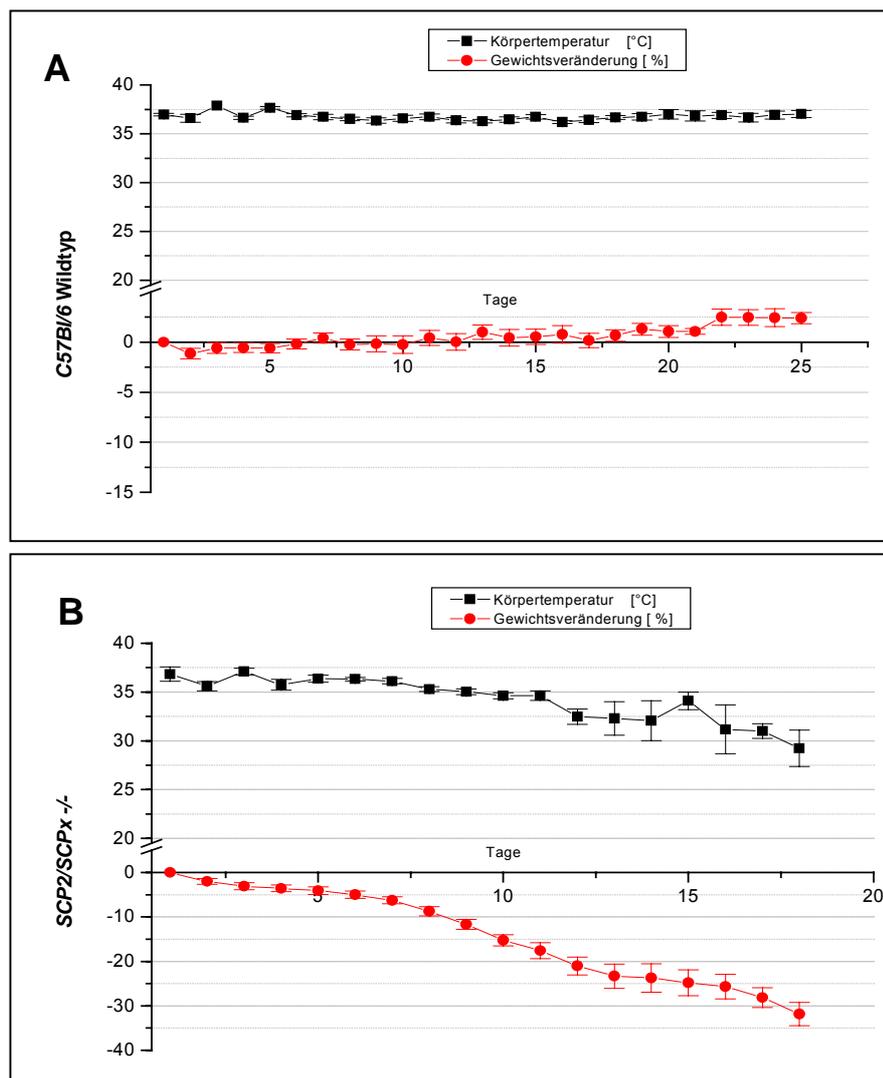
\* (p<0,05); # (p<0,01); ## (p<0,001).

Vor der Diät fanden sich keine Unterschiede in den EKG-Parametern zwischen den Wildtyp-Mäusen und den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen. Unter der Diät verlängerten sich alle EKG-Intervalle nur bei den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen, während die EKG-Intervalle bei den Wildtyp-Mäusen unverändert blieben. Ein Unterschied im Intervall für die Zykluslänge im Vergleich Wildtyp- und SCP2/SCPx-defiziente Mäuse vor der Phytoldiät wurde nicht registriert. Die Auswertungen der anderen Intervalle bestätigen die Messungen der Oberflächen-EKGs.

### 3.6 Telemetrische Aufzeichnung der Körpertemperatur bei Mäusen

Neben den elektrokardiographischen Aufzeichnungen dienten auch die Aufzeichnungen von Körpergewicht und Temperatur als Anhaltspunkte für das Befinden der Mäuse unter Einwirkung der Phytoldiät. In Abbildung 19 ist die Korrelation zwischen Körpertemperatur und Gewicht während einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol bei SCP2/SCPx-defizienten Mäusen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe dargestellt. Wie auch schon in vorangegangenen Fütterungsstudien ge-

zeigt werden konnte [35], verloren die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse bis zu 30% ihres Körpergewichts unter der Phytoldiät. Die Körpertemperatur der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse lag am Ende der Diät 7°C unter der Normalkörpertemperatur von Mäusen von ca. 37°C. Im Gegensatz zu den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen zeigten sich bei den Wildtyp-Mäusen keine Schwankungen hinsichtlich einer Gewichts- oder Körpertemperaturveränderung unter der Phytoldiät (Abbildung 19).

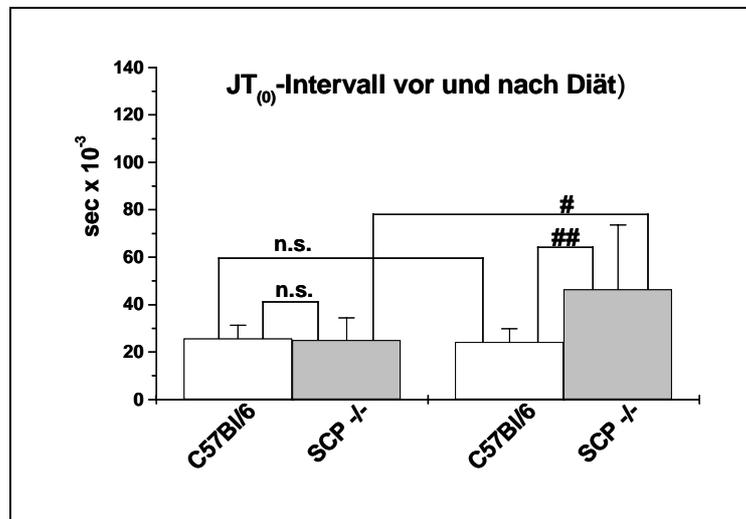


**Abbildung 19: Einfluss der Phytolfütterung (0,5 mg/g) auf die Körpertemperatur und das Gewicht von A) C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen und B) *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen.** Dargestellt ist die Veränderung der Körpertemperatur in [°C] und die Veränderung des Gewichts (prozentual zum Ausgangsgewicht = 100%) der Versuchstiere zum zeitlichen Verlauf. Im Gegensatz zu den konstanten Werten für die Wildtyp-Mäuse in Abbildung A, zeigen sich bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen in Abbildung B deutliche Gewichts- und Körpertemperaturveränderungen unter der Phytoldiät. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für n=15 Versuchstiere. (Die Daten wurden täglich an festgelegten Zeitpunkten erhoben).

### 3.7 Einfluss der Phytolfütterung auf die Repolarisationsphase des Herzens

Um zu überprüfen, ob die Phytol-Diät Einfluss auf die Repolarisationsphase des Herzens von *C57Bl/6*-Wildtyp- oder *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen hat, wurden aus den Oberflächen-Elektrokardiogrammen die Daten für das Intervall  $JT_0$  erhoben.

J gibt dabei das Ende der S-Zacke und  $T_{(0)}$  das Ende der T-Kurve an, somit wird das Intervall über die gesamte Repolarisationsphase des Herzens gemessen. Im Gegensatz zu der Messung des  $R_{(Q)}T_{(0)}$ -Intervalls gehen bei dem Intervall  $JT_0$  keine Veränderungen des Kammer-Komplexes ( $R_{(Q)}RS$ ) mit ein.



**Abbildung 20: Oberflächen-EKG-Parameter ( $JT_0$ -Intervall) von Wildtyp-Mäusen (*C57Bl/6*) und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (*SCP<sup>-/-</sup>*) vor und nach einer Diät mit 0,5 mg/g Phytol über einen Zeitraum von 18 Tagen.** Eine Verdoppelung des  $JT_0$ -Intervalls bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen von ca. 25 ms vor Diät auf über 50 ms nach Diät wurde registriert. Es wurden keine Veränderungen des  $JT_0$ -Intervalls bei den Wildtyp-Mäusen vor und nach Diät registriert.

Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für *C57Bl/6* n=19-34 Versuchstiere und *SCP<sup>-/-</sup>* n=22 Versuchstiere.

n.s. keine Signifikanz zwischen den gepaarten Proben.

\* ( $p < 0,05$ ); # ( $p < 0,01$ ); ## ( $p < 0,001$ ).

Wie auch schon für die anderen Intervalle im Elektrokardiogramm gezeigten auftretenden Veränderungen, wie die Verlängerung der  $PR_{(Q)}$ -,  $R_{(Q)}RS$ -,  $R_{(Q)}T$ -Intervalle und der Zykluslänge, sind signifikante Intervallverlängerungen für das Intervall  $JT_0$ , welches die Repolarisationsphase des Herzens anzeigt, bei den mit 0,5 mg/g Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen zu erkennen.

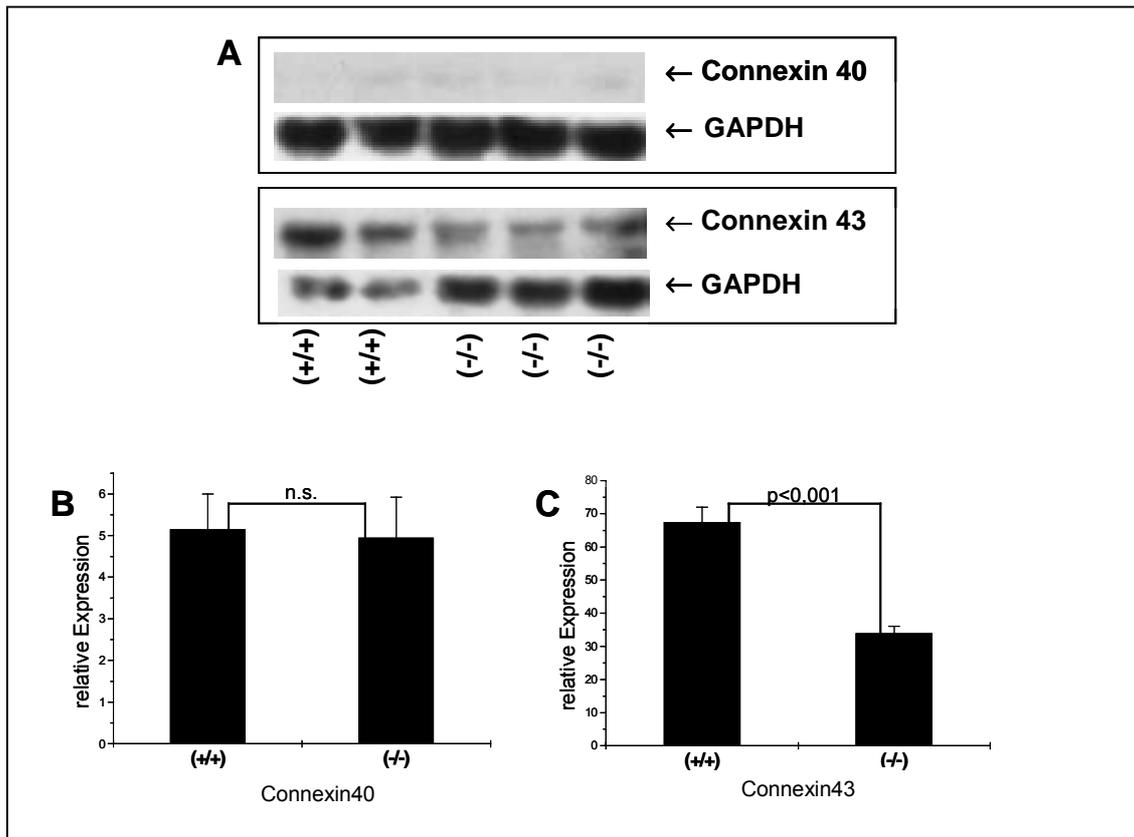
Dies gilt sowohl im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen, als auch im Gruppenvergleich der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen vor und nach der Phytoldiät.

### **3.8 Identifizierung von Expressionsunterschieden der Gene für Connexin40 und Connexin43 im Myokard zwischen *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Phytoldiät**

Die elektrokardiographischen Untersuchungen der mit 0,5 mg/g Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse zeigen einen deutlichen Defekt in der Erregungsausbreitung des Myokards. Sinu-atriale (SA) und Atrio-ventrikuläre (AV) -Blöcke lassen darauf schließen, dass es zu einer massiven Veränderung der Zell-Zell-Interaktion des Myokards kommt. Verantwortlich für diesen Defekt kann unter anderem eine Veränderung in der Regulation, der Synthese oder dem Zusammenbau der Connexine sein. Für die Expressionsuntersuchungen wurde RNS aus dem Herzen von Mäusen isoliert, welche über einen Zeitraum von 15 Tagen mit einer 0,5 mg/g Phytol enthaltenden Diät gefüttert wurden. Für die Sondenherstellung dienten in Plasmiden amplifizierte cDNS-Sequenzen für Connexin40 und Connexin43 des Menschen. Zur Quantifizierung der aufgetragenen RNS wurde die Membran mit der Digoxigenin markierten cDNS des konstitutiv exprimierten Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) rehybridisiert. Alle Northern-Blot-Analysen wurden mit RNS von mindestens drei verschiedenen Mäusen je Genotyp und Fütterung durchgeführt.

Die Northern-Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass es sich bei den Erregungsausbreitungsstörungen im Myokard der gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse um eine Veränderung der Expression der Connexine40/43 handeln könnte, konnte anhand der Northern-Blot-Analysen eine Verminderung der Expression von Connexin43 um 50% im Ventrikelmyokard *SCP2/SCPx*-defizienter Mäuse (-/-) gegenüber im Ventrikelmyokard von *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen (+/+) nach 15tägiger Fütterung mit 0,5 mg/g Phytol festgestellt werden. Es konnten keine Expressionsunterschiede für Connexin40 zwischen den Phytol gefütterten Wildtyp-Mäusen und den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen festgestellt werden.

Im Vergleich zu Connexin43 wurde Connexin40 im Herzen der Wildtyp-Mäuse, wie auch im Myokard der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse nur sehr gering exprimiert. Die doppelte aufgetragene Menge mRNA für Connexin40 (10 µg) im Vergleich zu der aufgetragenen Menge mRNA für Connexin43 (5 µg) zeigte nur schwach ausgeprägte Banden auf dem Röntgenfilm des Northern-Blots. Verlängerte Belichtungszeiten führten zu keinem auswertbaren Ergebnis, da bei den verlängerten Belichtungszeiten die Banden für den internen Standard Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) die Banden für Connexin40 überstrahlten und so eine Auswertung unmöglich machten. Auch bei Auftragung geringerer Mengen des internen Standards konnte keine zufriedenstellenden Ergebnisse ermittelt werden. Die Expressionsanalysen durch Northern-Blots und deren Auswertung für Connexin40 und Connexin43 im Myokard der Phytol gefütterten Mäuse finden sich in der folgenden Abbildung (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Der Einfluss der Phytolfütterung auf die Expression von Connexin40 und Connexin43.** **A) Northern-Blot-Analysen:** Im Vergleich zu dem internen Standard *GAPDH* zeigt sich eine deutliche Reduzierung der Expression von Connexin43 bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (-/-) gegenüber den Wildtyp-Mäusen (+/+). Demgegenüber zeigt die Expression von Connexin40 keine Unterschiede zwischen den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen.

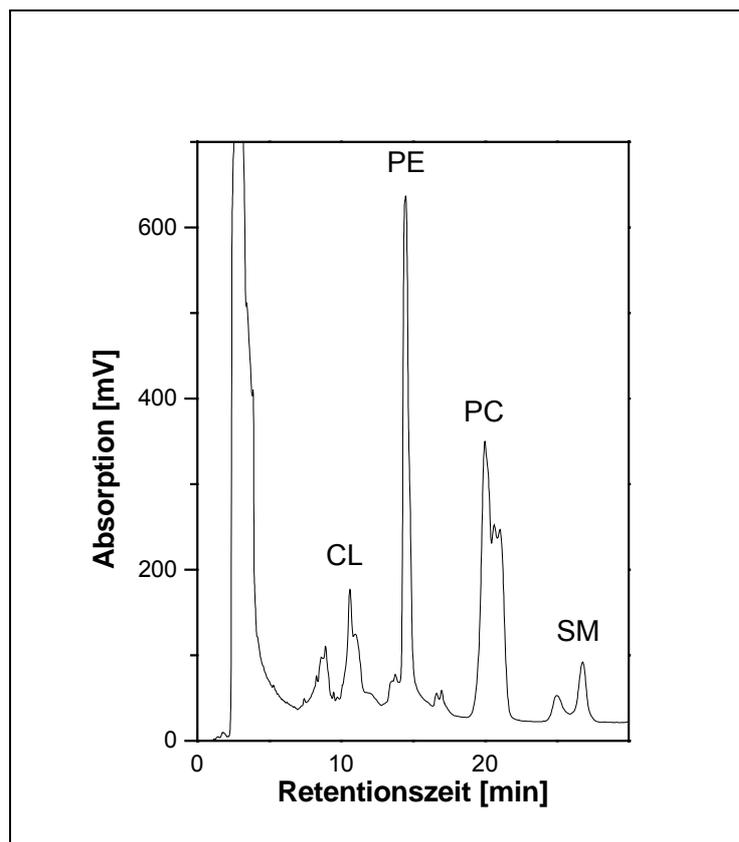
Aufgetragen sind 10µg (für Connexin40) und 5µg (für Connexin43) Poly(A)<sup>+</sup>-RNS aus dem Herzen von n=2 *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen (+/+) und n=3 *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (-/-) nach einer 15tägigen Diät mit 0,5 mg/g Phytol unter Verwendung von cDNS-Sonden, die Connexin40 und Connexin43 (Maus-spezifisch) detektieren. Zur Quantifizierung der aufgetragenen RNS dient die mit Digoxigenin-markierte cDNS des konstitutiv exprimierten Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*).

**B) u. C) Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Northern-Blot-Analysen für Connexin 40 und Connexin 43.** Die Expression von Connexin40 ist im Vergleich beider Gruppen unverändert. Im Gegensatz dazu zeigt sich für Connexin43 bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine Reduzierung um 50 %. Die Expression von Connexin40 ist bei beiden Gruppen deutlich geringer (1/10 von Connexin43).

Als maximale Expression gilt das Signal für *GAPDH*-mRNS (=100%); in Bezug dazu ergibt sich die relative Expression für *Connexin40*-mRNS und *Connexin43*-mRNS für Wildtyp-Maus (+/+) und *SCP2/SCPx*-defizienter Maus (-/-). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung für n=3 Versuchstiere. p<0,001 = Signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen (+/+) und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (-/-) beim T-Test und Mann-Whitney-U-Test.

### 3.9 Quantitative Analysen der Phospholipidfraktionen aus Herzgewebe von Mäusen

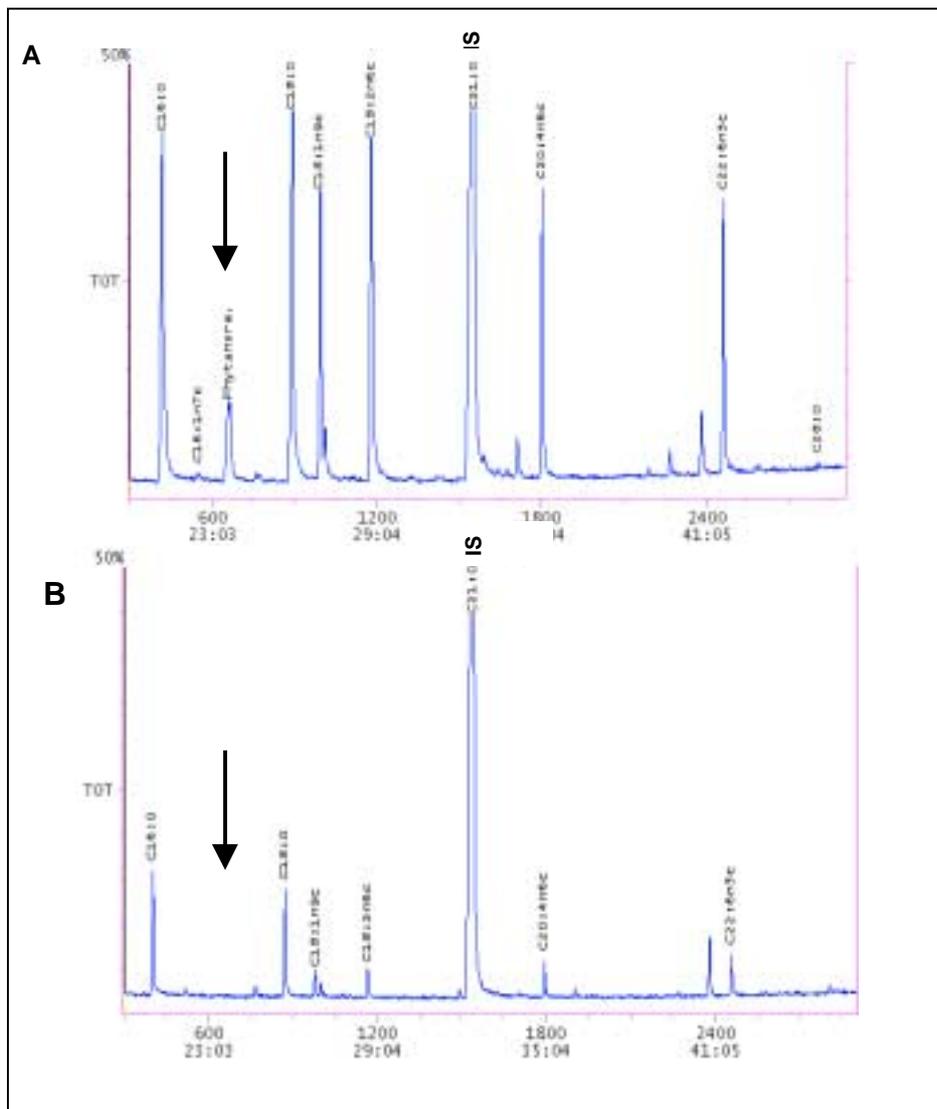
Es ist bekannt, dass der Verlust des Sterol Carrier Protein-2 zu einer fehlenden peroxisomalen Bindung von Phytansäure und damit zu einem verminderten Abbau von Phytansäure durch die peroxisomale  $\alpha$ -Oxidation führt [28]. Gänzlich unbekannt ist der Einfluss der Akkumulation der Phytansäure auf den Herzmuskel. Zur Überprüfung einer Akkumulation von Phytansäure in die Lipidfraktionen von Kardiomyozyten wurde Herzgewebe von Mäusen gewonnen und über eine High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) die verschiedenen Lipidfraktionen fraktioniert.



**Abbildung 22: HPLC-Analyse der Phospholipidfraktionen.** Herzen von *C57Bl/6* Wildtyp-Mäusen (+/+)  $n=6$  und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (-/-)  $n=6$  wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, präpariert und die Fraktionen Phosphatidylethanolamin (**PE**) und Phosphatidylcholin (**PC**) fraktioniert und gesammelt. Die Detektion der Phospholipide erfolgte bei  $A_{193}$  [arb. units]. **CL**=Cardiolipin, **SM**=Sphingomyelin.

### 3.10 Gaschromatographie mit anschließender Massenspektroskopie

Zur Überprüfung einer veränderten Zusammensetzung der Lipidmembranen durch Akkumulation von Fettsäuren wurden die aus der HPLC-Analyse aufgearbeiteten Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) -Fraktionen mittels Gaschromatographie (GC) mit anschließender Massenspektroskopie (MS) zur Quantifizierung untersucht.

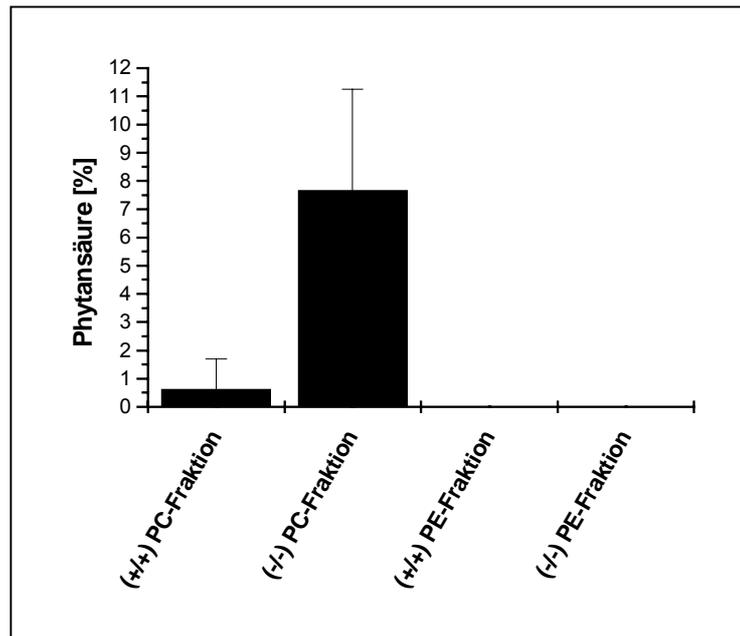


**Abbildung 23: Gaschromatographische/Massenspektrometrische-Analysen der Phosphatidylcholin-Fraktionen aus Mäuseherzen. A)** *SCP2/SCPx*-defiziente Maus nach 15-tägiger Diät mit 5mg/g Phytol. Der Peak nahe 600 (**Pfeil**) zeigt die Akkumulation von Phytansäure, **B)** *C57Bl/6*-Wildtyp-Maus nach 15-tägiger Diät mit 5mg/g Phytol. Eine Akkumulation von Phytansäure wurde nicht (**Pfeil**) oder nur geringfügig detektiert. Die Anreicherung von Pristan säure konnte nicht nachgewiesen werden. C:21 ist der interne Standard (IS) und gilt als Referenz zur Quantifizierung der Fettsäuren; C16:0 Palmitinsäure, C16:1n7c Palmitiinsäure, C18:0 Stearinsäure, C18:2n6c Linolensäure, C18:1n9c Ölsäure C20:4n6c Arachidonsäure, C22:6n3c Docosahexansäure, C26:0 Cerotinsäure, C28:0 Montansäure.

In Übereinstimmung mit der Anreicherung von Phytansäure in Organen und Geweben außerhalb des Herzens von SCP2/SCPx-defizienten Mäusen konnte erstmals auch eine erhöhte Akkumulation von Phytansäure im Herzen dieser Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 23).

### 3.11 Auswertung der Gaschromatographischen Untersuchungen

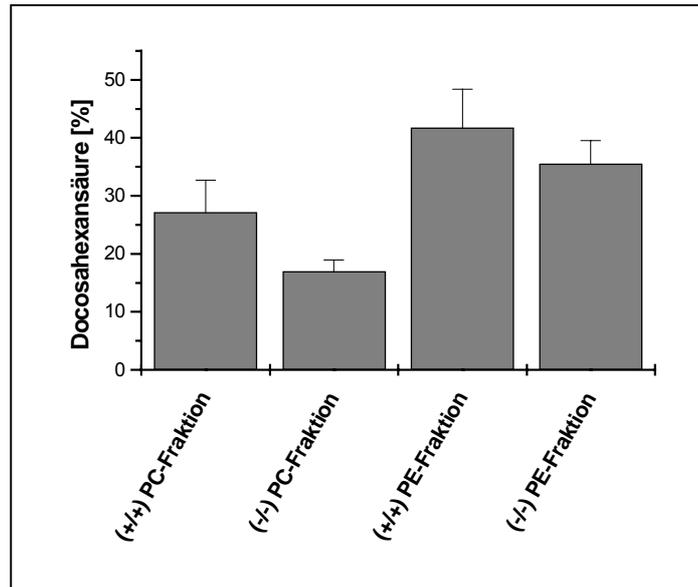
Durch die Phytolfütterung kommt es bei SCP2/SCPx-defizienten Mäusen zu einer 10fach erhöhten Serum-Phytansäurekonzentration im Vergleich zu Kontrollmäusen [35]. Gegenüber den Wildtyp-Mäusen findet man eine 8-12fach erhöhte Akkumulation von Phytansäure in der Phosphatidylcholin (PC)-Lipidschicht der Membran im Myokardgewebe der SCP2/SCPx-defizienten Mäusen. Anreicherungen von Phytansäure in der Phosphatidylethanolamin (PE)-Lipidschicht im Gewebe aus den Herzen dieser Mäuse wurde nicht nachgewiesen. Die durch die  $\alpha$ -Oxidation der Phytansäure um ein C-Atom verkürzte Pristansäure konnte sowohl bei den Wildtyp-Mäusen, als auch bei den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen in den PC- und PE-Fractionen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 24). Dies liegt zum einen an der schnellen Spaltung der Pristansäure durch die an die  $\alpha$ -Oxidation anschließende peroxisomale  $\beta$ -Oxidation und an der Deletion des Sterol Carrier Protein 2-Gens in den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen, welches eine peroxisomale Bindung der Phytansäure verhindert.



**Abbildung 24: Akkumulation der Phytansäure im Herzgewebe von C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen (+/+) und SCP2/SCPx-defizienten Mäusen (-/-) in den Membranlayern Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE).** Die Quantifizierung erfolgte mittels eines internen Standards C21:0 (IS) = 100 %. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für n=6 Versuchstiere.

Eine 8fach erhöhte Akkumulation von Phytansäure konnte in der PC-Fraktion aus Myokardgewebe von SCP/SCPx-defizienten Mäuse (-/-) im Vergleich der PC-Fraktion aus Myokardgewebe von Wildtyp-Mäusen (+/+) nach einer Phytoldiät festgestellt werden. Eine Akkumulation in die PE-Membranlayer des Myokardgewebes beider Gruppen nach Phytoldiät wurde nicht festgestellt.

Im Vergleich zu den SCP2/SCPx-defizienten Mäusen konnte insgesamt bei den Wildtyp-Mäusen eine leicht erhöhte Akkumulation von Docosahexansäure in den Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) –Fraktionen (Membranlayer) des Myokards dieser Tiere festgestellt werden. In der folgenden Abbildung 25 sind diese Unterschiede dargestellt.



**Abbildung 25:** Akkumulation von Docosahexansäure im Herzgewebe von *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen (+/+) und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen (-/-) in den Membranlayern Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE). Die Quantifizierung erfolgte mittels eines internen Standards C21:0 (IS) =100 %. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für n=6 Versuchstiere.

Es ist eine um 30% erhöhte Akkumulation der Docosahexansäure in der PC-Fraktion und eine um 10% erhöhte Akkumulation in der PE-Fraktion der Wildtyp-Mäuse (+/+), im Vergleich zu der Akkumulation von Docosahexansäure in der PC-Fraktion und der PE-Fraktion der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse (-/-) zu erkennen.

### 3.11 Identifizierung von histologischen Veränderungen im Myokardgewebe von *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach Phytoldiät

Um eine eventuelle Veränderung des Connexin-Musters in den Ventrikeln und dem Erregungsleitungssystem zu überprüfen, wurde mittels Immunzytochemie auf Kryoschnitten aus Myokard, der mit 0,5 mg/g Phytol gefütterten Mäusen, die Verteilung und Expression von Connexin43 untersucht.

Die Immunzytochemie für Connexin43 lässt eine deutliche Veränderung des Connexinmusters und der strukturellen Ausbildung der Connexine bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen gegenüber den *C57Bl/6*-Wildtyp-Mäusen nach der Phytoldiät erkennen.

Unterschiede der Connexinmuster für Cx43 bei *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen vor Diät, sind nur gelegentlich zu erkennen, und nur schwach ausgeprägt. Diese führen allerdings, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht zu den pathologischen Veränderungen im Elektrokardiogramm der Mäuse.

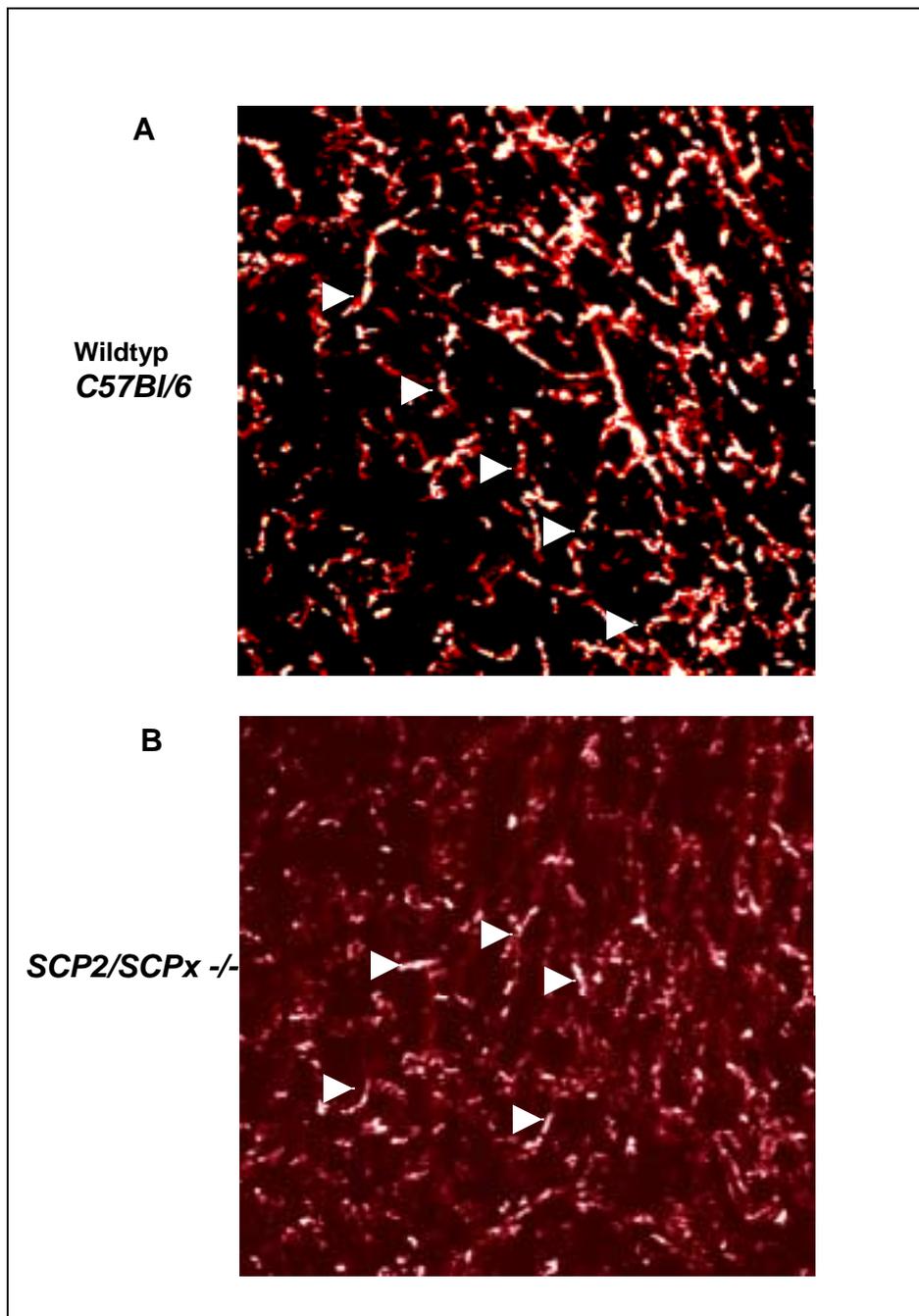
Nach 15tägiger Fütterung der Mäuse wurden die Herzen explantiert, mit einer kalten PBS/Heparin-Lösung gespült, mit Kryolösung ausgespritzt und mittels flüssigem Stickstoff auf  $-80^{\circ}\text{C}$  in Kryolösung gefroren.

Die Markierung und die Detektion der Connexine erfolgte auf 3-5  $\mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitten.

Die Untersuchungen wurden an Herzen von mehreren Versuchstieren durchgeführt und zeigten strukturelle Veränderungen in der typischen Leiterformation und der Größe der „gap-junctions“ bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät. Die „gap-junctions“ für Connexin43 erschienen bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen nach Phytoldiät unregelmäßig und nur punktuell angeordnet. Aufgrund der veränderten Größe gegenüber normal ausgebildeten „gap-junctions“, muss hier von „Mini-gap-junctions“ gesprochen werden. Durch die geringe Größe dieser „Mini-gap-junctions“ scheint der Zellkontakt über den interzellularen Raum (zwischen den Zellen) unterbrochen zu sein.

Die folgende Abbildung (Abbildung 26) zeigt kryokonservierte Gewebeschnitte des Ventrikelmyokards von Wildtyp-Mäusen und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen nach Phytoldiät. Die markierten Stellen weisen auf die markierten „gap-junctions“ bzw. „Mini-gap-junctions“ für Connexin43.

### 3.12 Connexin43 markierte Gewebeschnitte aus dem Myokard von Mäusen



**Abbildung 26: Immunzytochemie zur Identifizierung von Connexin43 auf Kryoschnitten aus dem Myokard der Maus.** Als primärer Antikörper wurde anti Cx43 (Maus gegen Ratte ) verwendet und mit dem fluoreszenzmarkierten sekundär-Antikörper Cy3 (Esel gegen Maus) detektiert. **A)** Ausschnitt aus dem rechten Ventrikel eines Herzens einer C57Bl/6-Wildtyp-Maus, die 15 Tage mit einer 0,5 mg/g Phytol angereicherten Diät gefüttert wurde. Die Pfeile deuten auf die „gap-junctions“, die in einer typischen Leiterformation auf der Myozytenoberfläche angelegt sind; **Abbildung B)** zeigt einen Ausschnitt aus dem rechten Ventrikel einer SCP2/SCPx-defizienten Maus nach 15tägiger Phytol-Diät 0,5 mg/g. Die Pfeile deuten auf die diffus über die Oberfläche verteilten „Mini-gap-junctions“. Eine für „gap-junctions“ typische Leiterformation im Connexinmuster für Connexin43, wie in **Abbildung 26 A)**, ist nicht zu erkennen.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Phytolfütterung auf die Erregungsphysiologie des Myokards von *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen mittels telemetrischer Aufzeichnung des Elektrokardiogramms und anderer Körperfunktionen untersucht werden. Auswirkungen der Anästhesie zur Abnahme des Oberflächen-EKG sollten durch Etablierung der telemetrischen Erfassung von Elektrokardiogrammen ausgeschlossen werden.

### 4.1 Probleme bei Auswertungen von Mäuse-Elektrokardiogrammen

Die Interpretation von Mäuse-EKGs ist extrem schwierig und führt häufig zu Missverständnissen in der Literatur.

Das menschliche EKG hat eine P-Welle, welche die atriale Depolarisation anzeigt. Der folgende QRS-Komplex gibt die Depolarisation des Ventrikels wieder und das ST-Segment korrespondiert mit der Plateau-Phase des Aktionspotentials, wenn das gesamte Herz depolarisiert ist. Die Repolarisationsphase wird durch die T-Welle angezeigt. Durch das spezialisierte Erregungsleitungssystem kommt es zu einer fast gleichzeitigen Erregung beider Ventrikel. Dabei ist die Länge des Intervalls QRS  $<100$  ms, während das QT-Intervall  $\sim 400$  ms beträgt. Veränderungen des QT-Intervalls signalisieren Veränderungen des Aktionspotentials. Reizleitungsstörungen im Ventrikel (QRS-Komplex) können leicht von Repolarisationsstörungen (QT-Intervall) im Oberflächen-EKG abgegrenzt werden.

Das Mäuse-EKG zeigt auch eine P-Welle und einen ähnlichen Kammerkomplex ( $R_{(Q)}RS$ ), wie das menschliche EKG. Allerdings lässt sich das ST-Intervall und die T-Welle nur sehr schlecht bestimmen. Studien konnten zeigen, dass sich das Aktionspotential über die Ventrikel bei Mäusen zwischen 5-10 ms ausbreitet [57]. Außerdem besitzt das Aktionspotential der Maus keine ausgeprägte Plateauphase, so dass die Depolarisationsphase in einigen Teilen des Herzens mit der Repolarisationsphase anderer Teile des Herzens parallel verläuft. So kann der Kammerkomplex mit ca. 20 ms und seiner hohen Amplitude nicht nur der Ausdruck der Depolarisation über die Ventrikel sein, sondern er zeigt auch die frühe Phase der Repolarisation an. So kann es sich zum Beispiel bei der Verbreiterung des QRS-Komplexes im Mäuse-EKG um die Folge einer Verände-

rung des Erregungsleitungssystems handeln, oder kann Ausdruck der Verzögerung der Repolarisation sein [58].

Die niedrige Amplitude für das ST-Segment und die T-Welle können entweder Ausdruck der späten Phase der Repolarisation sein oder die Endphase des Aktionspotentials darstellen.

Das Auftreten von atrio-ventrikular-Blöcken (AV-Block) zweiten oder dritten Grades wird in verschiedenen Wildtyplinien mit unterschiedlichen Frequenzen beobachtet, so dass es sich bei einem Auftreten eines AV-Blockes nicht immer um ein pathologisches Ereignis aufgrund einer Erkrankung [59], oder in diesem Fall als Folge der Diät, handeln muss. Es kann allerdings sicher davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit beobachteten AV-Blöcke bei den transgenen Tieren eine Folge der Fütterung mit Phytol sind, da in keinem Fall eine AV-Blockierung bei den Wildtyp-Mäusen ohne oder unter Phytoldiät zu beobachten war, und sich auch die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse kardiologisch unauffällig unter Normaldiät verhielten. Es ist also davon auszugehen, dass sich der genetische Hintergrund *C57/B16* für das transgene Mausmodell *SCP2/SCPx* *-/-* nicht auf die pathologischen Befunde des EKGs auswirkt [58].

#### 4.2 Der plötzliche Herztod

Der plötzliche Herztod tritt beim Menschen häufig nach struktureller Veränderung des Myokards ein und ist verbunden mit Tachykardie und ventrikulärem Flimmern [60]. Frühsterblichkeit und Arrhythmien sind bei transgenen Mausmodellen und bei *knockout*-Mäusen keine Seltenheit. Dies kann zu der Vermutung führen, dass ventrikuläre Tachyarrhythmien den plötzlichen Herztod bei Mäusen predisponieren [58]. Es wird aber immer deutlicher, dass die meisten transgenen oder *knockout*-Mäuse nicht an einer ventrikulären Tachykardie oder durch Kammerflimmern versterben. Auffällig ist, dass Mausmodelle mit einer Störung für Connexin43 eine verlangsamte Erregungsausbreitung zeigen, die durch den Verlust des interzellularen Kontaktes, und weniger durch die verminderte Erregbarkeit der Myokardzellen zu erklären ist [61]. Bei diesen Mausmodellen zeigten sich Erregungs-ausbreitungsstörungen, die zu AV-Blöcken und SA-Blöcken führten, und eine Erklärung für den plötzlichen Herztod darstellen können [60], [62]. Diese Erkenntnis stützt die Ergebnisse der RNS-

Expressionsanalysen und der Immunzytochemie dieser Arbeit, welche zeigen, dass es unter der Phytolfütterung bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen zu einer verringerten Expression und Veränderung des Connexinmusters und der Größe für Connexin43 kommt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den in diesem Mausmodell beobachteten elektrophysiologischen Ereignissen, die die Sinusknoten-Funktion und die Reizleitung beeinträchtigen und zu AV-Blöcken und SA-Blöcken bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät führen. Diese pathologischen Veränderungen der Erregungs-ausbreitung könnten Ursache für den plötzlichen Herztod sein.

### 4.3 Auswirkungen einer verringerten Expression der Connexine

#### 4.3.1 Connexin40

Es ist bekannt, dass das Ausschalten des Gens für Connexin40 bei Mäusen zu einer Verringerung der Erregungsausbreitung in den Vorhöfen des Myokards führt [63]. Immunhistologische Studien konnten zeigen, dass Connexin40 hauptsächlich im atrialen Myokard und dem HIS-Purkinje-System exprimiert werden [64], [65], [66].

Die ventrikuläre Erregungsausbreitung ist bei der *Connexin40-knockout*-Maus nicht gestört. Im Elektrokardiogramm unterscheiden sich die *Cx40-knockout*-Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen durch Verbreiterung der P-Welle und einer Verbreiterung des PR-Intervalls. Diese Veränderungen sind Ausdruck für atrio-ventrikuläre Dysfunktionen [67], [68], [69]. Die Verbreiterung des PR-Intervalls ist wahrscheinlich Ausdruck der verminderten Erregungsausbreitung über den AV-Knoten und der Veränderung des Erregungsleitungssystems. Studien ergaben, dass die Deletion von Connexin40 keinen Effekt auf die Expression anderer Connexine oder deren Struktur ausübt und auch die Gesamtstruktur des Herzens nicht verändert wird [68], [69].

Zusätzlich ist eine Verbreiterung des  $R_{(Q)}RS$ -Komplexes bei den *Cx40-knockout*-Mäusen zu beobachten, was an sich ungewöhnlich ist, da Connexin40 nicht im arbeitenden Ventrikel des Myokards exprimiert wird. Anscheinend übt das Ausschalten oder eine verringerte Expression von Connexin40

doch Einfluss auf die ventrikuläre Erregung aus. Diese Erkenntnis kann nur über die beeinträchtigte Funktion des spezifischen Erregungsleitungssystems erklärt werden, da es durch einen Schenkelblock zu einem verbreiterten  $R_{(Q)}$ RS-Komplexes kommen kann. Die Erregungsausbreitung über die HIS-Bündel wird allerdings durch das Ausschalten von Connexin40 nicht sehr beeinträchtigt. Über Connexin45 wird hier der Verlust von Connexin40 reduziert, so dass es zu keiner messbaren Veränderung der Erregungsausbreitung über die His-Bündel bei den *Cx40-knockout*-Mäusen kommt [64]. Deshalb scheinen die beobachteten pathologischen Veränderungen unter der Phytoldiät bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen durch die Beeinträchtigung der „gap-junctions“ für Connexin43 zu kommen.

#### 4.3.2 Connexin43

Wie im Kapitel 4.2 beschrieben, entsteht ein massiver Eingriff in die Erregungsausbreitung des Herzens durch die Veränderung der Expression von Connexin43 und deren Struktur. Diese Tatsache wird schon daraus ersichtlich, dass im Gegensatz zu *Connexin40-knockout*-Mäusen, *Connexin43-knockout*-Mäuse nicht überlebensfähig sind. Bei einer Null-Deletion von Connexin 43 kommt es zu massiven Entwicklungsstörungen der Knochenbildung, den Atmungsorganen und des Herzens [70], [71]. Als Konsequenz aus diesen Entwicklungsstörungen sterben die Mäuse direkt nach der Geburt an Asphyxie [72], [73]. Erkenntnisse über die Funktion von Connexin43 konnten allerdings mit einem alternativen Mausmodell gemacht werden [74]. Dabei handelt es sich um ein heterozygoten Modell, welches beide Allele für Wildtyp und Connexin43-knockout besitzt. Bei diesem Modell wird die Expression von Connexin43 auf 50% gegenüber den Wildtyp-Mäusen gesenkt [75], [76]. Ein ähnlicher Effekt stellte sich auch bei der Phytolfütterung der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse ein, bei denen eine um 50% verminderte Expression für Connexin43 gegenüber den Wildtyp-Mäusen ermittelt wurde. Die Verminderung der Expression von Connexin43 führt im Myokard der heterozygoten *Connexin43-knockout* Mäuse, wie auch im Myokard der *SCP2/SCPx*-defizienten-Mäuse unter Phytoldiät, zu einer Verlangsamung der Erregungsausbreitung über die Ventrikel. Diese Beobachtung beruht auf der interzellularen Entkopplung der Kardiomyozyten.

Bei Untersuchungen der Monophasischen Aktionspotentiale (MAPs) am isolierten Herzen von mit Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen in der Langendorff-Apparatur konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Mausmodellen gemessen werden [persönliche Mitteilung von Frau Dr. L. Fabritz]. Das deutet darauf hin, dass die Summe der Gesamtionenkanäle in keinem relevanten Ausmaß betroffen ist. Diese Aussage stützt zusätzlich die Vermutung, dass eine Beeinflussung der Ionenkanäle der Kardiomyozyten der *SCP2/SCPx*-defizienten-Mäuse unter Phytoldiät nicht die Ursache für die Reizleitungsstörungen des Myokards sind.

#### 4.4 Analysen der Oberflächen-EKG Auswertungen

Bei der Oberflächenelektrokardiologischen Charakterisierung der „*knockout*“-Mäuse konnte beobachtet werden, dass der Phänotyp der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus unter Standarddiät keine oder nur geringe Veränderungen gegenüber dem Wildtyp zeigt. Die im Oberflächen-Elektrokardiogramm gemessene Verlängerung der Zykluslänge unter Standarddiät bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen kann als solche nicht als pathologisch betrachtet werden, da diese Veränderung bei den telemetrisch aufgezeichneten Elektrokardiogrammen nicht mehr auftritt. Beeinträchtigende Faktoren können hier die Verabreichung der Anästhetika darstellen. In Versuchen mit verschiedenen „*knockout*“-Mausmodellen konnte festgestellt werden, dass die Mäuse je nach Gendefekt unterschiedlich auf die Gabe der Anästhetika reagieren. Dadurch ist es schwierig, gleiche Narkotisierungsbedingungen zwischen den verschiedenen Mausmodellen zu schaffen. Bei gleicher Gabe der Anästhetika bei Wildtyp-Mäusen und *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen ist es so zu einer tieferen Narkotisierung und Relaxierung der „*knockout*“-Mäuse gekommen, welches sich auf eine niedrigere Herzfrequenz und einer Verlängerung der Zykluslänge ausgewirkt hat.

#### 4.5 Analysen der telemetrisch erfassten Elektrokardiogramme

Durch die Erfassung der Elektrokardiogramme mittels Telemetrie konnten die beschriebenen Einflüsse der Narkotisierung ausgeschaltet werden, so dass nun der Vergleich verschiedener Mausmodelle möglich ist. Wie im Ergebnisteil zu sehen ist, bestehen zwischen dem Phänotyp der *SCP2/SCPx*-defizienten Maus und der Wildtyp-Maus keine Unterschiede im Elektrokardiogramm unter Normaldiät.

Unter Verabreichung von Phytol in Form einer Diät mit 0,5mg/g Phytol und der damit verbundenen Erhöhung der Phytansäurekonzentration verändert sich nicht nur der Phänotyp der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse, sondern es kommt auch zu beträchtlichen kardiologischen Dysfunktionen gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Schon die Ergebnisse der Oberflächen-Elektrokardiogramme weisen darauf hin, dass die Akkumulation der Phytansäure einen Einfluss auf das Reizleitungssystem des Herzens bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen hat. Im Gegensatz zu den Wildtypmäusen kommt es bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen zu signifikanten Veränderungen, die sich in der Verbreiterung mehrerer Intervalle abzeichneten. So kommt es zur Verzögerung der Erregungsausbreitung zwischen den Vorhöfen und dem Kammerkomplex, welche in vielen Fällen zur kompletten AV-Blockierung führte. Auch die Verbreiterung des  $R_{(Q)}$ RS-Komplexes und des  $R_{(Q)}T_{(0)}$ -Intervalls weisen darauf hin, dass die Akkumulation der verzweigt-kettigen gesättigten Fettsäure (Phytansäure) einen massiven Einfluss auf die Erregung des rechten und des linken Schenkels des Ventrikels hat.

Darauf weisen auch die in der telemetrischen Erfassung der Elektrokardiogramme registrierten SA-Blockierungen hin. Die SA-Blockierung ist ein Hinweis auf eine Störung der „gap-junctions“. Hierbei handelt es sich um eine verlängerte Leitungszeit zwischen dem Sinusknoten und dem Vorhof, die unter Abnahme des konventionellen EKGs nicht aufgezeichnet wurde. Durch die telemetrische Datenerfassung konnte dieses, teilweise abrupt auftretende Ereignis, dargestellt werden, welches sich über die Verlängerung des AA-Intervalls (PP) und dem folgenden Ausbleiben der P-Zacke darstellt und dann wieder mit der gleichen Zykluslänge fortfährt. Das bedeutet, dass der Sinusknoten weiter-

schlägt, aber die Überleitung („gap-junctions“) zum Vorhof (P) gestört ist. Die Erregung des Sinusknoten (Aktionspotential über Kalium-Einstrom und Natrium-Ausstrom) ist wahrscheinlich nicht behindert oder blockiert (Ergebnisse der MAP-Messungen).

#### **4.6 Telemetrisch erfasste Körpertemperatur und Messung des Körpergewichts**

Die durch die telemetrische Datenerfassung erhobenen Werte für die Körpertemperatur der Mäuse unter Phytoldiät und die Erfassung des Körpergewichts, könnten ein Hinweis darauf sein, dass die kardiologischen Dysfunktionen der *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse durch Unterkühlung oder durch die starke Gewichtsabnahme zustande kommen. Dagegen sprechen allerdings mehrere Tatsachen. Zum einen zeigen echokardiologische Untersuchungen an *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät, dass sich die Größe und Morphologie des Herzens nicht verändert [persönliche Mitteilung von Dr. J. Stypmann] und so das Herz eigentlich im Vergleich zur Abnahme des Körpergewichts an Leistung gewinnt. Des Weiteren wurde die täglich aufgenommene Futtermenge kontrolliert, wobei die *SCP2/SCPx*-defizienten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar am Anfang der Phytoldiät mehr Futter aufnehmen und sich die aufgenommene Menge an Futter während der Diät der Kontrollgruppe angleich. Eine weitere Tatsache, dass die in dieser Arbeit dargestellte Abnahme des Körpergewichts und der Körpertemperatur und die dargestellten kardiologischen Dysfunktionen Effekte der Einlagerung der Phytansäure in die Phospholipidmembranlayer sind, zeigen Untersuchungen an *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen, die abwechselnd mit einer Phytol- und einer Standarddiät gefüttert wurden. Bei diesen Mäusen kam es im Vergleich zu den durchgehend gefütterten *knockout*-Mäusen zu einer geringeren Abnahme des Körpergewichts und der Körpertemperatur als unter einer durchgehenden Phytoldiät, dabei folgen die beobachteten Veränderungen des Elektrokardiogramms den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Dadurch ist ein Mangel an Energieversorgung des Herzens durch eventuelle Unterernährung, oder eine Unterkühlung als Ursache für die Reizleitungsstörungen des Myokards bei den Mäusen auszuschließen.

#### 4.7 Gaschromatographische Analyse der Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Fractionen

Durch die Gaschromatographische Analyse konnte festgestellt werden, dass sich nicht nur die Serumkonzentration der Phytansäure bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät erhöht [35], sondern es auch zu einer Einlagerung der Phytansäure in die Phosphatidylcholin-Membranlayer der Kardiomyocyten bei diesen Mäusen kommt. Die eingelagerte Phytansäure kann so pharmakologische Effekte auf die Bildung und Funktion der „gap-junctions“ (Connexine) ausüben [54].

Wie in dieser Arbeit dargestellt, kommt es durch erhöhte Akkumulation von Phytansäure und Einlagerung in die Membranlayer der Kardiomyocyten zu einer verringerten Expression von Connexin43, und zu einem veränderten Connexinmuster für Connexin43 bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen unter Phytoldiät im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

Zusätzlich kann die eingelagerte verzweigt-kettige gesättigte Phytansäure einen negativen Einfluss durch Verdrängung ungesättigter Fettsäuren und den dadurch fehlenden Oxidationsschutz auf die Myokardzelle haben.

Die leicht erhöhte Konzentration an Docosahexansäure in den Lipidmembranen bei den Wildtypmäusen gegenüber den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen könnte eine Schutzwirkung gegen die leicht erhöhte Akkumulation der Phytansäure darstellen. Bei Experimenten an isolierten Kardiomyocyten zeigte eine schon leicht erhöhte Konzentration an PUFAs eine Stabilisierung der elektrischen Potentiale durch Veränderung der Leitungsfähigkeit von spezifischen Ionenkanälen. Diese Eigenschaft führt mit zur Prävention von malignen ventrikulären Arrhythmien bei [88]. Auch epidemiologische Studien konnten zeigen, dass eine Diät speziell mit Eicosapenten- und Docosahexansäure einen arrhythmogenen Schutz auf das Herz ausübt [13]. Dadurch ist zu erklären, dass die Effekte der eingelagerten Phytansäure in die Phosphatidylcholinschicht der Membranlayer der Kardiomyocyten bei den Wildtyp-Mäusen durch die erhöhte Konzentration der Docosahexansäure aufgefangen werden und es so unter der Phytoldiät zu keinen auffälligen EKG-Veränderungen kam.

#### 4.8 Immunzytochemie

Die veränderte Größe und das veränderte Connexin-Muster für Connexin43 im Ventrikel von den mit Phytol gefütterten *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen führt wahrscheinlich zu den interzellularen Impulsstörungen zwischen den Kardiomyocyten. Die Ausbildung von „Mini-gap-junctions“ und die Zerstörung der Leiterstruktur der „gap-junctions“, ist vermutlich als Folge der Einlagerung der Phytansäure in die Lipidmembranlayer der Kardiomyocyten zu sehen.

#### 4.9 Ausblicke

Einen eventuellen Hinweis zur Erklärung einer Beeinflussung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Myokardzelle stellt die Entdeckung der Toxizität der Phytansäure dar. Diese Fettsäure bindet an den „Retinoid X Receptor alpha“ ( $RXR\alpha$ ), einen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor aus der Familie der Kernhormonrezeptoren, und aktiviert ihn dadurch [77], [78]. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktordimers kommt es zur Aktivierung zahlreicher Gene des Lipidmetabolismus. In Mäusen, die  $PPAR\alpha$  über-exprimieren konnte unter Verabreichung einer Diät mit gesättigten Fettsäuren, eine starke Veränderung des Energiemetabolismus festgestellt werden, welcher zu Kardiomyopathien, wie ventrikuläre Hypertrophien, einer links ventrikulären Kammerdilatation und ventrikulären Dysfunktionen bei den Mäusen führte [79]. Auch in diesem Modell wird spekuliert, dass kontraktile Dysfunktionen des Myokards durch Einlagerung der verabreichten Fettsäuren in die Lipidmembran der Kardiomyocyten zustande kommen. Studien bei diabetischen Mäusen konnten diese These bestätigen [80], [81].

In einer Folgearbeit mit einem Doppelknockout-Mausmodell für *SCP2/SCPx* und  $PPAR\alpha$  soll der Einfluss von Phytansäure auf die Aktivierung des  $RXR\alpha/PPAR\alpha$ -Heterodimers und die eventuell daraus entstehenden Schädigungen des Myokards ausgeschlossen werden.

Die Reizleitungsstörungen bei den *SCP2/SCPx*-defizienten Mäusen können dann nur noch durch eine Verringerung der Expression und die Veränderung der Größe oder des Musters der Connexine durch die Einlagerung der Phytan-

säure in die Phosphatidylcholin-Schicht der Membran der Kardiomyocyten hervorgerufen werden.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die verzweigt-kettige gesättigte Fettsäure Phytansäure, die sich im Phospholipidmembranlayer der Kardiomyocyten der *SCP2/SCPx*-defizienten-Mäuse anreichert, einen direkten Einfluss auf die kardiologischen Funktionen ausüben könnte, zeigen mehrere Studien über Fettsäuren.

In diesen Studien konnte die direkte pharmakologische Intervention der Fettsäuren auf die Funktion der Connexine nachgewiesen werden [54]. Auch epidemiologische Studien über Ernährungsverhalten und Zusammensetzung der vorwiegend aufgenommenen Fettsäuren weisen darauf hin, dass körperliche und besonders kardiologische Funktionen stark durch die Aufnahme der verschiedenen Fette beeinflusst werden können [82], [83], [84].

Über die Erkenntnisse der Beeinflussung der Proteinproduktion und der Assemblierung der „gap-junctions“ (Connexine) durch die Phytansäureeinlagerung in die Membran der Kardiomyocyten sollen Ultrastrukturelle Untersuchungen Aufschluss geben.

Durch die Ergebnisse der MAP-Messungen (monophasisches Aktionspotential) können sterische Behinderungen der Ionenkanäle durch Einlagerung der Phytansäure in die Phospholipidmembran ausgeschlossen werden.

Die Summe der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weist darauf hin, dass die Akkumulation von Phytansäure mit zu dem Ereignis des plötzlichen Herztodes führt. Eventuell kann man damit einen Teil der plötzlichen Todesfälle bei Refsum-Patienten erklären.

Als Maßnahme gegen die plötzlichen Todesfälle bei Refsum-Patienten durch das Ereignis des plötzlichen Herztodes könnte neben der strengen phytolfreien Diät eine Herzschrittmacher-Therapie dienen.

- [1] Bharati S, Lev M. The conduction system findings in sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;5:356-66
- [2] Kuller LH, Cooper M, Perper J, Fisher R. Myocardial infarction and sudden death in an urban community. *Bull NY Acad Med* 1973;49:532-43
- [3] Kishel JC, Virmani R. Pathologic features of sudden cardiac death: an overview. *South Med J* 1987;80:487-93
- [4] Virmani R, Robinowitz M, Mcallister HA. Exercise and the heart. A review of cardiac pathology associated with physical activity. *Pathol Annu* 1985;20Pt:431-62
- [5] Kannel WB, Thomas HE. Sudden coronary death: The Framingham Study. *Ann NY Acad Sci* 1982;382:3-21
- [6] Davies MJ. Pathological view of sudden cardiac death. *Br Heart J* 1981;45:88-96
- [7] Luderitz B, Naumann-d'Alnocourt C, Steinbeck G. Effects of free fatty acids on electrophysiological properties of ventricular myocardium. *Klin Wochenschr* 1976;54:309-313
- [8] Kang JX, Leaf A. Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na<sup>+</sup> channels by directly binding to the channel proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3542-6
- [9] Gudbjarnason S. Prostaglandins and polyunsaturated fatty acids in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1975;7:443-9
- [10] Murnaghan MF. Effect of fatty acids on the ventricular arrhythmia threshold in the isolated heart of rabbit. *Br J Pharmacol* 1981;73(4):909-15
- [11] Billman GE, Hallaq H, Leaf A. Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by omega 3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4427-30
- [12] De Logeril M, Salen P, Defaye P, Mabo P, Paillard F. Dietary prevention of sudden cardiac death. *European Heart J* 2002;23:277-285
- [13] Leaf A, Kang JX. Prevention of cardiac sudden death by N-3 fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Internal Medicine* 1996;240:5-12
- [14] McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:1411-17
- [15] McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion. *Am Heart J* 1988;16:709-17

- [16] McLennan PL. Relative effects of dietary saturated, monoansaturated and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am J Clin Nutr* 1993;57:207-12
- [17] Jouven X, Charles AM, Desnos M, Ducimetiere P. Circulating nonesterified fatty acid level as a predictor for sudden cardiac death in the population. *Circ Res* 2001;104:754-61
- [18] Steinberg D. Refsum disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *McGraw-Hill*, 1995, New York:2351-2370
- [19] Leys D, Petit H, Bonte AC, Millaire A, Fourrier F, Dubois F, Rosseaux M, Ducoux G. Refsum's disease revealed by cardiac disorders [Letter]. *Lancet* 1989 ;1(8638):621
- [20] Klenk E, Kahlke W. Über das Vorkommen der 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure) in den Cholesterinestern und anderen Lipoidfraktionen der Organe bei einem Krankheitsfall unbekannter Genese (Verdacht auf *Heredopathia atactica polyneuritiformis*, Refsum's syndrom). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1964;333:133
- [21] Kahlke W. Refsum-Syndrome, Lipoidchemische Untersuchungen bei 9 Fällen, *Klein Wochenschr* 1964;42:1011
- [22] Jansen GA, Ferdinandusse S, Ijlst L, Muijsers AO, Skjedal OH, Stokke O, Jakobs C, Besley GTN, Wraith JE, Wanders RJA. Refsum disease is caused by mutations in phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat Genet* 1997;17:190-193
- [23] Mihalik SJ, Morell JC, Kim D, Sacksteder KA, Watjins PA, Gould SJ. Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nat Genet* 1997;17:185-189
- [24] Steinberg D, Vroom FQ, Engel WK, Camermeyer J, Mize CE, Avigan J. Refsum's disease, a recently characterized lipidosis involving the nervous system, *Ann Intern Med* 1967;66:365
- [25] Berson EL. Nutrition and retinal degenerations. *Int Ophthalmol Clin* 2000;40(4):93-111
- [26] Bernscherer G, Berenyi E, Karabalyos C, Laszlo A, David Z, Hollody K, Toth EZ. [Refsum disease]. *Orv Hetil* 2000;141(1):31-4
- [27] Mihalik SJ, Rainville Am, Watkins PA. Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. Production of alpha-hydroxyphytamoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur J Biochem* 1995;232:545-551
- [28] Steinberg D, Avigan J; Mize C, Baxter JH. Phytanic acid formation and accumulation in phytol-fed rats. *Fed Proc* 1965;24:290
- [29] Masters-Thomas. Heredopathia atactica polyneuritiformis (Refsum's disease), 1. Clinical features and dietary management. *J Hum Nutr* 1980;34:245

- [30] Masters-Thomas Heredopathia atactica polyneuritiformis (Refsum's disease), 3. Estimation of phytanic acid in foods, *J Hum Nutr* 1980;34:251
- [31] Patton S, Benson AA. Phytol metabolism in the bovine. *Biochem Biophys Acta* 1966;125:22
- [32] Jansen GA, Mihalik SJ, Watkins PA, Moser HW, Jakobs C, Denis S, Wanders RJA. Phytanoyl-CoA-hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid alpha-oxidation in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:205-10
- [33] Casteels M, Croes K, van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Peroxisomal localization of alpha oxidation in human liver. *J Inher Metab Dis* 1997;20:665-73
- [34] Raabe M. Entwicklung einer sterin-Transportprotein 2-und Sterin-Transportprotein x-defizienten transgenen Maus, Erkenntnisse zur Struktur und Funktion von SCP2. *Dissertation* 1995, Universität Münster
- [35] Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters FS, Wirtz KWA, Wanders RJA, Maeda N, Assmann G. Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev* 1998;12:1189-201
- [36] Kannenberg F, Ellinghaus P, Assmann G, Seedorf U. Abberant Oxidation of the Cholesterol Side Chain in Bile Acid Synthesis of Sterol Carrier Protein-2/Sterol Carrier Protein-x Knockout Mice. *J Biol Chem* 1999;274(50):35455-60
- [37] Ellinghaus P, Wolfrum C, Assmann G, Spener F. Phytanic Acid Activates the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) in Sterol Carrier Protein 2-/- Sterol Carrier Protein x-deficient Mice. *J Biol Chem* 1999;274(5):2766-72
- [38] Wouters FS. The non-specific lipid transfer protein and peroxisomal fatty acid  $\beta$ -Oxidation. *Dissertation* 1997, Universität Utrecht, NL
- [39] Frolov A, Cho TH, Billheimer JT, Schroeder F. Sterol carrier protein 2, a new fatty acyl coenzyme A- binding protein. *J Biol Chem* 1996;271:31878-84
- [40] Green CR, Severs NJ. Distribution and role of gap junctions in normal myocardium and in human ischaemic heart disease. *Histochem* 1993;99:105-20
- [41] Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced Content of Connexin43 Gap Junctions in Ventricular Myocardium From Hypertrophied and ischemic Human Hearts. *Circ Res* 1993;88:864-75
- [42] Van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junctions channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 2001;51(2):217-29

- [43] Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg –Fraté H. Secific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:805-17
- [44] White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 1995;6:459-70
- [45] Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, Paul DL. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in ist ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* 1993;4:7-20
- [46] Beblo DA, Wang HZ, Beyer EC, Westphale EM, Veenstra RD. Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin40. *Circ Res* 1995;77:813-22
- [47] Moreno AP, Sáez JC, Fishman GI, Spray DC. Human connexin43 gap junction channels. *Circ Res* 1994;74:1050-57
- [48] Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differentail phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and –deficient cell lines. *J Cell Biol* 1990;111:2077-88
- [49] Laird DW, Puranam KL, Revel JP. Turnover and phphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biophys J* 1991;273:67-72
- [50] Kwak BR, Sáez JC, Wilders R. Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human Connexin43 gap junction channels. *Pflfgers Arch* 1995;430:770-78
- [51] Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H. Immunochemical and elektrophysiologikal characterization of murine connexin40 and –43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol* 1994;64:101-112
- [52] Van Rijen HVM, van Veen AAB, Hermans MMP, Jongsma HJ. Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc Res* 2000;45:941-51
- [53] Veenstra PD, Wang HZ, Beblo DA. Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circ Res* 1995;77:1156-65
- [54] Dhein S. Gap junczion channels in the cardiovascular system: pharmlological and physiological modulation.[Review] *Elsevier Science* 1998;19:229-51
- [55] Cirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem J* 1979;18(24):5294-9
- [55] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J. Molecular cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989

- [56] Nissen HP, Kreysel HW. Analysis of phospholipids in human semen by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983;276(1):29-35
- [57] Baker LC, London B, Choi B-R, Koren G, Salama G. Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse heart promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circ Res* 2000;86:396-407
- [58] London B. Cardiac Arrhythmias: From (Transgenic) Mice to Men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12(9):1089-91
- [59] Nguyen-Tran VT, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB, Ruiz-Lozano P, Barrere-Lemaire S, Kondo R, Norman LW, Gourdie RG, Rahme MM, Feld GK, Clark RB, Giles WR, Chien KR. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell* 2000;102:671-82
- [60] Gutstein DE, Morley GE, Tamoddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman G. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 2001;88:333-39
- [61] Spach MS, Miller W, Geselowitz D, Barr R, Kootsey J, Johnson E. The discontinuous nature of propagation in normal canine cardiac muscle. *Circ Res* 1981;48:39-54
- [62] Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE, Rosenbaum DS. High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin43 deficient mice. *J Cardiovasc Res* 2001;51:681-90
- [63] Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:1380-89
- [64] Coppens SR, Severs NJ, Gourdie RG. Connexin45 ( $\alpha_6$ ) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet* 1999;24:82-90
- [65] Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 1996;18:719-30
- [66] Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci* 1993;105:985-91
- [67] Hagedorff A, Schuhmacher B, Kirchhoff S. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circ Res* 1999;99:1508-15

- [68] Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 1998;8:299-302
- [69] Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristics of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* 1998;8:295-98.
- [70] Cala SE, Scott BT, Jones LR. Intralumenal sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Semin Cell Biol* 1990;1:265-75
- [71] Yasue H et al. Localisation and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circ Res* 1994;90:195-203
- [72] Buyon JP. Congenital complete heart block. *Lupus* 1993;2:291-5
- [73] Orth T, Dorner T, Meyer Zum Buschenfelde KH, Mayet WJ. Complete congenital heart block is associated with increased autoantibody titers against calreticulin. *Eur J Clin Invest* 1996;26:205-15
- [74] Eisenberg CA, Eisenberg LM. Measuring electrophysiological changes in transgenic mouse models of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001;51:630-32
- [75] Guerrero PA, Schuessler RB, Davis LM. Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. *J Clin Invest* 1997;99:32-44
- [76] Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA. High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin43 deficient mice. *Cardiovasc Res* 2001;51:681-90
- [77] Lemotte PK, Keidel S, Apfel CM. Phytanic acid is a retinoid x receptor ligand: *Eur J Biochem* 1996;236:328-33
- [78] Kitareewan S, Burka LT, Tomer KB, Parker CE, Deterding LJ, Stevens RD, Forman BM, Mais DE, Heymann RA, McMorris T, Weinberger C. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell* 1996;7:1153-66
- [79] Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPAR $\alpha$  overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002;109:121-30
- [80] Murthy VK, Shipp JC. Accumulation of myocardial triacylglycerols in ketotic diabetes. *Diabetes* 1977;26:222-29
- [81] Zhou YT et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1784-89
- [82] Katz AM. *Trans-Fatty Acids and Sudden Cardiac Death*. *Circ Res* 2002;105:669-71

- [83] Bonnet D, Martin D, de Lonlay P, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M, Saudubray J-M : Arrhythmias and conduction Defects as Presenting Symptoms of Fatty Acid Oxidation Disorders in Children. *Circ Res* 1999;100:2248-53
- [84] Lemaitre RN, King IB, Raghutnathan TE, Pearce RM, Weinmann S, Knopp RH, Copass MK, Cobb LA, Siscovick DS. Cell Membrane *Trans*-Fatty Acids and the Risk of Primary Cardiac Arrest. *Circ Res* 2002;105:697-701
- [85] Schmidt RF, Thews G. Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 1995;26.Aufl.
- [86] Wehr M. Praktische Elektorkardiographie und Elektrophysiologie des Herzens. *Gustav Fisher Verlag* 1988
- [87] Börger HH. Ekg-Informationen. *Dr Dietrich Steinhoff Verlag* 1978;2.Aufl.
- [88] Leaf A, Kang JX. Prevention of cardiac sudden death by N-3 fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Internal Med* 1996;240:5-12

## 6. Anhang

### 6.1 Berechnung der Körpertemperatur aus den telemetrisch erfassten Signalen

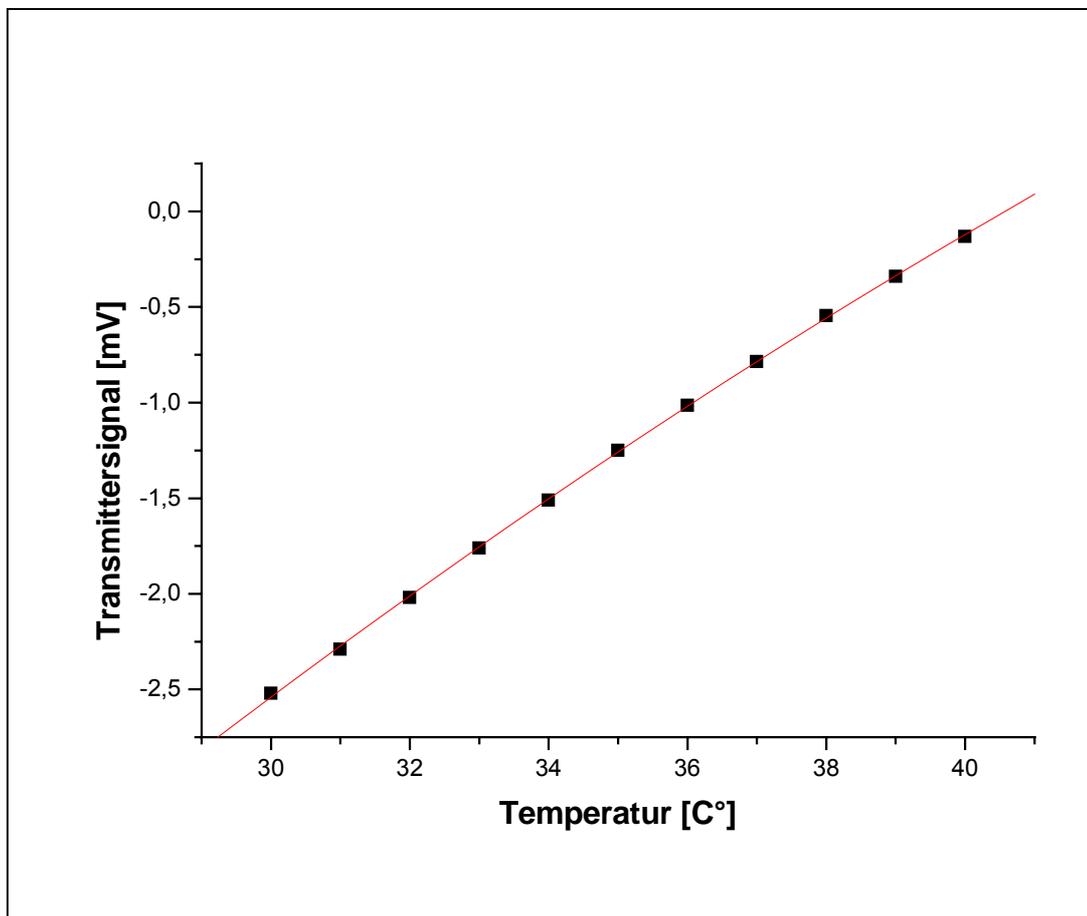
**Tabelle 35:** TM=Transmitter, Auftragung [C°] gegen den Ausschlag in [mV]

TM	40°C	39°C	38°C	37°C	36°C	35°C	34°C	33°C	32°C	31°C	30°C	A	B
5453	-0,13	-0,34	-0,55	-0,785	-1,02	-1,25	-1,52	-1,76	-2,02	-2,29	-2,52	40,27	4,08
5454	-0,17	-0,33	-0,53	-0,78	-0,99	-1,25	-1,5	-1,76	-2,01	-2,28	-2,49	40,35	4,19
5455	-0,21	-0,38	-0,54	-0,735	-0,94	-1,21	-1,45	-1,71	-1,965	-2,24	-2,50	40,37	4,26
5494	-0,20	-0,37	-0,55	-0,76	-0,98	-1,22	-1,47	-1,74	-1,99	-2,25	-2,48	40,43	4,265
5495	-0,11	-0,32	-0,55	-0,78	1,02	-1,26	-1,5	-1,76	-2,0	-2,15	-2,46	40,37	4,25
5496	-0,20	-0,37	-0,55	-0,77	-0,99	-1,25	-1,5	-1,75	-2,0	-2,26	-2,53	40,42	4,21
5498	-0,19	-0,345	-0,54	-0,75	-0,97	-1,22	-1,47	-1,71	-1,98	-2,24	-2,51	40,35	4,23
5499	-0,10	-0,27	-0,50	-0,72	-0,945	-1,22	-1,46	-1,71	-1,97	-2,24	-2,51	40,06	4,09
5500	-0,25	-0,37	-0,54	-0,76	-0,97	-1,22	-1,46	-1,71	-1,98	-2,23	-2,50	40,47	4,30
5611	-0,19	-0,32	-0,54	-0,75	-1,00	-1,25	-1,5	-1,73	-1,90	-2,1	-2,49	40,45	4,35

Y=Temperatur

X= Transmitter-Signal (Labview)

$Y=A+B \cdot X$



**Abbildung 27:** Eichgrade zur Bestimmung der Körpertemperatur

## 6.2 Connexin 40 Zugangs-Nr.: U03486 (Genebank)

```

1  cttttctctc tttctctctc tccatttgc agaagttttg gcatctgttc cctgctgtgc
61 caacatgggc gattggagct tcttgggaaa tttcctggag gaagtacaca agcactcgac
121 cgtggtaggc aaggctctggc tcactgtcct cttcatattc cgtatgctcg tgctggggcac
181 agctgctgag tcttcctggg gggatgagca ggctgatttc cgggtgtgata cgattcagcc
241 tggctgccag aatgtctgct acgaccaggc tttccccatc tcccacattc gctactgggt
301 gctgcagatc atcttcgtct ccacgccttc tctgggtgtac atggggccacg ccatgcacac
361 tgtgcgcatg caggagaagc gcaagctacg ggaggccgag agggccaaag aggtccgggg
421 ctctggctct tacgagtacc cggtggcaga gaaggcagaa ctgtcctgct gggaggaagg
481 gaatggaagg attgccctcc agggcactct gctcaacacc tatgtgtgca gcatcctgat
541 ccgaccacc atggagggtg gtttcattgt gggccagtac ttcactctacg gaatcttctc
601 gaccaccctg catgtctgcc gcaggagtcc ctgtccccac ccggccaact gttacgtatc
661 ccggcccaca gagaagaatg tcttcattgt ctttatgctg gctgtggctg cactgtccct
721 cctccttagc ctggctgaac tctaccacct gggctggaag aagatcagac agcgatttgt
781 caaacgcgg cagcacatgg ctaagtcca gctttctggc ccctctgtgg gcatagtcca
841 gagctgcaca ccacccccg actttaatca gtgcctggag aatggccctg ggggaaaatt
901 cttcaatccc ttcagcaata atatggctc ccaacaaaac acagacaacc tggtcaccga
961 gcaagtacga ggtcaggagc agactcctgg ggaaggtttc atccaggttc gttatggcca
1021 gaagcctgag gtgccaatg gagtctcacc aggtcaccgc cttccccatg gctatcatag
1081 tgacaagcga cgtcttagta aggccagcag caaggcaagg tcagatgacc tatcagtggt
1141 accctccttt atgggaggat caggaccagg tgggaacaaa ggaggctcag agaggaaga
1201 cgtgtccctt ctgaactgat gctttctcac tgtcatcact gcttggctcc tttggcccgg

```

Die unterstrichenen Sequenzen markieren die für die Sondenherstellung verwendeten Primer  
(J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (7), 861-868 (1994))

## 6.3 Connexin 43 Zugangs-Nr.: X52947 (Genebank)

```

1  gcgtgaggaa agtaccaaac agcagcggag ttttaaactt taaatagaca ggtctgagtg
61 cctgaacttg ccttttcatt ttacttctc ctccaaggag ttcaatcact tggcgtgact
121 tcaactactt taagcaaaag agtgggtgcc aggcaacatg ggtgactgga gcgcttagg
181 caaactcctt gacaaggttc aagcctactc aactgctgga ggggaagggt ggtctgctcag
241 acttttcatt ttccgaatcc tgctgctggg gacagcgggt gagtcagcct ggggagatga
301 gcagtctgcc tttcgttgta acactcagca acctgggtgt gaaaatgtct gctatgacaa
361 gtctttccca atctctcatg tgcgcttctg ggtcctgcag atcatattg tgtctgtacc
421 cacactcttg tacctggctc atgtgttcta tgtgatgca aaggaagaga aactgaacaa
481 gaaagaggaa gaactcaagg ttgcccacac tgatgggtgc aatgtggaca tgcacttgaa
541 gcagattgag ataaagaagt tcaagtacgg tattgaagag catggtaagg tgaaaatgcy
601 aggggggttg ctgcgaacct acatcatcag tatcctctc aagtctatct ttgagggtgc
661 cttcttgctg atccagtggt acatctatgg attcagcttg agtgctgttt acacttgcaa
721 aagagatccc tgcccacatc aggtggactg tttcctctct cgccccacgg agaaaacct
781 cttcatcatc ttcattgctg tgggtcctt ggtgtccctg gccttgaata tcattgaact
841 cttctatggt ttcttcaagg gcgttaagga tccgggtaag ggaaagagcy acccttacca
901 tgcgaccagt ggtgctgctg gccctgccc agactgtggg tctcaaaaat atgcttattt
961 caatggctgc tctcaccac ccgctcccct ctgcctatg tctcctctg ggtacaagct
1021 ggttactggc gacagaaaca attcttctg ccgcaattac aacaagcaag caagtgagca
1081 aaactgggct aattacagtg cagaacaaaa tccaatgggg caggcgggaa gcaccatctc
1141 taactcccat gcacagcctt ttgatttccc cgatgataac cagaattcta aaaaactagc
1201 tctgagcat gaattacagc cactagccat tgtggaccag cgacctcaa gcagagcag
1261 cagtcgtgcc agcagcagac ctccgctga tgacctggag atctagatac aggcttgaaa
1321 gcatcaagat tccactcaat tgtggagaag aaaaaagggt ctgtagaaag tgcaccaggt
1381 gttaattttg atccgggtga ggtggtactc aacagcctta ttcattgaggc ttagaaaaa
1441 caaagacatt agaataccta ggttactctg ggggtgatgg ggtagatggg tggagaggga
1501 ggggataaga gaggtgcatg ttggtattta aagtagtgga ttcaaagaac ttagattata
1561 aataagagtt ccattaggtg atacatagat aagggtttt tctccccgca aacaccctta
1621 agaatgggtc tgtgtatgtg aatgagcggg tggtaattgt ggctaaatat ttttgtttta
1681 ccaagaaact gaaataattc tggccaggaa taaatacttc ctgaacatct taggtctttt

```

```

1741 caacaagaaa aagacagagg attgtcctta agtcccctgct aaaacattcc attgttaaaa
1801 tttgcacttt gaaggtaagc tttctaggcc tgacccctcca ggtgtcaatg gacttgtgct
1861 actatatttt tttattcttg gtatcagttt aaaattcaga caaggcccac agaataagat
1921 tttccatgca ttgcaaata cgtatattct tttccatcc acttgacaa tatcattacc
1981 atcacttttt catcattcct cagctactac tcacattcat ttaatggttt ctgtaaacat
2041 ttttaagaca gttgggatgt cacttaacat ttttttttt tgagctaaag tcagggaatc
2101 aagccatgct taatatttaa caatcactta tatgtgtgtc gaagagtttg ttttgtttgt
2161 catgtattgg tacaagcaga tacagtataa actcacaac acagatttga aaataatgca
2221 catatggtgt tcaaatttga acctttctca tggatttttg tgggtgtggc caatatggtg
2281 tttacattat ataattcctg ctgtggcaag taaagcacac ttttttttc tcctaaaatg
2341 tttttccctg tgtatcctat tatggatact ggttttgta attatgattc tttattttct
2401 ctcttttttt taggatatag cagtaatgct attactgaaa tgaatttctt ttttctgaaa
2461 tgtaatcatt gatgcttgaa tgatagaatt ttagtactgt aaacaggctt tagtcattaa
2521 tgtgagagac ttagaaaaaa tgcttagagt ggactattaa atgtgcctaa atgaattttg
2581 cagtaactgg tattcttggg ttttcctact taatacacag taattcagaa cttgtattct
2641 attatgagtt tagcagtcct ttggagtgac cagcaacttt gatgtttgca ctaagatttt
2701 atttggaatg caagagaggt tgaaagagga ttcagtagta cacatacaac taatttattt
2761 gaactatatg ttgaagacat ctaccagttt ctccaaatgc ctttttttaa actcatcaca
2821 gaagattggt gaaaatgctg agtatgacac ttttcttctt gcatgcatgt cagctacata
2881 aacagttttg tacaatgaaa attactaatt tgtttgacat tccatgtaa actacggtca
2941 tgttcagctt cattgcatgt aatgtagacc tagtccatca gatcatgtgt tctggagagt
3001 gttcttttatt caataaagtt ttaatttagt ataaacat

```

Die unterstrichenen Sequenzen markieren die für die Sondenherstellung verwendeten Primer

(Submitted (02-MAY-1990) Fishman G.I., Albert Einstein College of Medicine, Dpt. of Microbiology and Immunology, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, 10461 NY, USA).

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
µl	Microliter
a.p.	Anterior posterior
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Posphatase
Bp	Basenpaare
CCD	Charged composite Device
cDNS	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CsCl	Cäsiumchlorid
Cx40	Connexin40
Cx43	Connexin43
Cx45	Connexin45
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Docosahexansäure
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithioerythritol
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EPA	Eicosapentensäure
eV	elektrovolt
FAME	Fettsäuremethylester
g	Gravitation
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
LB	Luria und Bertani
M	Molar
mg/g	Milligramm pro Gramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
mv	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
pH	H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
Phytanoyl-CoA	Phytanoyl-Coenzym A
PUFAs	Poly Unsaturated Fatty Acids
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde

---

SCP	Sterol Carrier Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
u	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen-/Volumenverhältnis
w/v	Gewicht-/Volumenverhältnis
w/w	Gewicht-/Gewichtverhältnis

## 6.5 Genehmigungsbescheid für tierexperimentelle Arbeit



### Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster, 48128 Münster

#### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
 Dr. med. Gerold Mönning  
 Medizinische Klinik und Poliklinik  
 - Innere Medizin C (Kardiologie und Angiologie)  
 der Westf. Wilhelms-Universität Münster  
 Albert-Schweitzer-Str. 33

Dienstgebäude  
 Domplatz 1-3  
 Telefon: (0251) 411-0  
 Durchwahl: 2110  
 Zimmer: 431  
 Frau Möllers

Aktenzeichen  
 23.0835.1.0 (G 49/99)

22. Juni 1999

48129 Münster

Betr.: Tierschutz;  
 hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 15.03.1999, hier eingegangen am  
 22.03.1999

#### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Mönning,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

I.

Implantation von EKG-Telemetrie-Sendern in transgenen Mäusemodellen zur Beurteilung elektrokardiographischer Daten, der körperlichen Aktivität und der Temperatur der Mäuse

II.

Untersuchungen zur Ätiopathogenese des plötzlichen Herztodes am Beispiel von knock-out-Mäusen mit Refsum Syndrom (Sterol-Carrier-Protein-2-knock-out-Maus-Modell).

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

## 7. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Johannes Theodor Wiekowski  
Anschrift: Hildastr. 9, 69115 Heidelberg; Tel.: 06221-37 63 03  
Geburtsdatum: 12. März 1968  
Geburtsort: Harderberg jetzt Georgsmarienhütte  
Eltern: Dipl. Ing. Horst Hans Wiekowski  
Dorothea Johanna Hedwig Wiekowski geb. Dworzynski  
Geschwister: 7  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

74-78 Grundschule Hollage  
78-82 Privatschule St. Ursula-Gymnasium Osnabrück  
82-87 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Osnabrück

### Wehrdienstzeit

87-88 Soldat im Grundwehrdienst/ Jäger und Sanitätssoldat im Jägerbataillon 322

### Arbeitsunfähigkeit

88-89 Krankenhausaufenthalt bedingt durch ALL

### Universitätslaufbahn

89-90 Angewandte Systemwissenschaft an der Universität Osnabrück  
90-91 Universität Konstanz: 1. Semester Chemie; 2. Semester Biologie  
91-97 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Fächer:  
Botanik, Mikrobiologie und Biochemie  
5/94 Diplomvorprüfung: Botanik, Zoologie, Chemie, Physik, WWU Münster  
7/97 Diplomprüfung und Diplomarbeit zum Diplom-Biologen, WWU Münster

### Tätigkeiten nach Abschluß des Studiums

- 97 industrielle Forschung in einem immunologischen Labor „Biotechnology-Molecular Biology“ Schering Plough Research Institute NJ/USA  
98 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Studium der Medizinischen Mikrobiologie, der Immunologie, der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
98/99 Forschungsaufenthalt am Max Delbrück Centrum Berlin im Arbeitskreis molekulare Herz-Kreislaufforschung  
6/99 Beginn der Dissertation zum Dr. rerum medicinalium am Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

seit 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem Sonderforschungsbereich der DFG für die Medizinische Klinik und Poliklinik –Innere Med C- der WWU Münster:  
„*Herzinsuffizienz und Arrhythmien-von den molekularen Grundlagen zur Klinik*“.  
seit 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der interdisziplinären Projektgruppe „*Plaque Imaging*“ der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der WWU Münster  
Seit 2002 Ausbildung zum Patentanwalt in der Kanzlei Ullrich&Naumann, Heidelberg

### Zusatzstudium

99-2000 Studium zum Gewerblichen Rechtsschutz am Institut für Informations Telekommunikations- und Medienrecht der WWU Münster

Heidelberg, den 31. Juli 2003