

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C-Kardiologie und Angiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt

**POP1A, ein Gen der Popeye Familie, ist notwendig für die  
Herzfrequenz-Adaptation an Belastung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

LIEBIG, SONJA KATHARINA  
aus Oldenburg

2008

Gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Paulus Kirchhof

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. P. Boknik

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C-Kardiologie und Angiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt  
Referent: Prof. Dr. med. Paulus Kirchhof  
Koreferent: PD Dr. Dr. P. Boknik

### ZUSAMMENFASSUNG

POP1A, ein Gen der Popeye Familie, ist notwendig für die Herzfrequenz-Adaptation bei Belastung

Sonja Katharina Liebig

Die evolutionär hoch konservierte Popeye-Genfamilie ist erstmals 2000 in der Literatur erwähnt worden (Andrée et al., 2000. Dev. Biol. 2000; 223: S. 371-82). Sie wird überwiegend in Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Das Gen POP1 ist essentiell für die Skelettmuskelregeneration. Zur Erfassung der Bedeutung des Gens POP1A für die Herzfunktion wurden 12 adulte Mäuse mit homozygoter Nullmutation des POP1A-Gens, so genannte Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse, und 12 Wildtyp(WT)-Mäuse untersucht.

Unter Kontrollbedingungen in Isoflurannarkose zeigen die Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse bezüglich der Herzfrequenz (HF) keinen Unterschied. Bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin ist die Popdc1<sup>-/-</sup>-HF im Vergleich zu der WT-HF bradykard. Die telemetrische Langzeit-EKG-Überwachung zeigt bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen in Ruhe sowie in Erholungsphasen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine unveränderte HF. Unter mentaler Belastung mittels „hot air jet“-Stress ist die Popdc1<sup>-/-</sup>-HF im Vergleich zur WT-HF bradykard. Auch im Oberflächen-EKG unter Diazepam und Isofluran ist in Ruhe zwischen den Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren bezüglich der HF kein Unterschied feststellbar, unter Isoprenalin dagegen neigen die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse dann zu einer bradykarden HF. Unter Kontrollbedingungen zeigen die isolierten, schlagenden Herzen der Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse keine Unterschiede in der HF.  $\beta$ -adrenerg mit Orciprenalin stimuliert schlagen die Popdc1<sup>-/-</sup>- Herzen bradykarder als die WT- Herzen.

Die isolierten, schlagenden Herzen neigen bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Orciprenalin zu einem erhöhten Wenckebachpunkt (p= 0,09), während sich unter Kontrollbedingungen kein Unterschied zeigt.

Echokardiographisch wurden keine Veränderungen der Herzstrukturen und kontraktilen Funktion bei den Popdc1<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu den WT-Tieren festgestellt. HF-abhängige Parameter zeigen sich bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation verändert, die linksventrikuläre Ejektionszeit ist bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Tieren verlängert, die maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe Vmax in der Dopplerechokardiographie verringert.

Unter Belastung zeigen die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Sinusbradykardie sowie einen erhöhten Wenckebachpunkt. Bei POP1A-Verlust adaptieren die Mäuse also inadäquat an Belastung.

Das POP1A-Gen könnte somit eine Bedeutung für die adäquate Frequenzadaptation an Belastung haben. Sein Fehlen könnte zur Genese bradykarder Rhythmusstörungen beim Menschen beitragen.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2008

Die tierexperimentelle Arbeit wurde am 20.01.2005 von der Bezirksregierung Münster (Aktenzeichen G83/2004) genehmigt.

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	7
<b>2. Stand der Forschung</b>	
2. 1. Popdc1 <sup>-/-</sup> - eine Nullmutation auf Maus-Chromosom 10	8
2. 2. Das Reizleitungssystem	16
<b>3. Material und Methoden</b>	
3. 1. Tiere und Tierhaltung	19
3. 2. Elektrophysiologische Messungen	
3. 2. 1. Oberflächenelektrokardiogramm bei sedierten Mäusen	21
3. 2. 2. Telemetrisches Langzeit-EKG bei wachen Mäusen	22
3. 2. 3. Elektrophysiologische Untersuchungen am isolierten Herzen	26
3. 2. 4. Auswertung elektrophysiologischer Untersuchungen	
3. 2. 4. 1. Oberflächenelektrokardiographie	28
3. 2. 4. 2. Telemetrie	29
3. 2. 4. 3. Elektrophysiologische Untersuchungen am isolierten Herzen	30
3. 3. Echokardiographie	30
3. 4. Statistik	36
<b>4. Ergebnisse</b>	
4. 1. Normale Herzstruktur und kontraktile Funktion	37
4. 2. Unter Isoflurannarkose und $\beta$ -adrenerger Stimulation relative Bradykardie	40
4. 3. Unter Isoprenalin relative Bradykardie im Oberflächen-EKG	44
4. 4. Mentale Belastung führt zu relativer Bradykardie	50
4. 5. Intrinsische Bradykardie unter Orciprenalin	57
4. 6. Unter Belastung zeigen die Popdc1 <sup>-/-</sup> -Mäuse eine bradykarde Herzfrequenz	59

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	
5. 1.	Methodenvergleich: Diazepamsedierung versus Isoflurannarkose	60
5. 2.	Inadäquate Herzfrequenzadaptation an Belastung bei Popdc1 <sup>-/-</sup> -Mäusen	61
5. 3.	Bradykardie-bedingte Veränderungen in der Doppler-Echokardiographie	63
5. 4.	Welche Rolle spielt das Gen POP1A für die elektrische Erregung des Mausherzens?	64
5. 5.	Abhängigkeit des Phänotyps vom Alter?	67
5. 6.	Offenen Fragen und Desiderata	68
5. 7.	Zusammenfassung zum Genprodukt POP1A	69
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	70
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	76
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	78
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	79

## **1. Einleitung**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Gene entdeckt und charakterisiert, die mit der Genese von Erkrankungen assoziiert sind. Das Internetportal „Online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM), ein Katalog humaner Gene und genetischer Dysfunktionen, offenbart eine weite Bandbreite an genetisch bedingten Erkrankungen.

Das noch nicht in seiner Funktion näher definierte Gen POP1A wurde erstmals im Jahr 2000 in der Literatur erwähnt (Andrée et al., 2000). POP1A ist ein Gen der Popeye-Familie, das auf dem Maus-Chromosom 10 lokalisiert ist. Dies entspricht im menschlichen Genom dem Genlocus 6q21.

Die Gene der Popeye-Familie sind bevorzugt in Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Bisherige Forschungen ergaben, dass das Gen POP1 bei der adulten Maus essentiell für die Skelettmuskelregeneration ist (Andrée et al., 2002a). Die Funktion von POP1A im Herzen wurde bisher nicht näher untersucht.

Während der Entwicklung ist POP1 zunächst in den Vorhöfen, später in den Ventrikel exprimiert. Im embryonalen Mauserzen sind POP Gene in der myokardialen Schicht exprimiert (Andrée et al., 2000).

Färbungen von Mauserzen, die homozygote Nullmutanten für das POP1A-Gen darstellen, sind dahingehend zu interpretieren, dass POP1A stark im Reizleitungssystem der Mauserzen exprimiert wird.

**Die vorliegende Arbeit geht auf folgende Fragen ein:**

**Welche funktionelle Bedeutung hat POP1A im Herzen?**

**Welche funktionelle Bedeutung hat POP1A für die elektrische Erregung des Herzens?**

## **2. Stand der Forschung**

### **2.1. Popdc1<sup>-/-</sup>- eine Nullmutation auf Maus-Chromosom 10**

Ein neues Gen wurde von zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander beschrieben. Reese et al. (1999) benannten das Gen Bves (blood vessel/ epicardial substance), Andrée et al. (2000) benannten es POP1A.

Das Gen wird bevorzugt im sich entwickelnden und im adulten Herzen sowie im Skelettmuskel von Huhn, Maus und Mensch exprimiert (Andrée et al., 2000; Reese et al., 1999). Analysen der POP1A/Bves-mRNA und POP1A/Bves-Antikörper-Studien bestätigen eine Expression von POP1A/Bves in Skelett- und Herzmuskel (DiAngelo et al., 2001; Wada et al., 2001; Osler and Bader, 2004). Auch im Skelettmuskel des Frosches konnten mRNA und Proteinexpression von POP1A/Bves nachgewiesen werden (Hitz et al., 2002; Ripley et al., 2006). Es wurde Expression in der Aorta (Reese and Bader, 1999) und in der glatten Muskulatur der Koronargefäße (Smith and Bader, 2006) nachgewiesen. Außerdem wurde POP1A/Bves-Expression in den Nieren, in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, in begrenzten Gehirnarealen, in der Milz, der Lunge und im Uterus der trächtigen Maus gezeigt (Andrée et al., 2000; Brand T, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse mit einer homozygoten Nullmutation von POP1A/Bves, Popdc1<sup>-/-</sup> untersucht. Beiden POP1A/Bves-Allelen wurde ihre Funktion genommen, indem das erste kodierende Exon des POP1A/Bves-Gens auf Chromosom 10 der Maus durch ein LacZ-Reporter-Gen ersetzt wurde (schematische Darstellung in Abb. 1) (Andrée et al, 2002a).

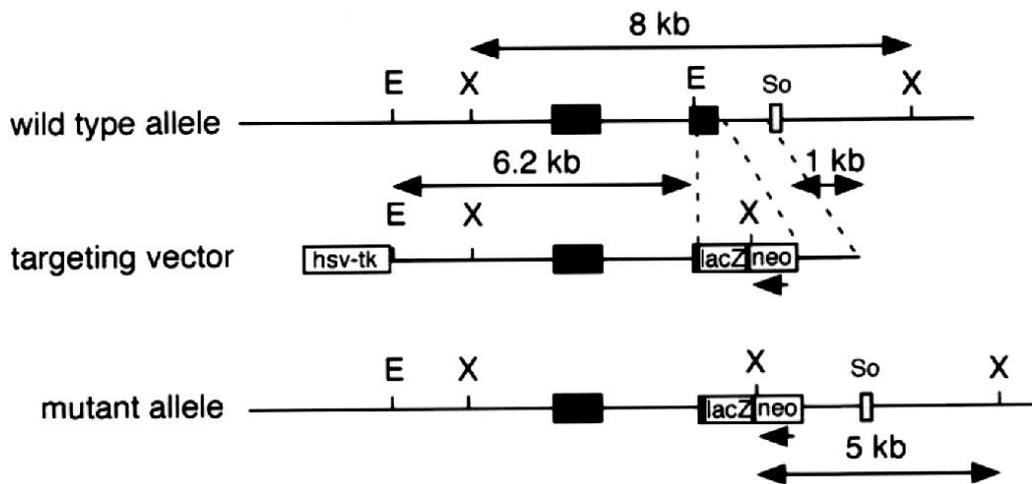


Abbildung 1: Restriktionskarte des POP1-Lokus und „gene targeting strategy“. Im Zielvektor wurde die kodierende Region des ersten Exons durch eine NLS-lacZ-Kassette ersetzt ( $\beta$ -Galaktosidase-Gen mit SV40 NLS am 5'-Ende). Am 3'-Ende des NLS-lacZ-Gens befindet sich ein Neomycin-Resistenz-Gen (neo) in Gegenrichtung zur kodierenden Region.  
Exons sind durch einen ausgemalten Kasten dargestellt. E und X= Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI  
(aus Andrée et al., 2002a)

### Gen und Transkript von POP1A/Bves

Das POP1A/Bves-Gen scheint evolutionär hoch konserviert. Es wurden in Huhn, Maus, Frosch und Mensch verwandte Sequenzen identifiziert (Andrée et al., 2000; Reese et al., 1999; Reese and Bader, 1999; Hitz et al, 2002; Ripley et al., 2006). 75% der Aminosäuren des Gens sind bei Huhn und Mensch identisch, 92% der Aminosäuren sind bei beiden Spezies ähnlich (Reese and Bader, 1999). Innerhalb des C-Terminus existiert eine so genannte Popeye-Region bzw. Popeye-Domäne, in der 92% der Aminosäuren bei Huhn und Maus identisch sind. Aufgrund dieser Domäne wird die Popeye-Genfamilie in der Literatur mitunter auch „Popdc<sup>-/-</sup>-Genfamilie“ (Popeye-domain containing) genannt (Osler et al., 2006).

Bei der Maus sind POP1A/Bves und POP3 zwischen den Markern D10Mit148 und D10Mit170 auf Chromosom 10 kolokalisiert (Andrée et al., 2000). Im menschlichen Genom ist POP1A/Hbves (humanes Bves) entsprechend auf Chromosom 6q21 lokalisiert (Andrée et al., 2000; Reese and Bader, 1999).

POP1A/Bves stellt eine von vier gefundenen Isoformen des Gens POP1 (POP1A, POP1B, POP1C und POP1D) dar, die auf unterschiedliche Splicing-Varianten des POP1-Gens zurückzuführen sind. POP1 ist Teil der Popeye-Genfamilie, die bei Maus und Mensch aus den drei Genen POP1, POP2 und POP3 besteht und spezifisch in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert (Andrée et al., 2000).

Andrée et al., 2000 zeigten für POP1 während der intrauterinen Entwicklung sowie postnatal im Mauserz eine spezifische Expression auf (Abb. 2): POP1-Expression ist während der intrauterinen Entwicklung ab E9,5 (E= Tag post coitum) auf den Vorhof begrenzt, später, ab E12,5, auch in subepikardialen Kompaktschichten der Ventrikel, die Ventrikelwachstum induzieren, zu finden (Rumyantsev, 1991). Laut Andrée und Kollegen gibt es also keine POP1A/Bves- Expression im Epikard (Andrée et al., 2000).

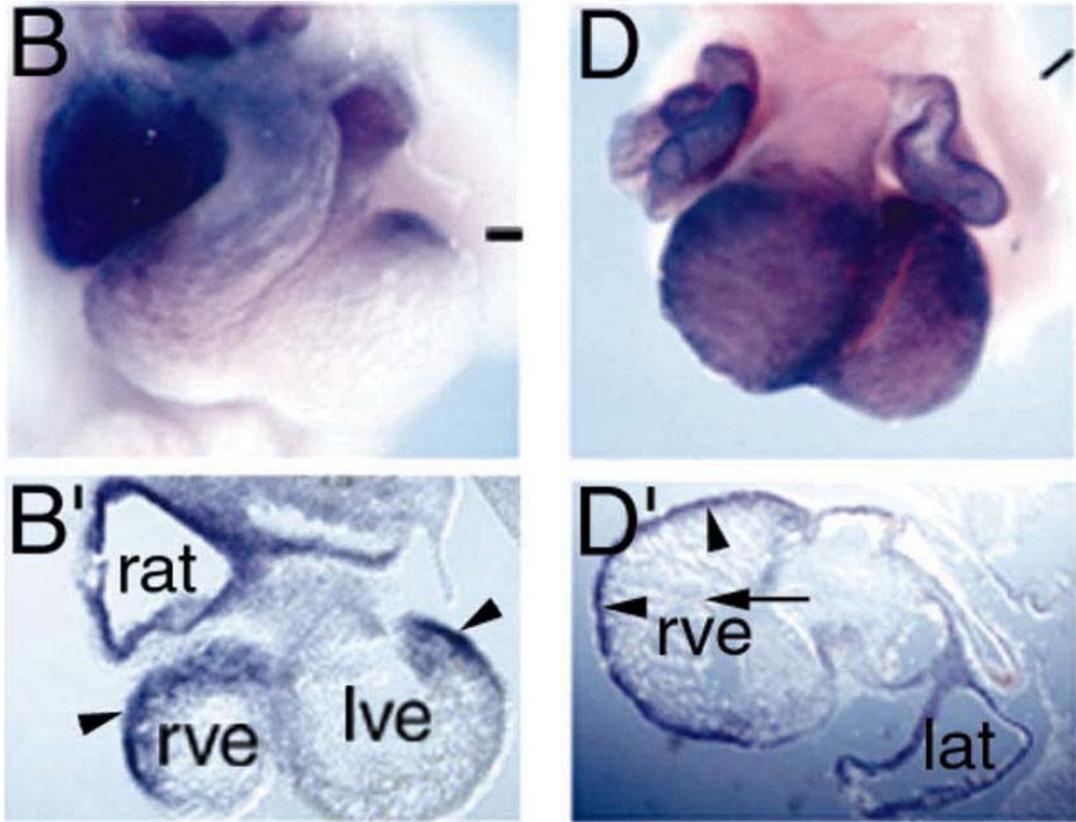


Abbildung 2: Kardiale Expression von POP1 während der embryonalen Entwicklung der Maus (aus André et al., 2000). Ab E9,5 (B, B') war POP1 in den Vorhöfen exprimiert. Beide Vorhöfe und Ventrikel zeigten ab E12,5 (D, D') starke POP1-Expression.  
 (B), (D) von lateral  
 (B'), (D') Transversalebene

Unterschiedliche Anfärbungen von  $Popdc1^{-/-}$ - Mausherzen (Abb. 3), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Brandt, zeigen Strukturen des Reizleitungssystems. Bild (B) zeigt eine LacZ-Färbung der  $Popdc1^{-/-}$ -Herzen. Das LacZ-Promotoren, welches das erste Exon des  $POP1A$ - Gens auf Chromosom 10 der  $Popdc1^{-/-}$ -Maus ersetzt, ist hier angefärbt. Es stellt sich eine  $POP1A$ -Expression im Reizleitungssystem dar. Weiter wurden die  $Popdc1^{-/-}$ -Herzen (A) mit Acetylcholinesterase (AChE) angefärbt. Dabei handelt es sich um eine gebräuchliche Anfärbung für anatomische Strukturen des Reizleitungssystems. Die gefärbten Strukturen beider Bilder korrelieren miteinander und sind als Sinus- und AV-Knoten identifizierbar.

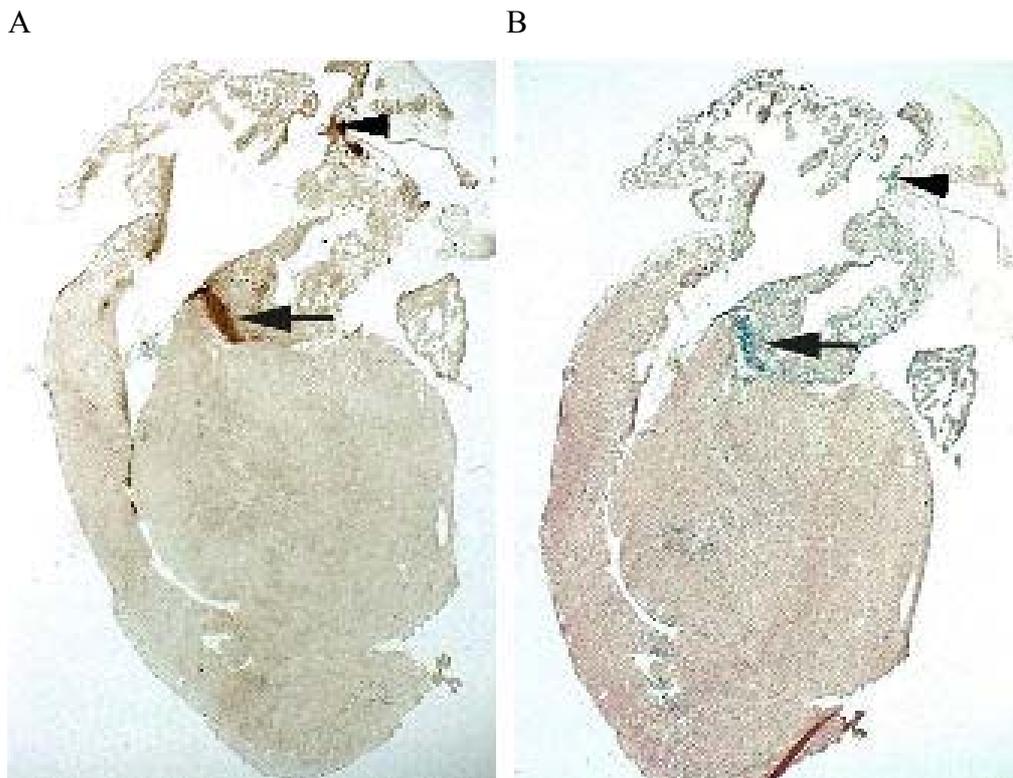


Abbildung 3: Herzen von  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen, Pfeilkopf Sinusknoten, Pfeil AV-Knoten (Arbeitsgruppe Thomas Brandt, Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg)  
(A) Acetylcholinesterase-Färbung  
(B) LacZ-Färbung

Im adulten Mausherz wird POP1 in geringem Maße im Myokard exprimiert, nicht jedoch im Endokard und Epikard. Stärker wird POP1 in der adulten Maus im Skelettmuskel exprimiert (Andrée et al., 2000).

### Struktur und Funktion des Proteins POP1A/Bves

Die murine Proteinstruktur weist drei transmembranale Helices, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf (Andrée et al., 2002b; Knight et al., 2003; Brand T, 2005). Wada et al. beschrieben 2001 eine intrazelluläre N-Terminus-Region sowie einen extrazellulären C-Terminus (Sonnhammer et al., 1998; Wada et al. 2001), doch immunzytochemische sowie biochemische Daten ließen auf einen extrazellulären, kürzeren N-Terminus und einen intrazellulären, längeren C-Terminus schließen (Knight et al., 2003). Maus- und Mensch-POP1A-Gene kodieren ungefähr 360 Aminosäuren, woraus sich ein ungefähres Protein-Gewicht von 41 kDa schätzen läßt. In vitro Translation von muriner POP1-cDNA ergab ein mittleres Gewicht von 43 kDa (Andrée et al., 2000). Bves wurde auf ein Proteingewicht von 53 kDa geschätzt (Reese et al., 1999). Andrée et al. vermuten verschiedene posttranslationale Modifikationen der Proteine, auf die die unterschiedlichen Molekulargewichte zurückzuführen sind (Andrée et al., 2000).

Die Proteine der Popeye-Familie scheinen mit Membranen assoziiert (Andrée et al., 2000). Die Proteine sind wahrscheinlich am Endoplasmatischen Retikulum oder an der Plasmamembran lokalisiert (Nakaki und Kenhisa, 1992). POP1A/Bves akkumuliert an Zell-Zell-Kontaktpunkten, bevor E-Cadherin an diesen Punkten erscheint. Möglicherweise spielt POP1A/Bves in der frühen Zell-Adhäsion und -Interaktion eine Rolle (Wada et al. 2001). Bei POP1A/Bves handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, das Zell-Zell-Interaktionen Calcium-unabhängig vermittelt (Wada et al., 2001). In seiner nativen Form bildet POP1A/Bves Dimere (Vasavada et al., 2004). Dabei ist die Popeye-Domäne in die Bildung der Dimere involviert (Brand T, 2005). In der POP1A/Bves-POP1A/Bves-Interaktion spielen intermolekulare Disulfidbrücken eine Rolle (Knight et al., 2003). Interaktionen finden am C- sowie N-

Terminus von POP1A/Bves statt (Wada et al., 2001; Andrée et al., 2002b). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass oligomere Formen von POP1A/Bves an der Zell-Zell-Adhäsion partizipieren (Osler et al., 2005). Beispielsweise wurde POP1A/Bves mit Hilfe von Reaggregationsassays an Myozyt-Myozyt-Zellkontakten entdeckt (Smith and Bader, 2006).

POP1A/Bves scheint für molekulare und zelluläre Ereignisse während der Skelettmuskelregeneration essentiell zu sein (Andrée et al., 2002a). Durch Cardiotoxin induzierte Läsionen im Skelettmuskel waren nur bei POP1LacZ-heterozygoten Tieren nach 10 Tagen regeneriert, nicht bei *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Erst 20 Tage nach Verletzung waren auch bei *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen die Muskelfasern vollständig regeneriert. Ohne POP1A/Bves scheint die Skelettmuskelregeneration demnach weniger effizient und verzögert abzulaufen (Andrée et al., 2002a).

Weiterhin scheint POP1A/Bves eine Rolle in der Koronararterienentwicklung zu spielen. Es konnte POP1A/Bves-Expression auf den glatten Muskelzellen der Tunica media in differenzierten Koronararterien nachgewiesen werden, nicht jedoch in systemischen Arterien, außer der proximalen Aorta (Reese et al., 1999). POP1A/Bves ist mit dem Marker-Protein für glatte Muskulatur,  $\alpha$ -Actin, ko-lokalisiert, wobei POP1A/Bves früher in der Gefäßentwicklung als die kontraktile Proteine exprimiert wird. Dies erfolgt entsprechend dem Differenzierungsmuster der glatten Muskelzellen abhängig vom Gefäßtyp. In der Tunica media arrangieren sich die POP1A/Bves-positiven Zellen in konzentrischen Kreisen, die eventuell  $\alpha$ -Actin exprimieren, weshalb POP1A/Bves als ein Marker der Frühentwicklung der Muskelzellen im Vaskularsystem fungieren könnte (Reese et al., 1999).

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen von sich in der Entwicklung befindenden Mausherzen wurde für das POP1A/Bves-Protein ein Expressionsmuster aufgezeigt. POP1A/Bves ist in Zellen des proepikardialen Organs und der wandernden Epikardfasern exprimiert. Beim proepikardialen Organ handelt es sich um eine mesotheliale Struktur im dorsalen Bereich des Septum transversum. Mindestens vier Zelltypen entwickeln sich im weiteren Verlauf aus dem proepikardialen Organ; Epikard,

kardiale Fibroblasten, die glatten Muskelfasern der Tunica media im intrakardialen Gefäßsystem und das Endokard. Noch ist jedoch nicht bestimmt, welche dieser Zellen POP1A/Bves-Protein exprimieren. POP1A/Bves-Protein könnte zunächst in jedem beliebigen oder in allen vier Zelltypen exprimiert sein, während sich die Zellen im proepikardialen Organ und den Fasern befinden. Später könnte die POP1A/Bves-Expression dann auf die glatten Muskelzellen des intrakardialen Gefäßsystems beschränkt sein (Reese et al., 1999, Wada et al., 2001).

Das POP1A/Bves-Protein wurde nicht nur im Proepikardium sowie in seinem Abkömmling, dem Epikard, entdeckt. Das Protein ist zudem in den drei Keimblättern des sich entwickelnden Embryos und in vielen epithelialen Strukturen neben dem Epikard während der Morphogenese und in adultem Huhn, Maus und Frosch exprimiert (Osler and Bader, 2004; Ripley et al, 2004; Osler et al., 2005; Ripley et al., 2006; Hitz et al., 2002).

Es wurden kardiale Myozyten und Epithelzellen kultiviert, die POP1A/Bves an Zell-Zell-Kontaktpunkten exprimierten (Wada et al., 2001; Brand, 2005; Osler et al., 2005; Smith and Bader, 2006). Das POP1A/Bves-Protein umgab die Zellgrenzen und war mit „tight junction“-Proteinen wie ZO-1 ko-lokalisiert. Mit Hilfe einer „GST pull-down“-Analyse zeigten Osler et al. (2005) eine Interaktion zwischen dem C- Terminus des POP1A/Bves-Proteins und dem „tight junction“-Protein ZO-1. Der Verlust des POP1A/Bves-Proteins in Epithelzellen führte zu einer Unterbrechung der Epithelschichtintegrität, zu einem konstanten Verlust transepithelialen Widerstandes (Osler et al., 2005). Weiter zeigten Epithelzellen mit einer Nullmutation für das POP1A/Bves-Gen während eines Wundheilungsprozesses eine erhöhte Migrationsrate, die darauf schließen lässt, dass aufgrund des POP1A/Bves-Proteinverlustes die Adhäsions- und Interaktionsfähigkeit gelockert ist (Ripley et al., 2004).

Reese et al. wiesen also POP1A/Bves-Expression im Epithel nach, speziell im proepikardialen Organ und den sich daraus entwickelnden Strukturen. Andrée et al. dagegen konnten POP1A/Bves im fetalen Herzen nur im subepikardialen Kompartiment nachweisen, im adulten Herzen im Myokard, jedoch nicht im Epikard. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Präsenz vieler verschiedener Splice-Isoformen sein, so Andrée et al., 2000. Es gibt Hinweise für die Existenz von cDNAs

im Huhn, die POP1- und POP3-Transkripte kodieren, denen die Transmembran-domänen fehlen (Andrée et al., 2000). Eine weitere Erklärung könnte die unterschiedliche Sensitivität der Untersuchungsmethoden gewesen sein, die benutzt wurden, um die Expression darzustellen (Osler et al., 2005).

## **2.2. Das Reizleitungssystem**

Das Erregungsbildungs- und -leitungssystem induziert und steuert autonom die elektrische Erregung des Herzens. Es ist aufgebaut aus modifiziertem, spezifischem Herzmuskelgewebe. Im Gegensatz zu den Zellen der Arbeitsmuskulatur besitzen die Zellen des Sinus- und AV-Knotens kein konstantes Ruhemembranpotenzial, sondern nach jeder Repolarisation steigt das Potenzial wieder langsam bis zu einem Schwellenpotenzial an, das dann ein Aktionspotenzial auslöst. Diese spontane Positivierung des Membranpotenzials führt zu einer regelmäßigen Schrittmacheraktivität. Dabei kommt dem Sinusknoten die Rolle des schnellsten Schrittmachers des Herzens zu, da seine Zellen die schnellste Schrittmacherfrequenz besitzen (Silbernagel, Despopoulos, 1991; Goodmann, Gilman, 1998). Das Schrittmacherpotenzial wird durch einen Nettoeinwärtsstrom hervorgerufen. Die Rolle dieses Einwärtsstroms variiert in den verschiedenen Schrittmacherregionen des Herzens (DiFrancesco, 1995). Normale elektrische Impulse werden im Sinusknoten generiert und breiten sich von dort über Arbeitsmuskulatur und spezialisierte atriale Myozyten bis zum AV-Knoten aus. Im AV-Knoten, der einzigen physiologischen, elektrisch leitenden Verbindung zwischen Vorhof und Kammer, wird die Erregungsausbreitung verzögert, so dass Vorhöfe und Kammern nacheinander kontrahieren. Durch diese Verzögerung können die kontrahierten Vorhöfe Blut in die Ventrikel pumpen. Anschließend werden die Erregungsimpulse im His-Bündel und den Purkinje-Fasern in beiden Ventrikeln von der Spitze zur Basis weitergeleitet (Myers et Fishmann, 2003).

## Die Entwicklung des Reizleitungssystems

Im embryonalen Herzen besteht das Reizleitungssystem RLS aus zwei Komponenten. Das Gewebe des zentralen RLS (ZRLS) weist im Gegensatz zum peripheren RLS keine ventrikelspezifischen Gene auf (Hoogaars et al., 2004). Im Bereich des peripheren RLS sind ventrikelspezifische und Gap Junction Gene wie Nppa, Cx40 und Cx43 exprimiert (Hoogaars et al., 2004). Bei Nppa, Cx40 und Cx43 handelt es sich um Marker des atrialen und ventrikulären Myokards im sich entwickelnden Herzen.

Das ZRLS enthält die T-box-Transkriptionsfaktoren Tbx2 und Tbx3. Tbx2 unterdrückt die ventrikelspezifischen Gene Nppa und Cx40 und blockiert so die Kammerformierung (Hoogaars et al., 2004). Die Tbx2-Expression wird in der Fetalzeit reduziert, jedoch nimmt dann die kardiale Tbx3-Expression zu. Tbx2 und Tbx3 teilen Struktur, Repressorfunktion und DNA-Elemente.

Tbx3 wird selektiv im gesamten ZRLS exprimiert. Es unterdrückt die Promotoraktivität von Nppa und Cx40. Tbx3 scheint in die kontinuierliche Unterdrückung der Myokardentwicklung in der Kammerregion, in der sich das RLS formt, involviert und damit als Marker für das ZRLS einsetzbar (Hoogaars et al., 2004).

Das ZRLS entwickelt sich also in den Regionen, in denen das myokardiale Kammerwachstum unterdrückt wird (Hoogaars et al., 2004).

2001 beschrieben Rentschler et al. eine transgene Mauslinie, bei der mit Hilfe der Expression von lacZ-Reportergenen das gesamte sich entwickelnde und ausgereifte zentrale Reizleitungssystem vom Sinusknoten bis zu den distalen Purkinjefasern im Mäuseherz dargestellt werden kann (Rentschler et al., 2001). Dabei korreliert die lacZ Expression direkt mit der funktionellen Erregungsbildung und -ausbreitung, so dass lacZ als RLS-Marker fungieren könnte (Rentschler et al., 2002). Bereits am E8,5 wurde lacZ-Expression in RLS-Vorläuferzellen entlang der dorsalen Wand des AV-Kanals gefunden. Am E9,5 wurde lacZ in SA-Knotenvorläufern im rechten Sinushorn sowie in Vorläuferzellen des RLS im Bereich zwischen den zu diesem Zeitpunkt noch nicht getrennten Ventrikeln exprimiert. Am E10,5 war es erstmals möglich, diskrete Fasern im AV-Kanal und in den späteren Ventrikeln zu erkennen. Eine Eosineinfärbung der RLS-Zellen zeigte zu diesem Zeitpunkt die überwiegend subendotheliale Lage des RLS.

Am E12,5 waren SA-Knoten und der SA-Ring erkennbar, ein Bündel in der posterioren Wand des rechten Vorhofes, das in Richtung AV-Knoten zog. Der AV-Knoten, im posterioren AV-Kanal lokalisiert, stand in Verbindung mit dem His-Bündel. Bündeläste entwickelten sich an der Spitze und entlang des knospenden interventrikulären Septums. Das RLS erschien am E13,5 beinahe ausgereift. So war zu diesem Zeitpunkt bereits das distale Purkinje Netzwerk im rechten und linken Ventrikel erkennbar. Das His-Purkinje-System ist also bereits vor der vollständigen Ventrikelseptierung funktionsfähig (Rentschler et al., 2001).

Das RLS der Maus entwickelt sich in ständiger Wechselwirkung mit dem Endokard. Neuregulin-1 ist ein für die ventrikuläre Trabekelbildung essentieller Wachstums- und Differenzierungsfaktor des Endokards. Weiterhin scheint das endokardiale Neuregulin-1 als Induktor zu fungieren. Durch die Neuregulin-1-Induktion differenzieren sich die embryonalen Kardiomyozyten in Zellen des RLS (Rentschler et al., 2002).

Die morphologische Färbung in Abb. 3 weist auf eine starke Expression des Gens POP1A im Reizleitungssystem des Mauserzens hin. Die Funktion des Gens im RLS ist jedoch nicht näher bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Funktion des Gens im RLS näher definiert werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Tiere und Tierhaltung**

Sowohl der Entwurf als auch die Durchführung der Versuche erfolgte streng nach den allgemeinen und lokalen Richtlinien des Tierschutzes (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (NIH publication No. 85- 23, revised 1996)).

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Münster am 20. Januar 2005 unter der Nummer G83/2004 genehmigt.

#### Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden im Institut für Zell- und Molekularbiologie der Technischen Universität Braunschweig in Zusammenarbeit mit dem Basil and Gerald Felsenstein Medical Research Center, Tel-Aviv University in Israel und dem Institut für Entwicklungsbiologie und Molekularpathologie der Universität Braunschweig entwickelt und vermehrt.

In dieser Arbeit werden Mäusen mit homozygoter Nullmutationen des POP1A Gens (Popdc1<sup>-/-</sup>) untersucht. Das 1. kodierende Exon von POP1 wurde durch ein LacZ-Reporter gen ersetzt (Andrée et al., 2002), und die Kontrollelemente von POP1 blieben vorhanden.

#### Tierhaltung

Alle Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ II auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Zusätzlich wurden die Käfige mit 2 Papiertüchern als Nestmaterial ausgestattet, um den Tieren eine Rückzugsmöglichkeit zu bieten. Tiere, die nur für elektro- oder echokardiographische Untersuchungen verwendet wurden, wurden in Gruppen bis zu 4 Tieren aufgestellt. Während der Telemetriephase wurden die Tiere einzeln gehalten.

Für alle Tiergruppen lag die Raumtemperatur bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , die relative Luftfeuchtigkeit bei  $55 \pm 5\%$ , die Belichtung fand von 07.00 bis 19.00 MEZ statt.

Pelletiertes, autoklaviertes Haltungsfutter für Ratten/Mäuse der Firma Altromin GmbH (Lage, D) (Inhaltsstoffe: Rohprotein 19,0%, Rohfett 4,0%, Rohfaser 6,0%, Rohasche 7,0%, Calcium 0,9% und Phosphor 0,7%; Zusatzstoffe je kg: Vit. A 15.000 IE, Vit. D<sub>3</sub> 600 IE, Vit. E 75 mg, Kupfer 5 mg) wurde ad libidum gefüttert, zusätzlich wurde Leitungswasser aus Tränkeflaschen ad libidum bereitgestellt. Alle Tiere wurden nach Ablieferung in demselben Raum gehalten, in dem alle nachfolgenden Versuche stattfanden.

### Versuchsabläufe

Die nachfolgend beschriebenen Versuche durchliefen insgesamt 24 Mäuse, 12 knock-out-Mäuse mit homozygoten Nullmutationen ( $Popdc1^{-/-}$ ) und 12 Wildtypgeschwistertiere (WT). Die Versuche wurden paarweise mit je einem „knock-out“ und einem WT-Geschwistertier durchgeführt. Die einzelnen Mäuse wurden entweder gleichzeitig bei der Telemetrie oder direkt hintereinander (Oberflächen-EKG, Echokardiographie, isoliertes, schlagendes Herz) untersucht.

In der Planung der Protokollabschnitte wurde berücksichtigt, dass für jedes Tier sämtliche angesetzte Versuche (Oberflächen-EKG, Echokardiographie, Telemetrie und isoliertes, schlagendes Herz) nacheinander und mit genügend zeitlichem Abstand zueinander durchgeführt wurden.

Mit Diazepam sedierte Mäuse, 12 WT-Tiere im Alter von  $29,6 \pm 0,9$  Wochen und 12  $Popdc1^{-/-}$ -Tier von  $30,3 \pm 0,8$  Wochen, wurden echokardiographisch untersucht. Unter Isoflurannarkose wurden 11 WT-Tiere,  $33,4 \pm 4$  Wochen alt, und 12  $Popdc1^{-/-}$ -Tiere,  $34,4 \pm 1,3$  Wochen alt, einer Ultraschalluntersuchung unterzogen. Vor und nach den Ultraschalluntersuchungen wurde ein Oberflächen-EKG erstellt.

Bei 8 Tieren, 4  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen im Alter von  $40 \pm 0,9$  Wochen und 4 WT-Tieren im Alter von  $43 \pm 1,4$  Wochen, wurde ein telemetrisches Langzeit-EKG aufgezeichnet. Es wurden immer eine WT- und eine  $Popdc1^{-/-}$ -Maus nacheinander operiert. Jeweils 4 Mäuse gleichzeitig wurden definiert belastet („hot air jet“-Stress).

5 Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit  $38,5 \pm 1,9$  Wochen und 5 WT-Mäuse mit  $34,8 \pm 4,5$  Wochen mit Urethan tief narkotisiert und heparinisiert. Nach Überprüfung der Schmerzfreiheit wurden den Mäusen die Herzen entnommen und die isolierten schlagenden Herzen nach Langendorff perfundiert und untersucht.

## **3.2. Elektrophysiologische Messungen**

### 3.2.1. Oberflächenelektrokardiogramm bei sedierten Mäusen

Es wurden digitale 6-Kanal-EKGs mit den bipolaren Standardableitungen I, II und III nach Einthoven und den unipolaren Ableitungen aVF, aVL und aVR nach Goldberger für mindestens 10 Sekunden als so genanntes Oberflächen-EKG abgeleitet (Korte et al., 2002) und aufgezeichnet.

Oberflächen-EKGs wurden vor und nach einer Ultraschalluntersuchung jeder Maus aufgezeichnet. Vor EKG-Aufzeichnung und folgendem Ultraschall wurde den Mäusen 0,0175 mg pro kg KG Diazepam (Valium®) intraperitoneal injiziert. Während einer weiteren Ultraschalluntersuchung wurden die Mäuse mit Isofluran (Narkoseeinleitung 4% Isofluran, 96% Sauerstoff, Erhaltung 1,5-2% Isofluran, 98-98,5% Sauerstoff) narkotisiert. Die dopplerechokardiographische Untersuchung wurde nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (2 mg/ kg KG), intraperitoneal injiziert, wiederholt.

Während der EKG-Aufzeichnung waren die narkotisierten Mäuse in Rückenlage auf einer Wärmeplatte zur Erhaltung der Körpertemperatur auf 37°C mit leicht abgespreizten Extremitäten fixiert. Um die Gliedmaßen waren in Elektrodengel getauchte Schlaufenelektroden aus weichem, geflochtenem, nicht oxidierbarem Stahldraht gezogen, um ein 6-Kanal-Oberflächen-EKG aufzuzeichnen (Kirchhof et al., 2003; Fabritz et al., 2004). Die EKG-Schlaufenelektroden waren mit einem AC 264 EKG Verstärker (EMKA Technologies, Paris, Frankreich) verbunden, so dass ein digitales EKG mit „iox“-Software der EMKA Technologies (ecg Auto Version 1. 5. 7. 36.) auf dem Computer aufgezeichnet werden konnte.

### 3.2.2. Telemetrisches Langzeit-EKG bei wachen Mäusen

Die drahtlose Radiotelemetrie, die zur Übertragung von Messwerten Funkwellen verwendet wird, wurde zur telemetrischen Datenerfassung genutzt.

Aufbau der Anlage

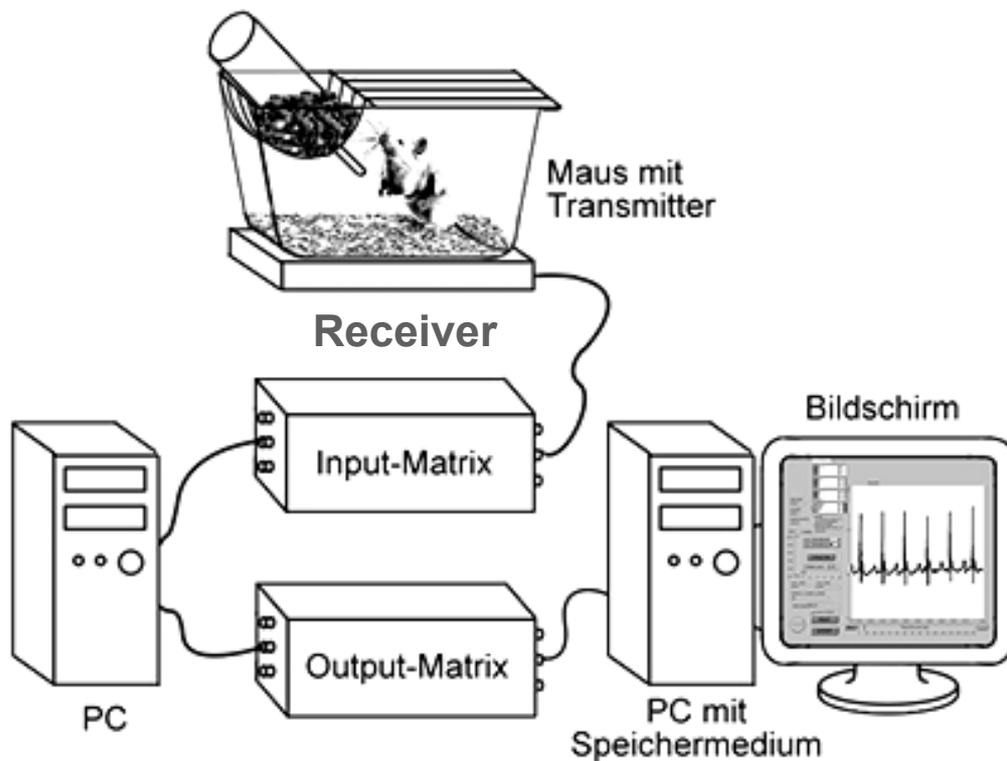


Abbildung 4: Telemetrie, schematische Darstellung des Aufbaus der Telemetrieanlage

Radiotelemetrie, die die Messung von Biosignalen frei beweglicher, nicht sedierter Tiere ermöglicht, wird als Biotelemetrie bezeichnet. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Biotelemetrie Elektrokardiogramme von Mäusen aufgezeichnet, die sich völlig frei bewegen konnten.

Die vom schlagenden Mauserz erzeugten Potenzialänderungen wurden von einem in den Mauskörper implantierten EKG-Transmitter registriert und die empfangenen Signale mit Hilfe von elektrischen Schaltsystemen innerhalb des Transmitters verstärkt und gefiltert. Die Signale wurden dann in Radiofrequenzsignale konvertiert und über weitere Schaltkreise und Antennen des Transmitters an einen Receiver gesandt. Dieser Receiver hatte die Form einer Platte, die sich unter dem Mauskäfig befand und die gesamte Käfiggrundfläche bzw. den gesamten Aktivitätsrahmen der Maus abdeckte. Die Radiofrequenzsignale wurden von dem Receiver empfangen, die vom Transmitter verstärkten Signale über ein Kabel an eine so genannte „Input-Matrix“ weitergeleitet. Hier wurden die Signale digitalisiert und gefiltert. Über ein weiteres Kabel wurden die Signale an einen Computer mit dem Programm „Dataquest A.R.T. Analog V1“ der Firma „Data Science International“ weitergeleitet, mit dem die Daten registriert und die Funktion der einzelnen Receiver überwacht werden konnten. Von hier wurden die Daten an die „Output-Matrix“ weitergeleitet, dort erneut analogisiert und anschließend an einen weiteren Computer weitergeleitet, der die Daten mit Hilfe der „iox“-Software der EMKA Technologies, Paris, Frankreich aufzeichnete (schematisch dargestellt in Abb. 4).

In dieser Arbeit wurde der kommerziell erhältliche, implantierbare Transmitter DSI TA10-EA-F20 (Abb. 5, Röntgenbild einer Maus) aus einem versiegelten, biokompatiblen Kunststoffgehäuse verwendet. Der Transmitter hat ein Volumen von 1,9 ml und ein Gewicht von ca. 4 g. Er enthält eine Batterie, einen Signalverstärker und Radiofrequenzelektronik. Am vorderen Ende entlässt der Transmitter 2 flexible, ca. 7 cm lange, rostfreie, flexible Stahldrähte. Diese sind mit farbigem Silikon zur Isolierung überzogen (rot (-) und weiß (+)). Der Transmitter kann mit Hilfe eines Magneten aktiviert oder deaktiviert werden. Der jeweilige Aktivitätsmodus kann durch Empfang der Amplituden-modulierten Signale mit einem handelsüblichen Radio überprüft werden. Ist der Transmitter implantiert, ist für jeden Herzton ein „Piep“-Ton hörbar. Auf diese Weise ließ sich auch ohne ein weiteres System die Herzfrequenz, z.B. intra- und postoperativ, überwachen.

Die subkutane Platzierung der Drahtenden des Transmitters innerhalb des Mäusekörpers (rechte Achselhöhle, linker Rippenbogen) ermöglicht die Ableitung der

Standardableitung II nach Einthoven (Abb. 5) (Kirchhof et al., 2003; Fabritz et al., 2004).

### Implantation des Transmitters

Die Maus wurde mit Isoflurangas anästhesiert. Nach Ausfall des Zwischenzehen-Reflexes wurde die Haut im Bereich des Bauches großzügig rasiert und anschließend mit einer medizinischen Enthaarungscreme vollständig von Haaren befreit.

Nun wurde die Maus auf eine steril abgedeckte Wärmeplatte, die über die rektal gemessene Körpertemperatur reguliert wurde, an allen 4 Gliedmaßen fixiert. Um die Wärmeaufnahme der Maus zu erhöhen, wurde der Schwanz ebenfalls auf der Platte fixiert. Zur Desinfektion der Haut im Operationsfeld diente ein handelsübliches Spray.

Zunächst wurde die Haut mit einem 2 cm langen medianen Bauchschnitt durchtrennt, anschließend subkutan die Unterhaut von der Muskulatur abgehoben, so dass 2 Kanäle für die Transmitterkabel entstanden. Ein Kanal reichte dabei bis in die rechte Achselhöhle, der andere bis kurz unter den letzten Rippenbogen linker Seite. Dann wurde die dann freiliegende Bauchmuskulatur entlang der Linea alba mit einer 2 cm-Inzision eröffnet. Der Transmitter wurde vorsichtig vollständig in die Bauchhöhle auf das Darmkonvolut geschoben. Die Drähte zeigten dabei beide in kaudale Richtung, die in das Transmittergehäuse eingelassenen Schlaufen in Richtung des Betrachters. Die Bauchmuskulatur wurde anschließend mit einer einfachen Knopfnahnt verschlossen. Durch Fixierung der 3 Schlaufen des Gehäuses in der Bauchnaht wurde ein Verrutschen des Transmitters verhindert. Im Bereich des kaudalen Wundwinkels wurde die Bauchmuskulatur auf der rechten Seite ca. 4 mm unterhalb des Wundrandes mit einem dünnen Trokar von außen nach innen durchstoßen, der rote Draht (negative Elektrode) wurde erst in eine Schleife gelegt und dann eingefädelt und nach außen gezogen. Mit dem weißen Draht (positive Elektrode) verfuhr man ebenso an der anderen Bauchwandseite. Nun wurde die restliche Bauchmuskulatur mit Einzelheften aus nicht resorbierbarem Nahtmaterial vollständig verschlossen. Anschließend wurden die Kabelenden mit Silikonhütchen versehen, um eine Durchstechung der Haut durch die Kabelenden zu vermeiden, und dann mit einer Pinzette in die vorbereiteten subkutanen Kanäle eingelegt. Das rosafarbene Kabel endete nun in Höhe rechte Achselhöhle und

wurde an der Flanke per Knopfnahat an dem Bauchmuskel festgenäht. Das weiße Kabel reichte an der linken Mauseite bis unter den Rippenbogen, und die nicht isolierte Stelle wurde so an den Muskel genäht, dass sie vollständig von Muskel umgeben war.

Zu diesem Zeitpunkt konnte dann die Herzfrequenz mit Hilfe eines Radios bereits überprüft werden.

Nun wurden die Hautwunden mit fortlaufenden Kürschnernähten aus resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Zum Infektionsschutz wurde die Hautnaht mit einem handelsüblichen Sprühpflaster versehen.

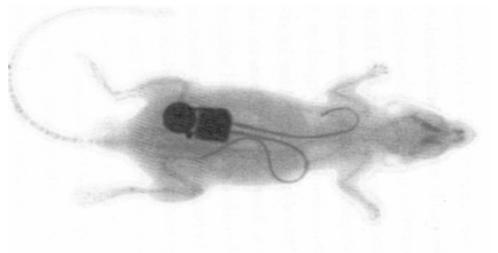


Abbildung 5: Röntgenbild einer Maus mit implantiertem EKG-Transmitter

Die Gesamtzeit der Operation (von Narkosebeginn bis zum Hautverschluss) betrug bei den WT-Mäusen  $40 \pm 3,5$  Minuten und bei den  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen  $44 \pm 0,75$  Minuten. Die Mäuse wurden nach der Operation zurück in den Käfig gelegt und erhielten zur Regulation des Flüssigkeitshaushaltes 2 ml Sterofundin® subkutan in 2 bis 4 Dosen innerhalb von 15 Minuten direkt im Anschluss an die Operation. Des Weiteren wurden die Mäuse noch 4-12 h nach der Operation unter Rotlicht gehalten, um eine Auskühlung in der Aufwach- und Erholungsphase zu vermeiden. Ein Analgetikum (Ibuprofen 7 mg/kg) wurde über 4 Tage über Trinkwasser und eingeweichte Futterpellets verabreicht. Bei Bedarf wie einer postoperativen Entzündungsreaktion wurde ein Antibiotikum (Enrofloxacin 5 mg/kg) eingesetzt. Die Mäuse wurden täglich gewogen, die fortschreitende Wundheilung kontrolliert und das telemetrische EKG zur Überwachung aufgezeichnet.

Nach einer ausreichenden Wundheilungsperiode von  $13 \pm 1$  Tagen wurde mit den Messungen begonnen.

### 3.2.3. Elektrophysiologische Untersuchungen am isolierten Herzen

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden an nach Langendorff perfundierten schlagenden Herzen (Abb. 6) vorgenommen (Kirchhof et al., 2003; Fabritz et al., 2004; Kirchhof et al., 2006).

Dazu wurde die Maus zunächst mit Urethan (2g/kg KG Urethane in einer 2mg/kg KG NaCl- Lösung) tief narkotisiert. Außerdem wurde ein NaCl-Heparin (250 IE Natrium-Heparin, Liquemin®)-Gemisch intraperitoneal injiziert. Nach Ausfall des Zwischenzehen-Reflexes wurde der Maus zügig das Herz entnommen, indem zunächst die Haut und der knöchern-knorpelige Brustkorb durchtrennt und dann das Herz herauspräpariert wurde. Dabei wurde die Vena cava am rechten Vorhof und die Aorta auf Höhe des Aortenbogens durchtrennt und dann das Herz samt anhängendem Lungengewebe der Brusthöhle entnommen. Der Organkomplex wurde sofort in eine warme präoxygenierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung gegeben, das Herz von den Lungen und dem mediastinalen Gewebe befreit und die Gefäßenden gekürzt. Die nun nur noch 3mm lange Aorta wurde über eine 27 Gauge- Kanüle gestülpt und mit einem Seidenfaden (metric 3) daran fixiert. Dann wurde das Herz in die Langendorff-Apparatur (Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland) gehängt und sofort retrograd via Aortenkanüle von einem 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer mit einem konstanten Fluss von  $2 \pm 1$  ml/min und einem konstanten Perfusionsdruck von  $110 \text{ mmHg} \pm 5$  durchströmt. Der Puffer besteht aus (in mmol/l) NaCl 118;  $\text{NaHCO}_3$  24,88;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18; Glucose 5,55; Na-Pyruvat 2;  $\text{MgSO}_4$  0,83;  $\text{CaCl}_2$  1,8; KCl 4,7. Das Perfusat wurde über einem 39,8°C warmen Wasserbad (Durchlauferhitzer, Lauda ecoline® 003) erwärmt und über eine Glasfritte moderat mit 95% Sauerstoff und 5%  $\text{CO}_2$  begast. Über eine Rollerpumpe (Isomatic® Hugo Sachs Electronic) und mit Hilfe eines Perfusionsautomaten (Perfusor® sacura B-Braun) erfolgte die Zufuhr der Wirkstoffflüssigkeit. Der Zufluss war mit einem Überdruckabflusssystem versehen. Eine verstellbare Druckmembran diente der Injektionsdruckregulation. Mit Hilfe einer Wärmelampe wurde eine Auskühlung des Herzens zusätzlich verhindert. Um artifiziellen Gewebeschädigungen vorzubeugen, wurde an der linksventrikulären Seite des Apex cordis eine Injektionskanüle mit einem Durchmesser von 0,3 mm gestochen, um so den Druck im Ventrikel zu mindern.

Des Weiteren wurde ein 2.0 French oktapolarer Katheter mit 0,5 mm breiten Elektroden und 0,5 mm breiten Zwischenräumen (Ciber mouse, NuMED, Inc., Hopkinton, N.Y., USA) über eine 2 mm große iatrogene Öffnung zunächst in den rechten Vorhof und später im Versuchsverlauf weiter in die Spitze der rechten Kammer in Septumnähe platziert, um in diesen Lokalisationen das Herz zu stimulieren sowie ein intrakardiales Elektrogramm abzuleiten. Dieser Katheter wurde zur Stimulation eingesetzt. Die EKG- Aufnahmen wurden über Ag-AgCl-Elektroden, die mit Hilfe gefederter Halterungen über flüssigkeitenthaltende Schwämme den Kontakt mit dem Epikard halten, aufgezeichnet. Die EKG-Signale wurden von einem Vorverstärker (Hugo Sachs, March- Hugstetten, Deutschland) mit einer Bandbreite von 0,1-300 Hz verstärkt und gefiltert. 3 monophasische Aktionspotenziale (MAP) wurden gleichzeitig aus dem rechten (MAP1) und linken Ventrikel (MAP2 posteriore Wand, MAP3 Septum) im Bereich des Epikards aufgenommen. Die MAP-Katheter waren an gefederten Halterungen befestigt, um eine konstante Andruckstärke der Katheter senkrecht zum Epikard zu gewährleisten. Die MAPs wurden mit DC-gekoppelten Vorverstärkern verschaltet (Modell 2000, EP Technologie, San Jose, CA, USA), die Signale mit einer speziell angepassten halbautomatischen Software (Labview®) zur Analyse der Repolarisation der Mäuseherzen digitalisiert und aufgezeichnet. Dieses Programm wurde in der Arbeitsgruppe Kirchhof/ Fabritz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Knollmann/ Morad und Franz, Dept. of Pharmacology, Georgetown University, Washington DC erstellt.

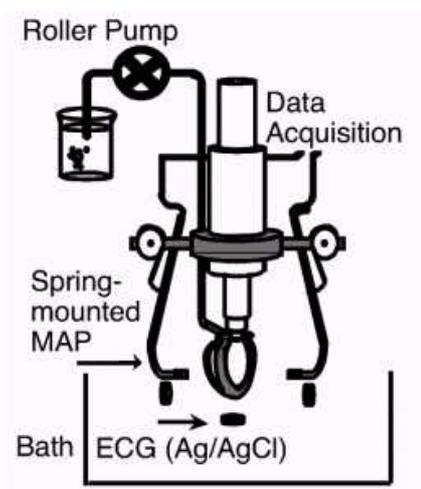


Abbildung 6: Untersuchungen am isolierten Herzen, Langendorff-Apparatur

Nach einer zehnmütigen Erholungsphase, in der sich Signalqualität und Sinusrhythmus nach der Präparation stabilisierten, wurde mit dem oktapolaren Katheter ein Stimulationsprotokoll durchgeführt, um die Refraktärzeit des AV-Knotens zu ermitteln. Zur Ermittlung der AV-Knotenüberleitungszeit (Wenckebach-Punkt) wurden bei der Stimulation die Zykluslängen verändert. Währenddessen wurden simultan ein Elektrogramm im rechten Vorhof und drei monophasische Aktionspotenziale sowie ein EKG im rechten und linken Ventrikel abgeleitet. Nach AV-Stabilisierung wurde bei regelmäßigem Herzschlag das intrakardiale EKG des RVA für die Bestimmung der spontanen Zykluslänge aufgezeichnet. Danach wurde dem Perfusat in einer fünfminütigen Einlaufphase Orciprenalin (2,5 mg/l) mit einer Geschwindigkeit von 90 ml/h hinzugefügt. Direkt anschließend wurde das Protokoll wiederholt.

### 3.2.4. Auswertung elektrophysiologischer Untersuchungen

#### 3.2.4.1. Oberflächenelektrokardiographie

Alle Auswertungen erfolgten bezüglich des Genotyps (Popdc1<sup>-/-</sup>, WT) geblindet. Die Auswertung des Oberflächen-EKG erfolgte mit der Software „ecg Auto 1.5.7.36“ (EMKA Technologies, Paris, Frankreich). Das Programm arbeitet mit EKG-Schablonen, auf die das auszuwertende EKG abgesucht wird. In jeder EKG-Schablone wurden folgende Punkte markiert: Anfang, Höhepunkt und Ende der P-Welle, Q-, R- und S-Zacke am höchsten Amplitudenpunkt, Anfang und Ende der T-Welle sowie die Nulllinie. Das Programm legt automatisch bis zu 20 einzelne Herzschläge übereinander und erstellt somit einen durchschnittlichen Komplex, „average beat“. Auf diese Weise berechnet das Programm bei drei willkürlich ausgesuchten „average beats“ Dauer (ms), Amplitude (mV) und absolute und relative Fläche (mV\*ms) der P- Welle, des QRS-Komplexes und der T-Welle, den PR-Abstand (ms), S- bis- Anfang- T-Welle (ms) sowie RR- Abstand (ms) und Herzfrequenz (Schläge/min).

Diese Auswertung erfolgte für jede Standardableitung (I, II, III, aVF, aVL, aVR). Aus den drei Einzelwerten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden Parameter bestimmt.

### 3.2.4.2. Telemetrie

Die Auswertung der telemetrischen Daten von acht Mäusen erfolgte mit dem Software-Programm „ecg Auto 1. 5. 12. 14.“ der EMKA Technologies, Paris, Frankreich. Wie bereits unter 2.2.1. unter Oberflächenelektrokardiographie beschrieben wurden die verschiedenen EKG-Parameter mit Hilfe des „average beat“ bestimmt. Das Software-Programm bestimmte die HF mit Hilfe der Einstellung „RR only“. Dabei misst das Programm den Abstand zwischen jeder R-Zacke.

Es lag immer aufgrund der Lage des Transmitters im Mäusekörper die Standardableitung II nach Einthoven vor.

*24h-EKG:* Die jeweils ersten fünf Minuten jeder Stunde über 24 Stunden hinweg wurden ausgewertet.

*Ruhe-EKG:* Es wurde in dem Zeitraum 13-14 Uhr eine Stunde Telemetrieaufzeichnung ausgewertet.

*„hot air jet“-Stress:* Hierbei wurden in zwei Durchgängen jeweils vier Mäuse einer fünfzehnminütigen Belastung ausgesetzt, die aus einem warmen, gegen den Fellwuchs gerichteten Luftstrom bestand. Dieser Luftstrom wurde mit einem handelsüblichen Haartrockner erzeugt und fünfzehn Mal für 15 Sekunden auf eine Maus gerichtet. Dieser „mentale Stress“ mit wiederholtem warmen Luftstrom bewirkt eine erhöhte HF (Johansson et al., 1998; Kirchhof et al., 2006) sowie einen erhöhten systemischen Blutdruck und eine erhöhte Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Knollmann, Kirchhof et al., 2003).

Während des Air Jets befanden sich die Mäuse in vier Käfigen, die auf vier Receiverplatten standen.

*Nach Air Jet:* Die Telemetriedaten in der der Belastung folgenden Stunde werden aufgezeichnet (Kirchhof et al., 2002).

### 3.2.4.3. Elektrophysiologische Untersuchungen am isolierten Herzen

Alle Aufzeichnungen wurden offline vollständig visuell kontrolliert und semiautomatisch mit Labview ausgewertet.

*Spontane Zykluslänge:* Sie wurde ermittelt, indem im intrakardialen Elektrogramm des RVA die A-A-Abstände bei regelmäßigem Herzschlag nach AV-Stabilisierung bestimmt wurden.

*Incremental atrial pacing (IAP):* Refraktärzeit des AV-Knotens. Der Vorhof wurde dabei für je 8 Sekunden mit einer jeweils um 10 ms kürzer werdenden Zykluslänge stimuliert, bis die Zykluslänge erreicht war, bei der nicht mehr alle Stimuli übergeleitet wurden. Die Zykluslänge/ Herzfrequenz, bei der der erste Impuls nicht mehr über den AV-Knoten übergeleitet wird, wird auch als Wenckebachpunkt bezeichnet.

### **3.3. Echokardiographie**

Nach der Narkoseinduktion (Diazepam oder Isofluran) wurde die Maus im Bereich des linken und ventralen Brustkorbs sowie an der Innenseite des linken Vorderbeins mit Hilfe eines Rasierers und einer medizinischen Enthaarungscreme vom Haarkleid befreit. Anschließend wurde die sedierte und enthaarte Maus in Rückenlage auf eine Wärmeplatte, die über die Rektaltemperatur der Maus reguliert wurde, gelegt und mit Klebestreifen an allen vier Extremitäten sowie über Bauch und Schwanz mit Leukosilk® fixiert. Mit Elektrodengel benetzte EKG-Elektrodenplättchen wurden unter beide Vorderpfoten und die linke Hinterpfote geschoben, so dass während der Ultraschalluntersuchung simultan ein einkanaliges EKG aufgezeichnet wurde. Zum Ausschluss externer Störfaktoren wurde an der rechten Hinterpfote eine Erdelektrode angebracht. Laufend wurde vom Ultraschallgerät Philips Sonos 5500, Philips, Hamburg die Herzfrequenz der Maus bestimmt. Im Fall eines Herzfrequenzabfalls unter 250 Schläge für länger als 3 Minuten oder eines Körpertemperaturabfalls auf unter 33°C

wurden tachykardisierende Gegenmaßnahmen wie weitere Wärmequellen, Massage und Reflexauslösung ergriffen.

Die Wärmeplatte wurde in einen Winkel von 15° gekippt, so dass die Maus in linker Seiten-Rückenlage zu liegen kam. Der Brustkorb wurde mit zentrifugiertem sowie angewärmtem Ultraschallgel bedeckt.

Zunächst wurden mit einem 15 MHz Linearschallkopf standardisierte zweidimensionale Längs- und Querschnitte vom Herz erstellt. Hierbei wurden Standardeinstellungen aus der Humanmedizin, lange und kurze parasternale Achse, gewählt. Bei den Untersuchungen wurde der Schallkopf leicht in das Ultraschallgel getaucht, wobei kein Druck auf die Maus ausgeübt wurde.

Um einen Längsschnitt durch das linke Herz zu erhalten, wurde der Schallkopf von der rechten Schulter zum linken Rippenbogen weisend gehalten. In dieser Darstellung des linken Herzens (Abb. 8) lag das Septum horizontal. Schallkopfnah lag der rechte Ventrikel, der sich in diesem Schnitt nur mit Einschränkung beurteilen ließ. Vorder- und Hinterwand der Aorta waren rechts im Bild sichtbar. Im Übergang zum Ventrikel erkannte man die diastolisch geschlossene Aortenklappe mit Mittelecho innerhalb der Aorta. Unterhalb der Aorta lag schallkopffern der linke Vorhof, der über die Mitralklappe mit dem Ventrikel verbunden war. Links im Bild lag der Ventrikel. Ein- und Ausflussbahn waren in dieser Bildeinstellung zu beurteilen.

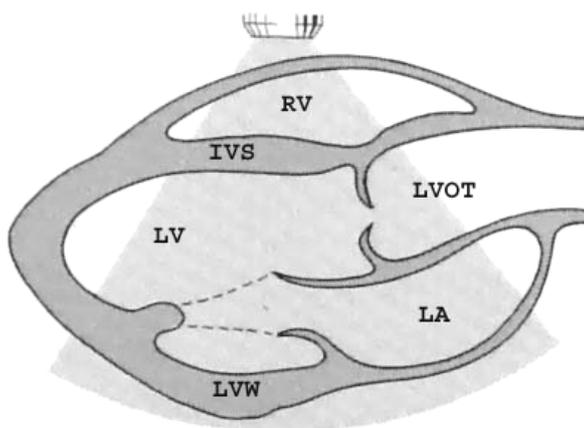


Abbildung 7: Echokardiographie, schematische Darstellung einer Längsachsenansicht des Herzens, (aus Köhler and Tataru, 2001)

Um die Querachsenansicht einzustellen, wurde der Schallkopf um 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Die Standardeinstellung wurde durch die Papillarmuskeleinstellung repräsentiert. In dieser Einstellung (Abb. 9) war der linke Ventrikel kreisrund dargestellt. Schallkopffern waren die beiden kreisrunden Echos der Papillarmuskeln innerhalb des linken Ventrikels sichtbar. Kappenförmig schmiegt sich der rechte Ventrikel oben links im Bild an den linken Ventrikel. Ein Scan von der Aorten- und Mitralklappenebene bis zur Herzspitze wurde ebenfalls durchgeführt.

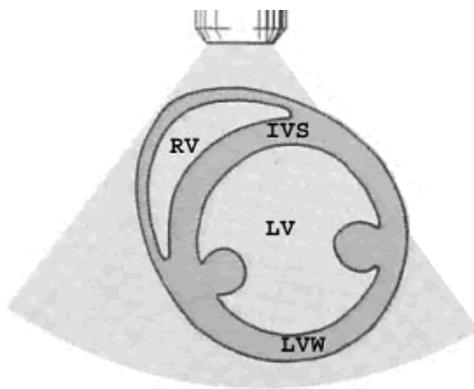


Abbildung 8: Echokardiographie, schematische Darstellung einer Queransicht der Herzens  
(aus Köhler and Tataru, 2001)

Time-Motion-Modes (M-Mode) wurden in der Längsachsensicht dicht unterhalb der Mitralklappe mit Darstellung der rechten Ventrikelwand und des rechten Ventrikels, des interventrikulären Septums, des linken Ventrikels und der linken Ventrikelwand gemacht. Bei im Querschnitt auf Papillarmuskelebene angefertigten M-Modes wurde ein Schallstrahl genau zwischen die beiden Papillarmuskeln gelegt. Auf diese Weise konnten die gleichen Strukturen wie im Längsschnitt dargestellt werden.

Die Doppler-Echokardiographie wurde mit einem 12 MHz Sektorschallkopf durchgeführt, dem eine ca. 1 cm lang Vorlaufstrecke, bestehend aus einem Zeigefinger eines handelsüblichen puderfreien Latexhandschuhs, zur Linearisierung der Ultraschallsignale vorgeschaltet wurde. Es wurde das CW (continuous wave)-

Dopplerverfahren eingesetzt, um den Blutstrom im Bereich der Aorten- und Mitralklappe darzustellen. Bei diesem Verfahren werden ständig Ultraschallwellen ausgesandt und gleichzeitig empfangen. So können langsame, aber auch sehr schnelle Geschwindigkeiten registriert werden, und es entstehen typische Dopplerfrequenzspektren, mit deren Hilfe der gedoppelte Gefäßbereich definiert und die Flussgeschwindigkeiten gemessen werden können (Poulsen and Tobias (Hrsg), 2001). Der Schallkopf wurde dabei so ausgerichtet, dass im 2D-Bild die Querachse des Herzens links parasternal dargestellt wurde. Der Strahl wurde durch die Aorta gelegt.

Um den Blutstrom durch die Mitralklappe erfassen zu können, wurde der Schallkopf stark geneigt, so dass er in Verlängerung die rechte Schulter der Maus treffen würde. Diese Schallkopfhaltung entspricht annähernd dem apikalen Vierkammerblick. Bei diesen Untersuchungen entstanden Kurven, die denen des Menschen und des Hundes ähneln.

Im Folgenden wurden der Maus 2 mg pro kg Körpergewicht Isoprenalin intraperitoneal injiziert. Da die Isoprenalinwirkung nur wenige Minuten anhielt, wurde dann sofort die Querachsenansicht durch die Papillarmuskelebene mit dem 15 MHz-Linearschallkopf dargestellt. M-Modes wurden in dieser Ebene angefertigt. Es folgte rasch die Doppler-Echokardiographie mit dem 12 MHz- Sektorschallkopf, der den Blutstrom durch Aorten- und Mitralklappe erfasste.

Die Bilddaten wurden digital auf Magneto-Optical Disc zur off-line-Analyse aufgezeichnet.

Nach der Untersuchung wurde die Maus von ihrer Fixierung sowie von allen Apparaturen befreit. Anschließend wurde sie mindestens zwei Stunden unter Rotlicht gehalten.

Von der Sedierung bis zum Ende der Untersuchung vergingen in der Regel ca. 30-40 Minuten.

## Auswertung

Alle Messungen erfolgten offline und geblindet gegenüber dem Genotyp (Popdc1-/-/-, WT). Einzelne Variablen, die sich nicht optimal messen ließen oder bei denen die Anschallebene nicht den oben beschriebenen Standardschnitten entsprach, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Messungen der einzelnen Parameter erfolgten mit dem in das Echokardiographiegerät integrierten Messsystem. Bei quantitativen Distanzmessungen wurde nach der „Leading-Edge-Methode“, entsprechend den Leitlinien der amerikanischen Gesellschaft für Echokardiographie, verfahren, d.h. es wurde von der Vorderkante der jeweils interessierenden Echolinie gemessen.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

In den zweidimensionalen Standardeinstellungen wurden acht Parameter gemessen. In der enddiastolischen Längsachsensicht wurden der linksventrikuläre Ausflusstrakt (LVOT) an der engsten Stelle vor der Aorta und der Aortenwurzeldurchmesser (AoV) in Klappenhöhe gemessen. Es erfolgten 5 Messungen in 5 verschiedenen Einstellungen, die im Anschluss gemittelt wurden.

Im M-Mode wurden die Wanddicken und der Ventrikeldurchmesser des linken Herzens bestimmt. In der Enddiastole wurden die Wanddicken des interventrikuläres Septum (IVSd) und der linksventrikulären Kammerwand (LVWd) erfasst. Die Ausmessung des linksventrikulären Ventrikeldurchmessers (LVEDd) erfolgte, während die dorsale Bewegung des Septums maximal und die Anteriorbewegung der linksventrikulären Hinterwand am größten waren. In der Systole wurde der Ventrikeldurchmesser (LVEDs) zum Zeitpunkt der maximalen Bewegung des Kammerseptums und der linksventrikulären Hinterwand bestimmt. Die kürzeste senkrechte Verbindung zwischen Septum und Hinterwand wurde gewählt. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Wanddicken des Septums (IVSs) und der Kammerwand (LVWs) erfasst. Die genannten Parameter wurden in 5 Einstellungen, in 2 M-Modus des Längsschnittes und 3 M-Modus des Querschnittes, gemessen. Aus den 5 Einzelwerten wurde ein Mittelwert errechnet. Alle Messwerte wurden in Millimeter angegeben.

Im CW-Doppler wurden 7 Parameter gemessen. Es wurden maximale Flussgeschwindigkeiten in der Aorta (AoVmax) als Punkt des frühsystolischen

Geschwindigkeitsmaximums im Aortendoppler gemessen. Des Weiteren wurden im Bereich der Aorta maximaler Druck (AoPGmax) und Durchschnittsdruck (AoPGmean) erfasst, außerdem der zeitliche Abstand zwischen zwei Aortenschlägen (Ao R-R) in ms. Im Mitralklappenbereich im atrioventrikulären Übergang wurden zu Beginn der Diastole direkt nach Klappenöffnung maximale Flussgeschwindigkeiten ermittelt (MV Vmax). Maximale (MV PGmax) und durchschnittliche (MV PGmean) Drücke wurden gemessen. Die genannten Parameter wurden jeweils in drei Einstellungen gemessen; aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert errechnet.

Aus den gemessenen Werten wurden folgende Parameter rechnerisch ermittelt:

<b>Parameter</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Formel</b>	<b>Einheit</b>
Herzfrequenz	HF	$1000 / \text{AoRR} \times 60$	Schläge/min
Herzzeitvolumen	HZV	Schlagvolumen x HF	ml/min
Linksventrikuläre Verkürzungsfraction	FS	$((\text{LVEDd}-\text{LVEDs}) / \text{LVEDd}) \times 100$	%
Linksventrikuläre Ejektionszeit	LVET	Zeit des Aortensignals	ms
enddiastolisches Volumen des LV nach Teichholz	EDV	$(7/2,4 + \text{LVEDd}) * \text{LVEDd}^3$	mm <sup>3</sup>
endsystolisches Volumen des LV nach Teichholz	ESV	$(7/2,4 + \text{LVEDs}) * \text{LVEDs}^3$	mm <sup>3</sup>
Ejektionsfraction d. LV nach Teichholz	EF nach Teichholz	$(\text{EDV}-\text{ESV}) / \text{EDV} * 100$	%
Zirkuläre Faserverkürzung nach HF korrigiert	Vcfc	$\text{Vcf} / \text{Wurzel} (\text{RR} \times 100)$	Circ/s
Schlagvolumen der Aorta	SV Ao	$(\text{AoV}/2)^2 * \pi * \text{LV VI VT}! * 10$	μl

Tabelle 1: Echokardiographie, errechnete Werte aus echokardiographischen bestimmten Daten

### **3.4 Statistik**

Die Analyse erfolgte bezüglich des Genotyps geblindet. Alle Variablen wurden nach Genotypen mit Hilfe des post-doc Student's T test (Microsoft Excel 2000) und ANOVA analyses (SPSS version 12) verglichen. Als signifikant wurden Unterschiede anerkannt, die einen p-Wert  $< 0,05$  zeigten. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

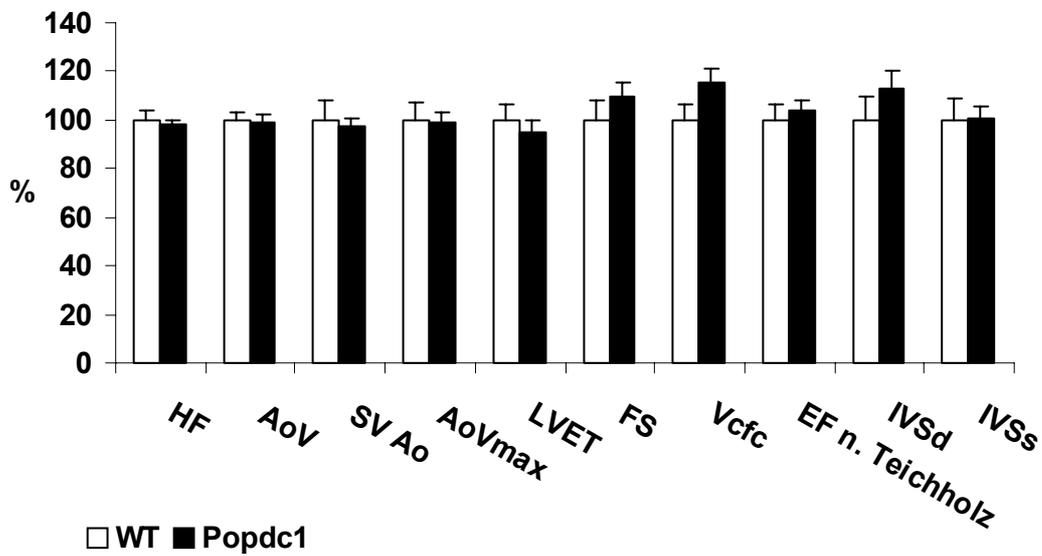
## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Normale Herzstruktur und kontraktile Funktion**

Unter Diazepamsedierung war bei der Ultraschalluntersuchung zwischen den Popdc1<sup>-/-</sup>- und den WT-Herzen in Herzstruktur und kontraktile Funktion kein Unterschied festzustellen (Abb.10A, 11A, 11B). Bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin zeigte sich zwischen den Popdc1<sup>-/-</sup>- und den WT-Tieren ebenfalls kein Unterschied (Abb.10B, 11C, 11D).

Weder unter Kontrollbedingungen noch bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse in der HF einen Unterschied zu den WT-Mäusen (Kontrollbedingung  $p= 0,66$ ; Isoprenalin  $p= 0,23$ ). Die WT-Mäuse reagierten auf Isoprenalin adäquat mit einem HF-Anstieg um 5,0 % im Vergleich zu Kontrollbedingung ( $p= 0,07$ ). Die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse dagegen reagierten inadäquat auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Die HF stieg unter Isoprenalin im Vergleich zu den Kontrollbedingungen um 2,1 % an ( $p= 0,56$ ).

A



B

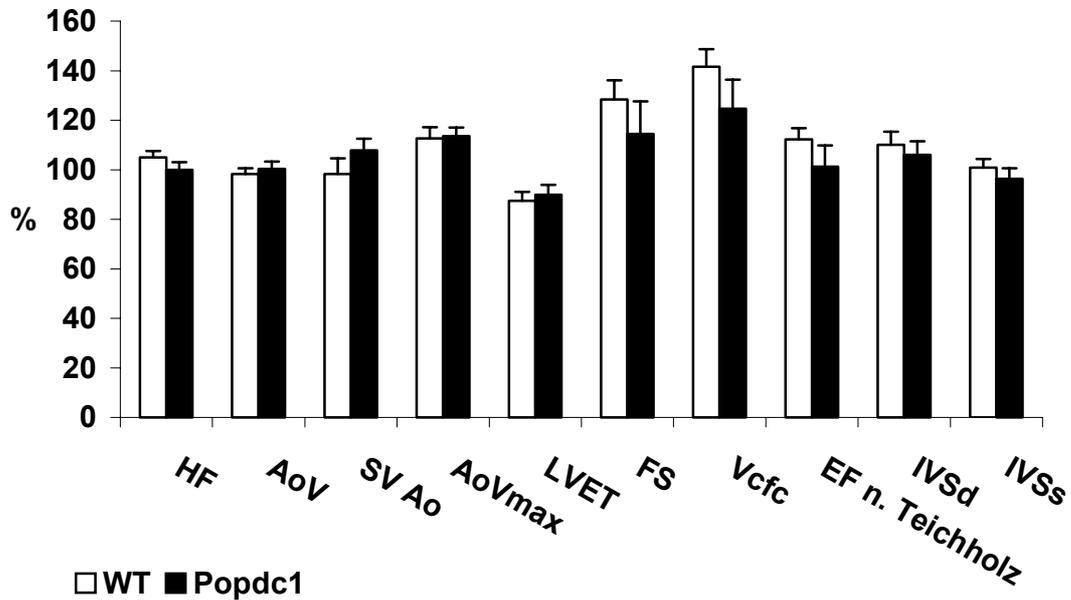
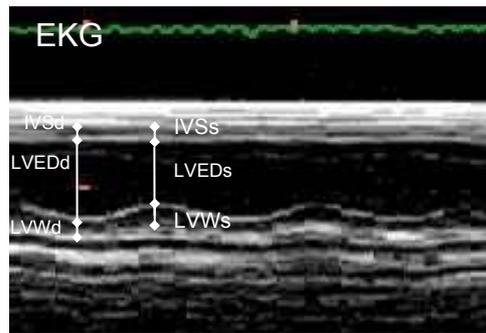
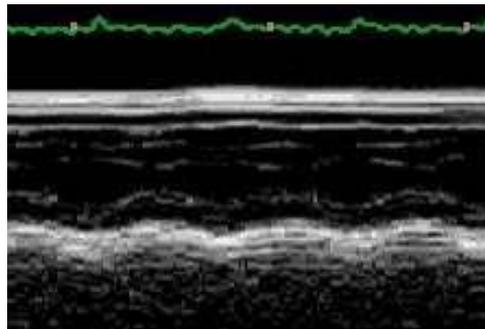


Abbildung 9a/b: Echokardiographie, Doppler-Echokardiographie. Verschiedene Parameter im Vergleich bei WT (n= 12 Mäuse) und Popdc1<sup>-/-</sup> (n= 12 Mäuse).  
 (A) Die untersuchten Mäuse wurden mit Diazepam (0,0175mg/kg KG) sediert (Kontrollbedingungen).  
 (B) Um die Mäuse kardial zu belasten wurde ihnen im weiteren Untersuchungsablauf 2mg/kg KG Isoprenalin injiziert.  
 Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

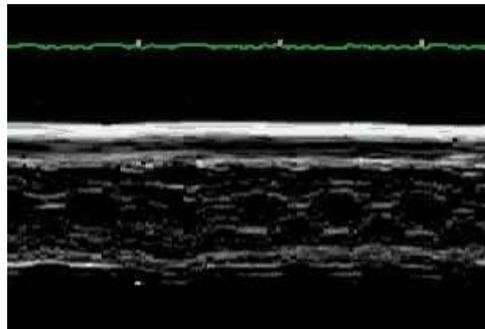
A



B



C



D

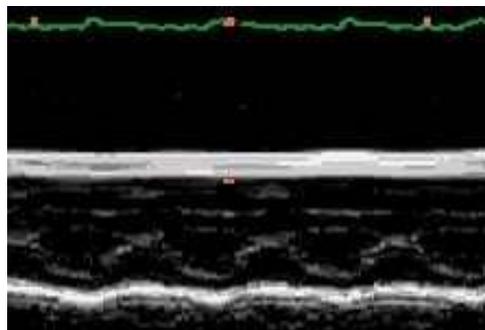


Abbildung 10a/b/c/d: Echokardiographie, M-Mode, Diazepamsedierung  
(A) WT Kontrollbedingungen  
(B) *Popdc1*<sup>-/-</sup> Kontrollbedingungen  
(C) WT nach Isoprenalininjektion  
(D) *Popdc1*<sup>-/-</sup> nach Isoprenalininjektion

#### **4.2. Unter Isoflurannarkose und $\beta$ -adrenerger Stimulation relative Bradykardie**

Unter Isoflurannarkose wurden sämtliche Mäuse ein weiteres Mal echokardiographisch untersucht. Isofluran bewirkte durch eine Erniedrigung des peripheren Gefäßwiderstandes eine HF-Abnahme. Die unter Isoflurannarkose ermittelten HF von WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen waren bradykard im Vergleich zu den HF von WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Diazepamsedierung ( $p < 0,05$  Isofluran vs. Diazepam).

Unter Isofluran-Kontrollbedingungen zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Tiere gleiche HF ( $p = 0,91$ ). Isoprenalingabe bewirkte bei WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen einen HF-Anstieg im Vergleich zur HF unter Kontrollbedingungen ( $p < 0,05$  Kontrolle vs. Isoprenalin). Unter Isoprenalinstimulation war die Popdc1<sup>-/-</sup>-HF relativ bradykard im Vergleich zur WT-HF ( $p = 0,01$  WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup>) (Abb. 11 und 13).

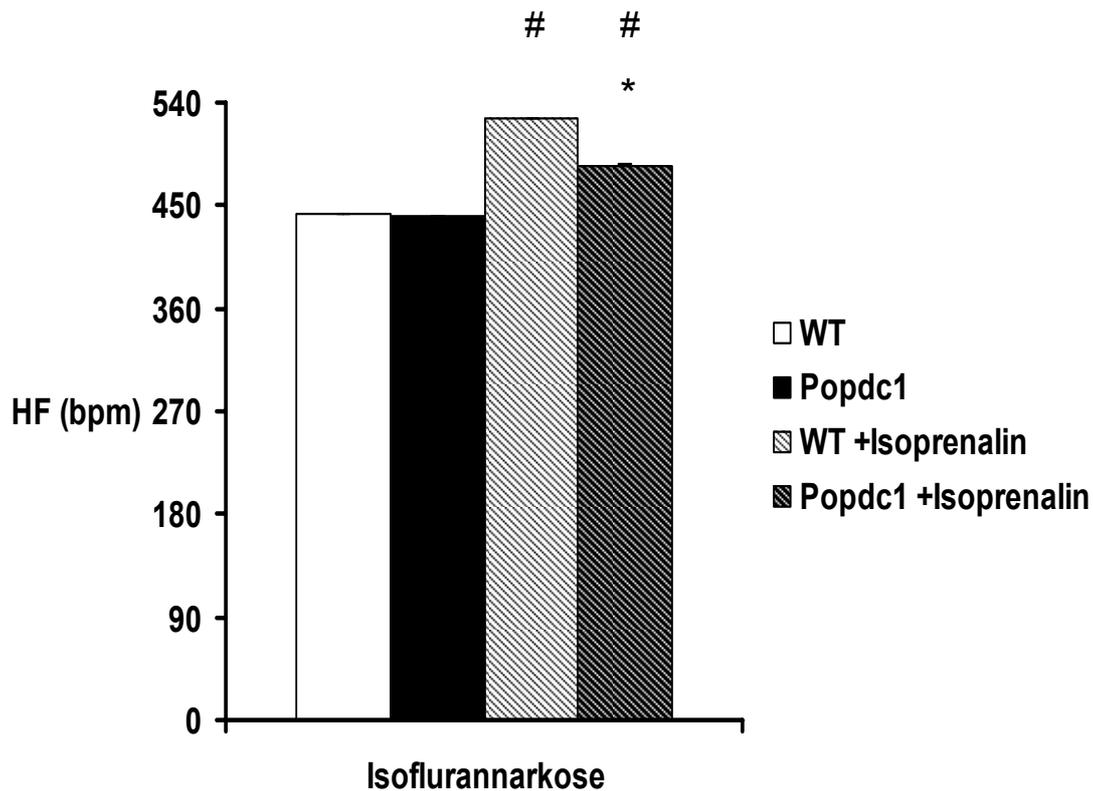


Abbildung 11: Doppler-Echokardiographie, HF unter Isoflurannarkose

\*  $p < 0,05$  WT (n= 11 Mäuse) vs. Popdc1<sup>-/-</sup> (n= 12 Mäuse)

#  $p < 0,05$  Kontrolle vs. Isoprenaline

Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

Unter Kontrollbedingungen zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse in der Doppler-Echokardiographie im Vergleich zu den WT-Mäusen über der Aortenklappe eine erhöhte maximale Geschwindigkeit (AoVmax) und einen erhöhten maximalen Druck (AoPGmax).

Während Stimulation mit Isoprenaline waren bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen neben der relativen Bradykardie eine verlängerte Ejektionszeit des linken Ventrikels LVET und über der Aorta eine erniedrigte maximale Geschwindigkeit (AoVmax) sowie ein erniedrigter maximaler Druck (AoPGmax) festzustellen (siehe Abb. 13 und 14). Außerdem neigten die Popdc1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT-Tieren zu einer erniedrigten maximalen Geschwindigkeit (MV Vmax) und zu einem erniedrigten maximalen Druck über der Mitralklappe.

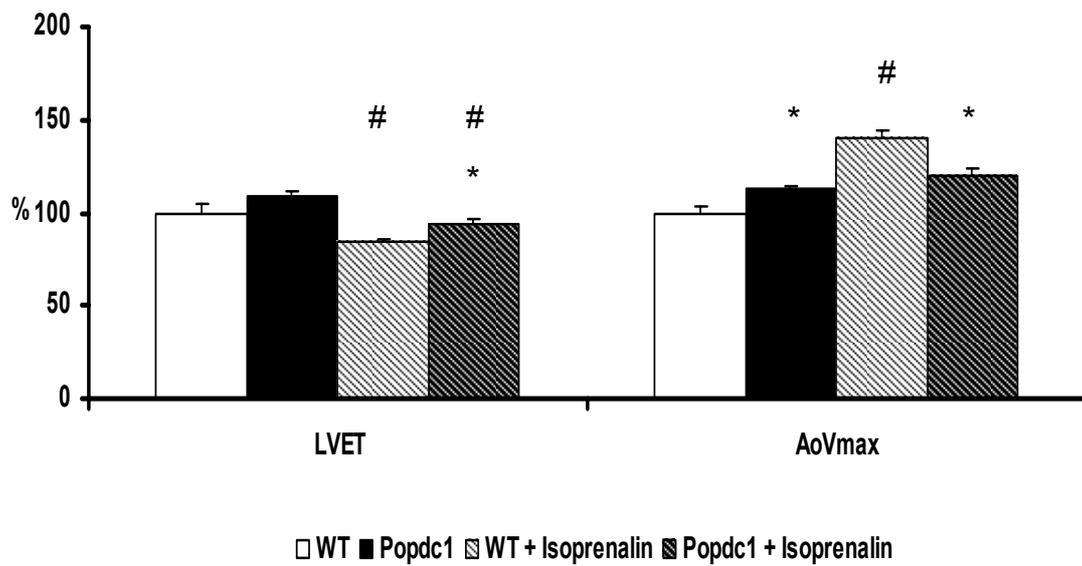


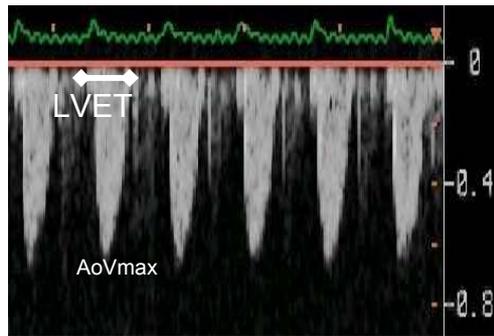
Abbildung 12: Doppler-Echokardiographie

\*  $p < 0,05$  WT (n= 11 Mäuse) vs. Popdc1<sup>-/-</sup> (n= 12 Mäuse)

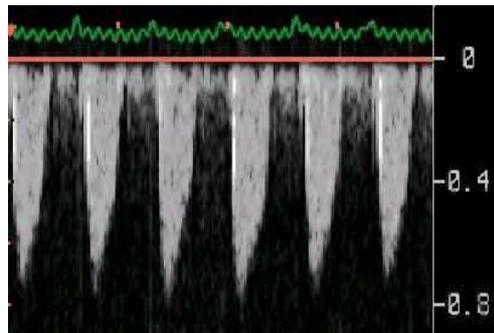
#  $p < 0,05$  Kontrolle vs. Isoprenalin

Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

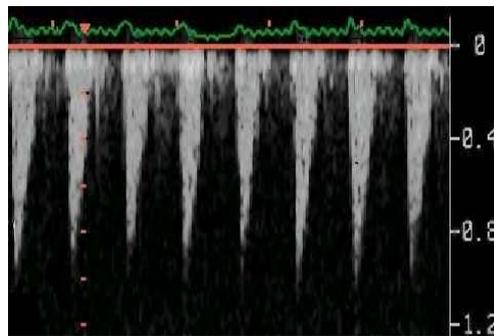
A



B



C



D

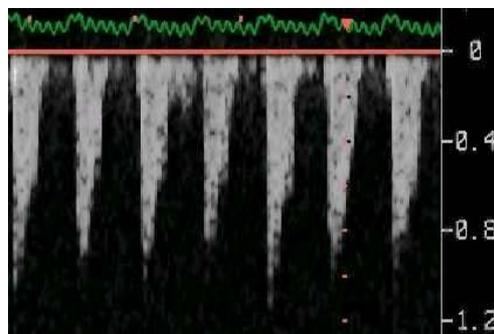


Abbildung 13: Doppler-Echokardiographie, 12 MHz Doppler, Aortenklappe  
(A) WT Kontrolle  
(B)  $Popdc1^{-/-}$  Kontrolle  
(C) WT nach Isoprenalininjektion  
(D)  $Popdc1^{-/-}$  nach Isoprenalininjektion

### **4.3. Unter Isoprenalin relative Bradykardie im Oberflächen-EKG**

Unter Diazepamsedierung war kein Unterschied in der HF zwischen den Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen festzustellen.

Unter Isoprenalin zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen im Vergleich zu WT eine Bradykardie (aVF) bzw. eine Neigung zur Bradykardie (I, II, aVL, aVR) (Tabelle 2).

Unter Isoflurannarkose wiesen die Popdc1<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse elektrokardiographisch keine Unterschiede auf (Abb. 15 A/B).

Zusätzlich  $\beta$ -adrenerg stimuliert (Abb. 16 A/B) zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup>-Tiere unter Isoflurannarkose im Vergleich zu den WT-Tieren eine Tendenz zur Bradykardie. Im Vergleich Kontrollbedingung vs. Isoprenalinstimulation zeigten die WT-Mäuse einen adäquaten HF-Anstieg, während die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse inadäquat auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation ohne HF-Anstieg reagierten (Tabelle 2).

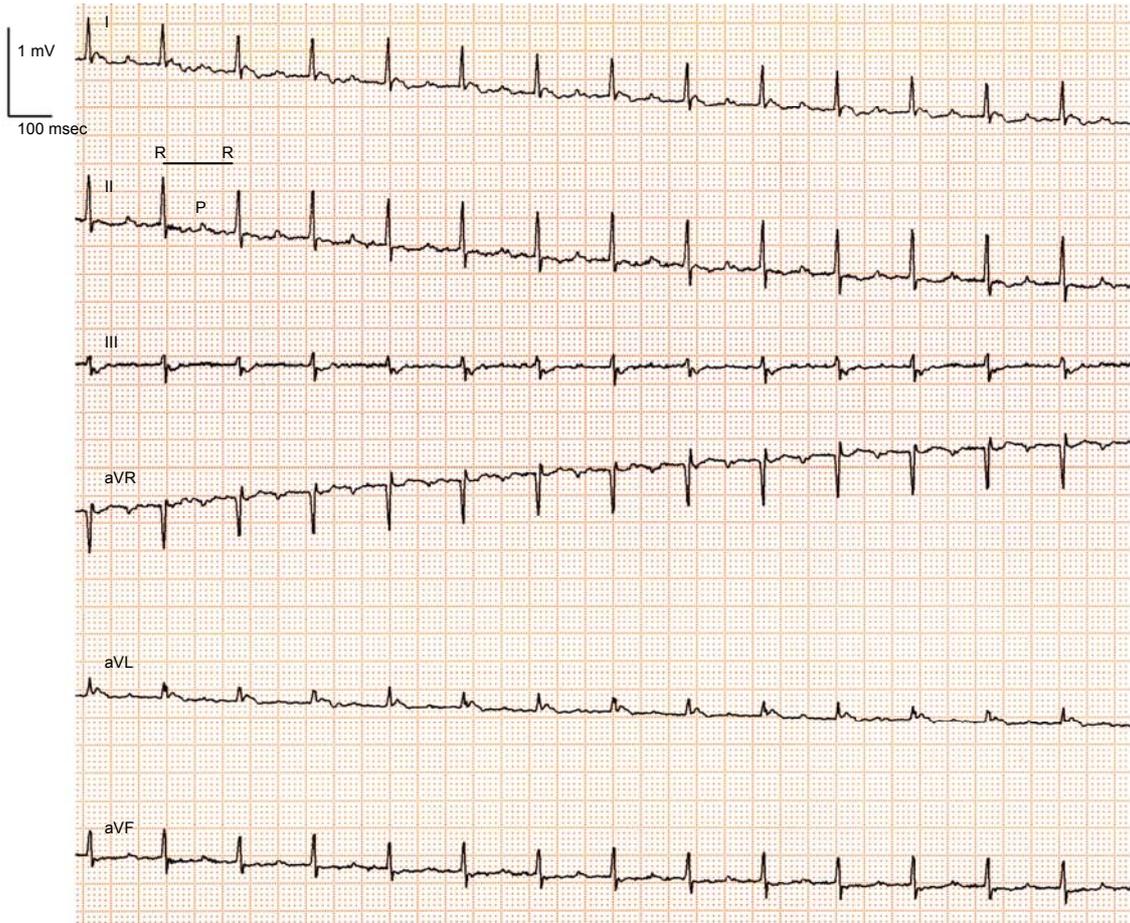
msec	P-Welle				PQ-Strecke			
	Isofluran		Isofluran + Isoprenalin		Isofluran		Isofluran + Isoprenalin	
	WT	Popdc1 <sup>-/-</sup>	WT	Popdc1 <sup>-/-</sup>	WT	Popdc1 <sup>-/-</sup>	WT	Popdc1 <sup>-/-</sup>
I	15±2	14±1	13±1	15±1	42±2	42±1	61±6	54±3
II	15±2	12±1	14±1	13±1	41±2	42±1	59±7	56±3
III	12±1	11±1	10±1	12±1	36±1	40±1	53±4	54±4
aVF	13±1	12±0	n. a.	n. a.	40±3	40±1	n. a.	n. a.
aVL	14±0	12±1	n. a.	n. a.	45±1	43±1	n. a.	n. a.
aVR	16±1	14±5	15±1	13±1	49±2	48±3	60±4	62±4

Tabelle 2: Oberflächen-EKG, P-Welle und PQ-Strecke in msec in verschiedenen Ableitungen unter Isoflurannarkose. n (WT)= 11 Mäuse. n (Popdc1<sup>-/-</sup>)= 12 Mäuse.

n. a. nicht auswertbar

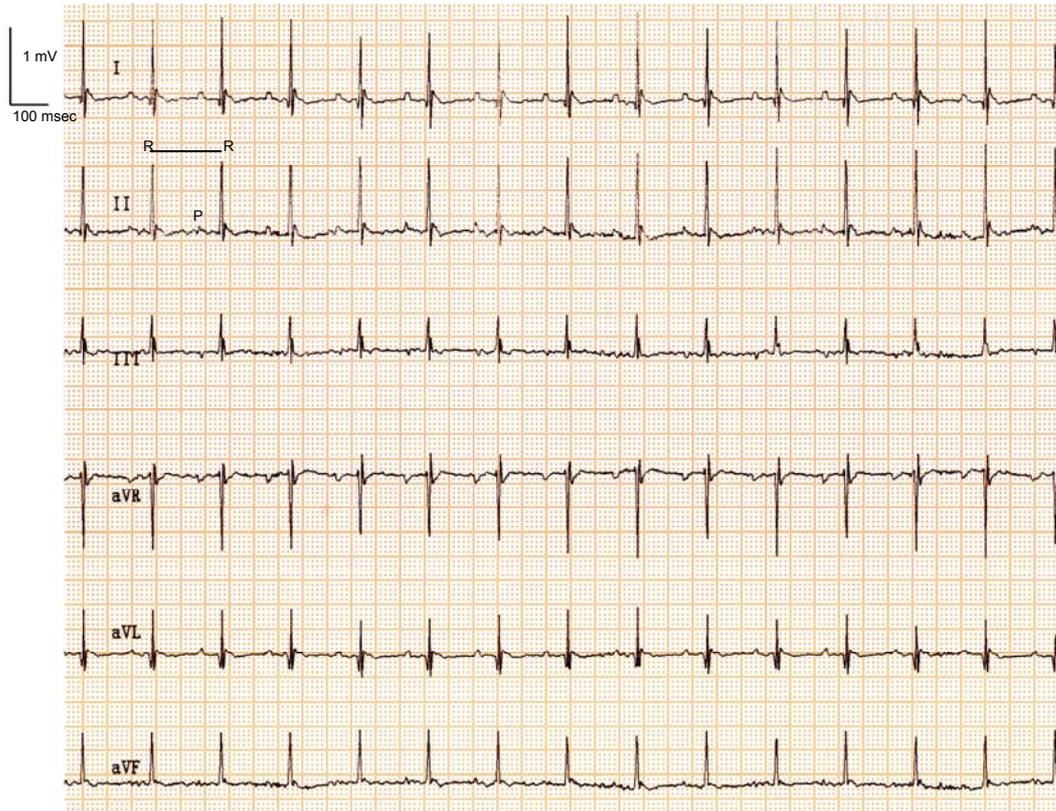
Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

(A)



(A) 6-Kanal-Oberflächen-EKG, WT Kontrolle, RR 124 ms

(B)



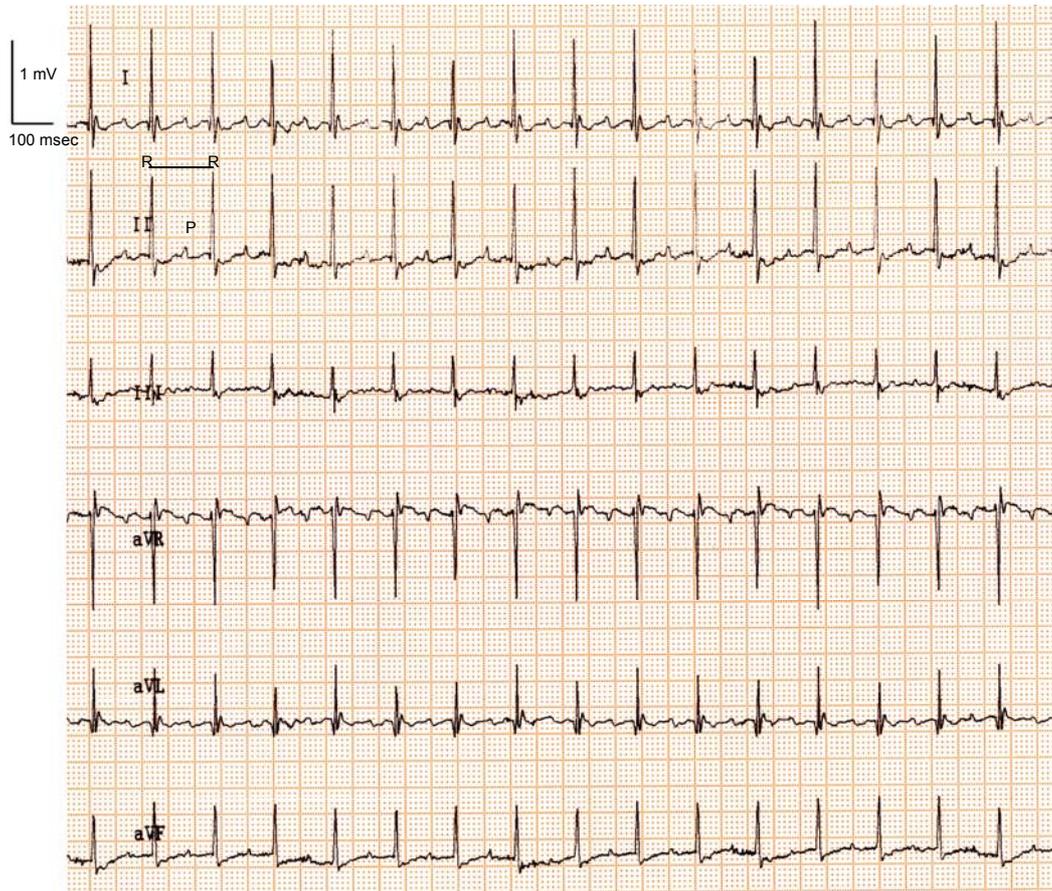
(B) 6-Kanal-Oberflächen-EKG,  $Popdc1^{-/-}$  Kontrolle, RR 129 ms

Abbildung 14: 6-Kanal-Oberflächen-EKG unter Isoflurannarkose, Kontrollbedingungen

(A) WT-Maus

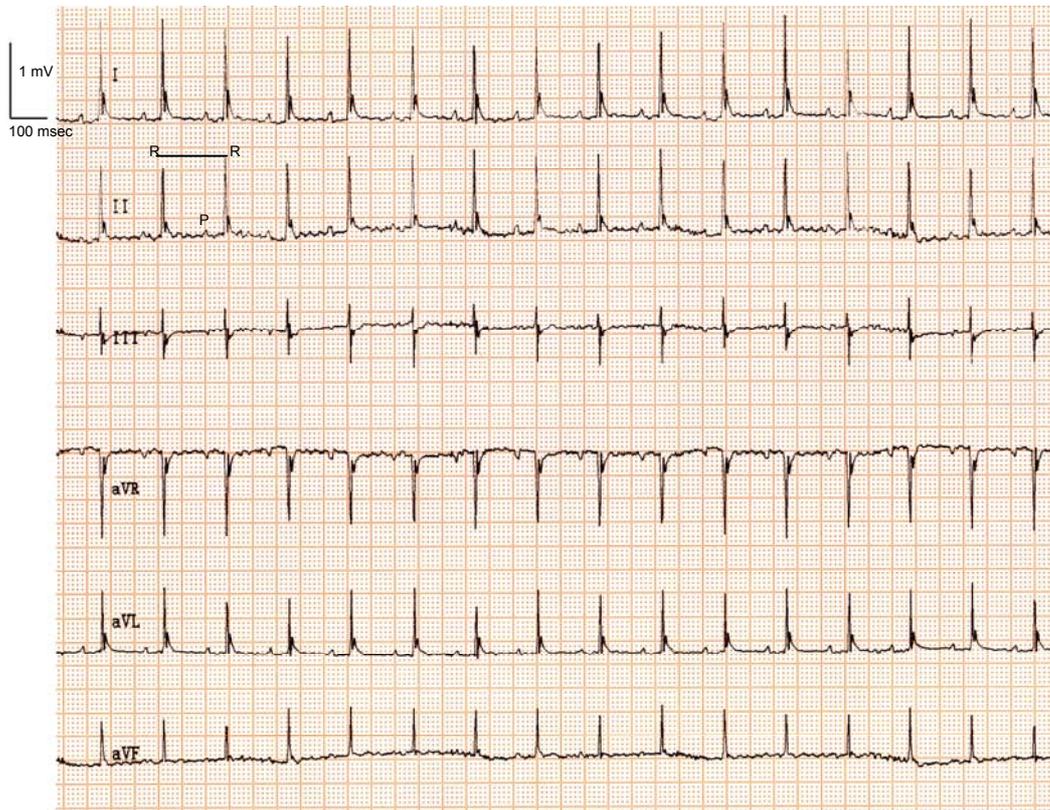
(B)  $Popdc1^{-/-}$ -Maus

(A)



(A) 6-Kanal-Oberflächen-EKG, WT Isoprenalin, RR 115 ms

(B)



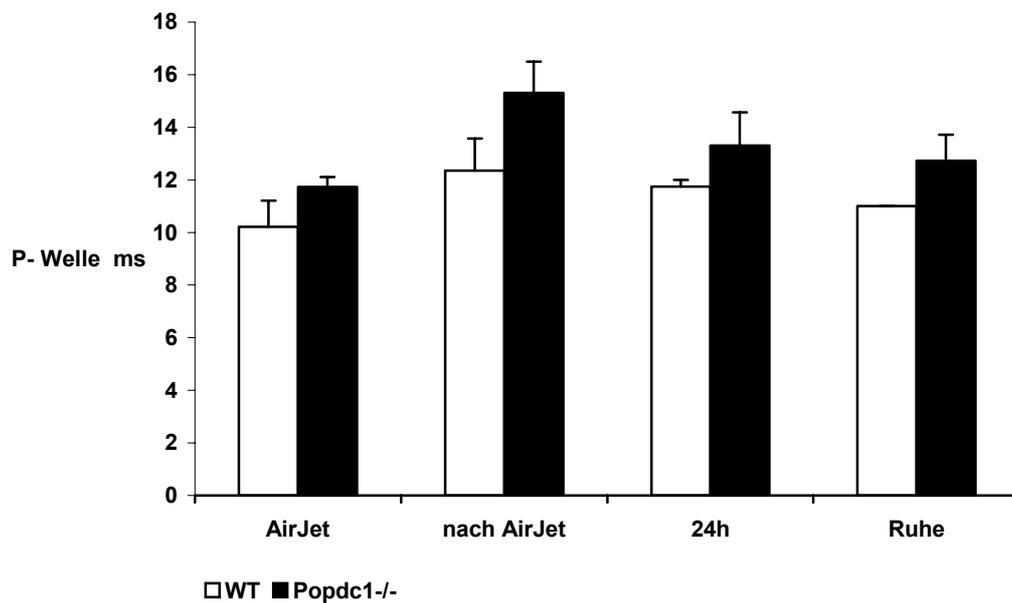
(B) 6-Kanal-Oberflächen-EKG, *Popdc1*<sup>-/-</sup> Isoprenalin, RR 132 ms

Abbildung 15 : 6-Kanal-Oberflächen-EKG unter Isoflurannarkose und  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin  
(A) WT-Maus  
(B) *Popdc1*<sup>-/-</sup>-Maus

#### 4.4. Mentale Belastung führt zu relativer Bradykardie

Die Dauer der P-Welle und der PQ-Strecke wurde im telemetrischen EKG bei wachen Mäusen über 24 Stunden, in Ruhephasen, während des „hot air jet“-Stresses sowie nach mentalem „hot air jet“-Stress bestimmt. Für beide Parameter waren zwischen den WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Tieren keine Unterschiede feststellbar ( $p > 0,1$  WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup> bei P-Welle und PQ-Strecke) (siehe Abb. 6).

A



B

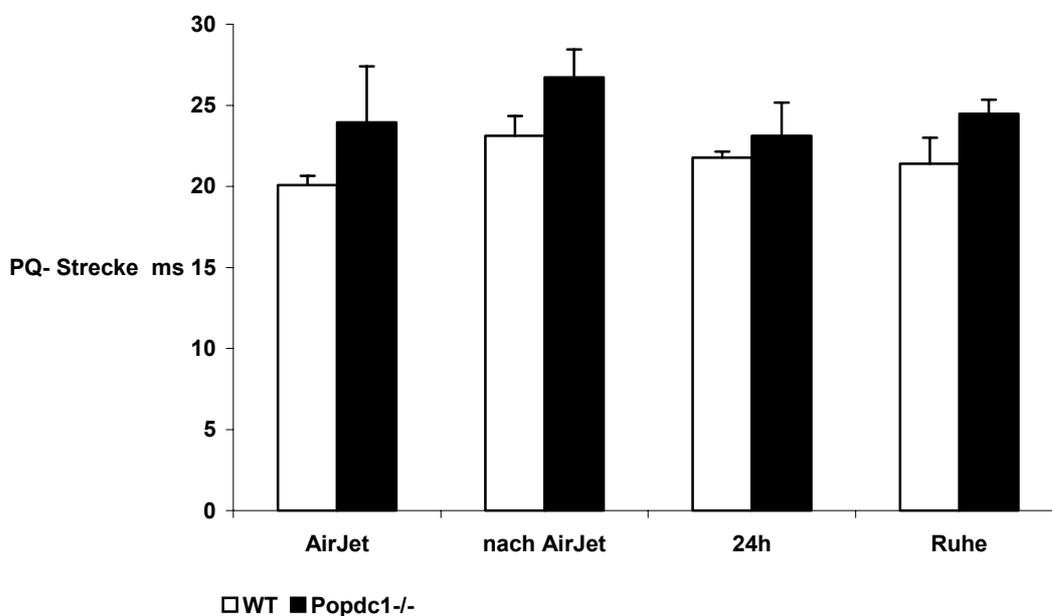


Abbildung 16: Telemetrie

(A) P-Welle in ms während und nach Belastung durch „hot air jet“-Stress, über 24 h hinweg gemessen sowie in Ruhe

(B) PQ-Strecke in ms

n (WT)= 4 Mäuse, n (Popdc1<sup>-/-</sup>)= 4 Mäuse

Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

Auch die Herzfrequenz wurde im telemetrischen EKG über 24 Stunden, in Ruhephasen, während des „hot air jet“-Stresses und nach mentalem Stress bestimmt. Dabei wiesen WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Tiere über 24 Stunden, in Ruhephasen (Abb. 19) und nach „hot air jet“-Stress (Abb. 20) keine Unterschiede auf ( $p > 0,1$  WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup> bei 24 h, Ruhephase, nach Belastung). Während der mentalen Belastung mit „hot air jet“-Stress zeigten sich jedoch Unterschiede in der HF; die HF der Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse war im Vergleich zu der der WT-Mäuse bradykard ( $p = 0,03$  WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup>) (Abb. 17, 20).

Die Popdc1<sup>-/-</sup>- und die WT-Mäuse reagierten bei „hot air jet“-Stress im Vergleich zur Ruhephase und zur Phase nach Belastung mit einem adäquaten HF-Anstieg ( $p < 0,05$  Ruhe vs. „hot air jet“ und nach Belastung vs. „hot air jet“ bei WT und bei Popdc1<sup>-/-</sup>).

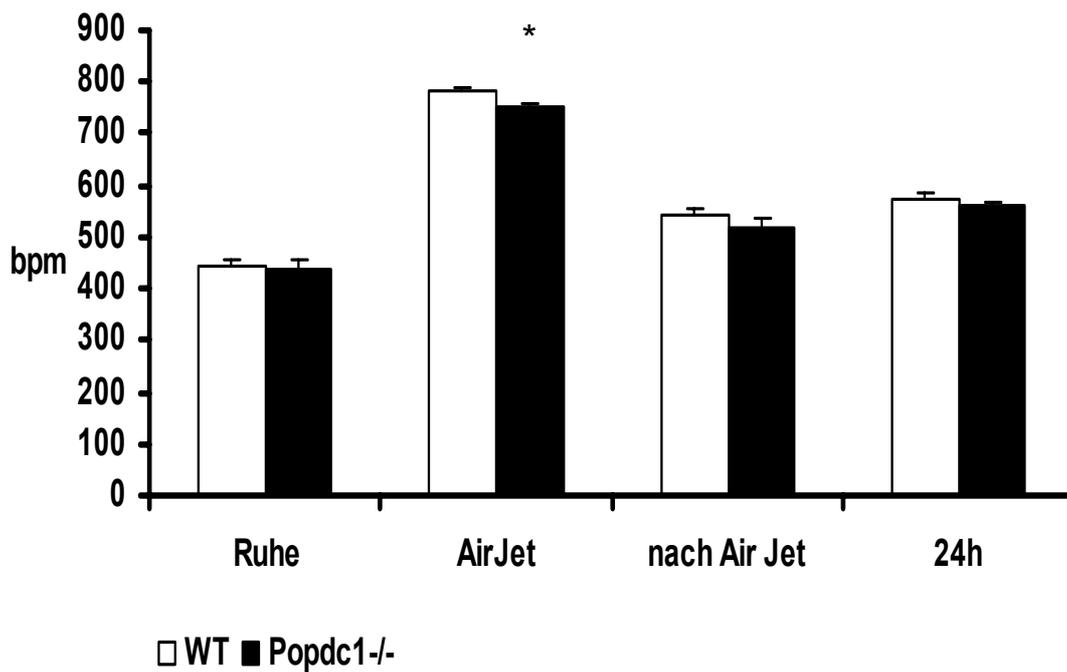


Abbildung 17: Telemetrie, HF in verschiedenen Aktivitätsphasen  
 $p < 0,05$  WT (n= 4 Mäuse) vs. Popdc1<sup>-/-</sup> (n= 4 Mäuse)  
Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

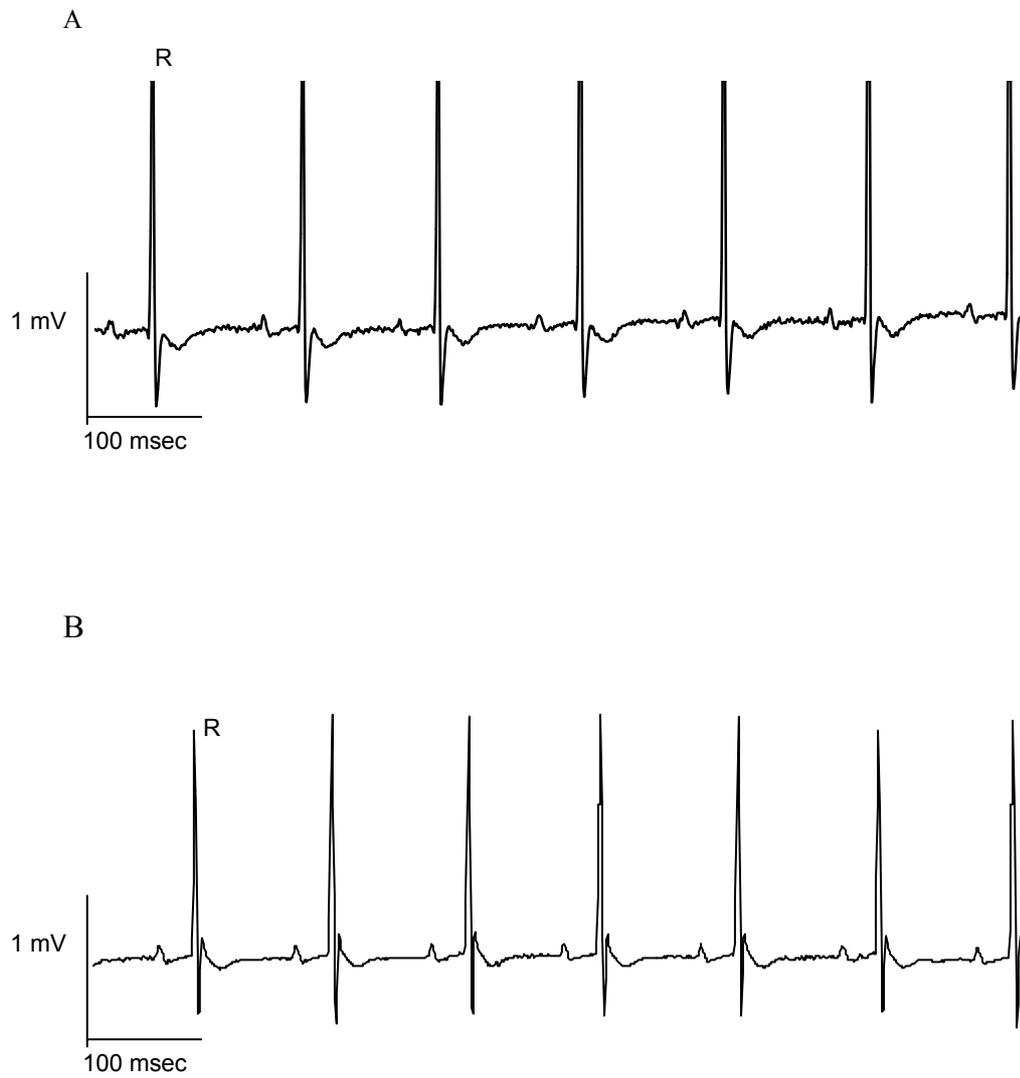


Abbildung 18: Telemetrisches EKG, Ableitung II, in der Ruhephase  
(A) WT  
(B) *Popdc1<sup>-/-</sup>*

A



B

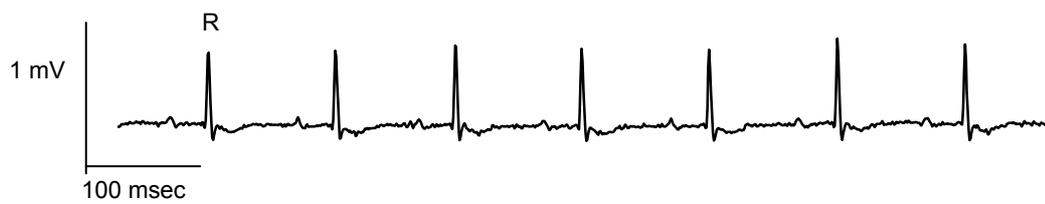


Abbildung 19: Telemetrisches EKG, Ableitung II, nach Belastung  
(A) nach „hot air jet“-Stress bei WT, RR-Abstand 118 ms  
(B) nach „hot air jet“-Stress bei  $Popdc1^{-/-}$ , RR-Abstand 120 ms

Bei mentaler Belastung mit „hot air jet“-Stress lag der MW der WT- HF bei  $784 \pm 6,6$  bpm. Bei den  $\text{Popdc1}^{-/-}$ - Mäusen wurde ein HF-MW von  $752 \pm 9,3$  bpm festgestellt. Die Werte der HF in den Quantilen 0,2 bis 0,9 sowie das Maximum (WT:  $837 \pm 13,0$  bpm;  $\text{Popdc1}^{-/-}$ :  $792 \pm 8,9$  bpm) waren bei den  $\text{Popdc1}^{-/-}$ - im Vergleich zu den WT-Mäusen bradykard ( $p < 0,05$  WT vs.  $\text{Popdc1}^{-/-}$ ) (Abb. 21). Eine Neigung zur Bradykardie zeigte das HF-Minimum (WT:  $703 \pm 18,8$  bpm;  $\text{Popdc1}^{-/-}$ :  $649 \pm 6,2$  bpm) bei den  $\text{Popdc1}^{-/-}$ - im Vergleich zu den WT-Mäusen ( $0,05 < p < 0,1$  WT vs.  $\text{Popdc1}^{-/-}$ ).

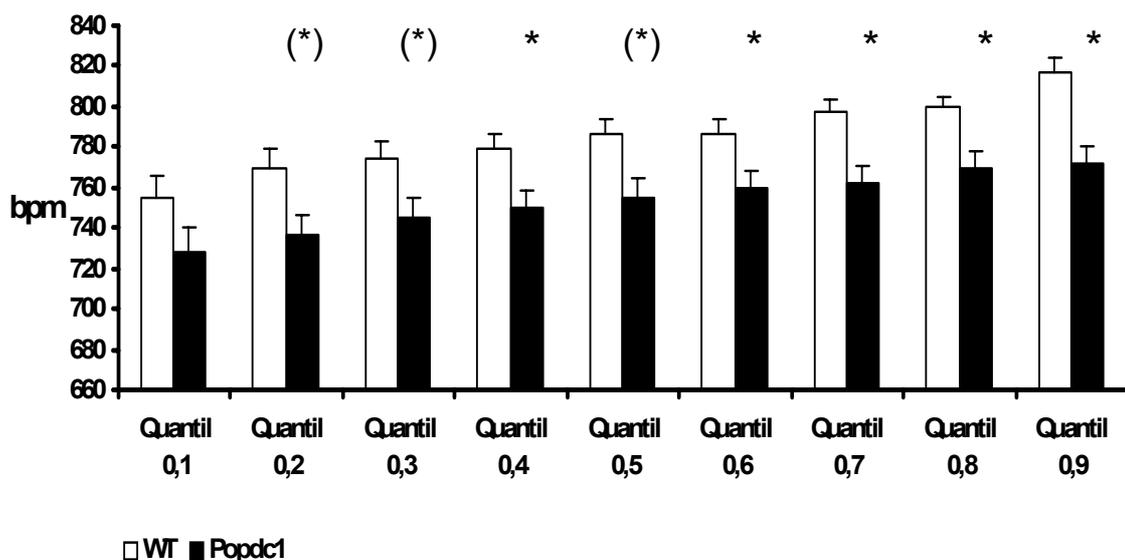


Abbildung 20: Telemetrie, „hot air jet“-Stress

\*  $p < 0,05$  WT (n= 4 Mäuse) vs.  $\text{Popdc1}^{-/-}$  (n= 4 Mäuse)

(\*)  $0,05 < p < 0,1$  WT vs.  $\text{Popdc1}^{-/-}$

Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

A



B

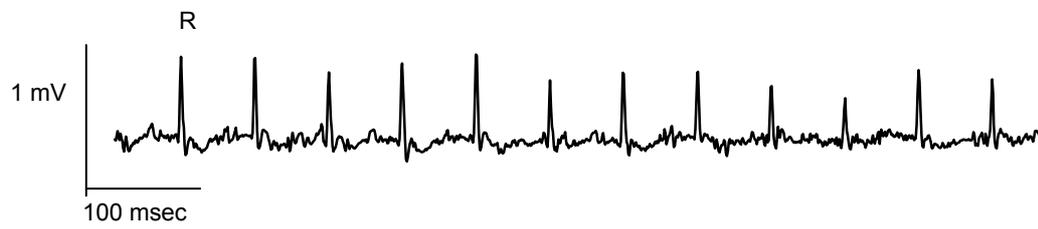


Abbildung 21: Telemetrisches EKG, Ableitung II, unter „hot air jet“-Stress

(A) Air Jet bei WT, RR-Abstand 74 ms

(B) Air Jet bei Popdc1<sup>-/-</sup>, RR-Abstand 76 ms

#### 4.5. Intrinsische Bradykardie unter Orciprenalin

Die isolierten, schlagenden Herzen der *Popdc1<sup>-/-</sup>*- und der WT-Mäuse wiesen unter Kontrollbedingungen in der HF keinen signifikanten Unterschied auf. Unter Orciprenalin zeigten die *Popdc1<sup>-/-</sup>*- im Vergleich zu den WT-Herzen eine bradykarde Frequenz ( $p=0,04$  WT vs. *Popdc1<sup>-/-</sup>*) (siehe Abb. 23).

Der Vergleich Kontrolle vs. Orciprenalin zeigte bei den WT- und *Popdc1<sup>-/-</sup>*-HF keinen Unterschied auf (WT: Kontrolle  $431 \pm 36,1$  bpm; Orciprenalin  $514 \pm 30,4$  bpm;  $p=0,16$ ; *Popdc1<sup>-/-</sup>*: Kontrolle  $363 \pm 36,2$  bpm; Orciprenalin  $323 \pm 62,6$  bpm;  $p=0,63$ ). Seinen in der Literatur beschriebenen, positiv chronotropen Effekt (Karow et Lang-Roth, 2004, S. 51) zeigte Orciprenalin bei den *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Herzen nicht.

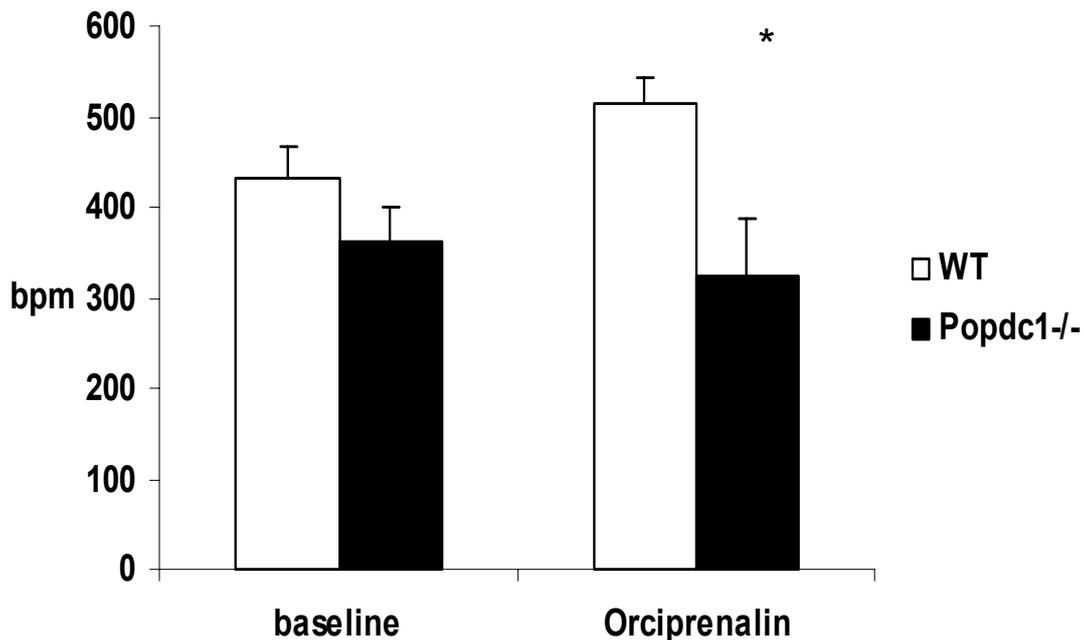


Abbildung 22: Untersuchungen am isolierten Herzen, ventrikuläre Frequenz nach AV-Block Kontrolle und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung  
 $p < 0,05$  WT (n= 5 Mäuse) vs. *Popdc1<sup>-/-</sup>* (n= 5 Mäuse)  
Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

Das „incremental atrial pacing“ (IAP) zeigte unter Kontrolle zwischen den WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen keinen signifikanten Unterschied auf, die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen zeigten jedoch im Vergleich zu den WT-Herzen einen Trend zu einem höheren Wenckebachpunktwert (WT: 84 ms ± 6,1; Popdc1<sup>-/-</sup>: 112 ms ± 15,1; p= 0,19).

Dabei zeigten die Popdc1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu den WT-Herzen eine Neigung zu einem höheren Wenckebachpunkt (WT: 76,7 ms ± 0,1; Popdc1<sup>-/-</sup>: 120 ms ± 15,8; p= 0,09) (Abb. 23).

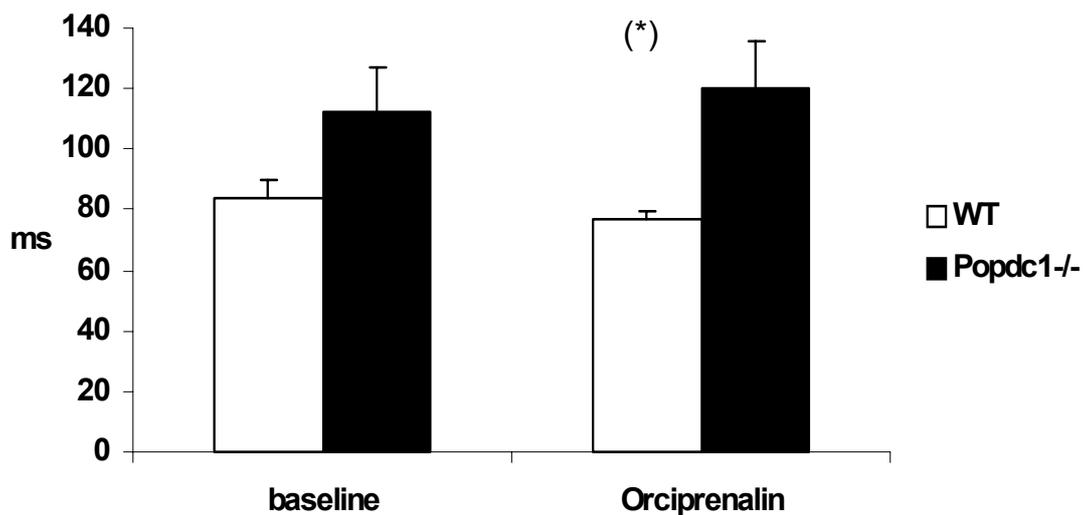


Abbildung 23: Incremental atrial pacing (IAP), WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup> Kontrolle und unter Orciprenalineinfluss  
(\* ) 0,05 < p < 0,1 WT (n= 5 Mäuse) vs. Popdc1<sup>-/-</sup> (n= 5 Mäuse)  
Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

#### 4.6. Unter Belastung zeigen die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine bradykarde Herzfrequenz

Während Kontrollphasen, in Ruhe und nach Belastung war kein Unterschied in der HF zwischen WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen festzustellen.

Unter jeglicher Form von Belastung dagegen zeigten Popdc1<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu WT-Mäusen eine bradykarde HF.

Während des Ultraschalls unter Isoflurannarkose schlugen die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen, mit Isoprenalin  $\beta$ -adrenerg stimuliert, langsamer als die WT-Herzen (p= 0,01).

Auch unter „hot air jet“-Stress war die Popdc1<sup>-/-</sup>-HF langsamer als die WT-HF (p= 0,03).

Mit Orciprenalin stimulierte isolierte Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen nach Langendorff zeigten im Vergleich zu WT-Herzen eine Bradykardie (p= 0,04).

Im Oberflächen-EKG tendierte die Popdc1<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu den WT-Mäusen unter Diazepam- und Isoflurannarkose sowie  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu einer bradykarden HF (Diazepam p= 0,06; Isofluran p= 0,06).

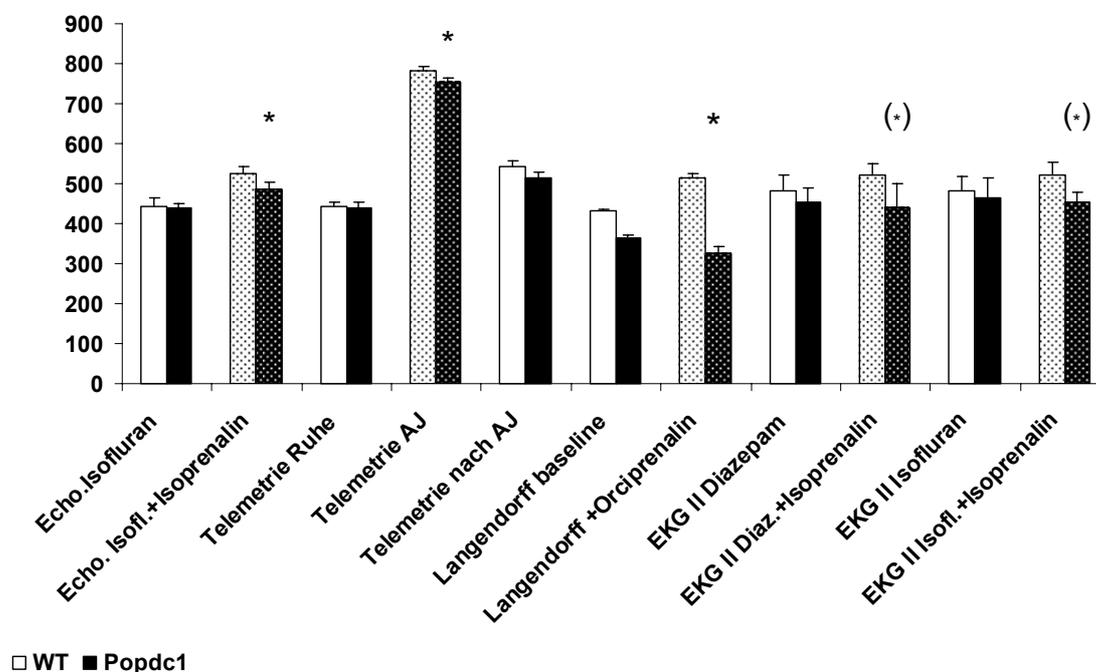


Abbildung 24: HF im Methodenvergleich

\* p < 0,05 WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup>

(\*) 0,05 < p < 0,1 WT vs. Popdc1<sup>-/-</sup>

Alle Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Methodenvergleich: Diazepamsedierung vs. Isoflurannarkose**

Die echokardiographischen Untersuchungen und die Ableitungen der Oberflächen-EKGs wurden zum einen unter Diazepamsedierung, zum anderen unter Isoflurannarkose durchgeführt.

Diazepam, ein Benzodiazepin, wirkt u. a. anxiolytisch und sedativ. Das Medikament wurde initial in einer fixen Dosis intraperitoneal injiziert. Wirkungseintritt und -dauer des Diazepams waren vom individuellen Tier und von umgebenden Bedingungen abhängig. So trat die gewünschte sedierende Wirkung bei einzelnen Mäusen zunächst gar nicht ein. Diazepam musste nachinjiziert werden, was zu einer Medikamentkumulation führte. Zu einem späteren Zeitpunkt im Untersuchungsablauf kam es deshalb dann zur verstärkten Wirkung des Benzodiazepins. Diese Wirkung hielt meist noch weit über die Dauer der Untersuchung hinaus an. Die Mäuse mussten also über einen längeren Zeitraum nach den Untersuchungen unter ständiger Beobachtung stehen. Der Auskühlung wurde mit Wärmelampen entgegengewirkt.

Das Inhalationsnarkotikum Isofluran wurde von den Mäusen inhaliert und führte bei sämtlichen Mäusen schnell zu einem Wirkungseintritt. Wirkungsstärke und -dauer des Isoflurans waren kaum von umgebenden Bedingungen abhängig. Weiter war die Nachbeobachtungsphase der Mäuse unter Isofluran weniger lang als unter Diazepam. Alle Mäuse erreichten rasch nach Beendigung der Isofluranzufuhr volle Bewusstseinslage. Ein relativ rasches An- und Abfluten der narkotisierenden Wirkung war festzustellen. Im Vergleich zum intraperitoneal injizierten Diazepam ließ sich das Inhalationsnarkotikum Isofluran also besser steuern.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass unter Diazepam ein Untersuchungsablauf mehr Zeit in Anspruch nimmt als unter Isofluran. Die Tiefe der Sedierung variiert unter Diazepam mehr als unter Isofluran. Die Isoflurannarkose ist besser steuerbar als die Diazepamsedierung. Die Mäuse werden unter Isoflurannarkose weniger stark und für kürzere Zeit belastet als unter Diazepamsedierung.

## 5.2. Inadäquate Herzfrequenzadaptation an Belastung bei Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die HF weist unter Kontrolle, in Ruhe, bei normaler Aktivität und nach Belastung zwischen Popdc1<sup>-/-</sup> und WT-Mäusen keinen Unterschied auf. Unter diesen Bedingungen scheint POP1A im Reizleitungssystem bezüglich der HF eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Unter Belastung jedoch ist ein Unterschied in der HF zwischen WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen feststellbar. Die Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen unter Isoprenalin und während mentalem „hot air jet“-Stress eine relativ bradykarde HF im Vergleich zu den WT-Mäusen. Die nach Langendorff perfundierten isolierten schlagenden Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen zeigen unter Orciprenalin im Vergleich zu den WT-Herzen eine relative Bradykardie. Die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen reagieren auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation inadäquat. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen schlagen die WT-Herzen,  $\beta$ -adrenerg stimuliert, mit einer höheren Frequenz, die HF steigt an. Die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen dagegen reagieren inadäquat auf die Belastung, indem es im Vergleich zur Kontrolle unter Belastung zu kaum einem HF-Anstieg kommt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen also, dass POP1A bei der kardialen Adaptation an Belastung im Reizleitungssystem eine Rolle spielt. Das Gen-Produkt POP1A trägt mit dazu bei, dass es während Belastung und Stress zu einem HF-Anstieg kommt, dass das Herz unter Belastung im Vergleich zur Kontrolle tachykarder schlägt.

Da auch die isolierten Herzen unter Orciprenalineinfluss eine relative Bradykardie aufzeigen, ist zu vermuten, dass die Bradykardie unter Belastung intrinsischer Natur ist. Die HF isolierter Herzen reflektiert die intrinsische HF (Jose et al., 1970), denn das isolierte Herz steht nicht mehr unter dem Einfluss des vegetativen Nervensystems. Die Bradykardie scheint ihre Ursache in den im Sinusknoten ihrer Funktion nicht mächtigen POP1A-Gen-Produkten zu haben.

Diese Annahme wird durch die Auswertung der gefärbten Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen gestärkt. Die Popdc1<sup>-/-</sup>-Herzen zeigen starke Anfärbungen in den Regionen von Sinus- und AV-Knoten, schwächere Anfärbung in den gesamten Vorhöfen. POP1A ist also in diesen Strukturen des Reizleitungssystems vermehrt vorhanden und hat nach den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen dort auch eine Funktion. So scheint POP1A im Reizleitungssystem für die HF-Adaptation während Belastung mit zuständig zu sein.

Bisherige Forschungen bezüglich der Funktion des Gen-Produktes POP1A ergaben, dass die Proteine der Popeye-Familie mit Plasmamembranen assoziiert sind (Nakaki und Kenhisa, 1992; Andrée et al., 2000a). Wahrscheinlich handelt es sich bei POP1A um ein Zelladhäsionsprotein, das Disulfidbrücken ausbildet (Knight et al., 2003; Wada et al., 2001). Die Popeye-Domäne des POP1A-Gens könnte dabei für die Bildung von Dimeren eine Rolle spielen (Vasavada et al., 2004; Brand T, 2005).

POP1A-Expression wurde in der Peripherie kardialer Myozyten in Myokard an Myozyt-Myozyt-Zellkontakten entdeckt (Smith and Bader, 2006). Das Reizleitungssystem ist aus modifiziertem Herzmuskelgewebe aufgebaut. Möglicherweise sind diese Myozyt-Myozyt-Kontakte, an denen POP1A-Expression registriert wurde, für die Erregungsbildung und -weiterleitung im Reizleitungssystem bei der HF-Adaptation an Belastung von Bedeutung. Sie scheinen nur bei Belastung von Bedeutung zu sein, da nur während Belastungsphasen Unterschiede in der HF zwischen WT- und *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen nachzuweisen waren. Die *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigen während Belastung eine bradykarde HF. Die elektrischen Myozyt-Myozyt-Zellkontakte könnten durch den POP1A-Verlust in ihrer Funktion eingeschränkt sein. Damit hätte das Fehlen des POP1A-Proteins eine Verlangsamung der Erregungsbildung und -weiterleitung im AV-Knoten während Belastung zur Folge. Bei einer vollkommenen Blockade der Zellkontakte müssten die Erregungsbildung und -weiterleitung über andere, vermutlich langsamer wirkende Zellkontakte laufen. Wären die Myozyt-Myozyt-Zellkontakte in ihrer Funktion nur eingeschränkt, so würde die Erregungsbildung und -weiterleitung lediglich fortwährend auf ihrem Weg durch das Reizleitungssystem gebremst, verlangsamt.

Die Popeye Genfamilie, zu der POP1A gehört, ist evolutionär hoch konserviert. So wurde POP1 im sich entwickelnden und im adulten Herzen bei Maus, Huhn, Frosch und Mensch gefunden (Andrée et al., 2000; Hitz et al., 2002; Ripley et al., 2006). POP1A könnte also auch bei Huhn, Frosch und Mensch bei der kardialen Adaptation an Belastung eine Rolle spielen. Dann käme es wahrscheinlich ohne das POP1A-Gen während Belastung bei Huhn, Frosch und Mensch, ähnlich wie bei den *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nicht zu einem adäquaten kardialen Frequenzanstieg.

Die Auswertung des telemetrischen EKGs bei mentaler Belastung während „hot air jet“ zeigt bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren eine Bradykardie bei der mittleren und maximalen HF und bei den Quantilen 0,2 und 0,4 bis 0,9 sowie eine Neigung zur Bradykardie bei der minimalen HF und bei Quantil 0,3 (Abb. 21). Keinen Unterschied in der HF zwischen WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen ergibt die Quantile 0,1.

### **5.3. Bradykardie-bedingte Veränderungen in der Dopplerechokardiographie**

Echokardiographisch sowie doppler-echokardiographisch ist unter Ruhebedingungen bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Isoflurannarkose lediglich über der Aortenklappe eine höhere maximale Geschwindigkeit und ein höherer maximaler Druck als bei den WT-Tieren festgestellt worden. Der mittlere Druck über der Aortenklappe AoPGmean zeigt keinen Unterschied zwischen WT- und Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die LVET der Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse ist länger als die der WT-Tiere, jedoch nicht signifikant länger (p= 0,12).

Diese leichten Veränderungen in der Dopplerechokardiographie unter Isoprenalin sind bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Tieren wahrscheinlich bradykardie-bedingt. Eine niedrigere Herzschlagfrequenz führt zu einer verlängerten Auswurfzeit des Blutes aus dem Ventrikel in die Aorta. Durch die niedrigere Schlagfrequenz passiert das Blut das Herz langsamer und mit weniger Druck.

#### **5.4. Welche Rolle spielt das Gen POP1A für die elektrische Erregung des Mausherzens?**

POP1A wird im Sinusknoten und in bestimmten Bereichen des Reizleitungssystems stark exprimiert, wie die Anfärbungen der *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Herzen zeigen. Die elektrophysiologischen und sonographischen Untersuchungen zeigten bei den belasteten *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine relative intrinsische Bradykardie. Damit könnte die Ursache des inadäquat niedrigfrequenten Herzschlags während Stress im Fehlen des POP1A-Gens im Sinusknoten liegen. POP1A ist also während Belastungsphasen im Reizleitungssystem des Vorhofes an der HF-Adaptation beteiligt.

Weiter könnte POP1A eine Rolle im AV-Knoten spielen. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation neigen *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zu einem erhöhten Wenckebachpunkt. Außerdem sind die PQ-Strecken-Werte der *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse in sämtlichen Aktivitätsphasen im Vergleich zu denen der WT-Mäuse in der Tendenz erhöht.

Im gesamten Vorhofbereich zeigt sich eine geringe POP1A-Expression, die in Einklang zu bringen ist mit den in sämtlichen Aktivitätsphasen erhöhten P-Wellen-Werten der *Popdc1<sup>-/-</sup>*-Tiere im Vergleich zu denen der WT-Tiere.

Das Gen-Produkt POP1A könnte also eine Funktion in der HF-Adaptation an Belastung haben, es scheint Einflüsse auf die Erregungsausbreitung im Vorhof sowie der Refraktärzeit des AV-Knotens zu haben. Auf der subzellulären Ebene wurde POP1A-Expression an Myokard-Myokard-Kontakten nachgewiesen (Ripley et al, 2006). Diese Zellkontakte scheinen während Belastung eine verstärkte Rolle zu spielen. Ob POP1A zusätzlich als Protein mit transmembranösen Domänen eine Ionenkanal-ähnliche Funktion hat und etwa die diastolische Depolarisation der Sinusknotenstelle beeinflusst, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Für die Funktion des Sinusknotens wichtig sind die HCN-Kanäle. Die mittels Hyperpolarisation aktivierten, von zyklischen Nukleotiden umschlossenen HCN-Kanäle wurden in Neuronen und Kardiomyozyten gefunden. Ein Mangel der Hauptisoformen HCN2 und HCN4 führt entsprechend zu neurologischen und kardialen Symptomen wie Absenzen, Ataxie und Sinusknotendysfunktion (Herrmann et al., 2007). Die HCN2- und HCN4-Kanäle wirken entscheidend an der Generation spontaner Aktivität in den Sinusknotenzellen mit (Huang et al., 2007). Der HCN4-Kanal hat einen dominanten

Einfluss auf die diastolische Depolarisation der Sinusknotenzellen. Die Mutation des HCN4-Kanals ermöglicht bereits bei niedrigerer Spannung eine Aktivierung des Kanals (DiFrancesco, 1993; Stieber et al., 2003; Ishii et al., 2001). Einige der Mutationen führen zu einer eingeschränkten Aktivierbarkeit durch cAMP (Schulze-Bahr et al., 2003). Dies führt zu einer veränderten Aktivierbarkeit des HCN4-Kanals bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Mutierte HCN4-Kanäle zeigen während der diastolischen Depolarisation einen geringeren Stromfluss, der sich klinisch in einer langsameren HF offenbart. HCN-Kanalmutationen sind mit einer angeborenen Sinusbradykardie assoziiert (Eyal et al., 2007; Schulze-Bahr et al., 2003).

Weiter ist im Sinusknoten der SCN5A-Kanal lokalisiert. Die Klinik eines mutierten und damit in seiner Funktion eingeschränkten kardialen Natrium-Kanals SCN5A beinhaltet u. a. den plötzlichen Herztod und Zeichen multipler arrhythmischer Syndrome wie Bradykardie, eine Sinusknotendysfunktion, das Long-QT-Syndrom (LQT3) sowie das Brugada-Syndrom (Monning et al., 2006; Schwartz et al., 2001, Bezzina et al., 2005; Chen et al., 1998; Schott et al., 1999; Benson et al., 2003). Das LQT3-Syndrom verursacht häufig während Ruhephasen durch kardiale Arrhythmien, meist durch Torsade de pointes, einen plötzlichen Herztod. Die Erkrankung ist relativ selten, aber aggressiv und führt zum plötzlichen Herztod im jungen Alter, auch im Neugeborenenalter (Fabritz et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass Mutationen, die ein LQT3-Syndrom bewirken, die physiologisch schnelle Inaktivierung des Natriumstroms unterbrechen und so einen andauernden Natrium-Einwärtsstrom und eine persistierende Plateauphase bewirken. Dagegen wird beim Brugada-Syndrom und den Reizleitungserkrankungen der Natriumstrom reduziert (Bennett et al., 1995; Tan et al., 2003). Transgene Mäuse, heterozygot für die Mutation des SCN5A-Kanals, zeigten eine bradykarde HF und eine Sinusknotendysfunktion mit wechselnd bradykarden Episoden und länger andauernden Pausen. Jedoch wurde nicht bei allen transgenen Mäusen ein plötzlicher Herztod festgestellt. Dies sei auf die im Vergleich zur menschlichen HF schnelleren intrinsischen HF der Mäuse zurückzuführen (Remme et al., 2006). Die Delta-KPQ-Mutation im SCN5A-Kanal führt jedoch auch im Mausmodell zu Torsades de pointes (Nuyens et al., 2001; Fabritz et al., 2004). Das EKG der transgenen Tiere zeigte eine verlangsamte Fortleitung und eine verspätete Repolarisation. Hauptsächlich im rechten Ventrikel waren diese Veränderungen

nachzuweisen, der linke Ventrikel war unverändert (Remme et al., 2006). In klinischen Studien waren diese Beobachtungen ebenfalls gemacht worden (Nagase et al., 1992-1995; Tukkie et al., 2004; Izumida et al., 2004; Coronel et al., 2005). Im rechten Ventrikel heterozygoter SCN5A-knock-out Mäuse wurde eine verlangsamte Erregungsleitung sowie eine verlängerte Refraktärperiode gezeigt (Van Veen et al., 2005).

Im A<sub>3</sub>AR-Mausmodell wird der die Schrittmacherzellen im Sinusknoten depolarisierende Ionenstrom mittels einer Adenosinrezeptorüberexpression des Rezeptors-Subtyps A<sub>3</sub> (ca. 67 fmol/mg high-affinity Gi-coupled A<sub>3</sub>AR pro Milligramm Protein) moduliert. Adenosin vermittelt seine Effekte am Herzen rezeptorvermittelt in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Muskelzellen in Koronargefäßen (Mubagwa et Flameng, 2001). Im Herzen haben die Adenosinrezeptoren u. a. eine chrono- und dromotrope Wirkung (Stone et al., 1995). So zeigt die A<sub>3</sub>AR-Maus in Ruhe eine Sinusknotendysfunktion, ein Bradykardie-Tachykardie-Syndrom, und einen kompletten AV-Block. Belastung vermindert die bradykarde HF und den AV-Block (Fabritz et al., 2004).

Die drei aufgeführten Beispiele für Ionenströme veranschaulichen, dass die Funktion des Sinusknotens auf unterschiedlichste Weise moduliert wird. So kann der Sinusknoten die HF entsprechend der Belastung über verschiedene Mechanismen adaptieren. Durch die beschriebenen Ionenströme wird u. a. die HF beeinflusst. Die dargestellten Ionenkanalmutationen bewirken eine Sinusbradykardie. Auch das Genprodukt POP1A beeinflusst die HF-Adaptation. Bei den Popdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen ist aufgrund der fehlenden Regulation eine Sinusbradykardie festzustellen. Möglicherweise besteht die Aufgabe von POP1A in der adäquaten Adaptation bestimmter Ionenströme an die Belastung. Im Bereich der Myozyt-Myozyt-Zellkontakte lokalisiert, könnte POP1A dort bestimmte Ionenkanäle, wie den SCN5A-Kanal, beeinflussen und so die für die jeweilige Belastung notwendige HF durch die Anpassung der Ionenströme bewirken.

## 5.5. Abhängigkeit des Phänotyps vom Alter?

Die erste Untersuchung, echokardiographisch unter Diazepam, wurde bei 30 Wochen alten  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen gestartet und zeigte zwischen den WT- und den  $Popdc1^{-/-}$ -Tieren keinen Unterschied auf. Dies wurde zunächst mit der zwischen den einzelnen Tieren sehr stark variierenden Sedierung unter Diazepam erklärt, durch welche die Ergebnisse beeinflusst worden sein könnten.

Jedoch wurden in unserem Labor kürzlich jüngere  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse, ca. 20 Wochen alt, echokardiographisch unter Isoflurannarkose untersucht. Es ließ sich zwischen den WT-Mäusen und den  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen,  $\beta$ -adrenerg stimuliert, kein phänotypischer Unterschied nachweisen. Die in dieser Untersuchung verwendeten WT-Mäuse waren bei den echokardiographischen Untersuchungen unter Isofluran  $33,4 \pm 0,5$  Wochen alt, die  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse  $34,4 \pm 1,3$  Wochen alt.  $\beta$ -adrenerg stimuliert zeigte sich zwischen den WT- und den  $Popdc1^{-/-}$ -Tieren bezüglich der HF ein Unterschied.

Möglicherweise bildet sich also der Phänotyp, Bradykardie unter Belastung, bei den  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen erst ab einem Alter über 33 Wochen aus. Der altersabhängige Phänotyp wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, dass sich unter Diazepamsedierung und  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Echokardiographie zwischen den 29,6 Wochen alten WT-Mäusen und den 30,3 Wochen alten  $Popdc1^{-/-}$ -Tieren kein Unterschied bezüglich der HF zeigte.

## 5.6. Offene Fragen und Desiderata

Bei den in dieser Doktorarbeit verwendeten  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen handelt es sich um homozygote Nullmutationen. D. h., beide Allele des Gens POP1A, dessen Funktion näher definiert werden soll, sind „blockiert“. Das Gen wird im Sinusknoten und im Reizleitungssystem der Maus exprimiert, es spielt eine Rolle bei der Adaptation der HF an Belastung. Bei „Blockierung“ des Gens POP1A ist ein adäquater HF- Anstieg während Belastung nicht möglich. Die HF der  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse ist während der verschiedenen Belastungen im Vergleich zu den WT-Mäusen bradykard.

Die funktionelle Bedeutung des Gens POP1A liegt also im adäquaten HF-Anstieg bei Belastung. Jedoch konnte der zelluläre Mechanismus, über den das POP1A-Gen die HF beeinflusst bisher nicht ausreichend geklärt werden.

Zur Popeye-Familie gehört auch das Gen POP2 (Andrée et al., 2000), das bei der Maus auf Chromosom 16, beim Menschen auf Chromosom 3q13 lokalisiert ist (Osler et al., 2006). Das Gen POP2 ist im gesamten Mauserz außer dem Ausflusstrakt exprimiert (Andrée et al., 2000). Es bleibt noch zu klären, ob das Gen POP2 in bestimmten Herzregionen, wie das Gen POP1A im Reizleitungssystem, überexprimiert ist.

In dieser Arbeit wurden die  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse jeweils nur für kurze Zeitspannen belastet, maximal für 15 Minuten. Wie reagieren die  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse bei länger andauernder Belastung? Adaptiert sich die HF der  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse bei längerer Belastung? Oder werden die HF-Unterschiede zwischen den WT- und  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen ausgeprägter? Ist vielleicht bei den  $Popdc1^{-/-}$ -Mäusen aufgrund der inadäquaten HF-Adaptation an Belastung gar kein Stress über einen längeren Zeitpunkt möglich? Um diese Fragen ausreichend zu beantworten, sollten  $Popdc1^{-/-}$ -Mäuse über längere Zeit belastet werden. An diese länger dauernde Belastung könnten sie mittels eines täglichen Trainings herangeführt werden. So trainierten Kirchhof et al. (2006) heterozygote Plakoglobinmäuse kontinuierlich über einen Zeitraum von 8 Wochen, was zu einer beschleunigten Manifestation des Phänotypes der Plakoglobinmäuse führte (Kirchhof et al., 2006).

## **5.7. Zusammenfassung zum Genprodukt POP1A**

1. POP1A ist wichtig für die chronotrope Kompetenz des Sinusknoten.
2. Die genaue Funktion des POP1A-Genproduktes für die kardiale Erregungsbildung und -ausbreitung ist noch nicht klar und sollte weiter untersucht werden.
3. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass das POP1A-Genprodukt in den Kardiomyozyten exprimiert wird. Es könnte für die embryonale Anlage des Sinusknotens, für die Zell-Zell-Kontakte im Sinusknoten oder für die Ionenströme im Sinusknoten verantwortlich sein.

## **6. Literaturverzeichnis**

**Andrée B, Hillemann T, Kessler- Ickson G, Schmitt- John T, Jockusch H, Arnold HH, Brand T, 2000.** Isolation and characterization of the novel Popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev Biol* 2000; 223: 371-82

**Andrée B, Fleige A, Arnold HH, Brand T, 2002a.** Mouse POP1 is required for muscle regeneration in adult skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biol* Mar 2002; 1504-12

**Andrée B, Fleige A, Hillemann T, Kessler- Ickson G, Arnold HH, Brand T, 2002b.** Molecular and functional analysis of Popeye genes: a novel family of transmembrane proteins preferentially expressed in heart and skeletal muscle. *Exp Clin Cardiol* 2002; 7: 99-103

**Bennett PB, Yasawa K, Makita N, George AL, 1995.** *Nature* 1995; 376: 683-5

**Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, 2003.** Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene SCN5A. *J Clin Invest* 2003; 112: 1019-28

**Bezzina CR, Wilde AA, Roden DM, 2005.** The molecular genetics of arrhythmias. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 343-6

**Brand T., 2005.** The Popeye domain- containing gene family. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43: 95-103

**Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q, 1998.** Genetics basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392: 293-6

**DiAngelo JR, Vasavada TK, Cain W, Duncan MK, 2001.** Production of monoclonal antibodies against chicken POP1 (BVES). *Hybrid Hybridomics* 2001; 20: 377-81

**DiFrancesco et al, 1993.** Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 455-72

**DiFrancesco et al, 1995.** Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 1995; 32: 470-73

**Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Dascal N, Eldar M, Glikson M, 2007.** Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* 2007; 116: 463-70

**Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Nuyens D, Rossenbacker T, Ottendorf A, Haverkamp W, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, 2003.** Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in  $\Delta$ KPQ SCN5A (long QT3) mice. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 1085-93

**Fabritz L, Kirchhof P, Fortmueller L, Auchampach JA, Baba HA, Breithardt G, 2004.** Gene dose- dependent atrial arrhythmias, heart block, and bradycardiomyopathy in mice overexpressing A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Cardiovasc Res* 2004 Jun 1; 62: 500-8

**Franz MR, Kirchhof P, Fabritz L, Koller B, Zabel M, 1995.** Computer analysis of monophasic action potential recordings: manual validation and clinically pertinent applications. *PACE* 1995; 18(I): 1666-78

**Goodmann et Gilman, 1998.** Kapitel “Neuronale Übertragung” und “Antiarrhythmien” in *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*, 9. Auflage, Verlag McGraw- Hill, Frankfurt, S.120-123, S.867-871

**Herrmann S, Stieber J, Ludwig A, 2007.** Pathophysiology of HCN channels. *Pflugers Arch* 2007; 454: 517-22

**Hitz MP, Pandur P, Brand T, Kühl M, 2002.** Cardiac specific expression of *Xenopus* Popeye1. *Mech Dev* 2002; 115: 123-6

**Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM, 2004.** The transcriptional repressor *Tbx3* delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 444-46

**Huang X, Yang P, Du Y, Zhang J, Ma A, 2007.** Age-related down-regulation of HCN channels in rat sinoatrial node. *Basis Res Cardiol* 2007; 102: 429-35

**Ishii TM, Takano M, Ohmori H, 2001.** Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol* 2001; 537: 93-100

**Izumida N, Asano Y, Doi S, Wakimoto H, Fukamizu S, Kimura T, Ueyama T, Sakurada H, Kawano S, Sawanobori T, Hirooka M, 2004.** Changes in patients with the Brugada syndrome. *Int J Cardiol* 2004; 95: 261-8

**Johannsson C, Vennstrom B, Thoren P, 1998.** Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1-deficient mice is an intrinsic defect. *Am J Physiol* 1998; 275: 640-6

**Jose AD, Stitt F, Collison D, 1970.** The effects of exercise and changes in body temperature on the intrinsic heart rate in man. *Am Heart J* 1970; 79: 488-98

**Karow T, Lang-Roth R, 2004.** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2004; Seite 51

**Kirchhof P, Eckardt L, Loh P, Weber K, Fischer PJ, Seidl KH, Bocker D, Breithardt G, Haverkamp W, Borggreffe M, 2002.** Anterior-posterior versus anterior-lateral electrode positions for external cardioversion of atrial fibrillation: a randomised trial. *Lancet* 2002; 360: 1275-9

**Kirchhof P, Fabritz L, Fortmüller L, Matherne GP, Lankford A, Baba HA, Schmitz W, Breithardt G, Neumann J, Boknik P, 2003.** Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H145-53

**Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schafers M, Zellerhoff S, Paul M, Athai T, Hiller KH, Baba HA, Breithardt G, Ruiz P, Wichter T, Levkau B, 2006.** Age- and training- dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin- deficient mice. *Circulation* 2006 Oct 24; 114 (17): 1799-806

**Knight RF, Bader DM, Backstrom JR, 2003.** Membrane topology of Bves/POP1A, a cell adhesion molecule that displays dynamic changes in cellular distribution during development. *J Biol Chem* 2003; 278: 32872-9

**Knollmann PC, Kirchhof P, Sirenko SG, Degen H, Greene AE, Schober T, Mackow JC, Fabritz L, Potter JD, Morad M, 2003.** Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca<sup>2+</sup>-dependent action potential remodeling. *Circ Res* 2003; 94: 428-36

**Korte et al., 2002.** In- Vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. *J Interv Card Electrophysiol* 2002; 6: 121-32

**Monning G, Eckardt L, Wedekind H, Haverkamp W, Gerss J, Milberg P, Wasmer K, Kirchhof P, Assmann G, Breithardt G, Schulze- Bahr E, 2006.** Electrocardiographic risk stratification in families with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J* 2006 Sept; 27: 2074-80

**Mubagwa and Flameng, 2001.** Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 25-39

**Myers DC, Fishmann GI, 2003.** Molecular and functional maturation of the murine cardiac conduction system. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 289- 95

**Nakaki K, Kenhisa M, 1992.** A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 1992; 14, 897-911

**Nagase S, Kusano KF, Morita H, Fujimoto Y, Kakishita M, Nakamura K, Emori T, Matsubara H, Ohe T, 2002.** Epicardial electrograms of the right ventricular outflow tract in patients with Brugada syndrome: using the epicardial lead. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1992-5

**Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compernelle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet P, 2001.** A abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med* 2001; 7:1021-7

**Osler ME, Bader DM, 2004.** Bves expression during avian embryogenesis. *Dev Dyn* 2004; 229: 658-67

**Osler ME, Chang MS, Bader DM, 2005.** Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci* 2005; 118: 4667-78

**Osler ME, Smith TK, Bader DM, 2006.** Bves, a member of the Popeye domain-containing gene family. *Dev Dyn* 2006; 235: 586-93

**Reese DE, Bader DM, 1999.** Cloning and expression of hbves, a novel and highly conserved mRNA expressed in the developing and adult heart and skeletal muscle in the human. *Mammalian Genom* 1999; 10: 913-15

**Reese DE, Zavaljevski M, Streiff NL, Bader DM, 1999.** bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Develop Biol* 1999; 209: 159-71

**Remme CA, Nuyens D, van Ginneken ACG, van Brunnschot S, Beltermann CNW, Wilders R, van Roon MA, Tan HL, Wilde AAM, Carmeliet P, de Bakker JMT, Veldkamp MW, Bezzina CR, 2006.** Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 2006; 114: 2584-94

**Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, 2001.** Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Develop* 2001; 128(10): 1785-92

**Rentschler S, Zander J, Meyers K, 2002.** Neuregulin- 1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Sci USA* 2002; 99: 10464-9

**Ripley AN, Chang MS, Bader DM, 2004.** Bves is expressed in the epithelial components of the retina, lens, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2475-83

**Ripley AN, Osler ME, Wright CV, Bader DM, 2006.** Xbves is a regulator of epithelial movement during early *Xenopus laevis* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 614-9

**Rumyantsev P, 1991.** Growth and hyperplasia of cardiac muscle cells. Harwood academic, London. 1991

**Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AAM, Escande D, Mannens MMAM, Le Marec H, 1999.** Cardiac conduction defects associated with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; 23: 20-1

**Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D, 2003.** Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 2003; 111: 1537-45

**Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R, 2001.** Genotype- phenotype correlation in the long- QT syndrom: gene- specific triggers for life- threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103: 89-95

**Silbernagel et Despopoulos, 1991.** Kapitel „Nerv und Muskel“ und „Herz- Kreislauf“ in Taschenatlas der Physiologie, Verlag Thieme, Stuttgart, New York. S.22-9, S.164-8

**Smith TK, Bader DM, 2006.** Characterization of Bves expression during mouse development using newly generated immunoreagents. *Dev Dyn* 2006; 235: 1701-8

**Sonnhammer E, von Heijne G, Krogh A, 1998.** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In “ Proceedings of the Sixth internat. conference on intelligent systems for molecular biol, 1998; 175-82

**Stieber J, Thomer A, Much B, Schneider A, Biel M, Hofmann F, 2003.** *J Biol Chem* 2003; 278: 33672-80

**Stone T, Collis MG, Williams M, Miller LP, Karasawa A, Hillaire- Buys D, 1995.** Adenosine: Some therapeutic applications and prospects. In: Cuello AC and Collier B (Hrsg) *Pharmacological Science: Perspectives for Research and Therapy in the late 1990s*, Birkhäuser Verlag, Berlin, 1995, S. 303-9

**Tan HL, Bezzina CR, Smits JP, Verkerk AO, Wilde AA, 2003.** Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 961-73

**Tukkie R, Sogaard P, Vleugels J, de Groot IKLM, Wilde AAM, Tan HL, 2004.** Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome. *Circulation* 2004; 109: 1272-7

**Van Veen TAB, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CLH, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JM, van Rijen HV, 2005.** Impaired impulse propagation in SCN5A-knockout mice. Combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 2005; 112: 1927-35

**Vasavada TK, DiAngelo JR, Duncan MK, 2004.** Developmental expression of POP1/Bves. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 371-7

**Wada AM, Reese DE, Bader DM, 2001.** Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Develop* 2001; 128: 2085-93

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abl.	Ableitung
AJ	„hot air jet“ Stress
AoPGmax	maximaler Druck über der Aorta
AoV	Aortenwurzeldurchmesser
AoVmax	maximale Geschwindigkeit über der Aorta
APD	Aktionspotentialsdauer
AV	atrioventrikulär
baseline	Kontrolle, normale Bedingungen
bpm	beats per minute, Schläge pro Minute
CL	Zykluslänge
Diaz.	Diazepam
Echo.	Echokardiographie
EDV	enddiastolisches Volumen des linken Ventrikels nach Teichholz
EF nach Teichholz	Ejektionsfraktion des linken Ventrikels nach Teichholz
EKG	Elektrokardiographie
ESV	endsystolisches Volumen des linken Ventrikels nach Teichholz
FS	linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
Isofl.	Isofluran
IVS	interventrikuläres Septum
KG	Körpergewicht
LA	Linker Vorhof
LQTS	Langes QT-Syndrom
LV	linker Ventrikel
LVET	linksventrikuläre Ejektionszeit
LVOT	linksventrikulärer Ausflusstrakt
LVW	linksventrikuläre Wand

MAP	monophasisches Aktionspotenzial
MV PGmean	mittlerer Druck über der Mitralklappe
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
RA	rechter Vorhof
RLS	Reizleitungssystem
RV	rechter Ventrikel
SV Ao	Schlagvolumen der Aorta
Vefc	zirkuläre Faserverkürzung nach HF korrigiert
WT	Wildtyp

## **8. Lebenslauf**

## **9. Danksagung**

Zunächst geht mein Dank an Frau Dr. Larissa Fabritz und Prof. Dr. Paulus Kirchhof. Vielen Dank für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, für die fortwährende Betreuung und die tatkräftige Unterstützung bei der Planung der Experimente. Bei Frau Dr. Fabritz möchte ich mich besonders auch dafür bedanken, dass ich mich jederzeit mit Problemen, die Experimente oder auch die Niederschrift der Doktorarbeit betreffend, an sie wenden konnte.

Weiter geht mein herzlicher Dank an das gesamte Tierstall-Labor-Team. Durch die freundliche Atmosphäre haben die meist langen Arbeitstage viel Spaß gemacht.

Mein Dank geht an Daniela Volkery für die liebe Unterstützung, besonders zu Anfang im Tierstall. Ich konnte mich mit Problemen immer an sie wenden.

Vielen Dank auch bei Dr. Lisa Fortmüller für die herzliche und kompetente Einarbeitung in die Echokardiographie sowie ihre Hilfe in der Telemetrie.

Für die Hilfe in jeglichen computertechnischen Problemen sowie für die Einarbeitung in die Telemetrie möchte ich mich herzlich bei Marcel Tekook bedanken.

Nina Kreienkamp danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung bei anstehenden Experimenten, die Untersuchung der isolierten Mausherzen sowie für die Hilfe beim „Verstehen der Langendorffgeschichte“.

Bei Sandra Laakmann und Christoph Waldeyer möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und einen guten Ratschlag zur rechten Zeit bedanken.

Bei der Deutschen Bundeswehr bedanke ich mich für die Unterstützung während des Studiums.

Ich möchte mich herzlichst bei meinem Bruder Niklas bedanken für die richtigen Worte zur rechten Zeit und die große Hilfe am Computer.

Schließlich geht mein Dank an meine Eltern, die mich während des gesamten Prozesses der Doktorarbeit unterstützt haben, auch dann wenn die Situation verfahren schien.



*Handwritten:* Kopie → Kuhl, Müller, Farniger, Grottel-Walsh

*Handwritten:* Inhaber: Tierärztliche

*Stamp:* 25.11.2005

DER OBERBÜRGERMEISTER



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster  
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
 Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz  
 Domagkstraße 12

48149 Münster

Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstraße 1

Auskunft erteilt:  
 Frau Feldkamp  
 Zimmer: 105  
 Telefon: 02534/971 - 304  
 Telefax: 02534/971 - 399  
 E-Mail: feidkamp@stadt-muenster.de  
 Sprechzeiten:  
 nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen:  
 39.32.5.4

Münster,  
 20.01.2005

**Tierschutz**

<b>Tierversuch: G 83/2004</b>	
<b>Versuchsleiter: Prof. Dr. Wilhelm Schmitz</b>	<b>Stellvertreter: PD Dr. Peter Boknik</b>

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung und Zucht von

**3156 Mäusen für das Versuchsvorhaben.**

Diese Erlaubnis ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

1. Die Tiere werden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Domagkstraße 12, und im ZTE, Universitätsklinikum MS, Domagkstr. 15a, 48149 Münster, gehalten und gezüchtet.
2. Treten bei der Zucht von gentechnisch veränderten Tieren Anomalien auf, die besondere Haltungsbedingungen erforderlich machen, ist dieses dem Veterinäramt der Stadt Münster umgehend mitzuteilen.
3. Es ist dafür zu sorgen, dass den Tieren - ihrer Art entsprechend - ausreichende Beschäftigungsmöglichkeiten geboten werden.
4. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren. Außerdem sind die Tiere zu kennzeichnen.
5. Die Verantwortung für die Zucht, Haltung, Unterbringung und Pflege der Tiere liegt bei Ihnen. Bei einem Wechsel der verantwortlichen Person erlischt diese Erlaubnis.
6. Für die Pflege und Betreuung Herr Bußmann, Herr Nissen und die Tierpfleger der ZTE benannt.

<b>Konten der Stadtkasse</b>				<b>Zentrale Verbindungen</b>			
Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 215 000	(BLZ 400 400 28)	Hauptvermittlung	(0251) 492-0
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)	Telefax	(0251) 492-7700
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-461	(BLZ 440 100 45)	Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 808 465 600	(BLZ 400 800 40)	Datex-J	*0251492#
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 800 50)	E-Mail	
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 306 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 600 00)	Stadtverwaltung	stadt-muenster.de

7. Die medizinische Versorgung der Tiere hat durch Herrn Dr. M. Lücke, Leiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE), zu erfolgen. Über die Zucht und Haltung ist er ebenfalls zu informieren.
8. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei der Tierart und der Tierzahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzutellen.
9. Für den Fall von erheblichen oder wiederholten Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Erlaubnis vor.
10. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor.
11. Diese Genehmigung gilt für die Versuchsdauer, längstens jedoch bis zum 31.12.2007.

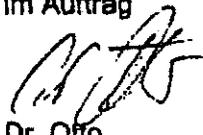
**Hinweis:**

**Bei Arbeiten mit genmanipulierten Tieren müssen die Vorschriften nach dem Gentechnikrecht eingehalten werden.**

**Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diese Erlaubnis können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen die Erlaubnis bekannt gegeben worden ist, schriftlich oder zur Niederschrift bei dem Oberbürgermeister der Stadt Münster (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, 48127 Münster) Widerspruch erheben. Der Nachbriefkasten befindet sich am Stadthaus I, Klemensstraße 10. Sie können den Widerspruch auch direkt beim Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, Amt 39, 48127 Münster, Hausanschrift: Schelmenstiege 1, 48161 Münster) erheben.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag



Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor