

Aus dem Bereich Molekulare Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung der molekularen Regulation von Physiologie und Pathologie des Herzens anhand spezifischer in vivo-Modelle

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der theoretischen Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von Laura Christin Schröder

geboren am 30.03.1987 in Saarbrücken

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung und eigene Fragestellung	5
2.1 Das Herz: Anatomie und Funktion	5
2.2 Der Herzzyklus	7
2.3 Laplace'sches Gesetz und Hypertrophie	8
2.4 Mikroskopische Anatomie und Physiologie der Kontraktion	9
2.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	14
2.6 Proteinkinasen C	17
2.7 PKC im Herzen	19
2.8 Ziele dieser Arbeit:	22
3 Material und Methoden	24
3.1 Materiallisten	24
3.2 Erstellung der PKC ϵ -Konstrukte	35
3.3 Adeno-assoziierte Viren zur Transduktion mit PKC ϵ -cDNS	35
3.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	36
3.5 Transduktion der Versuchstiere	40
3.6 Langzeit-Expressionskontrolle mittels Organfluoreszenz	42
3.7 Kontrolle der Expression auf Proteinebene	45
3.8 Echokardiographische Untersuchung	48
3.9 Operative Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion	58
3.10 Isolation und Kultivierung muriner Kardiomyozyten	66
3.11 Konfokalmikroskopische Untersuchung muriner Kardiomyozyten	68
3.12 <i>in vivo</i> -Applikation von Aldosteron: Osmotische Minipumpen	72
3.13 Bestimmung des Aldosterongehaltes im Serum	75
3.14 Histologische Präparation der Herzen	76
3.15 Polarisationsmikroskopie am histologischen Schnitt	78
3.16 Fluoreszenzmikroskopie am histologischen Schnitt	81
3.17 Statistische Auswertung der Ergebnisse	83

4	Ergebnisse	84
4.1	Bedeutung der Aktivität der PKC ζ in murinen Herzen und Herzzellen	84
4.1.1	Allgemeiner Phänotyp der Versuchstiere	84
4.1.2	Ergebnis der Fluoreszenzmessung an den Organen	85
4.1.3	Beschreibung des kardialen Phänotypes in der Echokardiographie	89
4.1.4	Echokardiographische Befunde der neonatal injizierten C57Bl6/N	96
4.1.5	Echokardiographische Befunde nach Nachlasterhöhung	98
4.1.6	Nachweis der Expression auf Proteinebene	108
4.1.7	Konfokalmikroskopische Untersuchung der isolierten Kardiomyozyten	112
4.1.8	Untersuchung der Regularität der T-Tubuli	112
4.2	Auswirkung von Hyperaldosteronismus und Hypertrophie bei inaktiver G α_q - und G11- Untereinheit in Kardiomyozyten	115
4.2.1	Echokardiographische Untersuchung vor und nach sechswöchiger Ap- plikation von Aldosteron	115
4.2.2	Entwicklung der echokardiographischen Parameter unter Aldosteron- einfluss	120
4.2.3	Der Aldosterongehalt im Serum	122
4.2.4	Kollagengehalt in den histologischen Schnitten	123
4.2.5	Effekt der Hypertrophie durch Nachlasterhöhung	126
4.3	Rolle der verschiedenen Ca $_v$ 1.2- β 2- Isoformen für Morphologie und Funktion des Herzens	129
4.3.1	Auswirkungen des induzierten kardialen Ca $_v$ 1.2- β 2-KO	129
4.3.2	Expression spezifischer Spleißvarianten im konstitutiven Knockout	131
4.3.3	Vergleich beider Studien	133
5	Diskussion	137
5.1	Phänotyp der Tiere bei Expression der verschiedenen PKC ζ -Aktivitätstypen	137
5.2	Beurteilung der Bedeutung der Regelmäßigkeit der T-Tubuli:	141
5.3	Der Einfluss von Nicht-Studien-Parametern	145
5.4	Betrachtungen zur Optimierung des viralen Gentransfers	146
5.5	Aldosteron beeinflusst die Herzfunktion abhängig von G α_q G11	152
5.6	Interstitielle Kollagenablagerung durch Aldosteron in Abhängigkeit von G α_q G11	155
5.7	TAC in G α_q G11-DKO: Wenig Unterschied zum Wildtyp	157

5.8	Bedeutung der β -Untereinheit für die Herzfunktion	159
5.9	Experimente zur Rettung des pathologischen Phänotypes bei $Ca_v\beta 2$ -KO . . .	161
6	Literaturverzeichnis	164
7	Publikationen/Dank	181
7.1	Publikationen	181
7.2	Danksagung	182

Abkürzungsverzeichnis

A-Wave	atriale Füllungswelle
AAV	adeno-assoziierte Viren
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AOBS	akusto-optischer Strahlenteiler
aPKC	atypische Proteinkinase C
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbiträre Einheit
B-Mode	Helligkeitsmodus
CA	konstitutiv aktiv
Cav-Kanal	spannungsabhängiger Kalziumkanal
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung
CMV	Cytomegalie-Virus
cPKC	konventionelle Proteinkinase C
DAG	Diacylglycerol
DC	mittlere Signalintensität
decel	Abnahmegeschwindigkeit der E-Welle
DN	dominant negativ
E-Wave	frühe Füllungswelle
E11	Tag 11 der Embryonalentwicklung
EF	Auswurfraction
EF2	eukaryotischer Elongations-Translokations-Faktor 2
FFT	Fast Fourier Transformation

FS	relative Ventrikelverkürzung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HRP	Rettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltriphosphat
ITR	invertierte terminale Wiederholungssequenz
IVRT	isovolumetrische Relaxationszeit
IVS	Interventrikuläres Septum
kb	kilo-Basenpaare
KO	Knockout
L-Tubuli	longitudinale Tubuli
L-Typ	langsamer Typ
LVAW	Vorderwand des linken Ventrikels
LVID	innerer Durchmesser des linken Ventrikels
LVPW	Hinterwand des linken Ventrikels
M-Mode	Bewegungs-Zeit-Modus
MHC	schwere Myosinkette
MLC	leichte Myosinkette
MR	Metalloproteinasen-Rezeptor
NaCl	Natrium-Chlorid

NCX	exportierender Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	Kerntranslokationsfaktor aktivierter T-Zellen
nPKC	neue Proteinkinase C
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-Reagenz
PFA	Paraformaldehyd
Pi	Phosphatrest
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β
PS	Phosphatidylserin
PW	pulsed wave
PW-Doppler	Pulsed Wave Doppler
RACK	Rezeptor für aktivierte C-Kinase
ROI	Bildregion von Interesse
RyR	Ryanoidin-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SERCA	sarko-endoplasmatische Retikulum-ATPase
SPF	spezifisch pathogenfrei
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubuli	transversale Tubuli
TAC	Aortenkonstriktion

TagRFPT	rotes Fluoreszenzprotein
TierSchG	Tierschutzgesetz
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
UE	Untereinheit
USP	United States Pharmacopeia
vg	Vektorgenome
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Im Menschen ist das Herz das zentrale Organ des kardiovaskulären Systems, seine Pumpleistung erhält die Körperhomöostase aufrecht. Die Funktion des Herzens wird hierfür durch eine große Zahl von Hormonen und deren nachgeschalteten intrazellulären Signalverarbeitungsmechanismen moduliert und reguliert. In dieser Arbeit wurden mithilfe von spezifischen Tiermodellen drei dieser Signalkassetten genauer untersucht: Die atypischen Proteinkinasen C, Gq/11 Proteine sowie deren Hormone und die β_2 -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals im Herzen. Atypische Proteinkinasen C stellen eine Unterfamilie der Proteinkinasen C dar, und besitzen eine große Bedeutung bei einer Vielzahl von intrazellulären Regulationsprozessen, wie Kontraktion oder Regulation des Zytoskeletts. Ihre Rolle im Herzen ist weitgehend unbekannt, was sicherlich auch darin begründet liegt, dass keine spezifischen pharmakologischen Werkzeuge zu ihrer Aktivitätsmodulation bekannt sind. In dieser Arbeit wird ein neuartiger Ansatz zur Untersuchung der Proteinkinase C *iota* gewählt. Durch virusvermittelte herzspezifische *in vivo* Expression von aktivitätsinhibierten (DN) bzw. konstitutiv aktiven (CA) Isoformen der PKC ι konnten die entsprechenden Aktivitätsmodulationen dieses Enzyms in den Herzmuskelzellen erreicht werden.

Die Resultate einer solchen Intervention wurden hinsichtlich ihrer *in vivo* Effekte, aber auch bezüglich möglicher Veränderungen der Morphologie des einzelnen Kardiomyozyten, untersucht. Die Reduktion der intrazellulären PKC ι -Aktivität durch die DN-PKC ι führte in der Echokardiographie *in vivo* zu einer milden kardialen Hypertrophie, die Überexpression der CA wie auch der unveränderten Wildtyp-Form induzierten allerdings keine Veränderungen der Herzfunktion. Diese Befunde am lebenden Tiermodell konnte durch Untersuchungen der Morphologie der einzelnen Herzmuskelzellen gestützt werden. Charakteristische Membraneinstülpungen, die T-Tubuli, waren nach Reduktion der intrazellulären PKC ι -Aktivität ebenfalls deutlich reduziert. Allerdings kehrten sich die Effekte um, wenn dieselben Isoformen in Herzen exprimiert wurden, in denen durch TAC eine Hypertrophie ausgelöst wurde. Hier führte die Heraufregulation der intrazellulären PKC ι Aktivität zu einer signifikanten Verminderung der Hypertrophie. Aus diesen Befunden kann geschlussfolgert werden, dass die PKC ι Aktivität im Herzen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Herzkrankheiten, wie der Herzmuskelschwäche, besitzt und unter Umständen ein neues pharmakologisches Target für deren Therapie darstellen könnte.

Im Herzen besitzen die $G\alpha_qG_{11}$ Proteine eine wichtige Relaisfunktion bei der Transduktion

von hormoneller Aktivierung in zelluläre Antworten, wie beispielsweise bei der Kontraktionsmodulation und dem zellulären Wachstum. Im zweiten Teil dieser Arbeit war daher die Rolle von $G\alpha_qG_{11}$ -Proteinen bei Hypertrophieentwicklung durch Nachlastserhöhung und bei Hyperaldosteronismus im Fokus der Untersuchungen. Insbesondere wurde der Zusammenhang dieser Untereinheiten mit dem profibrotischen Effekt von Aldosteron hinterfragt. Dazu wurde den Tieren über sechs Wochen Aldosteron mit einer subkutanen Minipumpe appliziert, die Tiere echokardiographisch untersucht und histologische Schnitte der Herzen auf den Kollagengehalt geprüft. Für die Kollagenbestimmung wurden zwei verschiedene Verfahren gewählt: Die Lichtpolarisation und die spezifische Fluoreszenz der Färbung mit Siriusrot. Es zeigte sich eine Überlegenheit der Fluoreszenzmikroskopie. In der Auswertung ergab sich, dass in der Maus, welcher durch konditionelles induziertes Knockout $G\alpha_q$ - und G_{11} -Untereinheiten fehlten, weniger kardiales Kollagen durch Aldosteron gebildet wurde, als in den Vergleichstieren mit physiologischer Ausprägung der Untereinheiten.

Im dritten Teil meiner Arbeit erfolgten Untersuchungen zur Funktion der β_2 -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals im Herzen, der bei der elektromechanischen Kopplung (Übersetzung der elektrischen Aktivität in mechanische Arbeit) eine zentrale Rolle besitzt. Hierzu sind neuartige Tiermodelle verwendet worden, in denen diese Untereinheit genetisch ausgeschaltet wurde (β_2 KO-Maus). Aufbauend auf diese Tiermodelle erfolgte eine Charakterisierung der Rolle von neu identifizierten embryonalen und adulten Spleißvarianten der β_2 -Untereinheit *in vivo*, auf dem Hintergrund der β_2 KO-Maus. Dazu wurden die entsprechenden Tiere einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen. Der herzspezifische, postnatal induzierte Verlust der Genexpression bewirkte eine Verminderung des ventrikulären Volumens, bei deutlichem Gewichtsverlust, der eine Belastung nahe legt. Dieser Phänotyp war jeweils durch Expression einer der beiden Spleißvarianten des Gens zu retten.

Characterization of the molecular regulation of cardiac physiology and pathophysiology by using specific *in vivo* mouse models

The human heart is the central organ of the circulation system, and its pumping capacity maintains the physiological homeostasis in the body. The function of the heart is regulated by a large number of hormones, and their subsequent intracellular signal transduction cascades. In this work, three aspects of these cascades were analyzed by using specific animal models:

The atypical protein kinase C ι , the G α_q G $_{11}$ -proteins and their hormonal interactions, and the β_2 -subunit of the voltage-sensitive calcium channel in the heart.

The atypical protein kinases C are a subfamily of the protein kinases C, playing an important role in a plenty of intracellular regulatory processes, as cellular contraction or regulation of the cytoskeleton. Their exact role in cardiac myocytes is mostly unknown yet, due to the fact that there are no specific agents available to modulate the activity of these enzymes specifically. Therefore, in this project, a new approach was used. The activity of the enzyme was modulated by viral transduction and cardiac-specific expression of activity-inhibited or constitutively active isoforms of PKC ι . The effects of this intervention were both examined in vivo, and by studying the morphology of the singular cardiomyocytes. The reduction of the intracellular activity of PKC ι caused a mild cardiac hypertrophy, whereas there was no change in cardiac function by increased activity, compared to the wildtype. These in vivo results were supplemented by the morphological characteristics of the isolated ventricular myocytes. Typical membrane invaginations, the T-tubules, were reduced and disorganized by downregulating PKC ι activity. After aortic banding in these mice, the in vivo effects turned to the opposite. By increasing PKC ι activity, the induced hypertrophy was markedly reduced, compared with the downregulation of PKC ι , and wildtype. Regarding these results, it is obvious that PKC ι may play an important role in the development of cardiac pathologies, and may therefore be a new target for cardiac specific therapies.

Likewise in the heart, G α_q G $_{11}$ proteins play an important role in the transduction of hormonal signals into cellular reactions, as in the modulation of contractility, or in cellular growth. Therefore, in the second project, the functions of the G α_q G $_{11}$ proteins in hypertrophy and hyperaldosteronism were in the focus of research. In particular, the role of these proteins in the profibrotic stimulus by aldosterone was of special interest. To figure out this correlation, mice of a G α_q G $_{11}$ -KO line were treated by chronic subcutaneous infusion of aldosterone over 6 weeks, subsequently examined in vivo by cardiac ultrasound. Finally, histological preparations of their hearts were specifically stained to detect collagen content, and then imaged by two different methods. At first, polarization microscopy was done, an established way to detect intercellular collagen; additionally, the specific fluorescence of the stained tissue was detected by fluorescence microscopy. In this study, fluorescence microscopy was superior. Regarding the profibrotic effect, mice with G α_q G $_{11}$ -KO showed less cardiac collagen content increase than the wildtype mice.

In the third project, the β 2-subunit of the voltage-sensitive calcium channel was examined. This channels plays an important role in the electro-mechanical coupling, which is necessary to translate the electrical stimulus into the mechanical work of cellular contraction. For this study, a new mouse model of induced cardiac knockout of the β 2-subunit was used. Additionally to these animals with β 2-KO, the importance of both a juvenile and an adult splice variant of the β 2-subunit was tested. To find out the physiological effects, all mouse models underwent echocardiographic examination. The induced β 2-KO led to a diminished ventricular volume, and to a loss of body weight that indicated physiological stress. Expression of each of the both splice variants was able to rescue this phenotype.

2 Einleitung und eigene Fragestellung

Herz- und Kreislauferkrankungen sind nach Angaben des statistischen Bundesamtes mit 39% Anteil die häufigste Todesursache in Deutschland [2]. Eine Vielfalt von Risikofaktoren und Prädispositionen sind bekannt, dennoch sind die molekularbiologischen Ursachen vieler Erkrankungen weiterhin teilweise unbekannt, und folglich Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen. Vielfältige intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln hier die krankmachende Wirkung von äußeren und inneren Stimuli. Will man die Erkrankungen beeinflussen, ist also eine Beeinflussung dieser Signalkaskaden wesentlich, und dazu wiederum ein genaues Verständnis jener molekularen Mechanismen. Besonders muss es im Interesse der Forschung liegen, über diese Angriffspunkte einen Ausweg aus dem chronisch-degenerativen Verlauf der Schäden am Organ zu finden. Ziel ist es, Angriffspunkte für neue Therapien zu entdecken, um den Teufelskreis aus maladaptiver Hypertrophie und Funktionsverlust unterbrechen zu können. Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei Teilaspekten der subzellulären Mechanismen und Enzymkaskaden in kardiomyozytären Pathologien. Diese stellen nach bisherigem Stand der Wissenschaft gute Ansatzpunkte für ein detaillierteres Verständnis der pathologischen Prozesse in der Herzmuskelzelle dar, und könnten Ziel zukünftiger Behandlungsstrategien sein.

In dieser Arbeit wurden drei Schlüsselproteine und deren mögliche Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens studiert.

Im ersten Teil wurde die Proteinkinase-Unterform Proteinkinase C iota (PKC_{ι}) als zytosolischer Signalvermittler mit bislang unbekannter Rolle im Herzen untersucht. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Vertretern eines der zentralen Signalvermittlungsproteine, den G-Proteinen. Der dritte Teil behandelt die β_2 -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals in der Zellmembran der Herzmuskelzelle. Dieser steht am Anfang einer zentralen kardialen Signalkaskade, der elektromechanischen Kopplung.

2.1 Das Herz: Anatomie und Funktion

Das Herz ist das zentrale Organ des Blutkreislaufes des Organismus aller höheren Tiere. Die Aufgabe des Säugerherzens ist es, über den Lungenkreislauf das Blut von Kohlenstoffdioxid zu befreien, sowie es wieder mit Sauerstoff anzureichern, um danach über den großen Körperkreislauf alle Organe, Gewebe und Zellen mit sauerstoffreichem Blut versorgen zu können. Im Blut werden zudem Energie, essentielle Substrate der Zellen, hormonelle Botenstoffe, Elektrolyte

und Wasser im Körper verteilt. Um diese Funktion zu gewährleisten, muss ein bestimmtes, an die Bedarfslage angepasstes Blutvolumen pro Zeit gepumpt werden. Der dazu nötige Blutdruck muss im Körperkreislauf aufrechterhalten werden, um gegen den peripheren Widerstand des Gefäßsystems einen Fluss zu gewährleisten.

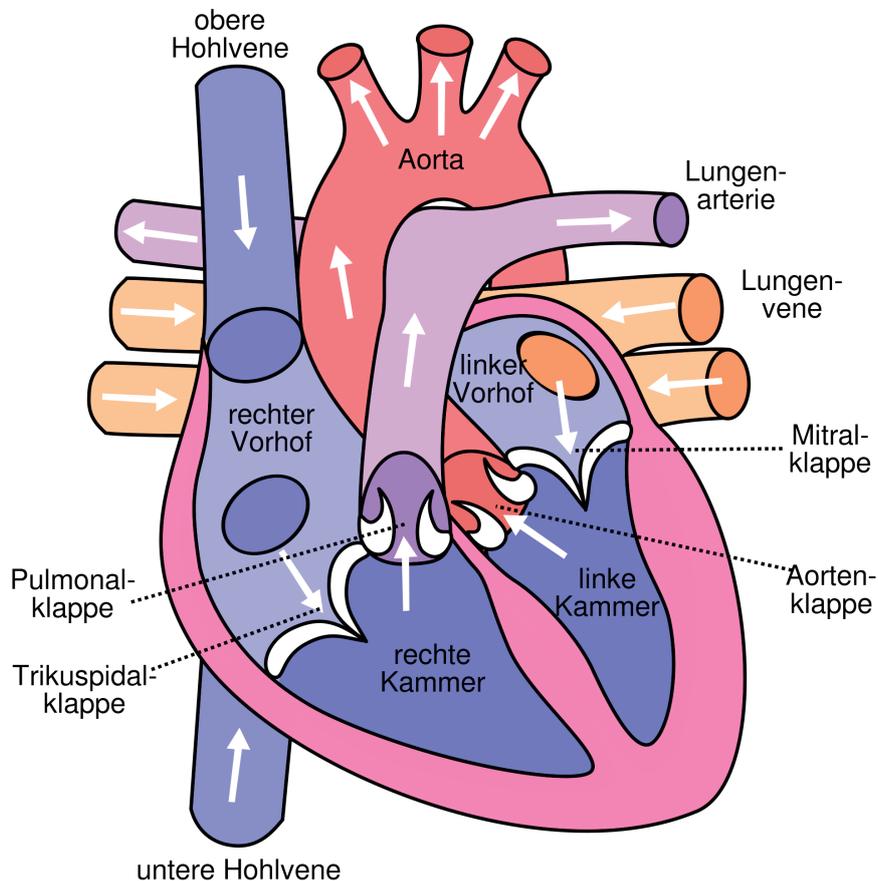


Abbildung 1: Schema des Herzens: In rosa ist der muskuläre Körper des Herzens dargestellt, bestehend aus den beiden Vorhöfen, in die das Blut (Pfeile) einströmt, und den Ventrikeln, durch die es wieder ausströmt. In blau sind Gefäße dargestellt, die das sauerstoffarme Blut transportieren, welches aus dem Körperkreislauf von der rechten Herzhälfte in den Lungenkreislauf gebracht wird. In rot sind die Gefäße dargestellt, die das sauerstoffreiche Blut aus dem Lungenkreislauf führen, welches über das linke Herz in den Körperkreislauf gebracht wird. Bei den Segelklappen zwischen Vorhöfen und Ventrikeln, und den Taschenklappen an den Ausstromgefäßen, handelt es sich um Rückschlagventile, welche die Einhaltung der korrekten Flussrichtung sichern.

„diagram of the human heart“, Jakov, creative commons -Lizenz, Wikimedia commons

Diese Funktion wird vom Herz als muskulärer Pumpe übernommen. Es ist in zwei Hälften unterteilt, der Aufbau ist in Abbildung 1 dargestellt. Die rechte Herzhälfte pumpt sauerstoffarmes Blut zum Gasaustausch in die Lunge, das linke Herz pumpt das sauerstoffreiche Blut in den Körperkreislauf. Dazu ist ein Druckunterschied in beiden Systemen nötig. So baut das linke Herz beim Auswurf etwa den fünffachen Druck auf das Blut für den Körperkreislauf auf, als das rechte Herz für den Lungenkreislauf.

und Wasser im Körper verteilt. Um diese Funktion zu gewährleisten, muss ein bestimmtes, an die Bedarfslage angepasstes Blutvolumen pro Zeit gepumpt werden. Der dazu nötige Blutdruck muss im Körperkreislauf aufrechterhalten werden, um gegen den peripheren Widerstand des Gefäßsystems einen Fluss zu gewährleisten.

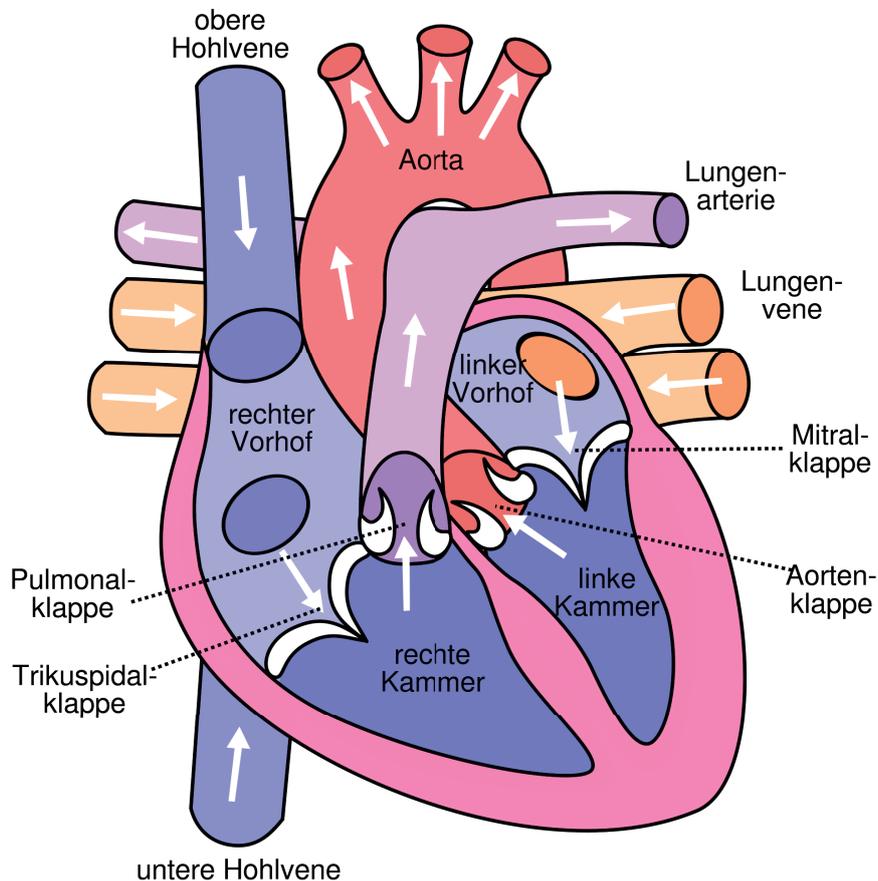


Abbildung 1: Schema des Herzens: In rosa ist der muskuläre Körper des Herzens dargestellt, bestehend aus den beiden Vorhöfen, in die das Blut (Pfeile) einströmt, und den Ventrikeln, durch die es wieder ausströmt. In blau sind Gefäße dargestellt, die das sauerstoffarme Blut transportieren, welches aus dem Körperkreislauf von der rechten Herzhälfte in den Lungenkreislauf gebracht wird. In rot sind die Gefäße dargestellt, die das sauerstoffreiche Blut aus dem Lungenkreislauf führen, welches über das linke Herz in den Körperkreislauf gebracht wird. Bei den Segelklappen zwischen Vorhöfen und Ventrikeln, und den Taschenklappen an den Ausstromgefäßen, handelt es sich um Rückschlagventile, welche die Einhaltung der korrekten Flussrichtung sichern.

„diagram of the human heart“, Jakov, creative commons -Lizenz, Wikimedia commons

Diese Funktion wird vom Herz als muskulärer Pumpe übernommen. Es ist in zwei Hälften unterteilt, der Aufbau ist in Abbildung 1 dargestellt. Die rechte Herzhälfte pumpt sauerstoffarmes Blut zum Gasaustausch in die Lunge, das linke Herz pumpt das sauerstoffreiche Blut in den Körperkreislauf. Dazu ist ein Druckunterschied in beiden Systemen nötig. So baut das linke Herz beim Auswurf etwa den fünffachen Druck auf das Blut für den Körperkreislauf auf, als das rechte Herz für den Lungenkreislauf.

Jede Herzhälfte ist in eine Vorkammer, das Atrium, und eine Hauptkammer, den Ventrikel unterteilt. Die Vorkammern sammeln das kontinuierlich einströmende Blut aus den zuführenden Niederdruckgefäßen, der großen Hohlvene (V. cava communis) und der Lungenvene, und geben es in der Füllungsphase in die Hauptkammer, den Ventrikel, ab. Zwischen Atrien und Ventrikeln befinden sich daher die Atrioventrikularklappen, die den Blutfluss nur in der Füllungsphase zulassen. Die Klappe in der rechten Herzhälfte heißt Tricuspidalklappe, im linken Herzen heißt sie Mitralklappe. An den Ausstromgefäßen der Ventrikel befinden sich ebenfalls Klappen um einen Rückstrom des Blutes nach der Auswurfphase des Herzens zu verhindern, die sogenannten Semilunarklappen. Die zum Stamm der Lungenarterien (Truncus pulmonalis) liegende Klappe heißt Pulmonalklappe, die an der Aortenwurzel liegende Klappe heißt Aortenklappe.

2.2 Der Herzzyklus

Der Herzzyklus beschreibt den sich regelmäßig wiederholenden Arbeitszyklus des Herzens. Er besteht aus vier Phasen: der Relaxations- und der Füllungsphase in der Diastole, und der Anspannungs- und Auswurfphase der Systole.

In der Relaxationsphase erschlafft das Myokard. Der Innendruck im Ventrikel fällt dabei bis unter den Druck des Vorhofes. Das Volumen ändert sich dabei nicht, daher spricht man auch von isovolumetrischer Relaxation. Ist der Druck im Ventrikel unterhalb des Vorhofdruckes angelangt, öffnen sich die Atrioventrikularklappen, was den Beginn der Füllungsphase markiert, das Blut strömt dabei bei weiterer Wandrelaxation ein. Zum Ende der Füllungsphase kontrahieren die Vorhöfe und pressen so zusätzlich Blut in den Ventrikel. Mit steigender Herzfrequenz verkürzt sich die Dauer der Füllungsphase durch Relaxation, in der Folge gewinnt die aktive Füllung der Ventrikel durch die Vorhofsystole an Bedeutung. Die gesamte Füllungsphase nimmt den größten Teil der Diastole in Anspruch.

Das Schließen der Atrioventrikularklappen markiert dann den Übergang von der Diastole in die Systole, damit den Beginn der Anspannungsphase. In dieser kontrahiert das Kammermyokard, und erhöht dabei schnell den Druck auf das bei geschlossenen Klappen konstante Blutvolumen im Ventrikel. Überschreitet der intraventrikuläre Druck den Druck des arteriellen Systems dahinter, öffnen sich die Semilunarklappen, die Auswurfphase des Blutes beginnt nun. Das Blut strömt solange der Druck im Ventrikel höher ist als im Gefäßsystem dahinter. Dieser Strom ebbt ab, wenn sich die Drücke angleichen. Sinkt dann der Druck im Ventrikel weiter durch Relaxation des Myokards oder erhöht der Tonus den Druck im Gefäßsystem, so schließen

sich die Klappen. Dies gewährleistet einen unidirektionalen Fluss des Blutes.

Die beiden vom Herzen versorgten Kreisläufe unterscheiden sich dabei hauptsächlich durch die Druckverhältnisse; während im kleinen Lungenkreislauf ein mittlerer Druck von 24 mmHg ausreicht, beträgt der mittlere arterielle Druck im großen Körperkreislauf, durch den größeren peripheren Widerstand, 100 mmHg. Da im rechten Ventrikel somit weniger Druck aufgebaut werden muss, beginnt dessen Auswurfphase früher und dauert länger an, als die des linken Ventrikels.

2.3 Laplace'sches Gesetz und Hypertrophie

Der Kammerdruck ist dabei direkt abhängig von der Wandstärke des Ventrikels, der Wandspannung, und verhält sich umgekehrt proportional zum Kammerradius. Infolgedessen sind die Kammerdrücke aller Säugetiere vergleichbar, da bei physiologisch sinnvollen größeren Volumina bei größeren Arten auch dickere Myokardwände möglich sind. Zugrunde liegt hier das Laplace'sche Gesetz, nach Pierre-Simon Laplace (1805):

$$P = K \cdot \frac{2d}{r}$$

Hier steht P für den Blutdruck im System, traditionell in der Medizin in mmHg angegeben; K steht für die Wandspannung (in N/cm^3), d für die Wandstärke und r für den Radius des Ventrikels. Wandstärke und Radius können artspezifisch wenige Millimeter bis zu mehreren Zentimetern betragen.

Andererseits bedeutet dieser Zusammenhang auch, dass, sobald sich im Individuum ein Parameter ändert, die anderen entsprechend angeglichen werden müssen, da der Blutdruck für einen adäquaten Blutfluss im System aufrechterhalten werden muss.

Der periphere Widerstand beeinflusst insofern das Herz, als dass eine pathologische Veränderung des Widerstands den Blutdruck direkt verändert. Der veränderte, beispielsweise erhöhte Blutdruck muss durch eine höhere Pumpleistung des Herzens ausgeglichen werden. Mittelfristige Angleichungen erfolgen dabei primär in Form einer Erhöhung der Wandstärke durch Muskelwachstum in Form von Hypertrophie.

Hypertrophie bezeichnet das Herzwachstum nach Geburt, das durch eine Zunahme der Zellgröße bei konstanter Zellzahl gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu steht die embryonale

Hyperplasie des Herzens, bei der die Zunahme der Herzmasse mit einer Teilung der Zellen einhergeht. Dies ist nach Geburt physiologischerweise nicht mehr möglich, da die hochgradig spezialisierten Kardiomyozyten aus dem regulären Zellzyklus ausgetreten sind, weshalb sie sich nicht mehr teilen können. Ist infolge von körperlicher Entwicklung, Schwangerschaft, oder erhöhter Leistung durch Sport, eine längerfristige Anpassung der Herzmasse zur Steigerung des Blutauswurfes nötig, geschieht dies in Form physiologischer (auch als adaptiv oder kompensatorisch bezeichnete) Hypertrophie [30]. Diese ist wieder reversibel, sollte der Bedarf durch erhöhte Leistung nicht mehr bestehen. Dagegen gibt es auch innerhalb pathologischer Vorgänge die Notwendigkeit der Anpassung der Herzmasse an den veränderten Bedarf. Beispielsweise in Folge von direkten mechanischen Defekten am Herzen, wie etwa infolge von Myokardinfarkten, oder durch die vermehrte Ausschüttung hypertropher Agonisten. Eine solche Veränderung der Pumpleistung aufgrund pathologischer Prozesse ist häufig zuerst ebenfalls adaptiv, sie passt sich dem erhöhten Bedarf an. Bei chronischer Einwirkung der pathologischen Reize kann jedoch ein Übergang in eine maladaptive, dekompensatorische Form der Hypertrophie stattfinden, die Herzleistung und die Funktionsfähigkeit des Herzens verschlechtert sich über eine Herzmuskelschwäche [74] bis zum Herzversagen.

2.4 Mikroskopische Anatomie und Physiologie der Kontraktion

Aufbau und Ablauf des Filamentgleitens

Der Herzmuskel ist, wie auch der Skelettmuskel, ein quergestreifter Muskel. Der mikroskopische Eindruck der Querstreifung entsteht dabei durch die sehr regelmäßig organisierte Anordnung der beiden an der Kontraktion beteiligten Elemente, des dünnen Aktins (Durchmesser ca. 6-7 nm) und des dickeren Myosins (Durchmesser ca. 10 nm). Sie bilden das Sarkomer, die kontraktile Einheit eines Muskels. Dabei sind die Aktinstränge über α -Aktinin direkt an der Z-Scheiben befestigt, das Myosin liegt dagegen im Zentrum des Sarkomers. An der Aktin-Helix ist ein Tropomyosinstrang angelagert, daran befinden sich in regelmäßigen Abständen Troponin-Einheiten. Die Troponin-Einheiten bestehen aus Troponin T (TnT), welches die Bindung an das Tropomyosin herstellt, Troponin C (TnC), das Kalziumionen binden kann, und Troponin I (TnI), das im Ruhezustand die Myosinbindestelle blockiert.

Das Myosinmolekül ist aus zwei schweren Ketten (Myosin heavy chain, MHC) und zwei leichten Ketten (Myosin light chain, MLC) aufgebaut. Die schweren Ketten formen dabei einen Myosinkopf, einen Hals- und einen Schwanzteil; an jeden Myosinkopf sind zudem zwei leichte

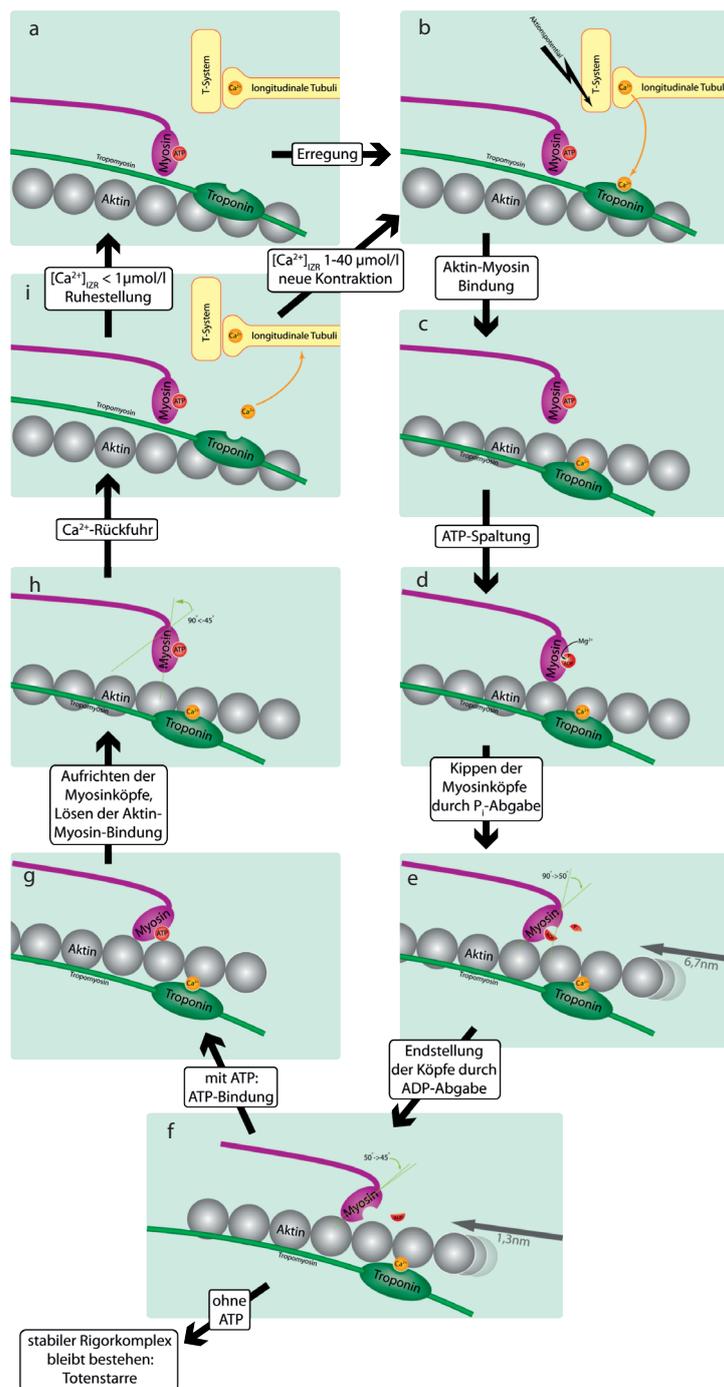


Abbildung 2: Gleitfilamenttheorie: a: gesamter Komplex im Ruhezustand. Der Myosinkopf (violett) mit gebundenen ATP (rot) steht in 90° zu Aktin (grau) und Troponin (grün), tubuläre Systeme (gelb): Die T-Tubuli der Zellmembran, rechtwinklig dazu die L-Tubuli des SR. b: trifft ein AP ein (schwarzer Blitz), wird aus dem SR Ca^{2+} freigesetzt, das an Troponin bindet. c: Konformations- und Lokalisationsänderung Troponin, die Myosinbindestelle wird frei. d: Myosin kann an Aktin binden; e: Myosin knickt um 40° ab („Rudern“), ATP wird zur Energiegewinnung gespalten, ADP verbleibt noch an der Bindungsstelle, Aktin wird um ca. 6,7 nm in die Sarkomermitte gezogen f: ADP löst sich auch ab, weiteres Abknicken um 5°, Bewegung um weitere 1,3 nm; g: ein neues ATP bindet an Myosin h: Myosin löst sich von Aktin, Kopf geht wieder zurück auf 90°-Winkel. i: abhängig von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ZK}}$: Bei geringem Level ($< 1 \mu\text{mol/l}$) Übergang in den Ruhezustand, bei mehr $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ZK}}$ Beginn einer neuen Kontraktion. „Molekulare Mechanismen der Muskelfunktion“, Hank van Helvete 2006, creative commons -Lizenz, Wikimedia commons

Myosinketten gebunden. Die Halsregion ist dabei beweglich, und zudem besitzen die Myosinköpfchen die Möglichkeit, Adenosintriphosphat (ATP) zu spalten, um Energie zu gewinnen. Für die Kontraktion ist ein Wechselspiel aus Bindung und Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander nötig. Der zugehörige Mechanismus ist auch als „Gleitfilamenttheorie“ bekannt [1]. Sie beruht auf dem Modell, dass sich die Filamente selbst nicht verkürzen, sondern ineinander gleiten, wodurch die Gesamtlänge der Muskelfaser verkürzt wird. Das Prinzip wird in Abbildung 2 erläutert.

Grundsätzlich kommt es zum Ende der elektro-mechanischen Kopplung zu einer Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumionen (Ca^{2+}), die an die TnC-Untereinheit binden, wodurch sich die Bindung von TnT an Tropomyosin verstärkt und das Tropomyosin tiefer in die Aktinhelix einrückt (Abbildung 2b, c). Die Bindungsstelle für Myosin wird dann von TnT freigegeben, dann kann der Myosinkopf an das Aktin binden (Abbildung 2d). Hat sich die Aktin-Myosin-Querbrücke ausgebildet, knickt der Myosinhals durch ATP-Spaltung und nachfolgende Dissoziation erst um 40° , dann um weitere 5° ab, und zieht dabei das Aktin zuerst um 6,7 nm, danach 1,3 nm in Richtung Sarkomermitte (Abbildung 2e, f). Die gesamte Verkürzung des Sarkomers wird dann durch schnelle Wiederholung dieses Vorganges, dem sogenannten „Rudern“ oder „Querbrückenzyklus“ der Myosinköpfchen, erreicht. Der Prozess des Ruderns konnte mit Röntgen-Kristallographie dargestellt werden [36]. Die Ablösung des Köpfchens vom Aktin erfolgt durch die Bindung eines neuen ATP-Moleküls (Abbildung 2g). Blicke dies aus, würde sich die Totenstarre (Rigor mortis) einstellen.

Die Kontraktion wird durch einen vorübergehenden Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Zytosol induziert. Dieser Ca^{2+} -Transient ist die Folge eines initialen Ca^{2+} -Einstromes während des AP, durch Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle. Dieser Ca^{2+} -Einstrom wird durch zusätzliche Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) verstärkt. Auf der SR-Membran vermitteln Ryanodin-Rezeptoren (RyR) diese Verstärkung durch den Vorgang der Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR, Calcium-induced Calcium-Release).

Die schnelle Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (intrazelluläre Kalziumionen) nach der Auslösung einer Kontraktion wird aktiv durch die Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum über die sarko-endoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) und den exportierenden Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) bewirkt.

Das tubuläre System in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Das sarkoplasmatische Retikulum ist im Myozyten in longitudinalen (L-)Tubuli angeordnet, die räumlich dicht an transversalen Einstülpungen der Zellmembran, den so genannten transversalen (T)-Tubuli, liegen. T-Tubuli und L-Tubuli sind speziell in Herzmuskelzellen als Dyade organisiert, also jeweils das Ende eines L-Tubulus nahe an einem T-Tubulus. Diese Dyaden befinden sich an der Z-Scheibe der Herzmuskelzelle.

In der Membran der T-Tubuli befinden sich bei allen Muskelzellen spannungsabhängige Kalziumkanäle, die Ca_V -Kanäle. Aufgrund ihrer langsamen („longlasting“) Inaktivierung werden sie auch als L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bezeichnet. Die Lage eines solchen L-Typ Ca^{2+} -Kanals ist in Abbildung 3 in pink skizziert. Ein anderer, älterer Name ist Dihydropyridin-Rezeptor, da Dihydropyridine als Antagonisten wirken, und zur damaligen Zeit die Eigenschaft als Kanal noch unbekannt war.

Bei Depolarisation der Membran öffnen die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, Kalzium strömt aus dem Extrazellularraum in die Zelle ein. Die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle liegen dabei räumlich sehr dicht bei den L-Tubuli des SR, in der Abbildung 3 in braun, in welchem das intrazelluläre Kalzium im Ruhezustand zu finden ist. Durch den lokalen Kalziumeinstrom der Ca^{2+} (in orange abgebildet) durch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle der T-Tubuli (in der Abbildung in blau) entstehen sehr schnell streng lokale Erhöhungen des zytoplasmatischen Kalziums in der unmittelbaren Umgebung der L-Tubuli.

Die räumliche Nähe ermöglicht damit sehr hohe Geschwindigkeiten der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung, zudem sind auch die Ca^{2+} -Kanäle der Zellmembran unmittelbar an den Ca^{2+} -sensitiven Ryanoidin-Rezeptoren (in Abbildung 3 in türkis dargestellt) des SR gelegen [6]. Daher ist die Integrität dieser T-Tubuli, wie auch ihre strikte räumliche Anordnung, von herausragender Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des Kardiomyozyten. Die T-Tubuli weisen dabei im physiologischen Zustand einen immer gleichen Abstand von $2\ \mu\text{m}$ auf. Sie liegen im 90° -Winkel zum SR und zur Zelloberfläche. Die äußere Membran erfährt so eine beträchtliche Oberflächenvergrößerung. Dies ist wichtig für die synchrone intrazelluläre Auslösung einer Kontraktion: Bei Eintreffen eines Aktionspotentials erreicht die Depolarisation der Membran über die T-Tubuli nahezu gleichzeitig die gesamte Zelle. Dies ist wichtig, da durch die Depolarisation die L-Typ-Kalziumkanäle geöffnet werden und Ca^{2+} von außen in die Zelle einströmt. Durch die Lage nahe an den RyR ist die Bindung des eingeströmten Ca^{2+} an die Rezeptoren sehr schnell möglich, die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR erfolgt also unmittelbar. Die Konzen-

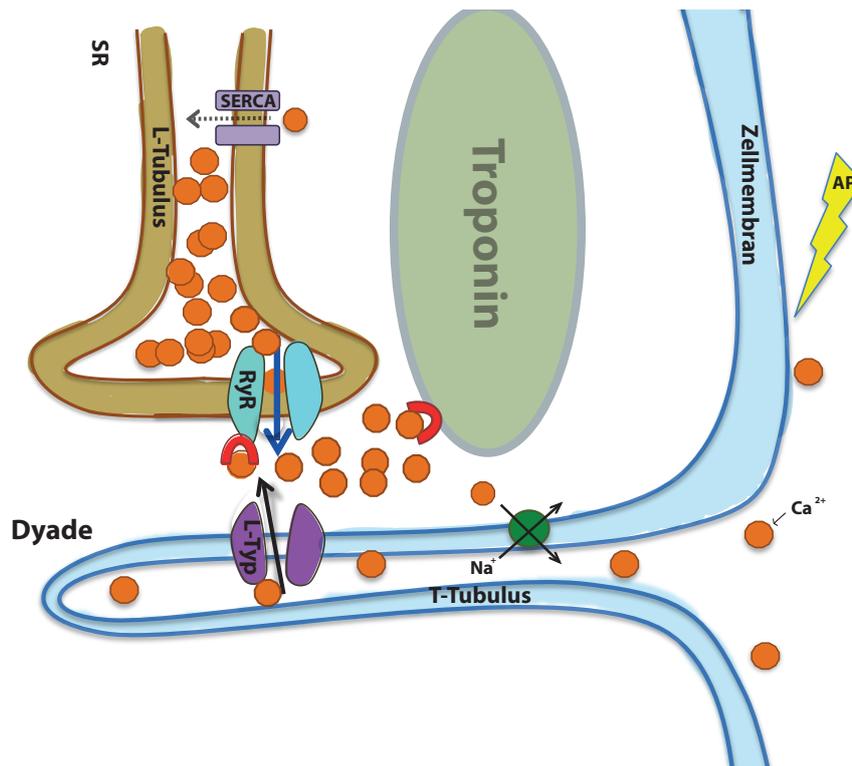


Abbildung 3: Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung: Durch ein Aktionspotential (gelber Blitz) wird die Zellmembran (blau) samt T-Tubulus depolarisiert, Ca^{2+} -Ionen (orange Kreise) können durch L-Typ - Ca^{2+} -Kanäle (pink) in das Zytoplasma austreten. Dort diffundiert Ca^{2+} zu den RyR (türkis) im L-Tubulus des SR (hellbraun) und binden an die Ca^{2+} -Bindungsstelle (rot). Ca^{2+} tritt aus dem SR aus und diffundiert zu seiner Bindungsstelle am Troponin (oliv), was eine Kontraktion auslöst. Das intrazelluläre Ca^{2+} wird dann von der SERCA (violett) in das SR und dem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (grün) in den Extrazellularraum gepumpt. *Abbildung erstellt nach Bers et al. [7]*

tration intrazellulärer Kalziumionen, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, reicht nun, um mit der Bindung an Troponin (Abbildung 3, oliv) eine Kontraktion auszulösen, die auch in der gesamten Zelle synchron erfolgt. Daraus folgt jedoch, dass ein Verlust der T-Tubuli, oder deren aberrante Anordnung, zwangsläufig zu einem beeinträchtigten Kontraktionsverhalten der Zellen führt.

Nach Ende der Kontraktion muss das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von speziellen Ca^{2+} -Transportern (SERCA-Pumpe, siehe 3, violett) sowie von dem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher NCX (Abbildung 3, grün) wieder zurück in das SR gebracht werden. Hier spielt die weite Verzweigung des SR über die L-Tubuli eine wichtige Rolle; in der großen Membranoberfläche sind viele Pumpen für den Rücktransport der Kalziumionen vorhanden, durch die der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel in der gesamten Herzmuskelzelle schnell und synchron sinkt. Ein kleinerer Teil wird wieder von dem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in den Extrazellularraum ausgeschleust (Abbildung 3, grün).

2.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Verschiedenste extrazelluläre Reize beeinflussen die Physiologie der Herzmuskelzellen. Um diese Wirkung zu übermitteln, beispielsweise Signale zur zellulären Hypertrophie, binden extrazelluläre Signalmoleküle, wie beispielsweise Angiotensin, Phenylephrin und Endothelin-1, an spezielle Rezeptoren in der Zellmembran. Wichtige Vertreter dieser Transmembran-Rezeptoren sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [43]. Die Bezeichnung dieser Rezeptoren wird abgeleitet von ihrer Eigenschaft, G-Proteine zu binden. G-Proteine wiederum werden so bezeichnet, da sie Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) binden, was eine Bedeutung in der folgenden Signalweiterleitung hat. G-Proteine sind heterotrimär aufgebaut, aus drei unterschiedlichen Peptidketten, die als α -, β - und γ -Untereinheit bezeichnet werden. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, bewirkt dies eine Konformationsänderung, durch die letztendlich an der $G\alpha$ -Untereinheit ein GDP durch ein GTP getauscht wird, was das G-Protein in den aktivierten Zustand versetzt. Die $G\alpha$ -Untereinheit kann dissoziieren, und danach spezifische nachgeschaltete Signalwege aktivieren. Auch der $G\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert, er kann danach selbst Signaltransduktion vermitteln. Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit ist dabei weitgehend konstant, die $G\alpha$ -Untereinheit dagegen sehr variabel.

Es gibt verschiedene Arten von G-Proteinen; die wichtigsten für die hier beschriebenen Prozesse sind G_s , G_q , G_i , G_{11} [80]. Der Typ des G-Proteins bestimmt wesentlich die nachgeschaltete Signalkaskade, beispielsweise aktivieren G_s -Proteine der β -adrenergen Rezeptoren vorwiegend Kaskaden, die zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A führen. Dadurch wird die Kontraktilität und Herzfrequenz kurzfristig gesteigert. G_i -Proteine werden von Acetylcholin-Rezeptoren aktiviert. G_q -Kaskaden werden von Hormonen wie Angiotensin, Endothelin oder Phenylephrin ausgelöst. Diese Kaskaden aktivieren in der Regel Phospholipasen. Eine Vielzahl der an der pathologischen Hypertrophie beteiligten Signalwege werden über den G_q -Signalweg ausgelöst [29].

Der Ablauf der Aktivierung ist in Abbildung 4 skizziert: Nach Bindung des Hormons an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der $G\alpha_q$ -Untereinheit (UE), durch Konformationsänderung des Transmembranrezeptors und Spaltung von GTP in GDP und einen Phosphatrest (P_i). Im nächsten Schritt aktiviert dabei die $G\alpha_q$ -Untereinheit die Phospholipase $C\beta$ (PLC β). Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, in der Folge wird Calcineurin freigesetzt. Darüber wird unter anderem der

Kerntranslokationsfaktor aktivierter T-Zellen, „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT) aktiviert, ein Transkriptionsfaktor, der zu einer Verschiebung der Genexpression hin zu einem pathologischen Muster beiträgt. In der Hypertrophie werden zusätzlich embryonale Transkriptionsmuster und sogenannte „immediate early“-Onkogene [85] aktiviert. Einen guten Überblick über die Genexpressionsmuster gibt dabei Rohini et al. [107].

Sowohl der von IP₃ erhöhte basale Kalziumspiegel, als auch DAG, können Mitglieder der konventionellen, Ca²⁺-abhängigen Proteinkinasen C (cPKC) aktivieren.

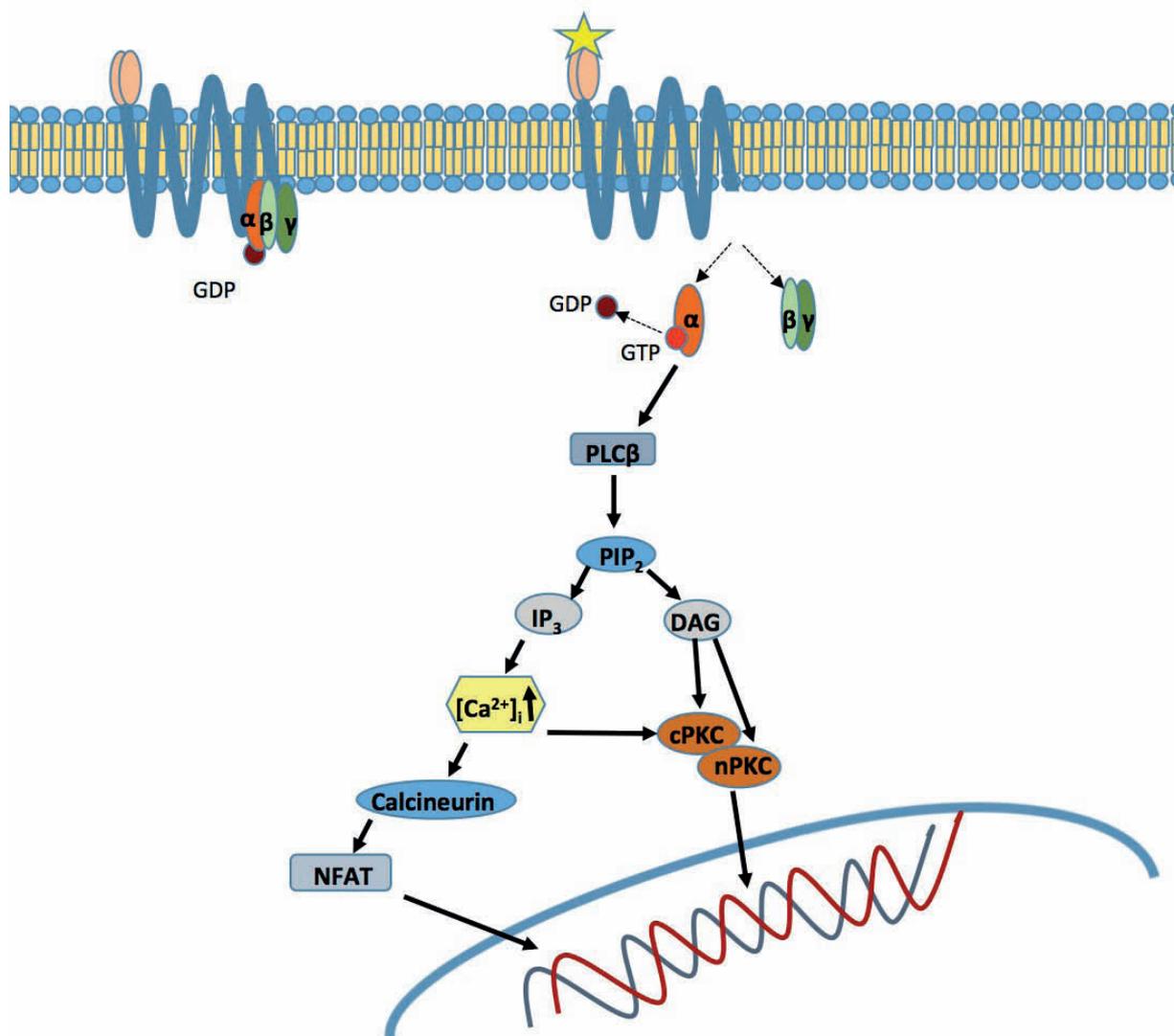


Abbildung 4: Schema GPCR: In gelb-blau ist die Zellmembran dargestellt, in blau die Kernmembran gezeichnet, die Doppelhelix stellt die DNS dar. Der Stern symbolisiert einen Hypertrophieagonisten, der an den GPCR mit seinen 7 Transmembrandomänen bindet. Dadurch wird am G-Protein GDP durch GTP getauscht, die Untereinheit (UE) G α und die G β/γ -UE lösen sich ab. G α aktiviert PLC β . Diese Phospholipase spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. IP₃ setzt intrazelluläres Ca²⁺ frei. DAG und Ca²⁺ aktivieren PKC. [Ca²⁺]_i aktiviert zudem Calcineurin und NFAT. NFAT moduliert direkt, PKC indirekt die Transkription. *Abbildung erstellt nach Rohini et al. [107]*

Diese Rolle der G_q -Proteine konnte bereits von Adams et al. [3] in Überexpressionsstudien unterstrichen werden. LaMorte et al. [61] zeigten nach der Gabe hypertropher Agonisten in Zellkultur, dass bei Hemmung von $G\alpha_q$, eine Reduktion der eigentlich zu erwartenden pathologisch-hypertrophen Mechanismen auftrat.

Wettschurek et al. [136] etablierten schließlich eine Mauslinie mit einem herzspezifischen Verlust („Knockout“, KO) von $G\alpha_q$, zusammen mit einem globalen KO von G_{11} . Diese genetische Manipulation führte zu einer Resistenz der Versuchstiere gegen Hypertrophie. Die Hypertrophie wurde in diesem Bericht durch Nachlasterhöhung via Aortenkonstriktion ausgelöst. Bei der Etablierung der Mauslinie war es wesentlich, den KO des *gnaq*-Genes, das für $G\alpha_q$ kodiert, durch ein Cre-Rekombinase-System konditionell zu gestalten. Ein reiner, nicht-konditioneller KO in den betroffenen Tieren führt zum Embryonaltod an Tag 11 der Trächtigkeit (E11). Die Föten zeigten dabei Kardiohypoplasie. Tiere, deren KO dagegen später aktiviert wurde, waren äußerlich nicht als krank erkennbar, verglichen mit ihrer Kontrolle [139].

Da die separaten Rollen von $G\alpha_q$ und G_{11} dabei interessant sind, wurden an unserem Institut Mauslinien gezüchtet, welche die verschiedenen Untersuchungsbedingungen erlauben: Die Tiere der Wildtyp-Gruppe (wt) tragen die wt- G_{11} -UE und exprimieren keine Cre-Rekombinase, welche die $G\alpha_q$ -UE ausschalten könnte. Die Tiere der $G\alpha_q$ -KO-Gruppe, Wurfgeschwister der Wildtyp-Gruppe, exprimieren dagegen die Cre-Rekombinase, wodurch hier ein $G\alpha_q$ -KO induzierbar ist. Die dritte Gruppe zeigt ein globales G_{11} -KO, jedoch keine Cre-Rekombinase, um das $G\alpha_q$ -KO zu induzieren. Diese haben wieder Geschwistertiere, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, wodurch nach der Aktivierung der Cre-Rekombinase $G\alpha_q$ und G_{11} fehlen. Diese Tiere werden als Doppel-KO (DKO) bezeichnet. Genutzt wurde ein Cre-LoxP-System, bei dem die Cre-Rekombinase erst nach Applikation von Tamoxifen aktiv wird. Der $G\alpha_q$ -KO wurde erst in der fünften Lebenswoche mit der Applikation von Tamoxifen induziert. Er zeigte drei Wochen später den gewünschten Expressionsverlust von $G\alpha_q$.

In den ersten Studien an dieser Mauslinie zeigte sich ein vor allem im DKO deutlich erkennbarer Phänotyp. Diese zeigte im Vergleich zu den Einzel-KO oder den wt-Tieren eine erniedrigte Herzfrequenz unter Narkose, eine erhöhte kardiale Auswurfraction und einen niedrigeren Blutdruck [139]. Eine detailliertere Charakterisierung dieser Tiere steht allerdings noch aus.

So war es beispielsweise von Interesse, welche Auswirkung der DKO auf die physiologische Wirkung von Aldosteron hat. Aldosteron ist ein Steroidhormon aus der Gruppe der Kortikosteroide. Es bewirkt über eine verstärkte Rückresorption von Natrium und Wasser eine langfristige Blut-

druckerhöhung, allerdings wirkt es auch profibrotisch in Herz und Nieren; einen guten Überblick über die Eigenschaften von Aldosteron bieten Brem et al. [14]. Der Blutdruck wiederum war in der Studie von Wiesen et al. in den Mäusen mit G_{11} -KO verringert. Daher war es naheliegend zu untersuchen, ob Aldosteron seine Wirkung möglicherweise ganz oder teilweise über $G\alpha_q$ und/oder G_{11} vermittelt.

Spezifische Wirkungen entstehen dabei nicht nur über die verschiedenen Untereinheiten des G-Proteins. Einzelne Elemente der nachfolgenden Signalkaskaden haben ebenfalls klar abgegrenzte Aktivatoren, Funktionen, sowie Folgen ihrer Wirkung. Je näher man dabei dem Ende der Kaskade kommt, desto genauer lässt sich die Auswirkung charakterisieren und in Zukunft womöglich therapeutisch beeinflussen. Im Fokus vieler Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit liegen daher Schritte der Kaskaden, die möglichst nahe am endgültigen physiologischen und pathologischen Effekt des Prozesses liegen; im Falle der $G\alpha_q$ / G_{11} -Signalketten waren solche späten Effektoren beispielsweise die PKC. Eine genaue Kenntnis dieser Prozesse könnte hochspezifische Therapien mit wenig Nebenwirkungen ermöglichen.

2.6 Proteinkinasen C

Proteinkinasen C sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen. Sie werden im Herzen im Verlauf der $G\alpha_q$ - Signalkaskade aktiviert, kommen aber auch ubiquitär im Organismus, in allen Organen und Zelltypen vor. Bisher sind 10 Isoenzyme bekannt, die in ihrer Ausprägung und Lokalisation artspezifischen Varianzen unterliegen. Es gibt, in Abhängigkeit vom Aktivierungsmechanismus, drei Subfamilien der PKC: Die konventionellen PKC (cPKC), darunter die PKC α , β_I , β_{II} , γ ; die neuen PKC (nPKC), mit PKC δ , ϵ , η , θ ; und die atypischen PKC (aPKC), darunter PKC ζ , ι/λ . Die Bezeichnungen PKC λ und PKC ι werden dabei synonym in der Literatur verwendet, wobei PKC ι für das humane, teilweise im Modell transgen exprimierte Homolog steht. PKC λ steht für das natürliche Homolog in der Maus.

Die cPKC werden von Phosphatidylserin (PS), Diacylglycerol (DAG) und Ca^{2+} aktiviert, die nPKC von PS und DAG, die aPKC von PS und verschiedenen Proteinen.

Typisch für die PKCs sind ihre Domänenstrukturen, die auch ihre Interaktionen vermitteln. Sie sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Am C-terminalen Ende (CT, violett) befindet sich dabei die Kinasendomäne (gelb), die Serin- und Theroninreste phosphorylieren kann. Am N-terminalen Ende befindet sich immer ein Pseudosubstrat (blau). Je nach Subfamilie gibt

es ein bis zwei Zielsteuerungssequenzen, welche die Spezifität der einzelnen Subfamilien für ihre Bindungspartner bestimmen. Die cPKCs tragen dabei eine C2-Domäne (orange) und eine C1A- und C1B-Domäne (rot). Die nPKCs haben auch eine C1A- und C1B-Domäne, aber eine Ca^{2+} -insensitive C2-Domäne. Die aPKCs unterscheiden sich hier grundsätzlich von den anderen Subfamilien, sie tragen eine PB1-Domäne (türkis) für die bei ihnen typischen Protein-Protein-Interaktionen.

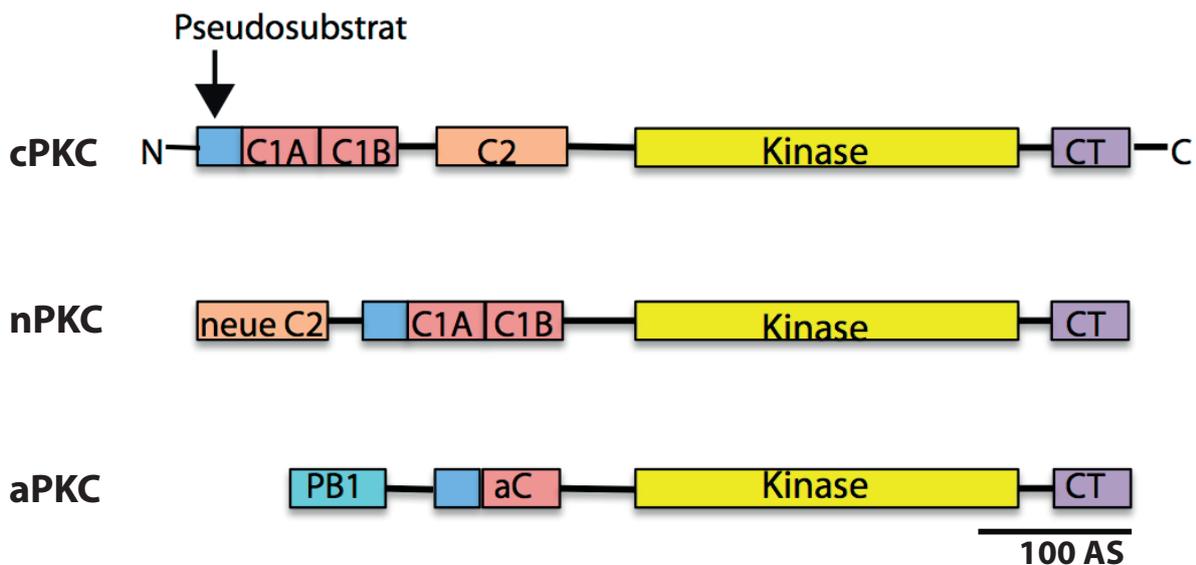


Abbildung 5: Schema der Domänenstruktur der PKC: Abgebildet sind die drei Subfamilien der PKC-Enzymfamilie, die Subfamilie ist dabei jeweils links der Domänenstruktur benannt. Allen PKC ist die Kinase-Domäne (gelb) und ein Pseudosubstrat am N-terminalen Ende (blau) gemeinsam. CT (violett) bezeichnet die Endsequenz am C-terminalen Ende. cPKC und nPKC tragen eine C1-Domäne, die in zwei Teile A und B unterteilt ist (rot). Die C2-Domäne kommt auch bei cPKC und nPKC vor (orange), unterscheidet sich aber bei beiden. Die aPKC tragen keine C-Domänen, sondern eine PB1-Domäne (türkis). Die Größe der Abschnitte ist durch die Skala rechts unten angegeben. *Abbildung nach Newton et al. [87]*

Die Regulation der PKC erfolgt strukturell und räumlich über spezifische Kofaktoren. Das Zusammenspiel mit den jeweiligen Kofaktoren wird über diese Domänenstruktur gesteuert. Im Ruhezustand liegen die PKCs inaktiv vor, das aktive Zentrum der Kinasedomäne wird vom Pseudosubstrat blockiert [66]. Das Pseudosubstrat beinhaltet ein Alanin, das zwar in das katalytische Zentrum passt, jedoch nicht phosphoryliert werden kann. Detaillierte Untersuchungen hierzu stammen von House und Kemp [44] sowie Makowske und Rosen [75]. Erfolgt eine Aktivierung der PKC, wird durch Konformationsänderung das Pseudosubstrat aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entfernt, das nun für die Substratphosphorylierung zur Verfügung steht. Die C1-Domänen der cPKCs und nPKCs werden von DAG aktiviert. Sie sind zweifach vorhan-

den, als sogenannte Tandem-Version aus C1A und C1B. Die C-Domäne der aPKCs kommt dagegen nur einmal vor. Sie ist nicht in der Lage, DAG zu binden [47]. Der Mechanismus, über den das Pseudosubstrat freigegeben wird, ist in PKC ζ und PKC λ/ι unbekannt [99]. Die C2-Domäne in cPKC kann durch Vermittlung von $[Ca^{2+}]_i$ an das innere Blatt der Zellmembran binden, das reich an PS ist. Die C2-Domäne in nPKC ist Ca^{2+} -insensitiv [52], aPKC dagegen besitzen keine C2-Domäne. Die spezielle PB1-Domäne der aPKCs vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Durch Heterodimärisierung entstehen hochspezifische Interaktionen [122]. Dies konnte beispielsweise für p62 [82] und Par6 [140] gezeigt werden. Die Heterodimärisierung ist in einer Vielfalt von Proteindomänen möglich. Zusätzlich zur Bindung an seine Kofaktoren, kann jedes Isoenzym noch an ein spezifisches RACK-Ankerprotein („Receptor for activated kinases“) binden, das eine gezielte Lokalisation der PKC verbessert [79].

2.7 PKC im Herzen

Vorkommen der Isoformen

Das Expressionsmuster der unterschiedlichen PKC-Isoformen ist, wie bereits erwähnt, speziesspezifisch höchst unterschiedlich. In menschlichem Herzgewebe wurden bisher die Subtypen PKC α , PKC β_I , PKC β_{II} , PKC δ , PKC ϵ , PKC ι und PKC ζ nachgewiesen. In Ratten, deren Kardiomyozyten oft experimentell in Zellkulturgenutzt werden, sind PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ , PKC ϵ , PKC ι und PKC ζ gefunden worden. In Maus-Ventrikeln konnten Schreiber et al [114] die Isoformen PKC α , PKC β_{II} , PKC δ und PKC ϵ nachweisen, wobei die Expression aller Isoformen mit Ausnahme von PKC ϵ nach Geburt innerhalb der ersten 18 Tage schnell abnahmen, im Durchschnitt auf etwa 15 % des Ausgangsniveaus am ersten Lebenstag. Generell ist zudem PKC β in einem im Verhältnis kleineren Anteil in Mäusen exprimiert, als in Ratten oder Menschen [111]. Auch PKC ζ und PKC λ kommen im Ventrikel der Maus vor [110], wobei PKC λ das Homolog zur PKC ι des Menschen ist. Über die Rolle der cPKC und nPKC in Kardiomyopathien sind schon viele Ergebnisse veröffentlicht, sowohl in humanem Gewebe, als auch in Zellkultur- und Tiermodellen. Einen guten Überblick geben hier Palaniyandi et al. [92]. Dabei konnte eine Beteiligung verschiedener PKC-Isoenzyme sowohl in chronischen Herzerkrankungen [21], als auch in akuten Prozessen, wie Ischämie, festgestellt werden [19]. Allerdings variiert die Beteiligung der verschiedenen Isoformen nicht nur zwischen Spezies und Altersgruppen, wie oben erläutert, sondern es zeigen sich auch verschiedene physiologische und pathologische Funktionen, zudem abhängig von der Grunderkrankung und dem Zeitpunkt innerhalb der Progression

der Erkrankung. Genauso sind die verschiedenen Isoformen unterschiedlich in den Geweben verteilt; so kommen nur PKC ϵ und PKC ι bei Menschen in Atrien und Ventrikel vor, die cPKC vorwiegend im Ventrikel, PKC δ und ζ eher in den Atrien [116].

cPKC und nPKC in der kardialen Hypertrophie

Für Ratten konnte gezeigt werden, dass im akuten Herzversagen PKC α unverändert ist, jedoch beim chronischen Verlauf des Herzversagens hohe Aktivität zeigt [5]. In Mausmodellen förderte eine Inaktivierung von PKC α die Kontraktilität, dagegen führte eine Überexpression zu linksventrikulärer Dilatation [12, 13]. PKC α scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Hypertrophie zu spielen: Kombiniert man im Modell eine G α_q -Überexpression mit einer Hemmung der PKC α , führt dies zu einer letalen Herzmassenzunahme, bei Aktivierung der PKC α dagegen bleiben die Herzen der Mäuse deutlich kleiner. Offenbar reguliert PKC α dabei vorwiegend die Kontraktilität des Herzens während der Ausbildung des hypertrophen Wachstums [40].

In Ratten mit Herzversagen durch Salz-induzierte Hypertonie wurden erhöhte Level an PKC β gefunden [49]. Eine Überexpression von konstitutiv aktiver PKC β_{II} induziert in adulten Mäusen Hypertrophie und ist für neonatale Tiere letal [10]. Eine andere Studie jedoch fand bei genetischer Deletion der PKC β keine Bedeutung in Hypertrophie [108]. Obgleich PKC β in Mäusen ohnehin geringer exprimiert ist als in Ratten und Menschen, scheinen auch diese Formen in pathologischen Prozessen in Mäusen eine Rolle zu spielen [10, 129].

Die Rolle der PKC ϵ ist im Mausmodell genauer untersucht; bei Aktivierung über die RACK-Ankerproteine werden die Kardiomyozyten kleiner, bei normaler Herzfunktion entwickelt sich konzentrisches Remodeling; bei Hemmung über die RACK-Ankerproteine dagegen werden die Kardiomyozyten größer, es zeigt sich eine dilatative Kardiomyopathie, die abhängig von der Stärke der Hemmung, letal endet [79]. Erwähnenswert war hierbei auch, dass sich durch die Hemmung der PKC ϵ -RACK das gleiche Genexpressionsmuster ergab wie bei G α_q -Überexpression. In einer anderen Studie, bei der PKC ϵ -KO-Mäuse genutzt wurden, zeigte sich nach Hypertrophieinduktion durch Aortenkonstriktion zwar ein Kollagenanstieg im Herzgewebe und eine Dysfunktion des linken Ventrikels, jedoch ersetzt eine Hochregulierung der PKC δ die übrigen Funktionen der PKC ϵ [57]. Bei PKC ϵ -KO- und PKC δ -KO-Mäusen bestätigte sich, dass sich diese beiden PKC in ihrer Funktion redundant ersetzen; in einem DKO dieser beiden PKC entwickelte sich nach der Aortenkonstriktion eine letal endende, überschießende Hypertrophie

[119]. Das lässt die Vermutung zu, dass diese beiden PKC im physiologischen Zustand möglicherweise das Wachstum des Herzmuskels begrenzen sollen. In einer PKC ζ -KO-Maus war eine Hypertrophieinduktion durch Angiotensin II nicht möglich [35].

Überblick und kardiale Bedeutung der aPKC

Über die Funktion der aPKC in der Herzphysiologie und -pathologie ist noch sehr wenig bekannt. Dies liegt vor allem an den unbekanntem Interaktionsmöglichkeiten der PB1-Domäne und der damit verbundenen physiologischen Aktivierung oder Hemmung, sowie der Effekte, die sich daraus ergeben. Da PKC ζ und PKC λ zu 72% homolog sind, werden sie vom gleichen Pseudosubstrat gehemmt, weshalb dieser methodische Ansatz zur Charakterisierung von einer der beiden aPKC nicht in Frage kommt [27, 28]. Ein globaler Knockout der PKC λ führt zu Embryonaltod an Tag E9.5, die Embryonen sind klein und unstrukturiert [117]. Eine wichtige proonkogene Funktion der PKC ι ist bekannt [93]; in Bezug auf kontraktile Zellen dagegen ist die Anzahl der gewonnenen Erkenntnisse gering. Bei einer auf den Skelettmuskel begrenzten PKC λ -KO-Maus zeigte sich eine systemische Insulinresistenz bei homo- und heterozygoten Tieren, der Verlust wurde durch die endogene PKC ζ nicht ausgeglichen [33]. Aufgrund der Rolle für die Energiegewinnung im Skelettmuskel liegt eine größere Bedeutung für PKC λ in Herzmuskelzellen sehr nahe. Lu et al. [72] konnten in Kardiomyozyten von Diabetes-Mäusen zeigen, dass der durch den genetischen Defekt verminderte Ca²⁺-Einstrom durch eine Aktivierung des PKC ι -Pfad es wieder erhöht werden konnte. Es wird daher eine Rolle der PKC ι in der diabetogenen Kardiomyopathie postuliert. In Zellkultur von Ratten Kardiomyozyten aber zeigte sich nur eine essentielle Rolle in der Glukoseaufnahme für PKC ζ , PKC λ war ohne Bedeutung. Bei Verlust von PKC λ erhöhte sich die Expression von PKC ζ nicht [23]. Zudem besteht eine proinflammatorische Funktion der PKC λ sowie eine Lipogenese-Steigerung in der Leber. Beide Faktoren tragen zum Gesamtbild in der Diabetes-Maus bei [32]. Bezüglich der embryonalen Entwicklung des Herzens der Maus konnten Li et al. [62] zeigen, dass die Funktion der PKC ι als Teil des Polaritätskomplexes in der Zellteilung bei kardialem Knockout zu einem Ausbleiben der Trabekulierung des Herzens führt, was mit dem Embryonaltod an Tag E10.5 endet.

Im Kontext der Bedeutung der cPKC und nPKC in Kardiomyozyten und der bisher gefundenen Funktionen der PKC λ/ι ist es folgerichtig von Interesse die Funktion der PKC λ/ι in Herzzellen genauer zu untersuchen, zumal deren Vorkommen in diesem Zelltyp gesichert ist [109]. In einer vorherigen Dissertation von Silke Wegener [132] an unserem Institut wurden Untersuchungen

von Kardiomyozyten adulter Ratten in Zellkultur durchgeführt. Da keine spezifischen Aktivatoren oder Inhibitoren der PKC ζ kommerziell erhältlich sind, wurde der Ansatz der Überexpression einer konstitutiv aktiven (CA) und einer dominant negativen (DN) Variante der humanen PKC ζ gewählt. Die Zellen wurden mittels Adenoviren transduziert und dann nach drei Tagen untersucht. In den kultivierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der PKC ζ abhängig von ihrem Aktivitätszustand anders war, genau wie der Ca²⁺-Haushalt der Zellen sich veränderte. Etwas überraschend blieb das Kontraktionsverhalten der Zellen davon unbeeinflusst.

2.8 Ziele dieser Arbeit:

Die Arbeit ist in drei Teilprojekten aufgebaut, entsprechend der drei untersuchten Proteine, sowie der Untersuchung ihrer Rolle in Physiologie und Pathophysiologie des Herzens. Diese Studien sollen an spezifischen Mausmodellen durchgeführt werden, um neue Erkenntnisse im Kontext des Gesamtorganismus bewerten zu können.

Teil 1: Die Aktivität der PKC ζ im Herzen

In einem ersten Projekt sollte die Bedeutung der PKC ζ für das Herz innerhalb des Organismus Maus untersucht werden. Aus den verfügbaren Daten ergab sich die These, dass PKC ζ in die Regulation der Zellmorphologie eingebunden sein könnte, und dass PKC ζ eine Rolle in der Vermittlung von Wachstumsprozessen des Herzens spielen könnte. Für den methodischen Ansatz wurde ein Ansatz der Überexpression einer konstitutiv-aktiven und einer dominant-negativen Variante der PKC ζ gewählt. Die Herzfunktion und Morphologie *in vivo* sowie die Zellmorphologie sollten zwischen den verschiedenen Aktivitätstypen verglichen werden. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Funktion des Enzymes sowohl innerhalb der normalen zellulären Regulation, als auch im hypertrophen Herzen getroffen werden können.

Teil 2: Die Rolle der G α_q G $_{11}$ -Untereinheiten in Hypertrophie und Hyperaldosteronismus

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkung eines chronischen Hyperaldosteronismus auf die bereits bekannte G α_q G $_{11}$ -Mauslinie untersucht werden. Während in der beschriebenen Mauslinie bereits eine Blutdrucksenkung durch den G $_{11}$ -KO auffällig war, entsteht bei Hyperaldosteronismus eine chronische Hypertonie, weshalb die Kombination beider Modelle in dieser

Arbeit möglicherweise zu einer direkten Verbindung der Effekte miteinander führen könnte. Ergänzend wurden die Auswirkungen eines operativen Hypertonie- und Hypertrophiemodells auf die $G\alpha_qG_{11}$ -DKO-Mäuse untersucht. Zudem sollten an dieser Mauslinie nähere Erkenntnisse zu der Vermittlung der profibrotischen Wirkung des chronischen Hyperaldosteronismus sowohl *in vivo*, als auch bei Untersuchung des Herzgewebes gewonnen werden.

Teil 3: Die Rolle der $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit und ihrer Spleißvarianten im Herzen

In einem dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die β_2 -Untereinheit der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in der Membran der T-Tubuli für die Funktion des adulten Herzens haben. Zum einen wurde in Mäusen die Auswirkungen eines im Alter von mehreren Wochen induzierten herzspezifischen Knockouts dieses Proteins auf die Herzfunktion *in vivo* studiert. Zum anderen sollte die Rolle einer adulten und einer embryonalen Spleißvariante dieses Proteins für die physiologische Morphologie und Funktion des Herzens untersucht werden. Ziel war es, eine Einordnung der Bedeutung dieses Proteins und seiner Varianten für das gesunde Herz zu ermöglichen. Es wurde dabei auch die These untersucht, dass der embryonale, globale, letal endende Verlust der $Ca_v\beta_2$ - Untereinheit im Herzen durch eine zusätzliche Expression der gefundenen $Ca_v\beta_2$ - Spleißvarianten im Herzen wieder zu lebensfähigen Nachkommen führen könnte. Dabei könnte die Expression der unterschiedlichen Varianten, sowie auch ein im adulten Stadium induzierter kardialer Verlust der $Ca_v\beta_2$ - Untereinheit unterschiedliche kardiale Phänotypen der Tiere verursachen.

3 Material und Methoden

3.1 Materiallisten

Tabelle 1: Verwendete Geräte:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Arbeitsplatz-Homogenisator	Minilys	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Brutschrank	Hera cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dunkelkammer	Fusion FX	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage	Sartorius	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Organfluoreszenz	Olympus SZX12	Olympus, Tokyo, Japan
Heizblock	HLC - HBT 130	Klinkner & Partner GmbH, Saarbrücken, Deutschland
in vivo-Hochfrequenz- Ultraschallgerät	VEVO 770	Visualsonics Inc. (Fujifilm) Toronto, Canada
Isofluran-Verdampfer	Dräger Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Kamera Polarisationsmikroskopie	ORCA Flash 4.0	Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan
Konfokalmikroskop	Leica TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR3001K	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Eclipse TS100	Nikon Instruments, Tokio, Japan
Objekthalter rund	Eigenanfertigung	Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Objektiv Histologie 20x	Nikon LWD 20x	Nikon Instruments, Tokio, Japan
Öl-Objektiv 63x	HXC PL APO 63x Oil	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Operationsmikroskop	Zeiss 50	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Osmometer	Vapro Vapor Pressure Osmometer 5520	EliTechGroup, Puteaux, Frankreich
Perfusionspumpe (Zellisolation)	Ismatec Reglo	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	InoLab WTW	Xylem Inc., New York, USA
Polarisationsmikroskop	Nikon TE Eclipse 2000	Nikon Instruments, Tokio, Japan
Rotlicht-Wärmelampe	IRL 88254	Medisana, Neuss, Deutschland
Spektrometer	Lambda Bio +	Perkin Elmer, Waltham, USA
Sterilbank	Holten Lamin Air	Thermo Fisher Scientific Inc., Weltham, USA
Western-Laufkammer	Mini-Protean TetraSystem	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Western-Transferkammer	Novx Mini-Cell	Invitrogen
Western-Spannungswandler	Power Pack 200	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zentrifuge	Napco 2019R	Thermo Fisher Scientific Inc., Weltham, USA

Tabelle 2: Instrumente, Medikamente und Medizinprodukte für Versuchstiere:

Wirkstoff/Instrument	Bezeichnung	Hersteller
Aldosteron	Aldosteron 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München (CAS: 52-39-1)

Wirkstoff/Instrument	Bezeichnung	Hersteller
Arterienklemme	BH 104 1NOX	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Butorphanol	Torbugesic® 10mg/ml	Zoetis, Florham Park, USA
Carprofen	Rimadyl®, 20ml	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Dexpanthenol	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Elektroden-Kontaktgel	Signa creme	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Enrofloxacin	Baytril®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Enthaarungscreme	Nair Hair Remover Lotion	Church & Dwight Co., Inc., Princeton, New Jersey, USA
Gleitgel	Aquagel	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Injektionskanülen (26½ G)	BD Microlance	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Injektionskanülen, 33G	Low dead space 33G, TSK,	Emergo Europe, The Hague, Niederlande
Iodlösung zur Hautdesinfektion	Braunol®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isofluran	Forene®, 250ml	AbbVie Deutschland GmbH &Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
isotone Kochsalzlösung zu Injektionszwecken	NaCl, 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin	Ursotamin®, 100 ml, 50 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Knüpfpinzette	FD 281 R, Stainless	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Wirkstoff/Instrument	Bezeichnung	Hersteller
Medizinisches Klebeband	Durapore Tape	3M, Minneapolis, USA
Nadelhalter	32-0445-1, Microsurgery, 5 1/2"	Snowden-Pencer, Tucker, USA
Nahtmaterial monofil, nicht resorbierbar, Polyethylen, Stärke 5/0, 6/0, 8/0, armiert	Serapren	Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
Nahtseide polyfil-geflochten, Spule, Stärke 6/0	Suprama Seide	Suprama, Berlin, Deutschland
Neutralöl	Miglyol 840	Apotheke der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Perfusionspumpen Maus	alzet Mini Pumps 2006	Durect Co., Cupertino, USA
Schere	FST 14028-10 Stainless Germany 14s5	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Schere fein	FST 14084-08 Stainless Germany 14s5	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Spritze 1ml	BD Plastipak	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze 2ml/5ml	Injekt	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze, 1ml, Totraumreduktion	Injekt-F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tamoxifen	Tamoxifen	Sigma-Aldrich GmbH, D-München (CAS: 10540-29-1)
Tätowierfarbe	Animal Tattoo Ink	Ketchum Manufacturing Inc, Brockville, USA
Tierwaage	EMB 500-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland

Wirkstoff/Instrument	Bezeichnung	Hersteller
Tupfer, 5 cm x 5 cm und 10 cm x 10 cm	Mullkompressen	Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland
Ultraschall-Kontaktgel	Aquasonic 100	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Wattestäbchen	/	Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland
Xylazin	Rompun®), 25ml, 2%ig	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien, Antikörper, Enzyme:

Reagenz	Hersteller	CAS-Nummer
Aldosteron 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	52-39-1
Antikörper „Goat anti-EF2 IgG HRP“, sc13004	Santa Cruz Biotechnology Inc., US-Dallas	n.a.
Antikörper „Goat anti-Mouse IgG HRP“, H0415	Santa Cruz Biotechnology Inc., US-Dallas	n.a.
Antikörper „Goat anti-Rabbit IgG HRP“, B1315	Santa Cruz Biotechnology Inc., US-Dallas	n.a.
Antikörper „Mouse anti-PKCiota“, 610175	BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg	n.a.
Antikörper „Rabbit anti-TRFP“, AB234	Evrogen, RU-Moskau	n.a.
apo-Transferrin human T2036	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	11096-37-0
Bradford Reagenz	Perkin Elmer, Lambda Bio	231-633-2
Cell Mask Deep Red Plasma Membrane Stain®)	Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland	n.a.

Reagenz	Hersteller	CAS-Nummer
Collagenase Typ II (CLS-2, Worthington); spez. Aktivität $\geq 125\text{U/mg TS}$	Cellsystems GmbH, D-Troisdorf	9001-12-1
Desoxyribonuklease I, Typ 2, Rinderpankreas (2000U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	9003-98-9
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	67-68-5
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Grüssing GmbH, D-Filsum	7558-79-4
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	3483-12-3
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 500ml	Gibro Life Technologies, New York (USA)	n.a.
Entellan	Merck, D-Darmstadt	109223-77-0
Ethanol vergällt	UdS-zentrales Chemikalienlager, D-Saarbrücken	64-17-5
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs	67-42-5
Extrazelluläre Matrix Gel (EZM), EHS-Matrix	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, D-München	n.a.
Detektor-Reagenz Western Blot FluoChemM	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	n.a.
D(+)-Glukose	Applichem GmbH, D-Darmstadt	50-99-7
Glycerin	Carl Roth, D-Karlsruhe	56-81-5
Glyzin	Carl Roth, D-Karlsruhe	56-40-6

Reagenz	Hersteller	CAS-Nummer
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, D-Darmstadt	7365-45-9
Immersionsöl Typ F	Leica Microsystems GmbH, D-Wetzlar	120-51-4
Insulin (Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	11070-73-8
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	67-63-0
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, D-Darmstadt	7447-40-7
Kalziumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ *H ₂ O)	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs	10035-04-8
Kanamycin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	25389-94-0
Liberase™ TM Research Grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München	n.a.
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co.KG, D-Zeven	/
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, D-Darmstadt	7786-30-3
Methanol	UdS-zentrales Chemikalienlager, D-Saarbrücken	67-56-1
Natriumchlorid (NaCl)	VWR international GmbH, D-Darmstadt	7647-14-5
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biochemicals Inc., US-Aurora	151-21-3
Natriumzitat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, D-München	6132-04-3
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Thermo-Fisher Scientific, US-Waltham	n.a.
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo-Fisher Scientific, US-Waltham	n.a.

Reagenz	Hersteller	CAS-Nummer
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Thermo-Fisher Scientific, US-Waltham	n.a.
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa	Thermo-Fisher Scientific, US-Waltham	n.a.
Paraformaldehyd	Riedel- de Haen, D-Seelze	30525-89-4
PBS-Tabletten	VWR international GmbH, D-Darmstadt	n.a.
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, D-München	n.a.
Picro-Sirius-Rot	Morphisto, D-Frankfurt	88-89-1 (Pikrinsäure) 2610-10-8 (Siriusrot-F3B)
Pluronic® F-127 (20% Lösung in DMSO)	Life Technologies Ltd, Paisley, Schottland	9003-11-6
Ponceau S	Carl Roth, D-Karlsruhe	6226-79-5
Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent	Biorad Laboratories Inc., US-Hercules	n.a.
Salzsäure 37% (HCl)	VWR International GmbH, D-Darmstadt	7647-01-0
Tamoxifen	Sigma-Aldrich GmbH, D-München	10540-29-1
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Promega GmbH, D-Mannheim	1185-53-1
Trizma®Base	Sigma-Aldrich GmbH, D-München	77-86-1
Tween®20	VWR International GmbH, D-Darmstadt	9005-64-5
Xylol	Merck, D-Darmstadt	1330-20-7

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien:

Material	Produktbezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Deckgläschen	/	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße, Größe 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml / 5 ml	Safe Seal Reaktionsgefäß	Sarsted AG, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier	/	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich
große Wägeschüsseln	Roti-Labo Einmal-Wägeschalen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Handschuhe	Vasco Nitril White	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Homogenisator-Kit 0,5 ml - Gefäße	Precellys Ceramic Kit 1.4 mm	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
kleine Wägeschüsseln	Diam Boat 30ml	VWR, Radnor, USA
Küvetten, einmalige Nutzung	/	Sarsted AG, Nümbrecht, Deutschland
Mundschutz virensicher	JTY Series 3000	Far Star medical, Barsbüttel, Deutschland
Objektträger	/	R.Langensbrink GmbH, Emmendingen
Petrischalen (Durchmesser 35mm, 60mm, 94mm)	/	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich
Pipetten, versch. Größen	/	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15ml/50ml	Cellstar Tubes 15ml/50ml	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich

Material	Produktbezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Skalpell, einmalige Nutzung	Surgical disposable scalpels	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Western Transfer-Membran	Whatman filter paper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Zellkulturplatten, 12er	Cellstar 12well cell culture plate	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich

Tabelle 5: Verwendete Lösungen:

Lösung	Zusammensetzung
Aldosteron-Lösung	Aldosteron 2 mg/ml (w/v), Ethanol 10 % (v/v) in 0,9 % NaCl zu Injektionszwecken
Alkoholreihe (Histologie)	Alkohol in 90 %, 80 %, 70 % (v/v) in Aqua dest.
Analgetische Injektionslösung	50 µl Rimadyl Injektionslösung ad 1000 µl NaCl-Lösung zu Injektionszwecken
Antibiotisch wirksame Injektionslösung	75 µl Baytril Injektionslösung ad 1000 µl NaCl-Lösung zu Injektionszwecken
Antikörper-Pufferlösung, Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T
DNAse-Lösung	15 mg Desoxyribonuklease I, Typ 2, Rinderpankreas ad 5 ml Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT (pH 7,35) + 5 ml Glycerin; aliquotiert, gelagert bei -20 °C
Färbelösung Konfokalmikroskopie	1 µl Cell Mask Deep Red in 2 ml Tyrode
Formalin-Lösung	4 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS

Lösung	Zusammensetzung
ITS-Stammlösung (Insulin-Transferrin-Selenit)	25 mg Insulin, Rinderpankreas 25 mg apo-Transferrin human 50 µl Selenit-Stammlösung ad 5 ml Aqua dest mit M-HCl bis zur Klärung versetzen; gelagert bei -20 °C
Kanamycin A-Lösung	1 mg Kanamycin A ad 20 ml Aqua dest, aliquotiert, gelagert bei -20°C
Liberase-Lösung	50 mg Liberase™ TM Research Grade ad 25 ml Aqua dest; aliquotiert (750 µl) gelagert bei -20 °C
Lösung A	134 mM NaCl, 11 mM Glukose, 4 mM KCl, 1,2 mM MgCl ₂ , 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM HEPES (pH 7,35)
Lösung A ⁺	0,2 mM EGTA in Lösung A
Lösung A ⁺⁺	0,1 % (v/v) DNase-Lösung in Lösung A
Lösung B	0,1 % (v/v) DNase Lösung, 0,2 mM CaCl ₂ , in Lösung A
Medium isolierte Kardiomyozyten	98,8 % MEM, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin, 0,1% Kanamycin A-Lösung, 0,1 % ITS
Natriumzitratlösung	11,7 mg Natriumzitat ad 1 ml NaCl-Lösung zu Injektionszwecken
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1 Tablette PBS in 100 ml Aqua dest.
PBS-Tween (Waschpuffer)	0,1 % Tween®20 in PBS-Lösung
SDS-Laufpuffer	40 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) ad 800 ml Aqua dest.
Selenit-Stammlösung	6 mg Na ₂ SeO ₃ ad 1ml Aqua dest.
Transferpuffer	25 mM Trizma®Base, 192 mM Glyzin, 10% (v/v) Methanol ad 800 ml Aqua dest
Tyrode	135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 MM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 10 mM Glukose, 10 mM HEPES (pH 7,35)

3.2 Erstellung der PKC ζ -Konstrukte

Die Konstrukte wurden erstellt, wie bereits von Silke Wegener beschrieben [132]. Dazu wurde die gleichen komplementären Desoxyribonukleinsäuren (cDNS) genutzt, die für eine konstitutiv aktive, sowie eine aktivitätsinhibierte Form der PKC ζ , welche dann dominant-negativ wirkt, kodieren. Beide Isoformen wurden als C-terminale Fusionsproteine exprimiert. Durch die Verwendung dieser CA- und DN-Variante kann das Aktivitätsgleichgewicht der PKC ζ in die jeweilige Richtung verschoben werden. Als negative Kontrolle wurde die cDNS genutzt, welche für das Fluoreszenzprotein TagRFPT allein kodiert. Das Fluoreszenzprotein alleine sollte keine Veränderung induzieren; dies konnte Wegener bereits zeigen, die für das von ihr verwendete Fluoreszenzprotein YFP in Ratten-Kardiomyozyten keine Veränderungen gegenüber den nativen Zellen fand, die einer Verwendung als Negativkontrolle entgegenstand.

Das Fluoreszenzprotein TagRFPT wurde gewählt, da seine optimale Anregungswellenlänge mit 555 nm gegenüber GFP (Green Fluorescent Protein, 488 nm) zum roten Spektralbereich hin verschoben ist. Die Untersuchung von Zellen im langwelligen Exzitations- und Emissionsbereich ist einerseits weniger phototoxisch, und vermeidet andererseits die Anregung störender zellulärer Autofluoreszenz. Die Erstellung der Konstrukte wurde von Frau Dr. Sandra Ruppenthal am Institut für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

3.3 Adeno-assoziierte Viren zur Transduktion mit PKC ζ -cDNS

Die für die Transduktion der Versuchstiere verwendeten adeno-assoziierten Viren (AAV) des Serotyps 9 wurden von der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Heidelberg, in der Arbeitsgruppe Kardiovaskulärer Gentransfer, unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Müller erstellt.

AAV sind als nicht immunogen nachgewiesen, und nicht mit bekannten Krankheiten assoziiert [141]. Zudem gehören diese Viren zum Genus Dependovirus. Sie sind in ihrer Vermehrung effektiv abhängig von der Präsenz eines Helfervirus (beispielsweise Adenoviren, daher „Adeno-assoziiert“). Solange kein passendes Helfervirus die selbe Zelle infiziert, liegt die AAV-DNS entweder episomal vor oder integriert zwar in die DNS, kann jedoch keine virale Replikation beginnen. Die Integration der verwendeten AAV erfolgt dabei ortsspezifisch auf Chromosom 19 [59]. Insgesamt handelt es sich also um einen nicht pathogenen und nicht immunogenen Vektor für den Gentransfer *in vivo*.

Von den bekannten Serotypen der AAV hat sich der in dieser Arbeit verwendete Serotyp AAV9 als besonders herzspezifisch gezeigt [48, 90, 146]. Dieser Kardiotropismus wird noch erhöht durch die Verwendung eines Kardiomyozyten-spezifischen Promotors, wie dem hier verwendeten MLC-Promotor. Die Stärke der Expression an sich wurde durch Cytomegalie-Virus-Enhancer (CMV_{enh}) verstärkt. Die Nutzung dieser beiden Promotoren ist etabliert [84]. Bei der Konstruktion der DNS für die rekombinanten Viren ist dabei zu beachten, dass zwischen den beiden flankierenden Regionen für die abzulesende DNS, den so genannten inverted terminal repeats (ITR), lediglich 4,7 kb (kilo-Basenpaare) Platz finden, was die Nutzung des Systems auf kurze transduzierbare Genabschnitte beschränkt.

Die produzierten Viren wurden im Institut für Molekulare Zellbiologie aliquotiert. Für einen ausreichenden Virustiter für die Transduktion von vier Tieren wurden jeweils 1×10^{12} vg (Vektorgenome) pro Tier vorbereitet, je Aliquot 4×10^{12} vg. Die Virusmenge je Tier orientierte sich dabei an vorausgegangenen Veröffentlichungen zur Nutzung dieses Virensystems zur kardialen Transduktion (siehe 5.4). Somit wurden Gruppen zu vier Tieren injiziert. Dies war aus mehreren Gründen sinnvoll; zunächst konnte so die Viruslösung eines Aliquots für vier Tiere in einer Spritze aufgezogen werden, und dann nacheinander für diese Tiere verwendet werden. So wurde der Verlust an virushaltiger Injektionslösung, der durch das Totraumvolumen in Spritze und Kanüle entsteht, möglichst gering gehalten. Eine so möglichst ökonomische Nutzung war wichtig, da die zur Verfügung stehende Gesamtmenge an Viruspartikeln aus einer Viruscharge eingeschränkt war. Hinzu kommt, dass eine Versuchsgruppe zu je vier Tieren in der weiteren Planung der Experimente eine gut nutzbare Gruppengröße darstellte, insbesondere bei gleichzeitiger Messung aller drei Expressionsbedingungen. Zudem wurde durch die direkte Aliquotierung vermieden, dass die gesamte Viruslösung für jede einzelne Entnahme zu den Injektionen hätte aufgetaut werden müssen. Die Lagerung der aliquotierten Lösung erfolgte bei -20 °C in 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen.

3.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Tierhaltung während der Versuche erfolgte im Tierhaltungsraum des Instituts für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes. Die Tiere wurden in einem 12-Stunden-Tagesrhythmus gehalten und mit standardisierter Haltungsdiät für Mäuse von Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) gefüttert. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die durchgeführten Versuche wurden nach § 8 TierSchG (Tierschutzgesetz) von

der zuständigen Behörde genehmigt (Versuchsvorhaben 37/2013 „PKCi“, 24/2012, „Iso/Aldo“, 31/2015 „beta2“).

Für die Transduktion mit den verschiedenen PKC ϵ -Subtypen wurden männliche Mäuse der Linie C57Bl6/N und FVB/N genutzt. Dabei erfolgte die Begrenzung auf männliche Mäuse, um eventuelle Effekte des hormonellen Zyklus der weiblichen Tiere auf das Ergebnis auszuschließen. Die FVB/N-Linie wurde im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet und die Würfe nach der Geburt nach Männchen und Weibchen getrennt, wozu ein zeitgleicher Wurf von mindestens zwei der weiblichen Tiere angestrebt wurde. Dann wurden die männlichen Neonaten am säugenden Muttertier in die Versuchshaltung des Institutes für Molekulare Zellbiologie, Gebäude 61, Raum 001C, überführt, in dem alle weiteren Versuche stattfanden.

Auch die C57Bl6/N-Welpen für die neonatale Injektion wurden im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet. Die männlichen injizierten Welpen verblieben allerdings bei ihrer eigenen Mutter, die weiblichen Tiere wurden entweder unmittelbar neonatal, oder zu einem späteren Zeitpunkt, für andere Experimente genutzt. Die Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Tieren erfolgte bei den C57Bl6/N-Welpen anhand der schwarz pigmentierten Gonaden, die am ersten Lebenstag noch gut durch die dünne Skrotalhaut sichtbar sind. Die Tiere wurden mit Tätowierungen der Fußsohlen eindeutig markiert. Auch sie wurden für die Versuche in die Versuchshaltung des Institutes für Molekulare Zellbiologie, Gebäude 61, Raum 001C gebracht.

Die 21 Tage alten Tiere der Linie C57Bl6/N wurden direkt aus der Zucht von Charles River bezogen. Alle Tiere wogen bei Anlieferung 8 bis 10 Gramm. Sie wurden dann zufällig den späteren Untersuchungsgruppen zugeordnet, und mit Ohrmarken markiert. Unmittelbar vor jeder Ultraschalluntersuchung erfolgte eine erneute Gewichtsmessung.

Für die $G\alpha_qG_{11}$ -Studie wurden Mäuse verschiedener Knockout-Genotypen gezüchtet, denen entweder eine der beiden Untereinheiten fehlte (Einzelknockout), beide fehlten (Doppel-Knockout) oder beide vorhanden waren (Wildtyp). Eine Auflistung der möglichen Genotypen der Tiere ist in Tabelle 6 dargestellt. Diese Mäuse wurden im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gezüchtet. Alle verwendeten Genotypen hatten den gleichen genetischen Hintergrund (C57Bl6/N). Es fand regelmäßig eine genetische Auffrischung durch Rückkreuzung auf C57Bl6/N statt.

Eine unmittelbare, bereits embryonale Inaktivierung der $G\alpha_q$ -Expression war nicht möglich, da

die Welpen nicht lebend geboren werden. Daher wurde das für die $G\alpha_q$ -Untereinheit kodierende Exon 6 „gefloxt“. Dies bedeutet, dass eine Gensequenz von zwei loxP-Sequenzen begrenzt wird, was ermöglicht, dass dieser Abschnitt durch die Aktivität eines speziellen Enzymes (Cre-Rekombinase) aus dem Genom der Zellen ausgeschnitten werden kann. Die enzymatische Aktivität der Cre-Rekombinase wird so erst durch die Applikation von Tamoxifen aktiviert. Auf diese Weise kommt es erst in der adulten Maus zum Expressionsverlust der $G\alpha_q$ -Untereinheit. Da das Gen für die Cre-Rekombinase nur bei einem Elterntier, sowie dort nur hemizygot vorliegt, wurden entsprechende Wurfgeschwister als „Cre-negative“ Kontrollgruppe genutzt.

Der hemizygoter Verlust der G_{11} -Untereinheit liegt dagegen als konstitutioneller, homozygoter Knockout schon bei Geburt statistisch in einer Hälfte der Würfe vor, in der anderen nicht. Dieser Ansatz ist am Institut für Molekulare Zellbiologie etabliert [139] und die Funktionsfähigkeit des Modells ist vielfach überprüft.

Die vier genetisch unterschiedlichen Gruppen unterteilten sich dabei wie in Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Genotypen GqG11: Die linke Spalte führt die vier Bezeichnungen der unterschiedlichen Genotypen auf, die den vier Studiengruppen entsprechen, eine je Zeile. Die nächste Spalte zeigt, ob die Tiere die G11-Untereinheit homozygot exprimieren (+/+) oder nicht (-/-). Die mittlere Spalte führt auf, ob die jeweilige Gruppe die Cre-Rekombinase heterozygot exprimiert (tg/0) oder nicht (0/0). Die folgende Spalte gibt an, ob die Tiere mit Tamoxifen behandelt wurden. In der rechten Spalte wird noch angegeben, welche Gruppe die direkten Wurfgeschwister zu der links Gruppe dieser Zeile darstellt.

Genotyp/Gruppe	G11	Cre	Tamoxifen	Geschwister zu
Wildtyp (wt)	+/+	0/0	ja	Gq-KO
Gq-KO	+/+	tg/0	ja	wt
G11-KO	-/-	0/0	ja	GqG11-DKO
GqG11-DKO	-/-	tg/0	ja	G11-KO

Die Überprüfung des Genotyps der Individuen erfolgte am Tag des Absetzens von der Mutter, durch Entnahme einer Biopsie-Stanze aus dem äußeren Ohr. Dies geschah in Zusammenhang mit der routinemäßigen Markierung der Tiere mit Ohrmarken. Die Bestimmung des Genotypen wurde dabei routinemäßig von Frau Tanja Kuhn mittels Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Anhand der so erzielten Ergebnisse wurden die Tiere den vier Versuchsgruppen zugeordnet.

Die Injektion von 40 mg/kg/Tag Tamoxifen (in Mygliol gelöst, 50 µl/Tag, intraperitoneal appliziert bei alternierendem Seitenwechsel der Injektionsstelle) erfolgte bei den männlichen Tieren in der fünften Lebenswoche, täglich über fünf Tage. Da es sich bei Tamoxifen um ein hormonell wirksames Östrogenderivat handelt und eine Wechselwirkung mit endogenen Hormonen besteht, wurden weibliche Tiere für die Experimente nicht genutzt.

Die Tiere für das dritte Teilprojekt zur β_2 -Untereinheit des Ca_V -Kanals wurden an der Universität des Saarlandes gezüchtet, in der spezifisch pathogenfreien (SPF)-Tierhaltung des Gebäudes 61.4, unter der Leitung von Petra Weissgerber. Die Mauslinie zur konditionellen Inaktivierung des *cacnb2*-Genes wurde in der Arbeitsgruppe Veit Flockerzi bereits für verschiedene Studien verwendet [135]. Um eine herzspezifische, konditionelle Inaktivierung der β_2 -Untereinheit des Ca_V -Kanals zu erreichen, wurden zunächst Tiere gezüchtet, deren *cacnb2*-Gen „gefloxt“, also von zwei loxP-Sequenzen flankiert war. Das ermöglicht, wie auch bei den Tieren des $\text{G}\alpha_q\text{G}_{11}$ -Projektes, das Ausschneiden der begrenzten Gensequenz durch eine Cre-Rekombinase. Diese *cacnb2*-loxP-Tiere wurden auf einem C57Bl/6 x 129/SvJ -Hintergrund gezüchtet. Sie wurden dann gekreuzt mit einer etablierten αMHC -MerCreMer-exprimierenden Maus, die, herzspezifisch durch den αMHC -Promotor, eine Cre-Rekombinase exprimiert, welche mit Tamoxifen-Injektionen aktiviert werden konnte. Diesen Tieren wurde dann zur Inaktivierung in der 10. bis 14. Lebenswoche über fünf Tage Tamoxifen intraperitoneal in einer Dosierung von 60 mg/kg injiziert und dieses nach 2 Wochen wiederholt. Tamoxifen wurde hier ebenfalls in einer Konzentration von 20 mg/ml in Mygliol gelöst.

Die Kontrollgruppe bestand hier aus Geschwistertieren, die, dem gleichen Schema folgend, lediglich mit Mygliol injiziert wurden.

Zur Untersuchung der Rolle der Spleißvarianten N1 oder N4 des *cacnb2*-Gens sollten diese konstitutiv exprimiert werden, bei gleichzeitiger Inaktivierung des wt-Gens des Ca_V -Kanals. Da der totale Knockout ($\beta_2^{-/-}$) zum Embryonaltod führt, wurden heterozygote ($\beta_2^{+/-}$) Tiere mit den Tieren mit N1 oder N4-Überexpression verpaart ($\beta_2^{+/+}\text{N1}^{\text{tg}/0}$ oder $\beta_2^{+/+}\text{N1}^{\text{tg}/0}$). Diese Tiere wurden dann untereinander wieder gekreuzt, sodass letztendlich Tiere mit dem Genotyp $\beta_2^{-/-}\text{N1}^{\text{tg}/0}$ oder $\beta_2^{-/-}\text{N1}^{\text{tg}/0}$ entstehen. Diese wurden mit Geschwistertieren verglichen, die den Genotyp $\beta_2^{+/+}\text{N1}^{\text{tg}/0}$ oder $\beta_2^{+/+}\text{N1}^{\text{tg}/0}$ trugen. Aufgrund der komplexen Zucht war die Ausbeute an Tieren mit dem gewünschten Genotyp gering, sodass Tiere beider Geschlechter und im Alter von 15 bis 28 Wochen in die Untersuchung eingingen.

3.5 Transduktion der Versuchstiere

In der Studie zur PKC α wurden zunächst Virus-Injektionen an männlichen neonatalen Mäusen der Linie FVBN durchgeführt. Jedoch stellte sich im Verlauf heraus, dass die Mauslinie FVB/N in der Zellisolation eine schlechte Ausbeute für die Einzelzelleexperimente lieferte. Daher wurde die Mauslinie C57Bl6/N genutzt, bei der die enzymatische Zellisolation sehr konsistente Ausbeuten ergab. Zeitgleich zum Wechsel der Mauslinie wurden wir auf eine Publikation von Lovric et al. [71] aufmerksam, in der die Transduktionseffizienz von AAV in Abhängigkeit vom Alter der injizierten Mäuse untersucht wurde. Dort wurde beschrieben, dass eine wesentlich spätere AAV-Injektion zu einer deutlich verbesserten Transduktionseffizienz führte. Als Grund wird ein neonatal aktives Reparatur-Enzym postuliert, welches etwa ab der zweiten Lebenswoche an Aktivität verliert. Daher injizierten wir die Welpen in der Folge eine Woche nach der Geburt.

Die für die Transduktion einer Maus vorgesehenen 1×10^{12} Viruspartikel wurden mit eiskalter 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl) für Injektionszwecke (B.Braun, Melsungen) auf ein Injektionsvolumen von 50 μ l je Maus verdünnt und gründlich durchmischt. Dabei soll die Kühlung der Injektionslösung bis unmittelbar vor der Injektion eine Degradation der Viruspartikel verlangsamen. Für die Injektion wurde eine 33G-Kanüle sowie eine tottraumreduzierte 1 ml-Spritze genutzt. Die Injektion erfolgte in das proximale Drittel der Vena jugularis. Es konnte von Kaestner et al. [54] gezeigt werden, dass diese Injektionsroute bei juvenilen Mäusen einer intraventrikulären Injektion, sowie einer Injektion in die Schwanzvene der Maus überlegen ist. Dies gilt hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, als auch für das Erreichen einer suffizienten Expression.

Die Injektion der virushaltigen Lösung verlief in den drei Wochen alten Tieren wie folgt:

Die Mäuse wurden während der Injektion einer Inhalationsnarkose mit Isofluran unterzogen. Hierzu wurde der Isofluranverdampfer Vapor (Dräger, Lübeck, Deutschland) und Isofluran (Forane, Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland) genutzt. Die Einleitung in einer speziellen Narkosebox erfolgt mit 3,5 % Isofluran bei einem Fluss von 1 l/min Sauerstoff. Bei Verlust der Sensibilität, geprüft durch den Rückziehreflex nach Zehenkneifprobe am Hinterbein, wurde die Maus auf den Operationstisch verbracht. Die Augen des Tieres wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Die Narkose erfolgte auf dem Operationsplatz über eine Nasenmaske (Konus einer 2 ml-Spritze, B.Braun, Melsungen, Deutschland). Darin ist eine Schlaufe eines Fadens so angebracht, dass in Rücken-

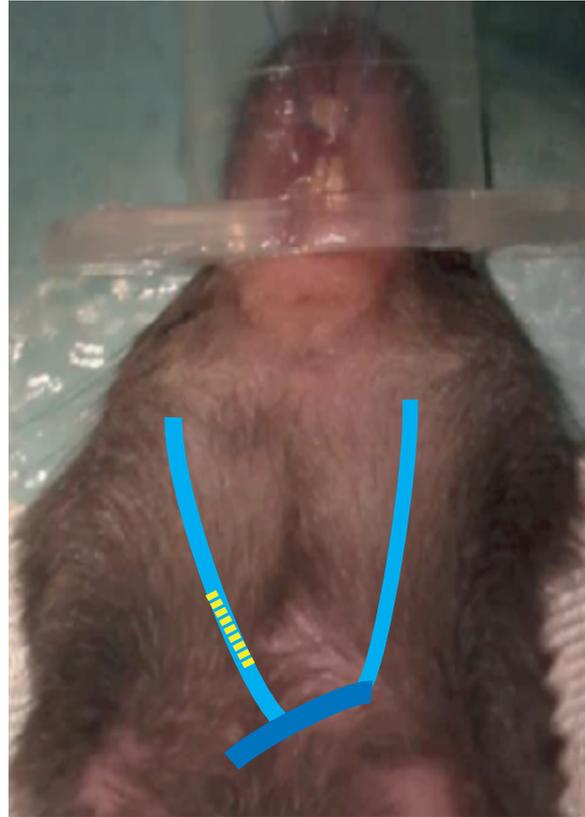


Abbildung 6: Transduktion der Versuchstiere: Schematische Darstellung des Verlaufes der Vena jugularis in der Maus (Rückenlage). Die hellblauen Linien zeigen den Verlauf der beiderseitigen Vena jugularis. Die dunkelblaue Linie zeigt die unbenannte gemeinsame Vene, in die beide Venae cavae und Venae subclaviae (zugunsten der Übersichtlichkeit nicht skizziert) münden, sodass sie dann die obere Hohlvene (Vena cava cranialis) bilden. In gelb ist einseitig der Insertionsbereich der Injektionsnadel skizziert.

lage des Tieres, die Oberkieferschneidezähne im Konus fixiert waren. Zur Unterhaltung der Narkose wurde 1,5-1,7 % Isofluran in 1 l/min Sauerstoff appliziert. Die Maus wurde dann in Rückenlage auf dem mit einem eingebauten Wärmekissen gewärmten Operationsplatz an den vier Gliedmaßen durch medizinisches Klebeband an den Untergrund geklebt. Dabei wurde das Vorderbein der Seite, in deren Vena jugularis die Injektion erfolgen soll, parallel zum Thorax nach kaudal befestigt; das andere Vorderbein kann dann nach lateral oder leicht nach kranial fixiert werden. Der Verlauf der Vena jugularis ist in Abbildung 6 skizziert.

Dann wurde die Stelle, an der die Injektion erfolgen soll, vorsichtig rasiert und mit Braunol® Iod-Lösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) die Haut desinfiziert. Nun musste die Injektionsstelle lokalisiert, und in der Haut darüber eine Inzision von etwa 2 mm gesetzt werden. Die Vene wurde dann vorsichtig durch stumpfe Präparation mit Knüpfpinzette (Aesculap FD281R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) und Schere (FST 14084-08, Fine Science Tools GmbH,

Heidelberg, Deutschland) dargestellt. Danach konnte die Injektion der 50 µl Viruslösung erfolgen. Die Kanüle wurde dann noch einige Sekunden in der Vene belassen, und danach, unter vorsichtigem Stau mit einem Wattetupfer, reponiert. Mit einem Tupfer musste für etwa eine Minute leichter Druck zur Blutstillung und Vermeidung eines Hämatoms ausgeübt werden. Dann wurde die Hautwunde mit einer monofilen nicht resorbierbaren Naht der Stärke 5/0 USP (United States Pharmacopeia) Serapren® (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) verschlossen. Nun konnte die Maus aus der Fixierung gelöst werden. Das Tier konnte in Ruhe im Käfig unter Wärmezufuhr mittels Rotlichtlampe (IRH Infrarotlampe, Medisana AG, Neuss, Deutschland) erwachen.

Die Injektion der Viruslösung in die neonatalen Welpen erfolgte von der Positionierung gleich, jedoch sind einige Unterschiede anzumerken: So erfolgte die Einleitung der Narkose bei den Neugeborenen in einer verschlossenen Box mit einem Isofluran-getränkten Tupfer. Die Unterhaltung der Narkose wurde mit 1,5-2 % Isofluran bei einem Fluss von 1 l/min eingestellt. Dabei wurde als zusätzliche Wärmequelle eine Rotlichtlampe genutzt, um Schäden durch Unterkühlung zu vermeiden; die Temperatur auf Höhe der Maus wurde mit dem Handrücken mehrfach überprüft. Die Narkoseunterhaltung erfolgte über eine Maske aus einer 1 ml-Spritze, an welche die Maus mit medizinischem Klebeband fixiert wurde. Aufgrund des Entwicklungszustandes neonataler Mäuse war weder der Schutz der Augen durch Salbe noch eine Enthaarung nötig. Die Injektion der Virenlösung erfolgte grundsätzlich gleich, allerdings langsamer, um einem Schock durch die plötzliche Volumenbelastung vorzubeugen. Die Wunde wurde mit einem Faden der Stärke 8/0 USP verschlossen. Die Welpen wurden danach noch mit einer eindeutigen Tätowierung an den Fußsohlen individuell markiert. Nach Ende der Narkose wurde besonders auf eine ausreichende Wärmezufuhr der Welpen geachtet. Sie wurden in benutzter Einstreu des Heimatkäfigs vorsichtig gerollt. So soll verhindert werden, dass die Mutter die Jungen aufgrund eines unbekanntes Geruches verstößt.

3.6 Langzeit-Expressionskontrolle mittels Organfluoreszenz

TagRFPT ist ein Fluoreszenzprotein, dessen Emissionsmaximum im roten Bereich des Farbspektrums liegt. Es wurde in der PKC ι -Studie als Indikator für eine erfolgreiche Transduktion genutzt, da es von viral transduzierten Zellen stabil exprimiert werden sollte.

Die im Folgenden durchgeführte Messung der Fluoreszenz einzelner Organe dient dem Nachweis der stabilen Expression von TagRFPT über einen längeren Zeitraum. Zudem kann ein

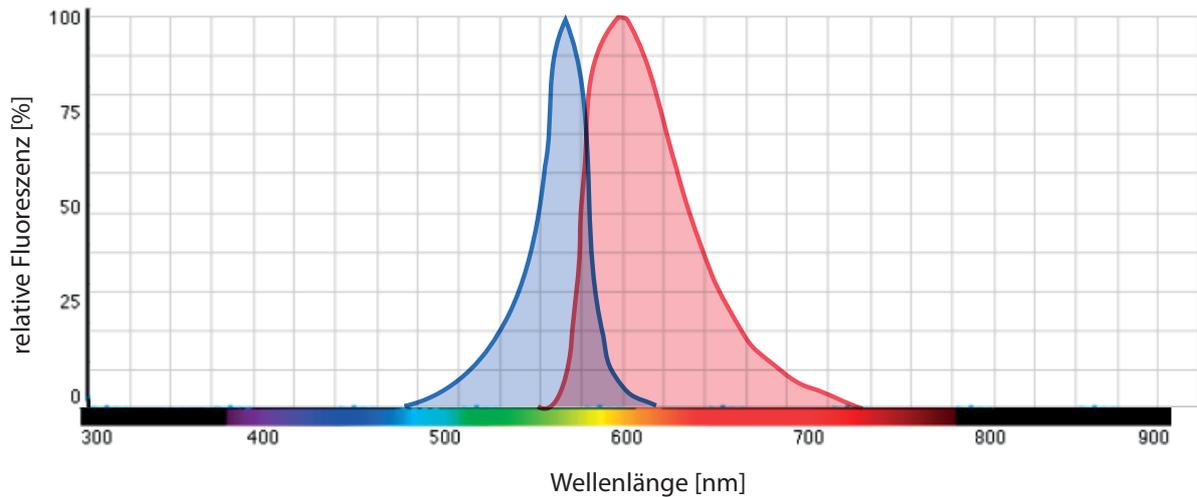


Abbildung 7: Spektrum TagRFPT: Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionskurven des exprimierten Fluoreszenzproteins TagRFPT. Aufgetragen ist die Fluoreszenz in % der maximalen Intensität, über die Wellenlängenbereiche des sichtbaren Lichtes. Das Absorptionsmaximum in der blauen Kurve liegt bei 555 nm, das Emissionsmaximum in der roten Kurve bei 584 nm. TagRFPT ist dabei die photostabilere Variante von TagRFP, das Spektrum ist bei beiden identisch. Diese Abbildung wurde nach einer Vorlage von Evrogen erstellt (<http://evrogen.com/products/TagRFP/TagRFP.shtml>).

Eindruck über die Verteilung der Expression im Zielgewebe getroffen werden. Es kann also dargestellt werden, ob unterschiedliche Schichten des Herzens unterschiedlich gut transduziert sind, sowie auch, ob auch andere Organe eine spezifische Fluoreszenz zeigen. Damit kann beurteilt werden, ob andere Organe ebenfalls von den AAV mit der spezifischen cDNS transduziert wurden, was Rückschlüsse auf die Herzspezifität des gewählten Vektors zulässt. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzmessung am ganzen Organ liegt darin, dass keine Zellisolation für eine erste Beurteilung der Transduktionseffizienz und -spezifität nötig ist. Da die Zellisolation aus den FVB/N-Tieren insgesamt schlecht verlief, bietet sich die hier mögliche Beurteilung der Organe im Ganzen an. Ein Nachteil der Methode lag darin, dass sich die verwendeten Organe bei dieser Untersuchung bei Raumtemperatur an der Luft befanden, daher schnell austrocknen oder konatminiert werden konnten. Eine weitere Verwendung der Organe wäre daher nur eingeschränkt möglich.

Für die Messung der Organfluoreszenz wurde je ein mit einer beliebigen Variante der Versuchslösungen neonatal injiziertes FVB/N-Männchen im Alter von 16 oder 23 Wochen genutzt, sowie jeweils ein mit NaCl injiziertes Kontrolltier gleichen Alters, aus dem gleichen Wurf. Die Tiere wurden dazu schmerzlos getötet. Die Mäuse wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion mit 85 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®), Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutsch-

land) und 15 mg/kg Xylazin (Rompun®), Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland) tief sediert und auf einer Unterlage fixiert. Dann wurden mit einer kräftigen Schere die großen Halsgefäße und die Halswirbelsäule durchtrennt, das Tier stirbt somit durch Dekapitation und Blutverlust. Da das Herz dann noch schlägt, entblutete das Tier fast vollständig. Anschließend wurden Abdomen und Thorax zur Organentnahme großzügig eröffnet. Eine darauffolgende beidseitige ventrikuläre Injektion von 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung wusch die Ventrikel von Blutresten frei. Ein Stück Jejunum wurde herausgetrennt, geöffnet, und ebenfalls gewaschen. Es folgte die Entnahme des Herzens, eines Stück der Aorta, der Oberschenkelmuskulatur und des Jejunums, sowie der gesamten Leber und Milz, des Gehirnes, eines Lungenflügels und einer Niere. Die isolierten Organe wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt erfolgte eine Abtrennung der Vorhöfe vom Herzen. Alle zu untersuchenden Proben wurden mit etwas 0,9 % NaCl-Lösung in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen bis zur eigentlichen Untersuchung auf Eis gelagert.

Die Untersuchung der Organe erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop SZX12 von Olympus (Tokyo, Japan). Die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes betrug 555 nm, entsprechend der Anregungswellenlänge von TagRFPT. Die Messung des emittierten Lichtes geschah unter Verwendung eines passenden Filters für die Emissionswellenlänge. Für TagRFPT liegt diese Emissionswellenlänge bei 584 nm. Die Wellenlängenbereiche für Exzitation und Emission sind in Abbildung 7 skizziert. Die Vergrößerung des Bildes durch die Kamera betrug 10x, hinzu kam die Vergrößerung des verwendeten Objektivs (hier 1x). Der Vergrößerungsfaktor war außerdem über ein Vergrößerungs-Stellrad am Mikroskop fein variierbar, um einen zusätzlichen Faktor zwischen 0,7x und 9x.

Zunächst erfolgten die Messungen an den zwei neonatal injizierten FVB/N-Mäusen im Alter von 16 Wochen. Hierzu entstanden zunächst immer Aufnahmen von Atrien und Ventrikel im Weißlicht, was einen späteren Vergleich mit dem anatomischen Bild ermöglichte. Danach entstanden Fluoreszenzbilder unterschiedlicher Belichtungszeiten. So sollte für die weiteren Aufnahmen die optimale Belichtungszeit für eine klare Darstellung des durch TagRFPT-Expression fluoreszierenden Gewebes ermittelt werden. Die optimale Belichtungszeit lag für die Atrien bei 10 ms, für den Ventrikel bei 21 ms, diese Zeiten wurden für die folgenden Messungen beibehalten.

Um die dargestellte Fluoreszenz sicher der Expression des TagRFPT zuzuordnen und von der Gewebe-Autofluoreszenz unterscheiden zu können, wurden im nächsten Schritt Vorhof

und Ventrikel der Kontrollmaus bei gleichen Einstellungen analysiert. Zu Vergleichszwecken wurden jeweils beide rechte und beide linke Vorhöfe der TagRFPT-exprimierenden Maus sowie der Kontrollmaus gleichzeitig in einem Bild mit einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen. Zuletzt wurden jeweils ein weiteres der entnommenen Organe der TagRFPT-Maus gemessen und daneben der rechte Vorhof als Positivkontrolle platziert. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Untersuchung wurde in gleicher Weise mit jeweils einem TagRFPT-exprimierenden Tier und einem Kontrolltier, ebenfalls neonatal injizierte FVB/N-Mäuse, nach einer Expressionszeit von 23 Wochen, durchgeführt.

3.7 Kontrolle der Expression auf Proteinebene

Proteinisolation

Die noch gefrorenen Organstücke wurden unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Precellys Ceramic Kit 1,4 mm (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Das Gewebe wurde in die speziellen 0,5 ml-Reaktionsgefäße verbracht, in dem kleine Keramikkügelchen vorgelegt waren. Es wurde Lysis-Puffer hinzugefügt (100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl, 0,5 % TritonX-100, 20 mM Dithiotreitol, 40 µl/ml Complete™ (Roche, Basel, Schweiz)). Die Zellrückstände wurden dann durch Zentrifugation mit 13000x g über 30 min bei 4° C auf dem Boden des Reaktionsgefäßes abgeschieden, die zytosolischen Proteine dagegen befanden sich im Überstand. Dieser Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Probe wurde nach der Methode von Bradford quantifiziert. Dazu wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 genutzt. Dessen Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Bindung an basische Aminosäurereste der in der Testlösung enthaltenen Proteine von 465 nm zu 595 nm. Eine bestimmte Zunahme der Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm entsprach damit einer definierten Zunahme des Proteingehaltes der Testlösung. Die Zusammensetzung der Testlösung bestand aus 1 ml Bradford-Reagenz und 1 µl der Probe. Gemessen wurde in Einmal-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), mit dem Spektrophotometer „Lambda Bio“ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Der Proteingehalt bei der gemessenen Änderung der Absorption wurde anhand einer vorab erstellten Standardreihe be-

stimmt. Dieser Schritt diente dazu, im Anschluss das Polyacrylamidgel mit Proben vergleichbarer Proteinkonzentration beladen zu können, um direkt vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierten Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde hier zu der entsprechenden Probe mit standardisierter Proteinkonzentration Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergenz hinzugefügt. Danach wurde die Probe für 5 min bei 95° C denaturiert. Die negative Ladung des SDS wurde dabei dazu verwendet, um die Eigenladung der Aminosäuren im Protein zu überdecken, wodurch sich die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins auflöste. Damit war das Laufverhalten der Proteine auf dem Elektrophoresegel nunmehr nur von der Größe der Proteinmoleküle abhängig. Für die hier isolierten Proteine wurde ein 12 % NuPAGE Bis/Tris-Gel von Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) genutzt, an das eine Spannung von 100-120 V angelegt wurde.

Western Blot - Analyse

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine unter Zuhilfenahme eines angelegten Stromes von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, dies wird als Elektrotransfer bezeichnet. Dazu wurde mit dem Mini-Protean® tetra-Systems (Biorad, München, Deutschland) ein so genanntes „Sandwich“ erstellt. Die Transfermembran (11 cm x 16 cm) wurde dafür auf das Gel aufgelegt, und beides zwischen zwei passenden Stücken Filterpapier (Whatman, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und zwei Schwämmen in einer speziellen Kassette eingeklemmt. Diese Kassette wurde dann in die Blotkammer verbracht, dabei zeigte die Transfermembran zur Anode, das Gel zur Kathode. Die Kammer wurde anschließend mit Blotpuffer (NuPAGE Transferpuffer, 5% v/v Methanol) befüllt. Das Blotten erfolgt dann bei Raumtemperatur und einem Strom von 140 mA über Nacht. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine konnte nun überprüft werden, indem die Membran für 5 min mit dem roten Farbstoff „Ponceau S“ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert wurde, der an die Proteine auf der Membran band und diese rot färbte. Diese Bindung konnte durch einen Waschschrift in einer mit dem Detergenz Tween® versetzten phosphatgepufferten Salzlösung (PBST) wieder gelöst werden.

Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur, oder 24 Stunden bei 4 °C

in Blockierpuffer (10% v/v, RotiBlock, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. In diesem Blockierpuffer sind Milchproteine enthalten, die nach der Inkubation mögliche unspezifische Bindungsstellen abdeckten, damit die später dazugegebenen Antikörper nur spezifisch binden konnten. Es folgten drei Waschschrte von jeweils fünf Minuten in PBST. Dann wurde der Antikörper „Mouse anti-PKCi“ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) als Erstantikörper, verdünnt auf 1 : 5000 im Blockierpuffer, auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für fünf Minuten mit PBST gewaschen, um schließlich für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper („Goat anti-mouse“ IgG HRP, Santa Cruz, Dallas, USA), 1 : 5000 verdünnt in PBST inkubiert zu werden. Die Meerrettich-Peroxidase (Horsereddish-peroxidase, HRP) sorgte für die Bildung optisch aktiver Hydroperoxide aus einem Detektionsreagenz (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Das Detektionsreagenz bestand dabei aus zwei Lösungen, die erst auf der Membran unter Lichtabschluss vermischt wurden: Zunächst wurde eine Luminollösung (Reagenz A) aufgetropft, dann eine Peroxidlösung. An den Bindungsstellen der Antikörper spaltete die HRP die Peroxidase, dadurch wurde Luminol zu seinem Hydroperoxid oxidiert, wodurch Lumineszenz entstand. Diese Lumineszenz kann detektiert werden. Somit konnte die Bindung des Sekundärantikörpers dann mit einem Fluoreszenzdetektor (FluorChemM, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) quantitativ dargestellt werden. Die lumineszierenden Membranen wurden dann fotografiert. Die Proteinbanden, an die der Sekundärantikörper binden konnte, erschien im Bild dunkel, die Membran selbst und alle Banden, an die kein Antikörper gebunden hat, waren weiß.

Für den Nachweis der Expression von TagRFPT konnte die mit Proteinbanden beladene Membran wiederverwendet werden. Dazu muss die Bindung der Antikörper aus der vorangegangenen Detektion wieder gelöst werden. Die Ablösung der Antikörper bezeichnet man als „Strippen“: Die Membran wird für 10 min in Strip-Puffer inkubiert, der durch seinen niedrigen pH-Wert die Bindungen der Antikörper zu den Proteinen auf der Membran löst. Es folgen alternierend je zwei Waschungen in PBS (10 min) und PBST (5 min), danach eine erneute Inkubation in Blockierpuffer über Nacht (24 h, 4° C).

Nun wird der Antikörper „Rabbit anti-TRFP“ (Evrogen, Moskau, Russland) nach dem gleichen Protokoll, wie schon zuvor für „Mouse anti-PKCi“ beschrieben, mit der Membran inkubiert, anschließend mit dem Sekundärantikörper „Anti-Rabbit“ igG HRP (Santa Cruz, Dallas, USA).

Nach den Waschschritten wurde auch hier die Lumineszenz detektiert, wie oben bereits beschrieben.

Als Ladekontrolle wird der in Kardiomyozyten vorkommende Elongationsfaktor 2 (EF 2) gewählt, der spezifische Antikörper dagegen ist „anti-EF2“, ebenfalls von Santa Cruz, Dallas, USA, in einer Verdünnung von 1 : 1000 in PBST. Diese Ladekontrolle wurde bei 100 kDa detektiert.

3.8 Echokardiographische Untersuchung

Prinzip der Ultraschalluntersuchung des Herzens

Als Ultraschall bezeichnet man Schallwellen oberhalb des Hörfrequenzbereiches des Menschen, beginnend ab etwa 16 kHz. Für die Echokardiographie zur Untersuchung kleiner Versuchstiere kommen Frequenzbereiche um 20-30 MHz zum Einsatz. Die Schallwellen werden von einem piezoelektrischen Element erzeugt. Sie breiten sich dabei im untersuchten Gewebe unterschiedlich gut aus, werden beispielsweise reflektiert, absorbiert oder gestreut. Bedeutsam dafür ist dabei die Schallgängigkeit des Gewebes oder dessen Widerstand dagegen, auch Impedanz genannt. Wässrige Gewebeteile sind sehr gut schallgängig. An der Grenzfläche zu Luft werden Schallwellen dagegen vollständig reflektiert. Dementsprechende können auch Luftblasen im Kopplungsgel zwischen Schallkopf und Tierkörper zu massiven Artefakten führen. Je weniger wasserhaltig ein Gewebe ist, desto mehr reflektiert es das Signal. Das Maß dieser Reflexion bezeichnet man als Echogenität. Hoch echogen sind beispielsweise Knochen und auch Haare, weshalb das Fell vor Beginn der Untersuchung möglichst vollständig entfernt werden sollte.

Im erzeugten Bild werden echogenere Gewebe hell dargestellt; je weniger echogen das Gewebe ist, desto dunkler ist die Darstellung. Da der Ventrikel mit stark wasserhaltigem Blut gefüllt ist, erscheint das Lumen also dunkel, das umgebende Herzgewebe dagegen heller. Dies nutzt man im Helligkeits- („Brightness“)-Modus (B-Mode), für eine zweidimensionale (2D) Darstellung der Schnittebene des Herzens, und im Motion (M)-Mode, um die Bewegung des Gewebes über die Zeit darzustellen.

Die Detailauflösung und die Eindringtiefe hängen dabei direkt mit der ausgesendeten Wellenlänge der Ultraschallwellen zusammen. Eine größere Eindringtiefe bedeutet immer einen Verlust an Detailschärfe, da die Wellenlänge zunehmen muss, um tiefer in das Gewebe eindringen zu

können. Eine hohe Frequenz der Schallwellen sorgt so zwar für eine hervorragende räumliche und auch zeitliche Auflösung, jedoch schränkt dies die Eindringtiefe des Signals ein. Hinzu kommt, dass für eine hohe zeitliche Auflösung eine hohe Frequenz der Schallwellen notwendig ist, um bei einer Herzfrequenz der Mäuse von etwa 300 - 500 Schlägen je Minute unter Narkose noch eine ausreichende zeitliche Detailauflösung der sich bewegenden Gewebe zu ermöglichen. Da bei der gewählten Untersuchung am Herz der Maus eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung wesentlich ist, hat dies zur Folge, dass von der nutzbaren Eindringtiefe von etwa 21 mm bei einer Frequenz von 30 MHz das Herz der Maus gerade erfasst wird.

Das Bild, das im Brightness-Mode erzeugt wird, zeigt bei dem hier verwendeten Gerät eine fächerförmige Bildfläche. Dies geschieht, da ein Sektor-Schallkopf mit einem schwingenden Kristall genutzt wird. Durch die schwingende Bewegung des Kristalls entsteht diese typische Form des Untersuchungsbereiches.

Neben der Nutzung des Brightness-Modus, der unterschiedliche Echogenität in Graustufen übersetzt, kann man auch den Doppler-Effekt verwenden, um Bewegungen darstellen zu können. Bei der Messung mit diesem Effekt misst man die Frequenzverschiebung, die zwischen ausgesendetem und reflektiertem Schall entsteht, wenn sich das untersuchte Objekt auf den Schallkopf zu-, oder von ihm weg bewegt. So misst man beispielsweise Blutfluss-Geschwindigkeiten durch Herzklappen mit dem Pulswellen-Doppler-Verfahren (PW = Pulsed Wave). Bei diesem Verfahren treffen kurze ausgesendete Schallpulse in einem begrenzten örtlichen Fenster auf das sich bewegende Blut. Sie werden dann von diesem, mit der entsprechenden Verschiebung, reflektiert, was wieder vom Schallkopf empfangen wird. Daraus lässt sich die Geschwindigkeit des Blutes sowie deren Änderung über die Zeit bestimmen.

Vorteile der Ultraschalluntersuchung an Versuchstieren zur Klärung kardiologischer Fragestellungen sind offensichtlich: Abgesehen von der nur gering belastenden Inhalationsnarkose entsteht dem Tier kein Schaden, es kann mehrfach im Verlauf einer Studie untersucht werden, was einen longitudinalen Studienverlauf ermöglicht. Die Ergebnisse spiegeln außerdem nicht nur die Situation *in vivo*, sie werden auch noch mit einem in der kardiologischen Diagnostik der Humanmedizin üblichen Verfahren erzielt.

Versuchsaufbau und Vorbereitung des Versuchstieres

Die Untersuchung wurde durchgeführt mit dem Vevo 770 System® (FUJIFILM Visualsonics, Toronto, Kanada). Bei dem Schallkopf handelte es sich um einen 30 MHz-Sektor-

Schallkopf, ebenfalls von FUJIFILM Visualsonics. Zur Darstellung der Aufnahmen und späteren Auswertung wurde die systemspezifische Vevo-Software des gleichen Anbieters genutzt. Das Mess-System enthält weiterhin einen beheizten Untersuchungstisch, in den Messelektroden integriert sind. In Abbildung 8 ist in **a** das genutzte Ultraschallgerät abgebildet, in **b** der fertige Messaufbau inklusive der narkotisierten Maus. Zwischen dem Thorax der Maus auf dem Messtisch und dem weißen Ultraschallkopf, ist das blaue Kopplungsgel gut zu erkennen.

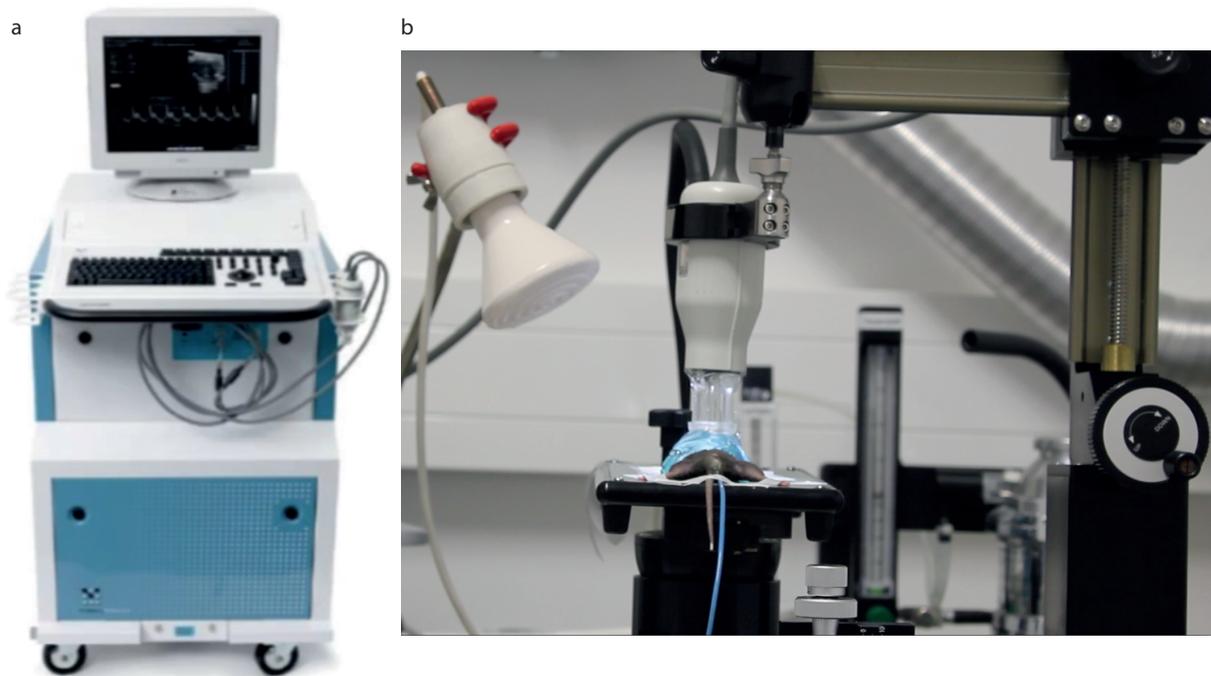


Abbildung 8: Aufbau der echokardiographischen Untersuchung: **a:** Die mobile Vevo 770-Echokardiographie-Station von Visualsonics Inc., Toronto Kanada (Bild vom Hersteller mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt). Es können daran Sektor-Schallköpfe unterschiedlicher Frequenz genutzt werden, das Bild wird auf dem Monitor direkt angezeigt. Die Einstellungen können über die integrierte Tastatur angewählt werden, zudem ist eine Auswertung der Messungen auch hier möglich. **b:** Platzierung der Maus auf dem Untersuchungstisch; Das Tier ist mit Klebeband mit den Pfoten auf den Elektroden des Tisches fixiert, so werden EKG und Atmung direkt aufgezeichnet. Eine Rektalsonde (blau) misst die Körpertemperatur, die Wärmelampe (weiß, links oben) kann flexibel ausgerichtet werden. Der Tisch kann auf dem runden Anteil des Fußes in der Position variiert werden, zudem über den Manipulator (unten, rechts des Fußes) horizontal fein verschoben werden. Der Schallkopf (707B, 30 MHz) kann in seiner Aufhängung frei rotiert werden. Über die Führungsschiene (oben und rechts) kann der Schallkopf nach links und rechts sowie in vertikaler Richtung verstellt werden. Im Hintergrund ist die Anlage zur Isoflurannarkose teilweise zu erkennen (Säule: Anzeige und Regulation des O₂-Flusses; rechts daneben ist teilweise der silberne Isofluran-Verdampfer sichtbar.)

Die echokardiographische Untersuchung erfolgt ebenfalls unter dem in 3.5 beschriebenen Standard-Narkoseprotokoll. Nach der Einleitung der Narkose in einer Plexiglasbox wird das Tier zuerst gewogen, dann wird es in Rückenlage auf den Untersuchungstisch gelegt. Die Pfoten

des Versuchstieres wurden dort auf den Elektroden und entsprechendem Elektrodenkontaktgel (Signa creme, Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA) mit Klebeband fixiert. So konnten während der Untersuchung Vitalparameter in Form von Atem- und Herzfrequenz überwacht werden. Ein Elektrokardiogramm konnte so simultan zur Ultraschalluntersuchung aufgezeichnet werden. Über eine Rektalsonde wurde zudem die Körpertemperatur des Tieres gemessen. Diese Daten zum physiologischen Zustand des Tieres wurden von der Software automatisch in das Ultraschallbild integriert. Der Thorax der Maus wurde mit Enthaarungscreme (Nair Hair Removal Creme®), Church & Dwigth Co., Ewing, USA) gründlich enthaart, um Artefakte durch das Fell im Ultraschallbild zu vermeiden. Gewärmtes Ultraschall-Kontaktgel (Aquasonic 100, Parker Laboratories inc., Fairfield, USA) wird möglichst luftblasenfrei auf dem zu untersuchenden Bereich aufgetragen, also median auf dem Thorax, sowie linksseitig an der kaudolateralen Thoraxwand. Dort wurde der Schallkopf für die Einstellung des Vierkammerblicks angesetzt. Der Untersuchungstisch ist manuell in X-Y-Richtung beweglich und kann um ein Kugelgelenk zudem in alle Richtungen rotiert werden. Der Schallkopf kann in einer Aufhängung in alle Richtungen gedreht, in der Höhe variiert und in jeder Position fixiert werden. So können einerseits die Standard-Messpositionen gut eingehalten werden. Andererseits sind feine Korrekturen möglich, ohne den Schallkopf in der Hand halten zu müssen. Bewegungsartefakte durch den Untersucher spielen in der Auswertung also keine Rolle. In den Aufbau ist eine Isofluran-Narkoseeinheit integriert. Grundsätzlich wäre es auch möglich, durch Anpassung der Narkose einen bestimmten Herzfrequenzbereich für die Untersuchung festzulegen. Dies wurde hier allerdings nicht genutzt, um mögliche Frequenzunterschiede bei gleicher Narkose als Ergebnis der Untersuchung erkennen zu können.

Durchführung der Echokardiographie

In der folgenden Beschreibung sollen, neben den deutschen Begriffen, auch die englischsprachigen Abkürzungen für die Messparameter eingeführt werden. Die internationalen Bezeichnungen für diese Parameter werden auch im deutschsprachigen Raum in Forschung und Klinik genutzt.

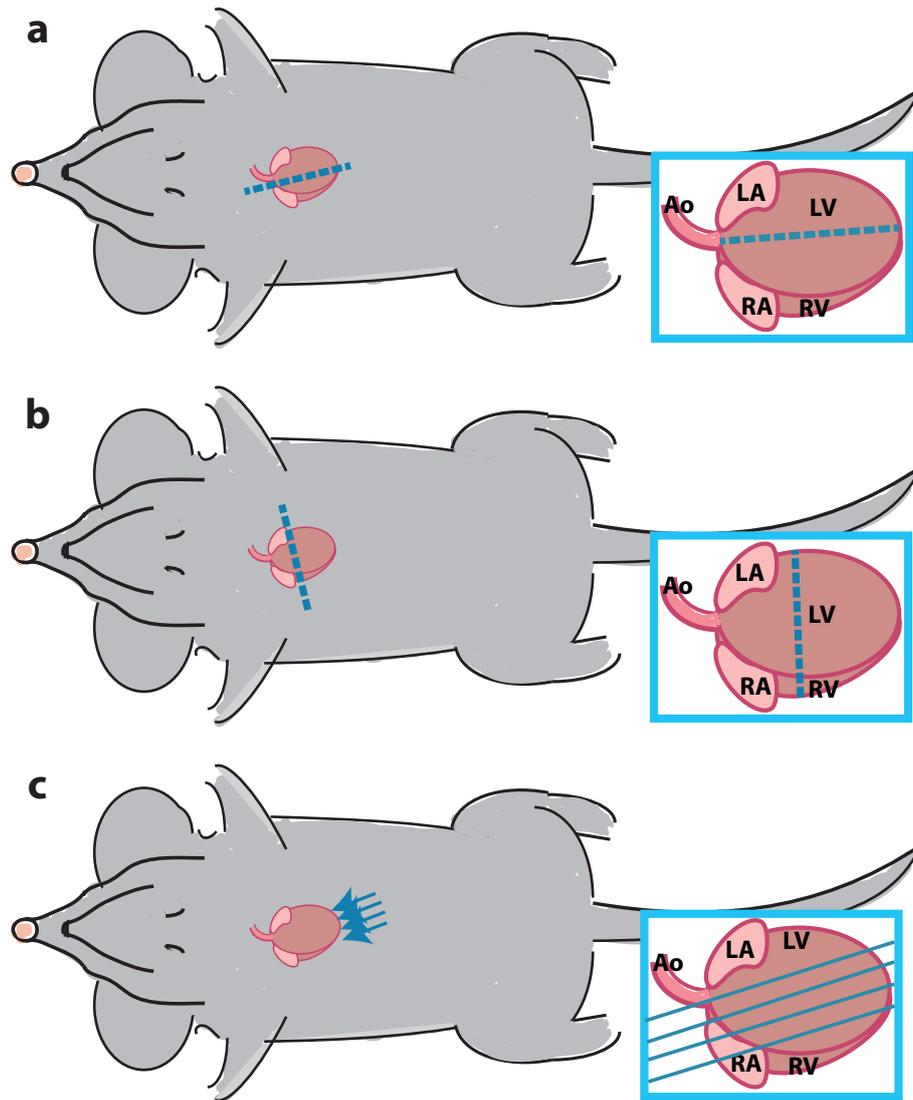


Abbildung 9: Schema der Messpositionen an der narkotisierten Maus: In allen drei Bildern ist der Strahlengang des Ultraschall-Signals im Verhältnis zur Maus skizziert, im blauen Ausschnitt sind Aorta (Ao), linkes (LA) und rechtes Atrium (RA), sowie linker (LV) und rechter Ventrikel (RV) gekennzeichnet. **a:** Messposition der langen Herzachse, der Schallkopf steht annähernd im 90°-Winkel zur Thorax-Fläche der Maus, der Strahlengang ist ventro-dorsal. **b:** Messposition der kurzen Herzachse, Winkel des Schallkopfes wieder 90° zur Maus, Strahlengang wieder ventro-dorsal, Schallkopf im Verhältnis zu a um 90° auf horizontaler Ebene rotiert. **c:** Messposition des Vierkammerblickes, der Schallkopf liegt parallel zur Maus an, Strahlengang gemäß der Pfeilspitzen kaudolateral- kranialateral.

Es wurden zunächst drei Standard-Messpositionen genutzt: Aufnahmen entlang der langen Herzachse, der kurzen Herzachse sowie der Vierkammerblick. Für die erste Position, der Messung in der langen Herzachse, (Abbildung 9a) wurde die Membran des Ultraschallkopfes, senkrecht auf dem Thorax der Maus stehend, entlang einer gedachten Linie durch Herzbasis und Apex ausgerichtet (rechts-kranial nach links-kaudal).

Die erste Aufnahme einer Einstellung erfolgte immer im Brightness-(B-) Mode. Zunächst wurde darauf geachtet, dass im Schallgang keine Artefakte vorliegen, die etwa durch Luftblasen, Rippen oder restliche Haare entstanden sein können.

Die Messposition der langen Herzachse ist ein zweidimensionaler Längsschnitt des Herzens. Hier ließ sich, bei korrekter Positionierung des Schallkopfes, die Herzspitze, die Papillarmuskeln, das interventrikuläre Septum (Interventricular Septum, IVS), das Lumen des Ventrikels, die Hinterwand des Ventrikels (Left Ventricular Posterior Wall, LVPW) und die Aortenwurzel erkennen, siehe Abbildung **10a**. In dieser Position ließ sich im M-Mode die Dicke des IVS und des LVPW in der Systole und Diastole messen, ebenso wurde der Durchmesser des Ventrikellumens (Left Ventricular Inner Diameter, LVID) in Systole und Diastole gemessen (siehe Abbildung **10d**). Die Position der Messung wurde an der breitesten Stelle des Ventrikels gewählt, direkt hinter dem Ursprung der Papillarmuskeln. Im dann genutzten Motion-(M-)Mode wurde die Bewegung des Gewebes über die Zeit dargestellt. An diesen Bildern im M-Mode konnte nachfolgend die Auswertung in Systole und Diastole stattfinden. Das hellere Myokardgewebe konnte deutlich vom dunkleren Ventrikellumen unterschieden werden. Es wurden mindestens 10 Sekunden im M-Mode aufgenommen. Bei der Aufnahme sollte darauf geachtet werden, die Grenzen der Ventrikelwände im M-Mode auf den ersten Blick bereits gut erkennen zu können, um die spätere Auswertung zu erleichtern. Gegebenenfalls konnte die Position über feine Variationen der Stellung des Schallkopfes leicht verändert werden.

Anschließend wurde die zweite Messposition entlang der kurzen Herzachse aufgesucht, siehe Abbildung **9b**. Dazu wurde der Schallkopf um genau 90° gedreht platziert. Nun sah man in der Bildmitte das dunkle und annähernd kreisförmige Lumen des linken Ventrikels, umschlossen vom helleren Myokard, siehe Abbildung **10b**. Auch hier wurde der Messbereich gewählt, der den größten Durchmesser des Ventrikels zeigte, und in der die Ansätze der Papillarmuskeln zu sehen waren. Proximal zum Schallkopf war in dieser Stellung die Ventrikelvorderwand (Left Ventricular Anterior Wall, LVAW) darstellbar. Es handelte sich dabei um den schallkopfnahen Bereich der sichtbaren Ventrikelwand, oben im Bild. Der Messbereich wurde genau durch die Mitte der Herzschnittes platziert. Der Schallgang stand hier annähernd rechtwinklig zur Ventrikelwand. Es wurde wiederum etwa 10 Sekunden im M-Mode die Bewegung des LVAW über die Zeit aufgenommen. In der Auswertung dieser Aufnahmen wurde dreifach die Dicke der LVAW in Systole und Diastole bestimmt, siehe Abbildung **10e**.

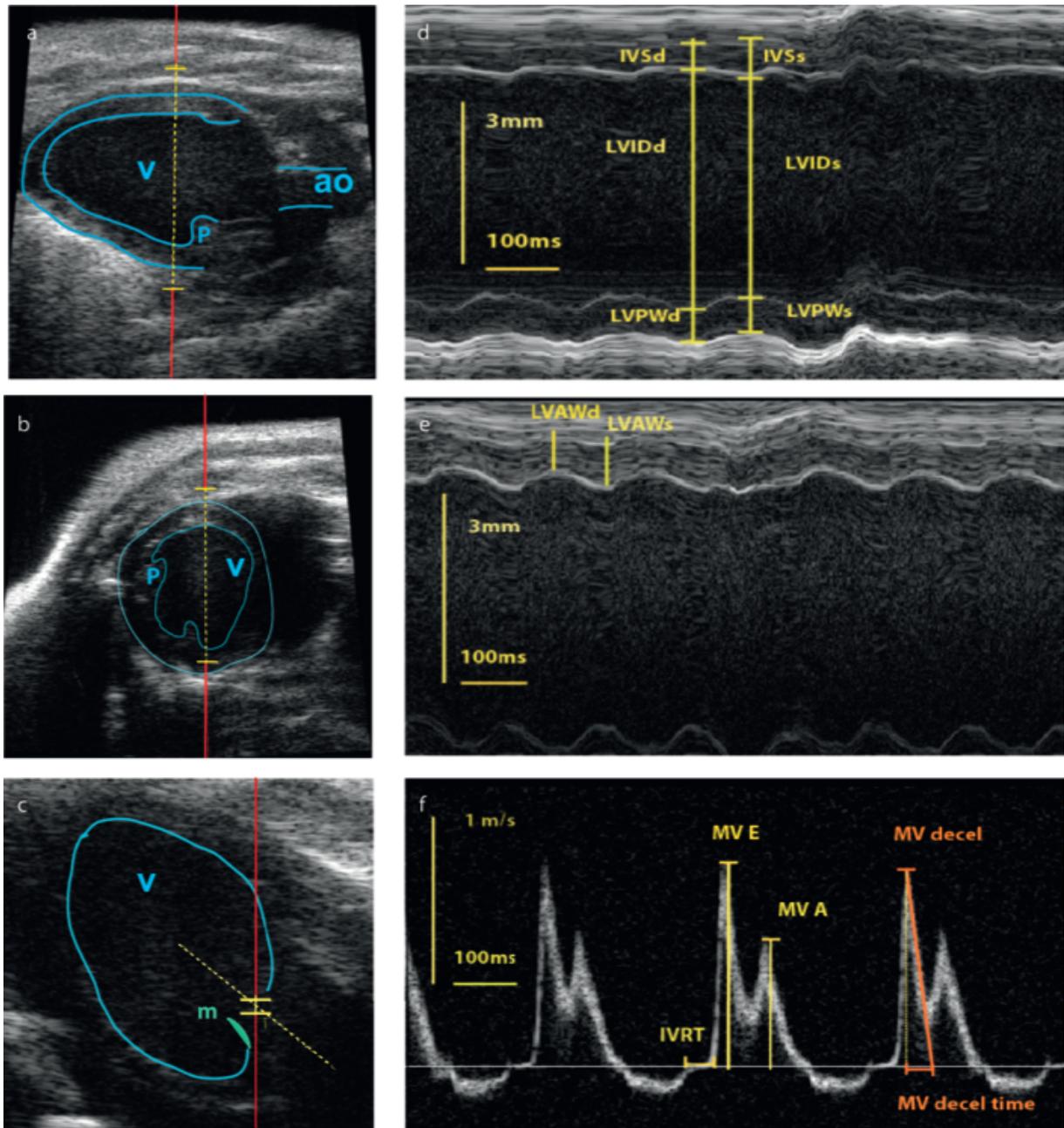


Abbildung 10: Messpositionen und Messung der echokardiographischen Parameter: a, b, c: Abbildungen im B-Modus, a lange Herzachse, b kurze Herzachse, c apikaler Vierkammerblick; d, e: gleiche Position wie die Abbildung links davon, M-Modus; f: PW-Doppler-Modus, Mitralklappe. blau: Umrisse kardialer Strukturen: in a, b ist das Myokard teilweise eingefasst. Rot-gelbe Linie: Verlauf des Schallwellenganges für die jeweilige M-/PW-Mode-Messung rechts (d-f). Die gelb-unterbrochene Linie zeigt den Messbereich an; c: gelb-unterbrochene Linie: Winkel der Doppler-Messung zum Schallwellengang. v = Ventrikellumen, ao = Aortenwurzel, P = Papillarmuskel, m = Mitralklappensegel. Der obere Bildbereich ist schallkopfnah: In a, b der ventrale Thorax der Maus, in c der links-laterale Thorax. d, e: schematische Zeichnung der Messparameter in gelb, von IVS, LVID und LVPW in a, von LVAW in b, jeweils systolisch und diastolisch. Größen- und Zeitverhältnisse links im Bild. f: Zeitverlauf der Blutflussgeschwindigkeit durch die Mitralklappe. Gelbe Linien: Messungen E-Welle, A-Welle, IVRT; Orange Linien: MV decel und MV decel time. Zeit- und Geschwindigkeitsverhältnisse links im Bild. Die Messungen in d-f werden je Tier dreimal ausgeführt.

Die dritte Messposition zeigte den Vierkammerblick, der auch in der klinischen Diagnostik angewendet wird. Dazu wurde der Schallkopf auf einer horizontalen Ebene mit dem Herz so ausgerichtet, dass der Schallgang vom Apex des Herzens zur Basis verlief, siehe Abbildung 9c. Im B-Mode erkannte man dann deutlich den linken Ventrikel sowie auch Teile des rechten Ventrikels und teilweise auch beide Vorhöfe, siehe Abbildung 10c. Zudem konnte man in dieser Position bei optimaler Platzierung des Schallganges und wenig Artefakten auch die Flügel der Mitralklappe erkennen. In dieser Position konnte die Funktion des linken Ventrikels, sowie indirekt die Funktion des linken Atriums analysiert werden. Dazu wurde die Geschwindigkeit des Blutstromes durch die Mitralklappe gemessen. Das Profil dieser Strömung wurde über die Zeit aufgezeichnet. Dazu wurde eine Messung mit dem Pulsed Wave (PW)-Doppler genutzt. Hierbei wurde der Doppler-Effekt von Schallwellen genutzt, um die Geschwindigkeit einer unidirektionalen Bewegung, in diesem Fall die des Blutstromes durch die Mitralklappe, zu bestimmen. Der Messbereich für das Doppler-Signal wurde unmittelbar hinter der Mitralklappe gewählt. Die Position des Messfensters konnte dann anhand des PW-Signales optimiert werden. Dabei konnte die vom Gerät ausgegebene akustische Umsetzung der Blutstromgeschwindigkeiten herangezogen werden; das Einstromgeräusch war genau im Zentrum des Bluteinstromes am deutlichsten, hier wurde das Messfenster platziert. Zudem konnte anhand der deutlichen und vom Hintergrund klar abgegrenzten Darstellung des Strömungsprofils im Bild der optimale Messpunkt weiter eingegrenzt werden. Die klar dargestellten Geschwindigkeitsprofile des Blutstromes über die Zeit wurden für etwa 20 Sekunden aufgezeichnet, siehe Abbildung 10f. Die echokardiographische Untersuchung der ersten FVBN-Mäuse nach neonataler Injektion erfolgte zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, in der 6., 10. und 12. Lebenswoche. So konnte ein Zeitverlauf der Entwicklung eines Phänotypes abgebildet werden. Daraus konnte der optimale Zeitpunkt für nachfolgende Untersuchungen gewählt werden. Grundsätzlich wurden in den Studien an unserem Institut bis dahin die besten Isolationsergebnisse von Kardiomyozyten zwischen der 10. und 12. Lebenswoche erzielt. Daher wurden auch die Ultraschallzeitpunkte entsprechend gewählt. Die Isolation der Kardiomyozyten aus den FVB/N-Tieren verlief jedoch zu diesem, wie auch zu späteren Zeitpunkten, nicht ergiebig. Es waren so vernachlässigbar wenig Zellen isolierbar, dass Auswertungen unterblieben und mit dieser Mauslinie keine weiteren Versuche unternommen wurden.

Es wurde dann bei den am 21. Lebenstag injizierten C57/Bl6N-Mäusen im Alter von 5, 7, 9 und 10 Wochen jeweils eine ultrasonographische Messung durchgeführt. Es zeigte sich eine

beginnende Ausbildung des Phänotyps in Woche sieben, mit deutlicher Entwicklung in Woche 9 und 10, wie im Unterabschnitt 4.1.3 erläutert. Die Tiere für die folgenden Studien wurden in der Konsequenz dieser Entwicklung dann in Lebenswoche 10 eingesetzt, also sieben Wochen nach Injektion.

Für die Tiere, die in den Hypertrophie-Gruppen eingesetzt wurden, war folgendes Untersuchungsschema angesetzt: Die erste echokardiographische Untersuchung erfolgte einen Tag vor der Operation, im Alter von 8 Wochen. Am Tag darauf wurde die Operation durchgeführt (siehe Abschnitt 3.9), dabei dienten die 24 Stunden zwischen den einzelnen Schritten dem Schutz der Tiere vor den Schäden durch wiederholte Narkosen. Der zweite Zeitpunkt der echokardiographischen Untersuchung lag 14 Tage nach dem Eingriff, also in der 10. Lebenswoche. Die echokardiographische Untersuchung und deren Auswertung für die Tiere der $G\alpha_qG_{11}$ -Studie erfolgte grundsätzlich gleich. Die Untersuchungszeitpunkte lagen zunächst einen Tag vor der Implantation der osmotischen Minipumpe, oder des Placebo-Implantates, und dann kurz vor der Tötung der Maus zur Organisolierung, nach sechswöchigem Verbleib des Implantates in der Maus. Zwischen der ersten echokardiographischen Untersuchung und der Implantation sollten dabei ebenfalls mindestens 24 Stunden liegen, um Schäden der Tiere durch die wiederholten Narkosen in zu kurzen Abständen zu vermeiden.

Bei den Tieren der $G\alpha_qG_{11}$ -Studie, die einer Aortenkonstriktion unterzogen wurden, lag der erste Untersuchungszeitpunkt in der 30. Lebenswoche und der zweite in der 32. Lebenswoche. Die Echokardiographie der Tiere zur Untersuchung der Funktion der $Ca_v\beta_2$ - Untereinheit fand einmalig statt, im Alter zwischen 14 und 25 Lebenswochen.

Auswertung der echokardiographischen Untersuchung

Hierzu stand die Software von Vevo® (FUJIFILM Visualsonics, Toronto, Kanada) zur Verfügung. Aus den erhobenen berechnete die Software die entsprechenden morphologischen und funktionellen Parameter. Diese Parameter und ihre Berechnung sind im Folgenden aufgeführt. Anhand der M-Mode-Aufnahmen von langer und kurzer Herzachse konnte die Dicke von IVS, LVPW und LVAW, sowie der Durchmesser des Ventrikels, LVID, jeweils in Systole und Diastole gemessen werden. Es wurden jeweils drei Messungen wiederholt, danach wurde der Mittelwert aus den Einzelmessungen bestimmt. Zudem berechnete die Software das endsystolische und enddiastolische Volumen des linken Ventrikels:

$$LVVold = \frac{7}{2,4 \cdot LVIDd} \cdot LVIDd^3$$

$$LVVols = \frac{7}{2,4 \cdot LVIDs} \cdot LVIDs^3$$

Des Weiteren wurde die Auswurffraktion des Blutvolumens (auch bezeichnet als Ejektionsfraktion, EF) und die Verkürzungsfraction des linken Ventrikels (englische Fachbezeichnung ist Fractional Shortening, FS) von dem Auswertungsprogramm berechnet:

$$EF = 100 \cdot \frac{LVVold - LVVols}{LVVold}$$

$$FS = 100 \cdot \frac{LVIDd - LVIDs}{LVIDd}$$

Es ist leicht erkennbar, dass sich EF und FS immer proportional zueinander entwickelten, da die ventrikulären Volumina, aus denen die EF bestimmt wurde, wiederum aus den internen Ventrikeldurchmessern errechnet wurden, aus denen sich auch FS ableitet.

Aus diesen Messgrößen wurde ebenfalls die linksventrikuläre Masse berechnet, die schlussendlich noch auf das Körpergewicht der Maus normiert wurde.

Das so gewonnene relative Gewicht des linken Ventrikels diente beispielsweise als ein Indiz zur Erkennung einer möglichen Hypertrophie.

$$LVmass = 1,053 \cdot ((LVIDd + LVPWd + IVSd)^3 - LVID^3)$$

Mit Hilfe der PW-Doppler-Aufnahmen des Blutflusses wurde die diastolische Funktion des linken Ventrikels analysiert. Das zeitliche Profil der Blutflussgeschwindigkeit im Mitralklappen-

einstrom ergab sich dabei folgendermaßen: Der Bluteinstrom begann nach der isovolumetrischen Entspannungszeit (Isovolumetric Relaxation Time, IVRT) mit der frühen Füllungsphase, gekennzeichnet durch die frühe Einstromwelle, Early Filling Wave (E-Wave), die durch die Sogwirkung des relaxierenden Ventrikels entstand. Die E-Welle wurde gefolgt von einer zweiten Welle, die durch die Kontraktion der Vorhöfe entsteht, die Atrial Filling Wave (A-Wave). Die Spitzengeschwindigkeiten dieser beiden Füllungswellen wurden gemessen, ebenso die IVRT. Aus diesen Werten ließ sich noch das Verhältnis der E- zur A-Welle bestimmen. Dieser beschrieb im Kontext der anderen Messwerte die dilatativen Eigenschaften des Ventrikels. Zudem konnte die Abnahmegeschwindigkeit der E-Welle gemessen werden, die sogenannte „Deceleration“ (decel) und die dazu benötigte Zeit, die Deceleration Time (decel time). Diese beiden Verzögerungswerte fanden bei der Auswertung der PKC α -Tiere besondere Beachtung.

Aus der Betrachtung aller Messwerte konnte dann beurteilt werden, ob ein pathologischer kardialer Phänotyp vorlag, und inwieweit dies schon zu einer möglicherweise dekompensierten Beeinträchtigung der Herzarbeit geführt hatte. Beispielsweise indiziert eine erhöhte Wanddicke und Zunahme des relativen Herzgewichtes grundsätzlich eine Hypertrophie. Sinken zudem EF und FS im Verhältnis zum Kontrollwert (beispielsweise der Messung vor Aortenkonstriktion) und steigt der Quotient aus E- und A-Welle bei deutlich geringerer A-Welle, so sprach dies für eine beginnende Dekompensation der Belastung. Stieg schließlich auch das intraventrikuläre Volumen, zunächst in der Diastole, später in der Systole, und erhöhte sich außerdem die Herzfrequenz, waren dies Indikatoren deutlicher Dekompensation der Überbelastung und baldigen Herzversagens.

Generell kann die Atmung des Tieres zu Fehlern in den Messwerten führen. Daher musste anhand der aufgezeichneten Atmungskurve im Schallbild jeweils ein Messzeitpunkt gewählt werden, zu dem das Tier gerade nicht einatmete. Weiterhin war darauf zu achten, die Messung erst bei stabiler Narkose zu beginnen.

3.9 Operative Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion

Das Prinzip der Nachlasterhöhung

Durch eine experimentelle Verengung der peripheren Zirkulation wurde im Tiermodell die Nachlast des linken Ventrikels erhöht. Eine erhöhte Nachlast entsteht im Menschen durch eine Erhöhung des peripheren Widerstandes. Dies ist der Fall bei peripheren Verschlusskrankheiten sowie bei einer erhöhten Restriktivität des Gefäßsystems, beispielsweise infolge chronisch

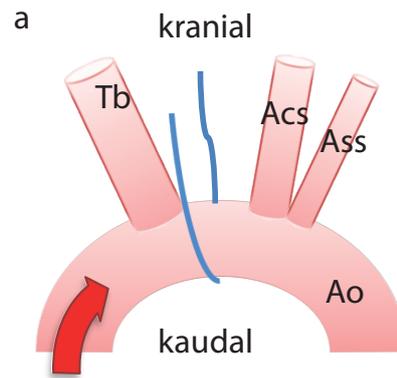


Abbildung 11: Schema der Aortenkonstriktion: Die Abbildung zeigt schematisch die Positionierung der Ligatur am Aortenbogen (**Ao**); mit „kranial“ und „kaudal“ ist die Orientierung im Tier angegeben, mit dem roten Pfeil die Richtung des Blutflusses dargestellt, am Fuße des Pfeiles befände sich das Herz des Tieres. (**Tb**) ist der Truncus brachiocephalicus, (**Acs**) die Arteria carotis communis sinistra, (**Ass**) die Arteria subclavia sinistra. In blau ist das für die Konstriktion verwendete Nahtmaterial skizziert.

erhöhten Blutdrucks. Da die erhöhte linksventrikuläre Nachlast eine häufige Ursache für chronische linksventrikuläre Hypertrophie ist, wurde das im Folgenden beschriebene Tiermodell der Aortenkonstriktion bereits in vielen Studien zur Erforschung der assoziierten Pathologien und ihrer Behandlungsmethoden genutzt [105, 106, 46, 11].

Üblicherweise wird im Tiermodell eine Konstriktion der Aorta transversa durchgeführt; daher lautet die internationale Bezeichnung auch „transverse aortic constriction“, oder kurz TAC. Dazu erfolgte auch in den hier verwendeten Mäusen eine teilweise Ligatur der Aorta (**Ao**) zwischen den ersten beiden Arterienabgängen, dem Truncus brachiocephalicus (**Tb**) und der linken Arteria carotis communis (**Acs**), neben der direkt noch die Arteria subclavia sinistra (**Ass**) abzweigt, siehe Abbildung 11. Der rote Pfeil zeigt die Blutflussrichtung des aus dem Herzen ausgeworfenen arteriellen Blutes. Der blaue Faden skizziert die für die Ligatur verwendete Naht an der korrekten Position. Die Ligatur reduzierte den Durchmesser dort auf ein festgelegtes Maß, damit folglich die Menge an Blut, die je Herzschlag durch diese Engstelle fließen konnte. Das wiederum musste eine Angleichung der Auswurfleistung an den verminderten Durchfluss nach sich ziehen, was zunächst durch eine Erhöhung der Auswurfleistung mittels Frequenzerhöhung und Kontraktilität geleistet wurde; mittel- und langfristig konnte dies aber nur durch eine Anpassung des Myokards durch Hypertrophie gelingen.

Die in unserer Studie für die TAC-Operation genutzte Methode orientierte sich an Martin et al. [76], wurde jedoch noch weiter modifiziert. Ziel war es, die Belastung der Tiere durch die Operation und deren Nebeneffekte weitestgehend zu reduzieren. Dies diente nicht nur dem

Tierschutz, sondern sorgte auch für geringere Ausfallraten bei den Versuchstieren und für konsistentere Ergebnisse.

Bei der in dieser Arbeit modifizierten, weniger invasiven Methode nach Martin war insbesondere eine Intubation und künstliche Beatmung vermeidbar, was eine deutliche Verbesserung gegenüber dem klassischen thorakalen Zugang darstellte. Denn einerseits müsste für das Einführen des Tubus der Schluck- und Hustenreflex ausgeschaltet sein, was eine besonders tiefe Narkose gleich zu Beginn erfordern würde, was dann belastender für das Tier wäre. Andererseits besteht bei der Intubation immer das Risiko einer Fehlintubation, besonders bei derartigen kleinen Tieren. Würde dies nicht bemerkt, würde das Tier während der Operation ersticken.

Auf die Intubation konnte bei der hier genutzten Methode verzichtet werden, da der Zugang zum Operationsfeld genau median erfolgte, und damit zwischen den beiden Pleuralräumen lag, welche die Lungen enthalten. Anatomisch betrachtet, treffen sich die beiden Brustfellauskleidungen der Brusthöhle median und bilden dort das Mediastinum, das um das Herz den Herzbeutel formt. Infolge der geschilderten anatomischen Situation waren über diesen Zugang die mediastinalen Organe, wie eben das Herz und seine großen Gefäßzu- und -abgänge, von kranial außerhalb der Pleura erreichbar. Das größte Risiko einer Thoraxoperation, der Pneumothorax, war somit bei sorgfältiger Arbeitsweise von vorneherein vermeidbar. Die Beatmung bei den standardmäßig genutzten thorakalen Operationsfeldern dieses Modells zwischen zweiter und dritter Rippe wäre dagegen unumgänglich, da durch den Pneumothorax, der bei Öffnung der Brusthöhle zwangsläufig entstünde, der Druck innerhalb des Pleuralraumes sich schlagartig dem äußeren Luftdruck anpassen würde. Die Lunge, die normalerweise vom pleuralen Unterdruck in ihrer Ausdehnung gehalten wird, würde kollabieren. Eine freie, spontane Atmung allein durch das Heben und Senken des Thorax via Atmungsmuskulatur wäre dann unmöglich, die Lunge müsste passiv durch das Beatmungsgerät mit Luft geflutet werden. Zudem wäre beim thorakalen Zugang für eine TAC-Operation auch das Risiko vorhanden, dass ein Pneumothorax noch nach der erfolgten Operation entstehen könnte, falls die Operationswunde nicht sorgfältig geschlossen wurde oder bei Manipulation des Wundverschlusses durch das Tier selbst.

Das Vermeiden einer Intubation mit Beatmung wird zudem bei einem geübten Operateur auch Zeit sparen: Die reine Operationszeit wäre bei beiden Zugängen vergleichbar; die für eine Intubation notwendige Arbeitszeit dagegen würde bei der hier beschriebenen Methode entfallen.

Durchführung der TAC-Operation

Die für die Operation nötige Narkose mit Isofluran verlief generell gleich, wie bereits in Abschnitt 3.5 beschrieben. Auch die Augen wurden wieder mit Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Die Maus wurde mittels Oberkieferschlinge in der Narkosemaske befestigt und mittels Verbandsklebeband am gewärmten Operationstisch fixiert. Zur Entzündungs- und Schmerzhemmung wurden 7,5 mg/kg Carprofen (Rimadyl®), Zoetis, Florham Park, USA), sowie zur Prävention von Infektionen 10 mg/kg Enrofloxazin (Baytril®), Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland) subkutan injiziert. Zusätzlich wurde Butorphanol (Torbugesic®), Zoetis, Florham Park, USA) mit einer Dosierung von 2 mg/kg zur stärkeren Analgesie supplementiert. Dies war hier angezeigt, da die spätere Durchtrennung des Processus sterni als zumindest mittelgradig schmerzhaft Belastung anzusehen war.

Der chirurgische Zugang befand sich über und direkt kranial des Sternums, genau median. Es wurde mit Enthaarungscreme enthaart, sofern dies noch nicht ausreichend bei der vorab durchgeführten echokardiographischen Untersuchung erfolgt war. Die Haut wurde mit PVP-Iod-Lösung desinfiziert.

Die Eröffnung des Operationsfeldes erfolgte durch einen etwa 7 mm langen Hautschnitt in kraniokaudaler Richtung, genau median, direkt kranial des Processus sterni (siehe Abbildung 12a). Die Haut wurde dort stumpf vom Unterhautgewebe getrennt, durch Spreizung der Schere.

Nun wurde mittels stumpfer Präparation die Trachea dargestellt, die der weiteren Orientierung diene. Entlang der Trachea wurde nach kaudal vorsichtig ein stumpfer Scherenschenkel median unter das Sternum geführt, das dann um etwa 2 bis 3 mm eingeschnitten wurde. Mit der Knüpppinzette wurde dann in diesem Einschnitt das Sternum gespreizt und der Thymus zwischen seinen Schenkeln stumpf getrennt (Abbildung 12b). Darunter war der Aortenbogen mit seinen Abgängen sichtbar (Abbildung 12c). Dieses freie Sichtfeld auf die Ligaturstelle ist ein weiterer Vorteil dieser Operationsmethode; in der üblichen intercostalen Variante der Aortenkonstriktion bestünde kein direkter Einblick, zudem wäre das notwendige Operationsfenster deutlich kleiner.

Zwischen den ersten beiden Abgängen, dem Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis, soll der Faden für die Stenosierung platziert werden. Es handelt sich um einen nicht resorbierbaren, monofilen Faden der Stärke USP 6/0 (Serapren®), Serag-Wiessner, Naila, Deutschland). Dieser wurde durch eine zu einem J geformten, abgestumpften Injektionskanüle

der Größe 23G geführt, deren Konus abgesetzt wurde.

Diese Führungskanüle wurde dann vorsichtig von kranial aus unter die Aorta, dann dahinter wieder nach oben gebracht (Abbildung 12d). Die Nutzung dieser speziell präparierten Kanüle verminderte das stumpfe Trauma im Umfeld der Aorta auf ein minimal nötiges Maß, verglichen mit etwa der Nutzung einer Knüpfpinzette. Dennoch ermöglichte die Kanüle eine gleichzeitig sichere Führung des Fadens.

Das Fadenende wurde nun kaudal der Aorta festgehalten, dann die Führungskanüle wieder nach kranial reponiert. Der Faden lag nun an der Stelle der späteren Stenose unter der Aorta bereit. Danach wurde eine weitere abgestumpfte Kanüle genutzt, um den Durchmesser der Stenose zu standardisieren. Je nach Fragestellung werden üblicherweise 25-27 Gauge-Kanülen mit 0,4 - 0,5 mm Außendurchmesser verwendet; im abgebildeten Beispiel wurde eine 26G-Kanüle genutzt (Sterican®), B.Braun, Melsungen, Deutschland). Die Kanülen wurden zuvor am Ende auf etwa 1 mm bis 2 mm Länge L-förmig abgebogen, danach die Spitze wurde stumpf geschliffen. Direkt am Übergang zum Konus war die Kanüle wiederum im 90° -Winkel abgebogen. So konnte das untere Ende der L-Kanüle parallel auf dem Aortenbogen zu liegen kommen, gleichzeitig konnte der Konus auf dem linken Thorax aufliegen, was diese Kanüle in Position hielt.

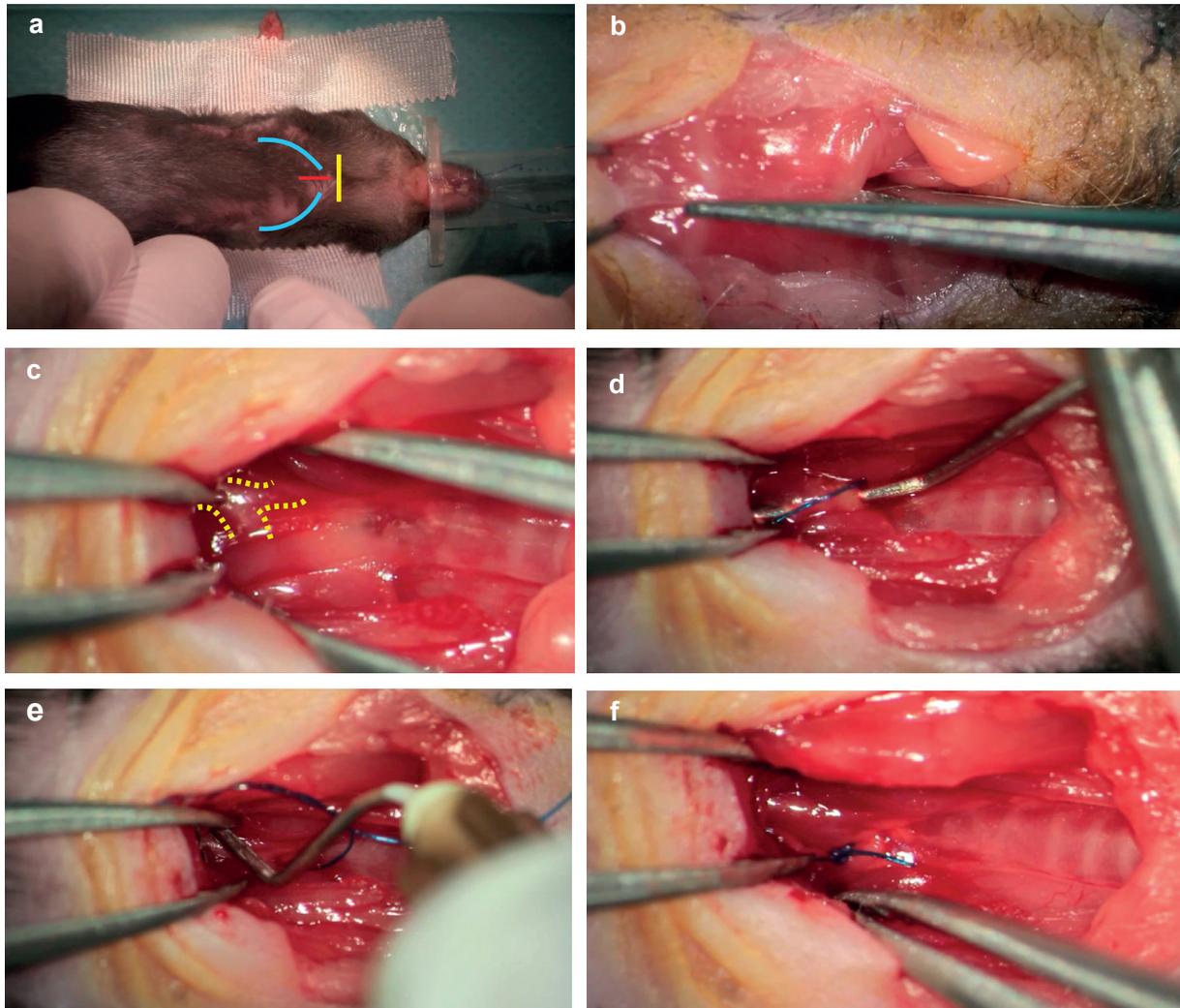


Abbildung 12: Aortenkonstriktion: Die Abbildung zeigt in Auszügen den Verlauf der Operation; in **a**: Narkotisierte Maus in der Vorbereitung der Operation, bereits mit Klebeband am Tisch fixiert, Nase in der Maske für die Inhalationsnarkose. In blau ist der kraniale Thorax skizziert, in gelb der Zugang zum Operationsfeld und in rot der Schnitt-Bereich des Sternums. In **b**: Schere mit dem stumpfen Ende von kranial in den Thorax eingeführt. Orientierung für die mediane Schnittführung ist kranial die Trachea, kaudal die Verbindungspunkte der Rippen am Sternum. In **c**: Der Thorax ist 2-3 mm weit eröffnet und der Thymus reponiert, der Aortenbogen und der Truncus brachiocephalicus sind gelb schraffiert. Das Sichtfeld wird mit zwei Knüppelpinzetten dargestellt, wie auch in **d-f**. In **d**: Führungskanüle unter Aortenbogen platziert, das blaue Fadenende etwas daraus vorgezogen. In **e**: Führungskanüle reponiert, die zweite Kanüle ist parallel auf dem Aortenbogen aufgelegt. Der Faden ist zu einem zweifach geschlungenen chirurgischen Knoten vorgelegt. In **f**: erfolgreiche Ligatur, die Einengung der Aorta durch den blauen Faden ist deutlich sichtbar. In dieser Situation kann in situ der vor der Ligatur abgehende Truncus brachiocephalicus als vermehrt gefüllt und pulsierend erkannt werden.

Um das Kanülen-Ende und Aorta wurde nun ein chirurgischer Knoten vorgelegt (siehe Abbildung 12e), vorsichtig zugezogen und mit einem zweiten Knoten fixiert. Die Kanüle wurde anschließend reponiert. Dies musste zügig geschehen, denn für die Zeit vom Zuziehen des ersten Knotens bis zur Reponierung der Kanüle, war der Blutfluss komplett unterbrochen. Die häufigste Ausfallursache war hier allerdings ein zu schnelles oder unvorsichtiges Herausziehen, wodurch die Aorta beschädigt wurde und das Tier verblutete. Präventiv konnte daher die Kanüle mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe gleitfähiger gemacht werden. Auch können in dieser Phase durch nur kleine Unachtsamkeiten leicht Blutungen anderen Ursprunges, oder Reizungen oder Dehnungen des Nervus vagus mit fatalem Ausgang geschehen. Besondere Sorgfalt ist gerade in diesem Moment der Operation geboten.

Die visuelle qualitative Kontrolle eines erfolgreichen Stenosierens (12f) konnte sofort anhand der beiden Halsarterien erfolgen, die im Zugangsbereich der Operation deutlich sichtbar waren: Während die Pulsation in der rechten A. carotis nach der Konstriktion deutlich verstärkt war, war sie in der linken A. carotis abgeschwächt. Nun konnte der Thorax verschlossen werden, hierzu wurde nicht resorbierbares, monofiles Nahtmaterial der Stärke 5/0 genutzt. Die Mm. pectorales profundi wurden mit einem Einzelheft an der Durchtrennungsstelle des Sternums wieder verbunden, dann wurde die Hautwunde mit zwei bis drei U-Heften verschlossen. Das Tier konnte unter Wärmezufuhr im Heimatkäfig erwachen. Bei gutem Verlauf der Operation und harmonischer Gruppenstruktur konnten die Tiere auch nach der Operation zu mehreren in einem Käfig gehalten werden. In den nächsten zwei Tagen wurde postoperativ ebenfalls Carprofen und Enrofloxacin in der oben genannten Dosierung subkutan injiziert. Die Operationswunde und das Allgemeinbefinden des Tieres wurden täglich genau kontrolliert. Starke Gewichtsabnahmen, schlechtes Allgemeinbefinden sowie offensichtliche Infektion der Operationswunde waren unmittelbare Abbruchkriterien, das Tier wurde in einem solche Fall unverzüglich schmerzlos getötet. Hierzu wurde im Kontext unserer Experimente ein sogenanntes „Score Sheet“ entwickelt, ein Belastungsbewertungsbogen. Er ist in Abbildung 13 aufgeführt. Der Bogen ermöglichte es jeder Person, die die Tiere betreute, anhand fester Kriterien den Zustand des Tieres zu bewerten und die entsprechenden tierschutzgerechten Maßnahmen unverzüglich zu ergreifen.

Die Operation der Tiere der $G\alpha_qG_{11}$ -Studie erfolgten grundsätzlich gleich, wie oben beschrieben. Die weiteren zellbasierten Versuche dieses Projektes wurden in der 32. Lebenswoche

Score	0	1	2	3
Wunde	Trocken, geschlossen	Schwellung	geringgradig Exsudat (serös/eitrig), deutliche Schwellung	Wunde offen, großflächige Nekrose
Allgemeinbefinden	unauffällig	Struppiges Fell, Augen in Ruhe geschlossen	Bewegungen langsam, kalte Gliedermaßen, erschwerete Atmung	Apathie, keine freiwillige Bewegung, stark erschwerete Atmung, Seitenlage
Gewichtsverlust	0%	Bis 10%	10-20%	Mehr als 20%
Bewertung: Ein Kriterium Score 3, oder zweimal 2: sofortiger Abbruch Ein Kriterium Score 2, oder zweimal 1: Tier vereinzeln, Wärmezufuhr, ggf. antibiotische/antiinflammatorische Behandlung; erneute Beobachtung nach 2h. Abbruch, wenn keine Verbesserung. Ein Kriterium Score 1: Erneute Beobachtung nach 2h, Tier ggf. vereinzeln.				

Abbildung 13: Score Sheet: Belastungsbewertungsbogen für die Beurteilung der Mäuse nach TAC-Operation. Dieser Bogen kann allen mit der Betreuung der Tiere verbundenen Personen zur Verfügung gestellt werden, sodass eine selbstständige Beurteilung der Tiere und eine adäquate Reaktion zu jeder Zeit möglich ist. Die entsprechende Reaktion kann in der Karteikarte des Tieres im Verwaltungsprogramm unter Verweis auf den „Score“ (Belastungswert) eindeutig dokumentiert werden.

durchgeführt. Da dieser Endpunkt des Versuches beibehalten werden sollte, und zudem aus Gründen der Vergleichbarkeit eine Dauer der Nachlasterhöhung von zwei Wochen beibehalten werden sollte, ergab sich ein Operationszeitpunkt zu Beginn der 30. Lebenswoche dieser Tiere. Während der echokardiographischen Untersuchung, die zum Ende der Studie erfolgte, konnte die korrekte Positionierung der Ligatur im Tier überprüft werden. Der Strahlengang weist dabei von rechts-kranial vor dem Processus sterni, was im Bild dem oberen Bildende entspricht, nach links kaudal, unten im Bild, gleichzeitig annähernd parallel zur Thoraxoberfläche der Maus. In **Abbildung 14 a** ist das unbearbeitete Bild zu sehen, in dem der dunkle, da blutgefüllte, Aortenbogen mit seinen helleren Wänden gut zu erkennen ist. Zum besseren Verständnis ist in **Abbildung 14 b** in der gleichen Aufnahme der Verlauf der Aorta (**Ao**) mit den zwei in dieser Position erkennbaren, auch schon in der Skizze gezeichneten Abgängen **Tb** und **Acs** eingezeichnet. Der Abgang der **Ass** ist bei dem Verlauf des Strahlenganges in dieser Aufnahme nicht zu sehen. Der rote Pfeil markiert wieder den Blutfluss; durch die Position des Schallkopfes ist der Verlauf hier im Verhältnis zur anatomischen Situation bei Thorakotomie gespiegelt.

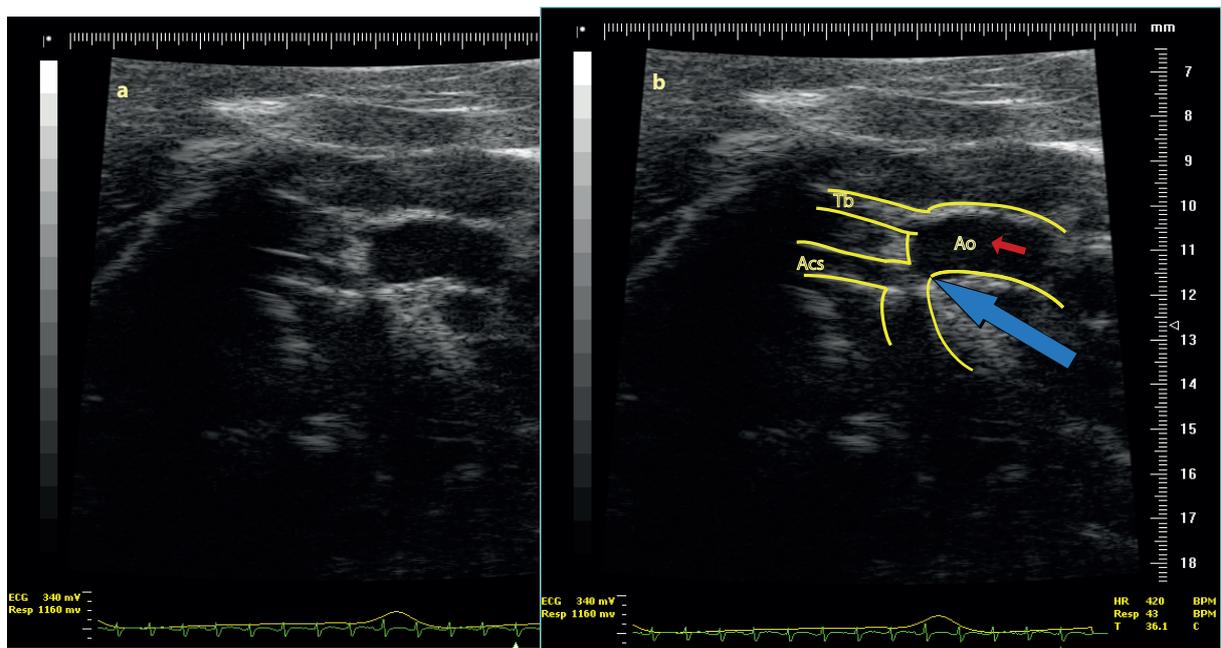


Abbildung 14: Echokardiographische Kontrolle der Stenosierung nach TAC: Zu sehen ist eine echokardiographische Aufnahme des Aortenbogens. Der Schallgang verläuft von rechts kranial des Sternums (hier oben im Bild) nach links kaudal (hier unten), damit annähernd parallel zur Thoraxoberfläche der Maus. **a** zeigt die unbearbeitete Aufnahme, in **b** ist in gelb der Gefäßverlauf nachgezeichnet (**Ao**: Aorta, **Tb**: Truncus brachiocephalicus, **Acs**: Arteria carotis communis sinistra). Der rote Pfeil zeigt die Richtung des Blutflusses, der blaue Pfeil weist auf die Einengung durch die Ligatur.

Der blaue Pfeil weist auf die sichtbare Einengung des Aortenbogens durch die Ligatur. Der Aortenbogen vor der Ligaturstelle war dabei erkennbar dilatiert.

Diese Untersuchung diente dabei der Verifizierung der korrekt positionierten Ligatur bei Bedarf, wie etwa nicht eindeutig sichtbarer Hypertrophie während der Echokardiographie. Die Ergebnisse hieraus wurden nicht speziell quantifiziert.

3.10 Isolation und Kultivierung muriner Kardiomyozyten

Die Maus wurde zunächst durch intraperitoneale Injektion mit 85 mg/kg Ketaminhydrochlorid und 15 mg/kg Xylazin tief sediert, wie schon in 3.6 beschrieben. Im Verlauf des Projektes wurde hierfür eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (s. Abschnitt 3.5) etabliert. War bei dem Tier das Schmerzempfinden erloschen, sieht man keinen Rückziehreflex nach Zehenkneifprobe mehr. Dann wurde Citratlösung intraperitoneal injiziert, daraufhin das Tier auf einer saugfähigen Unterlage fixiert. Die Haut wurde kaudal des letzten Rippenbogens auf mehreren Zentimetern eingeschnitten und nach kranial abgezogen. Das Tier wurde daraufhin durch Dekapitation getötet, dann der Thorax großflächig eröffnet. Das Herz wurde durch Injektion eiskalter Lösung A in beide Ventrikel von Blutresten freigespült, dann vorsichtig aus dem

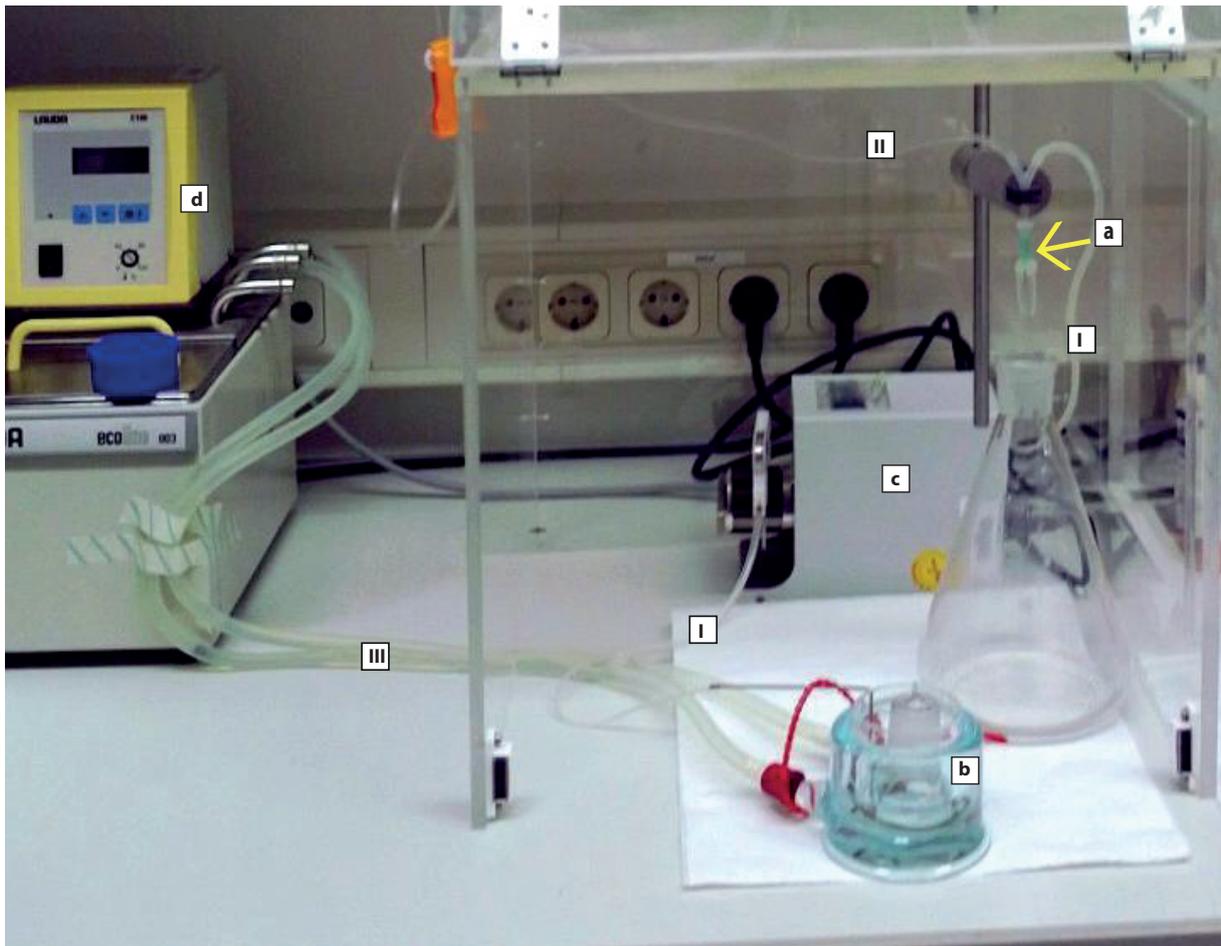


Abbildung 15: Aufbau Langendorff-Perfusion zur Zellisolation: a bezeichnet die abgestumpfte Kanüle, an der das Herz mit der Aorta flüssigkeitsdicht angebunden wird. Das Herz hängt dann vor dem weißlich-transparenten Schutz unter dem grünen Konus frei. Der von links oben kommende Schlauch II führt neue, unbegaste Lösung zu. Die begaste, gewärmte Zirkulationslösung befindet sich in der Glasschale b, sie wird über den schmalen Schlauch I und die Pumpe c zum Herzen transportiert. Wird das Auffanggefäß unter der Herzaufhängung gegen die Glasschale b getauscht, ist so ein Kreislauf geschaffen. d ist ein Wärmebad mit Pumpe, die in den Schläuchen II 37° warmes Wasser in die Glasschale b pumpt, um damit die darin enthaltene Zirkulationslösung zu wärmen. Die Begasung mit O₂ wird mittels eines Schlauches mit Injektionskanülen-Spitze, bei Bedarf in die Glasschale b eingebracht.

umgebenden Gewebe gelöst. Danach wurde die Aorta nahe vor dem ersten Abgang aus dem Aortenbogen durchtrennt und das Herz entnommen.

Die Aorta wurde dann in eiskalter Lösung A auf eine stumpfe Perfusionskanüle aufgezogen und mit Seidenfaden der Stärke 6/0 USP an der Kanüle fixiert. Diese Kanüle konnte dann an einer Apparatur zur retrograden Perfusion angeschlossen werden, dargestellt in Abbildung 15. Das zu perfundierende Herz wurde dazu an der Kanüle (Abbildung 15a) an die Perfusion angesteckt. Dabei wurde die kontinuierliche Flüssigkeitszufuhr durch eine Pumpe (Abbildung 15c) gewährleistet, die jeweilige Perfusionslösung in einem Wasserbad (Abbildung 15d)

auf Körpertemperatur erwärmt. Die vom Herzen tropfende Flüssigkeit wurde mit der Schale (Abbildung15b) aufgefangen und der Zirkulation wieder zugeführt.

Das Herz wurde in diesem Aufbau für etwa fünf bis sieben Minuten mit körperwarmer Lösung A perfundiert. Dabei war unbedingt darauf zu achten, dass sich keine Lufteinschlüsse im System befanden. Dann wurde der enzymatische Verdau des Herzens eingeleitet. Dafür wurden 1,25 mg Liberase in 12 ml Lösung A zuerst mit Sauerstoff begast, dann zur Perfusion zugegeben. Die Anreicherung mit Sauerstoff war sehr wichtig für ein gutes Ergebnis der späteren Einzelzellmessungen.

Die Perfusion mit Liberase wurde für sechs bis zwölf Minuten in einem Kreislaufsystem durchgeführt. Mit einer Pinzettenspitze wurde geprüft, ob das Gewebe leicht zu durchdringen war, was zusammen mit einer Aufhellung der Farbe des Herzens für einen ausreichend guten Verdau sprach. War dies erreicht, wurde das Herz von der Perfusionskanüle abgenommen. Dann wurde das Organ in eine Petrischale mit Lösung A überführt, in mehrere Stücke zerteilt, und dann für zweimal fünf Minuten in mit Sauerstoff begaster Lösung A++ bei 37 °C im Wasserbad unter Schütteln gewaschen. Daraufhin wurden die Herzstücke mit einer an der Spitze abgeschnittenen Plastik-Pasteur-Pipette mehrfach auf- und abpipettiert, um vorsichtig die Zellen mechanisch aus dem Zellverbund zu lösen. Die Zellsuspension musste anschließend etwa 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur ruhen. Danach wurde die Suspension in ein 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 12 ml des Zellkultur-Mediums zugegeben, mit der Zellsuspension durch Schwenken gemischt, und danach gleichmäßig auf eine 12-well-Zellkulturplatte mit den beschichteten Deckgläsern verteilt. Die Zellen konnten für eine halbe Stunde im Inkubator an der Beschichtung der Deckgläser adhären. Zuletzt erfolgte ein Austausch des Mediums, um bereits tote, in der Lösung frei schwimmende Zellen zu entfernen.

3.11 Konfokalmikroskopische Untersuchung muriner Kardiomyozyten

Erstellung konfokalmikroskopischer Aufnahmen von Herzzellen

Für die Plasmamembranfärbung zur Darstellung der T-Tubulären Struktur wurde Cell Mask™ Deep Red (Life Technologies Limited, Paisley, Schottland) als 0,05 % Lösung in Tyrode genutzt. Zur Färbung wurde das runde Deckgläschen mit den adhärenierten Zellen in eine Halterung eingebracht, mit 1 ml der Färbelösung überschichtet und für fünf Minuten unter Lichtschutz

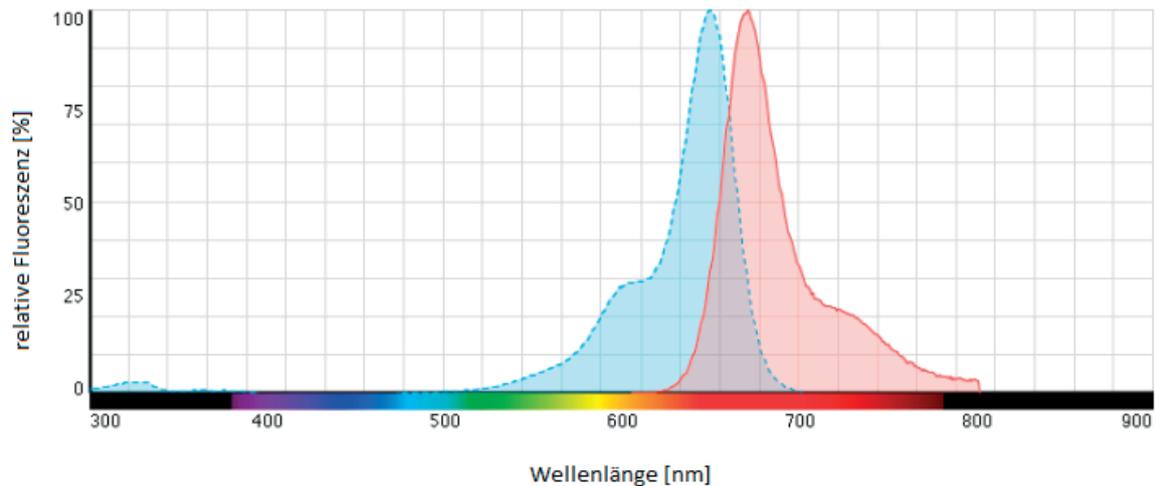


Abbildung 16: Spektrum Cell Mask™ Deep Red: Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz in % gegen die Wellenlänge des Lichtes. Das Maximum der Anregungswellenlänge liegt bei 650 nm, das des emittierten Lichtes bei 670 nm.

Quelle: <https://www.thermofisher.com> (mit freundlicher Genehmigung)

inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung durch dreimalige vorsichtige Spülung mit Tyrode ausgewaschen, dann wieder 1 ml Tyrode auf die Zellen aufgebracht, worin die Zellen während der Untersuchung lebensfähig blieben.

Bei der Konfokalmikroskopie rastert ein punktförmiger Lichtstrahl mit hoher Geschwindigkeit das Präparat in zwei Dimensionen ab. So regt der Laser zu einem Zeitpunkt nur Fluoreszenz in dem kleinen Einwirkungsbereich des Lasersstrahles an, der größte Teil der Probe ist also im gleichen Moment unbeleuchtet. Das ist wichtig, da durch die Einwirkung des Laserstrahles, der viel Energie auf kleiner Fläche bündelt, schnell phototoxische Effekte entstehen können, welche die Probe möglicherweise schädigen können. Dies ist insbesondere für lebende Zellen bedeutsam. Eine Lochblende sorgt dafür, dass nur emittiertes Licht aus der Fokusebene zum Detektor durchgelassen wird.

In dieser Arbeit wurde das Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TCS SP5 von Leica Microsystems, Wetzlar, genutzt. Das Anregungs- und Emissionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ist in Abbildung 16 dargestellt. Die maximale Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cell Mask™ Deep Red liegt bei 650 nm, die Anregung erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei 633 nm. Das Spektrum des emittierten Lichtes hat ein Maximum von 670 nm. Die Trennung von Anregungs- und Emissionswellenlänge erfolgte mit Hilfe eines akustisch-optischen Strahlenteilers (acousto optical beam splitter, AOBs). Mit Hilfe des im TCS SP5 verbauten spektralen

Detektors konnte der Wellenlängenbereich des emittierten Lichtes, das gemessen werden sollte, Nanometer-genau gewählt werden. Für die Analyse der Membranfärbung mit Cell Mask™ Deep Red wurde daher ein Wellenlängenbereich von 665-685 nm gewählt.

Das gesamte Mikroskop wird über die Leica-Anwendungssoftware (Leica Application Suite, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) gesteuert. Für die Bildgebung wurde ein 63x Öl-Immersionsobjektiv (Leica HXC PL APO 63x Oil, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Leica Software erlaubte eine Drehung des Abtastvorganges, eine zusätzliche Nachvergrößerung (0,7x-1,7x) sowie eine fein abgestufte Regulierung der Anregungsintensität.

Es wurden je Präparation randomisiert 30 bis 40 vitale Zellen analysiert. Dabei wurde die Fokusebene zunächst anhand des Durchlichtbildes voreingestellt, sodass nach Einschalten des Lasers nur noch kleinere Korrekturen der Fokusebene nötig waren. Es wurde eine Horizontalebene in der Mitte der Zelle ausgewählt. Die Laserbeleuchtung einer Zelle dauerte dabei nur wenige Sekunden. Sich gegenseitig überlagernde Zellen konnten in der Regel nicht in die Messung einbezogen werden, da ihre Fokusebene nicht parallel zu der Ebene lag, die der Laser abtastete. Ebenfalls nicht einbezogen wurden Zellen, die Indizien für baldige Degradation aufwiesen. Dazu zählten Erscheinungen wie vermehrte blasenartige Strukturen im Inneren oder eine insgesamt gekrümmte Form. Die letztendlich gemessenen Zellen dagegen wurden anhand einer intakten, geraden, regelmäßigen, klar abgegrenzten Zellmembran ausgewählt sowie der für Kardiomyozyten typischen, eher „eckigen“ äußeren Form.

Es war dabei immer darauf zu achten, die Färbezeiten und Einstellungen der Software, wie etwa Anregungsstärke und späteren Verstärkungsgrad des Fluoreszenzlichtes bei allen Messungen möglichst gleich zu halten.

Da auch Unterschiede zwischen den Tieren oder im Isolationsprozess das Ergebnis hätten beeinflussen können, gingen mindestens fünf Tiere je Gruppe mit jeweils mindestens 30 Zellen in die Messung ein. Ebenfalls wurde nach Möglichkeit darauf geachtet, Tiere verschiedener Versuchsgruppen alternierend zu analysieren.

Auswertung der konfokalmikroskopischen Bilder

Zunächst wurden alle Bilder einer Messung mit dem Programm „ImageJ“ [113] geöffnet. Es wurden alle für eine Auswertung verwertbaren Bilder ausgewählt und in einer speziell dafür von Dr. Qinghai Tian geschriebenen MatLab-Programmierung geöffnet. Eindeutig über- oder

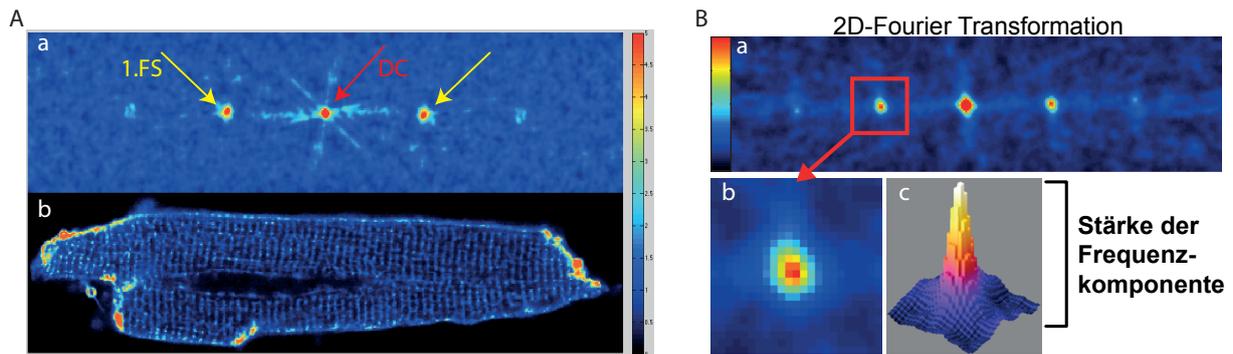


Abbildung 17: Auswertung konfokalmikroskopischer Bilder: **Ab:** konfokalmikroskopisch aufgenommenen Herzzelle, Wärmewerte der Darstellung nach Signalintensität der Fluoreszenz (rot = stärkere Intensität). **Aa:** Darstellung der Frequenzdomänen aus **Ab**, mittels FFT in MatLab erstellt. Blau = Hintergrundrauschen. Mit dem roten Pfeil ist der „direct current“ (DC) gekennzeichnet, der die Summe der Intensitätswerte aller Pixel des Bildes darstellt. Mit dem gelben Pfeil markiert ist die erste Signalspitze der mittels FFT transformierten Frequenzkomponenten (1.FS) aus **Ab**, die weiter nach außen folgenden Punkte sind die harmonischen Schwingungen der ersten Signalspitze **B:** Schema zur näheren Erläuterung eines Frequenzdomänen-Bildes (**Ba**). Der Wärme-Farbwert des hervorgehobenen Signalpunktes in **Bb** entspricht der in **Bc** auf der Y-Achse dargestellten Stärke der Frequenzkomponente. (Bild zur Verfügung gestellt von Dr. Qinghai Tian)

unterbelichtete Aufnahmen dagegen wurden ausgeschlossen, wie auch Zellen, deren Erscheinungsbild bei Betrachtung auf einen baldigen Zelltod hindeutete, erkennbar an Krümmung, Blasenbildung und Abrundung.

In der folgenden Analyse der einzelnen Bilder mit der speziell dafür geschriebenen Anwendung der Software MatLab wurde durch Markierung eines Bildbereiches von Interesse („Region of interest“, ROI) sichergestellt, dass die Auswertung auf die relevanten Bereiche der einzelnen Zelle beschränkt wurde. Dazu wurden Zellanteile, die sich nicht genau im Fokus befanden, oder die nicht eindeutig derselben, oder einer möglicherweise darunter oder darüber liegenden Zelle zuzuordnen waren, nicht mit einbezogen. Es wurde dabei darauf geachtet, offensichtliche Artefaktbereiche, die durch leichte Überbelichtung entstanden oder Detritus, der am Zellrand anhaftet, aus der ROI ausschließen, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Dazu wurde, unter Anwendung der oben genannten Kriterien, eine möglichst große Region der Zelle in der MatLab-Programmierung markiert.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels einer MatLab-Programmierung, die eine Form der Fourier-Transformation („fast Fourier transformation“, FFT) nutzt, um die Regelmäßigkeit der fluoreszierenden T-Tubuli zu bestimmen. Dabei wird das Fluoreszenzbild in seine Raumfrequenzen zerlegt. Die Stärke der Raumfrequenzen ist einheitenlos; je höher der Betrag einer bestimmten Raumfrequenz ist, desto größer dieser Wert. Abbildung **17Ab** zeigt eine zwei-

dimensionale Darstellung der konfokalmikroskopisch aufgenommenen Herzzelle. Je roter die Farbe, desto stärker war die Intensität der Fluoreszenz an dieser Stelle der Zelle.

In Abbildung **17Aa** ist die mittels FFT erstellte Darstellung der Raumfrequenzkomponenten aus dem unteren fluoreszenzmikroskopischen Bild, **17Ab** gezeigt. Der mittlere Punkt hoher Signalstärke ist der Mittelwert der Signalstärke aller Pixel des Bildes der Zelle, damit aller Intensitäten, der so genannte „direct current“ (DC). Die beiden spiegelbildlichen Punkte rechts und links des DC, in der Abbildung gekennzeichnet durch einen gelben Pfeil, sind die erste Signalspitze der Frequenzkomponenten des unteren 2D-Bildes, die weiter nach außen folgenden Punkte entsprechen den harmonischen Schwingungen höheren Grades der ersten Signalspitze. Der Abstand der ersten Frequenzspitze von der DC beträgt $0,5 \mu\text{m}^{-1}$, was dem Kehrwert von $2 \mu\text{m}$ entspricht, der Sarkomerlänge in Ruhe, folglich also dem erwarteten räumlichen Abstand zwischen den regelmäßig angeordneten T-Tubuli in gesunden Herzmuskelzellen.

Zur Auswertung wurde möglichst das Zentrum der ersten Frequenzspitze markiert, woraufhin die Berechnung der Regelmäßigkeit durch den Algorithmus der Software erfolgte. Der Wert der Regelmäßigkeit ist einheitenlos und wurde durch das Programm bereits auf das Hintergrundrauschen normiert. Aus diesen Werten erfolgte die statistische Analyse.

Abbildung **17B** dient der Verdeutlichung des Prinzips der Auswertung. Die erste Signalspitze ist in einer dreidimensionalen (3D) -Oberflächendarstellung wiedergegeben. Die Wärme-Farbwertwerte in der 2D-Darstellung in Abbildung **17Bb** entsprechen den in Abbildung **17Bc** auf der Y-Achse dargestellten Signalstärken der Frequenzkomponenten.

Die Programmierung der MatLab-Funktion, sowie das Schema in Abbildung **17B** wurde freundlicherweise von Dr. Qinghai Tian zur Verfügung gestellt.

3.12 *in vivo*-Applikation von Aldosteron: Osmotische Minipumpen

Diese Studie wurde an Tieren des $G\alpha_qG_{11}$ -Projektes durchgeführt. Zur chronischen Applikation von Aldosteron (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden osmotische Minipumpen (ALZET osmotic mini pumps®, Typ 2006, Durect Corporation, CA-Cupertino, USA) genutzt. Wie in der Abbildung **18** skizziert, funktioniert die Pumpe durch kontinuierlich zunehmenden osmotischen Druck. Die Gewebsflüssigkeit aus der Umgebung der Pumpe konnte durch die semipermeable äußere Membran in die osmotische Schicht eindringen, aber nicht mehr hinaus. Dabei folgte das Gewebswasser einem osmotischen Gradienten, der von der

Zusammensetzung der osmotischen Schicht der Pumpe erzeugt wurde. Diese Schicht wiederum baute durch die kontinuierliche Flüssigkeitseinlagerung einen zunehmenden Druck auf das Substanzreservoir im Inneren der Pumpe auf, das wiederum von einer impermeablen Schicht umgeben war. Die substanzhaltige Flüssigkeit (blau) im Inneren konnte also nur durch die Auslassöffnung des Fluss-Moderators (schwarz) entweichen. Dieser lag in Form eines langen dünnen Metallröhrchens im gesamten Reservoir, so konnte er auch kleine Substanzreste zum Ende der Perfusionszeit noch vollständig erfassen. Die Auslassöffnung und der Flussmoderator waren dabei in die Kappe der Pumpe (weiß) integriert, die erst nach Befüllung des Reservoirs mit der Substanz eingesetzt wurde. Die Befüllung erfolgte mit einem speziellen Spritzen-Kanülen-System, das im Lieferumfang der Pumpensysteme enthalten ist.

Die in dieser Studie genutzten osmotischen Minipumpen „Typ 2006“ gaben über sechs Wochen kontinuierlich 0,15 µl/h der Lösung aus ihrem Reservoir ab, dies entsprach einer täglichen Dosis von 360 mg/kg Aldosteron. Die Pumpen wurden mit 200 µl einer Aldosteron-Lösung (2 mg/ml) befüllt. Nach Verschluss mussten sie noch für vier Stunden in körperwarmer 0,9 % NaCl-Lösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) aufbewahrt werden („Priming“), bevor die Implantation erfolgen konnte. Die Pumpen hatten eine Länge von 3 cm und einen Durchmesser von 0,7 cm, sie wogen 1,1 g. Die Mäuse, denen eine Pumpe implantiert werden sollte, mussten mindestens ein Körpergewicht von 20 g aufweisen. Narkose und präoperative Medikation erfolgten, wie schon zuvor beschrieben.

Durchführung der Implantation:

Die Maus wurde bei dieser Operation in Brust-Bauch-Lage vor der Narkosemaske fixiert, im Nacken rasiert und die Haut desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte latero-lateral im Nacken, über etwa 1,5 cm Länge. Durch Spreizen einer Schere mit stumpfen Schenkeln wurde die Haut nach kaudolateral in Richtung der rechten Flanke vom Unterhautgewebe gelöst. In die so entstandene subkutane Tasche wurden 1,5 ml körperwarmer 0,9% Natriumchlorid-Lösung eingebracht, um das Verschieben der Pumpe zu erleichtern und ein Verkleben der Pumpenöffnung im Zuge des Heilungsprozesses möglichst zu vermeiden. Dann wurde die Minipumpe in die Tasche eingebracht und bis an die Flanke vorgeschoben. Die Öffnung der Pumpe sollte dabei zuerst eingeführt werden, damit diese nicht in die Nähe der heilenden Wunde gerät, ebenfalls, um ein Verkleben möglichst zu vermeiden. Danach wurde die Hautwunde mit zwei bis drei U-Heften verschlossen und die Maus konnte unter Wärmezufuhr erwachen. Die postoperative Medikation

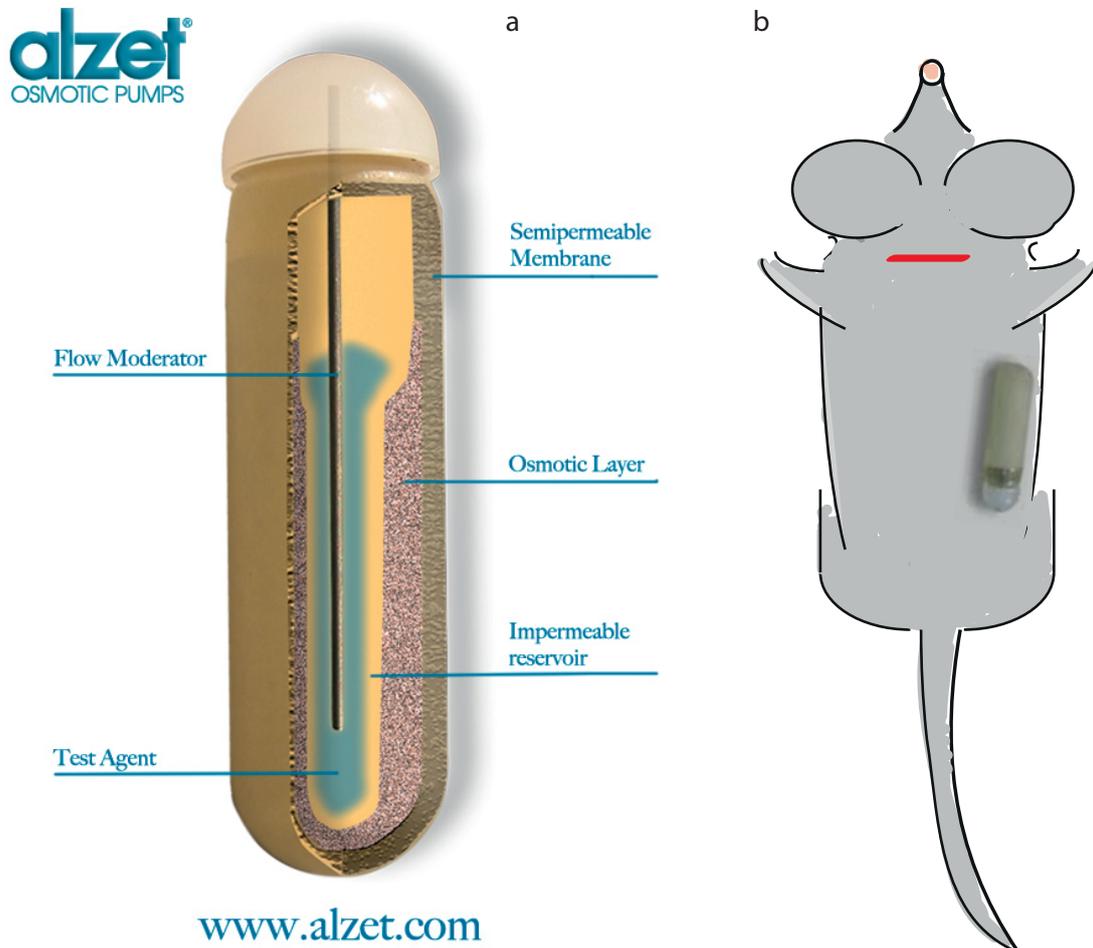


Abbildung 18: Osmotische Minipumpe: a zeigt den Aufbau der Pumpe im Schema; in blau ist die Flüssigkeit im Reservoir dargestellt, in gelb das Reservoir, das wiederum von einer Osmoseschicht umgeben ist. Umhüllt wird der Körper der Pumpe von einer semipermeablen Membran. Im Reservoir ist ein Auslass (grau) für den Wirkstoff eingelassen, in cremeweiß ist oben die Kappe mit der Auslassöffnung dargestellt. Mit der Zeit im Tierkörper dringt freies Wasser durch die äußere Membran in die osmotische Schicht ein, kann aber nicht mehr heraus. Dadurch baut sich langsam ein Druck auf die Flüssigkeit im Reservoir auf, die so gleichmäßig durch den Auslass fließt, und derart in den Körper der Maus gelangt. b zeigt die Platzierung der Pumpe im Tier, an der Flanke, den Auslass vom operativen Zugang zur subkutanen Tasche (rot) abgewendet. Das Größenverhältnis ist zutreffend. Die Pumpen-Bilder stammen von der Internetseite des Herstellers, mit freundlicher Genehmigung: <http://www.alzet.com>

erfolgte wie bereits beschrieben. Sechs Wochen nach Implantation wurden die Tiere getötet, es erfolgte eine Zell- oder Organisolierung. Als Kontrollgruppe dienten jeweils Tiere, denen ein Polymethylmethacrylat-Stab mit vergleichbaren Maßen und gleichem Gewichtes im gleichen Verfahren als Placebo („Dummy“) implantiert wurden.

Auch bei und nach dieser Operation stellt ein stark verschlechtertes Allgemeinbefinden, eine Wundinfektion, starker Gewichtsverlust (hierbei ist das Eigengewicht der Pumpe zu beachten) oder auch großflächige Nekrosen der Haut über der Pumpe oder am Zugang, eindeutige Abbruchkriterien dar. Kleinere Nekrosen am Wundrand können prinzipiell durch Exzision und Wundrandauffrischung korrigiert werden. Beides war allerdings im Verlauf dieser Studie bei keinem Tier nötig.

3.13 Bestimmung des Aldosterongehaltes im Serum

In dem bei der Herzentnahme aufgefangenen Blut wurde der Aldosterongehalt in Pikogramm je Mikroliter ($\text{pg}/\mu\text{l}$) bestimmt, um die Funktion der Aldosteronapplikation zu überprüfen. Hierzu wurde bei der Tötung der Tiere durch Durchtrennung der Aorta abdominalis dem Tier möglichst viel Blut entnommen, das in einer Spritze sofort aufgesogen wurde. Das Blut wurde aus der Spritze unmittelbar in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In diesem Gefäß kann das Blut für 20 Minuten bei Raumtemperatur koagulieren. Danach wird die Probe zusätzlich für 10 min bei $2500\times g$ zentrifugiert. Bei allen Arbeitsschritten mit Vollblut war hier zu beachten, dass die Erythrozyten bei zu großer Krafteinwirkung zerstört werden können. Diese iatrogene (vom Untersucher ausgelöste) Hämolyse würde weiterführende Untersuchungen stark beeinträchtigen; sie ist an einer deutlichen rötlichen Einfärbung des Serums mit bloßem Auge zu erkennen. Das Risiko der iatrogenen Hämolyse besteht vor allem beim Auffangen des Blutes mit der Spritze, hier sollte ohne Kanüle, oder, wenn nötig, mit einer möglichst großlumigen Kanüle gearbeitet werden; des Weiteren ist eine zu starke Zentrifugation des Blutes zu vermeiden.

Die koagulierten Erythrozyten befinden sich nun im Sediment, der Überstand ist das Blutserum. Im Blutserum ist, anders als im Plasma, das Fibrinogen durch Gerinnung ausgefallen. Das Serum konnte nun abpipettiert werden. Es wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, und dann bis zur abschließenden Untersuchung in flüssigem Stickstoff gefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die folgende Bestimmung des Aldosterongehaltes wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sandra Ruppenthal, mit Hilfe des Festphasen-Enzymimmunoassays „Aldosterone ELISA“ von DRG Diagnostics, Marburg durchgeführt. Das Grundprinzip besteht dabei in einer Konkurrenz des Aldosterons aus dem Serum mit einem zugesetzten Aldosteron-Enzymkonjugat um die Bindungsstellen der Antikörper, die in der Beschichtung der Reaktionsplatte eingebunden sind. Nach Auswaschen der überständigen Aldosteron- und Aldosteron-Enzymkonjugat-Lösung wurde das Substrat Tetramethylbenzidin zugegeben, das zu einem Farbumschlag führt. Die Intensität der Färbung (gemessen bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät) war dabei umgekehrt proportional zum Aldosterongehalt; aus einer Standardkurve für die optische Dichte kann dadurch der Rückschluss auf den Gehalt an Aldosteron getroffen werden.

3.14 Histologische Präparation der Herzen

Das Tier wurden narkotisiert, wie in Abschnitt 3.10 beschrieben, jedoch wurde keine Citratlösung appliziert. Nach Eröffnung des Abdomens wurde das Tier zunächst durch Durchtrennung der großen abdominalen Gefäße entblutet, dann wurde das Blut für den oben beschriebenen Aldosteron- Enzymimmunoassay möglichst vollständig aufgefangen.

Danach wurde, wie bereits zur Zellisolation beschrieben, das Herz entnommen. Zur Spülung der Ventrikel kann auch eine andere physiologische Lösung genutzt werden, wie etwa PBS oder 0,9% NaCl-Lösung, dies ist für den weiteren Verlauf ohne Relevanz. Danach wurde das Herz in 2 ml 4 % - Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (w/v) in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Darin war es besonders bei Kühlung bei 4 °C lange lagerfähig.

Sollte das Herzgewebe teilweise noch für biochemische Untersuchungen genutzt werden, konnten entsprechende Proben auch vor dem Einlegen in PFA-Lösung entnommen werden; im PFA aber gehen wesentliche Eigenschaften physiologischer Gewebe verloren, da Methylenbrücken entstehen und Proteine denaturieren. Dementsprechend war eine spätere molekularbiologische Verwendung von mit PFA fixierten Proben nicht möglich. Umgekehrt würden Gefrierschnitte keine vergleichbare Qualität erreichen, wie Schnitte aus PFA-fixierten Präparaten. Außerdem wäre eine Formalinfixierung nach Einfrieren und Auftauen nicht auswertbar, da das Gewebe durch Frieren und Tauen Schaden nehmen würde.

Bei entsprechender Probenentnahme für die mögliche Doppelnutzung war hier jedoch darauf zu achten, dass für die Histologie der mittlere Teil des Herzens, mit dem größten Ventrikeldurch-

messer, zur Verfügung stand. Dieser Abschnitt stimmte auch mit dem für die echokardiographische Diagnostik genutzten Areal in den Aufnahmen der langen und kurzen Herzachse überein. Dementsprechend konnte sowohl die Herzbasis, als auch der Apex, für andere weiterführende Untersuchungen abgetrennt werden.

Die entnommenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in PFA bei 4 °C gelagert.

Anfertigung histologischer Schnitte

Die Präparate wurden aus dem Paraformaldehyd genommen, danach wurden sie mittels eines Einbettautomaten in Paraffinwachs eingebettet. Dies wurde am Institut für Anatomie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Es folgte das Trimmen des Paraffinblockes, sodass das Herz nahezu vertikal im Block, und demzufolge mit der langen Achse rechtwinklig zur Schnittebene lag. Danach wurden mittels eines Mikrotoms Dünnschnitte erstellt, die einen Querschnitt durch die breiteste Stelle des linken Ventrikels darstellen. Dies ist in Abbildung **19a** zu erkennen.

Es wurden jeweils acht aufeinanderfolgende Schnitte angefertigt, dann wieder achtzig Schnitte verworfen, um eine andere Ebene im Herzen zu erreichen. Dieser Ablauf wurde vier mal je Herz wiederholt. So konnte sichergestellt werden, dass die breiteste Stelle des Ventrikels nahezu erreicht wurde, außerdem standen so mehrere Proben für die letztliche Auswertung zur Verfügung. Die aufeinanderfolgenden Schnitte wurden in zwei Schnittsequenzen zu je vier Schnitten in ein Bad mit warmem Wasser überführt, was die Elastizität erhöht und eventuelle Falten durch das Mikrotom aufzieht. So können die Schnitte glatt auf den Objektträger gezogen werden. Je Objektträger wurden die vier aufeinander folgende Schnitte der Dicke 10 µm aufgebracht, wie aus Abbildung **19b** ersichtlich. So wurden, aus den verschiedenen Schnittebenen, acht verschiedene Objektträger je Herz gewonnen. Die histologischen Dünnschnittpräparate wurden in Zusammenarbeit mit Frau Tanja Kuhn erstellt.

Färbung histologischer Schnitte mit Pikrosirius-Rot

Zunächst war eine Entwässerung der Präparate mit Xylol und Alkohol nötig. Dazu wurden die Präparate dreimal für drei Minuten in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht, danach je drei Minuten in 100%, dann 90%, dann 70% Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), worauf eine einminütige Waschung in destilliertem Wasser folgte. Nun wurde das Präparat für 60 min mit einer 0,1 %-Sirius-Rot-Lösung in 1,2 % Pi-

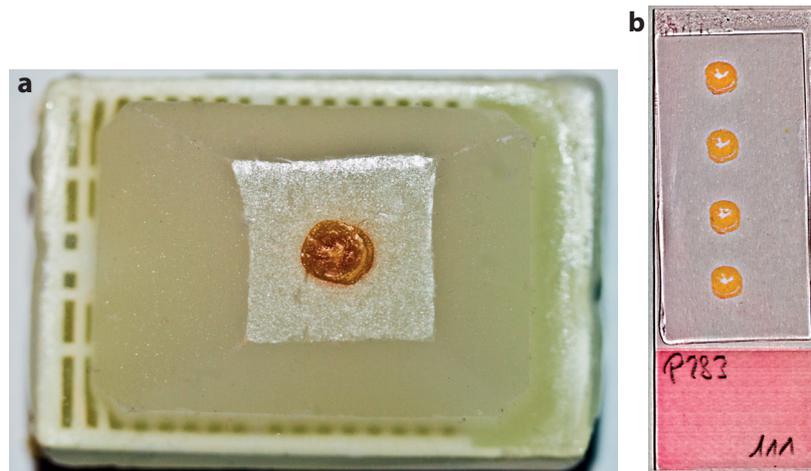


Abbildung 19: Anfertigung histologischer Präparate: In **a** ist der ausgehärtete Paraffinblock auf einem weißen Plastik-Träger mit im Paraffin zentral eingebettetem Herzen zu sehen. In **b** sind vier Schnitte dieses Herzens auf dem Objektträger zu erkennen, bereits mit Pikrosiriusrot gefärbt. Der bei mikroskopischer Betrachtung hinsichtlich Färbung und Präparation beste der vier Schnitte wurde für die Messung ausgewählt. Die Beschriftung zeigt die individuelle Nummer der Maus, von der das Herz stammte (P283) und die Nummer des Objektträgers (111).

krinsäure (Polysciences Inc, Eppelheim, Deutschland) bei einem pH-Wert von 2,0 gefärbt. Es folgte eine Waschung in 0,01 mol Salzsäure (HCl), dann wieder eine Entwässerung in obiger Alkoholreihe, und danach einmalig für wieder drei Minuten Xylol. Das anschließende Eindecken der Schnitte diente dem Luftabschluss, es verlängerte so die Haltbarkeit der Präparate. Hierzu wurde, vor Aufbringen eines Deckgläschens, Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetropft, dann das Deckgläschen vorsichtig luftblasenfrei aufgelegt. Abschließend konnte das Entellan noch bei Raumtemperatur aushärten. Ein derart gefärbter und eingedeckter Schnitt ist in Abbildung **19b** gezeigt.

Es wurden aus den verfügbaren Schnitten pro Herz jeweils zwei Objektträger ausgewählt und gefärbt. So gab es letztendlich acht einzelne gefärbte Herzschnitte eines Herzens. Da jeweils 20 Präparate in einem speziellen Halter für die Objektträger auf einmal gefärbt werden konnten, war die Färbung der Schnitte untereinander vergleichbar.

3.15 Polarisationsmikroskopie am histologischen Schnitt

Aus den acht verfügbaren gefärbten Schnitten je Herz wurde der am besten präparierte Schnitt für die Aufnahmen zur Kollagenquantifizierung ausgewählt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Gewebe nicht eingerissen, oder übereinander gefaltet war, dass möglichst keine Bereiche mit Anzeichen von Austrocknung zu erkennen waren, und wenig oder gar keine Blutreste

im Ventrikel zu sehen waren. Sowohl Trocknungsbereiche, als auch Blutreste führen zu fälschlich zu hoch gemessenen Kollagenwerten. Sie sind daher im Schnitt zu vermeiden, oder später im Rahmen der Bildbearbeitung von der Auswertung auszunehmen.

Zur Polarisationsmikroskopie wurde ein Video-Imaging-System genutzt. Die wichtigen Komponenten dieses Systems sind das Mikroskop Nikon TE Eclipse 2000 (Nikon Instruments, Tokio, Japan), die Kamera Orca Flash 4.0 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) und ein motorisierten Tisch für die Bewegung in x-y-Richtung. Gesteuert wurden alle Elemente von der Software „Live Aquisition 2.4 TILL“ (FEI Corp., Oregon, USA).

Zunächst wurde von den Präparaten eine Aufnahme im Weißlicht erstellt, die als Graustufenbild wiedergegeben wurde. Die Vergrößerung des Objektivs (Nikon LWD 20X, Nikon Instruments, Tokio, Japan) betrug 20x. Das Herz wurde mit der Options „Tiles Scan“ aufgenommen. Dies bedeutet, dass das später zusammengefügte Bild zunächst in 10 x 10 Bildern aufgenommen wurde, der motorisierte Tisch wurde dabei von der Software vollautomatisiert gesteuert. Der Tiles Scan wurde dann mit identischen Einstellungen unter polarisiertem Licht wiederholt.

Die Färbung mit Siriusrot verstärkte dabei die schon natürlicherweise vorhandene Doppelbrechung des Lichtes durch Kollagen. Dieser Effekt stellt eine spezifische Nachweismethode für Kollagen im Gewebe dar [81]. Um die Polarisation messen zu können, wurden zwei orthogonal zueinander ausgerichtete Polarisationsfilter in den Strahlengang des Lichtes gebracht, einer zwischen Lichtquelle und Präparat, der andere zwischen Präparat und Kamera. Der erste Filter hatte dabei die Aufgabe, nur Lichtstrahlen hindurch zu lassen, die in einer bestimmten Ausrichtung parallel zueinander sind, sodass das Präparat nur von linear polarisierten Lichtstrahlen getroffen wird. Im Präparat wurden diese linear polarisierten Strahlen, die mit Kollagen interagierten, in der Polarisationsachse gedreht; der zweite Filter sollte dann nur noch diese gedrehten Lichtstrahlen hindurchlassen, die schließlich als helle Bildpunkte erscheinen. Dazu konnte der zweite Filter manuell rotiert werden. Die Ablenkung durch den zweiten Filter war am Echtzeitbild überprüfbar: War das gesamte Herzgewebe noch schemenhaft zu erkennen, reichte die Ablenkung des zweiten Filters noch nicht aus, nur bei korrekter Stellung dieses Filters erschienen im Bild lediglich die polarisierenden Anteile des Gewebes auf dunklem Hintergrund. Bei korrekter Einstellung der Filter wurden die Aufnahmen in den Einstellungen des Graustufenbildes wiederholt.

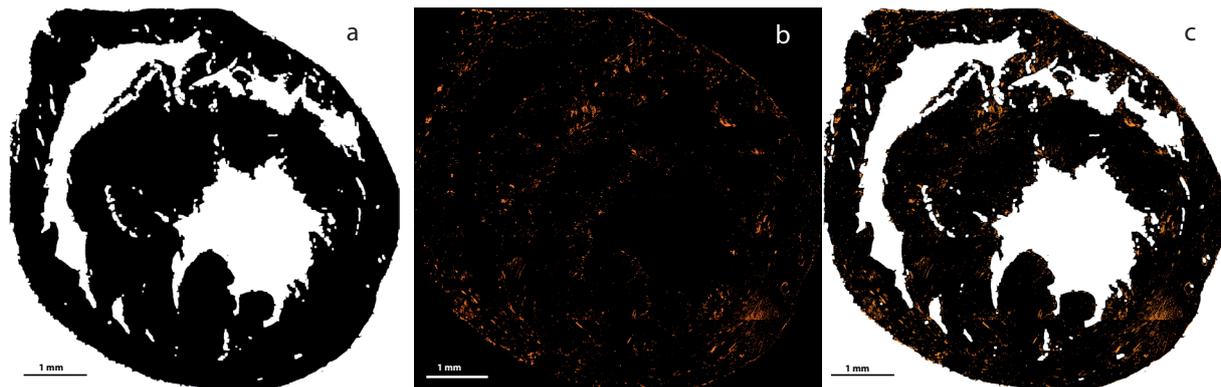


Abbildung 20: Prinzip der Messung mittels Polarisationsmikroskopie: a zeigt die gesamte Gewebefläche des Herzens, in einem binären Bild. Das Herzgewebe ist schwarz, der Hintergrund weiß. b zeigt das durch Kollagen modulierte polarisierte Licht in der Herzfläche in rot. c zeigt schematisch die Kombination aus beiden Bildern.

Auswertung der polarisationsmikroskopischen Bilder

Die Auswertung der so generierten Aufnahmen erfolgte mit dem Bildbearbeitungs- und Auswertungsprogramm „Image J“ [113]. Es wurde hierzu das Polarisationsbild und das Weißlicht-Bild genutzt. Die 100 Einzelbilder beider Aufnahmen (in Durchlicht und in den Polarisationsstellungen) wurden bereits von der Aufnahme-Software zu einem Gesamtbild kombiniert. Dann wurde zuerst das gesamte Herzgewebe als „Grundfläche“ der späteren Auswertung dargestellt. Dazu wurde an dem Durchlicht-Bild ein Grenzwert („Threshold“) gesetzt, bei dem das Herz möglichst gleichmäßig als Gewebefläche dargestellt wurde, bei dem also wenig dunkle Pixel im Herzgewebe vorkommen. Andererseits sollen gleichzeitig möglichst wenig helle Pixel im Hintergrund des Bildes erkennbar sein. Der nach diesen Kriterien ausgewählte Grenzwert musste dabei manuell an jedes Bild angepasst werden. Nun wurde dieses Bild binärisiert, und dann durch die Operationen „Dilate“ und „Erode“ noch Artefaktpixel in der Herzfläche eradiziert. Im Folgenden wurde eine ROI um möglichst viel Herzgewebe markiert und deren Bildkoordinaten gespeichert. Die Nutzung von ROI's anstelle der Markierung des gesamten Herzgewebes war hier nötig, da die folgende Untersuchung mittels polarisierten Lichtes sehr sensibel auf Artefakte im histologischen Schnitt durch Einbettung, Schneiden oder Färbung und Fixierung reagiert. Offensichtlich falsch-positive Bereiche konnten so ausgeschlossen werden.

Als nächstes wurde dann das Polarisationslichtbild bearbeitet. Auch hier wurde zuerst der Threshold manuell so gesetzt, dass das in der Polarisation leuchtende Kollagen klar sichtbar wurde, aber ohne zu große Artefaktanteile oder Hintergrundrauschen im Bild. Die individuelle manuelle Einstellung war dabei wichtig, da ja zuvor auch die Einstellung des Ablenkwinkels

manuell erfolgte. Eventuelle bildspezifische Abweichungen konnten schon bei der Aufnahme entstanden sein, die an diesem Punkt nun wieder auszugleichen waren. Danach wurde auch dieses Bild binärisiert und die zuvor gespeicherten ROI auf das binäre Polarisationsbild angewendet. Nun wurden in beiden binären Bildern in den ROI die Pixel, die im Durchlichtbild das Gewebe darstellten (in Abbildung 20a schwarz), und im Polarisationsbild das Kollagen (in Abbildung 20b rot), durch die Option „Measure“ gezählt. Diese Einzelergebnisse wurden dann ins Verhältnis zueinander gesetzt, danach wurde das Ergebnis statistisch ausgewertet. Zur Verdeutlichung des Prinzips sind in Abbildung 20c beide Anteile übereinandergelegt, der Hintergrund ist in weiß dargestellt.

3.16 Fluoreszenzmikroskopie am histologischen Schnitt

Angefertigt wurden die Aufnahmen ebenfalls mit dem Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TCS SP5 von Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland). Dessen Funktionsweise ist bereits in Abschnitt 3.11 erklärt. Die Anregungswellenlänge für die Fluoreszenz der Siriusrot-Färbung lag bei 543 nm, die Emissionswellenlänge bei 633 nm. Die Messung der Emissionswellenlänge erfolgte daher zwischen 625 nm und 645 nm. Die Bildgröße der Aufnahmen betrug 1024 x 1024 Pixel. Die Intensität des Lasers konnte über die Software so angepasst werden, dass die sichtbare Fluoreszenz, die abhängig von der Qualität der Färbung ist, für eine Auswertung ausreichte und zugleich keine Überbelichtung vorlag. Diese Intensität wurde am ersten untersuchten Schnitt eingestellt, dann für alle weiteren Schnitte beibehalten. Aufgenommen wurden die Bilder des Herzschnittes mit dem Objektiv HC PL APO 20x von Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland). Mit der Option „Tiles Scan“ in der Bedienungssoftware konnten die Herzschnitte so in 8 x 8 bis 8 x 10 Teilbildern aufgenommen werden, was zu einer detailreicheren Wiedergabe führte, als eine Aufnahme des Herzschnittes in einem einzigen Bild bei geringerer Vergrößerung. In den Aufnahmen waren innerhalb eines Bildes unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zu sehen, da auch hier das Gewebe Autofluoreszenz aufwies. Davon grenzten sich die Kollagenanteile dadurch ab, dass sie mit deutlich größerer Intensität spezifisch fluoreszierten.

Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder

Die Teilaufnahmen aus der Untersuchung mittels Fluoreszenzdarstellung des Kollagens wurden ebenfalls mit dem Programm „ImageJ“ [113] weiter bearbeitet und ausgewertet. Zunächst

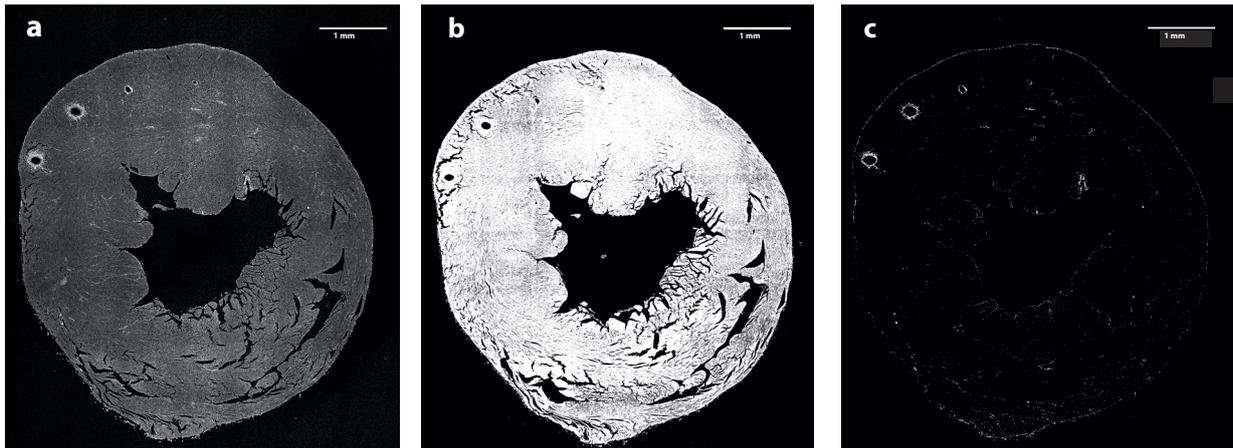


Abbildung 21: Prinzip der Auswertung der histologischen Schnitte: Ein histologischer Schnitt eines Herzens, aufgenommen mit dem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop LEICA TCS SP5, unter Verwendung von Licht der Anregungswellenlänge 543 nm, eine Emission ab 633 nm und einem 20x Objektiv. Größenverhältnisse sind durch die Skala links oben angegeben. **a:** Die noch unbearbeitete Aufnahme in Graustufen; der Hintergrund zeigt vernachlässigbare Fluoreszenz, ein Großteil des Herzgewebes eine Fluoreszenz mittlerer Intensität, das aber von Bereichen deutlicher Fluoreszenz durchzogen wird, insbesondere in der Umgebung von Gefäßen. Aus **a** wurden dann die beiden folgenden Bilder erstellt: **b:** Ein binäres Bild des Herzgewebes, der Grenzwert für die Darstellung eines Bildpunktes als „weiß“ lag bei einem Grauwert von 400 in **a**; **c:** Ein zweites binäres Bild, hier betrug der Grenzwert für die weiße Darstellung eines Bildpunktes einen Grauwert von 1300 in **a**. Aus **b** und **c** lässt sich der prozentuale Anteil des Picrosiriusrot-gefärbten Kollagens am gesamten Herzgewebe berechnen.

wurden die Teilbilder wieder zu einem gemeinsamen Bild zusammengefügt. Dieses Bild entspricht der Darstellung in Abbildung 21a. Danach wurde auf dem Bild das Herzgewebe als ROI markiert und gespeichert. Dabei konnten offensichtliche Artefakte, sofern vorhanden, noch ausgeschlossen werden. Daraufhin wurde zunächst ein unterer Helligkeits-Grenzwert festgelegt, der möglichst alles sichtbare Herzgewebe einschloss und gegen den Bildhintergrund abgrenzte. Nach Festsetzen dieses Grenzwertes in der Software („Threshold: 400“) wurde das entstehende Bild der Herzgrundfläche in ein binäres Bild umgewandelt; so konnten alle zur Grundfläche des Herzschnittes gehörenden, nun weißen Pixel innerhalb der Bildregion von Interesse in der Gesamtanzahl erfasst werden. Dieser Stand ist in Abbildung 21b zu sehen.

Danach wurde der Grenzwert im gleichen Ausgangsbild angehoben („Threshold: 1300“), zu einer Schwelle, ab der nur noch Pixel erfasst wurden, die durch die Fluoreszenz des Siriusrot im Bild einen deutlich höheren Helligkeitswert aufwiesen, als das übrige kardiale Gewebe und der Bildhintergrund. Die so noch messbar fluoreszierenden Bereiche sind in Abbildung 21c zu sehen. Die beiden Grenzwerte wurden auf alle Herzen der Untersuchung angewendet, da sowohl die Färbung, als auch die Einstellungen am Konfokalmikroskop identisch waren. Die

Aufnahme wurde dann wiederum in ein binäres Bild umgewandelt, dann wurden innerhalb der aus der ersten Messung gespeicherten ROI die weißen Pixel, welche die fluoreszierenden Bereiche ausmachten, erfasst und gezählt. So war das Ergebnis nicht direkt abhängig von der Größe der gesamten Herzgewebes im Schnitt. Nun wurden die fluoreszenzpositiven Pixel der unterschiedlichen Grenzwerte beider Bilder ins Verhältnis zueinander gesetzt. So ergab sich ein Prozentsatz des durch Siriusrot-Färbung fluoreszierenden Gewebes am Herzgewebe. Der derart errechnete Prozentsatz entsprach dem Anteil des Kollagens am Herzgewebe.

3.17 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism, Version 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, USA). Die in den oben beschriebenen Experimenten erzielten Messwerte, die zur Auswertung verglichen werden sollten, wurden zunächst durch den „Outlier Test“ in Graphpad Prism auf statistische Ausreißer untersucht. Gefundene Ausreißer wurden dann aus der Auswertung ausgeschlossen. Dann wurde die Normalverteilung und die Standardabweichung (SD) innerhalb der Datensätze geprüft, um das weitere Vorgehen auszuwählen. Bei Normalverteilung und vergleichbarer Standardabweichung wurde der Student's t-Test zur Signifikanzprüfung der Unterschiede zwischen zwei Datensätzen genutzt, andernfalls angepasste Testverfahren, beispielsweise der Mann-Whitney-Test bei fehlender Normalverteilung. Bei Untersuchungen mit mehr als drei Datensätzen wurde grundsätzlich eine Anova zur Prüfung auf signifikante Unterschiede durchgeführt. Bei einzelnen Vergleichen wurde zudem ein Student's t-Test durchgeführt, der gegenüber der ANOVA-Analyse einen sensitiveren Vergleich zweier bestimmter Gruppen an Werten erlaubt.

Die Darstellung erfolgte bei gleichem Messzeitpunkt bei fehlender Normalverteilung im Boxplot-Diagramm, mit Einzeichnung des Median, der 25% und 75%-Quartile in der Box und des Fehlerbalkens vom minimalen zum maximalen Wert. In gesonderten Fällen wurden die einzelnen Werte als Punkte dargestellt, um die Verteilung der Werte zu veranschaulichen, wenn dies in der spezifischen Beurteilung später von Bedeutung sein könnte. Wurden Messungen der gleichen Gruppen über die Zeit ausgewertet, erfolgte die Darstellung in Graphen, die einzelnen Messpunkte zeigten dabei den Median der Messwerte, die Fehlerbalken den minimalen und maximalen Wert. Wenn zugehörige Tabellen der Messwerte aufgeführt wurden oder einzelne Messwerte hervorgehoben wurden, ist dort zusätzlich der Standardfehler (SEM, standard error of mean) des Mittelwertes angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung der Aktivität der PKC ι in murinen Herzen und Herzzellen

4.1.1 Allgemeiner Phänotyp der Versuchstiere

Eine grundsätzliche Beurteilung der Tiere durch Inaugenscheinnahme und Messung des Körpergewichtes dient der Beurteilung, ob die durchgeführten Manipulationen, hier die virusvermittelte herzspezifische Überexpression von konstitutiv aktiver (CA) oder dominant negativer (DN) PKC ι im Vergleich zur Kontrollbedingung zu einer sichtbaren Beeinträchtigung von Gesundheit und Entwicklungsverlauf der Versuchstiere führt. Dies müsste dann in der Beurteilung aller *in vivo*-Parameter berücksichtigt werden, und beeinflusst die Beurteilung möglicher Befunde.

Die Versuchstiere dieses Projektes zeigten allerdings keine Befunde in Allgemeinbefinden oder Verhalten.

Unter den ersten C57Bl6/N-Tieren der Gruppe, die DN-PKC ι überexprimierten (Gruppe DN, siehe Abschnitt 4.1.3) entwickelte sich das Gewicht nach Vireninjektion weniger robust als in den vergleichbaren Tieren der anderen Gruppen. Es ist zu beachten, dass in diese erste Gruppe DN, wie auch in CA, lediglich 6 Tiere eingingen, in die Gruppe TagRFPT 8 Tiere. In der Folge wurden alle Tiere zu jeder echokardiographischen Untersuchung gewogen, um diese Beobachtung zu verifizieren. Es zeigte sich, dass der Unterschied im Körpergewicht zwischen der Gruppe DN und den anderen beiden Versuchsgruppen im Laufe der gesamten Studie so nicht bestätigt wurde, und damit keine typische Besonderheit der Versuchsgruppe DN darstellte (Abbildung 22b).

In Abbildung 22 wird dieser anfängliche Befund der geringeren Gewichte in DN dem Ergebnis der Gewichtsmessung aller C57Bl6/N-Tiere in der 10. Lebenswoche gegenübergestellt.

Zusätzlich müssen mögliche Tierverluste durch die experimentellen Manipulationen beachtet werden. Bei oder infolge der Injektion der Viren verstarben insgesamt fünf von 44 neonatalen Welpen. Es kann dabei nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Injektion selbst, die Narkose, oder der Pflgetrieb der Mutter zum Verlust der Welpen führten. Die Injektion in die 21 Tage alten Mäuse erfolgte dagegen ohne Verluste.

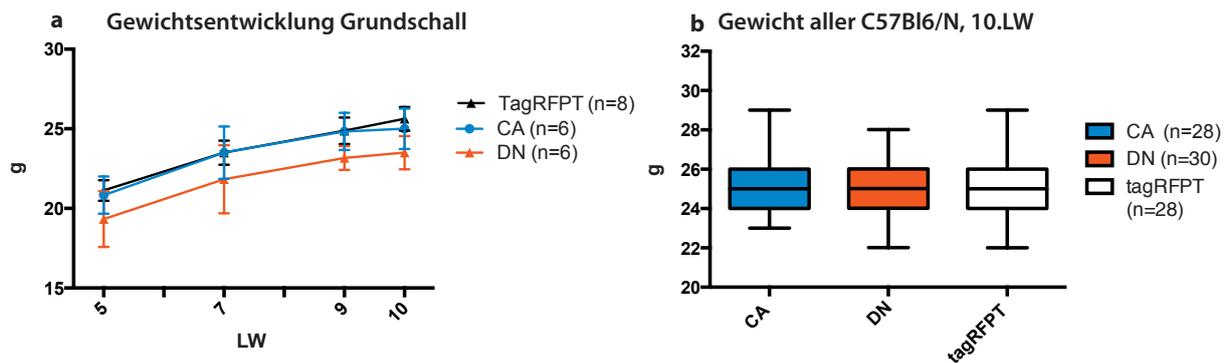


Abbildung 22: Körpergewichte der Versuchstiere C57Bl6/N: a: Entwicklung der Körpergewichte der Tiere in der ersten Versuchsgruppe mit C57Bl6-Tieren (siehe Abschnitt 4.1.3), in Lebenswoche 5, 7, 9 und 10. b: alle C57Bl6/N-Tiere des gesamten Projektes, die in der 10. Lebenswoche gewogen wurden. Gruppe DN in rot, Gruppe CA in blau, Gruppe TagRFPT in schwarz/weiß. In den Klammern hinter der Legende ist jeweils die in die Auswertung eingegangene Tierzahl n aufgeführt.

4.1.2 Ergebnis der Fluoreszenzmessung an den Organen

Diese Untersuchung erfolgte, um die Expression der transduzierten Gene auf Organebene zu analysieren. Hierbei soll insbesondere die Art und Intensität der kardialen Expression adressiert werden. Zudem konnte auch die Herzspezifität der Transduktion gegenüber anderen ausgewählten Organen untersucht werden. Genutzt wurden hierfür die zu Anfang des Projektes neonatal transduzierten FVB/N-Mäuse.

Zunächst wurde die optimale Belichtungszeit für eine detaillierte Darstellung der TagRFPT-Expression ermittelt. Diese lag für die Vorhöfe bei 10 ms, für den dickeren Ventrikel bei 21 ms.

In den Abbildungen 23, 1-3a/b zeigten sich die fluoreszierenden Areale scharf abgegrenzt vom umgebenden Gewebe. In den Vorhöfen waren die fluoreszierenden Bereiche gleichmäßig über das gesamte Gewebe verteilt. Im Ventrikel war ebenfalls eine Fluoreszenz über das gesamte Gewebe zu beobachten, jedoch erscheinen die lumennahen, endokardialen Bereiche stärker signalgebend, als die äußeren Bereiche des Myokards. Dies liegt bei genauer Betrachtung an häufigeren und dichteren Bereichen mit intensiver Fluoreszenz in der Nähe des Lumens.

Dann wurde die Fluoreszenzintensität transduzierten Gewebes mit der Fluoreszenz in nicht transduzierten Tieren verglichen. Dazu wurden die Atrien einer mit TagRFPT transduzierten Maus mit den Atrien einer Maus verglichen, die lediglich mit NaCl injiziert wurde, siehe Abbildung 23, Bild 4a/b und 5a/b. Bei einer Belichtungszeit von 10 ms war dabei die Fluoreszenz des rechten und linken Vorhofes der TagRFPT-Maus bei einer Anregungswellenlänge von 555

nm deutlich sichtbar. Der jeweilige Vorhof der Kontrollmaus zeigte keine entsprechend spezifische Fluoreszenz. Auch im Ventrikel war im Herzen der TagRFPT-Maus die Fluoreszenz deutlich darstellbar, im Ventrikel der Kontrolle fehlte sie.

Im Anschluss wurde die Organspezifität der gewählten Virustransduktion geprüft. Hierzu wurde jeweils der Vorhof einer TagRFPT-Maus auf einem Bild mit anderen ausgewählten Organen der mit TagRFPT transduzierten Maus bei einer Belichtungszeit von 10 ms verglichen. Das Atrium zeigte dabei jeweils deutliche Fluoreszenz. Im Speziellen wurden Aorta ascendens, Skelettmuskel (*M. vastus lateralis*), Lunge, Gehirn, Darm (mittleres Jejunum), Leber, Niere und Milz mit dem Atrium verglichen. Abbildung 24 zeigt jeweils das lichtmikroskopische Bild in **b**, und das Fluoreszenzbild in **a**, von Aorta (**1a/b**), Leber (**2a/b**), Lunge (**3a/b**), Skelettmuskel (**4a/b**), Darm (**5a/b**), Milz (**6a/b**), Niere (**7a/b**), Gehirn (**8a/b**).

In Aorta, Lunge, Milz und Skelettmuskel ließ sich dabei keine Fluoreszenz identifizieren. In Gehirn und Darm war ein sehr schwaches Signal vorhanden, in Leber und Niere dagegen ein etwas stärkeres. Immer jedoch war die Fluoreszenz der anderen Organe deutlich geringer als die des Vorhofes. Die Fluoreszenz der anderen Organe war diffus verteilt, es handelte sich vermutlich um Autofluoreszenz des Gewebes, im Gegensatz zum distinkten Signal der fluoreszierenden Zellbereiche im Vorhof, bei dem sogar einzelne Zellen zu erkennen waren.

Die Messungen wurden in gleicher Art an neonatal transduzierten FVB/N-Mäusen in der 23. Lebenswoche wiederholt, es zeigten sich dabei allerdings keine erkennbaren Abweichungen von den Ergebnissen der Untersuchung in der 16. Lebenswoche der Tiere.

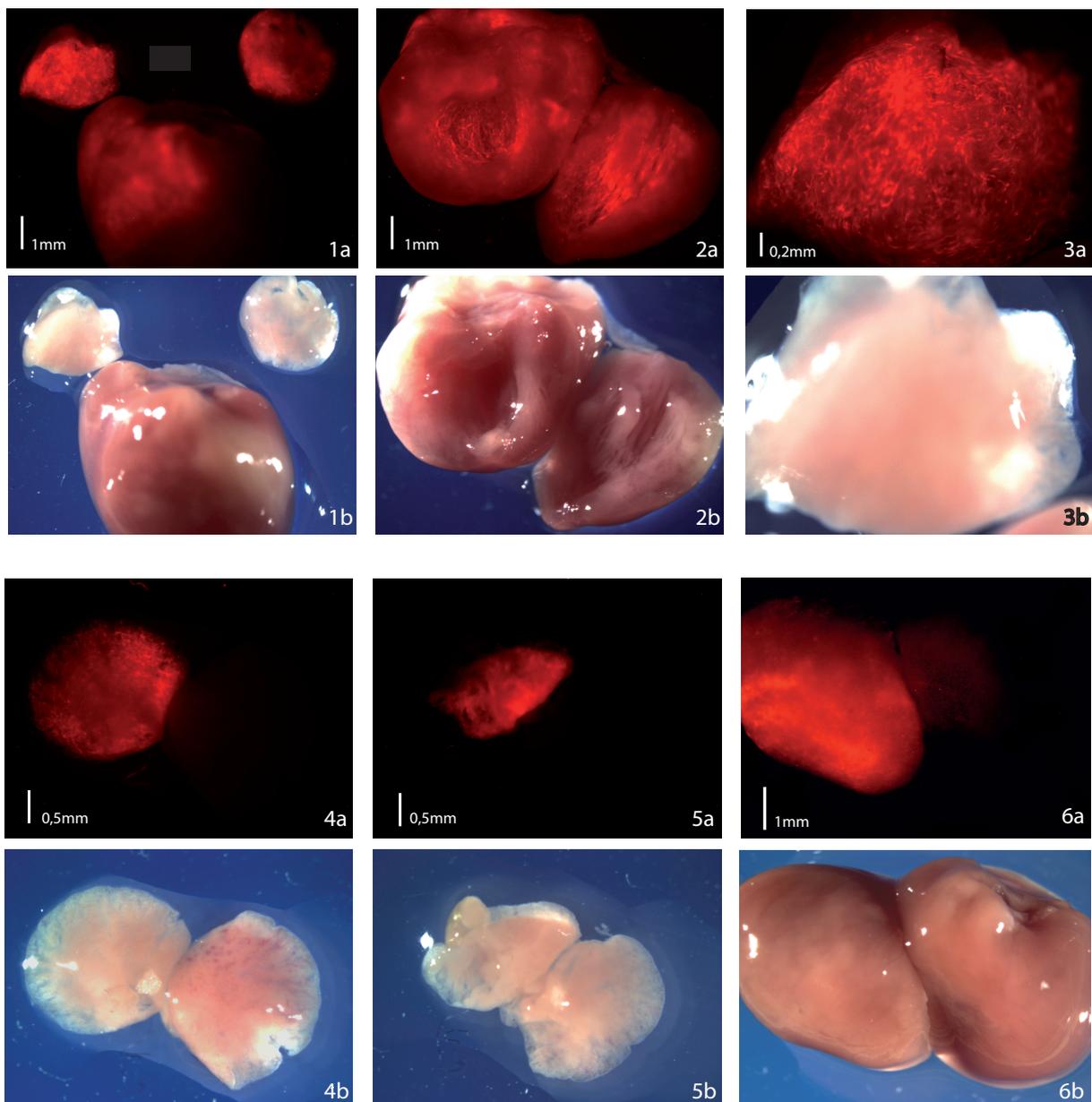


Abbildung 23: Fluoreszenz Atrien und Ventrikel: Die Bilder gleicher Nummer zeigen jeweils ein Präparat einer mit AAV-TagRFPT neonatal transduzierten FVB/N-Maus, (16. Lebenswoche) an, von dem immer in **a** die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Anregungswellenlänge 555nm, Emissionswellenlänge 584nm), und in **b** die dazu passende Weißlichtaufnahme kombiniert wurde. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzdarstellung betrug 10ms, nur in Bild **2a** 21ms. **1a/b** Der Ventrikel und die beiden bereits abgetrennten Vorhöfe, alle Bestandteile des Herzens zeigen Fluoreszenz. **2a/b**: Eröffneter Ventrikel, es sind diskrete leuchtende Bereiche sichtbar, vor allem im Inneren. **3a/b**: Vorhof rechts, stärker vergrößert, Belichtung: Die fluoreszenten Bereiche sind gleichmäßig verteilt, und deutlich abgegrenzt. **4a/b**: rechter Vorhof, von dem TagRFPT-transduzierten Tier (linkes Präparat), und einem mit NaCl-Vehikel injiziertem Kontrolltier (rechtes Präparat). Die Kontrolle des NaCl-injizierten Tieres zeigt keine Fluoreszenz. Dies gilt analog für die linken Vorhöfe in Bild **5a/b**, und die Ventrikel in **6a/b**.

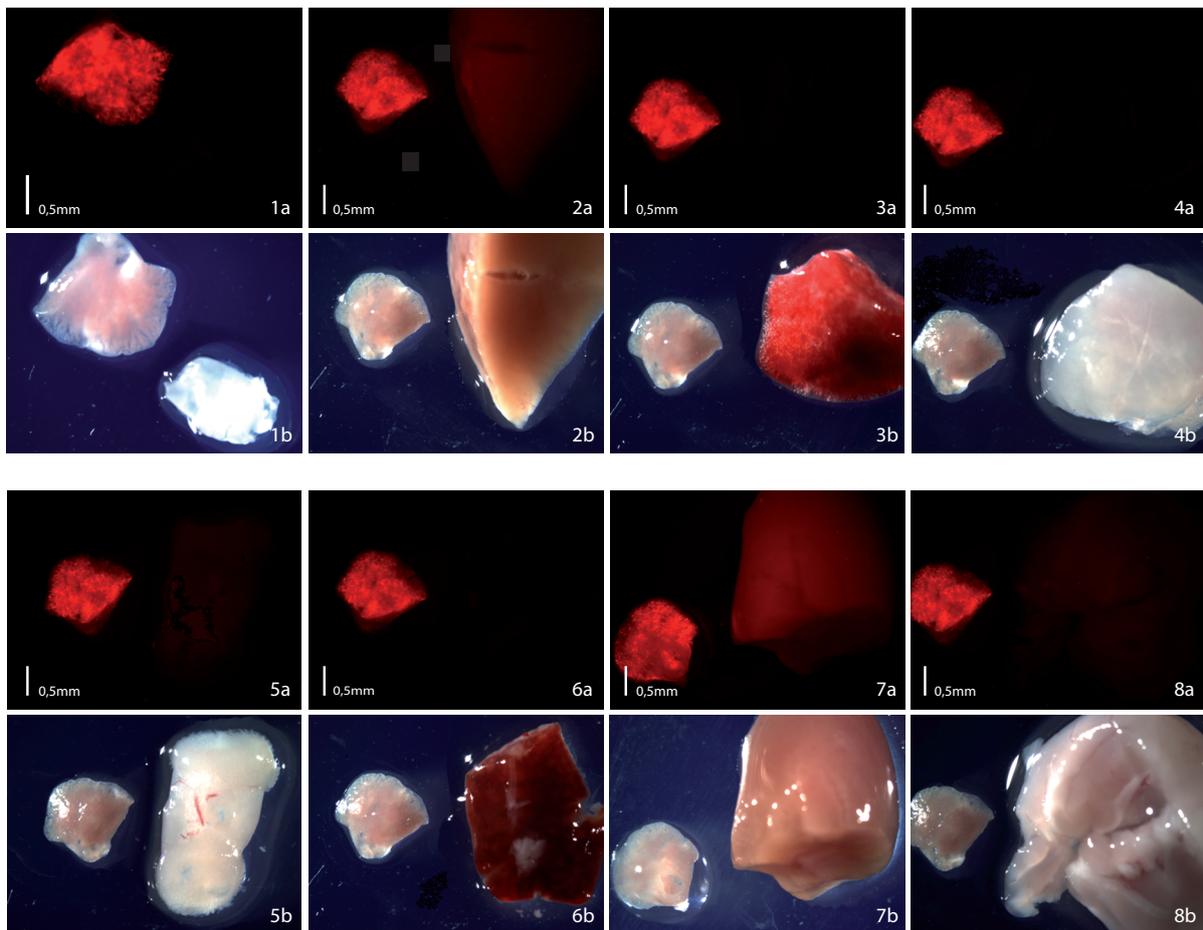


Abbildung 24: Fluoreszenz andere Organe: Abgebildet ist jeweils der rechte Vorhof aus 23 sowie ausgewählte Organe, teilweise oder vollständig. In **a** sind beide Präparate jeweils in der Fluoreszenzmessung (Belichtungszeit 10ms, Anregungswellenlänge 555nm, Emissionswellenlänge 584nm) dargestellt, in **b** im Weißlicht. Eine Fluoreszenz ist in Leber (**2a**) und Niere (**7a**) schwach, dennoch klar erkennbar; eine noch schwächere Fluoreszenz ist in Gehirn (**8a**) und Darm (**5a**) sichtbar. In Aorta (**1a**), Lunge (**3a**), Skelettmuskel (**4a**) und Milz (**6a**) ist eine spezifische Fluoreszenz nicht auszumachen.

4.1.3 Beschreibung des kardialen Phänotypes in der Echokardiographie

Entwicklung eines Phänotypes in FVB/N-Mäusen über die Zeit:

Hier wurden die neonatal injizierten FVB/N-Mäuse über mehrere Wochen echokardiographisch untersucht, um die Entwicklung kardiologischer Auffälligkeiten durch die Überexpression der verschiedenen PKC ζ -Subtypen zu analysieren. Es wurden 7 Tiere der Gruppe CA, und jeweils 6 Tiere der Gruppen DN und TagRFPT gemessen, die alle am ersten Lebenstag mit den entsprechenden AAV transduziert wurden (Abbildung 25). Insgesamt hatte sich bei echokardiographischer Untersuchung nur bei der linksventrikulären Masse ein deutlicher Unterschied entwickelt (Abbildung 25a), der auch nach Normierung auf das jeweilige Körpergewicht der Maus (Abbildung 25c) zum Untersuchungszeitpunkt Bestand hatte. In der 6. Woche nach Injektion zeigte sich noch keine signifikante Differenz. Jedoch wurde in der 10. Lebenswoche ein statistisch signifikanter Unterschied gemessen, der auch bei der dritten Untersuchung in der 12. Lebenswoche Bestand hatte. Die Körpergewichte waren dabei nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 25b).

In allen anderen untersuchten Parametern (Wanddicken in Systole und Diastole, intraventrikulärer Durchmesser und Volumen, Auswurfraction und Ventrikelverkürzung, funktionelle Mitralklappenparameter) ergab sich bei dieser Anordnung kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Untersuchung dieser Kombination aus Mauslinie und Injektionszeitpunkt wurde wegen der insuffizienten Ergebnisse der Einzelzellisolation der Herzzellen aus FVB/N-Mäusen danach nicht weiter fortgeführt.

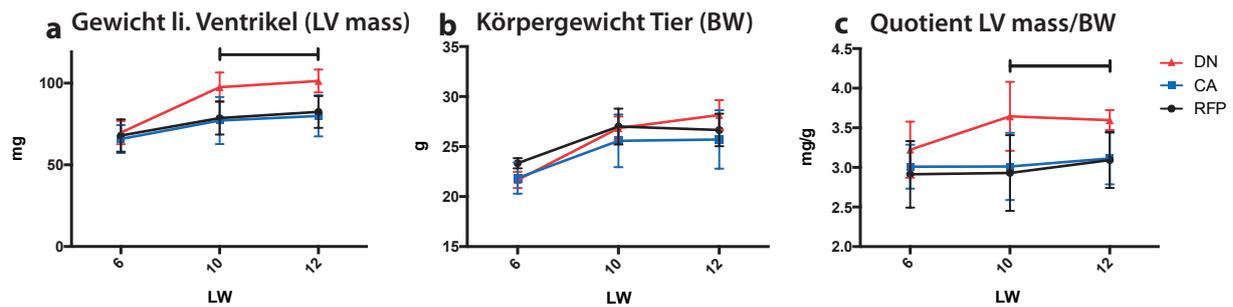


Abbildung 25: Entwicklung der normalisierten linksventrikulären Masse über die Zeit in neonatal transduzierten, männlichen FVB/N-Mäusen: Messwerte aus Lebenswoche 6, 10 und 12 der Tiere. **a:** Entwicklung der aus der Echokardiographie errechneten linksventrikulären Masse, LV mass, in mg **b:** Entwicklung der Körpergewichte der Tiere, in g; **c:** die Entwicklung des relativen linksventrikulären Gewichtes, normiert auf das Körpergewicht, in mg/g. In rot ist der Verlauf der Gruppe DN abgebildet, in blau der der Gruppe CA, und in schwarz der Verlauf der Gruppe TagRFPT. Der schwarze Balken oberhalb der Graphen zeigt an, ab wann das gemessene, bzw. das normierte linksventrikuläre Gewicht in der Gruppe DN signifikant größer war, als das der anderen Gruppen. Die Tierzahl betrug in der Gruppe DN n=6, CA n=7, TagRFPT n=6 Tiere; LW = Lebenswoche .

Entwicklung eines kardiologischen Phänotypes in C57Bl6/N nach Transduktion in der dritten Lebenswoche

Wegen der schlechten Zellisolationen aus den FVB/N-Tieren wurde die Mauslinie gewechselt; das Tiermodell bestand ab der folgenden Untersuchung aus männlichen C57Bl6/N-Mäusen, die am 21. Lebenstag transduziert wurden. Es handelte sich zunächst um die initiale echokardiographische Untersuchung zur Bestimmung des Messzeitpunktes für die folgenden Teile des Projektes. Die Untersuchung wurde an Tieren aller drei Transduktionsgruppen durchgeführt, in der 5., 7., 9. und 10. Lebenswoche. Es wurden 6 Tiere der Gruppe DN, 6 Tiere der Gruppe CA, und 8 Tiere der Gruppe TagRFPT in die Auswertung inkludiert.

In den direkt gemessenen Parametern (IVS, LVID, LVPW, LVAW, MVE, MVA, IVRT) zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. In den morphologischen und funktionellen Parametern, die daraus berechnet wurden, ergab sich das gleiche Bild. Einzig die auf das Körpergewicht der Tiere normierte linksventrikuläre Masse in der Gruppe DN nahm gegenüber beiden anderen Gruppen zu. Zu der Gruppe CA zeigte sich bereits in der siebten Lebenswoche ein signifikanter Unterschied, und ab der neunten Woche auch zur Gruppe TagRFPT (siehe Abbildung 26a) .

Die Normierung der linksventrikulären Masse auf das Körpergewicht ist dabei bedeutsam, da, wie bereits beschrieben, die Gruppe DN vom ersten Messzeitpunkt an ein durchschnittlich

geringeres Körpergewicht aufwies als die anderen Tiergruppen.

Das Wiegen der Tiere erfolgte unmittelbar vor der Ultraschalluntersuchung.

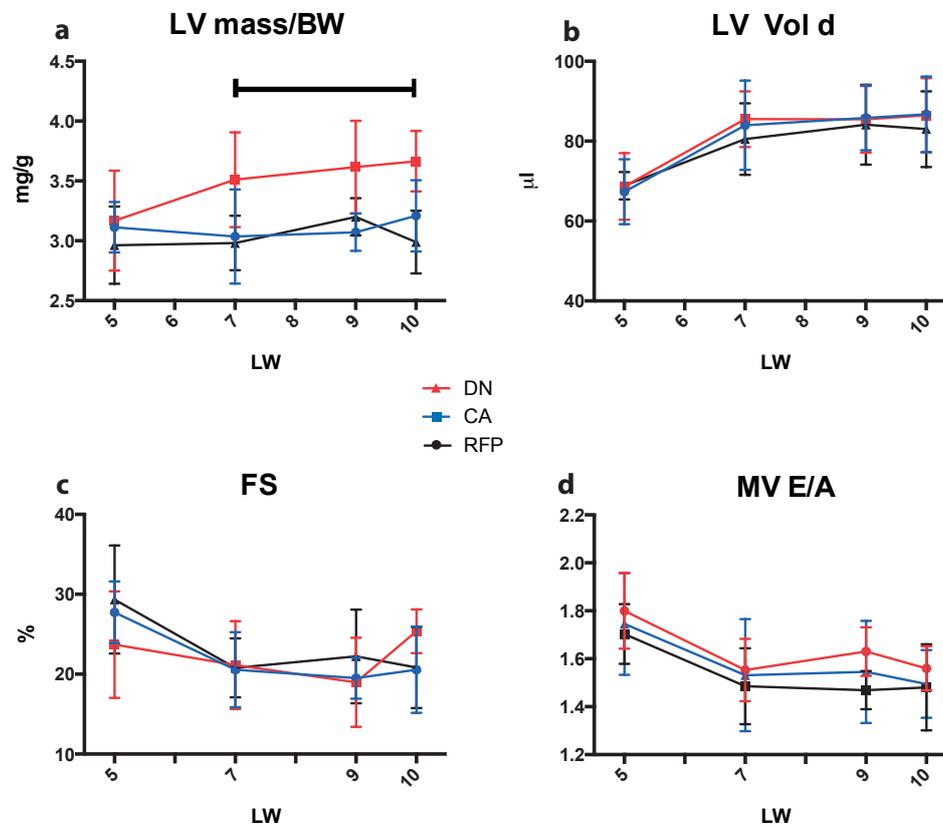


Abbildung 26: Entwicklung der echokardiographischen Parameter in C57Bl6/N-Tieren: Entwicklung wichtiger echokardiographischer Parameter in den mit 21 Tagen transduzierten C57Bl6/N-Mäusen. Betrachtet wird der Zeitraum über die 5., 7., 9. und 10. Lebenswoche. **a:** Entwicklung der LV mass/BW, in mg/g; **b:** Entwicklung des diastolischen Ventrikelvolumens (LV Vol d), in µl. **c:** FS, in %; **d:** MV E/A-Quotient des linksventrikulären Bluteinstromprofils. Der schwarze Balken über den Graphen bezeichnet den Zeitraum, ab dem eine Gruppe (hier DN) einen signifikant höheren Wert erreicht, als mindestens eine der beiden anderen Gruppen.

In der Abbildung 26 sind zudem auch die Graphen zum enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels LV Vol d in **b**, zur relativen Ventrikelverkürzung FS in **c**, und zum Verhältnis der E- zur A-Welle, MV E/A, in **d** dargestellt. In diesen zur Charakterisierung des kardialen Phänotypen bedeutsamen Parametern zeigten sich keine Besonderheiten einer Gruppe über den Beobachtungszeitraum.

Detaillierte Analyse des Phänotypes in der 10. Lebenswoche.

Für weitergehende Untersuchungen sollte ein Zeitpunkt nach der Transduktion gewählt werden, zu dem die bisher gefundenen Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant ausgeprägt

waren. Hierfür wurde die Zunahme des relativen Herzgewichtes in der Gruppe DN herangezogen. Zudem sollten die Mäuse möglichst jung sein, da dies die Qualität der Zellen aus Zellisolationen für Einzelzellexperimente erhöhte. Nach den Untersuchungen aus Abschnitt 4.1.3 hatte sich die 10. Lebenswoche als Zeitpunkt mit dem deutlichsten Unterschied zwischen den Gruppen etabliert. In diese Messung gingen 8 Tiere der Gruppe TagRFPT, 10 der Gruppe DN, und 7 Tiere der Gruppe CA ein. Zum Teil bestanden die Gruppen aus den Tieren, die bereits im Rahmen der vorigen Untersuchung (Abschnitt 4.1.3) in der 10. Lebenswoche untersucht worden waren. Die zusätzlich in die Gruppen inkludierten Mäuse wurden nur einer einmaligen Ultraschalluntersuchung zum Zeitpunkt der 10. Lebenswoche unterzogen. Die gemessenen mittleren Werte der Gruppen sind mit SEM (Standard Error of Mean) in Tabelle 7 zusammengestellt.

Bei den morphologischen Messparametern der Aufnahme entlang der Längsachse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Betrachtet wurden IVS, LVID, LVPW, jeweils systolisch und diastolisch. Und auch die LVAW aus der Messung entlang der kurzen Herzachse zeigt in ihrer gemessenen Dicke keine statistisch signifikante Veränderung.

In der Messposition entlang der kurzen Herzachse wurde die Dicke der Vorderwand des linken Ventrikels in der Diastole und in der Systole gemessen. Hier war diastolisch kein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Messung zwischen den Gruppen erkennbar. Bei den gemessenen Werten der Dicke der Ventrikelvorderwand in der Phase der Systole (LVAWs) zeigte sich dann, dass die Gruppe DN einen signifikant höheren Mittelwert ($p = 0,04$) aufwies als die Gruppe CA. Keine der beiden PKC α -Versuchsgruppen zeigte einen Unterschied zur Kontrollgruppe TagRFPT.

Tabelle 7: Echokardiographische Parameter in der siebten Woche nach Transduktion: Zu sehen ist jeweils der gemessene Parameter mit seiner Einheit, und der dazugehörige Wert der jeweiligen Untersuchungsgruppe, zuzüglich SEM. Die Spalten sind in der schwarzen Kopfzeile entsprechend beschriftet. Die Anzahl der Tiere je Gruppe ist direkt unter dem Gruppennamen aufgeführt. Gleiche Symbole kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Unit	CA n=7	DN n=10	tagRFPT n=8
Mittelwert ± SEM				
BW	g	25.00±0.44	24.20±0.39	25.63±0.26
HF	bpm	389.9±16.10	397.6±10.17	381.4±17.35
IVSd	mm	0.64±0.015	0.68±0.011	0.65±0.017
IVSs	mm	0.84±0.041	0.90±0.034	0.86±0.038
LVIDd	mm	4.33±0.086	4.35±0.060	4.25±0.096
LVIDs	mm	3.47±0.144	3.37±0.090	3.38±0.144
LVPWd	mm	0.62±0.026	0.68±0.024	0.63±0.024
LVPWs	mm	0.81±0.042	0.92±0.026	0.86±0.048
LVAWd	mm	0.60±0.017	0.65±0.023	0.61±0.024
LVAWs	mm	0.84±0.050	0.90±0.035 ⁺	0.86±0.032 ⁺
LV Vol d	μl	84.98±3.89	87.07±2.97	80.37±4.07
LV Vol s	μl	50.69±4.97	47.40±2.98	47.02±4.61
EF	%	41.15±3.42	45.90±2.21	42.47±3.12
FS	%	20.12±1.92	22.85±1.30	20.83±1.79
LV mass	mg	79.00±3.30	85.47±1.65	76.48±1.83
LV mass /BW	mg/g	3.16±0.114 [*]	3.53±0.095 ⁺	2.99±0.093 ⁺
MV E	mm/s	910.0±62.21	911.6±24.69	930.9±43.49
MV A	mm/s	600.7±45.84	570.1±20.89	631.7±27.69
MV E/MV A		1.53±0.061	1.61±0.034	1.48±0.064
IVRT	ms	14.46±0.68	15.85±0.89	17.88±1.40
MV decel	mm/s ²	-43529±6452 [*]	-26471±289 ⁺	-36959±2782 ⁺
MV decel t	ms	22.17±2.47 [*]	36.66±3.44 ⁺	24.95±1.91 ⁺

In der Schallkopfposition des Vierkammerblickes wurde mittels des Pulswellendopplers das Geschwindigkeitsprofil des Blutflusses durch die Mitralklappe über die Zeit gemessen. Jeweils ein beispielhafter Geschwindigkeitsverlauf über die Zeit ist je Untersuchungsgruppe in Abbildung 28 zu sehen. Bei der Messung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Spitzengeschwindigkeiten der beiden Füllungswellen (MV E, MV A) zwischen den Gruppen. Setzt man nun jeweils beide Wellen einer Maus ins Verhältnis zueinander, ergibt dies den Wert MV E/A. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied, ebensowenig wie beim Vergleich der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT).

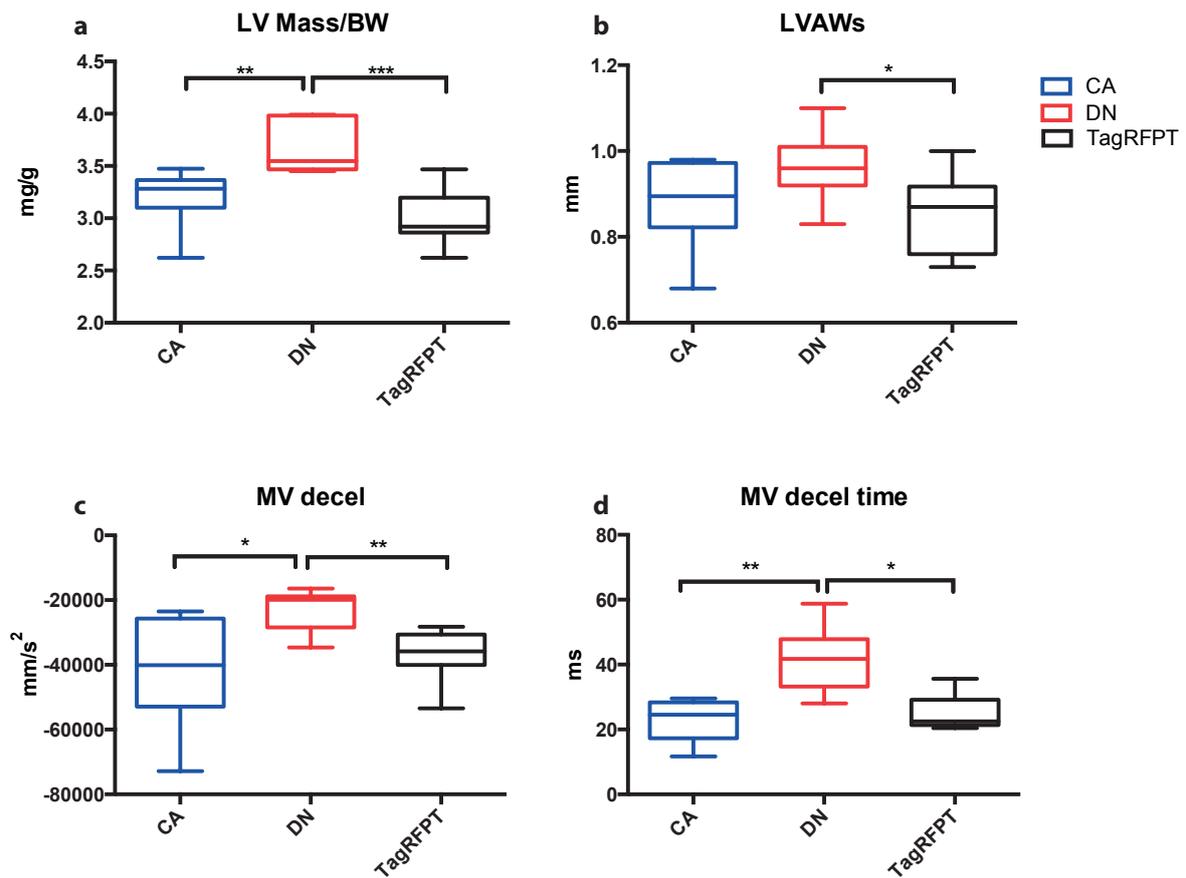


Abbildung 27: Echokardiographische Grundcharakterisierung in der 10. Lebenswoche: Ergebnis der Echokardiographie: rot = DN (n = 10), blau = CA (n = 7), schwarz = TagRFPT (n = 8). **a:** Die linksventrikuläre Masse nach Normalisierung auf das Körpergewicht der Tiere (LV mass/BW), in mg/g **b:** Die Dicke der linksventrikulären Vorderwand (LVAWs) in mm **c:** Die Verlangsamung der E-Welle (MV decel) in mm/s²; **d:** Die für die Geschwindigkeitsabnahme benötigte Zeit (MV decel time) in ms.

Die letzte Messung, die im Vierkammerblick getätigt wurde, war die der Geschwindigkeitsabnahme der frühen Füllungswelle, der E-Welle („Early filling“), und die Zeit, die zwischen der erreichten Spitzengeschwindigkeit, und dem Endpunkt der Geschwindigkeitsabnahme (bis zum Beginn der atrialen Füllungswelle), verging. Hier zeigte sich eine deutliche Verlängerung dieser Zeit in der Gruppe DN gegenüber sowohl der Gruppe CA ($p = 0,01$) und TagRFPT ($p = 0,009$). Dies ist in Abbildung 27d dargestellt. Die benötigte Zeit für die Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit war dabei in der Gruppe DN verlängert (gegenüber der Gruppe CA und der TagRFPT-Kontrolle). Die Einstromgeschwindigkeit der E-Welle selbst nahm dabei in DN deutlich langsamer ab als in der Kontrollgruppe. So zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen DN und TagRFPT ($p = 0,02$), dargestellt in Abbildung 28c.

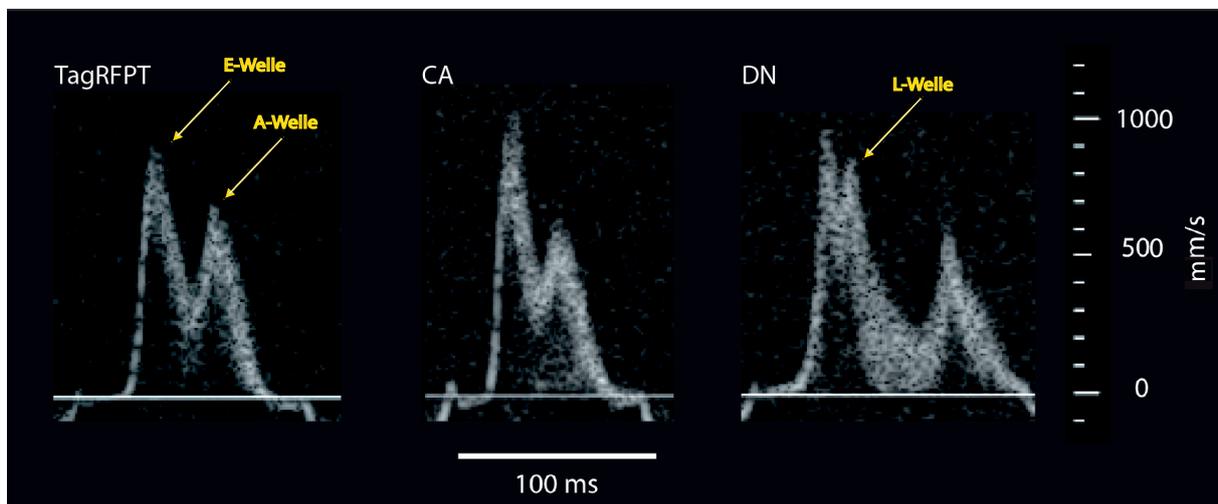


Abbildung 28: Auszug aus der PW-Doppler-Messung. PW-Doppler-Profil des Mitralklappen-Bluteinstromes in den linken Ventrikel während einer Dilatation. Die weiße Linie zeigt dabei die Blutflussgeschwindigkeit in mm/s, über die Zeit (in ms). TagRFPT und CA zeigen das für eine physiologische Herzaktion typische Strömungsprofil. E-Welle und A-Welle sind im TagRFPT-Bild mit gelbem Pfeil hervorgehoben. In dem Auszug aus einer charakteristischen Messung der Gruppe DN fällt die zweite Spitze der E-Welle auf, bezeichnet als L-Welle, im DN-Bild ebenfalls durch gelben Pfeil gezeigt.

Hierbei ist insbesondere zu erwähnen, dass die mittlere Herzfrequenz während der Messung zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war. Da die funktionellen Parameter, vor allem die der Mitralklappe, von der Frequenz direkt abhängig sind, ist zur korrekten späteren Beurteilung dieser Parameter eine vergleichbare Herzfrequenz essentiell.

Ein weiterer, jedoch nicht quantitativer Messparameter ist hier zu beachten: In der Gruppe DN trat bei 8 von 10 Tieren eine zusätzliche Geschwindigkeitsspitze im Flussprofil der Mitralk-

klappe auf. Sie lag in jedem Fall zeitlich nach der Spitze der E-Welle, mit unterschiedlicher Ausprägung, jedoch als Spitze klar abgesetzt. Diese zusätzliche Welle war in den Gruppen CA und TagRFPT nicht erkennbar. Sie wird, analog zur vorhandenen Literatur zu ähnlichen zusätzlichen Einstromwellen, als L-Welle bezeichnet [56].

4.1.4 Echokardiographische Befunde der neonatal injizierten C57Bl6/N

Diese Untersuchung wurde aufgrund der unterschiedlichen Befunde in den neonatal transduzierten FVB/N-Tieren, und den mit drei Wochen transduzierten C57Bl6/N-Tieren unternommen. Dies soll die bisher genutzten Versuchsbedingungen ergänzen, um den Einfluss von Alter und Mauslinie auf die Ergebnisse zu beurteilen. Die Echokardiographie erfolgte ebenfalls sieben Wochen nach der Injektion, um eine Vergleichbarkeit der Expressionsdauer zu erreichen. Gemessen wurden jeweils sieben Tiere, die mit CA oder DN injiziert wurden, und sechs Tiere in der Kontrollgruppe TagRFPT. Die Tiere aus einer Gruppe stammten aus jeweils zwei verschiedenen Würfen. Die männlichen C57Bl6/N-Welpen konnten am ersten Lebenstag mit bloßem Auge anhand der schwarz pigmentierten Gonaden identifiziert werden, die durch die hellrosa Haut des Skrotums hindurchschienen.

Es ergab sich wiederum ein etwas abweichendes Bild von den beiden anderen Versuchsansätzen; zum einen unterschieden sich die Tiere schon im Vergleich der Körpergewichte. Die Gruppe TagRFPT zeigte, wie in der Abbildung **29a** dargestellt, höhere Körpergewichte, und zwar signifikant in DN ($p = 0,022$) und CA ($p = 0,03$).

Die Herzfrequenzen waren nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung **29b**). Das auf das Körpergewicht normierte linksventrikuläre Gewicht in Abbildung **29d** war nicht signifikant unterschiedlich. Auch die Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle zeigte in dem hier untersuchten experimentellen Ansatz (**29c**) keine signifikant unterschiedlichen Befunde.

MV E/A war signifikant größer in der Gruppe DN, gegenüber TagRFPT ($p = 0,0494$), zu sehen in **29e**. Die Geschwindigkeit der E- und A-Welle war allerdings vergleichbar (**29f**).

Alle anderen gemessenen und errechneten Werte wiesen keine signifikanten Befunde auf.

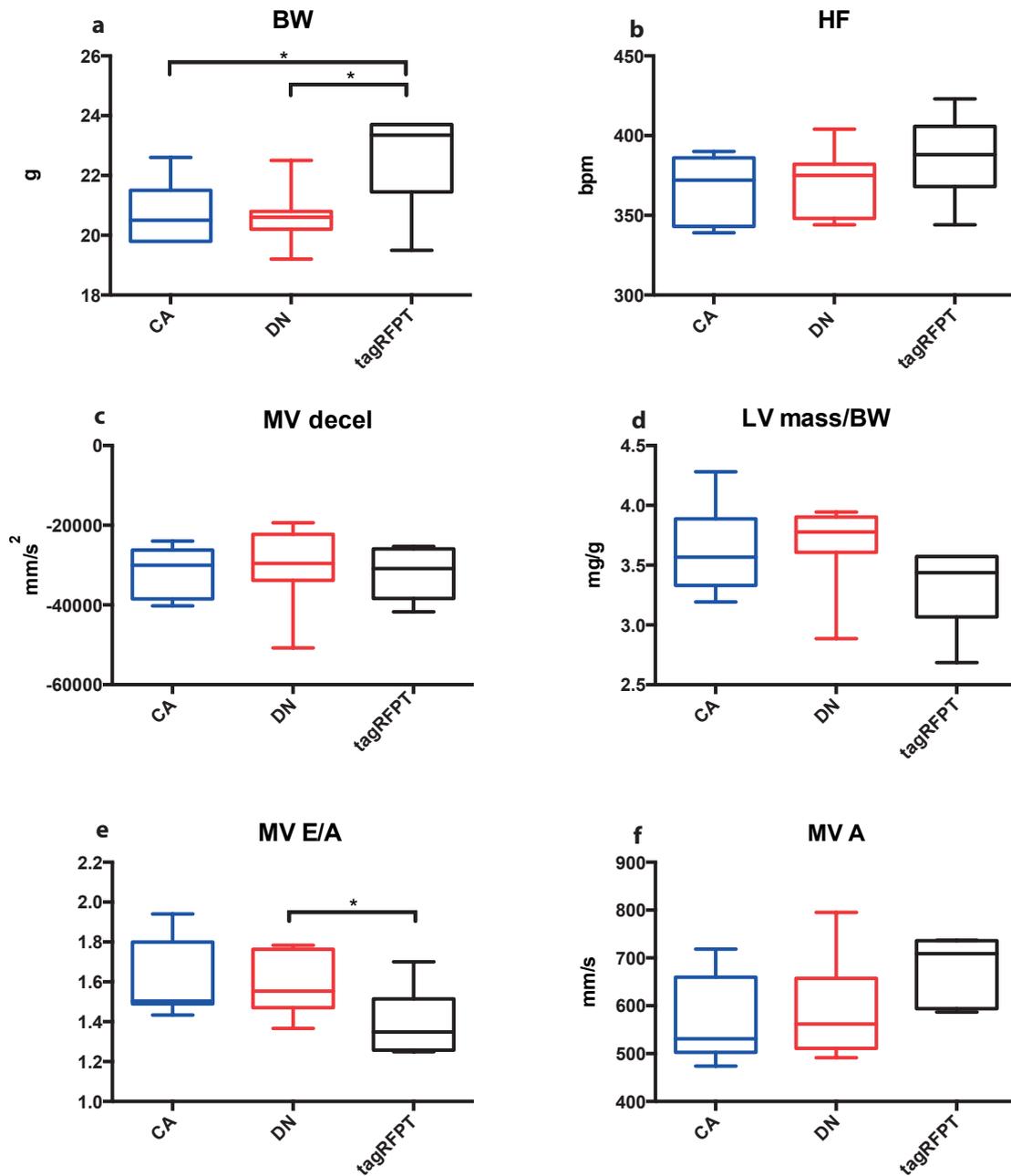


Abbildung 29: Ultraschall der neonatal injizierten C57Bl6/N: Farbcodierung wie in Abbildung 27. **a:** Körpergewicht in g; **b:** Herzfrequenz in Schlägen/Minute (1/min) **c:** Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle, in mm/s²; **d:** Auf das Körpergewicht normierte Masse des linken Ventrikels, in mg/g; **e:** Verhältnis E-Welle zur A-Welle; **f:** Geschwindigkeit der A-Welle, in mm/s.

4.1.5 Echokardiographische Befunde nach Nachlasterhöhung

Nach dem Befund der höheren relativen Herzmasse in den DN-Mäusen gegenüber CA und TagRFPT lag die Vermutung nahe, dass die Aktivität der PKC α einen Einfluss in der Regulation des Herzwachstums haben könnte. Diese Vermutung erschien auch im Kontext der bekannten Rolle anderer PKCs in der Hypertrophie sinnvoll [21]. Daher sollte im nächsten experimentellen Schritt pathologisches Herzwachstum induziert werden, um die Auswirkung der verschiedenen Aktivitätszustände der PKC α auf die Hypertrophie zu beurteilen. Hierzu wurde das operative Modell der Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion gewählt.

In der folgenden Studie wurde der Einfluss der verschiedenen PKC-Subtypen auf das Herz bei pathologischer Hypertrophie untersucht. Dazu wurden Tiere der verschiedenen Untersuchungsgruppen einer TAC-Operation unterzogen, und sowohl direkt vor der Operation als auch 14 Tage danach eine echokardiographischen Untersuchung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Echokardiographie 14 Tage nach TAC sind mit ihrem Standardfehler SEM in Tabelle 8 aufgeführt. Verglichen wurden dabei alle Gruppen der Kontrolloperation („sham“) sowie der Aortenkonstriktion („TAC“) untereinander, und zudem auch die beiden Operationsbedingungen innerhalb einer Transduktionsgruppe (DN, CA, TagRFPT). Da generell eine Vielzahl relevanter Ergebnisse erzielt werden konnte, erfolgt hier eine Untergliederung der Ergebnisse nach den einzelnen gemessenen oder errechneten Parametern.

Zuerst ist jedoch zu bemerken, dass sich weder die Körpergewichte noch die Herzfrequenz während der Messung, zwischen den Gruppen unterschied, wie in Abbildung 30 gezeigt. Dies ist bedeutsam, da beide Faktoren die Ultraschallergebnisse beeinflussen können.

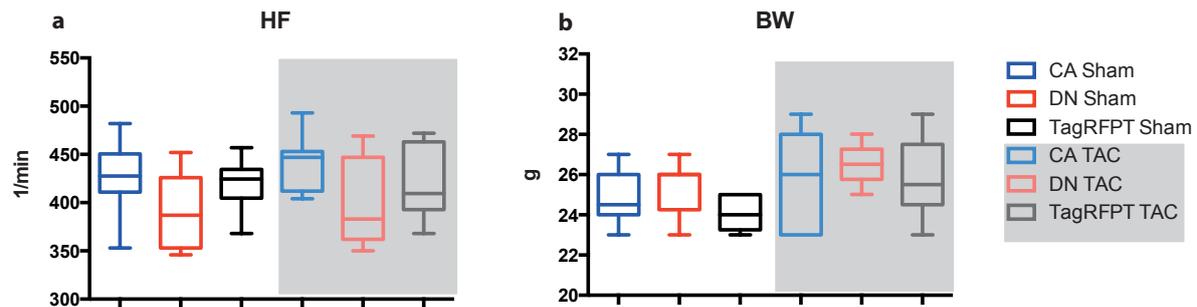


Abbildung 30: Körpergewichte und Herzfrequenz unter Narkose: a: Durchschnittliche Herzfrequenz der Mäuse während der echokardiographischen Untersuchung in Schlägen pro Minute. b: Gewicht der Tiere zum Untersuchungszeitpunkt, in g. Legende: Aufgetragen sind die Werte der Tiere der Gruppe CA (blau), DN (rot), und TagRFPT (schwarz bzw. grau), die Werte der TAC-operierten Tiere sind dabei grau hinterlegt.

Das interventrikuläre Septum:

Die Dicke des interventrikulären Septums zeigte nach der Sham-Operation in der Phase der Diastole eine signifikant größere Dicke in der Gruppe DN, gegenüber CA ($p = 0,0011$) und TagRFPT ($p < 0,0001$), in der Systole war eine signifikant größere Dicke des Septums lediglich zwischen DN und TagRFPT zu messen ($p = 0,0009$). Nach 14 Tagen der TAC-induzierten Hypertrophie-Entwicklung war das Septum in der Diastole in der Gruppe DN signifikant dicker als in der Gruppe CA ($p = 0,0008$) oder TagRFPT ($p = 0,0068$). Innerhalb der Transduktionsgruppen DN, CA und TagRFPT war diastolisch in jeder Gruppe eine signifikante Zunahme dieser Dicke nach Aortenkonstriktion zu beobachten. (DN: $p < 0,0001$; CA: $p = 0,0008$; TagRFPT: $p < 0,0001$). Auch in der Systole bestand diese hypertrophe Zunahme innerhalb der jeweiligen Gruppe (CA: $p = 0,0005$); DN: $p < 0,0001$; TagRFPT: $p < 0,0001$).

Der linksventrikuläre Innendurchmesser:

Bei diesem Messparameter ist erwähnenswert, dass sich in der diastolischen Phase des Herzzyklus in beiden Operationsbedingungen keinerlei Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gab. Ebenso entstanden innerhalb der verschiedenen PKC ι -Versuchsgruppen keine Unterschiede zwischen den Operationsbedingungen.

In der systolischen Phase des Herzzyklus zeigte sich lediglich eine Zunahme des Innendurchmessers in der Kontrollgruppe der TagRFPT-exprimierenden Tiere nach TAC-Operation gegenüber

der Kontrollbedingung der Sham-Operation ($p = 0,0351$). Zu bemerken ist an dieser Stelle weiterhin, dass es innerhalb der Gruppe CA bei Aortenkonstriktion im Vergleich zur Sham-Operation zu keiner Zunahme des linksventrikulären Innendurchmessers kam.

Die Ventrikelhinterwand:

In den Tieren nach Sham-Operation traten Unterschiede zwischen den Transduktionsgruppen auf. In der diastolischen Phase war in der Gruppe DN die Breite der Ventrikelhinterwand größer als in den beiden anderen Gruppen (zu CA: $p = 0,0124$; zu TagRFPT: $p = 0,0267$). In der Phase der Systole zeigte sich dagegen lediglich zwischen den Gruppen DN und TagRFPT ein Unterschied, mit einer größeren Hinterwandstärke in der Gruppe DN ($p = 0,034$); in den seit 14 Tagen mit Konstriktion versehenen Tieren war auffällig, dass die Wandstärke der Vorderwand in der Versuchsgruppe CA gegenüber den beiden anderen Gruppen (zu DN $p = 0,0008$, zu TagRFPT $p = 0,0488$) in der diastolischen Phase deutlich kleiner war. Ein vergleichbarer Unterschied entwickelte sich systolisch jedoch nicht. Durch die Aortenkonstriktion nahm innerhalb der Versuchsgruppen die Wandstärke sowohl systolisch als auch diastolisch zu (Diastole: CA: $p = 0,0004$; DN: $p < 0,0001$; TagRFPT: $p = 0,0003$; Systole: CA: $p = 0,0033$, DN: $p = 0,0416$; TagRFPT: $p = 0,0022$).

Die Ventrikelvorderwand:

Die Ergebnisse hier sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Ventrikelhinterwand. Nach der Sham-Kontrolloperation zeigte sich in der Diastole ebenfalls eine größere Wandstärke in der Gruppe DN, verglichen mit CA ($p = 0,0282$) und TagRFPT ($p = 0,0021$). Dieser Unterschied zeigte sich in der Systole lediglich zwischen den Sham-operierten Gruppen CA und DN ($p = 0,0093$). In allen Versuchsgruppen, sowie in systolischer und diastolischer Messung, nahm die Wanddicke durch die Aortenkonstriktion gegenüber der Sham-Operation signifikant zu (CA: diastolisch $p = 0,0046$, systolisch $p = 0,017$; DN diastolisch: $p < 0,0001$, systolisch $p = 0,0345$; TagRFPT diastolisch $p = 0,0003$, systolisch $p < 0,0001$).

Das linksventrikuläre Volumen

In der diastolischen Herzphase ergab sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, und unter den verschiedenen Bedingungen (Abbildung 31f). In der systolischen Herzphase dagegen nahm das linksventrikuläre Volumen innerhalb der Gruppe TagRFPT ($p = 0,0292$) durch die

Konstriktion deutlich zu. Auch hier gab es innerhalb der CA-exprimierenden Tiergruppen, wie auch in DN, zwischen Sham und TAC keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 31e).

Die Ejektionsfraktion

Innerhalb der Kontrollgruppe der Tiere, die der Sham-Operation unterzogen wurde, gibt es keinen Unterschied durch die Expression der verschiedenen PKC ζ -Varianten. Infolge der Aortenkonstriktion entwickelte sich nach 14 Tagen eine Abnahme der Ejektionsfraktion in den Gruppen DN ($p = 0,0043$) und TagRFPT ($p = 0,0144$); diese Entwicklung blieb bei Expression von CA vollständig aus. Demzufolge zeigte sich innerhalb der Tiergruppen mit Aortenkonstriktion eine deutlich größere Ejektionsfraktion in CA gegenüber DN ($p = 0,0117$) und TagRFPT ($p = 0,0317$), zu sehen in Abbildung 31d.

Die relative Ventrikelverkürzung

Da die Berechnung die gleichen Grundparameter einschließt, wie die Berechnung der Ejektionsfraktion, verhalten sich auch die beobachteten Effekte analog: Innerhalb der Sham-Tiere ergeben sich zwischen den Gruppen keine Unterschiede in der relativen Ventrikelverkürzung. Demgegenüber nimmt diese durch die Aortenkonstriktion in den Gruppen DN und TagRFPT deutlich ab (DN: $p = 0,0032$; TagRFPT: $p = 0,0152$). Eine entsprechende Entwicklung durch Konstriktion ist in der Gruppe CA nicht zu beobachten. Betrachtet man alle operierten Tiere, so zeigen die Tiere der Gruppen DN ($p = 0,0116$) und TagRFPT ($p = 0,0351$) eine geringere relative Verkürzung des Ventrikels als die CA exprimierenden Tiere (Abbildung 31c).

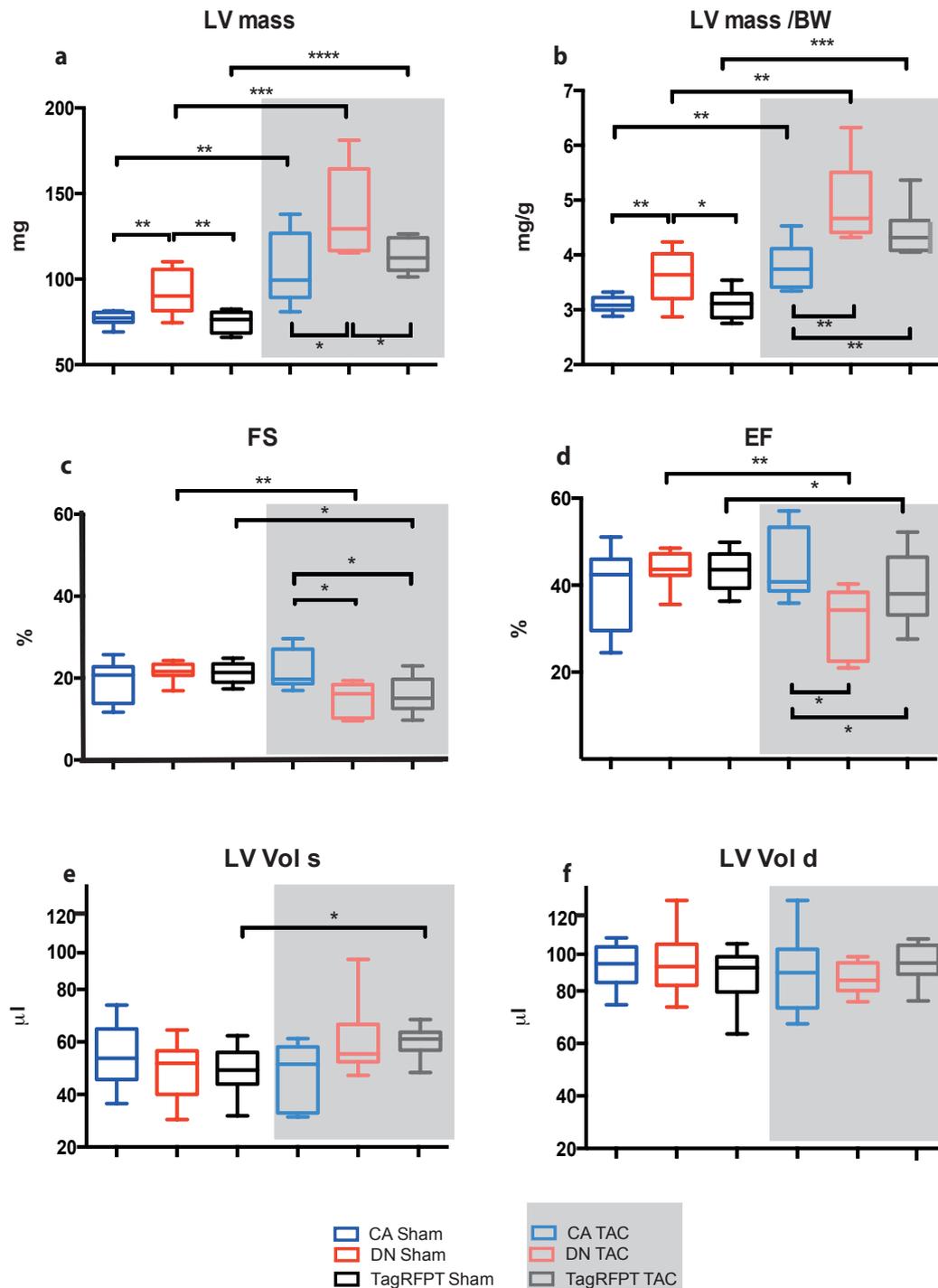


Abbildung 31: Echokardiographische Parameter nach TAC in C57Bl6/N I: Rot = DN (n(Sham) = 8, n(TAC) = 7), blau = CA (n(Sham) = 8, n(TAC) = 7), schwarz = TagRFPT (n(Sham) = 8, n(TAC) = 6); satte Farben ohne Unterlegung für Tiere der Sham-Operation, blassere Farben auf grauer Unterlegung 14 Tage TAC-induzierter Hypertrophie. Signifikante Unterschiede mit Sternchen gekennzeichnet. **a:** Linksventrikuläre Masse (LV mass) in mg; **b:** Linksventrikuläre Masse, normalisiert auf das Körpergewicht (LV mass/BW), in mg/g; **c:** Relative Ventrikelverkürzung (FS) in % **d:** Auswurfraction (EF) in % **e:** Systolisches linksventrikuläres Volumen (LV Vol s) in μl . **f:** Diastolisches linksventrikuläres Volumen (LV Vol d) in μl

Die linksventrikuläre Masse

In den der Sham-Operation unterzogenen Gruppen entsprach der Befund dem Ergebnis der vorherigen Grundcharakterisierung in Abschnitt 4.1.3: Die Gruppe DN zeigte ein größeres linksventrikuläres Gewicht, als die Gruppen CA ($p = 0,0089$) und TagRFPT ($p = 0,0058$). Dieses Verhältnis blieb so auch nach Applikation der Aortenkonstriktion erhalten: DN-exprimierende Tiere zeigten eine größere linksventrikuläre Masse als CA ($p = 0,023$) und TagRFPT ($p = 0,048$). Insgesamt nahm die linksventrikuläre Masse nach Konstriktion, gegenüber der Kontroll-Operation, in allen Expressionsgruppen zu (CA: $p = 0,0024$; DN: $p = 0,0006$; TagRFPT: $p < 0,0001$). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 31a.

Normalisierung des linksventrikulären Gewichtes auf das individuelle Körpergewicht

Die Entwicklung des Herzgewichtes ist immer auch abhängig von der Entwicklung des Individuums. Um diesen Einfluss in einer Beurteilung der Resultate der Untersuchung angemessen zu berücksichtigen, wurde das Herzgewicht nun noch auf das Körpergewicht der Tiere normiert. Diese wird als relatives Herzgewicht bezeichnet, gezeigt in Abbildung 31b.

Das Körpergewicht der Tiere war dabei zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. In der Betrachtung der Gruppen der Kontrolloperation änderte sich dementsprechend der Zahlenwert des Signifikanzniveaus, jedoch blieb das grundsätzliche Ergebnis bestehen: Die Tiere der Gruppe DN zeigten ein deutlich höheres relatives Herzgewicht als die Tiere der Gruppe CA ($p = 0,0098$) und TagRFPT ($p = 0,0058$). Unter der Bedingung der Aortenkonstriktion zeigte sich allerdings, dass nun die Gruppe CA ein signifikant kleineres relatives Herzgewicht nach 14 Tagen der Konstriktion entwickelte als die DN-exprimierenden Tiere ($p = 0,023$) oder die TagRFPT-exprimierenden Tiere ($p = 0,0488$). Innerhalb der Expressionsgruppen bestätigte sich, dass die Herzmasse in allen Fällen durch die Applikation der Aortenkonstriktion erhöht wurde (CA: $p = 0,024$; DN: $p = 0,0006$; TagRFPT: $p < 0,0001$).

Mitralklappe: E- Welle, A-Welle und isovolumetrische Relaxationszeit.

Typische Beispiele aus den Messungen jeder Gruppe sind in Abbildung 32 zu sehen. Die bei der E-Welle kennzeichnende Spitzengeschwindigkeit des Blutstromes war lediglich beim Vergleich der Tiergruppen TagRFPT und CA nach 14 Tagen Hypertrophie in der Gruppe TagRFPT ($p = 0,0453$) signifikant größer, siehe Abbildung 33a.

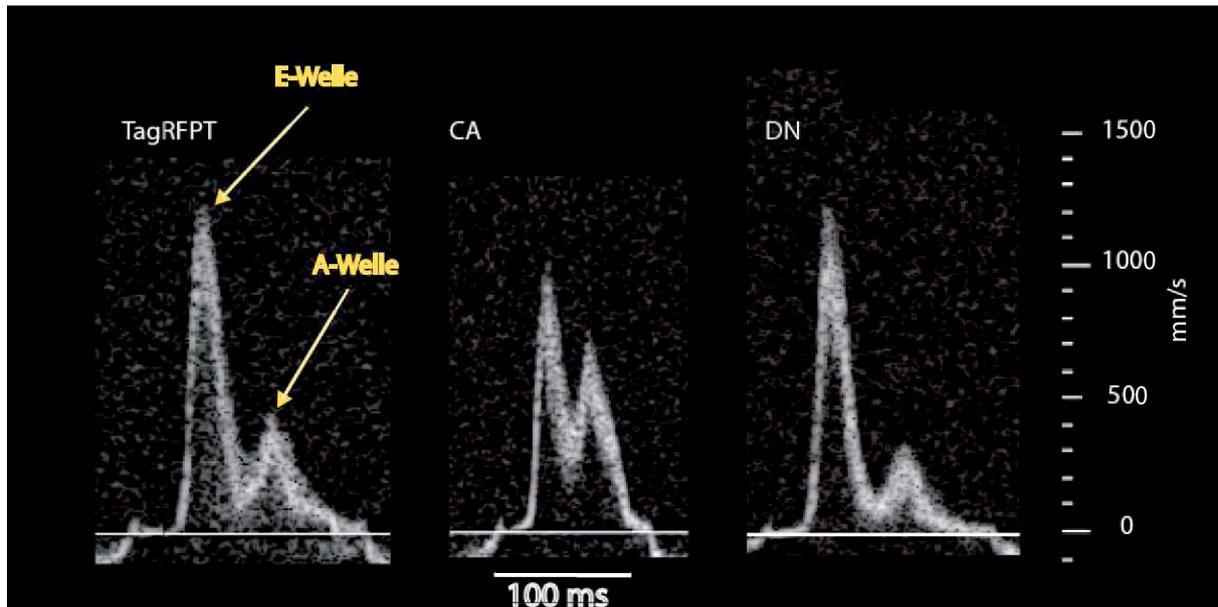


Abbildung 32: Auszüge aus der PW-Doppler-Messung, 14 Tage nach TAC: Typische Beispiele aus Tieren jeder Untersuchungsgruppe. Die Zunahme der Geschwindigkeit E-Welle und Abnahme der Geschwindigkeit der A-Welle in TagRFPT und DN war in einer Maus nach 14 Tagen Hypertrophie zu erwarten. Beide Gruppen verhielten sich hier vergleichbar. In der Gruppe DN war die zusätzliche L-Welle aus der Grunduntersuchung nicht mehr vorhanden. Die Gruppe CA zeigte ein Strömungsprofil, das dem Zustand der Kontrollbedingung nahezu entspricht.

Bei der A-Welle in Abbildung 33b zeigte sich schon in der Situation der Kontrolloperation eine signifikant kleinere Spitzengeschwindigkeit in den Tieren der Gruppe TagRFPT, verglichen mit den Werten der Tiere aus der CA-Tieren ($p = 0,0249$). Beim Vergleich der Expressionsgruppen unter der Bedingung der Aortenkonstriktion, zeigte sich eine Abnahme der Einstromgeschwindigkeit in der Gruppe DN gegenüber CA ($p = 0,013$). Innerhalb der Gruppen entwickelte sich durch Konstriktion, gegenüber der Sham-Operation, nur in der Gruppe DN eine deutliche Abnahme des Wertes der Spitzengeschwindigkeit ($p = 0,0063$).

Bei Betrachtung der isovolumetrischen Relaxationszeit in Abbildung 33d fiel kein signifikanter Unterschied zwischen allen miteinander verglichenen Gruppen auf.

Berechnete Parameter: Das Verhältnis der E-Welle zur A-Welle

Zwischen den Gruppen mit Sham-Operation zeigte sich kein Unterschied im MV E/A-Quotienten (Abbildung 33c). Ebenso entwickelte sich innerhalb der Gruppe CA zwischen den Tieren der Sham-Gruppe und der Konstriktionsgruppe kein Unterschied. Anders bei Vergleich der Operationsbedingungen in den beiden anderen Expressionsgruppen: Hier entwickelte sich sowohl bei DN als auch in der TagRFPT-Kontrollgruppe, durch die Hypertrophieinduktion

eine deutliche Zunahme sowie eine starke Streuung der einzelnen Werte; dadurch betrug der Mittelwert des Verhältnisses in der DN-Sham-Gruppe zwar $1,62 \pm 0,045$, und in der Gruppe mit Aortenkonstriktion $3,27 \pm 0,901$, jedoch führte die starke Streuung der Werte in der Hypertrophiegruppe gerade nicht zu einem signifikanten Unterschied ($p = 0,0536$). Innerhalb der Kontrollgruppe TagRFPT zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0427$).

Dementsprechend ergab sich bei den TAC-Gruppen zwischen CA und TagRFPT ein Unterschied ($p = 0,0381$), zwischen CA und DN bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle

Verglich man hier die verschiedenen Expressionsgruppen unter der Kontrollbedingung, war die Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle in der Gruppe DN langsamer ($p = 0,036$) als in den Gruppen CA und TagRFPT (Abbildung 33e).

Zudem wurde die Zeit verglichen, die benötigt wurde, um die minimale Blutflussgeschwindigkeit zu erreichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 33f zu sehen. In der Kontrolloperation war der Anstieg dieser Zeit in der Gruppe DN zu den beiden anderen Gruppen signifikant (CA: $p = 0,034$; TagRFPT: $p = 0,026$). Verglich man nun wieder innerhalb der Expressionsgruppen die Situation nach Aortenkonstriktion oder Sham-Operation, so entwickelten sich nur in der Gruppe DN- signifikante Differenzen, sowohl in Bezug auf die durch Hypertrophie langsamere Geschwindigkeitsabnahme ($p = 0,036$) als auch in Bezug auf die dafür zunehmend benötigten Zeit ($p = 0,013$).

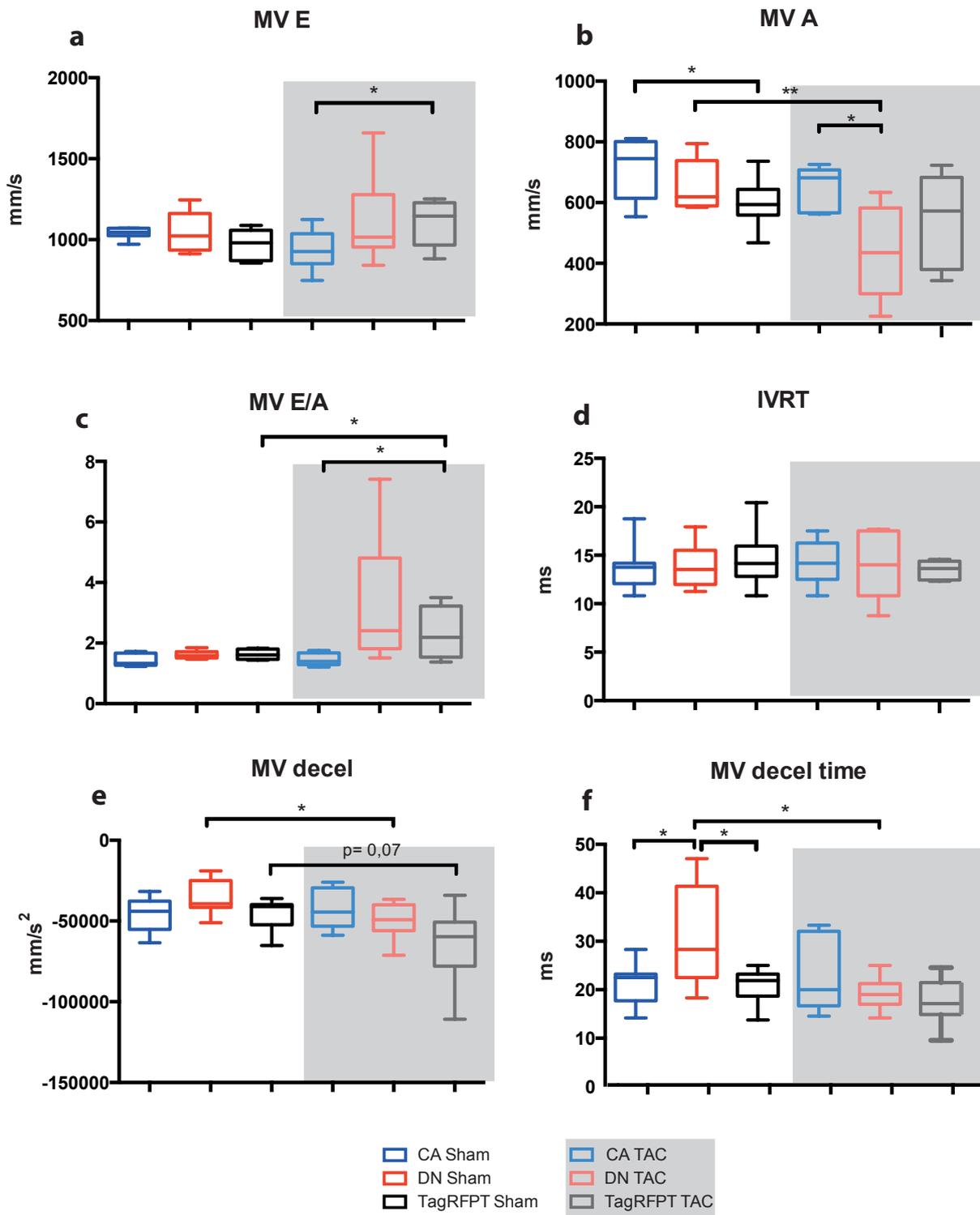


Abbildung 33: Echokardiographische Parameter nach TAC in C57Bl6/N II: PW-Doppler-Untersuchung der Mitralklappe. Farbkodierung und Anzahl der Messwerte wie in Abbildung 31. In **a**: Spitzengeschwindigkeit der E-Welle (MV E) in mm/s. **b**: Spitzengeschwindigkeit der A-Welle (MV A), in mm/s **c**: Quotient der beiden Spitzengeschwindigkeiten der Einstromwellen (MV E/A) **d**: Interventrikuläre Relaxationszeit (IVRT), in ms; **e**: Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle (MV decel) in mm/s² **f**: Für die Geschwindigkeitsabnahme benötigte Zeit (MV decel time) in ms.

Tabelle 8: Echokardiographische Untersuchung, 14 Tage nach TAC-Operation: Die Tabelle zeigt die gemessenen Parameter samt ihrer Einheit für jede gemessene Gruppe. Dem Mittelwert ist jeweils der SEM beigefügt. Die Tierzahl ist für jede Gruppe angegeben. Die Beschriftung jeder Spalte findet sich in der schwarzen Zeile. Gleiche Symbole kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Unit	CA sham	DN sham	tagRFPT sham	CA TAC	DN TAC	tagRFPT TAC
Mittelwert ± SEM		n=8	n=8	n=8	n=7	n=7	n=6
BW	g	24.88±1.356	25.38±1.302	24.13±0.835	25.86±2.340	26.50±1.049	25.83±2.041
HF	bpm	426.0±13.34	390.8±13.51	419.6±9.31	441.4±11.21	400.4±17.62	420.0±15.92
IVSd	mm	0.61±0.011 ^{•+}	0.69±0.017 ^{•+*}	0.59±0.010 ^{•*}	0.78±0.041 [•]	0.96±0.045 [•]	0.77±0.030 [•]
IVSs	mm	0.81±0.028 [•]	0.87±0.015 ^{•*}	0.78±0.016 ^{•*}	1.03±0.042 [•]	1.15±0.061 [•]	0.98±0.055 [•]
LVIDd	mm	4.42±0.060	4.45±0.090	4.36±0.086	4.36±0.127	4.42±0.099	4.46±0.071
LVIDs	mm	3.52±0.263	3.43±0.331	3.44±0.279 [•]	3.40±0.366	3.76±0.369	3.75±0.173 [•]
LVPWd	mm	0.60±0.013 ^{•+}	0.68±0.022 ^{•+*}	0.61±0.008 ^{•*}	0.72±0.022 ^{•■}	0.92±0.036 ^{•■}	0.85±0.053 ^{•■}
LVPWs	mm	0.83±0.033 [•]	0.93±0.047 ^{•*}	0.81±0.023 ^{•*}	1.03±0.047 [•]	1.07±0.037 [•]	1.01±0.050 [•]
LVAWd	mm	0.61±0.013 ^{•+}	0.66±0.015 ^{•+*}	0.60±0.009 ^{•*}	0.82±0.063 [•]	0.87±0.034 [•]	0.75±0.042 [•]
LVAWs	mm	0.84±0.029 ^{•+}	0.91±0.035 ^{•+}	0.77±0.029 [•]	1.07±0.084 [•]	1.08±0.069 [•]	0.98±0.070 [•]
LV Vol d	μl	89.60±2.98	90.39±4.38	86.01±3.83	86.48±6.01	84.73±2.55	90.59±3.31
LV Vol s	μl	54.76±4.24	49.14±3.87	49.14±3.27 [•]	48.26±4.49	61.07±5.70	60.15±2.68 [•]
EF	%	39.33±3.34	43.57±1.59 [•]	43.23±1.61 [•]	44.51±3.04 ^{•■}	32.15±2.84 ^{•■}	33.26±3.44 ^{•■}
FS	%	19.21±1.79	21.43±0.90 [•]	21.19±0.90 [•]	22.05±1.80 ^{•■}	15.18±1.45 ^{•■}	15.83±1.85 ^{•■}
LV mass	mg	76.93±1.41 ^{•+}	91.78±4.68 ^{•+*}	75.00±2.16 ^{•*}	105.7±8.07 ^{•■}	138.8±9.84 ^{•■}	113.7±4.02 ^{•■}
LV mass/BW	mg/g	3.10±0.051 ^{•+}	3.62±0.167 ^{•+*}	3.11±0.093 ^{•*}	3.80±0.183 ^{•■}	4.94±0.306 ^{•■}	4.42±0.197 ^{•■}
MV E	mm/s	1038±12.99	1053±42.59	971±32.04	938±46.90 [■]	1119±104.3	1107±59.24 [■]
MV A	mm/s	713±35.74 [#]	653±29.13 [•]	600±27.45 [#]	653±28.75 [■]	436±66.01 ^{•■}	539±70.47
MV E/MV A		1.44±0.073	1.62±0.045	1.63±0.058 [•]	1.46±0.085 [■]	3.27±0.901	2.343±0.391 ^{•■}
IVRT	ms	13.87±0.94	13.91±0.78	14.64±1.01	14.29±0.85	13.73±1.23	13.50±0.42
MV decel	mm/s ²	-45721±3724	-35430±3753	-45152±3518	-42645±4600	-49705±4865	-64600±10326
MV decel t	ms	21.41±1.53 ⁺	31.15±3.63 ^{•+*}	20.91±1.26 ^{•*}	22.44±2.80	19.23±1.27 [•]	17.60±2.02

4.1.6 Nachweis der Expression auf Proteinebene

Die zuvor beobachteten Unterschiede zwischen den Tiermodellen könnten auch auf ein unterschiedliches Expressionsniveau der PKC ι -Konstrukte bei den unterschiedlichen Mauslinien und Altersgruppen zurückgehen. Daher wurde diese Expression mit der Western Blot-Methode untersucht. Zunächst wurden die neonatal transduzierten FVB/N-Mäuse mit den dreiwöchig injizierten C57Bl6/N-Mäusen verglichen.

Gezeigt wird das Ergebnis der Western Blot-Analyse der Proteinexpression der nach viraler Transduktion überexprimierten PKC ι -TagRFPT-Konstrukte sowie der Ladekontrolle EF2 (eukaryotischer Elongations-Translokations-Faktor 2). Die Ladekontrolle wurde dabei genutzt, um eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit Protein zu zeigen.

In sämtlichen Proben konnte die endogene PKC ι auf der Höhe von 70 kDa identifiziert werden. Es konnten keine Unterschiede im Expressionsniveau der endogenen PKC ι zwischen den beiden Mauslinien gesehen werden.

Die überexprimierten PKC ι -TagRFPT-Fusionsproteine konnten nur in den FVB/N-Mäusen, nicht aber in den C57Bl6/N-Mäusen auf der vorhergesagten Höhe von 100 kDa nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Größe des endogenen, und des überexprimierten Proteines, rührte dabei von dem an das transduzierte Konstrukt gekoppelten TagRFPT, welches ein Molekulargewicht von 35 kDa besitzt. In Kombination mit den 70 kDa einer PKC ι entsteht somit eine Bande bei etwa 100 kDa. Bei der Probe der am ersten Lebenstag mit TagRFPT-transduzierten FVB/N-Maus konnte weder endogene noch überexprimierte PKC ι nachgewiesen werden, obgleich die Bande der endogenen PKC ι erwartet wurde. Dies liegt höchstwahrscheinlich aber an der schlechten Qualität der zur Verfügung stehenden Probe; andere Gewebeproben waren für diese Kombination aus Mauslinie und Virus nicht mehr verfügbar, und das Generieren einer neuen Probe war weder durch experimentelle Aspekte noch durch tierschutzrechtliche Gesichtspunkte vertretbar. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieses Western Blots war bereits bekannt, dass die FVB/N-Tiere für weitere Experimente ungeeignet waren.

Bei etwa 35 kDa, der spezifischen Marke für die Bande des TagRFPT-Expressionsmarkers („TagRFPT“), zeigten beide TagRFPT-Tiere eine Bande, die übrigen Proben nicht (siehe Abbildung 35). Dies war zu erwarten, da in den CA- oder DN-Tieren das TagRFPT an die

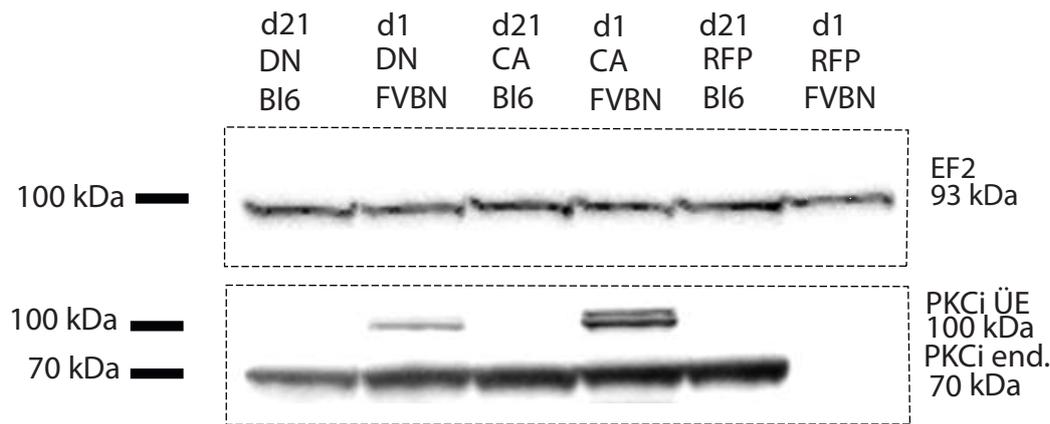


Abbildung 34: Western Blot für PKC ι : Vergleich neonatal injizierte FVB/N mit dreiwöchig injizierten C57Bl6/N. Links der Banden sind die Marker mit der zugehörigen Proteingröße in kDa angegeben. Die Banden auf dem Gel zeigen die mit den spezifischen Antikörpern markierten Proteine PKC ι der Transduktion, „PKC ι -ÜE“ (100 kDa), die endogene PKC ι (hier als „PKC ι end.“ bezeichnet; bei 70 kDa) und die Ladekontrolle EF2 bei 93 kDa. CA und DN bezeichnen den Typ der überexprimierten PKC ι , TagRFPT die Kontrolle. „FVB/N“ steht für die Proben der neonatal transduzierten FVB/N-Tiere, „Bl6“ steht für die mit 21 Tagen transduzierten C57Bl6/N-Tiere.

jeweilige Form von PKC ι gekoppelt war, und damit nicht bei 35 kDa erscheinen konnte. Die Banden der TagRFPT unterschieden sich aber: Die der C57Bl6/N-Maus ist deutlich schwächer als die der FVB/N-Probe. Es ist zu bemerken, dass die Ladekontrolle eine vergleichbare Menge aufgetragenes Protein anzeigte.

Um das Bild der Expressionsbedingungen zu vervollständigen, wurden abschließend zu allen Versuchen auch neonatale C57Bl6/N-Mäuse mit den verschiedenen viralen Vektoren transduziert, und, nach der vergleichenden echokardiographischen Untersuchung, mit den neonatal transduzierten FVB/N-Tieren hinsichtlich der Proteinexpression verglichen. Zudem sollte beurteilt werden, ob nach sieben Wochen die Proteinexpression in C57Bl6/N-Tieren möglicherweise wieder abgenommen hatte, was auch eine mögliche Erklärung für die fehlenden 100 kDa Banden der CA- und DN-Überexpression wäre. Daher wurden auch Proben von Tieren nach der halben Expressionszeit, bei dreieinhalb Wochen nach Transduktion, auf die Expression der Proteine untersucht. Dann wurden die Befunde der Expression von PKC ι zu beiden Zeitpunkten innerhalb der Gruppe, und zu jeweils einem Zeitpunkt zwischen den Gruppen qualitativ verglichen, siehe Abbildung 36. Als Ladekontrolle diente hier ebenfalls EF2, das in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit oberhalb der PKC-Banden (in rotem Rahmen) gezeigt wird. Wieder war die Bande der endogenen PKC ι bei 70 kDa, und die der transduzierten PKC ι bei 100 kDa zu erwarten.

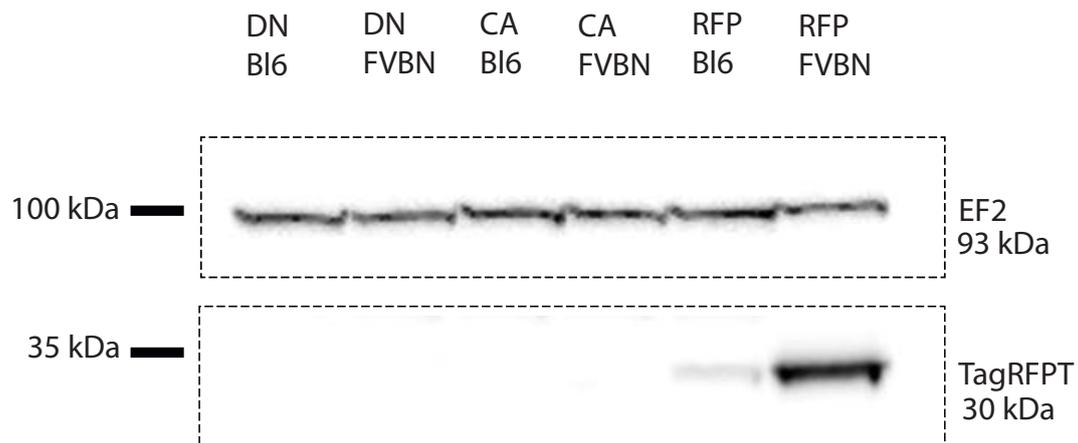


Abbildung 35: Western Blot für TagRFPT: Die aufgetragenen Proteinisolate entsprechen denen in Abbildung 34, auch die Höhe der Proteinstandardbanden ist wieder mit schwarzen Balken links skizziert, inklusive der zugehörigen Größe. EF2 bei 93 kDa ist wieder die Bande der Ladekontrolle, vergleichbar in allen Isolaten; mit TagRFPT ist die Laufhöhe des Markerproteins bei 30 kDa bezeichnet. Dieses wurde in den Proteinisolaten beider Kontrollmäuse (RFP-BI6 und RFP-FVBN) detektiert, in der BI6-Maus jedoch deutlich schwächer. In den anderen Tieren war hier keine Bande zu sehen, da TagRFPT an die überexprimierte PKC ι gebunden ist.

Die Ladekontrolle war überwiegend vergleichbar, lediglich die beiden FVBN-Tiere der siebten Expressionswoche zeigten eine schwächere Beladung der Geltasche mit Protein. Ebenfalls war dort das Signal der endogenen PKC ι schwächer, als bei allen anderen, bei denen die Bandenstärke vergleichbar war. Trotz der schwachen Beladung war jedoch in CA-FVB/N nach sieben Wochen eine Expression der PKC ι bei 100 kDa zu sehen. Insgesamt war bei neonataler Injektion bei allen CA- und DN-PKC ι -exprimierenden Tieren eine Bande zu sehen. Es gab zwischen den beiden Zeitpunkten bei den C57Bl6/N-Tieren keinen deutlichen Unterschied, bei FVB/N dagegen stieg die Expression, auch im Kontext der schwächeren Beladung, offenbar an. Da es sich nur um exemplarische Western Blot-Untersuchungen handelt, wurde diese Beobachtung jedoch nicht statistisch ausgewertet. Hier war zu erkennen, dass FVB/N grundsätzlich einen Vorteil im Expressionsniveau zeigt; innerhalb der C57Bl6/N-Tiere, die aufgrund der besseren Zellisolation interessant waren, war in Bezug auf das Expressionslevel die neonatale Injektion überlegen. In den TagRFPT-exprimierenden Tieren war auf gleicher Höhe keine Bande erkennbar. Knapp unterhalb der 100 kDa-Bande war bei TagRFPT-FVB/N und CA-FVB/N nach dreieinhalb Wochen eine schwache Bande erkennbar, und bei allen Proben unterhalb der 70 kDa-Bande, die jedoch nicht der endogenen oder überexprimierten PKC ι zugewiesen werden kann. Es handelte sich sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Die

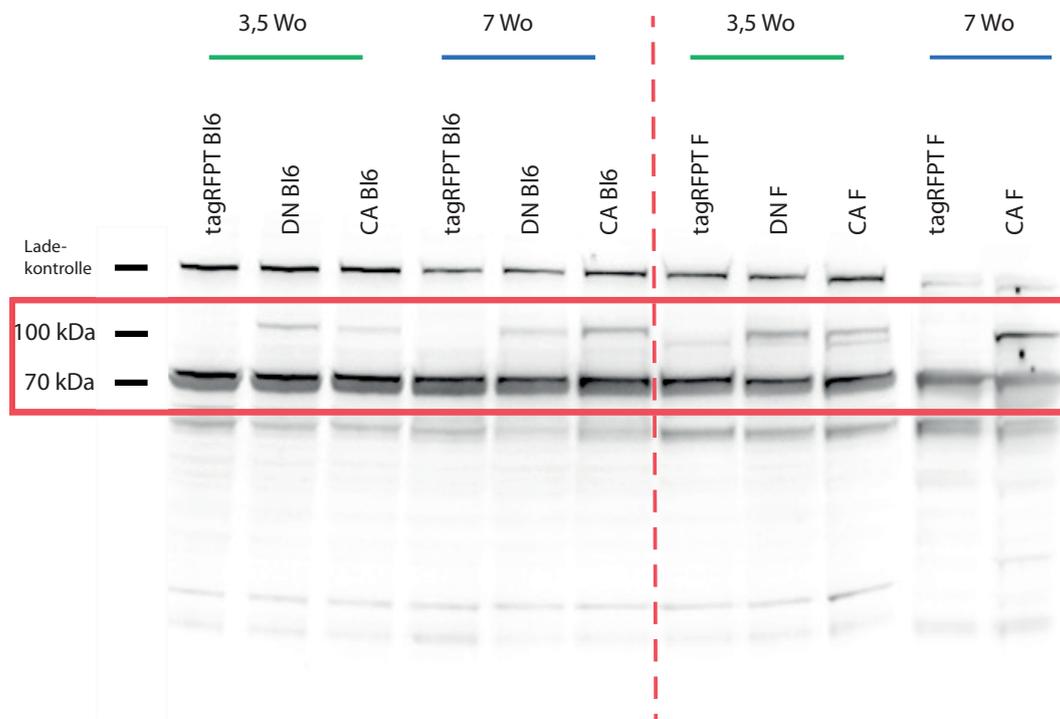


Abbildung 36: AAV-Injektion in neonatale Mäuse: Vergleich der Tiere der Linien C57Bl6/N und FVB/N nach neonataler Transduktion. Der Proteinstandard in der ersten Spalte links zeigt die Laufhöhe der Banden. Die spezifische Bande der überexprimierten PKC α lag wieder bei etwa 100 kDa, die der endogenen PKC α bei 70 kDa, diese beiden Banden wurden zur Übersichtlichkeit hier rot umrandet. Links der gestrichelten roten Linie befanden sich Proben von Tieren der C57Bl6/N-Linie (BI6), rechts Proben der FVB/N-Linie (F). Es handelte sich jeweils um Proben, die 3,5 Wochen (grüner Balken) oder 7 Wochen (blauer Balken) nach Transduktion entnommen wurden. TagRFPT bezeichnet die Kontrolle, hier sollte sich keine Bande bei 100 kDa finden; DN und CA bezeichnen den jeweiligen PKC α -Aktivitätstyp überexprimierende Tiere. Die oberste Bande ist die Ladekontrolle. Die Beladung der 7 Wo-CA F- und TagRFPT- Tasche im Gel war schwächer als bei dem Rest der Proben. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Frau Monika Barth.

hier gezeigte Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Frau Monika Barth, ebenfalls aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes.

4.1.7 Konfokalmikroskopische Untersuchung der isolierten Kardiomyozyten

Da die Aktivität der PKC α , wie aus der echokardiographischen Untersuchung ersichtlich, einen Einfluss auf das Herzwachstum zu haben schien, war es naheliegend, die Größe der isolierten Herzmuskelzellen zu betrachten. Infolge typischer Hypertrophie hätte deren Größe zugenommen, und damit die Größenzunahme des gesamten Herzens bewirkt.

Anhand isolierter Kardiomyozyten sollte die Zellgröße bestimmt werden. Diese sollte, wenn Hypertrophie vorläge, gegenüber der Vergleichsgruppe zugenommen haben. Die dafür aus den Zellisolaten konfokalmikroskopisch aufgenommenen Zellbilder wurden mit dem Programm ImageJ prozessiert und analysiert. Aus jeweils fünf Tieren wurden für die Gruppe DN $n = 222$ Zellen gemessen, für CA $n = 235$ Zellen, für TagRFPT $n = 168$ Zellen. Dabei wurden Bilder von Zellen aus den gleichen Isolationen verwendet, die später auch für die Bestimmung der T-tubulären Regularität genutzt wurden. Da die Werte nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney-Test zur statistischen Analyse genutzt, und statistische Ausreißer ausgeschlossen.

In Abbildung 37a sind, wie üblich, die Werte der Zellgrößen der Gruppe TagRFPT in schwarzweiss, die der Gruppe CA in blau, und die der Gruppe DN in rot dargestellt, in Quadratmikrometern (μm^2). In der Kontrollgruppe TagRFPT ergab sich eine mittlere Größe von $2181 \mu\text{m}^2$ mit einem SEM von $\pm 60,7 \mu\text{m}^2$ für die gemessenen Zellen. Im Vergleich dazu waren die Zellen der Gruppe CA kleiner ($2022 \pm 42,7 \mu\text{m}^2$), und die der Gruppe DN größer ($2229 \pm 48,7 \mu\text{m}^2$), was allerdings nur einen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Zellgrößen von CA und DN ergab ($p = 0,003$).

In Abbildung 37b ist eine beispielhafte Zelle zu sehen, die an ihrer äußeren Membran zur Messung ihrer Fläche im Fokusbereich umrandet wurde. Die schmalen roten Streifen stellen die Membraneinstülpungen der T-Tubuli dar.

4.1.8 Untersuchung der Regularität der T-Tubuli

Die rechtwinkligen Membraneinstülpungen, die so genannten T-Tubuli, weisen in gesunden Herzmuskelzellen eine sehr regelmäßige Anordnung auf, dagegen ist ihre Anordnung unter pa-

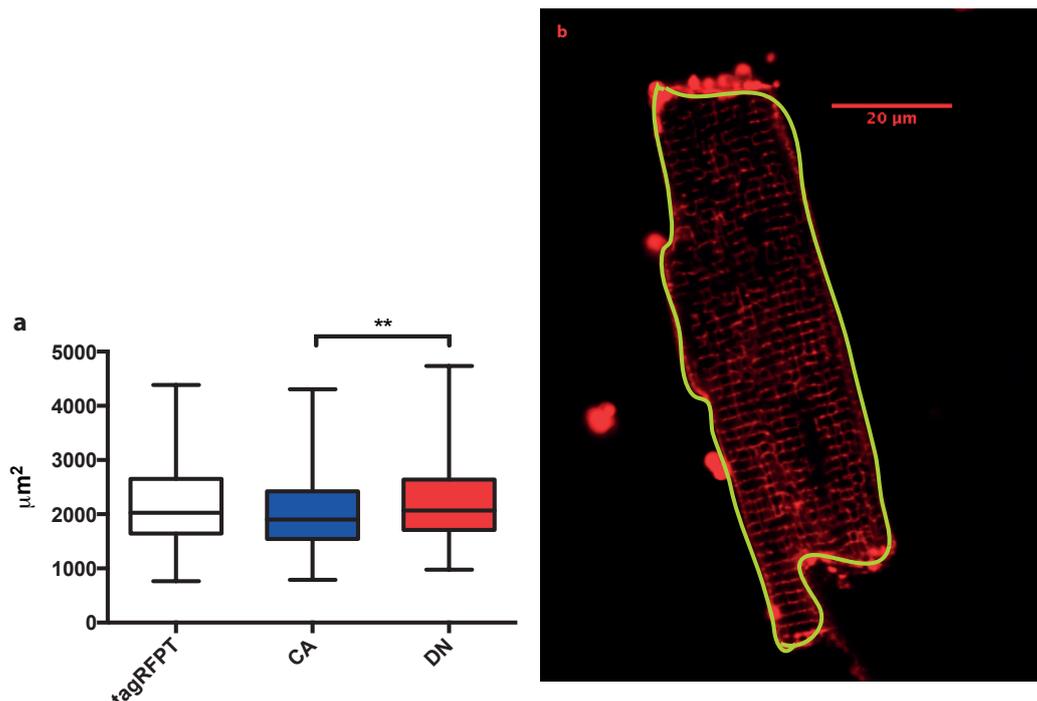


Abbildung 37: Konfokalmikroskopisch gemessene Zellgrößen: a: Abgebildet sind die Zellgrößen in μm^2 der konfokalmikroskopisch untersuchten Zellen der Gruppen TagRFPT (schwarz), CA (rot) und DN (blau). Die Kontrollgruppe TagRFPT unterschied sich nicht signifikant von CA oder DN, dagegen waren die Zellen der Gruppe CA signifikant kleiner als die der Gruppe DN. b: Zellgrößenmessung in ImageJ, beispielhaft. In rot wurde die Zellmembran samt ihrer regelmäßigen Einstülpungen angefärbt. Die Zelle wurde entlang der äußeren Membran umrandet, um so den Messbereich festzulegen.

thologischen Bedingungen im Herzen in Menschen und Tiermodellen zunehmend ungeordnet, und ihre Dichte nimmt zudem im Verlauf der Hypertrophie ab [118, 70, 73]. Somit stellte die Messung der räumlichen Anordnung der T-Tubuli einen von der Echokardiographie unabhängig prüfbar Parameter zur Untersuchung des pathologischen Zustandes der Herzen dar. Wenn eine Änderung der Anordnung und Verteilung der T-Tubuli in einer Gruppe messbar wäre, wäre dies ein Indiz für das Vorliegen einer kardialen Hypertrophie.

Es wurden aus jeweils 5 Tieren pro Gruppe $n = 190$ Zellen der Gruppe DN, $n = 241$ Zellen der Gruppe CA, und $n = 157$ Zellen der Gruppe TagRFPT in die Messung und Auswertung einbezogen.

Die Messung erfolgte, wie unter 3.11 beschrieben.

Schon in der zugrunde liegenden konfokalmikroskopischen Aufnahme war dabei die physiologische, regelmäßige Querstreifung der Herzmuskelzelle der TagRFPT-Gruppe (siehe Abbildung 38a) sichtbar. Die Regelmäßigkeit der T-Tubuli in den TagRFPT-Zellen bestätigte sich in der

Auswertung; die Stärke der Raumfrequenz betrug $12,97 \pm 0,33$ SEM. Dies ist ein arbiträrer Wert mit dementsprechend arbiträrer Einheit („arbitrary unit“, AU); je höher, desto regelmäßiger angeordnet waren die zugrunde liegenden Raumfrequenzen der Fluoreszenzsignale, und damit die T-Tubuli.

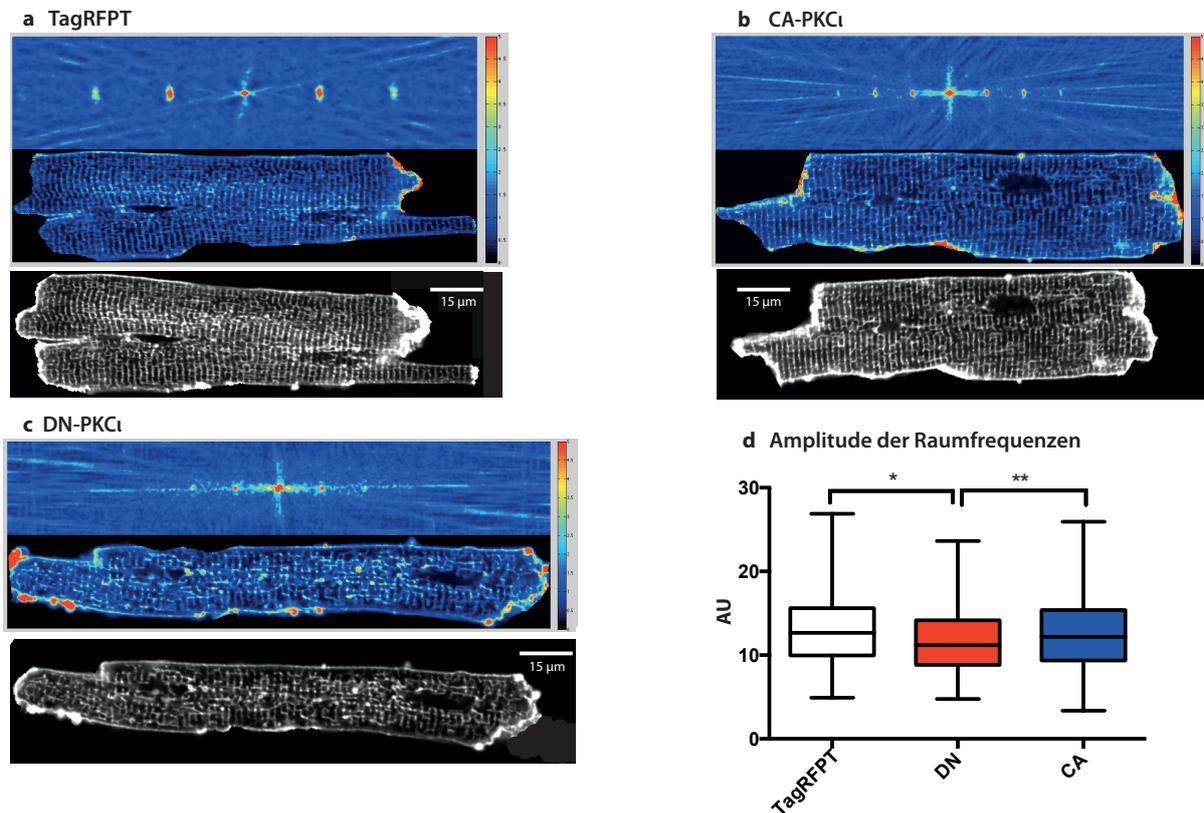


Abbildung 38: Analyse der T-tubulären Regularität isolierter Kardiomyozyten: Die Graustufen-Bilder wurden mit einem Leica TSC SP5 mit einem 63x-Objektiv aufgenommen. Abgebildet sind in a-c jeweils unten das Graustufen-Bild einer Zelle der jeweiligen Gruppe, mittig eine Abbildung der Fluoreszenzintensitäten, und oben die durch FFT erzeugte Abbildung der Frequenzdomänen der Ortsfrequenzen. Die für das mittlere und obere Bild relevante Farbskala zeigt arbiträre Werte, um starke Intensitäten (gelb-rote Farbgebung) hervorzuheben. Die Skala zur Größenbeschreibung im Graustufenbild gilt so auch für das mittlere Bild der Zellen. a: Analyse eine Zelle der TagRFPT-Gruppe; b: Zelle der Gruppe CA; c: Zelle der Gruppe DN. Bei direktem Vergleich von a, b und c war eine weniger geordnete Struktur der Querstreifung der T-Tubuli in c erkennbar. d: Die statistische Analyse der Messwerte der Raumfrequenzspitzen aller gemessenen Zellen aufgetragen; schwarz-weiß: TagRFPT (n = 157); rot: DN (n = 190); blau: CA (n = 241).

Dagegen war in den Zellen der Gruppe DN (siehe Abbildung 38c) zum Teil schon mit bloßem Auge erkennbar, dass diese Querstreifung weniger geordnet, oder teilweise völlig aufgelöst war. Die errechneten Werte Raumfrequenzspitzen lagen erwartungsgemäß auch statistisch signifi-

kant niedriger ($11,82 \pm 0,29$ SEM) als in den TagRFPT-Zellen.

Die hier abgebildete typische Zelle der Gruppe CA (siehe Abbildung 38b) zeigte ein vergleichbares Erscheinungsbild wie die TagRFPT-Zelle. Es ergab sich für die Amplitude der Raumfrequenz ein Wert von $12,55 \pm 0,27$ SEM. Damit waren die T-Tubuli der Zellen der Gruppe CA ebenfalls signifikant regelmäßiger angeordnet als die der Gruppe DN.

Es ergab sich in der statistischen Auswertung eine im Durchschnitt deutlich geringere Regularität der T-Tubuli in der Gruppe DN als in den Gruppen CA ($p = 0,0426$) und TagRFPT ($p = 0,0055$); die beiden letzteren Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der T-tubulären Regularität nicht voneinander (siehe Abbildung 38d).

4.2 Auswirkung von Hyperaldosteronismus und Hypertrophie bei inaktiver $G\alpha_q$ - und G_{11} - Untereinheit in Kardiomyozyten

4.2.1 Echokardiographische Untersuchung vor und nach sechswöchiger Applikation von Aldosteron

Die von Wiesen et al. durchgeführten Studien zu der $G\alpha_qG_{11}$ -Mauslinie ergaben, dass die Tiere mit $G\alpha_qG_{11}$ -Knockout (DKO) einen niedrigeren Blutdruck aufwiesen als die Wildtyp (wt)-Tiere. Zudem zeigten die DKO-Tiere eine geringere interstitielle Einlagerung von Kollagen im Herzen [139]. Die Herkunft dieser globalen und lokalen Effekte ist noch unklar, jedoch sind sie für die Herzphysiologie von großer Bedeutung.

Ein Hormon, das physiologischerweise in beide Prozesse involviert ist, ist das Aldosteron. So ist bekannt, dass Aldosteron den Blutdruck erhöht, und dadurch einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt, und zudem im Herzen eine profibrinogene Wirkung entfaltet [112, 143, 104].

Aus einer Studie in Kooperation mit unserem Institut zur Wirkung chronischer Aldosteronapplikation in Ratten war bekannt, dass der Gehalt an interstitiellem Kollagen durch Aldosteron erhöht war, und außerdem vermehrt atriale Arrhythmien auftraten [101]. Die Verbindung dieses Effektes mit der Rolle des $G\alpha_qG_{11}$ -Rezeptors am Herzen sollte nun untersucht werden, jedoch war es hierzu nötig, auf das von Wiesen beschriebene Mausmodell auszuweichen, da ein KO oder eine andere Beeinflussung der entsprechenden $G\alpha_qG_{11}$ -Untereinheit in Ratten noch nicht möglich ist. Es wurden von den in Tabelle 6 beschriebenen Tieren jeweils die Wildtyp (wt)-Tiere, und die Tiere mit DKO für die folgenden Untersuchungen herangezogen, um in der

hier unternommenen ersten Studie zunächst Unterschiede in den beiden „Extrembedingungen“ messen zu können.

Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden Tiere der DKO- und der wt-Gruppe für 6 Wochen durch kontinuierliche subkutane Applikation von Aldosteron einem chronischen Hyperaldosteronismus ausgesetzt. Die Applikation erfolgte mit einer speziell für diese Dauer und für die Anwendung an Mäusen optimierten osmotischen Infusionspumpe, wie in Abschnitt 3.12 beschrieben. Zuerst wurden die morphologischen und funktionellen Herzparameter echokardiographisch *in vivo* untersucht, um genotypspezifische Auswirkungen der Behandlung auf die Herzarbeit messen zu können.

Die echokardiographische Untersuchung wurde unter standardisierter Narkose vorgenommen. Unter dieser Bedingung wurde für die untersuchten Genotypen bereits in der Arbeit von Wiesen et al. ein Unterschied in der Herzfrequenz zwischen Wildtyp und DKO beschrieben, mit geringeren Herzfrequenzen bei den DKO-Tieren.

Es waren vor allem die finalen Werte nach sechswöchiger Aldosteron-Applikation von Interesse. Verglichen wurden dabei jeweils innerhalb des Genotyps die echokardiographischen Parameter der Tiere mit Aldosteron-Minipumpe (Aldo), und mit Placebo-Pumpe (Dummy). Zudem wurde innerhalb einer Behandlungsform, also Placebo oder Dummy, die beiden Genotypen, wt und DKO, verglichen. Untersucht wurden 6 Tiere der Gruppe wt-Dummy, 6 Tiere der Gruppe wt-Aldo, 6 Tiere der Gruppe DKO-Dummy, und 5 Tiere der Gruppe DKO-Aldo (siehe Abbildung 39). Die Tiergruppen werden entsprechend als wt-Dummy-Gruppe, wt-Aldo-Gruppe, DKO-Dummy-Gruppe, und DKO-Aldo-Gruppe bezeichnet.

Bei dieser Messung ergaben sich für alle gemessenen Wanddicken (IVS, LVPW, LVAW) keine signifikanten Unterschiede nach 6 Wochen chronischen Hyperaldosteronismus.

Der Innendurchmesser des linken Ventrikels, LVID, ist in der Systole ebenfalls in allen Gruppen gleich. Im diastolischen Wert des LVID aber waren die Werte der Gruppe wt-Dummy signifikant kleiner als die der DKO-Dummy-Gruppe ($p = 0,0197$), siehe Abbildung 39a.

Dementsprechend gab es auch in dem daraus berechneten Wert des diastolischen linksventrikulären Volumens (LV Vol d) einen signifikant kleineren Wert in der wt-Dummy-Gruppe als in der DKO-Dummy-Gruppe ($p = 0,02$), siehe Abbildung 39b.

Die funktionellen Werte EF und FS zeigten keine Unterschiede zwischen den Bedingungen.

Bei den Werten des linksventrikulären Herzgewichtes zeigte sich ein signifikant größeres Gewicht in der Gruppe DKO-Dummy, gegenüber wt-Dummy ($p = 0,0296$, Abbildung 39c). Bei

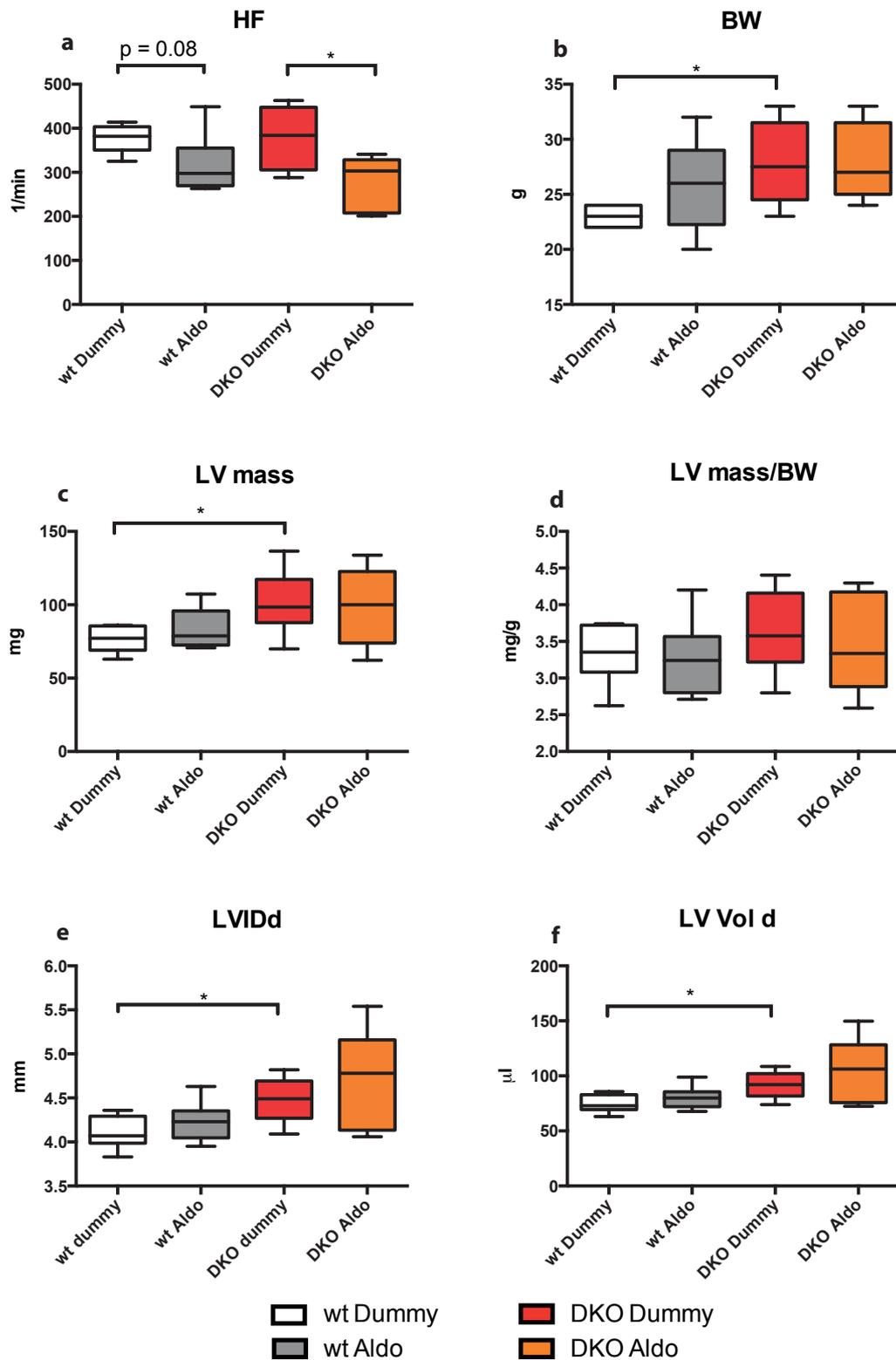


Abbildung 39: Echokardiographie nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus: In schwarz/weiß die Gruppe wt-Dummy ($n = 6$), in grau die Gruppe wt Aldo ($n = 6$), in rot die Gruppe DKO Dummy ($n = 6$), in orange die Gruppe DKO-Aldo ($n = 5$). **a:** Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min). **b:** Gewicht der Tiere in g **c:** LV mass, in mg **d:** LV mass/BW, in mg/g **e:** LVIDd in mm **f:** LV Vol d in μl .

Normierung auf das Körpergewicht zeigte sich dann, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der untersuchten Tiere mehr gab (Abbildung 39f).

Dies war Folge des hier deutlichsten Befundes: Die in dieser Untersuchung verwendeten Tiere der wt-Dummy-Gruppe waren signifikant leichter, als die aus den Gruppen DKO-Dummy ($p = 0,0122$) und DKO-Aldo ($p = 0,0082$, Abbildung 39d). Dies unterstrich die Bedeutung der Normierung der Ergebnisse des linksventrikulären Herzgewichtes auf das Körpergewicht. Da ein solcher Unterschied aus anderen Studien mit der gleichen Mauslinie nicht bekannt war, waren hier individuelle Besonderheiten der verwendeten Tiere wahrscheinlich. Hinzu kommt, dass es sich, bedingt durch das notwendige Zuchtschema, nicht um einen Vergleich von Wurfgeschwistern handelt, sondern um Tiere aus verschiedenen Elternpaaren.

Auch die Herzfrequenz, die hier ebenfalls signifikante Unterschiede aufwies, musste betrachtet werden: Unter Aldosteronbehandlung war in DKO-Tieren die Herzfrequenz während der ultrasonographischen Untersuchung niedriger als bei den Dummy-Tieren des gleichen Genotyps ($p = 0,0442$). Es gab keinen Unterschied zwischen den Genotypen innerhalb der Dummy- oder Aldosteron-Behandlung, und keinen zwischen den Behandlungen im wt-Genotyp.

Diese Frequenzunterschiede können bedeutenden Einfluss auf die Untersuchung des Strömungsprofils des Blutflusses durch die Mitralklappe haben.

Bei Messung dieses Blutflusses zeigten sich bei den Strömungsgeschwindigkeiten der E- und A-Welle keine Unterschiede zwischen den Gruppen, ebenso in der IVRT. Auch das Verhältnis der E-Welle zur A-Welle wies keine Unterschiede auf.

Tabelle 9: Echokardiographische Parameter nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus: Die Tabelle zeigt alle gemessenen Werte der echokardiographischen Untersuchung nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus, aufgelistet in der linken Spalte, die Gruppen sind in der schwarzen Kopfzeile bezeichnet, die jeweilig Tierzahl darunter angegeben. Die Werte verstehen sich als Mittelwert mit SEM. Gleichfarbige Kreise kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Einheit	wt Dummy	wt Aldo	DKO Dummy	DKO Aldo
Mittelwert ± SEM		n = 6	n = 6	n = 6	n = 5
HF	bpm	377 ± 13.19	317.2 ± 27.8 [•]	378 ± 32.64 [•]	275 ± 28.3 [•]
BW	g	23 ± 0.37 [•]	25.83 ± 1.70	27.83 ± 1.5 [•]	28 ± 1.58
IVSd	mm	0.65 ± 0.012	0.64 ± 0.0299	0.76 ± 0.059	0.69 ± 0.061
IVSs	mm	0.88 ± 0.011	0.89 ± 0.02	1.02 ± 0.078	0.97 ± 0.081
LVIDd	mm	4.11 ± 0.077 [•]	4.23 ± 0.094	4.48 ± 0.11 [•]	4.67 ± 0.26
LVIDs	mm	3.11 ± 0.065	3.14 ± 0.143	3.27 ± 0.095	3.45 ± 0.326
LVPWd	mm	0.67 ± 0.014	0.69 ± 0.066	0.69 ± 0.03	0.66 ± 0.047
LVPWs	mm	0.89 ± 0.029	0.96 ± 0.051	0.96 ± 0.047	0.96 ± 0.089
LVAWd	mm	0.63 ± 0.018	0.67 ± 0.057	0.75 ± 0.057	0.67 ± 0.037
LVAWs	mm	0.91 ± 0.039	0.92 ± 0.021	1.07 ± 0.1	0.98 ± 0.029
LV Vol d	µl	74.7 ± 3.29 [•]	80.2 ± 4.27	91.8 ± 5.26 [•]	102.8 ± 13.6
LV Vol s	µl	35.4 ± 2.66	39.8 ± 4.43	43.4 ± 2.96	51.9 ± 10.91
EF	%	48.5 ± 1.98	51 ± 3.11	51.85 ± 4.71	51 ± 6.71
FS	%	24.2 ± 1.18	25.9 ± 1.91	26.81 ± 2.99	26.6 ± 4.42
LV mass	mg	76.65 ± 3.71 [•]	83.5 ± 5.8	101.3 ± 8.99 [•]	98.7 ± 12.04
LV mass/BW	mg/g	3.34 ± 0.166	3.26 ± 0.215	3.63 ± 0.23	3.45 ± 0.308
MV E	mm/s	1045 ± 72.8	1008 ± 78.1	989 ± 82	1027 ± 57.2
MV A	mm/s	532 ± 42.2	586 ± 52.9	568 ± 45.1	598 ± 66.8
IVRT	ms	14.72 ± 0.6	17 ± 1.39	13.6 ± 0.76	15.8 ± 0.6
MV E/A		2.06 ± 0.28	1.79 ± 0.201	1.77 ± 0.114	1.76 ± 0.091

4.2.2 Entwicklung der echokardiographischen Parameter unter Aldosteroneinfluss

Es ist möglich, dass bereits vor Implantation der Minipumpe mit Aldosteron, oder des Dummys, Unterschiede zwischen den Gruppen vorgelegen haben. Diese können durch den unterschiedlichen Genotyp bedingt worden sein, oder durch Unterschiede zwischen den Würfen, da es sich, bedingt durch die Kreuzungsschemata der Zucht, nicht um Geschwistertiere handeln konnte. Durch Unterschiede, die auf diesem Umstand beruhen, könnte das Resultat nach der Applikationszeit beeinflusst worden sein. Daher wurden im Folgenden das Ergebnis einer bestimmten echokardiographischen Messung vor Applikation der Aldosteronpumpe von dem entsprechenden Wert der gleichen Maus nach der Zeit des Hyperaldosteronismus abgezogen, und aus dieser Differenz die mögliche Entwicklung einer Besonderheit in diesem Parameter bestimmt. So kann man nun die während der medikamentösen Manipulation erfolgte Veränderung der Parameter innerhalb eines bestimmten Tieres beurteilen, wenn eine signifikante Änderung vorlag. So konnte beispielsweise eine Zu- oder Abnahme der Auswurfrefraktion beurteilt werden, an Stelle eines absoluten Endwertes. Dann wurden wieder die Ergebnisse innerhalb der Gruppen von Genotypen (jeweils Dummy und Aldo) sowie die Ergebnisse einer Behandlungsbedingung (jeweils wt und DKO), verglichen. In der Auswertung ergibt sich ein insgesamt etwas abweichendes Bild gegenüber dem Ergebnis aus Abbildung 39.

Zunächst haben alle Tiere während dieser sechs Wochen an Körpergewicht zugenommen, ohne, dass darin Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar sind (Abbildung 40a). Dagegen nahm die Herzfrequenz vor allem in den Aldo-Gruppen ab, was zu einer signifikanten Differenz zwischen den Gruppen Wildtyp-Dummy, und Wildtyp-Aldo führte (Abbildung 40d).

Die gemessenen Parameter IVS, LVID und LVPW zeigten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Werten. Dagegen war die linksventrikuläre Vorderwand (LVAW) in der Diastole in der Wildtyp-Dummy-Gruppe nach sechs Wochen nahezu unverändert. Im Vergleich dazu war die Dicke der LVAW in der DKO-Dummy-Gruppe diastolisch signifikant gestiegen ($p = 0,0264$). In der Systole zeigte sich an der LVAW kein besonderer Befund.

Das systolische und diastolische linksventrikuläre Volumen nahm in allen Gruppen im untersuchten Zeitraum leicht zu, und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Auswurfrefraktion, wie auch der relativen Ventrikelverkürzung, zeigte sich jedoch eine signifikante Änderung zwischen den Wildtyp-Dummy-Tieren, und den Wildtyp-Aldo-Tieren ($p = 0,0481$ in EF, siehe Abbildung 40b; $p = 0,0416$ in FS); EF und FS zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung.

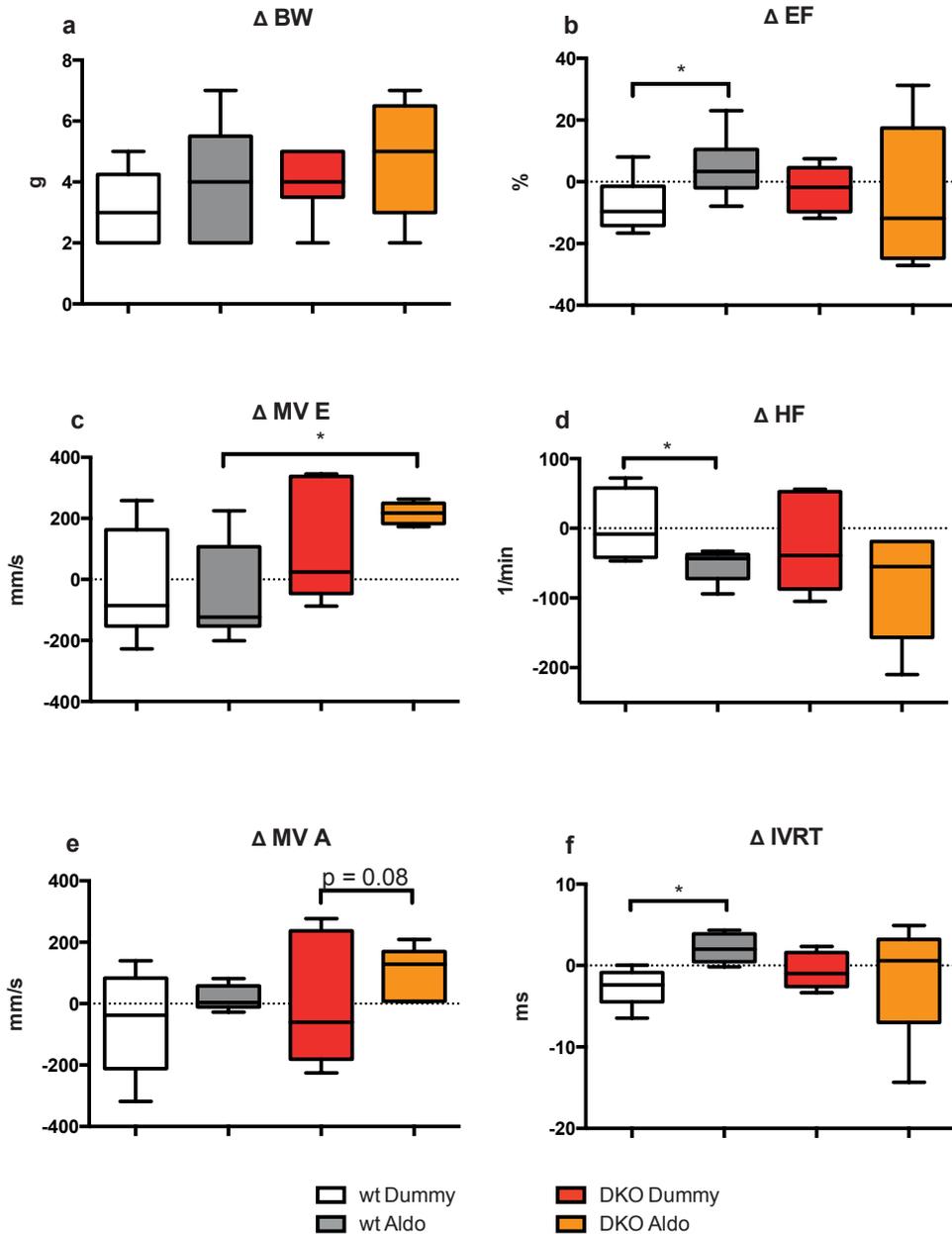


Abbildung 40: Entwicklung der echokardiographischen Messparameter während des Hyperaldosteronismus. Der Messwert vor Implantation der Minipumpe wird vom Messwert der gleichen Maus nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus oder Dummy abgezogen. Die Boxplots sind farblich codiert und nummeriert, wie in Abbildung 39. a: Körpergewichts-Differenz (Δ BW) in g; b: Δ EF in %; c: Δ MV E, in mm/s; d: Δ HF in Schlägen/min; e: Δ MV A in mm/s; f: Δ IVRT in ms.

In allen Tieren hat das linksventrikuläre Gewicht zugenommen, das auf das Körpergewicht normierte linksventrikuläre Gewicht dagegen änderte sich innerhalb der Gruppen kaum. Keine Gruppe wich in dieser Entwicklung besonders von den anderen ab.

Bei Betrachtung der Geschwindigkeit der E-Welle zeigte sich, dass die Geschwindigkeit bei den DKO-Tieren zugenommen hatte, während sie bei beiden Wildtyp-Gruppen annähernd gleich blieb. Dieser Unterschied war zwischen den Wildtyp-Aldo- und DKO-Aldo-Tieren signifikant ($p = 0,0303$), siehe Abbildung 40c. Bei der Geschwindigkeit der A-Welle fielen keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung durch Aldosteron auf, gezeigt in Abbildung 40e. Die isovolumetrische Relaxationszeit zeigt dagegen eine signifikante Zunahme dieser Zeit in der Wildtyp-Gruppe nach Aldosteron-Behandlung verglichen mit der Wildtyp-Dummy-Gruppe ($p = 0,0021$) in Abbildung 40f. Das Verhältnis der E-Welle zur A-Welle zeigte keine signifikanten Veränderungen in einer Gruppe gegenüber den anderen Versuchsgruppen.

4.2.3 Der Aldosterongehalt im Serum

Diese Messung war notwendig, um die Erhöhung des Aldosteronspiegels im Blutserum infolge der Applikation zu quantifizieren. Dies sollte die Funktionsfähigkeit des Modelles, und damit die Aussagekraft der echokardiographischen Befunde untermauern.

Die für diese Messung genutzten Proben wurden aus den gleichen Tieren gewonnen, die auch mittels Echokardiographie untersucht wurden. Eine Probe in der Gruppe DKO-Dummy war dabei aufgrund von Hämolyse nicht messbar. Die gesamte Messung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sandra Ruppenthal durchgeführt. Die statistische Auswertung der Messungen ist in Abbildung 41 zu sehen. Der Aldosterongehalt im Serum in Wildtyp-Tieren mit Pumpe war deutlich höher ($p = 0,012$) als in Wildtyp-Tieren mit Dummy; gleiches galt für die mit Aldosteronpumpe behandelten Tiere des DKO-Genotypen, gegenüber deren Dummy-Kontrolle ($p = 0,0008$). Die beiden Aldosteron-behandelten Gruppen unterschieden sich im Aldosterongehalt des Serums nicht. In den Proben der Dummy-Tiere zeigte sich, dass die Wildtyp-Tiere einen signifikant höheren Serum-Aldosterongehalt aufwiesen als die DKO-Dummy-Gruppe ($p = 0,047$). Die Schwankungsbreite der Werte war teilweise groß, besonders in den Tieren mit chronischer Applikation; die Gruppe wt Aldo zeigte eine Konzentration von $1315 \pm 940,8$ pg/ml (Standardabweichung), DKO-Aldo $1347 \pm 604,4$ pg/ml. Demgegenüber waren in den Dummy-Tieren nicht nur die Aldosteronlevel geringer, sondern auch die Abweichung: wt-Dummy mit $405,5 \pm 220,3$ pg/ml, DKO-Dummy mit $168,4 \pm 64,59$.

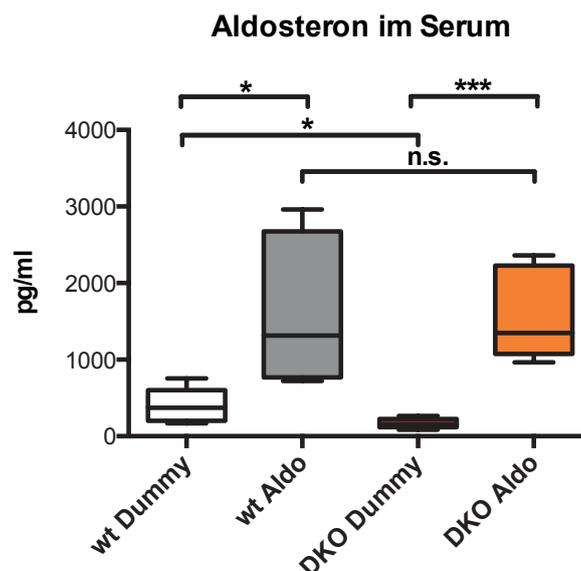


Abbildung 41: Aldosteron Gehalt im Serum: Gemessen wurde der Aldosteron Gehalt in Pikogramm (pg) je ml Serum. Tierzahlen und Farbkodierung wie in 39, nur in DKO Dummy n=5. Die Serum-Aldosteron-Werte der mit Aldosteron-Minipumpe behandelten Tiere waren erwartungsgemäß deutlich höher als in den Dummy-Gruppen. Die beiden Aldo-Gruppen unterschieden sich nicht. Bei den Kontrolltieren waren die Aldosteronwerte in den DKO-Tieren signifikant niedriger als in den Wildtyp-Tieren.

4.2.4 Kollagen Gehalt in den histologischen Schnitten

Aldosteron wirkt profibrinogen [18], während in den DKO-Tieren bereits gezeigt wurde, dass sich in älteren Tieren weniger interstitielles Kollagen im Herzen gebildet hatte als in den wt-Tieren [139]. Folglich konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der $G\alpha_qG_{11}$ -DKO möglicherweise dem profibrinogenen Effekt des Hyperaldosteronismus entgegenwirken könnte, und unter Umständen die Kollageneinlagerung durch Aldosteron verhindern könnte. Da aus den echokardiographischen Daten bereits ein Effekt ersichtlich wurde, nämlich, dass die Wirkung von Aldosteron auf den kardialen Phänotyp in verschiedenen Parametern abhängig war vom Vorhandensein oder Fehlen der $G\alpha_qG_{11}$ -Untereinheiten, sollte nun auch überprüft werden, ob der profibrinogene Effekt von Aldosteron im DKO wesentlich milder ausfiele als in den Wildtyp-Hezen, oder sogar ausbliebe.

Hierzu wurden die Herzen der entsprechend behandelten Tiere entnommen, histologisch präpariert, und mit Pikrosiriusrot gefärbt, wie in Abschnitt 3.14 beschrieben. Die Auswertung erfolgte dann, wie im Abschnitt 3.15 beschrieben. Dabei ist zu erwähnen, dass die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des gefärbten Kollagens zur Ergänzung der Polarisationsmi-

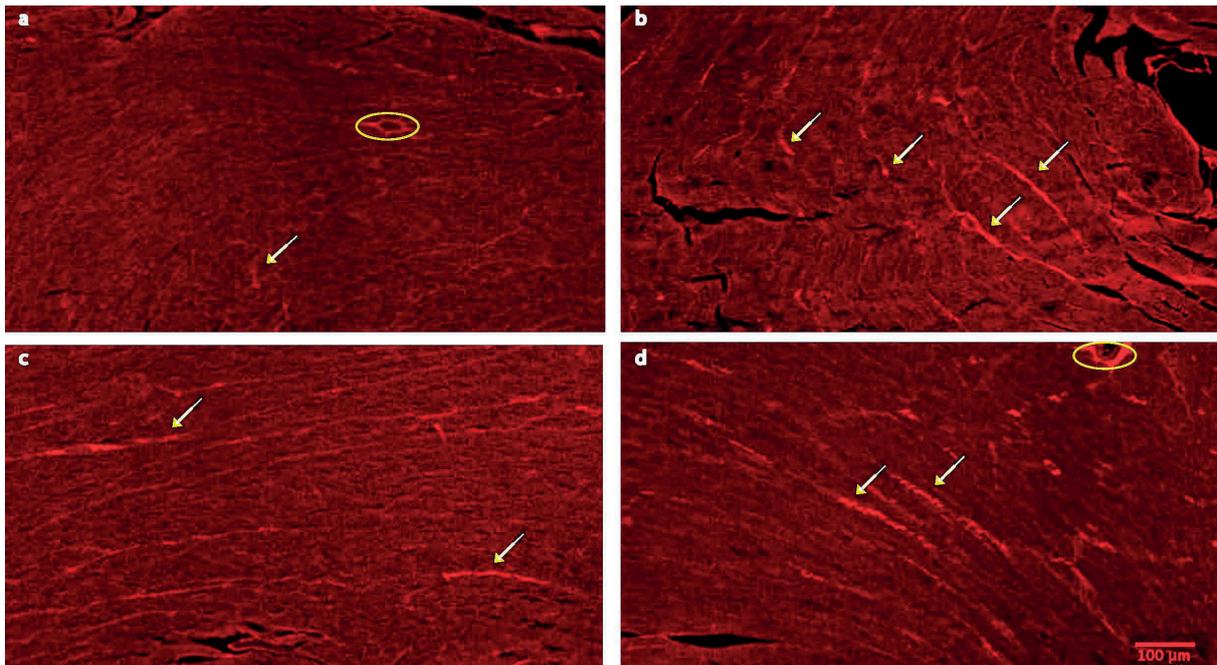


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der histologischen Schnitte: a Wildtyp-Dummy b Wildtyp-Aldo c DKO-Dummy d DKO-Aldo; kleine Gefäße, erkennbar am ringförmig sichtbaren kollagenen Bindegewebe der Gefäßwand, wurden oval umrandet; Pfeile auf hellrote Bereiche markieren Siriusrot-Fluoreszenz des angefärbten Kollagens. Helligkeit und Farbintensität der gesamten Abbildung wurden nachträglich erhöht. Das Kollagen zeigte deutlich mehr Emission als das umgebendes Herzgewebe. Man sah die für interstitielle Fibrose typische „Bänderung“ des Gewebes durch die Kollagenanordnung.

kroskopie vor allem deshalb gewählt wurde, weil eine parallele Anordnung der Kollagenfasern, die für eine korrekte Messung durch Ablenkung des Lichtes im richtigen Winkel nötig wäre, nicht für das gesamte enthaltene Kollagen angenommen werden kann. Andererseits zeigte sich, dass auch Präparationsartefakte eine Polarisation aufweisen konnten, und damit ebenfalls die Aussagekraft des Ergebnisses beeinträchtigten. Zudem konnte eine spezifische Unterscheidung zwischen „echtem“ Kollagen und anderen Strukturen, die das Licht entsprechend polarisierten, mit dieser Methode nicht getroffen werden. Daher wurde eine ergänzende Messung mit einer zweiten Messmethode durchgeführt, die auf dem Prinzip der spezifischen Fluoreszenz von Siriusrot beruhte.

Es zeigte sich vor allem, dass die Ergebnisse dieser Untersuchungen wie vermutet davon abhängen, welches Messprinzip und Messsystem genutzt wurde. Die verwendeten Präparate in diesen Messungen waren identisch, und in beiden Fällen wurde ein 20x-Objektiv genutzt. Somit beruhen Unterschiede zwischen den Ergebnissen nur auf der Messmethode.

Die Messung des Kollagengehaltes mittels polarisiertem Lichtes ergab keine statistisch signifi-

kanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, und zudem fielen die Messwerte insgesamt geringer aus als Werte der fluoreszenzmikroskopischen Messung (Abbildung 43a). In der Polarisationsmessung ergab sich für die Herzschnitte der DKO-Dummy-Tiere ein mittleren Anteil an polarisierendem Kollagen von $3,116 \pm 2,205$ % (SD); für die Schnitte der mit Aldosteron behandelten DKO-Tiere ergab sich ein Wert von $4,652 \pm 1,778$ %. Zur Kontrolle wurden Schnitte von Wildtyp-Tieren mit Dummy untersucht, diese zeigten $4,044 \pm 2,988$ % polarisierendes Kollagen. Wildtyp-Tiere mit sechswöchiger Aldosteron-Behandlung zeigten einen Anteil von $3,958 \pm 2,48$ % polarisierendes Kollagen.

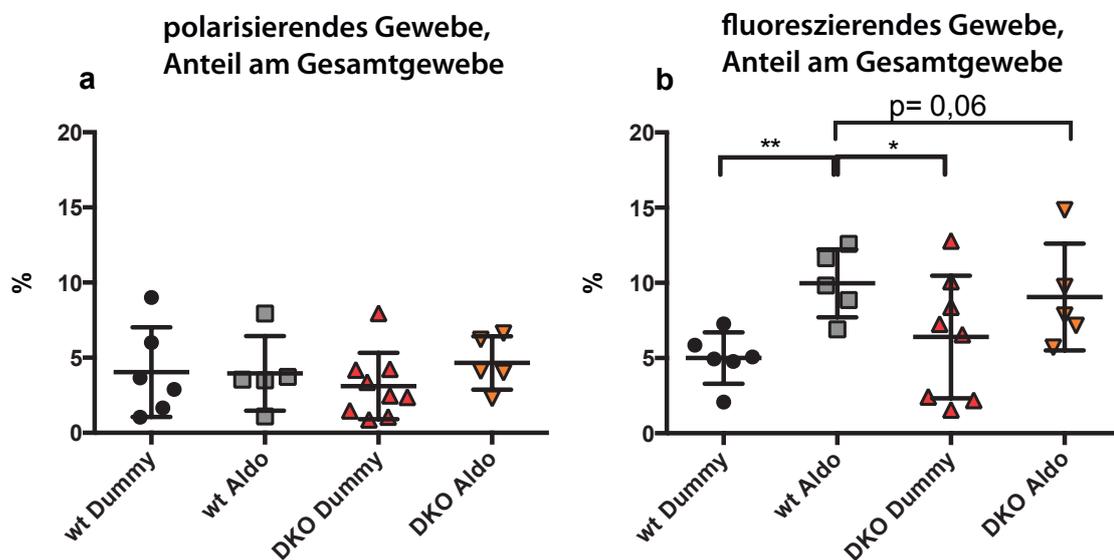


Abbildung 43: Analyse des Kollagenanteils im Herzgewebe mittels Lichtpolarisation und Konfokalmikroskopie: In beiden Graphen ist der Anteil des gemessenen Kollagens pro Herzgewebe (in %) je Gruppe dargestellt, aufgrund teilweise geringer Tierzahlen in Form der einzelnen Datenpunkte. Rote Dreiecke: DKO-Dummy, n = 9 (n = 8 in der Fluoreszenzmessung, da ein statistischer Ausreißer herausgenommen wurde); orange Dreiecke: DKO Aldo, n = 5; schwarze Kreise: wt Dummy, n = 6; graue Quadrate: wt Aldo, n = 5. a: Untersuchung mit polarisiertem Licht In b: Ergebnis der Analyse nach Fluoreszenzmikroskopie.

Die Resultate der Fluoreszenzmessung der Siriusrot gefärbten Schnitte ergab schon grundsätzlich höhere Messwerte. Die Herzschnitte der DKO-Mäuse zeigten einen mittleren Anteil fluoreszierenden Gewebes von $6,406 \pm 4,073$ % nach Implantation des Dummys, und $9,059 \pm 3,544$ % nach der sechswöchigen Applikation von Aldosteron. Abbildung 43b zeigt die statistische Auswertung dieser Methode. In den DKO-Tieren hatte dabei das fluoreszierende Gewebe

durch Aldosteronapplikation gegenüber der Kontrollbedingung zwar im ersten Eindruck zugenommen, es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollbedingung (Abbildung 42c) und dem Herzgewebe der behandelten Maus (Abbildung 42d).

Die histologischen Herzpräparate der Wildtyp-Tiere dagegen hatten in der Dummy- Kontrollbedingung einen mittleren Anteil fluoreszierenden Herzgewebes von $5,001 \pm 1,706$ %, und nach Aldosteronapplikation einen Anteil von $9,967 \pm 2,254$ % (Abbildung 43b). Hierbei stieg der Anteil innerhalb der Wildtyp-Gruppe durch die Aldosteronapplikation signifikant an ($p = 0,0024$), und auch die DKO-Tiere zeigten nach Aldosteronapplikation einen signifikant größeren Kollagengehalt ($p = 0,034$) als die Wildtyp-Dummy-Gruppe. Abbildung 42a zeigt einen Ausschnitt des Herzgewebes einer Maus ohne Aldosteronapplikation, 42b einen Ausschnitt einer mit Aldosteron behandelten Wildtyp-Maus.

Beim Vergleich von Wildtyp und DKO ergaben sich innerhalb der Dummy-Bedingung keine signifikanten Unterschiede. Auch innerhalb der Aldosteron-Bedingung waren beide Genotypen vergleichbar.

4.2.5 Effekt der Hypertrophie durch Nachlasterhöhung

Dieser Ansatz stellt eine andere Methode zur Überprüfung des Effektes des DKO auf einen pathologisch erhöhten Blutdruck dar, der nun durch eine akute Erhöhung der Nachlast mittels Aortenkonstriktion erfolgte. Dabei kommt es, anders als im chronischen Modell mit Aldosteron, innerhalb von Tagen zu einer hypertrophen Anpassung des Herzens an die erhöhte Arbeitslast. Wettschureck et al. konnten bereits zeigen, dass die hypertrophe Antwort von einem ähnlichen Modell des $G\alpha_q$ - und G_{11} -KO abgemildert wurde, wobei es sich dort jedoch um einen globalen, nicht herzspezifischen KO handelte, der noch dazu konstitutiv, also vom ersten Embryonaltag an, vorlag [136], und nicht, wie bei dem in der hier beschriebenen Studie verwendeten Modell, erst fünf Wochen post natum induziert wurde. Um die von Wettschurek et al. beschriebenen Effekte auch in dem hier verwendeten Tiermodell zu untersuchen, wurde die Aortenkonstriktion auch auf das hier verwendete herzspezifische Tiermodell des $G\alpha_qG_{11}$ -KO angewendet, allerdings in der 32. Lebenswoche deutlich später als im Modell von Wettschurek et al. Das zur Untersuchung bestimmte Alter der Tiere rührte daher, dass die von Wiesen et al. gefundenen Effekte auf Herzfrequenz und Blutdruck in der von uns genutzten Mauslinie zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten auftraten.

Männliche Tiere der Genotypen Wildtyp oder DKO, wie sie schon für die vorausgegangenen

Experimente zum Aldosteron genutzt wurden, wurden in der 30. Lebenswoche jeweils einer Sham- oder einer TAC-Operation unterzogen. Daraus ergaben sich die Gruppen wt Sham ($n = 4$), wt TAC ($n = 6$), DKO Sham ($n = 3$), DKO TAC ($n = 5$). Jeweils vor der Operation sowie nach 14 Tagen (32. Lebenswoche) wurden die Mäuse einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen, und vor jeder Untersuchung gewogen. Die Körpergewichte unterschieden sich dabei nicht.

Die Auswurffraktion, EF (siehe Abbildung **44a**) und die relative Muskelverkürzung FS unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Die Herzfrequenz dagegen ist in DKO sham signifikant niedriger als in wt-Tieren mit Aortenkonstriktion (siehe Abbildung **44b** ($p = 0,0113$)). Die linksventrikuläre Masse Abbildung (Abbildung **44c**) steigt nach Aortenkonstriktion in wt ($p = 0,0035$) und DKO ($p = 0,034$) gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe an. Vergleich man wt Sham-Kontrolle, und DKO mit Konstriktion, war auch hier das Herzgewicht der TAC-Gruppe signifikant größer ($p = 0,022$). Dagegen unterschieden sich die Genotypen innerhalb der jeweiligen Operationsbedingung nicht. Die Verhältnisse der Herzgewichte bleiben in dieser Form auch nach Normierung auf das Körpergewicht erhalten, die Signifikanzniveaus unterschieden sich nicht wesentlich (Abbildung **44d**).

Weitere Unterschiede zeigten sich noch bei Betrachtung des systolischen (Abbildung **44f**) und diastolischen (Abbildung **44e**) linksventrikulären Volumens: Hier zeigt sich eine deutliche Zunahme nach Aortenkonstriktion in den DKO-Tieren gegenüber allen anderen Gruppen: wt Sham ($p = 0,016$), wt TAC ($p = 0,0007$), DKO sham ($p = 0,0019$). Dagegen steigt das systolische Volumen nur bei DKO TAC gegenüber wt TAC an ($p = 0,039$).

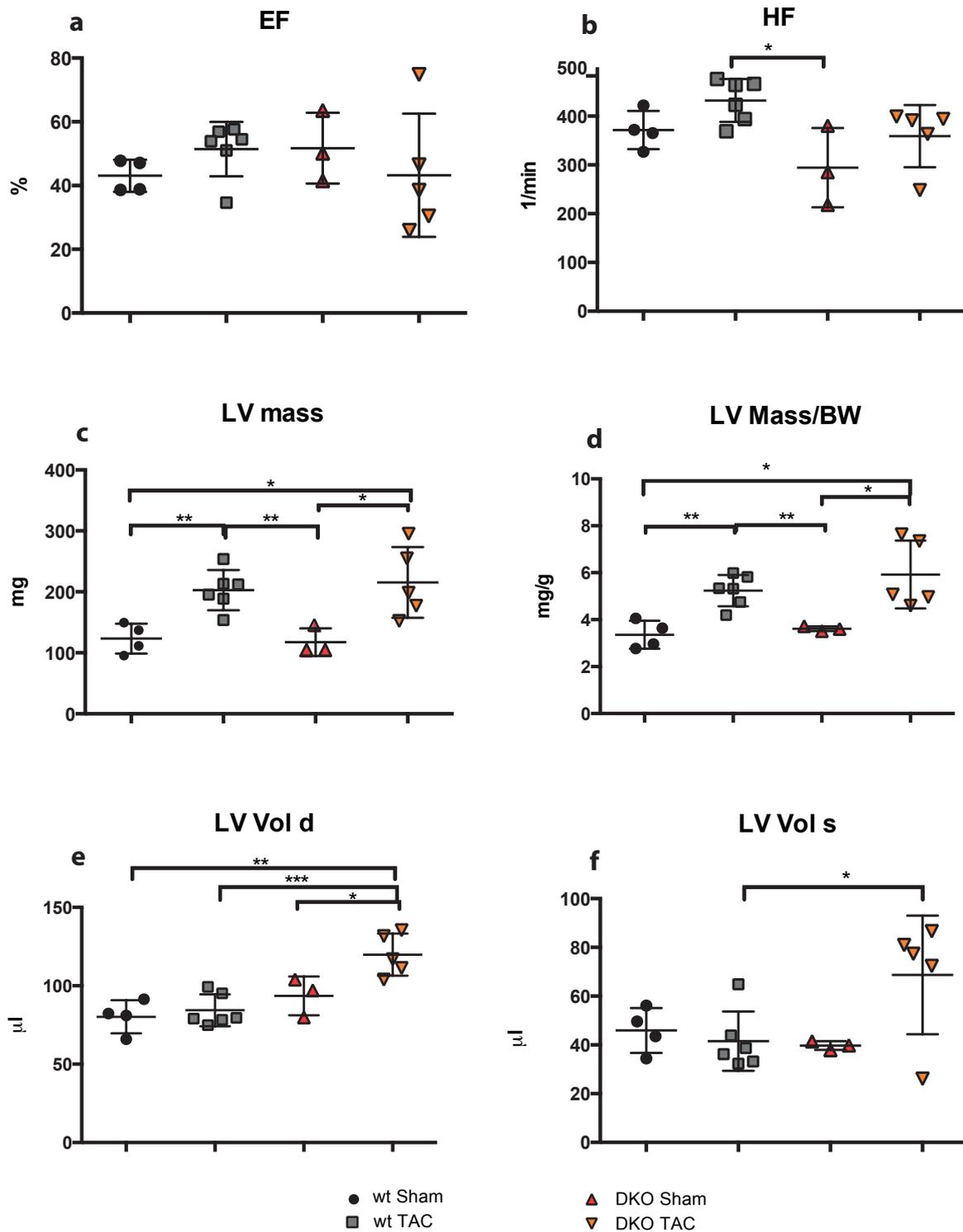


Abbildung 44: TAC-Hypertrophie und α_qG_{11} -DKO in Mäusen: Schwarze Kreise: wt sham, n = 4; graue Quadrate: wt TAC, n = 6; rote Dreiecke: DKO sham, n = 3; orange Dreiecke: DKO TAC, n = 5; a: EF in %; b: Herzfrequenz, in bpm; c: LV mass, in mg; d: LV mass normiert, in mg/g e: Diastolisches Volumen, in μ l; f: Systolisches Volumen, in μ l.

4.3 Rolle der verschiedenen $\text{Ca}_v1.2\text{-}\beta_2$ - Isoformen für Morphologie und Funktion des Herzens

4.3.1 Auswirkungen des induzierten kardialen $\text{Ca}_v1.2\text{-}\beta_2$ -KO

Die kardiomyozytären Effekte des Knockout der $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -Untereinheit wurden bereits von Weisserger et al. beschrieben [134]. Dabei starben die Embryonen bereits vor Geburt, offenbar durch das völlige Fehlen der Herzaktion. Auf zellulärer Ebene war die Ca^{2+} -Homöostase stark verändert. Da es gelang, dieses Knockout der $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -Untereinheit als induzierbares, herzspezifisches KO zu etablieren, waren nun lebende Tiere verfügbar, deren $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO erst postnatal wirksam wurde. Es war infolge der vorherigen Befunde allerdings konsequent, eventuelle Effekte des späten herzspezifischen $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO auf den kardialen Phänotyp *in vivo* zu studieren. Hierzu wurden die entsprechenden $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO-Tiere sowie deren nicht mittels Tamoxifeninjektion induzierte Geschwister einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen.

Beide Tiergruppen umfassten jeweils neun Tiere, die zwischen der 12. und 25. Lebenswoche untersucht wurden sowie weibliche und männliche Tiere, und damit verhältnismäßig inhomogene Gruppen. Dies war aufgrund der schwierigen Zucht dieser Tiere nicht anders möglich.

Bei Betrachtung des induzierten kardialen Knockout der $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -Untereinheit zeigten sich einige Auffälligkeiten bei der Echokardiographie. So war vor allem die Herzfrequenz in der Gruppe $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO niedriger als in der Wildtyp-Vergleichsgruppe ($p = 0,0040$; siehe Abbildung **45a**). Das Körpergewicht dagegen war in der $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO-Gruppe deutlich niedriger als in der Vergleichsgruppe ($p = 0,0051$, Abbildung **45b**). Betrachtete man das linksventrikuläre Volumen, fällt auf, dass dieses sowohl in der Diastole ($p = 0,0162$) als auch in der Systole ($p = 0,0094$), in den $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2^{-/-}$ -KO-Tieren deutlich niedriger war (Abbildung **45c**). Dies rührte daher, dass der Durchmesser des linken Ventrikels ebenfalls in der Diastole ($p = 0,0163$) und der Systole ($p = 0,0108$) in den $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO-Tieren kleiner war als in den Wildtyp-Kontrolltieren (Abbildung **45d**). Auch andere funktionelle Parameter waren beeinflusst. So war die Auswurfraction EF in der $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO-Gruppe zwar noch vergleichbar, dafür die relative Ventrikelverkürzung FS in $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO signifikant ($p = 0,0466$) größer (Abbildung **45e**). Die isovolumetrische Relaxationszeit (siehe Abbildung **45f**) war in der Gruppe $\text{Ca}_v\text{-}\beta_2$ -KO länger als in der Wildtyp-Kontrolle ($p = 0,0192$).

Die hier nicht gezeigten echokardiographischen Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Insbesondere war das normierte linksventrikuläre Gewicht unverändert.

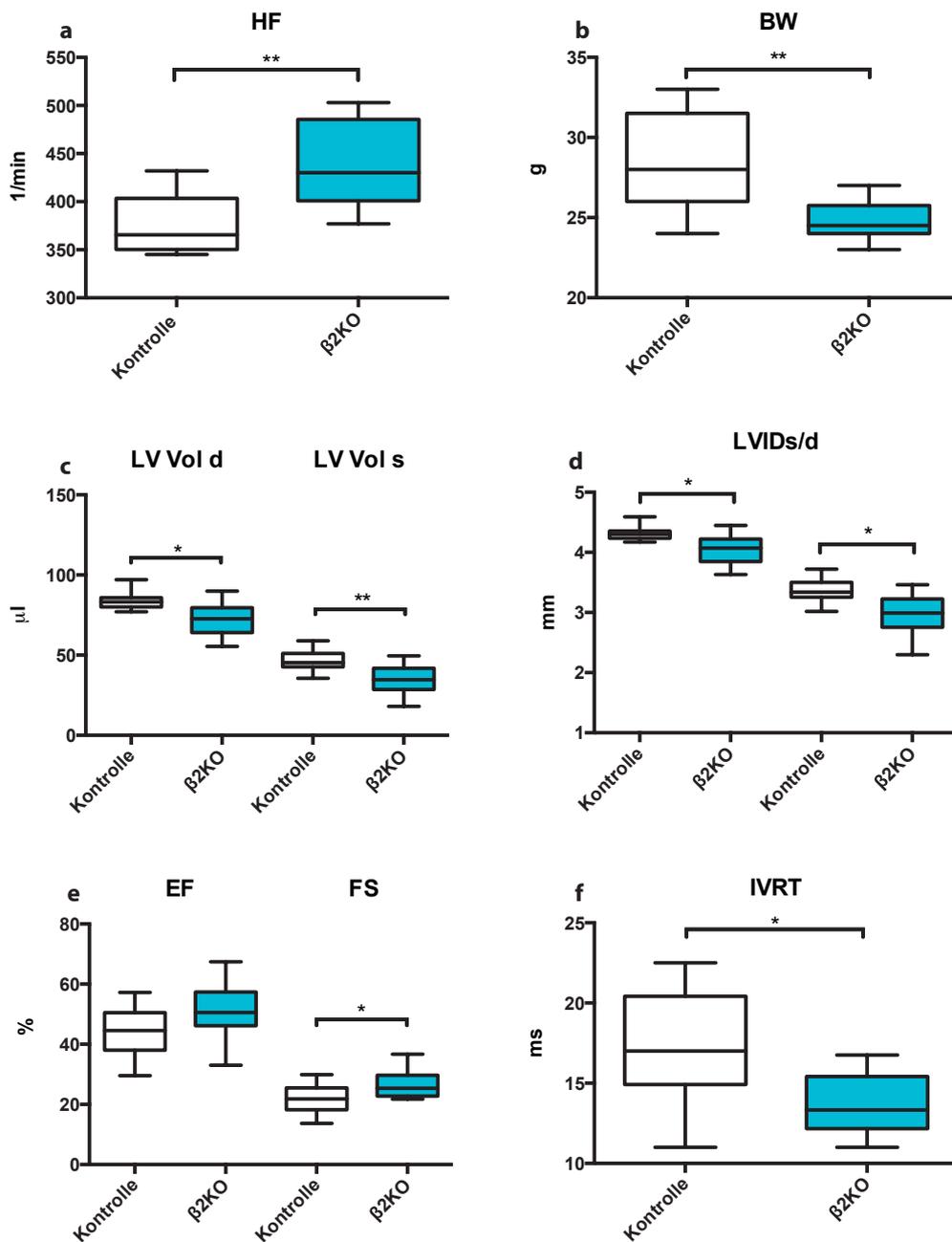


Abbildung 45: Wichtige echokardiographische Grundparameter der $Ca_v1.2\text{-}\beta_2^{-/-}\text{-KO}$: In schwarz-weiß ist die Kontrollgruppe dargestellt ($n = 9$), in schwarz-blau die $\beta_2\text{-KO}$ -Gruppe ($n = 9$). **a** Herzfrequenz in 1/min; **b**: Das Körpergewicht in g **c**: linksventrikuläres Volumen, in μl . **d**: Durchmesser des linken Ventrikels, in mm **e**: EF und FS in % **f**: IVRT, in ms.

4.3.2 Expression spezifischer Spleißvarianten im konstitutiven Knockout

Da der klassische globale $Ca_v\beta 2$ -KO zum Embryonaltod durch Fehlfunktion des Herzens führte, lag die Vermutung nahe, dass eine kompensatorische herzspezifische Expression der $Ca_v\beta 2$ -Untereinheit in einem „Rescue“-Ansatz diesen Effekt verhindern könnte, was sich auch bereits so zeigen ließ [55]. In dieser Studie von Katiyar et al. wurde eine von zwei Spleißvarianten der $Ca_v\beta 2$ -Untereinheit kardial exprimiert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung der Maus im Herzen gefunden wurden. Beide führen bei kardialer Expression auf dem Hintergrund eines globalen $Ca_v\beta 2$ -KO zu lebensfähigen Nachkommen, Genotyp und Züchtung dieser Tiere sind in dem Abschnitt 3.4 genauer beschrieben. Allerdings stellte sich die Frage nach den Effekten der Expression auf den adulten kardialen Phänotyp *in vivo*. Dieses sollte in einer echokardiographischen Untersuchung adressiert werden.

In den folgenden Experimenten wurden $Ca_v1.2-\beta 2^{-/-}$ -KO-Tiere verwendet, bei denen, im Rahmen so genannter „Rescue“-Experimente, in den Herzen jeweils ein Allel der embryonalen Spleißvariante der Untereinheit, $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1, oder der adulten Spleißvariante $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4, exprimiert wurde. Als Kontrollgruppe dienten Geschwistertiere, die, zusätzlich zu den neuen Spleißvarianten, eine funktionelle normale $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -Untereinheit exprimierten. Diese trugen also insgesamt drei Allele der $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -Untereinheit.

Weil die Kreuzungsschemata zur Erzeugung der gewünschten Genotypen relativ komplex waren, ergab sich nur eine geringe Anzahl nutzbarer Tiere für diese Studie. Da sich aber die Kontrollgruppen $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1 und $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 nicht unterschieden, wurden die Tiere beider Genotypen zu einer gemeinsamen Kontrollgruppe zusammengefasst. So ergaben sich 15 Kontrolltiere, gegenüber jeweils 10 Tieren in den $\beta 2$ N1- oder $\beta 2$ N4-Gruppen. Die Untersuchung umfasste männliche und weibliche Tiere im Alter von 18 bis 25 Wochen.

Zunächst fiel auf, dass die Herzfrequenz in der $Ca_v\beta 2$ -N4-Gruppe signifikant niedriger war, als in der $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1-Gruppe ($p = 0,0029$, siehe Abbildung 46a). Beide Spleißvarianten zeigen allerdings keinen Frequenzunterschied zur Kontrollgruppe. Dann wurde das Körpergewicht der Tiere der verschiedenen Gruppen verglichen, es zeigten sich keine Abweichungen (siehe Abbildung 46b). Das Volumen des linken Ventrikels ist, sowohl in der Diastole, als auch in der Systole, in alle Untersuchungsgruppen vergleichbar (Abbildung 46c).

Die Spitzengeschwindigkeit der E-Welle, zu (Abbildung 46d) war in der $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1-Gruppe niedriger, als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0358$), zur $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 -Gruppe be-

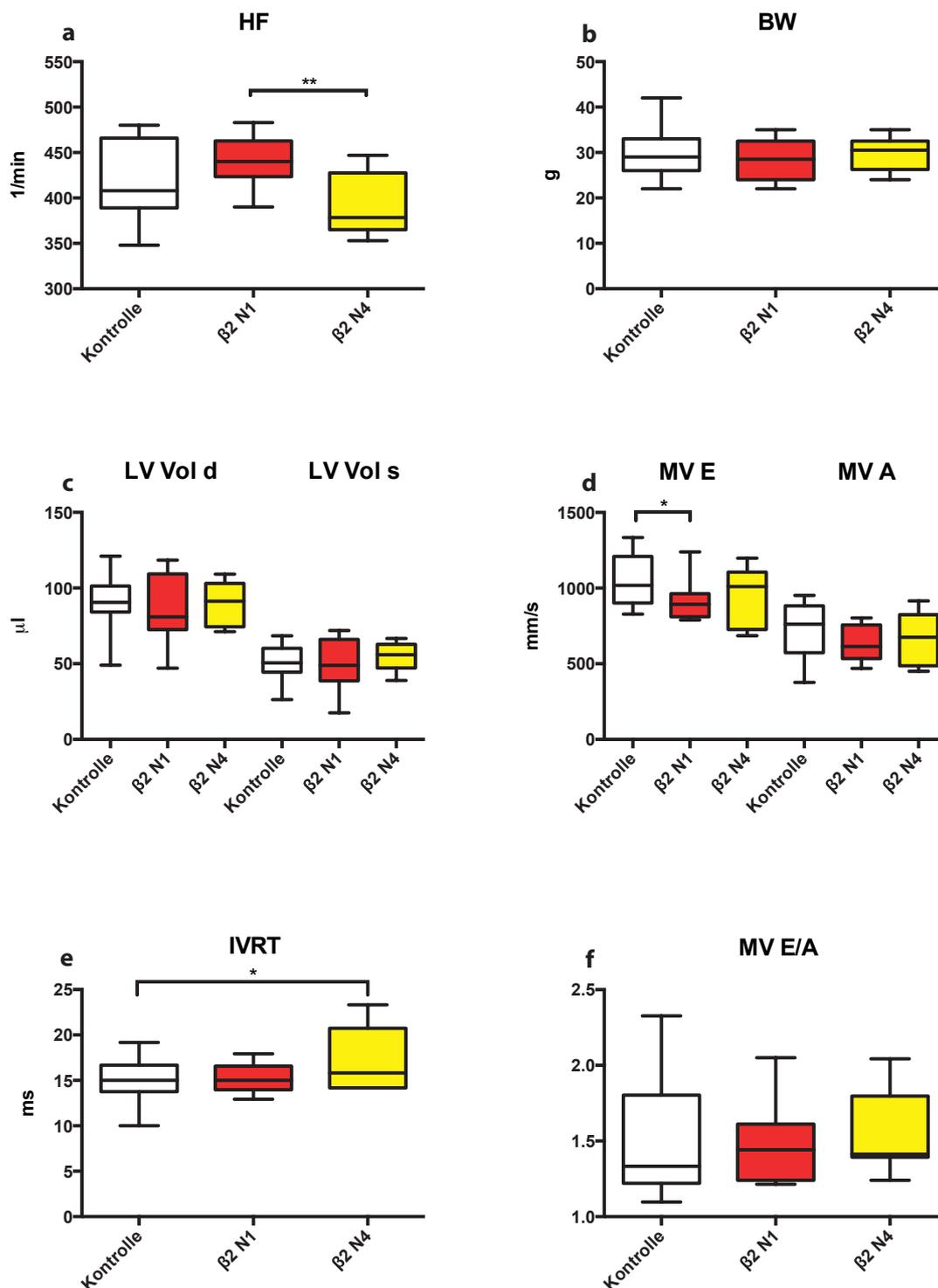


Abbildung 46: Echokardiographische Untersuchung $Ca_v\beta_2$ -KO mit Expression der Spleißvarianten N1 und N4: In schwarz-weiß ist die Kontrollgruppe dargestellt (n = 15), in schwarz-rot die Tiere, die die embryonale Spleißvariante N1 exprimieren (n = 10), in schwarz-gelb die Tiere, die die adulte Spleißvariante N4 (n = 10) kardial exprimieren. **a:** Herzfrequenz der Tiere in Schlägen pro Minute (1/min). **b:** Körpergewicht in g. **c:** Diastolisches und systolisches Volumen des linken Ventrikels, in μl. **d:** Geschwindigkeit der E-Welle und der A-Welle, in mm/s. **e:** Intraventrikuläre Relaxationszeit in ms **f:** Quotient aus E- und A-Welle

stand jeweils kein Unterschied. Ebenso bestand in der Spitzengeschwindigkeit der A-Welle kein Unterschied zwischen allen Gruppen. Die intraventrikuläre Relaxationszeit war in den Herzen der $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4 länger, als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0192$), die der $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N1-Gruppe lag zwischen den beiden anderen Werten (Abbildung 46e). Der Quotient aus der Spitzengeschwindigkeit der E- und A-Welle war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 46f). In den übrigen Parametern war ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar.

4.3.3 Vergleich beider Studien

Es war naheliegend, die Ergebnisse der beiden vorausgegangenen Studien zum $Ca_v\beta2$ -KO, und zu den beiden Spleißvarianten zu vergleichen, um vor allem eine eventuelle „Rettung“ des Phänotyps der kardialen $Ca_v\beta2$ -KO-Tiere durch die Expression der beiden verschiedenen Spleißvarianten erkennen zu können. Dazu jedoch muss erst die grundsätzliche Vergleichbarkeit der beiden vorausgegangenen Studien in den untersuchten Parametern geprüft werden. Daher wurden in jedem gewonnenen echokardiographischen Parameter beider Teilstudien zuerst die jeweilige Kontrollgruppe mit der der anderen Untersuchung verglichen. Unterschieden sich die beiden Kontrollen statistisch nicht voneinander, können die übrigen Gruppen direkt gegeneinander abgeglichen werden. Die jeweiligen Kontrollen wurden dann zu einer gemeinsamen Kontrollgruppe zusammengefasst, mit $n = 24$ Tieren.

Die einzelne Untersuchung beider Kontrollgruppen war nur beim Vergleich der Herzfrequenzen nötig, hier war der Unterschied mit $p = 0,0356$ zwischen beiden Kontrollen signifikant (Abbildung 47b), was bei der späteren Diskussion der übrigen Befunde in diesem Parameter zu beachten war.

Insgesamt muss angemerkt werden, dass sowohl weibliche als auch männliche Tiere untersucht wurden, und auch hier das Alter zwischen 12 und 25 Wochen variierte. Eine strengere Auswahl war jedoch aufgrund der schwierigen Züchtung der Tiere nicht möglich.

Zunächst wurde das Körpergewicht der Tiere verglichen; hier war auffällig, dass die $Ca_v\beta2$ -KO-Gruppe ein deutlich niedrigeres durchschnittliches Körpergewicht zeigte als die Kontrollgruppe ($p < 0,0001$), die $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N1-Gruppe ($p = 0,0361$), und die $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4-Gruppe ($p = 0,0028$; Abbildung 47a).

Die Herzfrequenzen, gemessen während der Echokardiographie unter Narkose, wiesen abseits des Unterschieds zwischen den Kontrollen, ebenfalls signifikante Befunde auf (Abbildung 47b). So war, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, die Herzfrequenz in $Ca_v\beta2$ -KO-Tieren im

Tabelle 10: Echokardiographische Parameter aller Genotypen des $\beta 2$ -Projektes: Die Tabelle zeigt alle gemessenen Werte der echokardiographischen Untersuchung der verschiedenen Genotypen, aufgelistet in der linken Spalte. Die Gruppen sind in der schwarzen Kopfzeile bezeichnet, die jeweilig Tierzahl darunter angegeben. Die Werte verstehen sich als Mittelwert mit SEM. Gleichfarbige Kreise kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Einheit	Kontrolle	$\beta 2KO$	$\beta 2N1$	$\beta 2N4$
Mittelwert \pm SEM		n = 24	n = 9	n = 10	n = 10
BW	g	29 \pm 0,89●	24,5 \pm 0,45●●	28,5 \pm 1,45●	30,5 \pm 1,22●
IVSd	mm	0,67 \pm 0,015	0,72 \pm 0,035	0,74 \pm 0,043	0,675 \pm 0,014
IVSs	mm	0,92 \pm 0,02	0,92 \pm 0,035	0,995 \pm 0,046	0,875 \pm 0,027
LVIDd	mm	4,375 \pm 0,064	4,07 \pm 0,086	4,25 \pm 0,162	4,475 \pm 0,093
LVIDs	mm	3,425 \pm 0,063	2,99 \pm 0,118	3,445 \pm 0,169	3,64 \pm 0,084
LVPWd	mm	0,695 \pm 0,016	0,66 \pm 0,02	0,665 \pm 0,043	0,725 \pm 0,024
LVPWs	mm	0,76 \pm 0,022	0,85 \pm 0,031	0,89 \pm 0,062	0,92 \pm 0,026
LVAWd	mm	0,705 \pm 0,02	0,67 \pm 0,032	0,68 \pm 0,026	0,685 \pm 0,022
LVAWs	mm	0,95 \pm 0,025	0,94 \pm 0,043	0,975 \pm 0,035	0,935 \pm 0,028
LV Vol d	μ l	86,53 \pm 2,9●	72,73 \pm 3,6●●	80,93 \pm 7,4	91,26 \pm 4,4●
LV Vol s	μ l	48,31 \pm 2,13●	34,71 \pm 3,2●●	48,98 \pm 5,3●	55,97 \pm 3,0●
EF	%	44,49 \pm 1,33	50,56 \pm 3,21	41,16 \pm 2,59	39,96 \pm 1,68
FS	%	21,83 \pm 0,77●	25,34 \pm 1,59●●	20,77 \pm 0,68●	19,33 \pm 1,04●
LV mass	mg	88,66 \pm 4,15	72,13 \pm 4,61	84,34 \pm 7,3	91,72 \pm 3,89
LV mass/BW	mg/g	3,098 \pm 0,074	2,797 \pm 0,172	3,090 \pm 0,151	3,064 \pm 0,135
MV E	mm/s	949 \pm 29,23	907 \pm 53,93	893,6 \pm 42,3	1011 \pm 59,36
MV A	mm/s	633,5 \pm 33,95	604,7 \pm 32,8	614,1 \pm 35,75	675,2 \pm 58,39
IVRT	ms	15,38 \pm 0,65	13,33 \pm 0,64●	15 \pm 0,51	15,83 \pm 1,1●
MV E/A		1,43 \pm 0,065	1,467 \pm 0,098	1,44 \pm 0,08	1,413 \pm 0,092

Parameter	Einheit	$\beta 2KO$ Kon	$\beta 2KO$	$\beta 2N1$	$\beta 2N4$	$\beta 2N1N4$ Kon
Mittelwert \pm SEM		n = 9	n = 9	n = 10	n = 10	n = 15
HF	bpm	365,5 \pm 11●●	430 \pm 15●●	440 \pm 8,8●	378,5 \pm 11●●	408 \pm 11●

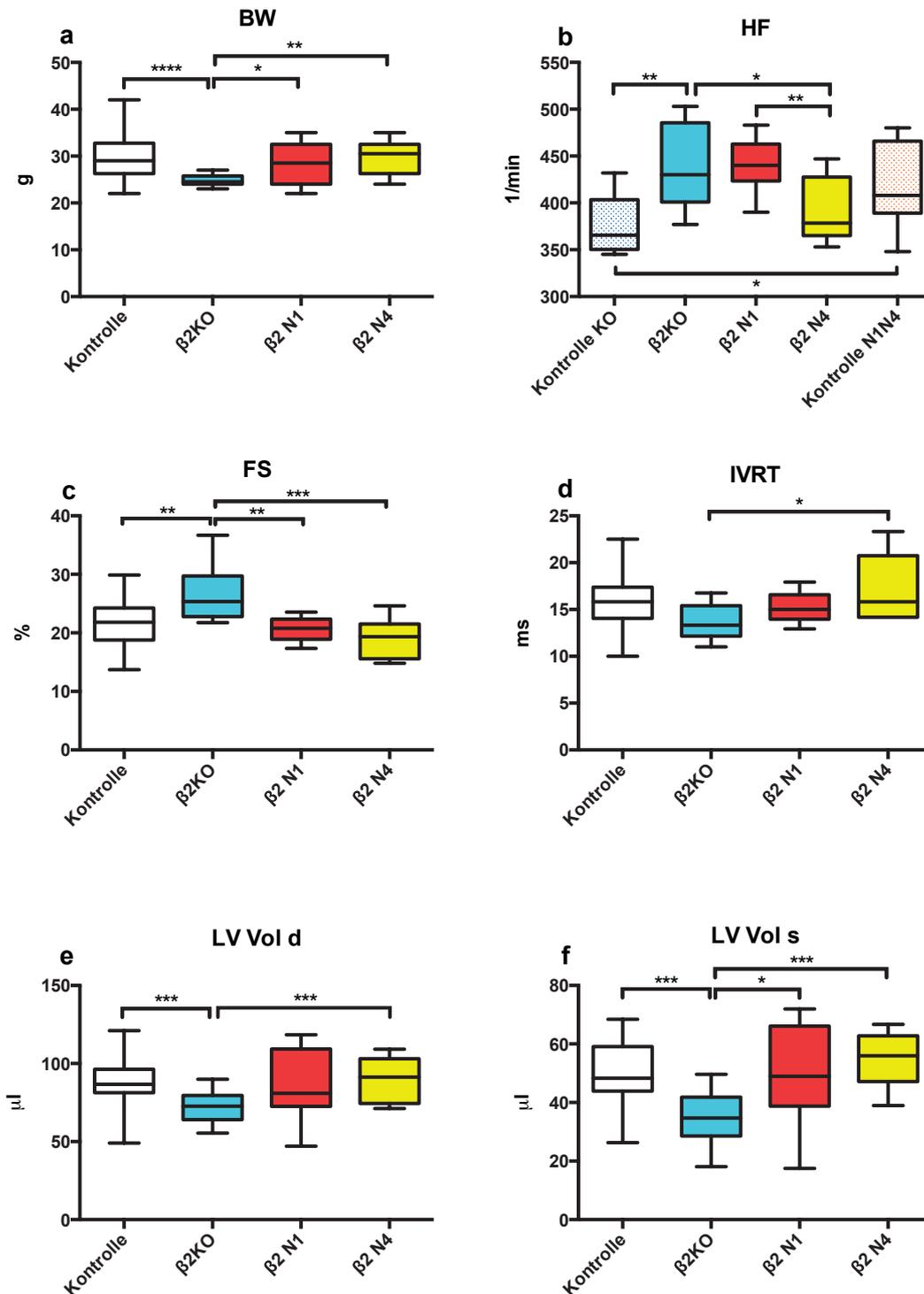


Abbildung 47: Direkter Vergleich des $\text{Ca}_v1.2\text{-}\beta_2^{-/-}\text{-KO}$ mit den beiden Rettungsvarianten: Die Farbgebung ist an die Abbildungen 45 und 46 angepasst: In weiß sind beide Kontrollgruppen zusammengefasst, wenn sie sich nicht voneinander unterschieden (dann $n = 24$); in hellblau sind die Daten der Gruppe $\text{Ca}_v\beta_2\text{-KO}$ abgebildet, in rot die der $\beta_2\text{-N1}$ -Tiere, in gelb die der $\beta_2\text{-N4}$ -Tiere. **a:** Körpergewicht in g. **b:** Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min). **c:** FS in %. **d:** IVRT in ms. **e:** Diastolisches Volumen des linken Ventrikels in μl ; **f:** Systolisches Volumen des linken Ventrikels, in μl .

Mittel höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0,004$), aber auch höher als in den $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4-Tieren ($p = 0,0172$). Wie ebenfalls bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, war die Frequenz in $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4 größer, als in $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N1 ($p = 0,0029$).

Die relative Ventrikelverkürzung (in Abbildung 47c) zeigte ebenfalls Auffälligkeiten der Tiere mit $Ca_v\beta2$ -KO, hier war deren Wert höher, als in allen anderen Gruppen (Kontrolle: $p = 0,0019$; $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N1: $p = 0,0021$; $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4: $p = 0,0074$). Demgegenüber fand sich in der isovolumetrischen Relaxationszeit (Abbildung 47d) nur zwischen $Ca_v\beta2$ -KO und $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4 ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0139$), wobei die $Ca_v\beta2$ -KO-Tiere auch insgesamt die niedrigste mittlere IVRT aufwiesen (im Mittel 13,66 ms).

Dann wurden die diastolischen ventrikulären Volumina verglichen (Abbildung 47e). Auch hier zeigte die $Ca_v\beta2$ -KO-Gruppe einen deutlich niedrigeren Wert, signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,0064$) und der $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4-Gruppe ($p = 0,0074$). Die Werte des systolischen Volumens, zu sehen in Abbildung 47f, verhielten sich analog für die Kontrolle ($p = 0,0008$) und $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N4 ($p = 0,0003$), wobei nun der Wert der $Ca_v\beta2$ -KO-Gruppe auch signifikant kleiner war als der der $Ca_v1.2-\beta2^{+/+}$ -N1-Gruppe ($p = 0,0445$).

Abseits der Besonderheiten beim Vergleich der Herzfrequenz, zeigte keine der beiden Gruppen der Spleißvarianten einen Unterschied zur gemeinsamen Kontrollgruppe.

5 Diskussion

5.1 Phänotyp der Tiere bei Expression der verschiedenen PKC ι -Aktivitätstypen

In der echokardiographischen Untersuchung fand sich sowohl initial bei den FVB/N-Tieren, als auch in den C57Bl6/N-Tieren der Hauptstudie ein klarer Phänotyp. Die Tiere mit der DN-PKC ι zeigten eine vergrößerte linksventrikuläre Masse, auch nach Normalisierung auf das individuelle Körpergewicht. Dieser Befund deutet darauf hin, dass durch diese Überexpression möglicherweise postnatales Herzwachstum initiiert worden sein könnte. Dieses ist zunächst grundsätzlich als Hypertrophie, als Zunahme der Masse durch Zellwachstum, zu betrachten; physiologisch ist das Herzwachstum durch Zellvermehrung post natum beendet, die Herzzellen haben den Zellzyklus verlassen, und morphologische Anpassungen an veränderte Belastungen können nur noch durch Modulation der Zellgröße erfolgen. Die Hypertrophie dient dabei dem Zweck, eine erhöhte Belastung, etwa durch Training oder Krankheit, durch eine Anpassung der Herzleistung auszugleichen. Dadurch wird die Herzleistung im kompensatorischen Stadium aufrecht erhalten. Jedoch ist das hypertrophe Herzwachstum limitiert, und es folgt ab einer bestimmten Belastung der Übergang in ein dekompensatorisches Stadium der Hypertrophie, in dem die maximal gesteigerte Herzleistung den Bedarf an Mehrleistung nicht mehr deckt. Dies ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Auswurfleistung, messbar mittels der EF, einem verschlechterten Kontraktionsverhalten, zu sehen in der FS, danach durch Volumenzunahme des Ventrikels. Da die zunehmende Volumenüberlastung durch die Auswurfleistung nicht mehr gedeckt werden kann, mündet sie in eine sekundäre Dilatation, und schließlich ins Herzversagen. Die Elastizität der Herzwände nimmt ab, wodurch sich auch die dilatativen Eigenschaften des linken Ventrikels verschlechtern, was in Form spezifischer Veränderungen der E- und A-Welle zu sehen ist. Insbesondere nimmt die Geschwindigkeit der E-Welle zu, und die A-Welle verschwindet zunehmend. Der Ventrikel hat nicht mehr die elastische Reservekapazität, das zusätzliche Blut, das durch die Vorhofkontraktion einströmt, aufzunehmen. Die Herzfrequenz steigt im Verlauf an, da das verminderte Auswurfvolumen durch mehr Kontraktionen ausgeglichen werden soll, jedoch ist auch dies ab einem bestimmten Maß insuffizient. Alle diese Prozesse enden schließlich im Herzversagen mit Kammerflattern und -flimmern.

Die in der echokardiographischen Typisierung der hier untersuchten Tiere erhobenen Befunde zeigen ein frühes Stadium der Hypertrophie in den DN-PKC ι -exprimierenden Tieren. Die links-

ventrikuläre Masse ist dabei, normiert auf das individuelle Körpergewicht der Tiere, deutlich erhöht. Gleichzeitig aber sind in EF, FS, und dem systolischen und diastolischen linksventrikulären Volumen, keine Unterschiede zu finden. Eine solche Entwicklung der Werte deutet auf ein noch kompensiertes Stadium der Hypertrophie hin. Dennoch indiziert die verlängerte Relaxationszeit eine verzögerte aktive Relaxation, was mit einem erhöhten Widerstand der Ventrikelwände assoziiert wäre, auch einem Befund im Verlauf der kardialen Hypertrophie. Chinali et al. [20] sowie Mishra et al. [78] beurteilten diese Relaxationszeit, besonders nach Normalisierung auf die E-Welle, in klinischen Studien als aussagekräftigen Parameter auf die Prognose von Patienten mit Herzversagen. Dabei war auch eine deutlich verlängerte Relaxation allein mit verschlechterter Prognose assoziiert [144].

Ein weiteres Indiz für das Vorliegen einer pathologischen Veränderung des linken Ventrikels besteht in dem Auftreten der zusätzlichen Einstromwelle im fallenden Abschnitt der E-Welle bei der Mehrheit der DN-PKC ι -exprimierenden Tiere. Diese Welle wird in der Literatur als L-Welle bezeichnet, über die jedoch bisher kaum publizierte Erkenntnisse vorliegen. Zuerst beschrieben von Keren [56], wurde diese Welle zunächst als direkter Einstrom aus der Pulmonalvene in den linken Ventrikel zwischen den beiden regulären Wellen angesehen. In computerbasierten Simulationen [96, 37] wurde diese Welle entweder oszillierenden Druckverhältnissen oder Besonderheiten des Bluteinstromes in Kombination mit Fehlern der durchführenden Person bei der Auswahl des Messbereiches zugeschrieben. Dabei wurde vermutet, dass eine Messung, deren Messbereich nicht unmittelbar im Zentrum des Einstroms des Blutes in das Kammerlumen platziert wird, aufgrund von Verwirbelungen im Blutstrom zu falschen Ergebnissen und dem scheinbaren Auftreten einer eigentlich nicht vorhandenen L-Welle geführt habe. In anderen klinischen Studien konnte dagegen gezeigt werden, dass die L-Welle bevorzugt bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie und erhöhtem Füllungsdruck im Ventrikel auffällt, bei denen allerdings noch keine Veränderung der EF vorliegt; dies wäre zu der Situation der von uns untersuchten DN-PKC ι -Tiere vergleichbar. In experimentellen Studien an Mäusen wurde dieser Befund im Kontext einer Pathologie bisher nicht in der Literatur beschrieben. Dennoch sehen wir diese Welle auch in den bei uns untersuchten Tieren der GqG11-DKO-Linie. Hier tritt diese Welle bei vielen DKO-Tieren regelmäßig und klar abgegrenzt auf, wurde bisher aber für sich noch nicht genauer untersucht. Dementsprechend wollen wir in Zukunft der L-Welle weiterführendes Forschungsinteresse widmen, insbesondere, da ein neues echokardiographisches Messsystem verfügbar ist, mit dem diese Welle in Zukunft besser charakterisiert werden kann.

Zur Beurteilung der genauen Druckverhältnisse im linken Ventrikel wären an dieser Stelle entsprechende Messungen mit Blutdruckkathetern nötig gewesen, diese sind jedoch zum bisherigen Zeitpunkt nicht erfolgt. Die Planung der weiterführenden Studien sieht dies allerdings vor.

Entsprechend zu den Befunden einer möglichen Hypertrophie im frühen Stadium bei überexprimierter inaktiver DN-PKC ι war in der Folge interessant, inwieweit die Überexpression der konstitutiv aktiven CA-PKC ι zu einer möglicherweise positiven Beeinflussung einer induzierten Hypertrophie führt. Daher wurden an Mäusen aller drei Gruppen Aortenkonstriktionen durchgeführt. Eine solche Erhöhung der Nachlast ist ein etabliertes Modell zur akuten Induktion von Hypertrophie, und ist dementsprechend gut charakterisiert [106, 46, 95, 11]. Auch die echokardiographische Messung der linksventrikulären Masse als Maß für die Hypertrophie ist etabliert [63]. Weiterentwickelt wurde diese Methode von Martin et al. [76], bei der durch den auch hier genutzten operativen, sternalen Zugang die Maus frei atmen kann, und so Schäden und Nebenwirkungen durch die Intubation ausbleiben. Diese Methode wurde auch bereits von anderen Autoren genutzt [31]. In unserem Institut etablierten wir einige Modifikationen, die den Ablauf weiter verbessern; so wurde die Kanüle, um die der Faden zur Konstriktion gebunden wird, speziell geformt und abgestumpft, wodurch weniger Verletzungspotential besteht. Auch wurde eine Inhalationsnarkose angewendet, die leicht steuerbar ist, und Anpassungen an den Zustand des Tieres erlaubt, wie etwa eine direkte Vertiefung der Narkose beim Auftreten von Schmerzreflexen oder eine Verringerung der Narkosetiefe bei zu flacher Atmung des Tieres.

Die erneute echokardiographische Messung erfolgte nach 14 Tagen, um ein frühes Stadium der hypertrophen Reaktion des linken Ventrikels abbilden zu können. Es zeigte sich hier tatsächlich, dass in Tieren der Gruppe CA-PKC ι die Hypertrophie deutlich abgemildert war, gegenüber den Tieren der anderen Gruppen. Neben einer (absolut und normiert) geringeren Zunahme der linksventrikulären Masse gegenüber den beiden anderen Expressionsgruppen nach TAC-Operation, blieben auch EF und FS in CA-PKC ι in einem physiologischen Bereich. Beide Werte sanken in den beiden anderen Gruppen auf ein bei Hypertrophie zu erwartendes Niveau ab. In der TagRFPT-Gruppe war zudem bereits eine Erhöhung des systolischen Volumens zu erkennen.

Auch diastolische Veränderungen wurden gefunden. So blieb eine Erhöhung des Quotienten aus E- und A-Welle in den CA-PKC ι -Tieren aus, in den beiden anderen Gruppen erhöhte dieser Wert sich aber deutlich, was einem zunehmend restriktiven Ventrikel geschuldet sein wird. Dies bedeutet, dass der Ventrikel aufgrund zunehmender Einlagerung kollagenen Binde-

gewebes in die Wandmuskulatur, bei gleichzeitiger hypertropher Verdickung der Wand, immer weniger in der Lage ist, sich durch Erschlaffung der Muskelwände zu erweitern; die kollagenen Anteile sind an sich erheblich weniger elastisch, als die kardiomyozytären Anteile. Somit wird einerseits die E-Welle schmaler, da die Ausdehnung des Ventrikels durch die erhöhte Wandsteifigkeit früher beendet ist. Andererseits wird die Spitzengeschwindigkeit der E-Welle größer, da der Füllungsdruck aus dem Vorhof infolge der verschlechterten Füllungseigenschaften des Ventrikels gestiegen ist, und das Blut so mit größerem Druck einströmt. Gleichzeitig ist die A-Welle deutlich vermindert oder setzt ganz aus, da der Vorhof weniger oder nicht mehr in der Lage ist, durch seine aktive Kontraktion mehr Blut in den restriktiven Ventrikel zu pumpen. Dadurch steigt dann folglich das Verhältnis der E-Welle zur A-Welle an.

Die Zunahme der Schwankungsbreite dieses Wertes in den anderen Gruppen mag an individuellen Unterschieden der Tiere in der hypertrophen Antwort liegen, oder auch an Unterschieden in der Stärke und Qualität der Konstriktion, die, als manuelle Technik, auch entsprechend fehleranfällig ist.

Ebenso kann darin das Ergebnis der einzelnen Betrachtung von E- und A- Welle liegen, bei denen einerseits die Schwankung der Werte in DN-PKC ι zunahm, und andererseits zwar signifikante Unterschiede entstanden, jedoch nur in einzelnen Betrachtungen; dennoch ist es augenfällig, dass sich durch die TAC-Hypertrophie in CA-PKC ι Tieren nicht viel verändert, während die E-Welle in den beiden anderen Gruppen tendenziell steigt, und die A-Welle an Geschwindigkeit abnimmt.

Dies gilt auch für die Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle, und der dafür benötigten Zeit; ein Trend ist in beiden Fällen für DN-PKC ι und die TagRFPT-Kontrolle erkennbar, dennoch konnte die Signifikanz nur für DN-PKC ι gezeigt werden. Hier ist erwähnenswert, dass sich DN-PKC ι und die TagRFPT-Kontrolle in der Hypertrophie durch Aortenkonstriktion einander angleichen, wohingegen DN-PKC ι unter der Kontrollbedingung eine verzögerte Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle zeigt. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass die verzögerte Relaxation der DN-PKC ι -Herzen in der Kontrollbedingung nicht mit einem klassischen Hypertrophie-Phänotypen verbunden sein könnte. Um hier eine genauere Charakterisierung des kardialen Phänotypen treffen zu können, ist allerdings eine Untersuchung des intraarteriellen und intraventrikulären Blutdruckes notwendig, die in zukünftigen Experimenten noch erfolgen soll.

Zudem sind histologische Untersuchungen der Kontroll- und TAC-Gruppen anzuraten, um die Wanddicke, Zellgröße, und den Kollagengehalt am fixierten Präparat bestimmen zu können.

Diese Untersuchungen sind ebenfalls bereits geplant, um die hier gefundenen Ergebnisse zu ergänzen.

Ogleich alle *in vivo*-Befunde auf einen Einfluss der Aktivität der PKC ι in der Hypertrophie deuten, muss dennoch bedacht werden, dass grundsätzlich auch eine Hyperplasie für ein Herzwachstum in Frage käme. Eine Hyperplasie wurde in Studien zu andern PKC bereits von Mochly-Rosen et al. [79] postuliert. Dagegen spricht jedoch in den Einzelzelluntersuchungen der Befund der größeren Zellen in DN-PKC ι , mit vermindert regulären T-Tubuli, die dem Zustand in Hypertrophie entsprechen.

Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass fehlende statistische Signifikanz in diesem Teil der Studie mitunter darin begründet liegt, dass die Tierzahlen relativ niedrig waren, und auch deshalb, trotz klarer Tendenzen, keine statistisch haltbaren Unterschiede zustande kamen. Um dies zu umgehen, sollten, gerade für Studien mit TAC-induzierter Hypertrophie, zukünftig mehr Tiere für die Operation eingeplant werden.

5.2 Beurteilung der Bedeutung der Regelmäßigkeit der T-Tubuli:

Aus den Herzen der Tiere der Gruppe CA, und der Kontrollgruppe TagRFPT, ergaben die Isolationen eine zufriedenstellende Zelldichte auf den Objektträgern, die mit Isolationen aus C57Bl6/N-Tieren aus anderen Studien vergleichbar waren. Es wurden, je Tier, ein Objektträger für die konfokalmikroskopische Untersuchung ausgewählt, um die Zielzahl von mindestens 30 Zellen je Tier zügig zu erreichen, da isolierte murine Kardiomyozyten selbst in einem speziellen Kulturmedium schnell an Vitalität verlieren. In der Gruppe DN war die Ausbeute an Zellen deutlich geringer, und die Zellen auf den Objektträgern bei lichtmikroskopischer Kontrolle weniger vital. Daher waren je Tier zwei Objektträger nötig, um die nötigen 30 augenscheinlich vitale Zellen aufnehmen zu können, wobei die dadurch mehr benötigte Zeit zusätzlich zu einem Zellverlust geführt haben kann. Diese Beobachtung wurde nicht statistisch erfasst, da dies einen zusätzlichen Zeitverlust für die konfokalmikroskopische Beurteilung bedeutet hätte. Dennoch ist dieser Umstand bei der folgenden Auswertung und anschließenden Beurteilung der Einzelzellergebnisse zu beachten.

Bei kardialer Überexpression von DN-PKC ι zeigte sich eine Abnahme der regulären Anordnung der T-Tubuli, gegenüber der Überexpression von CA-PKC ι . Dieser Verlust der regelmäßigen Anordnung der T-Tubuli ist bei vielen Herzerkrankungen von menschlichen Patienten beschrie-

ben [73, 70], und auch in Tiermodellen mit Herzversagen [118, 69]. Die T-tubuläre Struktur ist dabei in Mäusen erst post natum entwickelt. Zudem ist diese Irregularität auch in Zellkultur induzierbar [15, 16], und dort mit pathologischen Veränderungen in Ca^{2+} -Homöostase verbunden. Letztendlich tritt diese morphologische Veränderung auch nach einiger Zeit in Zellkultur spontan auf [41], und stellen eine Herausforderung in der Nutzung adulter kardiomyozytärer Zellkulturen dar. Der Verlust in Zellkultur kann beispielsweise durch Supplementierung von Cytochalasin D verzögert [126], jedoch nicht verhindert werden.

Wei [133] konnte zeigen, dass die Auflösung der regelmäßigen Struktur in TAC- Hypertrophie-modellen bereits einsetzt, bevor ein klinischer Phänotyp erkennbar ist; aus eigenen Erkenntnissen im Rahmen anderer Studien ist uns bekannt, dass diese Veränderungen in Zellen von TAC-operierten Mäusen schon nach 7-10 Tagen auftreten. Welche Mechanismen genau zum Verlust der T-Tubuli führen, ist bislang nicht bekannt. Ein direkter oder indirekter Zusammenhang mit Signalkaskaden, die zur Hypertrophie führen, ist möglich, genau wie mechanischer Stress die Ursache sein kann.

PKC ι zeigt sich in anderen Zellen als bedeutsam im Aufbau des Zytoskeletts, und ein Verlust der PKC ι durch kardialen Knockout bewirkte in Maus-Embryonen den Verlust der polarisierten Zellteilung, wodurch eine Trabekulierung des Herzens nicht zustande kam, und die Embryonen an Tag E 10,5 abstarben [94]. Insofern scheint eine Rolle der Aktivität der PKC ι auch im zytoskelettalen Aufbau adulter Kardiomyozyten naheliegend. Es ist demzufolge auch möglich, dass die morphologischen Veränderungen der T-Tubuli nicht eine indirekte Auswirkung des hypertrophen Stresszustandes sind, sondern eine direkte Folge der verringerten Aktivität der PKC ι .

Die hier untersuchten Tiere zeigten auch im kardiologischen Phänotyp in der Gruppe DN-PKC ι Anzeichen einer gewissen Form der Hypertrophie; so war vor allem die charakteristische Vergrößerung der Herzmasse, normiert auf das individuelle Körpergewicht der Tiere, in dieser Gruppe vorhanden. Dabei stammten die für die Zellisolation genutzten Tiere aus Tiergruppen, die einer echokardiographischen Untersuchung unterzogen wurden, die Ergebnisse sind also direkt miteinander vergleichbar.

Des Weiteren wurde besonders darauf geachtet, die Isolationsbedingungen immer gleich zu halten, um die Ergebnisse nicht durch Unterschiede in diesem Prozess zu beeinflussen. Es ist beschrieben, dass die mechanische, enzymatische und chemische Beeinflussung zur Lösung der Herzzellen aus ihrem Gewebeverbund zu einer Schädigung der Zellen führt [45]. Außerdem ist

generell ein zunehmender T-tubulärer Verlust mit Dauer der Kultivierung der Zellen nach Isolation bekannt [125]. Zellen mit einer bereits vorhandenen Beeinträchtigung der T-tubulären Struktur, wie sie durch die hier erfolgte genetische Manipulation grundsätzlich stattgefunden haben kann, reagieren deutlich sensibler auf die enzymatische Verdauung, die mechanische Auslösung der Zellen, und schwankenden Ca^{2+} -Haushalt [42]. Da die Bedingungen in unserer Studie konstant waren, konnten die gefundenen Unterschiede zwischen den Zellen der verschiedenen Gruppen auf die Aktivität der PKC α zurückgeführt werden.

Eine Lösung der Problematik von durch die Kulturbedingungen beeinträchtigten Zellen bestünde in der Nutzung von nach Langendorff perfundierten Herzen für die Erstellung der konfokalmikroskopischen Bilder, wie von Wei et al. [133] beschrieben. Das würde die Effekte einer Zellisolation auf das Untersuchungsergebnis ausschließen. Diese Methode könnte in zukünftigen Projekten möglicherweise zusätzlich etabliert werden. Jedoch wäre es bei ausschließlicher Nutzung einer solchen Methode nicht mehr möglich, an den Herzzellen eines getöteten Tieres mehrere verschiedene Versuche durchzuführen, was schon allein aus Gründen des Tierschutzes ein deutlicher Nachteil wäre. Hier sind Nutzen und Schaden oder, in diesem Fall, die Qualität eines Ergebnisses im Vergleich zum möglichen Erzielen mehrerer Ergebnisse, sorgfältig abzuwägen. Hinzu kommt, dass die Färbung der Zellen mittels Gewebesperfusion erfolgen muss, was zu einer ungleichmäßigeren Anfärbung der Strukturen führen könnte.

Weiterhin kann das Ergebnis von der gewählten Art der Auswertung beeinflusst worden sein. Hier wurde zwar die Höhe der Signalspitzen aus der FFT-Analyse auf den Hintergrund normiert; dennoch könnten eine unterschiedliche Güte der Färbung, und dementsprechende unterschiedliche Helligkeit der gefärbten Strukturen, Einflüsse auf die Höhe und deutliche Abgrenzung der ersten Frequenzkomponente haben, da helle Pixel bei der Analyse von Grauskalenbildern stärker in das Ergebnis eingehen, als dunkle.

Letztendlich ist auch eine Auswertung in Form mehrerer manueller Schritte immer fehleranfällig, individuelle Bias ist immer ein bedeutender Faktor, zumal in Kenntnis vorheriger Resultate der Studie, und entsprechender Erwartungshaltung. Hier hätte eine personelle Trennung der Messung und der Auswertung, und/oder eine Blindstudie gegenüber der Zugehörigkeit der untersuchten Zellen zu einer bestimmten Gruppe stattfinden können, was jedoch im Verlauf nicht umsetzbar war, da die Planung des Versuchstages, Zellmessung und unmittelbar vorangehende Ultraschalluntersuchung der Maus von der gleichen Person durchgeführt wurden. Eine personelle Trennung der Messungen sollte aber für die Zukunft angestrebt werden.

Guo et al. [38] schlagen daher mehrere Modifikationen der Messverfahren vor: Eine Automatisierung, um die Bias durch den Untersucher zu minimieren, eine Minimierung der Helligkeitseffekte durch Binärisierung der Bilder, eine Nutzung der Option „Skeletonize“, um nur die Architektur der T-Tubuli, und nicht deren Breite, zu beurteilen. Außerdem sollte nicht nur die Regularität der Tubuli Eingang in die Betrachtung finden, sondern auch die Dichte der T-Tubuli im Herzen; wenn beispielsweise nur wenige Tubuli erhalten sind, diese aber regelmäßig, verfälscht dies das Ergebnis. Daher sollte ein Messwert entwickelt werden, der den Einfluss beider Faktoren einbezieht. Diese Vorschläge von Guo et al. sollten in künftigen Studien zum T-Tubulären Verlust hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf die von uns untersuchten Fragestellungen geprüft werden.

Zusammenfassend bestätigen all diese Ergebnisse aber, dass ein Funktionsverlust der PKC ι zu einem Bild der T-tubulären Architektur führt, wie es aus Kardiomyozyten in Hypertrophie und Herzversagen bekannt ist, während die konstitutive Aktivität der PKC ι das physiologische Bild regulär angeordneter T-Tubuli zeigt.

Die gemessenen Zellen der Gruppe DN- PKC ι waren im Mittel größer, als die Zellen der Gruppe CA-PKC ι . Hier ist zwar die mögliche Selektionierung der Zellen im Laufe der Isolation zu bedenken, wie bereits geschildert; dennoch unterstreicht dieses Ergebnis die Vermutung, dass PKC ι im Signalweg der kardialen Hypertrophie eine Bedeutung zukommt; bei Inaktivität der PKC ι vergrößern sich die Kardiomyozyten. In Kombination mit dem beschriebenen Verlust der Regularität der T-Tubuli entsteht das Bild einer Hypertrophie-Antwort, auf zellulärer Ebene, die dem pathologischen Phänotyp aus Hypertrophie-Patienten [73, 70] und Modellen [118, 69] sehr ähnlich sieht.

Aus anderen PKC-Subtypen ist bekannt, dass sie das Zellwachstum beeinflussen: Eine derartige Zunahme der Zellfläche ist für die Überexpression von PKC α beschrieben [12], und bei einer moderaten Hemmung des RACK-Ankerproteins der PKC ϵ [79]. Ein kardialer Verlust von PKC ϵ und PKC δ im Maus-Fetus ist fatal, die Kardiomyozyten wachsen unkontrolliert, und auch im adulten Tier entsteht nach Aortenkonstriktion eine überschießende Hypertrophie [119], wobei sich diese beiden PKC in ihrer Funktion redundant ersetzen können.

Insofern ist es denkbar, dass auch PKC ι , wie die hier gezeigten Ergebnisse vermuten lassen, einen Einfluss auf das Zellwachstum haben kann. Die Vermutung liegt auch hier nahe, dass die Aktivität der PKC ι für die Aufrechterhaltung der physiologischen Zellgröße verantwortlich sein kann, während eine Herunterregulierung oder ein Funktionsverlust der PKC ι zu einem

hypertrophen Zellwachstum führt.

5.3 Der Einfluss von Nicht-Studien-Parametern

Ein zu beachtender Punkt bei der Betrachtung der Ergebnisse ist sicher die interindividuelle Variation zwischen den Versuchstieren, die auch unabhängig von einem Einfluss der jeweiligen Manipulation im Versuch besteht. Beispielhaft ist hier die in der Hauptstudie an C57Bl6/N (in der dritten Lebenswoche injiziert) festgestellte anfängliche Unterscheidung der Gruppe DN gegenüber den beiden anderen Gruppen im Körpergewicht, in der Übersichtsstudie zu Wahl des geeigneten Untersuchungszeitpunktes. Im Verlauf aller anderen Untersuchungen an diesem Mausmodell änderte sich dieses Ergebnis, es bestand bei allen Tieren zum finalen Untersuchungszeitpunkt kein gruppenbezogener Unterschied im Körpergewicht mehr. Dies kann darin begründet sein, dass bei der zufälligen Auswahl der ersten Tiere (sechs bis acht je Gruppe) in die Transduktionsgruppen schon eine unglückliche Verteilung der Unterschiede im individuellen Entwicklungsstand der Tiere vorgelegen haben kann. Daraus kann sich eine Kumulation schlechter entwicklungsfähiger Tiere in der Gruppe DN ergeben haben. Die Bedingungen wurden dabei dennoch möglichst vergleichbar gehalten: Alle Tiere wogen bei Anlieferung 8-10 Gramm. Sie wurden in Gruppen so zusammengesetzt, dass immer ein Käfig nur Tiere einer bestimmten Transduktionsgruppe enthielt, mit maximal vier Tieren je Käfig.

Es ist auch möglich, dass innerhalb der ersten DN-Gruppe ein Stressor vorlag (beispielsweise aggressives Verhalten der Tiere innerhalb der Gruppe), der zu einer verschlechterten Futteraufnahme oder erhöhtem Energiebedarf geführt haben kann. Zwar sind keine Tiere mit Verletzungen aufgefallen, jedoch ist Aggression innerhalb einer Gruppe männlicher Mäuse immer möglich.

Auch nicht ausgeschlossen werden kann eine negative Auswirkung der Injektion auf die Tiere der ersten DN-Gruppen. Beispielsweise sind Infektionen durch invasive Manipulationen wie der Injektion viraler Vektoren immer möglich, und können die Entwicklung des Individuums bedeutend verzögern. Anzeichen einer allgemeinen Erkrankung waren allerdings bei täglicher Inspektion der Tiere nicht festzustellen. Dennoch ist bei dem Verlauf der Gewichtskurven auffällig, dass der Unterschied zwischen den Gruppen bereits zu einem Zeitpunkt deutlich ist, zu dem sich die Transduktion selbst noch nicht auf den restlichen Phänotyp ausgewirkt haben sollte.

Letztendlich sind sogar innerhalb von eindeutigen Geschwistergruppen, wie wir aus anderen Versuchen wissen, markante interindividuelle Entwicklungsunterschiede zu sehen, ohne, dass ein offensichtlicher Grund dafür vorliegt. In jedem Fall stellte sich die Auswahl der Individuen in den ersten Gruppen als wahrscheinliche Ursache für die Differenzen heraus. Dem kann und sollte in Zukunft möglicherweise entgegengewirkt werden, indem noch unmittelbar vor Applikation der viralen Vektoren eine individualisierte Wiegung des Tieres stattfindet, und auf eine regelmäßige Aufteilung unterschiedlich schwerer Jungtiere geachtet wird. Eine Vergrößerung der Tierzahl für diese wiederholte Ultraschalluntersuchung war im Rahmen des beantragten Tierversuches leider nicht möglich. Alle anderen genutzten Tiere dieser Gruppen wurden in der 10. Lebenswoche, und damit vor dem finalen Versuch oder der Organentnahme, gewogen. Der anfängliche Befund der unterschiedlichen Körpergewichte zwischen den Gruppen ist nach Auswertung all dieser Tiere als falsch positiv zu klassifizieren.

5.4 Betrachtungen zur Optimierung des viralen Gentransfers

In dieser Studie wurden verschiedene Mauslinien und Transduktionszeitpunkte verwendet. Begonnen wurde das Experiment mit männlichen Welpen des FVB/N-Mausstammes, da diese aus der Tierhaltung des Institutes für Experimentelle Chirurgie verfügbar waren. In den ersten Untersuchungen zeigte sich dann echokardiographisch ein deutlich veränderter kardialer Phänotyp. Auch waren die Ergebnisse aus dem Proteinnachweis, sowie die Ergebnisse der Organfluoreszenz zufriedenstellend. Jedoch zeigte sich diese Mauslinie als ungeeignet für Einzelzellexperimente, da bei Isolation kaum vitale Zellen gewonnen werden konnten. Es wurde daher dann der Mausstamm gewechselt, zu C57Bl6/N. Um eine noch effizientere Transduktion zu ermöglichen, wurde nach den Ergebnissen von Lovric et al. [71], auf ein Transduktionsalter von 21 Tagen gewechselt. Die von uns gewählte Dosierung von 10^{12} vg (Vektorgenomen) je Tier, bei einem durchschnittlichen Gewicht der Tiere von 10 g, lag nach der verfügbaren Literatur im wirksamen Bereich für eine fast vollständige Transduktion des Herzgewebes, von den bisherigen Autoren wurden bereits Dosierungen von 10^{11} vg erfolgreich genutzt [90, 8, 146]. Es zeigte sich auch in diesen Tieren ein klarer Phänotyp in den echokardiographischen Studien, jedoch waren im Proteinnachweis mittels Western Blot die artifiziell überexprimierten PKC α -Konstrukte nicht nachweisbar. Die Einzelzellisolation funktionierte dafür mit sehr guter Zellausbeute, eine direkte Fluoreszenz der Zellen durch spezifische Anregung der TagRFPT war wiederum nicht zu zeigen. Die Autofluoreszenz der Zellen überdeckte etwa im gleichen Wel-

lenlängenbereich eine mögliche, geringe spezifische Fluoreszenz. Neben den hier geschilderten Einzelzellexperimenten wurden im Rahmen des Projektes aber noch einige andere Versuche mit den Isolaten durchgeführt, bei denen in Zusammenarbeit mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe die Expression des TagRFPT mittels Immunfluoreszenz (Antikörper mouse anti-TagRFPT) gezeigt werden konnte.

Somit hieße dies, dass eine Expression von TagRFPT (und damit der Transgene) vorhanden ist, die spezifische Fluoreszenz in dem genutzten Modell aber nicht stark genug für einen direkten Nachweis ausgeprägt war. Dies wird unterstützt durch den Befund im Western Blot-basierten Nachweis der TagRFPT-Expression, die eine deutlich geringere Expression in C57Bl6/N-Tieren zeigte als in FVB/N. Dementsprechend ist festzuhalten, dass die Nutzung neonataler FVB/N-Welpen zwar keine Einzelzellexperimente erlaubt, dafür aber die Proteinexpression überlegen ist; bei Nutzung 21 Tage alter C57Bl6/N ist die Proteinexpression im Western Blot kaum bis nicht nachweisbar, dennoch zeigen diese einen kardialen Phänotyp in der Echokardiographie, und liefern in der Zellisolation eine für weitere Versuche ausreichende Ausbeute an Zellen.

Da bis zu diesem Zeitpunkt nicht nur zwei verschiedene Altersgruppen, sondern auch zwei verschiedene Mauslinien untersucht worden waren, musste nun noch geprüft werden, inwieweit die deutlichen Unterschiede vom Alter oder der verwendeten Mauslinie abhängig waren. Zur Vervollständigung der Befunde wurden also noch neonatale C57Bl6/N transduziert, und deren Ergebnisse mit den beiden anderen Modellen verglichen. Diese Tiere zeigten nach gleicher Expressionszeit keinen deutlich veränderten kardologischen Phänotyp in der Echokardiographie. Ein Proteinnachweis mittels Western Blot war zwar im direkten Vergleich mit FVB/N noch schwächer, aber möglich.

Eine mögliche Ursache für die fraglichen Befunde in der Western Blot-Untersuchung wäre eine geringe Spezifität der verwendeten Antikörper. Sollte beispielsweise im Rahmen der Prozessierung der Proteine in bestimmten Mauslinien oder Entwicklungsstadien der Herzzellen ein Schritt stattgefunden haben, der die Bindungsstelle für den Antikörper auch nur gering modifiziert, wäre das Ergebnis falsch negativ. Zudem könnte eine möglicherweise nur geringe Proteinmenge in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze im Western Blot liegen. Somit sind ergänzende Untersuchungen angezeigt, die von anderen Mitgliedern des Projektes durchgeführt wurden. Es wurde von Monika Barth im Rahmen des Projektes eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)-Untersuchung durchgeführt, die einen Nachweis der transduzierten Gene auf RNA-Ebene ermöglichte. Dabei wird gemessen, ab wieviel PCR-Zyklen

sich die RNA deutlich findet; je mehr RNA enthalten ist, desto weniger Zyklen sind nötig. Es konnte von Monika Barth dabei gezeigt werden, dass die Expression der DN- und CA-PKC α auf RNA-Ebene deutlich vorhanden war. Somit kann angenommen werden, dass eine Expression stattfindet, deren Ergebnis auf Proteinebene jedoch quantitativ zu gering ist, um mit Western Blot detektiert werden zu können. Dass dennoch der veränderte kardiologische Phänotyp bei geringgradig geänderter Expression zu zeigen ist, kann für eine bedeutende Rolle der Aktivität der PKC α sprechen. Eine nur geringe Überexpression bietet hier zudem den Vorteil, deutlich näher am physiologischen Zustand zu sein. Dadurch ist das Auftreten massiver Gegenregulationen weniger wahrscheinlich, und das Ergebnis der Experimente mit größerer Sicherheit auf die Überexpression der PKC α -Aktivitätstypen zurückzuführen.

Es ist in der Summe jedoch festzuhalten, dass bei Transduktion der C57Bl6/N-Tiere in der dritten Lebenswoche, wie dies von Lovric et al. [71] veröffentlicht wurde, überraschenderweise weniger Protein detektiert wird, als bei neonataler Injektion in diese Mauslinie oder in FVB/N-Mäusen. Unsere Ergebnisse widersprechen den Befunden von Lovric et al. 2012, zumindest für das von uns genutzte System.

Zum viralen Gentransfer wurden dort ebenfalls adeno-assoziierte Viren genutzt. Diese werden so bezeichnet, da sie ohne ein begleitendes Helfervirus (beispielsweise ein Adenovirus) nicht zur Replikation in der Lage sind. Dies erhöht die Biosicherheit dieses System gegenüber Adeno- oder Lentiviren stark. Es gibt zudem weitere methodische Vorteile: Die Expression der mit AAV transduzierten Proteine setzt zwar erst etwa ein bis zwei Wochen nach Transduktion ein, gegenüber dem Beginn nach drei Tagen bei Adenoviren, dafür aber persistiert die Expression aber für Monate auf einem hohe Level, eine Infektion ist für die Zellen nicht zytotoxisch, und ruft keine nennenswerte Immunreaktion der Tiere hervor [141]. Bei deren Studie zeigte eine intraperikardiale oder intramyokardiale Injektion eine gute selektive Transduktion von Herzgewebe [127]. Allerdings ist eine solche Applikationsroute mit hohem Risiko für das Tier verbunden, und auch für eine mögliche spätere klinische Anwendung nicht praktikabel. Zudem sollte eine solche Injektion unter visueller Kontrolle erfolgen, etwa durch Injektion unter Echokardiographie [120]. Eine systemische Applikation über periphere Applikationsstellen ist daher von Interesse. Hierzu ist allerdings eine exakte Zielfindung der Viren auf spezifische Zellen und Gewebe unumgänglich, um einerseits das Zielgewebe mit ausreichend infektiösen Partikeln zu erreichen, und andererseits unerwünschte Auswirkungen der Transduktion anderer Gewebe zu vermeiden. Hier war es für die Entwicklung spezifischer Systeme hilfreich, die verschiedenen,

nacheinander identifizierten Serotypen auf ihren Tropismus zu untersuchen. Die Serotypen unterscheiden sich nur gering, an einer speziellen Lokalisation, dem Kapsidprotein VP1 in den so genannten „looped out domains“ [34], das dennoch für deutlich unterschiedliche Tropismen und Expressionsergebnisse verantwortlich scheint. Hierdurch wurde von Pacak [90] gezeigt, dass eine Applikation von 10^{11} Vektorgenomen (vg) des Serotyps AAV9 in die Vena temporalis zu einer bevorzugten Transduktion kardialen Gewebes führte. Hier war bei Applikation der gleichen Dosierung in zwölf Wochen alte Tiere das Expressionslevel allerdings niedriger. Inagaki et al. [48] zeigten, dass AAV9 dem bis dahin als optimal postulierten AAV8 in der Transduktion kardialen Gewebes überlegen war. Es zeigte sich, dass mit 3×10^{11} vg der AAV9 etwa 80% der Kardiomyozyten transduziert wurden, aber nur 14% von AAV8 dieser Dosierung. In den hier mit sechs bis acht Wochen auf unterschiedlichen peripheren Routen (Schwanzvene, Portalvene, subkutan, intraperitoneal) transduzierten Tiere erreichte die Expression von der zweiten bis sechsten Woche nach Applikation einen konstanten Höhepunkt, der danach nur langsam abnahm. Eine möglichst lange Expression der transduzierten Gene wäre auch für eine klinische Anwendung bedeutsam, da Herzerkrankungen generell einen chronischen Charakter haben, und somit für deren mögliche Behandlung via Gentransfer eine lange Expression bedeutsam ist, auch, um mögliche Immunreaktionen durch wiederholte Applikation zu vermeiden. Dabei war nur die subkutane Injektion weniger effizient, als die anderen Routen.

Von Bish et al. [8] wurde AAV9 dann hinsichtlich des Gewebstropismus mit AAV1, AAV6, AAV7 und AAV8 verglichen. Die Viren wurden neonatalen Mäusen mit $2,5 \times 10^{11}$ Partikeln subxiphoidal in das Perikard injiziert, wie schon von Zhang et al. [145] beschrieben. Auch hier zeigte sich AAV9 den anderen Serotypen hinsichtlich der Herzspezifität überlegen. Dies wurde in derselben Studie auch für adulte Ratten gezeigt. Die systemische Applikation via Schwanzvene wurde mit den Serotypen AAV1-AAV9 von Zincarelli et al. [146] verglichen. Hier wurden 10^{11} vg in adulte, 8 bis 10 Wochen alte Mäuse der Linie BalbC injiziert. Auch hier zeigte AAV9 die beste kardiomyozytäre Expression, von Tag sieben bis über ein Jahr der Beobachtung. Zudem wurde die Persistenz der Viruspartikel im Blut untersucht. AAV1 und AAV4 wurden innerhalb einer Stunde, AAV6, AAV 7 und AAV8 nach ein bis sechs Stunden, AAV9 aber erst nach sechs bis 48 Stunden eliminiert. Neben dem Herzen exprimierten durch AAV9 vor allem der Skelettmuskel und die Leber das transduzierte Protein. Die verzögerte Elimination der AAV9 aus dem zirkulierenden Blut wurde auch von Kotchey et al. [58] untersucht. Hier wurde festgestellt, dass AAV9 besonders widerstandsfähig gegen die Entfernung aus dem Blut

durch die Kupffer'schen Sternzellen in der Leber ist, und somit eine längere Zeit für den transepithelialen Übergang in die Zielzellen besteht. Hier wurden 10^{12} vg je Maus in adulte C57Bl6-Tiere peripher injiziert.

Zusammenfassend ist auffällig, dass in vielen Studien nicht nur unterschiedliche Transduktionsrouten, sondern auch verschiedene Mauslinien und Altersgruppen an Mäusen genutzt werden. Bostick et al. [9] verglichen daher neonatale und adulte Tiere, und verschiedene Routen der Transduktion (intrakardial oder periphere Vene) in C57Bl10-Mäusen unter Verwendung von AAV9-Viren. Zwölf Wochen nach Applikation zeigte sich, dass das Alter das Expressionsmuster beeinflusste, aber nicht die Route der Applikation. Hier wurden $3,5 \times 10^{11}$ vg je Gramm Körpergewicht appliziert. Die Expression in Skelettmuskel und Herz war unabhängig von allen Faktoren, die Retina wurde juvenil besser transduziert, Aorta, Leber und Niere dagegen eher in adulten Tieren. Dem steht das Ergebnis von Kaestner et al. [53] entgegen, bei dem für unterschiedliche Transduktionsrouten (intrakardial, V. jugularis und Schwanzvene), und verschiedene Altersklassen, unterschiedlich gute Transduktionsergebnisse gefunden wurden; es wurde zudem gezeigt, dass auch die Reproduzierbarkeit der Transduktionsergebnisse stark methodenabhängig ist, was die Vergleichbarkeit der Tiere untereinander stark beeinflusst, und deshalb bei der Planung einer Studie bedacht werden sollte.

Insgesamt kann das von uns verwendete AAV9-Vehikel also als vielfach erprobte, erfolgversprechende Variante des viralen kardiomyozytäre Gentransfers betrachtet werden.

Müller et al. [84] zeigten, dass der Gewebstropismus durch herzspezifische Promotoren weiter verbessert werden kann. Ein starker Promotor, der sogenannte Zytomegalievirus-Promotor (CMV), beschleunigt dabei die transkriptionale Aktivität in den transduzierten Kardiomyozyten. Ein zusätzlicher MLC (Myosin light chain)- Promotor erhöht die Spezifität für Kardiomyozyten zusätzlich. Dieses $CMV_{enh}/MLC800$ -System wurde in dieser Form auch in den von uns applizierten AAV9-Viren genutzt.

Eine Begründung für mögliche Altersunterschiede in der Transduktionseffizienz zeigten Lovric et al. [71], die als Grund für eine bessere Transduktion von Kardiomyozyten in 21 Tage alten Tieren, gegenüber neonatal transduzierten Tieren, in einer Abnahme der Effizienz von DNA-Reparaturmechanismen in Herzzellen mit Reifung der Tiere sehen. Dementsprechend ist eine Nutzung von AAV besonders zur Transduktion von Geweben interessant, deren Zellen terminal differenziert sind. In anderen Zellen würden AAV-Genome als „beschädigte DNS“ erkannt, und entsprechend degradiert. Auch aufgrund dieser Resultate wurde in unserem Projekt ein Alter

von 21 Tagen für die Transduktion der Tiere im Hauptversuch gewählt.

Trotz der inzwischen vielfältigen Publikationen werden in unterschiedlichen Studien weiterhin unterschiedliche Mauslinien, Altersklassen, Applikationsrouten, und auch Dosierungen der Viruspartikel je Gramm oder je Tier genutzt. Ein optimiertes Protokoll zur Nutzung des Systems in kardiologischen Fragestellungen ist bisher nicht publiziert. Wie aus unseren Ergebnissen hier ersichtlich ist allerdings nicht nur das Alter der Applikation, sondern auch die genutzte Mauslinie für unterschiedliche Werte der Proteinexpression verantwortlich, und damit auch für teilweise unterschiedliche Phänotypen bei Expression des gleichen Proteins. Es zeigte sich, dass allein für die Proteinexpression unserer Zielproteine, offenbar eine Kombination aus neonataler Transduktion und der Mauslinie FVB/N optimal scheint. Dennoch wurde diese Mauslinie aufgrund der schlechten Einzelzellisolationen für nicht weiter nutzbar befunden. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Protokoll anhand der Ergebnisse von Lovric et al. optimiert, und es zeigte sich ein klarer Phänotyp der C57Bl6/N -Tiere in der Echokardiographie. Die Injektion der gleichen Virusmenge (10^{12} vg) in neonatale Tiere bewirkte zwar eine etwas größere Proteinexpression, nachgewiesen im Western Blot und der qPCR, jedoch trat der in der Hauptuntersuchung gefundene Phänotyp nach sieben Wochen der Expression nicht auf. Um eine mögliche Verzögerung der Expression als Ursache für das Fehlen der kardiologischen Auffälligkeiten in Betracht zu ziehen, wurden auch Proben neonatal transduzierter Mäuse beider Linien nach dreieinhalb Wochen der Expression untersucht. Eine Expression der Zielproteine war zu diesem Zeitpunkt vorhanden. Es sollte allerdings noch geprüft werden, wie sich eine Angleichung der Virendosierung auf das jeweilige Körpergewicht der Tiere auswirken würde.

Das virale System der AAV9 -Viren selbst, kombiniert mit dem $CMV_{enh}/MLC800$ -Promotoren-System kann jedoch unserer Ansicht nach sowohl aufgrund der Literaturlage, als auch aufgrund der eigenen Ergebnisse, als grundsätzlich wirksam erachtet werden.

Als eine wesentliche Nebenerkenntnis aus dieser Arbeit ist festzuhalten, dass eine Nutzung eines viralen Transduktionssystemes grundsätzlich immer in einer Pilotstudie getestet werden sollte. Dabei sind mindestens zwei verschiedene Altersgruppen (neonatal, adult), verschiedene Titer, und nach Möglichkeit verschiedene Injektionsrouten und auch Mausstämme zu untersuchen. Ein Wechsel der Mauslinie im Experiment sollte nur vollzogen werden, wenn, wie hier, aus methodischen Gründen unvermeidbar. Ein Standardprotokoll gibt es nach derzeitigem Stand der Forschung nicht. Es ist, bei der Vielfalt der in der Literatur genutzten Protokolle, auch nicht möglich, herauszufinden, welche Varianten davon bisher nicht funktioniert haben.

Es gibt des Weiteren andere Möglichkeiten, die Kardiomyozyten spezifisch mit Fremd-DNS zu transduzieren [83]. Zum einen könnten Lenti- oder Adenoviren genutzt werden. Allerdings spricht, neben der geringeren Persistenz im Organismus, besonders die Immunogenität dieser Partikel dagegen. Hinzu kommen erhöhte Anforderungen an die Biosicherheit, da diese viralen Systeme replikationskompetent sind. Zudem werden mit Adenoviren transduzierte Zellen vom Organismus eliminiert. Nicht virale Applikationsarten konzentrieren sich auf die direkte intrakardiale Applikation von DNS, die jedoch erstens invasiv, und zweitens lokal sehr begrenzt ist. Auch möglich ist eine periphere Applikation von Liposomen oder so genannten „Microbubbles“. Das sind kleine, befüllbare Gasbläschen, die mit einem starken Ultraschallpuls lokal und kontrolliert zum Platzen gebracht werden können.

Die Liposomen haben dabei den großen Nachteil, dass sie per se nur sehr begrenzt gezielt auf ein Gewebe gerichtet werden können. Microbubbles dagegen sind nur lokal anwendbar, und nur in Kombination mit speziellen, teuren Ultraschallgeräten. Zudem ist die Produktion der Microbubbles selbst an bestimmte Geräte gebunden, und relativ kostenintensiv. Allerdings sind diese Microbubbles auch wieder mit dem Einsatz von AAV oder anderen Viren kombinierbar. Die Evaluierung und Etablierung dieser Technik für ähnliche Fragestellungen soll für zukünftige Projekte angedacht werden, da das dafür benötigte Ultraschallgerät seit kurzem verfügbar ist.

5.5 Aldosteron beeinflusst die Herzfunktion abhängig von $G\alpha_qG_{11}$

Wir haben Gruppen von Tieren der Genotypen „Wildtyp“ und „Doppel-Knockout“ jeweils mit Placebo-Implantaten, oder Aldosteron-Minipumpen versehen. Die vier Gruppen waren dementsprechend wt Dummy, wt Aldo, DKO Dummy, und DKO Aldo. Nach sechswöchiger Aldosteronapplikation war, gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe, bei beiden Genotypen die Herzfrequenz gesunken. Dies war der auffälligste Unterschied, alle weiteren Parameter müssen in dem Kontext unterschiedlicher Körpergewichte betrachtet werden. Die DKO-Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Messung nach der sechswöchigen Applikationsphase signifikant höhere Körpergewichte auf, unter beiden Bedingungen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt eine heterogene Versuchstierpopulation vorlag. Darunter muss vor allem das in DKO Dummy gegenüber wt Dummy größere linksventrikuläre Volumen betrachtet werden, auch wenn dies in der Systole gerade kein Signifikanzniveau erreicht. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den wt-Gruppen und DKO Aldo besteht dagegen nicht, sicherlich auch wegen der auffallend größeren Schwankung der DKO Aldo-Werte. Betrachtet man die

Herzgewichte isoliert, ergeben sich Unterschiede, die jedoch durch Normalisierung auf das Körpergewicht entfallen, und damit dem möglichen Entwicklungsunterschied zugeordnet werden können.

Ein solcher Unterschied im Körpergewicht kann durchaus schon vor Beginn des eigentlichen Experimentes vorgelegen haben. Daher erscheint es sinnvoll, die Befunde vor, und nach Beginn der Aldosteronapplikation zu vergleichen. So wurden in einer folgenden Auswertung nur die sich entwickelnden Differenzen der Echokardiographie-Befunde vor und nach der Applikationszeit verglichen. Hier zeigte sich, dass unter Aldosteronbehandlung im Wildtyp einige Effekte erkennbar sind: Die Auswurffraktion EF, und die IVRT steigen durch die Aldosteronbehandlung, während die Herzfrequenz im Verlauf abnimmt. Diese drei Parameter können voneinander abhängig sein; Sinkt die Herzfrequenz, so kann auch die Relaxationsphase bis zur Klappenöffnung länger dauern. Dagegen könnte die Auswurffraktion steigen, um das benötigte Herzminutenvolumen bei niedriger Frequenz zu erhalten. Allerdings könnte eine verlängerte IVRT auch mit einer verzögerten Relaxation des Ventrikels verbunden sein, dann wären üblicherweise auch Änderungen im Einstromprofil durch die Mitralklappe erkennbar. Wie eng die funktionellen Parameter unter Narkose mit der Höhe der Herzfrequenz zusammenhängen, ist allerdings in dieser Studie nicht genau geprüft worden. In Zukunft sollte bei solchen Tiermodellen, bei denen ein Effekt auf die Herzfrequenz zu vermuten sein könnte, die exakte Auswirkung der Narkose sowie einer medikamentös verringerten Herzfrequenz an Tieren aller verwendeten Genotypen in einem Vorversuch getestet werden.

Unter Aldosteronapplikation fiel bei Betrachtung der untersuchten Genotypen eine Zunahme der E-Wellen-Geschwindigkeit in der DKO-Gruppe gegenüber der wt-Gruppe auf. Da aber die A-Welle in den DKO-Tieren auch tendenziell größer wurde, wenn auch nicht signifikant, ist der Quotient aus E- und A- Welle wieder zwischen den Genotypen vergleichbar. Bei den absoluten Werten nach sechswöchiger Applikation war kein Unterschied in diesem Parameter aufgefallen. Der genannte Unterschied in der E-Wellen Geschwindigkeit kommt allerdings vermutlich auch durch die großen Unterschiede in der Standardabweichung zustande, besonders zwischen wt Aldo und DKO Aldo. Eine Vergrößerung der E- und A-Welle kann ebenfalls mit einer Änderung der diastolischen Ventrikelrelaxation in Zusammenhang gebracht werden. Die fehlende Änderung des MV E/A-Quotienten spricht allerdings gegen einen klaren pathologischen Phänotyp. Gleichzeitig muss das Absinken der Herzfrequenz durch den Aldosteroneinfluss als Faktor für eine Änderung der Mitralklappenflüsse bedacht werden.

Und abschließend ist auch hier die Tierzahl, besonders mit den fünf Tieren in Gruppe DKO-Aldo, sehr gering. Die Aussage der Ergebnisse wäre gesicherter und fundierter, und möglicherweise mehr oder andere Befunde zu erkennen, würde die Tierzahl hier noch erhöht.

Aldosteron beeinflusst bekanntermaßen ET-1 und Ang II, und ET-1 und Ang II wirken auf den $G\alpha_q G_{11}$ -Signalweg. Eine Verknüpfung dieser beiden Mechanismen lag also nahe. Die Erwartung, dass bei einem DKO von $G\alpha_q$ und G_{11} Effekte des Aldosterons blockiert sein könnte, konnte in unseren Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden. Dies fügt sich gut in den derzeitigen Stand der Forschung ein.

Zwischen den Tieren der wt- und der DKO-Linie liegen Unterschiede im kardialen Phänotyp vor, die sich in unserer Kontrollbedingung in einem größeren diastolischen, und einem nicht ganz signifikant größeren systolischen linksventrikulären Volumen äußern, wie durch die Untersuchungen von Wiesen et al. [139] gezeigt. Zudem ist bekannt, dass der $G\alpha_q G_{11}$ -Signalweg bedeutsam ist für die Dauer und Höhe des Aktionspotentials, die Aufrechterhaltung der Membrankapazität und die Membranströme, und ein physiologisches Ca^{2+} -Verhalten [91].

Eine milde dauerhafte Aktivität des $G\alpha_q G_{11}$ -Signalweges trägt zum Schutz der physiologischen Eigenschaften der Zelle bei [136], aber eine chronische Stimulation kann zur Entwicklung von Herzerkrankungen und Änderungen im Genexpressionsmuster führen [39, 26]. Für $G\alpha_q$ ist bekannt, dass die Aktivierung dieses Signalweges Hypertrophie und Herzversagen sowie kardiomyozytäre Apoptose verursacht [3]; eine Überexpression von $G\alpha_q$ senkt dagegen die Kontraktilität der Kardiomyozyten ab [22]. An globalen KO-Mäusen überlappen die Effekte von $G\alpha_q$ und G_{11} dabei partiell, wie von Offermanns et al. [88] gezeigt. Eine teilweise Hemmung der $G\alpha_q$ schwächte eine induzierte Hypertrophie ab [4].

Auch Aldosteron spielt eine wichtige Rolle in pathologischen Prozessen im Herzen. Dartsch et al. [24] zeigten bei Ratten ein strukturellen und elektrischen Umbau der Herzzellen nach vierwöchiger chronischer Applikation von Aldosteron. Dies wäre durch die Gabe von Aldosteron-Antagonisten zu unterdrücken. Auch in klinischen Studien verbessert Spironolacton, ein oft genutzter Aldosteron-Antagonist, die Langzeitprognose bei Hypertrophie und anderen Pathologien [98, 38].

Eine reine chronische Applikation von Aldosteron bewirkt dabei eine Hypertrophie ohne eine periphere Hypertonie; diese hatte bei früheren Modellen, bei denen zusätzlich eine einseitige Nephrektomie und eine salzhaltige Diät angewendet wurden, immer einen zusätzlichen, schwer bestimmbareren Einfluss auf das Ergebnis [17, 142]. Durch Aldosteron-Antagonisten nimmt auch

ventrikuläre Arrhythmogenität ab [100], wodurch eine Rolle des Aldosterons in ventrikulären Arrhythmien naheliegt.

Ein erhöhter Aldosteron-Spiegel ist dabei als ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse beschrieben [112, 143, 104]. Die Aldosteron-Antagonisten binden an spezifische Matrix-Metalloproteinasen (MR), die die Aldosteronwirkung vermitteln. [67, 68]. Unabhängig von der Produktion in der Nebennierenrinde findet auch eine Aldosteronsynthese im Herzgewebe selbst statt [115]. Die subzellulären Wirkungsmechanismen des Aldosterons in Kardiomyozyten sind teilweise bekannt [137]. Aldosteron beeinflusst die Genexpression und Funktion von ET-1 und Ang II; in Zellkultur stimuliert Aldosteron das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) [130]. Die Anzahl der Angiotensin-1-Rezeptoren (AT-1) steigt durch Aldosteron und salzhaltige Diät [103].

5.6 Interstitielle Kollagenablagerung durch Aldosteron in Abhängigkeit von $G\alpha_qG_{11}$

Die Verwendung der spezifischen Fluoreszenz von mit Siriusrot angefärbten Geweben zeigte sich in unserem Vergleich als geeignet für die Untersuchung der histologischen Schnitte der Herzen aus der Aldosteron- $G\alpha_qG_{11}$ -Studie. In der Untersuchung zeigte sich, dass die Applikation von Aldosteron zu einer Erhöhung des Kollagengehaltes im Herzgewebe der wt-Tiere führte. In den $G\alpha_qG_{11}$ -DKO-Tieren blieb dieser Kollagenanstieg aus. Dies unterstützt die These, dass die Wirkung von chronisch appliziertem Aldosteron auf das Herzgewebe über $G\alpha_qG_{11}$ -gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird. Schon von Wiesen et al. konnte an unserem Institut gezeigt werden, dass im histologischen Vergleich die altersbedingte kardiale Fibrose in den wt-Tieren deutlich stärker ausfällt, als im $G\alpha_qG_{11}$ -DKO. Dementsprechend war es fraglich, ob dies auch für eine Fibrose durch pathologische Prozesse zutrifft. Aldosteron ist bei chronischer Applikation als profibrotisch bekannt [18, 64] und führt, wie von Sun 2002 [123] gezeigt, zu oxidativem Stress. Die NADPH-Oxidase ist dabei in die Entstehung der interstitiellen Fibrose im Herzen involviert [51], und damit die Hochregulierung der Transkription von NF κ B und MMP2. Diese Hochregulierung wiederum geschieht unter anderem über die Aktivierung des Signalweges des $G\alpha_q$ -gekoppelten AT1-Rezeptors für Angiotensin, deren Anzahl durch Aldosteron steigt [103]. Das hier erzielte Ergebnis zeigt also diese mögliche Verknüpfung der profibrotischen Eigenschaften von Aldosteron mit dem $G\alpha_qG_{11}$ -Signalweg. Hier wäre es möglicherweise noch

von Interesse, in einer Weiterführung dieses Projektes auch die Herzen von den separaten KO-Mäusen für $G\alpha_q$ oder G_{11} auf den Kollagengehalt hin zu untersuchen.

Wie schon bei Wiesen et al. veröffentlicht, erfolgt die Messung des Kollagengehaltes anhand einer Siriusrot-Färbung, die für Kollagen spezifisch ist. Jedoch wurde in der vorherigen Studie der Anteil magenta-roter Bereiche (Kollagen) am gesamten Herzgewebe (angefärbter Bereich) im Durchlichtbild gemessen. Diese Methode wurde in früheren Studien oft genutzt [81, 86, 89]. Allerdings ist sie fehleranfällig, da unterschiedliche Qualitäten der Präparation oder der Färbung zu unterschiedlichen Nuancen führen können. Zudem werden sehr dünne Kollagenfasern so nicht erfasst, und der Kollagenanteil dann unter Umständen unterschätzt.

Daher wurde hier in einer ersten Untersuchung die Pikrosiriusrot-Färbung mit der Messung mit linear polarisiertem Licht gewählt. Diese ist etabliert seit Jalil [50] und Weber [131]. Die ohnehin vorhandene Polarisierung des Kollagens wird dabei durch die der Färbung noch verstärkt. Jedoch war mit dieser Methode zwischen den Untersuchungsgruppen hier kein Unterschied zu finden. Die Sensitivität dieser Methode wird allerdings von verschiedenen Autoren auch bezweifelt; so zeigten Rich et al. [102], dass die Verwendung von zirkulär polarisiertem Licht zu deutlich sensitiveren Ergebnissen führt. Dies wird damit erklärt, dass bei linear polarisiertem Licht die Kollagenfasern nicht erfasst werden, die annähernd parallel zum Strahlengang stehen [138]. Eine entsprechende Anordnung des Messplatzes, beispielsweise in Form eines rotierbaren Objektisches, ist am von uns genutzten Versuchsaufbau jedoch nicht ohne weiteres möglich.

Des Weiteren war im Verlauf unserer Untersuchung erkennbar, dass diese Messmethode sehr anfällig war für falsch positive Befunde aufgrund von Artefakten. Tatsächlich ist bekannt, dass verschiedene kristalline Strukturen [97], wie sie auch bei Trocknung entstehen, von polarisiertem Licht erfasst werden, aber auch Formalin-Häm-Komplexe [124], oder Stärkemoleküle [60], mit denen auch die Handschuhe bepudert sein können, mit denen die Proben gewonnen oder präpariert wurden. Entsprechende als „positiv“ erscheinende Verunreinigungen wurden auf einigen Schnitten gefunden, weshalb das Ergebnis der Untersuchung mit dieser Methode sicherlich äußerst kritisch betrachtet werden sollte.

Auch deshalb wurden die gleichen Proben mit einer zweiten Nachweismethode für Picosiriusrot-positive Gewebe gemessen, die deutlich sensitiver ist, nämlich mit Fluoreszenzmikroskopie an einem Konfokalmikroskop. Die Anregungswellenlänge von 543 nm und die Emissionswellenlänge bei 633 nm bedeuten eine Fluoreszenz im orange-roten Bereich des Spektrums. Die Siriusrot-Fluoreszenz ist also von der stärksten Autofluoreszenz im grünen Bereich des Spek-

trums (Anregung 440-490 nm, Emission 500-550 nm) deutlich unterschiedlich, wie von Vogel et al. [128] gezeigt werden konnte. Auch spielt die Orientierung der Kollagenfäden im Bezug zum Strahlengang bei der Fluoreszenzmessung keine Rolle. Zudem werden die oben genannten Artefakte mit dieser Methode nicht erfasst; lediglich zeigte das in wenigen Schnitten durch Austrocknung geschädigte Gewebe eine stärkere Anfärbung, weshalb diese Schnitte in beiden Messungen von der Auswertung ausgenommen wurden.

Mit der Fluoreszenzmessung zeigte sich dann auch, dass der Kollagenanteil in den Herzen der mit Aldosteron behandelten wt-Mäuse signifikant höher lag als bei den unbehandelten wt-Mäusen. Dies war aus dem bisherigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zu erwarten, und zeigt vor allem die grundsätzliche Funktionalität des Modelles; dagegen unterschieden sich die Tiere der $G\alpha_qG_{11}$ -DKO Gruppen mit und ohne Aldosteron nicht deutlich voneinander. Dies deckt sich mit der aufgestellten These, dass der $G\alpha_qG_{11}$ -gekoppelte Signalweg auch in der Entstehung der durch chronischen Hyperaldosteronismus hervorgerufenen Fibrose des Herzens eine wesentliche Rolle spielen könnte. Bei $G\alpha_qG_{11}$ -DKO geht auch folgerichtig diese profibrotische Eigenschaft der Aldosteronapplikation verloren.

Beim Vergleich beider Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden ist überdies auffällig, dass, obgleich die Anfälligkeit für Artefakte in der Polarisationsmethode höher war, die gemessene Kollagenmenge mit dieser Methode niedriger ausfällt als bei der Fluoreszenzmessung. Dies deckt sich mit den erwähnten Befunden von Whittaker [138], die eine grundlegende Unterschätzung des Kollagengehaltes mit der Polarisationsmikroskopie bestätigen.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss jedoch wieder beachtet werden, dass die Aussagekraft der statistischen Analyse durch die geringe Anzahl an Proben beeinflusst wird. Da allerdings die Herzen nur entweder für eine histologische Untersuchung fixiert, oder die Zellen für Einzelzellexperimente isoliert werden können, waren nicht mehr Proben unterschiedlicher Individuen verfügbar. Außerdem wurden auch, wie bereits erwähnt, einige Schnitte wegen der Artefakte durch Austrocknung von der Untersuchung ausgeschlossen.

5.7 TAC in $G\alpha_qG_{11}$ -DKO: Wenig Unterschied zum Wildtyp

In der hier durchgeführten Studie wurden im Rahmen der $G\alpha_qG_{11}$ - Projektes Aortenkonstriktionen an 30 Wochen alten Tieren der Gruppen wt und DKO durchgeführt. Das Alter wurde so gewählt, da aus Wiesen et al. [139] bekannt ist, dass im Alter von 32 Wochen in dieser Mausli-

nie der prominenteste kardiale Phänotyp vorliegt: Die EF und FS war in DKO signifikant erhöht, genau wie MV E/A, verglichen mit den Wildtyp-Tieren. Zudem war die Herzrate in DKO signifikant geringer. Es konnte jedoch in den wt-Tieren gezeigt werden, dass die Erhöhung der EF und des FS nicht nur durch die verringerte Herzfrequenz bedingt sein können, sondern, bei medikamentöser Erniedrigung der Herzfrequenz, diese beiden Parameter in den Tieren sogar fielen. Demnach müssten die gesehenen Effekte direkt oder indirekt mit dem Funktionsverlust von $G\alpha_q$ und G_{11} zusammenhängen. Zudem war der Blutdruck in DKO-Tieren signifikant niedriger als in den Wildtyp-Tieren. Insgesamt zeigte sich das Bild eines erniedrigten peripheren Widerstandes in den Tieren mit G_{11} -KO. Daraus ergab sich die Frage, welche Auswirkungen eine operative Erhöhung dieses Widerstandes mittels Aortenkonstriktion hätte. Um dies zu beantworten, wurden die hier beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass bei weiterhin niedrigerer Herzfrequenz in den TAC-operierten DKO-Tieren schon nach 14 Tagen das ventrikuläre Volumen gegenüber der DKO-Sham-Gruppe größer wurde, während dies in der Wildtyp-Kontrolle ausblieb; dabei fand in beiden TAC-Gruppen hypertrophes Herzwachstum statt, gekennzeichnet durch Zunahme der normalisierten Herzmasse. Es kann nun abgeleitet werden, dass der $G\alpha_qG_{11}$ -Verlust zu einem verminderten Widerstand des Herzens bei Belastung durch periphere Hypertonie führt. Das ergänzt den Befund von Wiesen et al., der auf einen generell geringeren peripheren Widerstand in $G\alpha_qG_{11}$ -DKO-Tieren hindeutete.

Die Erhöhung des ventrikulären Volumens bei gleichzeitiger Zunahme der Herzmasse kann ein frühes Stadium der Dekompensation anzeigen, oder die eingeschränkte oder fehlende Fähigkeit zur Kompensation der Volumenüberlastung. Dabei ist zu bemerken, dass die EF zwar statistisch in der Gruppe DKO-TAC noch nicht geringer ist als in den anderen Gruppen, betrachtet man jedoch die einzelnen Werte, so fällt auf, dass lediglich ein einzelner höherer Wert die Entstehung einer statistischen Signifikanz verhindert. Es gibt keine statistischen Gründe, dieses Tier auszuschließen, dennoch beeinflusst dieser Wert das Ergebnis deutlich. Eine Vergrößerung der Tierzahl muss daher in der gesamten Studie angestrebt werden, um die Beobachtungen insgesamt zu veri- oder falsifizieren.

Die Untersuchung der Reaktion von $G\alpha_qG_{11}$ -KO-Tieren auf eine induzierte Hypertrophie erfolgte in ähnlicher Weise schon bei Wettschurek et al. [136]. Dort jedoch waren die Tiere mit 12-16 Wochen deutlich jünger, und das Knockout durch eine konstitutive Cre-Rekombinase induziert, nicht, wie bei uns genutzt, durch eine konditionelle, mit Tamoxifen aktivierbare Cre-

Rekombinase. Dadurch starben in deren Studie auch etwa 75% der Tiere perinatal, und zeigten bei genauerer Untersuchung hypoplastische Herzen. Des Weiteren erfolgte dort die Aortenkonstriktion an der A. abdominalis, in größerer Distanz zum Herzen. Mit diesem Versuchsaufbau erzielten Wettchurek et al. die Erkenntnis, dass das $G\alpha_qG_{11}$ -KO Hypertrophie verhindern könne, was sich jedoch in den von uns erzielten Resultaten nicht bestätigte. Der Phänotyp der von uns genutzten Tiere zeigte nach TAC auch im DKO zur Hypertrophie, allerdings zu einer beginnend dekompensierten Form. Zusammenfassend muss also die Einschränkung getroffen werden, dass die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Experimenten, wie auch die von Wiesen et al., nur bedingt mit den Ergebnissen von Wettchurek verglichen werden können. Die gefundenen Differenzen zwischen den Resultaten beider Studien sind bei derzeitiger Datenlage allerdings kaum erklärbar, und bedürfen einer genaueren Prüfung.

Einschränkend für das Ergebnis ist auch, wie bereits erwähnt, dass in der hier durchgeführten Studie bisher nur wenige Tiere genutzt werden konnten. Somit sind die Tierzahlen, vor allem in den Sham-Kontrollgruppen, eigentlich zu gering für ein statistisch valides Ergebnis; da beispielsweise keine Normalverteilung geprüft werden konnte, musste diese angenommen werden, um die entsprechenden Vergleiche zu treffen. Dennoch muss und wird hier eine ergänzende Untersuchung von mehr Tieren nötig sein, um diese Ergebnisse valide zu bestätigen. Des Weiteren kann bei den geringen Tierzahlen und dem fortgeschrittenen Alter der Tiere nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Unterschiede auf individuellen Auswirkungen des Alterungsprozesses beruhen. Genauso könnten altersbedingte Einflüsse aber auch andere Effekte maskieren.

5.8 Bedeutung der β -Untereinheit für die Herzfunktion

Im ersten Teil der hierzu durchgeführten Untersuchung wurde die $Ca_v\beta 2$ - Untereinheit konditionell inaktiviert, und das zu einem Zeitpunkt, zu dem die untersuchten Mäuse als adult zu betrachten sind. Dies vor allem aufgrund der beschriebenen Letalität einer entsprechenden konstitutionellen Inaktivierung, sowohl herzspezifisch als auch ubiquitär [135]. Daher beschreiben die Ergebnisse aber nur die Konsequenzen der Inaktivierung der $Ca_v\beta 2$ - Untereinheit in einem bereits entwickelten adulten Herzen, was bei der Beurteilung bedacht werden muss. Die Kontrollgruppen setzen sich aus den direkten Geschwistertieren zusammen, die lediglich nicht mit Tamoxifen behandelt wurden. Dadurch sind die Gruppen untereinander bestmöglich vergleichbar.

Zunächst ist zu beachten, dass die Tiere mit $Ca_v\beta 2$ -KO ein geringeres Körpergewicht zeigen, was bei dem hier möglichem Vergleich von Wurfgeschwistern aus mehreren Würfen grundsätzlich auf eine erhöhte Belastung der $Ca_v\beta 2$ -KO gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe schließen lässt. Dies vor allem, da die Inaktivierung von $Ca_v\beta 2$ erst in einem adulten Entwicklungsstadium erfolgt. Eine Wachstumsverzögerung ist als Ursache für den Gewichtsunterschied nicht bekannt.

Gleichzeitig war der intraventrikuläre Durchmesser in den Mäusen mit $Ca_v\beta 2$ -KO erniedrigt, wie auch das ventrikuläre Volumen, und das gleichermaßen in Diastole und Systole. Für die embryonale Form dieses $Ca_v\beta 2$ -KO ist von Weissgerber et al. bekannt, dass die Pumpleistung der nicht lebensfähigen Embryonen massiv verschlechtert war gegenüber den Kontrollen.

Die funktionelle Herzleistung in Form der Auswurffraktion und der relativen ventrikuläre Verkürzung, war dabei zum Untersuchungszeitpunkt zwar in den Tieren mit $Ca_v\beta 2$ -KO leicht erhöht (signifikant nur die relative ventrikuläre Verkürzung). Eine Steigerung der Herzarbeit in diesen Tieren, die ja durch die erhöhte Herzfrequenz besteht, scheint dabei trotz kleinerem ventrikulären Volumen zu einer leichten Erhöhung der Herzleistung zu führen. Die erhöhte Herzfrequenz begründet auch die Erniedrigung der intraventrikulären Relaxationszeit direkt.

Insgesamt zeigt sich also, dass durch die erhöhte Herzfrequenz zwar die Leistung erhalten ist oder gering steigt, jedoch im Kontext eines geringeren intraventrikulären Volumens, was eine insgesamt geringere Effizienz der Herzarbeit bedeutet. Darin könnte der gefundene Gewichtsunterschied begründet liegen, da durch eine weniger Effiziente Herzarbeit die Belastung steigt, und damit weniger Energie für die Gewichtsentwicklung zur Verfügung steht. Weiterführend könnte es von Interesse sein, inwieweit sich der echokardiographische Befund in einer längeren Beobachtungszeit entwickeln würde, was jedoch im Rahmen dieser Studie nicht möglich war.

Die hier untersuchte Mauslinie wurde bereits von Meissner et al. [77] zur Bestimmung der Effekte des adulten kardialen $Ca_v\beta 2$ -KO auf der kardiomyozytären Ebene verwendet. Dort wurde gezeigt, dass durch den induzierten Knockout des Genes die $Ca_v\beta 2$ -Expression um 96% des Kontrollwertes in Kardiomyozyten sank, und um 74% in der gesamten Proteinfraction des Herzens. Der verbleibende Rest wird mit einer Expression des Proteins in Fibroblasten erklärt, was jedoch wenig Rückschlüsse auf die von uns gefundenen Effekte zulässt. Die Mäuse zeigten auch hier keine Auffälligkeiten bei äußerer Beurteilung. Es wurden keine kompensatorischen Effekte gefunden, wie eine Hochregulierung anderer $Ca_v\beta$ - Untereinheiten, oder eine Änderung der $Ca_v 1.2$ -Kanäle generell.

Bei Untersuchung der Kalziumströme fiel allerdings auf, dass diese, trotz des hohen Rückganges der Expressions der $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit, nur um 29% gemindert waren. Dieser residuale Kalziumstrom war allerdings immer noch durch Dihydropyridin modulierbar. Die Auswirkungen des $\text{Ca}_v\beta$ -KO *in vivo* waren also weniger gravierend, als zunächst zu vermuten war.

Über die genaue Funktion der $\text{Ca}_v\beta$ - Untereinheiten liegen dabei nur wenige Erkenntnisse vor. Dolphin et al. [25] konnten zeigen, dass die $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten das Expressionsniveau der $\text{Ca}_v1.2$ -Kalziumkanäle beeinflussen, ebenso wie das spannungsabhängige Öffnungsverhalten. Es ist also nicht auszuschließen, dass die bei unserer Studie beobachtete Herzfrequenzerhöhung aus einer Veränderung der Reaktionskinetik der Kanäle rührt, welche durch die $\text{Ca}_v\beta2$ -Untereinheit reguliert sein könnten. Dieser Verdacht wird dadurch erhärtet, dass für eine Inaktivierung der Gene, die für die anderen $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten kodieren, kein Effekt beobachtet werden konnte [121]. Demensprechend wäre ein möglicher nächster Schritt, die Herzfrequenz der Tiere über einen längeren Zeitraum und im Wachzustand zu prüfen, und die elektrische Aktivität dabei mittels EKG genauer zu beschreiben.

Bekannt ist zudem, dass von den verschiedenen Untereinheiten verschiedene Spleißvarianten vorkommen, die zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten auftreten [65]. Es wäre also möglich, dass der Unterschied zwischen dem fatalen embryonalen $\text{Ca}_v\beta2$ -KO, und dem offensichtlich weniger massiven Effekt des adulten $\text{Ca}_v\beta2$ -KO, auf der altersabhängig unterschiedlichen Dominanz verschiedener Spleißvarianten beruht.

5.9 Experimente zur Rettung des pathologischen Phänotypes bei $\text{Ca}_v\beta2$ -KO

Im zweiten Teil der Studie wurden in Mäusen bei ubiquitären $\text{Ca}_v\beta2$ -KO entweder die dominante embryonale Spleißvariante ($\text{Ca}_v\beta2$ -N1), oder die adulte Spleißvariante ($\text{Ca}_v\beta2$ -N4) auf einem Allel kardial exprimiert. Diese gezielte Überexpression der jeweiligen Variante der $\text{Ca}_v\beta2$ -Untereinheit bestand in diesem Versuchskonzept schon in der Embryonalentwicklung. Dazu waren komplexere Kreuzungsschemata nötig; heterozygote Träger des konstitutionellen $\text{Ca}_v\beta2$ -KO wurden mit den Trägern der jeweiligen N1- oder N4-Untereinheit verpaart. Daraus konnten nur die Tiere genutzt werden, die, bei globalem $\text{Ca}_v\beta2$ -KO, kardial die N1 oder N4-Spleißvariante exprimierten. Daraus ergab sich ein so geringer Anteil an verwendbaren Tieren aus der Zucht, dass für diese Experimente männliche und weibliche Tiere genutzt werden

mussten. Als Kontrollgruppe wurden Tiere genutzt, die bei regulärer $Ca_v\beta 2$ -Expression kardial noch zusätzlich die N1- oder N4-Variante exprimierten. Die $Ca_v\beta 2$ -N4-Linie wurde dabei bereits von Katiyar et al. [55] erfolgreich genutzt, um die Auswirkungen der extrakardialen KO an den Photorezeptor-Synapsen des Auges zu beurteilen. Hier war ein erster Befund, dass mit der kardialen Expression dieser Spleißvariante der embryonal letale Phänotyp des konstitutiven $Ca_v\beta 2$ -KO bereits gerettet werden konnte, weshalb es interessant wurde, diese Tiere mit dem adulten, konditionellen $Ca_v\beta 2$ -KO zu vergleichen.

Die entsprechenden Tiere wurden lebensfähig geboren und zeigten keine äußeren Anzeichen eines pathologischen Phänotypes. Auch bei der hier durchgeführten Echokardiographie zeigten sich wenig Befunde bei Vergleich der Expression beider Spleißvarianten mit der gemeinsamen Kontrollgruppe; lediglich war die Herzfrequenz unter Narkose in den $Ca_v\beta 2$ -N4- exprimierenden Tieren erniedrigt, und infolge dessen die intraventrikuläre Relaxationszeit in den Tieren dieser Gruppe verlängert.

Ein direkter Vergleich der gefundenen Auffälligkeiten in beiden Gruppen lag nahe. Zunächst musste jedoch geprüft werden, ob eine direkte Vergleichbarkeit überhaupt vorlag. Dazu wurden initial die beiden Kontrollgruppen aus den beiden Studien in den ausgewählten Parametern verglichen. Mit Ausnahme der Herzfrequenz unter Narkose, bestand in allen Parametern kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen, sodass dann eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Tiergruppen mit den Genotypen $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1, $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 und dem $Ca_v\beta 2$ -KO angenommen wurde. Die Kontrollen wurden dann zu einer gemeinsamen Kontrollgruppe zusammengefasst. Es zeigte sich, dass das Körpergewicht und das systolische wie diastolische Volumen in den Tieren mit $Ca_v\beta 2$ -KO auch gegenüber der gemeinsamen Kontrollgruppe deutlich geringer war, und die relative Ventrikelverkürzung deutlich größer. Beide Rettungs-Gruppen zeigten in diesen Parametern keinen Unterschied zur Kontrolle, und überwiegend einen deutlichen Unterschied zum $Ca_v\beta 2$ -KO. Daraus kann abgeleitet werden, dass in diesen Betrachtungen die „Rettung“ des vom Normalen abweichenden Phänotypes der $Ca_v\beta 2$ -KO-Tiere erfolgreich war. Dagegen war ein solcher Vergleich bei Betrachtung der Herzfrequenz direkt nicht möglich. Die Kontrollgruppen konnten nicht zusammengefasst werden, da sie einen unterschiedlichen Frequenzbereich der Herzfrequenz zeigten. Jedoch ist die Herzfrequenz ein hoch variabler Parameter, und von vielen Faktoren, wie vorausgegangenem Stress, beispielsweise aufgrund von Aggression in der Gruppe, aber auch vom Alter abhängig. Das Alter der Tiere war in der Studie stark variabel, wie auch die Geschlechterzusammensetzung.

Dies kann den leichten Frequenzunterschied in den Kontrollen bedingen. Zudem stammten die beiden Kontrollgruppen auch aus unterschiedlichen Zuchtstämmen, was möglicherweise einen Einfluss auf die Stressanfälligkeit haben könnte. Unabhängig vom Unterschied zwischen den Kontrollen, war die Herzfrequenz der $Ca_v\beta 2$ -KO-Gruppe nicht nur gegenüber der eigenen Kontrollgruppe erhöht, sondern auch gegenüber der $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4-Gruppe, was zu den Befunden der übrigen echokardiographischen Parametern passt. Unklar ist jedoch, aus welchem Grund die Herzfrequenz in der Gruppe $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1 gegenüber $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 erhöht ist, und keinen Unterschied zum $Ca_v\beta 2$ -KO zeigt. Möglicherweise aber ist die Herzfrequenz auch ein Parameter, der auf die möglichen Eigenschaften der verschiedenen Spleißvarianten sehr sensibel reagiert. Dann wäre in weiteren Experimenten zu prüfen, inwiefern $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 eine stärkere Rettungsvariante ist, als $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1. Dies kann anhand der echokardiographischen Befunde hier nicht geklärt werden, die Untersuchung mittels EKG-Transmittern könnte aber Aufschluss über den generellen Charakter der Frequenzunterschiede geben, und wäre eine mögliche weitere Methode zur Charakterisierung der Befunde. Vor dem Hintergrund der Frequenzunterschiede müssen dann auch die Werte des IVRT interpretiert werden. Hier zeigte sich nur eine knapp signifikante Erhöhung der IVRT in $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 gegenüber dem $Ca_v\beta 2$ -KO, dies würde aber zu der Frequenzerniedrigung in $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 gegenüber dem KO passen. $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1 scheint in seiner Auswirkung auf das KO zwischen diesen beiden Extremen angesiedelt zu sein, ebenso wie die Kontrolle.

Zusammenfassend kann also mit kleinen Einschränkungen festgestellt werden, dass die kardiale Expression von $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N4 die pathologischen Veränderungen bei $Ca_v\beta 2$ -KO rettet, und dies in mehreren Messparametern auch mit $Ca_v1.2-\beta 2^{+/+}$ -N1 gelingt. Als Referenz wird hierbei, wo möglich, eine gemeinsame Kontrollgruppe genutzt. Die Unterschiede in der Herzfrequenz unter Narkose erfordern ein differenzierteres Bild, und damit möglichst weiterführende Untersuchungen, wie etwa Langzeit-EKG-Messungen, auch im wachen Zustand.

6 Literaturverzeichnis

- [1] [1] Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. - PubMed - NCBI. .
- [2] Publikation - Gesundheit - Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - Ausführliche vierstellige ICD10-Klassifikation - Statistisches Bundesamt (Destatis), . URL <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachenstatistik.html>.
- [3] J W Adams, Y Sakata, M G Davis, V P Sah, Y Wang, S B Liggett, K R Chien, J H Brown, and G W Dorn. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17):10140–10145, August 1998.
- [4] S A Akhter, L M Luttrell, H A Rockman, G Iaccarino, R J Lefkowitz, and W J Koch. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5363):574–577, April 1998.
- [5] Rashad J Belin, Marius P Sumandea, Edward J Allen, Kelly Schoenfelt, Helen Wang, R John Solaro, and Pieter P de Tombe. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circulation Research*, 101(2):195–204, July 2007.
- [6] Donald M Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868):198–205, January 2002.
- [7] Donald M Bers. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circulation Research*, 90(1):14–17, January 2002.
- [8] Lawrence T Bish, Kevin Morine, Meg M Sleeper, Julio Sanmiguel, Di Wu, Guangping Gao, James M Wilson, and H Lee Sweeney. Adeno-Associated Virus (AAV) Serotype 9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the Mouse and Rat. *Human Gene Therapy*, 19(12):1359–1368, December 2008.
- [9] B Bostick, A Ghosh, Y Yue, C Long, and D Duan. Systemic AAV-9 transduction

- in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Therapy*, 14(22):1605–1609, September 2007.
- [10] J C Bowman, S F Steinberg, T Jiang, D L Geenen, G I Fishman, and P M Buttrick. Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *Journal of Clinical Investigation*, 100(9):2189–2195, November 1997.
- [11] Amy D Bradshaw, Catalin F Baicu, Tyler J Rentz, An O Van Laer, Janet Boggs, John M Lacy, and Michael R Zile. Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation*, 119(2):269–280, January 2009.
- [12] J C Braz. PKCalpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *The Journal of Cell Biology*, 156(5):905–919, February 2002.
- [13] Julian C Braz, Kimberly Gregory, Anand Pathak, Wen Zhao, Bogachan Sahin, Raisa Klevitsky, Thomas F Kimball, John N Lorenz, Angus C Nairn, Stephen B Liggett, Ilona Bodi, Su Wang, Arnold Schwartz, Edward G Lakatta, Anna A DePaoli-Roach, Jeffrey Robbins, Timothy E Hewett, James A Bibb, Margaret V Westfall, Evangelia G Kranias, and Jeffery D Molkentin. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature Medicine*, 10(3):248–254, February 2004.
- [14] Andrew S Brem. The Janus effect: two faces of aldosterone. *Kidney international*, 75(2):137–139, January 2009.
- [15] F Brette, P Rodriguez, K Komukai, J Colyer, and C H Orchard. beta-adrenergic stimulation restores the Ca transient of ventricular myocytes lacking t-tubules. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(2):265–275, February 2004.
- [16] Fabien Brette, Sanda Despa, Donald M Bers, and Clive H Orchard. Spatiotemporal characteristics of SR Ca(2+) uptake and release in detubulated rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(5):804–812, November 2005.
- [17] C G Brilla, B Maisch, and K T Weber. Myocardial collagen matrix remodelling

- in arterial hypertension. *European Heart Journal*, 13 Suppl D:24–32, September 1992.
- [18] C G Brilla, G P Reams, B Maisch, and K T Weber. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *European Heart Journal*, 14 Suppl J:57–61, November 1993.
- [19] Grant R Budas, Eric N Churchill, and Daria Mochly-Rosen. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*, 55(6):523–536, June 2007.
- [20] Marcello Chinali, Marina De Marco, Gianpaolo D'Addeo, Margherita Benincasa, Carmela Romano, Maurizio Galderisi, and Giovanni de Simone. Excessive increase in left ventricular mass identifies hypertensive subjects with clustered geometric and functional abnormalities. *Journal of hypertension*, 25(5):1073–1078, May 2007.
- [21] Eric Churchill, Grant Budas, Alice Vallentin, Tomoyoshi Koyanagi, and Daria Mochly-Rosen. PKC Isozymes in Chronic Cardiac Disease: Possible Therapeutic Targets? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1):569–599, February 2008.
- [22] D D D'Angelo, Y Sakata, and J N Lorenz. Transgenic $G\alpha_q$ overexpression induces cardiac contractile failure in mice. In *Proceedings of the . . .*, 1997.
- [23] Joost J F P Luiken Margriet Ouwens Will A Coumans Monique Vergouwe Stine J Maarbjerg Michael Leitges Arend Bonen Erik A Richter Jan F C Glatz Daphna D J Habets. Involvement of atypical protein kinase C in the regulation of cardiac glucose and long-chain fatty acid uptake. *Frontiers in Physiology*, 3, 2012.
- [24] Theresa Dartsch, Robert Fischer, Andrej Gapelyuk, Marco Weiergraeber, Dennis Ladage, Toni Schneider, Alexander Schirdewan, Hannes Reuter, Jochen Mueller-Ehmsen, and Carsten Zobel. Aldosterone induces electrical remodeling independent of hypertension. *International journal of cardiology*, 164(2):170–178, April 2013.
- [25] Annette C Dolphin. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 55(4):607–627, December 2003.
- [26] Andrea A Domenighetti, Qing Wang, Marcel Egger, Stephen M Richards, Thierry Pedrazzini, and Lea M D Delbridge. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hy-*

- pertension*, 46(2):426–432, August 2005.
- [27] I Dominguez, M T Diaz-Meco, M M Municio, E Berra, A García de Herreros, M E Cornet, L Sanz, and J Moscat. Evidence for a role of protein kinase C zeta subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular and cellular biology*, 12(9):3776–3783, September 1992.
- [28] I Dominguez, L Sanz, F Arenzana-Seisdedos, M T Diaz-Meco, J L Virelizier, and J Moscat. Inhibition of protein kinase C zeta subspecies blocks the activation of an NF-kappa B-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular and cellular biology*, 13(2):1290–1295, 1993.
- [29] Gerald W Dorn and Thomas Force. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3):527–537, March 2005.
- [30] Gerald W Dorn, Jeffrey Robbins, and Peter H Sugden. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation Research*, 92(11):1171–1175, 2003.
- [31] Gloria Faerber, Frederico Barreto-Perreia, Maria Schoepe, Ralf Gilsbach, Andrea Schrepper, Michael Schwarzer, Friedrich W Mohr, Lutz Hein, and Torsten Doenst. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 141(2):492–500–500.e1, February 2011.
- [32] Robert V Farese and Mini P Sajan. Atypical protein kinase C in cardiometabolic abnormalities. *Current Opinion in Lipidology*, 23(3):175–181, June 2012.
- [33] Robert V Farese, Mini P Sajan, Hong Yang, Pengfei Li, Steven Mastorides, William R Gower, Jr., Sonali Nimal, Cheol Soo Choi, Sheene Kim, Gerald I Shulman, C Ronald Kahn, Ursula Braun, and Michael Leitges. Muscle-specific knockout of PKC- λ impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8):2289–2301, 2007.
- [34] Shumin Gao, David Ho, Dorothy E Vatner, and Stephen F Vatner. *Echocardiography in Mice*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, March 2011.
- [35] C García-Hoz and G Sánchez-Fernández. $G\alpha_q$ acts as an adaptor protein in protein kinase C ζ (PKC ζ)-mediated ERK5 activation by G protein-coupled receptors

- (GPCR). *Journal of Biological . . .*, 2010.
- [36] M A Geeves and K C Holmes. Structural mechanism of muscle contraction. *Annual review of biochemistry*, 68:687–728, 1999.
- [37] Erina Ghosh, Shelton D Caruthers, and Sándor J Kovács. E-wave generated intra-ventricular diastolic vortex to L-wave relation: model-based prediction with in vivo validation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 117(3):316–324, August 2014.
- [38] Jun Gu, Yu-Qi Fan, Zhi-Hua Han, Li Fan, Ling Bian, Hui-Li Zhang, Zuo-Jun Xu, Zhao-Fang Yin, Yu-Shui Xie, Jun-Feng Zhang, and Chang-Qian Wang. Association between long-term prescription of aldosterone antagonist and the progression of heart failure with preserved ejection fraction in hypertensive patients. *International journal of cardiology*, 220:56–60, September 2016.
- [39] K Gusev, A A Domenighetti, L M D Delbridge, T Pedrazzini, E Niggli, and M Egger. Angiotensin II-Mediated Adaptive and Maladaptive Remodeling of Cardiomyocyte Excitation-Contraction Coupling. *Circulation Research*, 105(1):42–50, July 2009.
- [40] H S Hahn. Protein Kinase C Negatively Regulates Systolic and Diastolic Function in Pathological Hypertrophy. *Circulation Research*, 93(11):1111–1119, November 2003.
- [41] Karin Hammer, Sandra Ruppenthal, Cedric Viero, Anke Scholz, Ludwig Edelmann, Lars Kaestner, and Peter Lipp. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(3):427–437, September 2010.
- [42] Stéphane Hatem. Does the loss of transverse tubules contribute to dyssynchronous Ca²⁺ release during heart failure? *Cardiovascular Research*, 62(1):1–3, April 2004.
- [43] Joerg Heineke and Jeffery D Molkenin. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(8):589–600, August 2006.
- [44] C House and B E Kemp. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4834):1726–1728, December 1987.
- [45] S R Houser. Reduced abundance of transverse tubules and L-type calcium channels:

- another cause of defective contractility in failing ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 49(2):253–256, February 2001.
- [46] Ping Hu, Dongfang Zhang, LeAnne Swenson, Gopa Chakrabarti, E Dale Abel, and Sheldon E Litwin. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 285(3):H1261–H1269, August 2003.
- [47] J H Hurley, A C Newton, P J PARKER, P M Blumberg, and Y Nishizuka. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 6(2):477–480, 1997.
- [48] K INAGAKI, S FUESS, T STORM, G GIBSON, C MCTIERNAN, M KAY, and H NAKAI. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy*, 14(1):45–53, July 2006.
- [49] Koichi Inagaki, Yoshitaka Iwanaga, Nobuaki Sarai, Yoko Onozawa, Hiroyuki Takenaka, Daria Mochly-Rosen, and Yasuki Kihara. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10):1377–1385, October 2002.
- [50] J E Jalil, C W Doering, J S Janicki, R Pick, W A Clark, C Abrahams, and K T Weber. Structural vs. contractile protein remodeling and myocardial stiffness in hypertrophied rat left ventricle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 20(12):1179–1187, December 1988.
- [51] Sofian Johar, Alison C Cave, Anilkumar Narayanapanicker, David J Grieve, and Ajay M Shah. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *The FASEB Journal*, 20(9):1546–1548, July 2006.
- [52] Joanne E Johnson, Jennifer Giorgione, and Alexandra C Newton. The C1 and C2 Domains of Protein Kinase C Are Independent Membrane Targeting Modules, with Specificity for Phosphatidylserine Conferred by the C1 Domain. *Biochemistry*, 39(37):11360–11369, September 2000.
- [53] Lars Kaestner, Anke Scholz, Qinghai Tian, Sandra Ruppenthal, Wiebke Tabellion, Kathrina Wiesen, Hugo A Katus, Oliver J Muller, Michael I Kotlikoff, and Pe-

- ter Lipp. Genetically encoded Ca²⁺ indicators in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 114(10):1623–1639, May 2014.
- [54] Lars Kaestner, Qinghai Tian, Elisabeth Kaiser, Wenying Xian, Andreas Müller, Martin Oberhofer, Sandra Ruppenthal, Daniel Sinnecker, Hidekazu Tsutsui, Atsushi Miyawaki, Alessandra Moretti, and Peter Lipp. Genetically Encoded Voltage Indicators in Circulation Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9):21626–21642, September 2015.
- [55] Rashmi Katiyar, Petra Weissgerber, Elisabeth Roth, Janka Dörr, Vithiyanjali Sotilingam, Marina Garcia Garrido, Susanne C Beck, Mathias W Seeliger, Andreas Beck, Frank Schmitz, and Veit Flockerzi. Influence of the β 2-Subunit of L-Type Voltage-Gated Cav Channels on the Structural and Functional Development of Photoreceptor Ribbon Synapses. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(4):2312–2324, April 2015.
- [56] G Keren, J S Meisner, J Sherez, E L Yellin, and S Laniado. Interrelationship of mid-diastolic mitral valve motion, pulmonary venous flow, and transmitral flow. *Circulation*, 74(1):36–44, July 1986.
- [57] Gunnar Klein, Arnd Schaefer, Denise Hilfiker-Kleiner, Dagmar Oppermann, Praphulla Shukla, Anja Quint, Eva Podewski, Andres Hilfiker, Frank Schröder, Michael Leitges, and Helmut Drexler. Increased Collagen Deposition and Diastolic Dysfunction but Preserved Myocardial Hypertrophy After Pressure Overload in Mice Lacking PKC ϵ . 2005.
- [58] Nicole M Kotchey, Kei Adachi, Maliha Zahid, Katsuya Inagaki, Rakshita Charan, Robert S Parker, and Hiroyuki Nakai. A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction. *Molecular Therapy*, 19(6):1079–1089, June 2011.
- [59] R M Kotin, J C Menninger, D C Ward, and K I Berns. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics*, 10(3):831–834, July 1991.
- [60] Krishnanand. *Artefacts in Oral Mucosal Biopsies – A Review*, volume 2. Medknow Publications, January 2010.
- [61] V J LaMorte, J Thorburn, D Absher, A Spiegel, J H Brown, K R Chien, J R Ferramisco, and K U Knowlton. Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy

- of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *The Journal of biological chemistry*, 269(18):13490–13496, May 1994.
- [62] Jingjing Li, Lianjie Miao, David Shieh, Ernest Spiotto, Jian Li, Bin Zhou, Antoni Paul, Robert J Schwartz, Anthony B Firulli, Harold A Singer, Guoying Huang, and Mingfu Wu. Single-Cell Lineage Tracing Reveals that Oriented Cell Division Contributes to Trabecular Morphogenesis and Regional Specification. *Cell reports*, 15(1):158–170, April 2016.
- [63] Yulin Liao, Fuminobu Ishikura, Shintaro Beppu, Masanori Asakura, Seiji Takashima, Hiroshi Asanuma, Shoji Sanada, Jiyeon Kim, Hisakazu Ogita, Tsunehiko Kuzuya, Koichi Node, Masafumi Kitakaze, and Masatsugu Hori. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 282(5):H1703–H1708, May 2002.
- [64] P Lijnen and V Petrov. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(6):865–879, June 2000.
- [65] Sabine Link, Marcel Meissner, Brigitte Held, Andreas Beck, Petra Weissgerber, Marc Freichel, and Veit Flockerzi. Diversity and developmental expression of L-type calcium channel beta2 proteins and their influence on calcium current in murine heart. *The Journal of biological chemistry*, 284(44):30129–30137, October 2009.
- [66] P Lipp and G Reither. Protein Kinase C: The MMastersöf Calcium and Lipid. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7):a004556–a004556, July 2011.
- [67] M Lombès, M E Oblin, J M Gasc, E E Baulieu, N Farman, and J P Bonvalet. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circulation Research*, 71(3):503–510, September 1992.
- [68] M Lombès, N Alfaidy, E Eugene, A Lessana, N Farman, and J P Bonvalet. Pre-requisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*, 92(2):175–182, July 1995.
- [69] W E Louch, H K Mørk, and J Sexton. Tâ tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *The Journal of . . .*, 2006.
- [70] William E Louch, Virginie Bito, Frank R Heinzel, Regina Macianskiene, Johan

- Vanhaecke, Willem Flameng, Kanigula Mubagwa, and Karin R Sipido. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules—a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 62(1):63–73, April 2004.
- [71] Jasmina Lovric, Miguel Mano, Lorena Zentilin, Ana Eulalio, Serena Zacchigna, and Mauro Giacca. Terminal Differentiation of Cardiac and Skeletal Myocytes Induces Permissivity to AAV Transduction by Relieving Inhibition Imposed by DNA Damage Response Proteins - mt2012144a.pdf. *Molecular Therapy*, 20(11):2087–2097, July 2012.
- [72] Zhongju Lu, Lisa M Ballou, Ya-Ping Jiang, Ira S Cohen, and Richard Z Lin. Restoration of Defective L-type Ca²⁺ Current in Cardiac Myocytes of Type 2 Diabetic db/db Mice by Akt and PKC- ι . *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58(4):439–445, October 2011.
- [73] Alexander R Lyon, Ken T MacLeod, Yanjun Zhang, Edwin Garcia, Gaelle Kikonda Kanda, Max J Lab, Yuri E Korchev, Sian E Harding, and Julia Gorelik. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16):6854–6859, April 2009.
- [74] Lauren Mackenzie, Martin D Bootman, Mika Laine, Michael J Berridge, Jan Thuring, Andrew Holmes, Wen-Hong Li, and Peter Lipp. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 541(Pt 2):395–409, June 2002.
- [75] M Makowske and O M Rosen. Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *The Journal of biological chemistry*, 264(27):16155–16159, September 1989.
- [76] Tamara P Martin, Emma Robinson, Adam P Harvey, Margaret MacDonald, David J Grieve, Andrew Paul, and Susan Currie. Surgical optimization and characterization of a minimally invasive aortic banding procedure to induce cardiac hypertrophy in mice. *Experimental Physiology*, 97(7):822–832, May 2012.
- [77] Marcel Meissner, Petra Weissgerber, Juan E Camacho Londoño, Jean Prenen, Sabine Link, Sandra Ruppenthal, Jeffery D Molkenin, Peter Lipp, Bernd Nilius, Marc Freichel, and Veit Flockerzi. Moderate calcium channel dysfunction in adult mice

- with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *cacnb2* gene. *The Journal of biological chemistry*, 286(18):15875–15882, May 2011.
- [78] Rakesh K Mishra, James M Galloway, Elisa T Lee, Lyle G Best, Marie Russell, Mary J Roman, and Richard B Devereux. The ratio of mitral deceleration time to E-wave velocity and mitral deceleration slope outperform deceleration time alone in predicting cardiovascular outcomes: the Strong Heart Study. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*, 20(11):1300–1306, November 2007.
- [79] D Mochly-Rosen, G Wu, H Hahn, H Osinska, T Liron, J N Lorenz, A Yatani, J Robbins, and G W Dorn. Cardirotrophic Effects of Protein Kinase C : Analysis by In Vivo Modulation of PKC Translocation. *Circulation Research*, 86(11):1173–1179, June 2000.
- [80] J D Molkentin and G W Dorn. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology*, 63:391–426, 2001.
- [81] James C C Moon, Emma Reed, Mary N Sheppard, Andrew G Elkington, Siew Yen Ho, Margaret Burke, Mario Petrou, and Dudley J Pennell. The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12):2260–2264, June 2004.
- [82] J Moscat, M T Diaz-Meco, and M W Wooten. Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death and Differentiation*, 16(11):1426–1437, August 2009.
- [83] O MULLER, H KATUS, and R BEKEREDJIAN. Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods. *Cardiovascular Research*, 73(3):453–462, February 2007.
- [84] Oliver J Muller, Barbara Leuchs, Sven T Pleger, Dirk Grimm, Wolfgang-M Franz, Hugo A Katus, and Jürgen A Kleinschmidt. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovascular Research*, 70(1):70–78, April 2006.
- [85] Bernardo Nadal-Ginard, Jan Kajstura, Annarosa Leri, and Piero Anversa. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circulation Research*, 92(2):139–150, February 2003.

- [86] P Nart, H Thompson, D C Barrett, S C Armstrong, and A R McPhaden. Clinical and pathological features of dilated cardiomyopathy in Holstein-Friesian cattle. *The Veterinary record*, 155(12):355–361, September 2004.
- [87] A C Newton. Protein kinase C: poised to signal. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 298(3):E395–E402, February 2010.
- [88] S Offermanns, L P Zhao, A Gohla, I Sarosi, M I Simon, and T M Wilkie. Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *The EMBO journal*, 17(15):4304–4312, August 1998.
- [89] Ricardo Ophof, Jaap C Maltha, Johannes W Von den Hoff, and Anne-Marie Kuijpers-Jagtman. Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 12(5):528–538, September 2004.
- [90] C A Pacak. Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circulation Research*, 99(4):e3–e9, August 2006.
- [91] Sara Pahlavan, Martin Oberhofer, Benjamin Sauer, Sandra Ruppenthal, Qinghai Tian, Anke Scholz, Lars Kaestner, and Peter Lipp. G α q and G α 11 contribute to the maintenance of cellular electrophysiology and Ca $^{2+}$ handling in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 95(1):48–58, July 2012.
- [92] S S Palaniyandi, L Sun, J C B Ferreira, and D Mochly-Rosen. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovascular Research*, 82(2):229–239, November 2008.
- [93] Peter J Parker, Verline Justilien, Philippe Riou, Mark Linch, and Alan P Fields. Biochemical Pharmacology. *Biochemical Pharmacology*, 88(1):1–11, March 2014.
- [94] D Passer, A van de Vrugt, A Atmanli, and I J Domian. Atypical Protein Kinase C-Dependent Polarized Cell Division Is Required for Myocardial Trabeculation. *Cell reports*, 2016.
- [95] R D Patten and M R Hall-Porter. Small Animal Models of Heart Failure: Development of Novel Therapies, Past and Present. *Circulation: Heart Failure*, 2(2):138–144, February 2009.
- [96] C S Peskin and E L Yellin. Fluid dynamics of the mitral valve: physiological aspects

- of a mathematical model. *American Journal of . . .*, 1982.
- [97] Paulding Phelps. Compensated Polarized Light Microscopy. *JAMA*, 203(7):508, February 1968.
- [98] B Pitt, F Zannad, W J Remme, R Cody, A Castaigne, A Perez, J Palensky, and J Wittes. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *The New England journal of medicine*, 341(10):709–717, September 1999.
- [99] Yongmei Pu, Megan L Peach, Susan H Garfield, Stephen Wincovitch, Victor E Marquez, and Peter M Blumberg. Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 281(44):33773–33788, November 2006.
- [100] F J Ramires, A Mansur, O Coelho, M Maranhão, C J Gruppi, C Mady, and J A Ramires. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *The American journal of cardiology*, 85(10):1207–1211, May 2000.
- [101] Jan-Christian Reil, Mathias Hohl, Simina Selejan, Peter Lipp, Fabian Drautz, Andrey Kazakow, Benedikt M Münz, Patrick Müller, Paul Steendijk, Gert-Hinrich Reil, Maurits A Allessie, Michael Böhm, and Hans-Ruprecht Neuberger. Aldosterone promotes atrial fibrillation. *European Heart Journal*, 33(16):2098–2108, August 2012.
- [102] L Rich and P Whittaker. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*, 2005.
- [103] V Robert, C Heymes, J S Silvestre, A Sabri, B Swynghedauw, and C Delcayre. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*, 33(4):981–986, April 1999.
- [104] R Rocha, A E Rudolph, and G E Frierdich. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. . . . of *Physiology-Heart . . .*, 2002.
- [105] H A Rockman, R S Ross, A N Harris, K U Knowlton, M E Steinhelper, L J Field, J Ross, and K R Chien. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18):8277–8281, September 1991.
- [106] H A Rockman, S P Wachhorst, L Mao, and J Ross. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *The American journal of physiology*, 266(6 Pt 2):H2468–75, June 1994.
- [107] Agrawal Rohini, Neeraj Agrawal, Chintan N Koyani, and Randhir Singh. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research*, 61(4): 269–280, April 2010.
- [108] B B Roman. Inhibition of PKC phosphorylation of cTnI improves cardiac performance in vivo. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 286(6):H2089–H2095, January 2004.
- [109] V O Rybin, P M Buttrick, and S F Steinberg. PKC-lambda is the atypical protein kinase C isoform expressed by immature ventricle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 272(4):H1636–H1642, April 1997.
- [110] Vitalyi O Rybin, Jianfen Guo, Zoya Gertsberg, Hasnae Elouardighi, and Susan F Steinberg. Protein kinase C epsilon (PKC epsilon) and src control PKC delta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32):23631–23638, 2007.
- [111] Abdelkarim Sabri and Susan F Steinberg. Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 251(1-2):97–101, September 2003.
- [112] A Sato, J W Funder, and T Saruta. Involvement of aldosterone in left ventricular hypertrophy of patients with end-stage renal failure treated with hemodialysis. *American journal of hypertension*, 12(9 Pt 1):867–873, September 1999.
- [113] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis - nmeth.2089.pdf. *Nature Methods*, 9(7):671–675, June 2012.
- [114] Kathy L Schreiber, Louise Paquet, Bruce G Allen, and Hansjörg Rindt. Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 281(5):H2062–H2071, November 2001.

- [115] J S Silvestre, C Heymes, A Oubénaïssa, V Robert, B Aupetit-Faisant, A Carayon, B Swynghedauw, and C Delcayre. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*, 99(20):2694–2701, May 1999.
- [116] Gregor Simonis, Steffen K Briem, Steffen P Schoen, Manja Bock, Rainer Marquetant, and Ruth H Strasser. Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 305(1-2):103–111, June 2007.
- [117] R S Soloff, C Katayama, M Y Lin, J R Feramisco, and S M Hedrick. Targeted Deletion of Protein Kinase C Reveals a Distribution of Functions between the Two Atypical Protein Kinase C Isoforms. *The Journal of Immunology*, 173(5):3250–3260, August 2004.
- [118] Long-Sheng Song, Eric A Sobie, Stacey McCulle, W J Lederer, C William Balke, and Heping Cheng. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11):4305–4310, March 2006.
- [119] M Song, S J Matkovich, Y Zhang, D J Hammer, and G W Dorn. Combined cardiomyocyte PKC and PKC gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Science signaling*, 8(373):ra39–ra39, April 2015.
- [120] Matthew L Springer, Richard E Sievers, Mohan N Viswanathan, Michael S Yee, Elyse Foster, William Grossman, and Yerem Yeghiazarians. Closed-chest cell injections into mouse myocardium guided by high-resolution echocardiography. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(3):H1307–14, September 2005.
- [121] Jörg Striessnig and Alexandra Koschak. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca²⁺ channels with gene knockout models. *Channels (Austin, Tex.)*, 2(4):233–251, July 2008.
- [122] Hideki Sumimoto, Sachiko Kamakura, and Takashi Ito. Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2007(401):re6, August 2007.

- [123] Yao Sun, Jiakun Zhang, Li Lu, Sue S Chen, Mark T Quinn, and Karl T Weber. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *The American journal of pathology*, 161(5):1773–1781, November 2002.
- [124] R C Thompson. An electro-optic light scattering photometric polarimeter. *Ph.D. Thesis Texas A&M Univ., College Station.*, 1978.
- [125] Qinghai Tian, Sara Pahlavan, Katharina Oleinikow, Jennifer Jung, Sandra Ruppenthal, Anke Scholz, Christian Schumann, Annette Kraegeloh, Martin Oberhofer, Peter Lipp, and Lars Kaestner. Functional and morphological preservation of adult ventricular myocytes in culture by sub-micromolar cytochalasin D supplement. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1):113–124.
- [126] Qinghai Tian, Sara Pahlavan, Katharina Oleinikow, Jennifer Jung, Sandra Ruppenthal, Anke Scholz, Christian Schumann, Annette Kraegeloh, Martin Oberhofer, Peter Lipp, and Lars Kaestner. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1):113–124, January 2012.
- [127] Giuseppe Vassalli, Hansruedi Büeler, Jean Dudler, Ludwig K von Segesser, and Lukas Kappenberger. Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *International journal of cardiology*, 90(2-3):229–238, August 2003.
- [128] Benjamin Vogel, Hanna Siebert, Ulrich Hofmann, and Stefan Frantz. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*, 2:124–134, 2015.
- [129] H Wakasaki, D Koya, F J Schoen, M R Jirousek, D K Ways, B D Hoit, R A Walsh, and G L King. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17):9320–9325, August 1997.
- [130] Jian Wang, Lan Yu, Patricia J Solenberg, Lawrence Gelbert, Chad D Geringer, and Mitchell I Steinberg. Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes. *Journal of Cardiac Failure*, 8(3):167–174, June 2002.
- [131] K T Weber and C G Brilla. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, 1991.

- [132] Silke Wegener. Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zu G-Protein-gekoppelten Signalwegen in adulten Herzmuskelzellen, 2013.
- [133] S Wei, A Guo, B Chen, W Kutschke, Y P Xie, K Zimmerman, R M Weiss, M E Anderson, H Cheng, and L S Song. T-Tubule Remodeling During Transition From Hypertrophy to Heart Failure. *Circulation Research*, 107(4):520–531, August 2010.
- [134] Petra Weissgerber, Brigitte Held, Wilhelm Bloch, Lars Kaestner, Kenneth R Chien, Bernd K Fleischmann, Peter Lipp, Veit Flockerzi, and Marc Freichel. Reduced Cardiac L-Type Ca^{2+} Current in $\text{Cav}\beta 2^{-/-}$ Embryos Impairs Cardiac Development and Contraction With Secondary Defects in Vascular Maturation. *circres.ahajournals.org*.
- [135] Petra Weissgerber, Brigitte Held, Wilhelm Bloch, Lars Kaestner, Kenneth R Chien, Bernd K Fleischmann, Peter Lipp, Veit Flockerzi, and Marc Freichel. Reduced cardiac L-type Ca^{2+} current in $\text{Ca(V)}\beta 2^{-/-}$ embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circulation Research*, 99(7):749–757, September 2006.
- [136] N Wettschureck, H Rütten, A Zywiets, D Gehring, T M Wilkie, J Chen, K R Chien, and S Offermanns. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of $\text{G}\alpha_{\text{q}}/\text{G}\alpha_{11}$ in cardiomyocytes. *Nature Medicine*, 7(11):1236–1240, November 2001.
- [137] Perrin C White. Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(6):2376–2383, June 2003.
- [138] P Whittaker, D R Boughner, and R A Kloner. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, 84(5):2123–2134, November 1991.
- [139] Kathrina Wiesen, Elisabeth Kaiser, Laura Schröder, Anke Scholz, Sandra Ruppenthal, Jan-Christian Reil, Christina Backes, Eckart Meese, Carola Meier, Anna Bogdanova, Peter Lipp, and Lars Kaestner. Cardiac remodeling in $\text{G}\alpha_{\text{q}}$ and $\text{G}\alpha_{11}$ knockout mice. *International journal of cardiology*, 202:836–845, January 2016.
- [140] Michael I Wilson, David J Gill, Olga Perisic, Mark T Quinn, and Roger L Williams. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular cell*, 12(1):39–50, July 2003.

- [141] M J Wright, LML Wightman, C Lilley, and M de Alwis. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic research in . . .*, 2001.
- [142] Kaoru Yoshida, Shokei Kim-Mitsuyama, Ryotaro Wake, Yasuhiro Izumiya, Yasukatsu Izumi, Tokihito Yukimura, Makiko Ueda, Minoru Yoshiyama, and Hiroshi Iwao. Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertension Research*, 28(5):447–455, May 2005.
- [143] M Young and J W Funder. Aldosterone and the heart. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(6):224–226, August 2000.
- [144] Achilles Zacharoulis, Vasiliki Kotseroglou, Stamatios Lerakis, Apostolos Karavidas, Sophia Arapi, and Apostolos Zacharoulis. Predictive value of C-reactive protein and left ventricular diastolic filling pattern after a non-ST elevation myocardial infarction. *The American journal of the medical sciences*, 331(3):113–118, March 2006.
- [145] X Zhang, M de Alwis, S L Hart, F W Fitzke, S C Inglis, M E Bournsnel, R J Levinsky, C Kinnon, R R Ali, and A J Thrasher. High-titer recombinant adeno-associated virus production from replicating amplicons and herpes vectors deleted for glycoprotein H. *Human Gene Therapy*, 10(15):2527–2537, October 1999.
- [146] Carmela Zincarelli, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo, and Joseph E Rabinowitz. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy*, 16(6):1073–1080, June 2008.

7 Publikationen/Dank

7.1 Publikationen

Beteiligt an:

Camacho Londono, J. E., Tian, Q., Hammer, K., Schröder, L., Camacho Londono, J., Reil, J. C., et al. (2015). A background Ca²⁺ entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *European Heart Journal*. doi:10.1093/eurheartj/ehv250

Kaiser E, Schröder L, Wiesen K, Wess J, Tian Q, Kaestner L, Lipp P. Novel Roles of Gq-Dependent Signal Transduction for Cardiac Pacemaking and Cardiac Impulse Propagation Studied by Gq-KO and a DREADD. *Biophysical Journal*. 2015;108:2

Wiesen, K., Kaiser, E., Schröder, L., Scholz, A., Ruppenthal, S., Reil, J.-C., et al. (2016). Cardiac remodelling in G α q and G α 11 knockout mice. *International Journal of Cardiology*, 202, 836–845. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.069>

Poster auf Konferenzen:

Less-invasive transverse aortic banding in mice for hypertrophy studies

L. Schröder, Q. Tian, L. Kaestner, P. Lipp; 93rd annual meeting of the German Physiological Society, Mainz, März 2014

The role of the atypical protein Kinase C iota for cardiac function: An *in vivo* study using cardiac specific gene transfer

L. Schröder, K. Flügel, S. Ruppenthal, Q. Tian, O. Müller, H. Katus, L. Kaestner, P. Lipp
94rd annual meeting of the German Physiological Society, Magdeburg, März 2015

7.2 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich in den letzten Jahren während der Arbeit zu dieser Dissertation unterstützt haben, und mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Zuallererst ein herzliches Dankeschön an meinen Chef und Doktorvater, Peter Lipp. Danke für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie anfertigen zu können, und für die immer offenen Ohren und das Vertrauen in ein gutes Ende.

Danke auch an Lars Kästner für die immer konstruktive Kritik in allen wissenschaftlichen und technischen Fragen, und den großen Rückhalt in jeder Situation.

Großer Dank geht auch an Sandra Ruppenthal, für die große Geduld mit mir Tierarzt im Nasslabor, für die gute Zusammenarbeit in der Mausorganisation, und die gute fachliche und persönliche Unterstützung des „Schreibvorganges“.

Danke an Monika Barth für die Hilfe bei den Western-Blot-Versuchen, ohne die die Gele für diese Arbeit nie so schön geworden wären.

Ein herzliches Dankeschön an Julia Schweizer, für die trotz aller Widrigkeiten doch immer wieder funktionierenden IT, und für den oft so nötigen persönlichen Austausch.

Hier möchte ich mich auch bei Benjamin Sauer bedanken, für die immer verfügbare Unterstützung, auch aus der Ferne.

Danke an Sabrina Hennig für die Hilfe in der Tierhaltung und im Keller-Labor, und an Tanja Kuhn für Ansetzen, Schneiden, Verdauen, und vieles mehr.

Ein Dank geht auch an Qinghai Tian, für dessen große Geduld mit mir und meinen besonderen „Freunden“ MatLab und Leica.

Danke weiterhin an Christina Körbel und Monika Frings für den fachlichen Austausch, und die ebenso pragmatische wie effektive Art, Probleme zu lösen.

Das größte Dankeschön geht an Elisabeth Kaiser, die beste Tierärztliche Ex-Kollegin, Freundin und Schicksalsgenossin, die ich mir vorstellen kann; wir haben's gerockt!

Ein Dank geht auch an die Arbeitsgruppe Prof. Veit Flockerzi und Dr. Petra Weissgerber, die mich am $Ca_v\beta 2$ -Projekt teilhaben ließen, und an das Institut für Experimentelle Chirurgie (Prof. Michael Menger und Prof. Matthias Laschke), in deren Räumlichkeiten die Ultraschalluntersuchungen stattfinden konnten. Weiterhin haben mir die Arbeitsgruppen Prof. Ulrich Laufs, und dort Ellen Becker bei der histologischen Färbung, und die Arbeitsgruppe Prof. Carola Meier bei der Erstellung der histologischen Präparate sehr geholfen, vielen Dank.

Zuletzt möchte ich meiner gesamten großen Familie danken, und ganz besonders Oma Lotte. Ich wäre nie hierhin gekommen ohne euch!

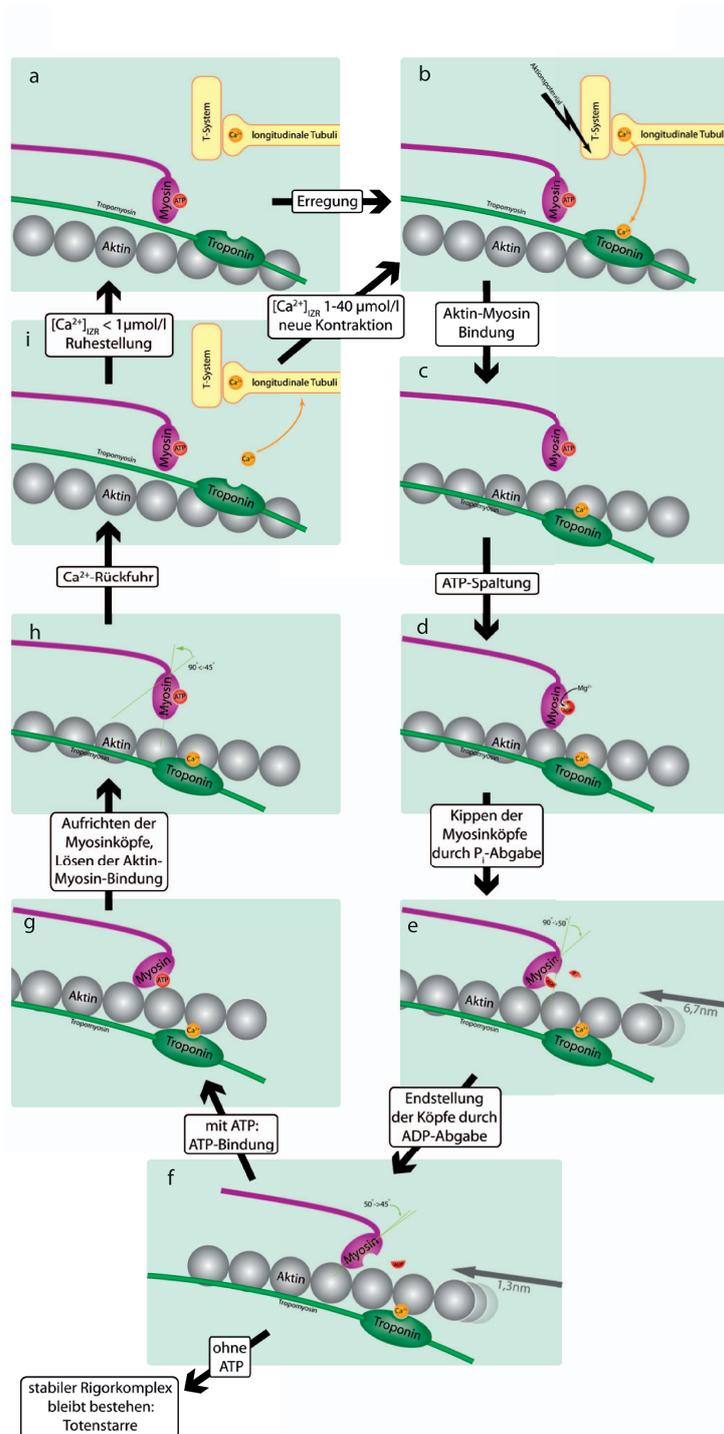


Abbildung 2: Gleitfilamenttheorie: a: gesamter Komplex im Ruhezustand. Der Myosinkopf (violett) mit gebundenen ATP (rot) steht in 90° zu Aktin (grau) und Troponin (grün), tubuläre Systeme (gelb): Die T-Tubuli der Zellmembran, rechtwinklig dazu die L-Tubuli des SR. b: trifft ein AP ein (schwarzer Blitz), wird aus dem SR Ca^{2+} freigesetzt, das an Troponin bindet. c: Konformations- und Lokalisationsänderung Troponin, die Myosinbindestelle wird frei. d: Myosin kann an Aktin binden; e: Myosin knickt um 40° ab („Rudern“), ATP wird zur Energiegewinnung gespalten, ADP verbleibt noch an der Bindungsstelle, Aktin wird um ca. 6,7 nm in die Sarkomermitte gezogen f: ADP löst sich auch ab, weiteres Abknicken um 5°, Bewegung um weitere 1,3 nm; g: ein neues ATP bindet an Myosin h: Myosin löst sich von Aktin, Kopf geht wieder zurück auf 90°-Winkel. i: abhängig von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$: Bei geringem Level ($< 1 \text{ mol/l}$) Übergang in den Ruhezustand, bei mehr $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ Beginn einer neuen Kontraktion. „Molekulare Mechanismen der Muskelfunktion“, Hank van Helvete 2006, creative commons -Lizenz, Wikimedia commons

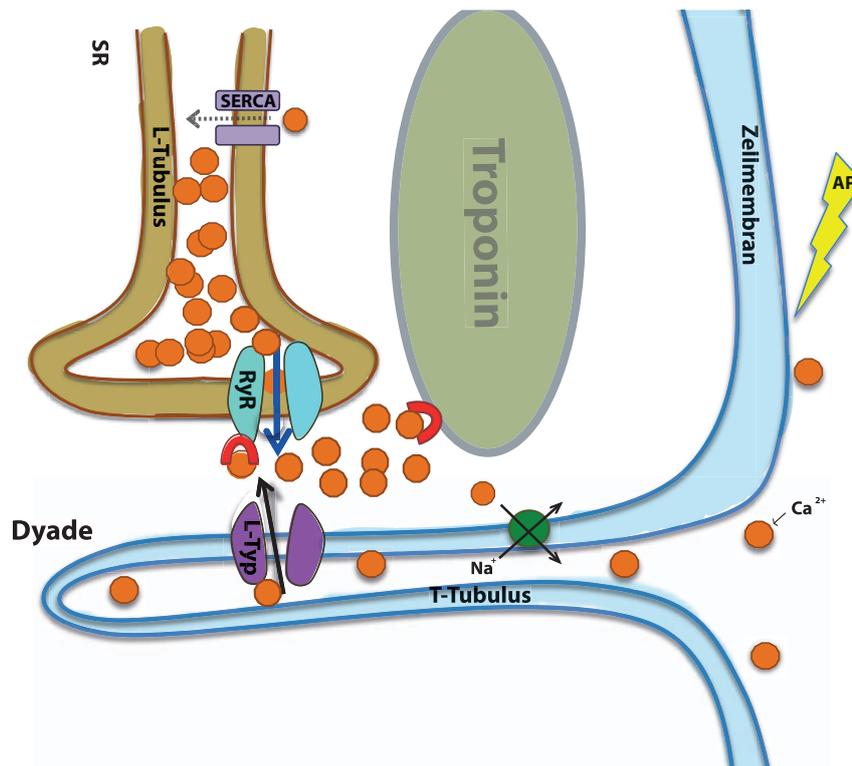


Abbildung 3: Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung: Durch ein Aktionspotential (gelber Blitz) wird die Zellmembran (blau) samt T-Tubulus depolarisiert, Ca²⁺-Ionen (orange Kreise) können durch L-Typ - Ca²⁺-Kanäle (pink) in das Zytoplasma austreten. Dort diffundiert Ca²⁺ zu den RyR (türkis) im L-Tubulus des SR (hellbraun) und binden an die Ca²⁺-Bindungsstelle (rot). Ca²⁺ tritt aus dem SR aus und diffundiert zu seiner Bindungsstelle am Troponin (oliv), was eine Kontraktion auslöst. Das intrazelluläre Ca²⁺ wird dann von der SERCA (violett) in das SR und dem Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (grün) in den Extrazellulärraum gepumpt. *Abbildung erstellt nach Bers et al. [7]*

tration intrazellulärer Kalziumionen, [Ca²⁺]_i, reicht nun, um mit der Bindung an Troponin (Abbildung 3, oliv) eine Kontraktion auszulösen, die auch in der gesamten Zelle synchron erfolgt. Daraus folgt jedoch, dass ein Verlust der T-Tubuli, oder deren aberrante Anordnung, zwangsläufig zu einem beeinträchtigten Kontraktionsverhalten der Zellen führt.

Nach Ende der Kontraktion muss das [Ca²⁺]_i von speziellen Ca²⁺-Transportern (SERCA-Pumpe, siehe 3, violett) sowie von dem Na⁺-Ca²⁺-Austauscher NCX (Abbildung 3, grün) wieder zurück in das SR gebracht werden. Hier spielt die weite Verzweigung des SR über die L-Tubuli eine wichtige Rolle; in der großen Membranoberfläche sind viele Pumpen für den Rücktransport der Kalziumionen vorhanden, durch die der [Ca²⁺]_i-Spiegel in der gesamten Herzmuskelzelle schnell und synchron sinkt. Ein kleinerer Teil wird wieder von dem Na⁺-Ca²⁺-Austauscher in den Extrazellulärraum ausgeschleust (Abbildung 3, grün).

es ein bis zwei Zielsteuerungssequenzen, welche die Spezifität der einzelnen Subfamilien für ihre Bindungspartner bestimmen. Die cPKCs tragen dabei eine C2-Domäne (orange) und eine C1A- und C1B-Domäne (rot). Die nPKCs haben auch eine C1A- und C1B-Domäne, aber eine Ca^{2+} -insensitive C2-Domäne. Die aPKCs unterscheiden sich hier grundsätzlich von den anderen Subfamilien, sie tragen eine PB1-Domäne (türkis) für die bei ihnen typischen Protein-Protein-Interaktionen.

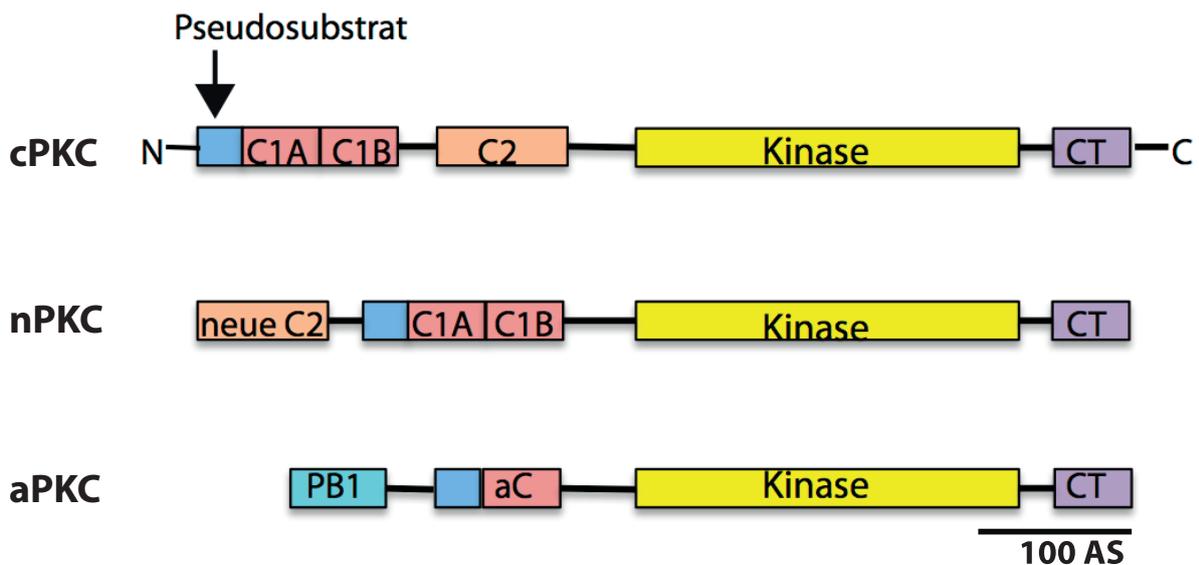


Abbildung 5: Schema der Domänenstruktur der PKC: Abgebildet sind die drei Subfamilien der PKC-Enzymfamilie, die Subfamilie ist dabei jeweils links der Domänenstruktur benannt. Allen PKC ist die Kinase-Domäne (gelb) und ein Pseudosubstrat am N-terminalen Ende (blau) gemeinsam. CT (violett) bezeichnet die Endsequenz am C-terminalen Ende. cPKC und nPKC tragen eine C1-Domäne, die in zwei Teile A und B unterteilt ist (rot). Die C2-Domäne kommt auch bei cPKC und nPKC vor (orange), unterscheidet sich aber bei beiden. Die aPKC tragen keine C-Domänen, sondern eine PB1-Domäne (türkis). Die Größe der Abschnitte ist durch die Skala rechts unten angegeben. *Abbildung nach Newton et al. [87]*

Die Regulation der PKC erfolgt strukturell und räumlich über spezifische Kofaktoren. Das Zusammenspiel mit den jeweiligen Kofaktoren wird über diese Domänenstruktur gesteuert. Im Ruhezustand liegen die PKCs inaktiv vor, das aktive Zentrum der Kinasedomäne wird vom Pseudosubstrat blockiert [66]. Das Pseudosubstrat beinhaltet ein Alanin, das zwar in das katalytische Zentrum passt, jedoch nicht phosphoryliert werden kann. Detaillierte Untersuchungen hierzu stammen von House und Kemp [44] sowie Makowske und Rosen [75]. Erfolgt eine Aktivierung der PKC, wird durch Konformationsänderung das Pseudosubstrat aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entfernt, das nun für die Substratphosphorylierung zur Verfügung steht. Die C1-Domänen der cPKCs und nPKCs werden von DAG aktiviert. Sie sind zweifach vorhan-

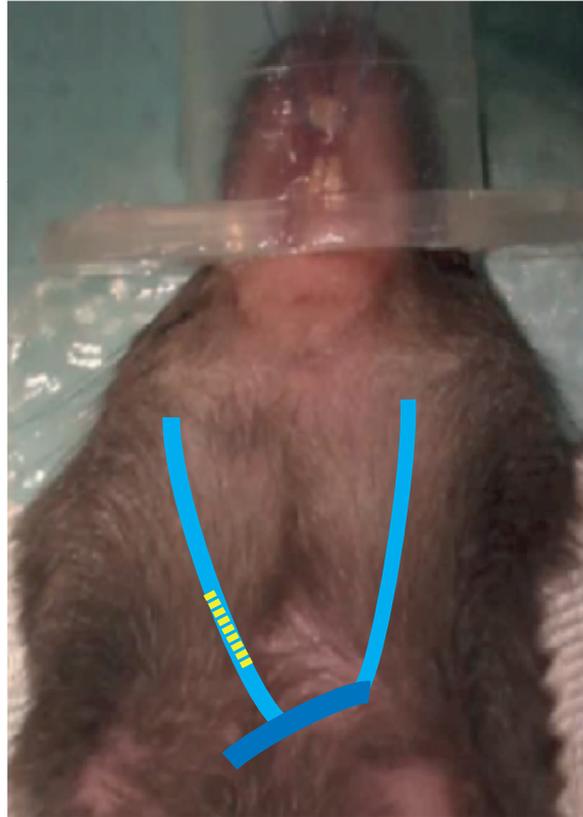


Abbildung 6: Transduktion der Versuchstiere: Schematische Darstellung des Verlaufes der Vena jugularis in der Maus (Rückenlage). Die hellblauen Linien zeigen den Verlauf der beiderseitigen Vena jugularis. Die dunkelblaue Linie zeigt die unbenannte gemeinsame Vene, in die beide Venae cavae und Venae subclaviae (zugunsten der Übersichtlichkeit nicht skizziert) münden, sodass sie dann die obere Hohlvene (Vena cava cranialis) bilden. In gelb ist einseitig der Insertionsbereich der Injektionsnadel skizziert.

lage des Tieres, die Oberkieferschneidezähne im Konus fixiert waren. Zur Unterhaltung der Narkose wurde 1,5-1,7 % Isofluran in 1 l/min Sauerstoff appliziert. Die Maus wurde dann in Rückenlage auf dem mit einem eingebauten Wärmekissen gewärmten Operationsplatz an den vier Gliedmaßen durch medizinisches Klebeband an den Untergrund geklebt. Dabei wurde das Vorderbein der Seite, in deren Vena jugularis die Injektion erfolgen soll, parallel zum Thorax nach kaudal befestigt; das andere Vorderbein kann dann nach lateral oder leicht nach kranial fixiert werden. Der Verlauf der Vena jugularis ist in Abbildung 6 skizziert.

Dann wurde die Stelle, an der die Injektion erfolgen soll, vorsichtig rasiert und mit Braunol® Iod-Lösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) die Haut desinfiziert. Nun musste die Injektionsstelle lokalisiert, und in der Haut darüber eine Inzision von etwa 2 mm gesetzt werden. Die Vene wurde dann vorsichtig durch stumpfe Präparation mit Knüpfpinzette (Aesculap FD281R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) und Schere (FST 14084-08, Fine Science Tools GmbH,

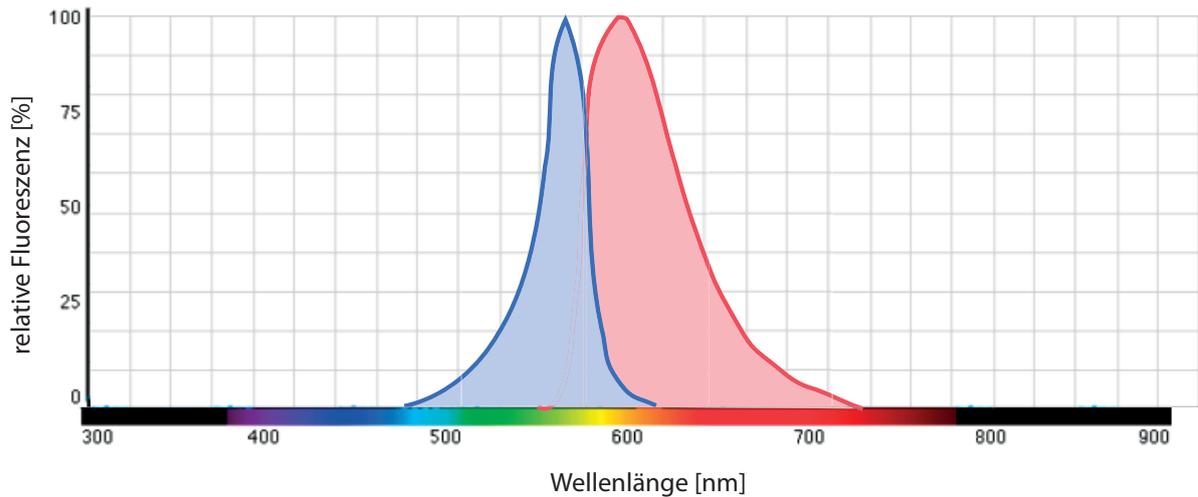


Abbildung 7: Spektrum TagRFPT: Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionskurven des exprimierten Fluoreszenzproteins TagRFPT. Aufgetragen ist die Fluoreszenz in % der maximalen Intensität, über die Wellenlängenbereiche des sichtbaren Lichtes. Das Absorptionsmaximum in der blauen Kurve liegt bei 555 nm, das Emissionsmaximum in der roten Kurve bei 584 nm. TagRFPT ist dabei die photostabilere Variante von TagRFP, das Spektrum ist bei beiden identisch. Diese Abbildung wurde nach einer Vorlage von Evrogen erstellt (<http://evrogen.com/products/TagRFP/TagRFP.shtml>).

Eindruck über die Verteilung der Expression im Zielgewebe getroffen werden. Es kann also dargestellt werden, ob unterschiedliche Schichten des Herzens unterschiedlich gut transduziert sind, sowie auch, ob auch andere Organe eine spezifische Fluoreszenz zeigen. Damit kann beurteilt werden, ob andere Organe ebenfalls von den AAV mit der spezifischen cDNS transduziert wurden, was Rückschlüsse auf die Herzspezifität des gewählten Vektors zulässt. Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzmessung am ganzen Organ liegt darin, dass keine Zellisolation für eine erste Beurteilung der Transduktionseffizienz und -spezifität nötig ist. Da die Zellisolation aus den FVB/N-Tieren insgesamt schlecht verlief, bietet sich die hier mögliche Beurteilung der Organe im Ganzen an. Ein Nachteil der Methode lag darin, dass sich die verwendeten Organe bei dieser Untersuchung bei Raumtemperatur an der Luft befanden, daher schnell austrocknen oder konatminiert werden konnten. Eine weitere Verwendung der Organe wäre daher nur eingeschränkt möglich.

Für die Messung der Organfluoreszenz wurde je ein mit einer beliebigen Variante der Versuchslösungen neonatal injiziertes FVB/N-Männchen im Alter von 16 oder 23 Wochen genutzt, sowie jeweils ein mit NaCl injiziertes Kontrolltier gleichen Alters, aus dem gleichen Wurf. Die Tiere wurden dazu schmerzlos getötet. Die Mäuse wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion mit 85 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®), Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutsch-

Schallkopf, ebenfalls von FUJIFILM Visualsonics. Zur Darstellung der Aufnahmen und späteren Auswertung wurde die systemspezifische Vevo-Software des gleichen Anbieters genutzt. Das Mess-System enthält weiterhin einen beheizten Untersuchungstisch, in den Messelektroden integriert sind. In Abbildung 8 ist in **a** das genutzte Ultraschallgerät abgebildet, in **b** der fertige Messaufbau inklusive der narkotisierten Maus. Zwischen dem Thorax der Maus auf dem Messtisch und dem weißen Ultraschallkopf, ist das blaue Kopplungsgel gut zu erkennen.

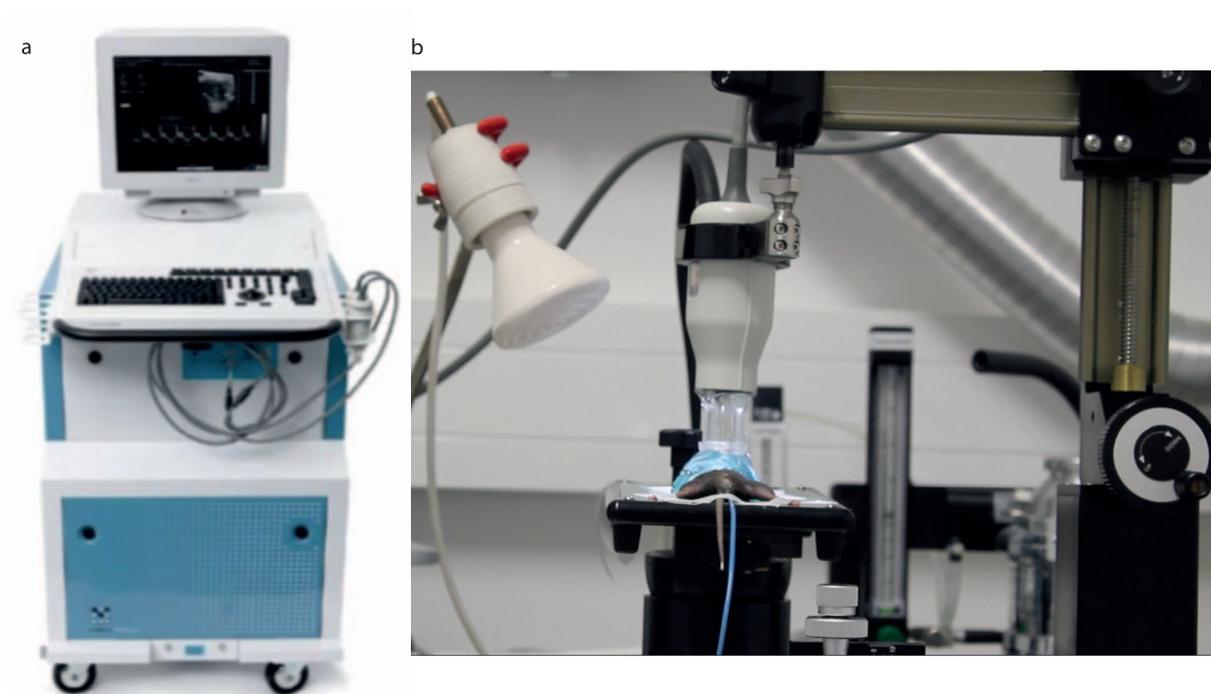


Abbildung 8: Aufbau der echokardiographischen Untersuchung: **a:** Die mobile Vevo 770-Echokardiographie-Station von Visualsonics Inc., Toronto Kanada (Bild vom Hersteller mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt). Es können daran Sektor-Schallköpfe unterschiedlicher Frequenz genutzt werden, das Bild wird auf dem Monitor direkt angezeigt. Die Einstellungen können über die integrierte Tastatur angewählt werden, zudem ist eine Auswertung der Messungen auch hier möglich. **b:** Platzierung der Maus auf dem Untersuchungstisch; Das Tier ist mit Klebeband mit den Pfoten auf den Elektroden des Tisches fixiert, so werden EKG und Atmung direkt aufgezeichnet. Eine Rektalsonde (blau) misst die Körpertemperatur, die Wärmelampe (weiß, links oben) kann flexibel ausgerichtet werden. Der Tisch kann auf dem runden Anteil des Fußes in der Position variiert werden, zudem über den Manipulator (unten, rechts des Fußes) horizontal fein verschoben werden. Der Schallkopf (707B, 30 MHz) kann in seiner Aufhängung frei rotiert werden. Über die Führungsschiene (oben und rechts) kann der Schallkopf nach links und rechts sowie in vertikaler Richtung verstellt werden. Im Hintergrund ist die Anlage zur Isoflurannarkose teilweise zu erkennen (Säule: Anzeige und Regulation des O₂-Flusses; rechts daneben ist teilweise der silberne Isofluran-Verdampfer sichtbar.)

Die echokardiographische Untersuchung erfolgt ebenfalls unter dem in 3.5 beschriebenen Standard-Narkoseprotokoll. Nach der Einleitung der Narkose in einer Plexiglasbox wird das Tier zuerst gewogen, dann wird es in Rückenlage auf den Untersuchungstisch gelegt. Die Pfoten

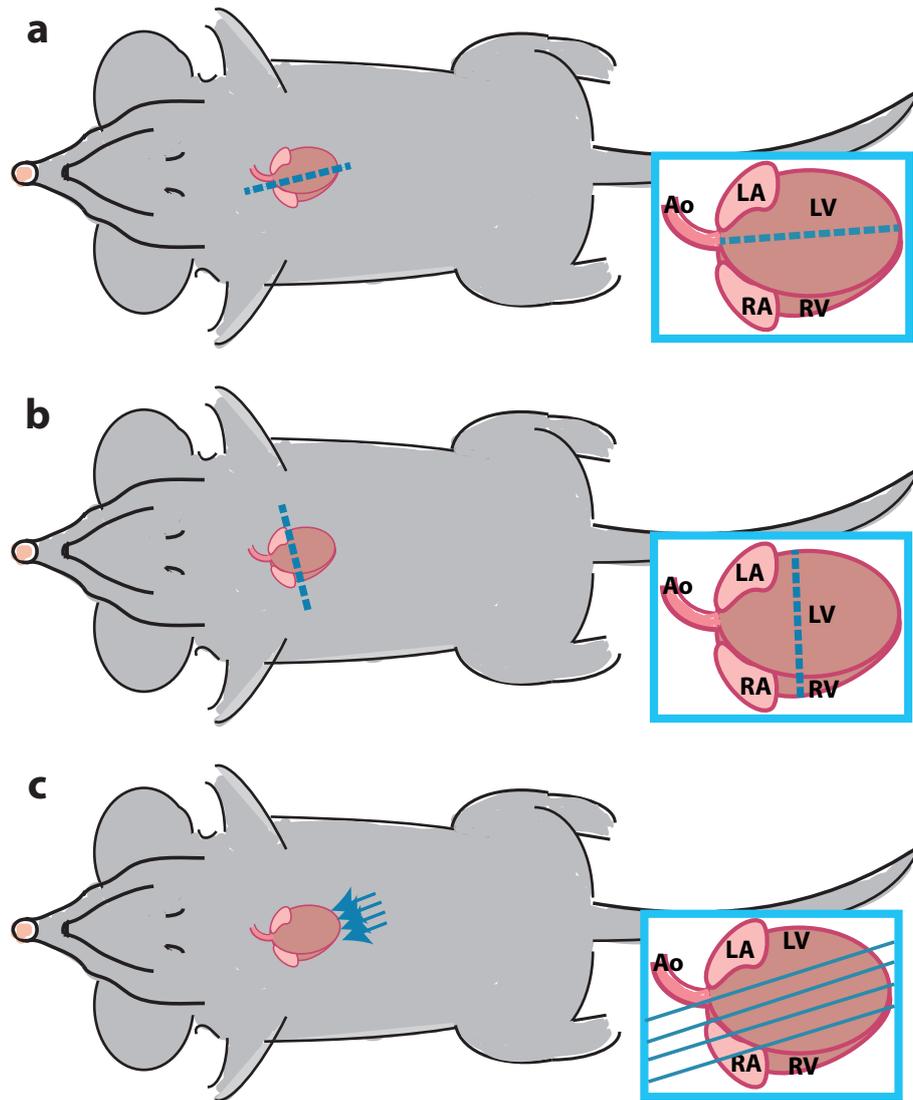


Abbildung 9: Schema der Messpositionen an der narkotisierten Maus: In allen drei Bildern ist der Strahlengang des Ultraschall-Signals im Verhältnis zur Maus skizziert, im blauen Ausschnitt sind Aorta (Ao), linkes (LA) und rechtes Atrium (RA), sowie linker (LV) und rechter Ventrikel (RV) gekennzeichnet. **a:** Messposition der langen Herzachse, der Schallkopf steht annähernd im 90°-Winkel zur Thorax-Fläche der Maus, der Strahlengang ist ventro-dorsal. **b:** Messposition der kurzen Herzachse, Winkel des Schallkopfes wieder 90° zur Maus, Strahlengang wieder ventro-dorsal, Schallkopf im Verhältnis zu a um 90° auf horizontaler Ebene rotiert. **c:** Messposition des Vierkammerblickes, der Schallkopf liegt parallel zur Maus an, Strahlengang gemäß der Pfeilspitzen kaudolateral- kranialateral.

Es wurden zunächst drei Standard-Messpositionen genutzt: Aufnahmen entlang der langen Herzachse, der kurzen Herzachse sowie der Vierkammerblick. Für die erste Position, der Messung in der langen Herzachse, (Abbildung 9a) wurde die Membran des Ultraschallkopfes, senkrecht auf dem Thorax der Maus stehend, entlang einer gedachten Linie durch Herzbasis und Apex ausgerichtet (rechts-kranial nach links-kaudal).

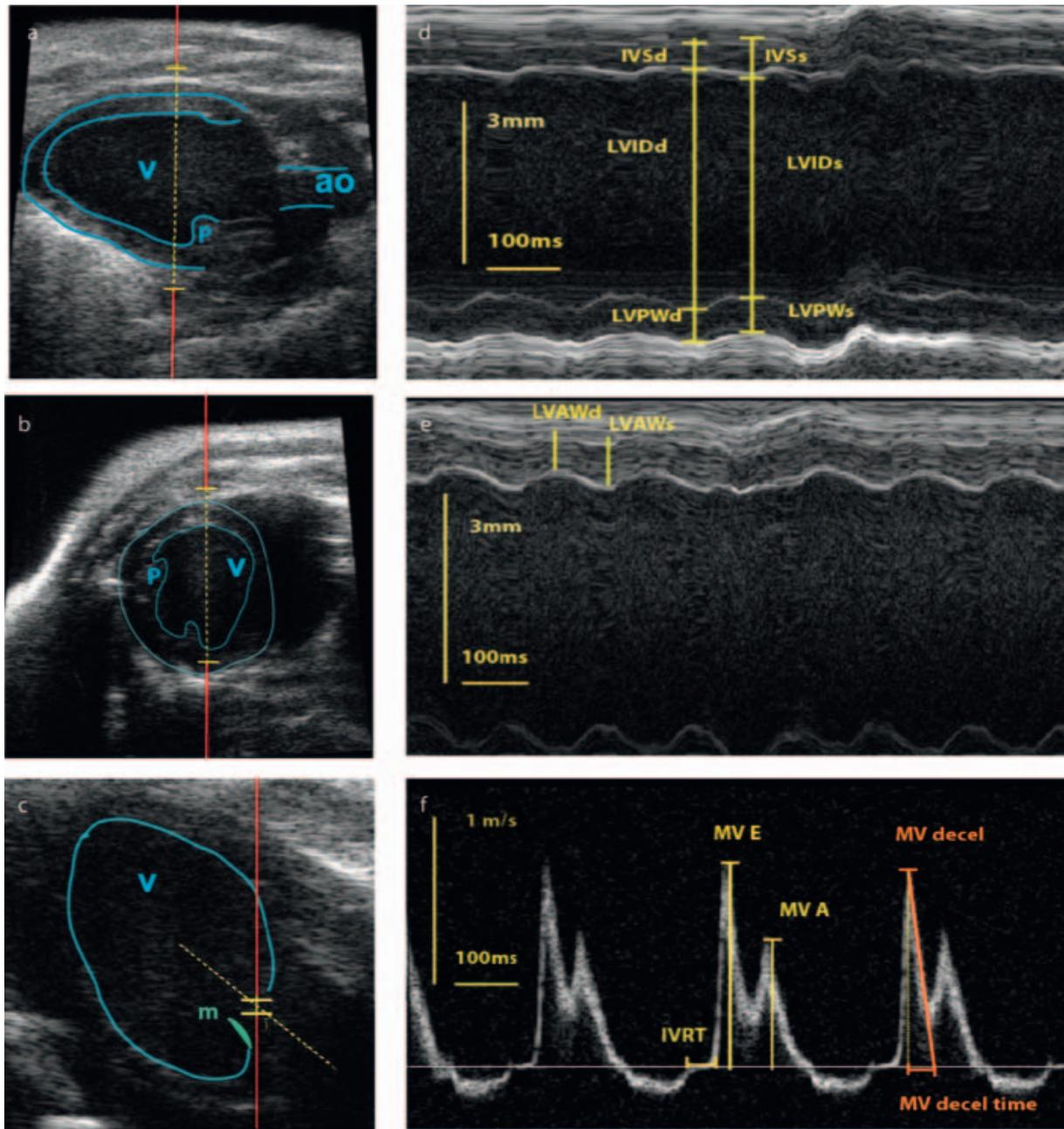


Abbildung 10: Messpositionen und Messung der echokardiographischen Parameter: a, b, c: Abbildungen im B-Modus, a lange Herzachse, b kurze Herzachse, c apikaler Vierkammerblick; d, e: gleiche Position wie die Abbildung links davon, M-Modus; f: PW-Doppler-Modus, Mitralklappe. blau: Umrisse kardialer Strukturen: in a, b ist das Myokard teilweise eingefasst. Rot-gelbe Linie: Verlauf des Schallwellenganges für die jeweilige M-/PW-Mode-Messung rechts (d-f). Die gelb-unterbrochene Linie zeigt den Messbereich an; c: gelb-unterbrochene Linie: Winkel der Doppler-Messung zum Schallwellengang. v = Ventrikellumen, ao = Aortenwurzel, P = Papillarmuskel, m = Mitralklappensegel. Der obere Bildbereich ist schallkopfnah: In a, b der ventrale Thorax der Maus, in c der links-laterale Thorax. d, e: schematische Zeichnung der Messparameter in gelb, von IVS, LVID und LVPW in a, von LVAW in b, jeweils systolisch und diastolisch. Größen- und Zeitverhältnisse links im Bild. f: Zeitverlauf der Blutflussgeschwindigkeit durch die Mitralklappe. Gelbe Linien: Messungen E-Welle, A-Welle, IVRT; Orange Linien: MV decel und MV decel time. Zeit- und Geschwindigkeitsverhältnisse links im Bild. Die Messungen in d-f werden je Tier dreimal ausgeführt.

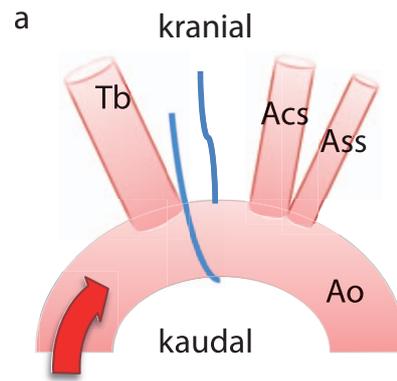


Abbildung 11: Schema der Aortenkonstriktion: Die Abbildung zeigt schematisch die Positionierung der Ligatur am Aortenbogen (**Ao**); mit „kranial“ und „kaudal“ ist die Orientierung im Tier angegeben, mit dem roten Pfeil die Richtung des Blutflusses dargestellt, am Fuße des Pfeiles befände sich das Herz des Tieres. (**Tb**) ist der Truncus brachiocephalicus, (**Acs**) die Arteria carotis communis sinistra, (**Ass**) die Arteria subclavia sinistra. In blau ist das für die Konstriktion verwendete Nahtmaterial skizziert.

erhöhten Blutdrucks. Da die erhöhte linksventrikuläre Nachlast eine häufige Ursache für chronische linksventrikuläre Hypertrophie ist, wurde das im Folgenden beschriebene Tiermodell der Aortenkonstriktion bereits in vielen Studien zur Erforschung der assoziierten Pathologien und ihrer Behandlungsmethoden genutzt [105, 106, 46, 11].

Üblicherweise wird im Tiermodell eine Konstriktion der Aorta transversa durchgeführt; daher lautet die internationale Bezeichnung auch „transverse aortic constriction“, oder kurz TAC. Dazu erfolgte auch in den hier verwendeten Mäusen eine teilweise Ligatur der Aorta (**Ao**) zwischen den ersten beiden Arterienabgängen, dem Truncus brachiocephalicus (**Tb**) und der linken Arteria carotis communis (**Acs**), neben der direkt noch die Arteria subclavia sinistra (**Ass**) abzweigt, siehe Abbildung 11. Der rote Pfeil zeigt die Blutflussrichtung des aus dem Herzen ausgeworfenen arteriellen Blutes. Der blaue Faden skizziert die für die Ligatur verwendete Naht an der korrekten Position. Die Ligatur reduzierte den Durchmesser dort auf ein festgelegtes Maß, damit folglich die Menge an Blut, die je Herzschlag durch diese Engstelle fließen konnte. Das wiederum musste eine Angleichung der Auswurfleistung an den verminderten Durchfluss nach sich ziehen, was zunächst durch eine Erhöhung der Auswurfleistung mittels Frequenzerhöhung und Kontraktilität geleistet wurde; mittel- und langfristig konnte dies aber nur durch eine Anpassung des Myokards durch Hypertrophie gelingen.

Die in unserer Studie für die TAC-Operation genutzte Methode orientierte sich an Martin et al. [76], wurde jedoch noch weiter modifiziert. Ziel war es, die Belastung der Tiere durch die Operation und deren Nebeneffekte weitestgehend zu reduzieren. Dies diente nicht nur dem

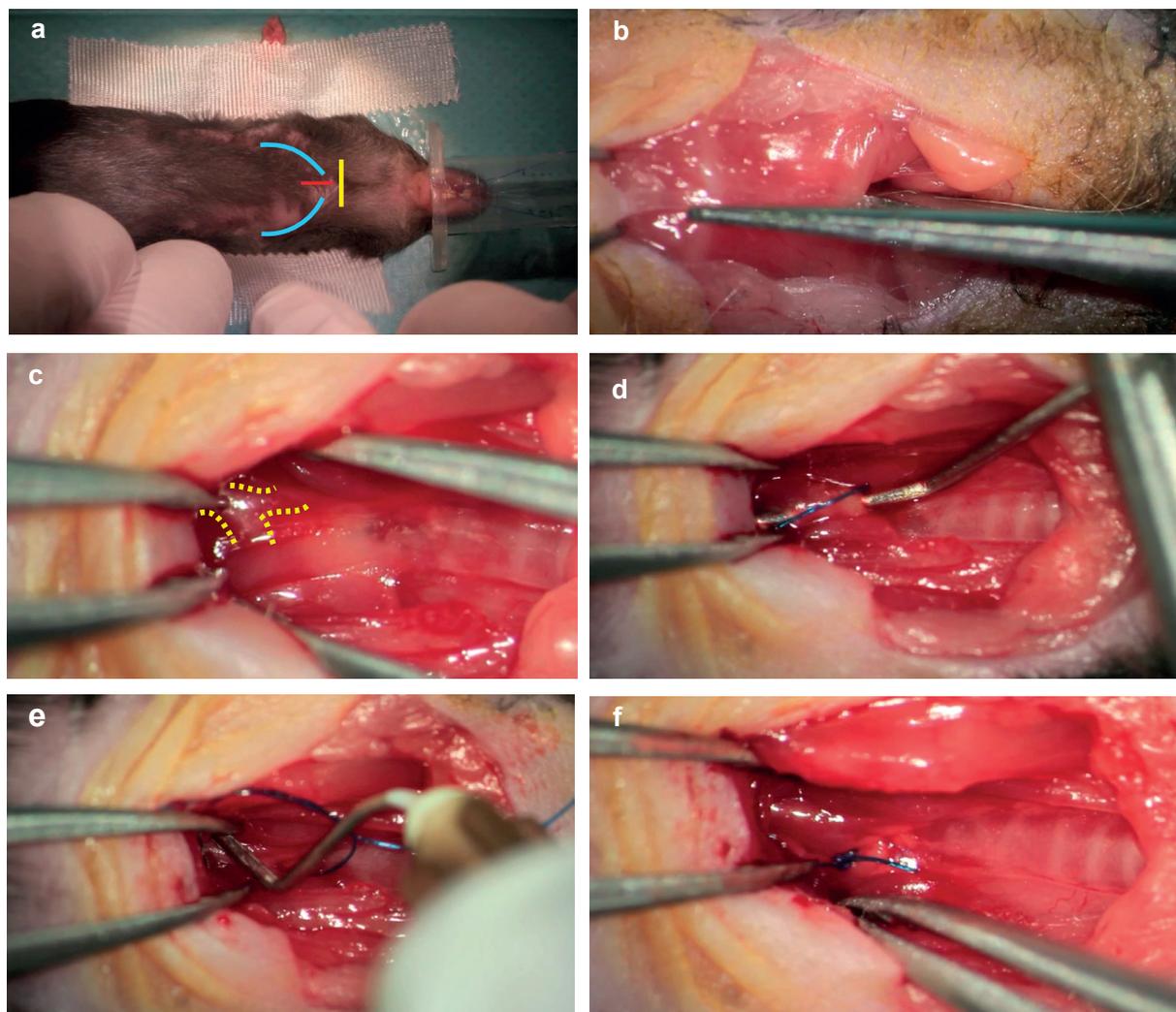


Abbildung 12: Aortenkonstriktion: Die Abbildung zeigt in Auszügen den Verlauf der Operation; in **a**: Narkotisierte Maus in der Vorbereitung der Operation, bereits mit Klebeband am Tisch fixiert, Nase in der Maske für die Inhalationsnarkose. In blau ist der kraniale Thorax skizziert, in gelb der Zugang zum Operationsfeld und in rot der Schnitt-Bereich des Sternums. In **b**: Schere mit dem stumpfen Ende von kranial in den Thorax eingeführt. Orientierung für die mediane Schnittführung ist kranial die Trachea, kaudal die Verbindungspunkte der Rippen am Sternum. In **c**: Der Thorax ist 2-3 mm weit eröffnet und der Thymus reponiert, der Aortenbogen und der Truncus brachiocephalicus sind gelb schraffiert. Das Sichtfeld wird mit zwei Knüppelpinzetten dargestellt, wie auch in **d-f**. In **d**: Führungskanüle unter Aortenbogen platziert, das blaue Fadenende etwas daraus vorgezogen. In **e**: Führungskanüle reponiert, die zweite Kanüle ist parallel auf dem Aortenbogen aufgelegt. Der Faden ist zu einem zweifach geschlungenen chirurgischen Knoten vorgelegt. In **f**: erfolgreiche Ligatur, die Einengung der Aorta durch den blauen Faden ist deutlich sichtbar. In dieser Situation kann in situ der vor der Ligatur abgehende Truncus brachiocephalicus als vermehrt gefüllt und pulsierend erkannt werden.

Score	0	1	2	3
Wunde	Trocken, geschlossen	Schwellung	geringgradig Exsudat (serös/eitrig), deutliche Schwellung	Wunde offen, großflächige Nekrose
Allgemeinbefinden	unauffällig	Struppiges Fell, Augen in Ruhe geschlossen	Bewegungen langsam, kalte Gliedmaßen, erschwerte Atmung	Apathie, keine freiwillige Bewegung, stark erschwerte Atmung, Seitenlage
Gewichtsverlust	0%	Bis 10%	10-20%	Mehr als 20%
Bewertung: Ein Kriterium Score 3, oder zweimal 2: sofortiger Abbruch Ein Kriterium Score 2, oder zweimal 1: Tier vereinzeln, Wärmezufuhr, ggf. antibiotische/antiinflammatorische Behandlung; erneute Beobachtung nach 2h. Abbruch, wenn keine Verbesserung. Ein Kriterium Score 1: Erneute Beobachtung nach 2h, Tier ggf. vereinzeln.				

Abbildung 13: Score Sheet: Belastungsbewertungsbogen für die Beurteilung der Mäuse nach TAC-Operation. Dieser Bogen kann allen mit der Betreuung der Tiere verbundenen Personen zur Verfügung gestellt werden, sodass eine selbstständige Beurteilung der Tiere und eine adäquate Reaktion zu jeder Zeit möglich ist. Die entsprechende Reaktion kann in der Karteikarte des Tieres im Verwaltungsprogramm unter Verweis auf den „Score“ (Belastungswert) eindeutig dokumentiert werden.

durchgeführt. Da dieser Endpunkt des Versuches beibehalten werden sollte, und zudem aus Gründen der Vergleichbarkeit eine Dauer der Nachlasterhöhung von zwei Wochen beibehalten werden sollte, ergab sich ein Operationszeitpunkt zu Beginn der 30. Lebenswoche dieser Tiere. Während der echokardiographischen Untersuchung, die zum Ende der Studie erfolgte, konnte die korrekte Positionierung der Ligatur im Tier überprüft werden. Der Strahlengang weist dabei von rechts-kranial vor dem Processus sterni, was im Bild dem oberen Bildende entspricht, nach links kaudal, unten im Bild, gleichzeitig annähernd parallel zur Thoraxoberfläche der Maus. In **Abbildung 14 a** ist das unbearbeitete Bild zu sehen, in dem der dunkle, da blutgefüllte, Aortenbogen mit seinen helleren Wänden gut zu erkennen ist. Zum besseren Verständnis ist in **Abbildung 14 b** in der gleichen Aufnahme der Verlauf der Aorta (**Ao**) mit den zwei in dieser Position erkennbaren, auch schon in der Skizze gezeichneten Abgängen **Tb** und **Acs** eingezeichnet. Der Abgang der **Ass** ist bei dem Verlauf des Strahlenganges in dieser Aufnahme nicht zu sehen. Der rote Pfeil markiert wieder den Blutfluss; durch die Position des Schallkopfes ist der Verlauf hier im Verhältnis zur anatomischen Situation bei Thorakotomie gespiegelt.

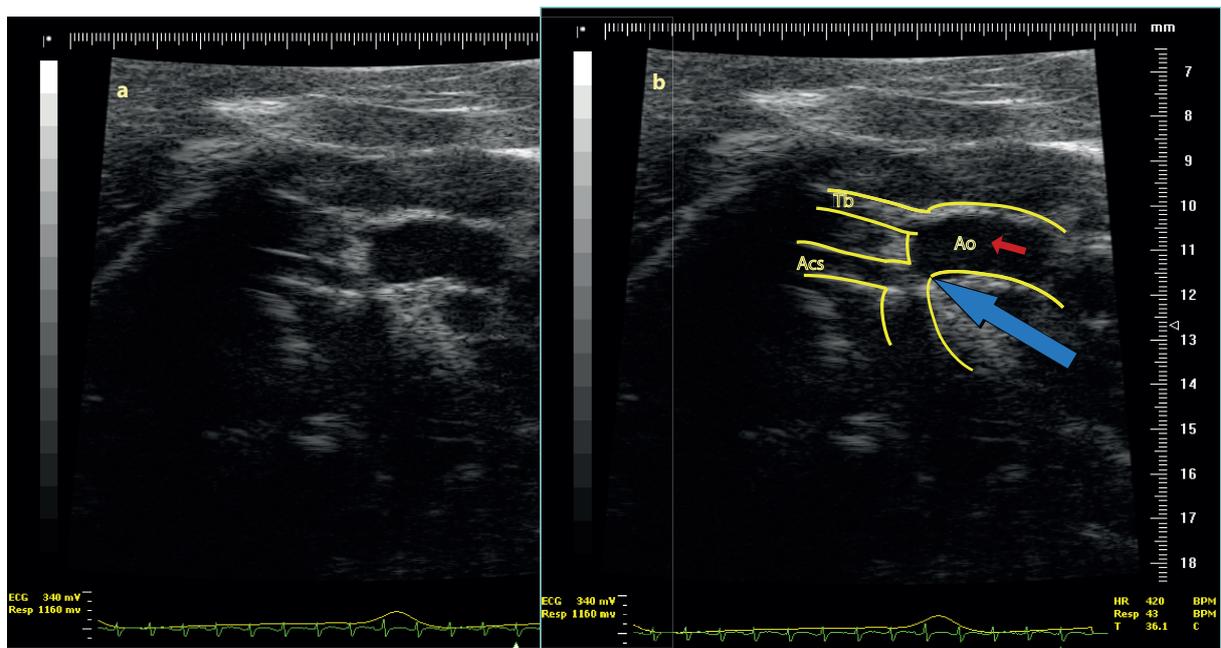


Abbildung 14: Echokardiographische Kontrolle der Stenosierung nach TAC: Zu sehen ist eine echokardiographische Aufnahme des Aortenbogens. Der Schallgang verläuft von rechts kranial des Sternums (hier oben im Bild) nach links kaudal (hier unten), damit annähernd parallel zur Thoraxoberfläche der Maus. **a** zeigt die unbearbeitete Aufnahme, in **b** ist in gelb der Gefäßverlauf nachgezeichnet (**Ao**: Aorta, **Tb**: Truncus brachiocephalicus, **Acs**: Arteria carotis communis sinistra). Der rote Pfeil zeigt die Richtung des Blutflusses, der blaue Pfeil weist auf die Einengung durch die Ligatur.

Der blaue Pfeil weist auf die sichtbare Einengung des Aortenbogens durch die Ligatur. Der Aortenbogen vor der Ligaturstelle war dabei erkennbar dilatiert.

Diese Untersuchung diente dabei der Verifizierung der korrekt positionierten Ligatur bei Bedarf, wie etwa nicht eindeutig sichtbarer Hypertrophie während der Echokardiographie. Die Ergebnisse hieraus wurden nicht speziell quantifiziert.

3.10 Isolation und Kultivierung muriner Kardiomyozyten

Die Maus wurde zunächst durch intraperitoneale Injektion mit 85 mg/kg Ketaminhydrochlorid und 15 mg/kg Xylazin tief sediert, wie schon in 3.6 beschrieben. Im Verlauf des Projektes wurde hierfür eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (s. Abschnitt 3.5) etabliert. War bei dem Tier das Schmerzempfinden erloschen, sieht man keinen Rückziehreflex nach Zehenkneifprobe mehr. Dann wurde Citratlösung intraperitoneal injiziert, daraufhin das Tier auf einer saugfähigen Unterlage fixiert. Die Haut wurde kaudal des letzten Rippenbogens auf mehreren Zentimetern eingeschnitten und nach kranial abgezogen. Das Tier wurde daraufhin durch Dekapitation getötet, dann der Thorax großflächig eröffnet. Das Herz wurde durch Injektion eiskalter Lösung A in beide Ventrikel von Blutresten freigespült, dann vorsichtig aus dem

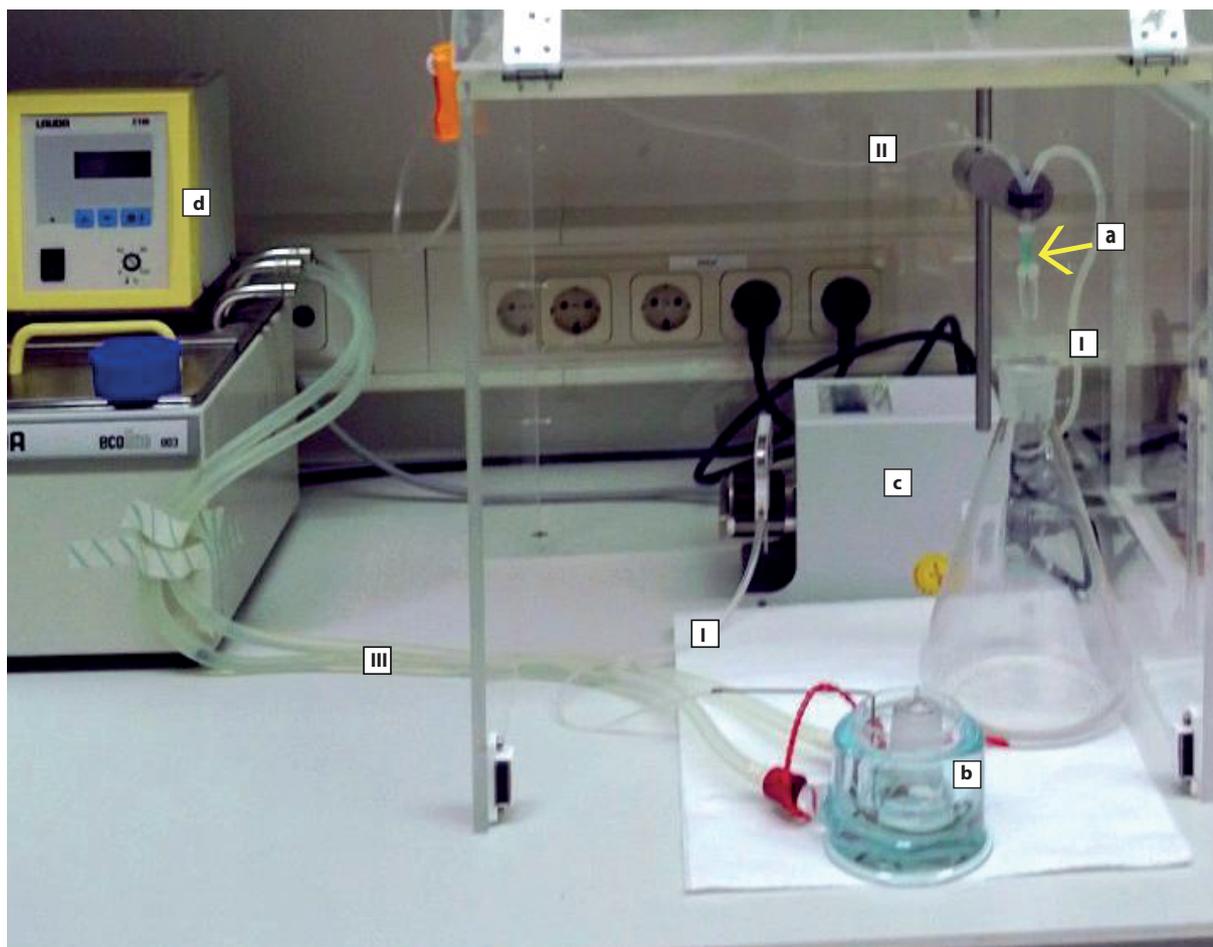


Abbildung 15: Aufbau Langendorff-Perfusion zur Zellisolation: a bezeichnet die abgestumpfte Kanüle, an der das Herz mit der Aorta flüssigkeitsdicht angebunden wird. Das Herz hängt dann vor dem weißlich-transparenten Schutz unter dem grünen Konus frei. Der von links oben kommende Schlauch II führt neue, unbegaste Lösung zu. Die begaste, gewärmte Zirkulationslösung befindet sich in der Glasschale b, sie wird über den schmalen Schlauch I und die Pumpe c zum Herzen transportiert. Wird das Auffanggefäß unter der Herzaufhängung gegen die Glasschale b getauscht, ist so ein Kreislauf geschaffen. d ist ein Wärmebad mit Pumpe, die in den Schläuchen II 37° warmes Wasser in die Glasschale b pumpt, um damit die darin enthaltene Zirkulationslösung zu wärmen. Die Begasung mit O₂ wird mittels eines Schlauches mit Injektionskanülen-Spitze, bei Bedarf in die Glasschale b eingebracht.

umgebenden Gewebe gelöst. Danach wurde die Aorta nahe vor dem ersten Abgang aus dem Aortenbogen durchtrennt und das Herz entnommen.

Die Aorta wurde dann in eiskalter Lösung A auf eine stumpfe Perfusionskanüle aufgezogen und mit Seidenfaden der Stärke 6/0 USP an der Kanüle fixiert. Diese Kanüle konnte dann an einer Apparatur zur retrograden Perfusion angeschlossen werden, dargestellt in Abbildung 15. Das zu perfundierende Herz wurde dazu an der Kanüle (Abbildung 15a) an die Perfusion angesteckt. Dabei wurde die kontinuierliche Flüssigkeitszufuhr durch eine Pumpe (Abbildung 15c) gewährleistet, die jeweilige Perfusionslösung in einem Wasserbad (Abbildung 15d)

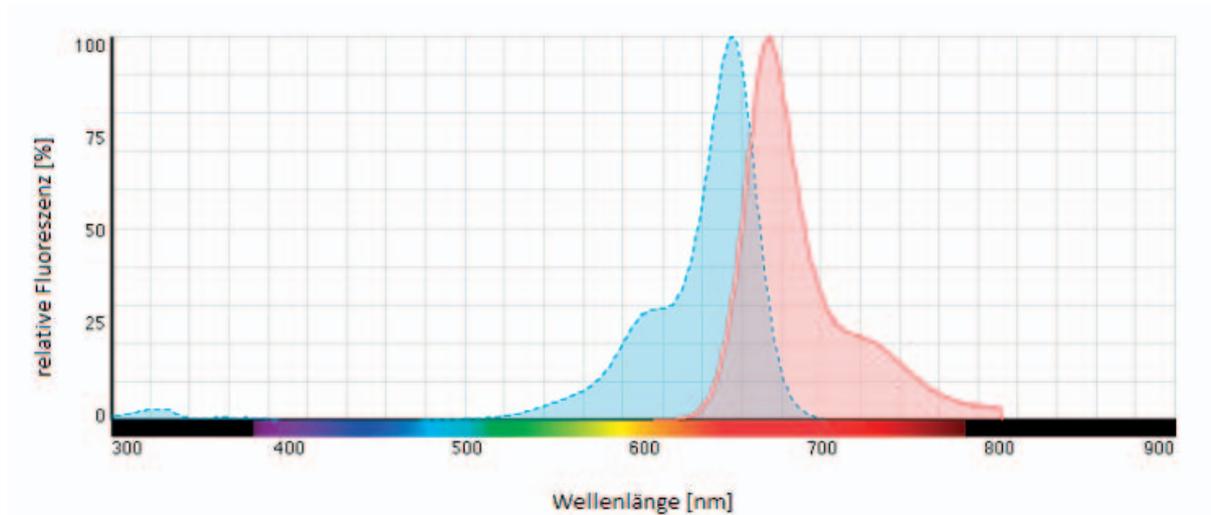


Abbildung 16: Spektrum Cell Mask™ Deep Red: Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz in % gegen die Wellenlänge des Lichtes. Das Maximum der Anregungswellenlänge liegt bei 650 nm, das des emittierten Lichtes bei 670 nm.

Quelle: <https://www.thermofisher.com> (mit freundlicher Genehmigung)

inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung durch dreimalige vorsichtige Spülung mit Tyrode ausgewaschen, dann wieder 1 ml Tyrode auf die Zellen aufgebracht, worin die Zellen während der Untersuchung lebensfähig blieben.

Bei der Konfokalmikroskopie rastert ein punktförmiger Lichtstrahl mit hoher Geschwindigkeit das Präparat in zwei Dimensionen ab. So regt der Laser zu einem Zeitpunkt nur Fluoreszenz in dem kleinen Einwirkungsbereich des Laserstrahles an, der größte Teil der Probe ist also im gleichen Moment unbeleuchtet. Das ist wichtig, da durch die Einwirkung des Laserstrahles, der viel Energie auf kleiner Fläche bündelt, schnell phototoxische Effekte entstehen können, welche die Probe möglicherweise schädigen können. Dies ist insbesondere für lebende Zellen bedeutsam. Eine Lochblende sorgt dafür, dass nur emittiertes Licht aus der Fokusebene zum Detektor durchgelassen wird.

In dieser Arbeit wurde das Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TCS SP5 von Leica Microsystems, Wetzlar, genutzt. Das Anregungs- und Emissionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ist in Abbildung 16 dargestellt. Die maximale Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cell Mask™ Deep Red liegt bei 650 nm, die Anregung erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei 633 nm. Das Spektrum des emittierten Lichtes hat ein Maximum von 670 nm. Die Trennung von Anregungs- und Emissionswellenlänge erfolgte mit Hilfe eines akustisch-optischen Strahlenteilers (acousto optical beam splitter, AOBs). Mit Hilfe des im TCS SP5 verbauten spektralen

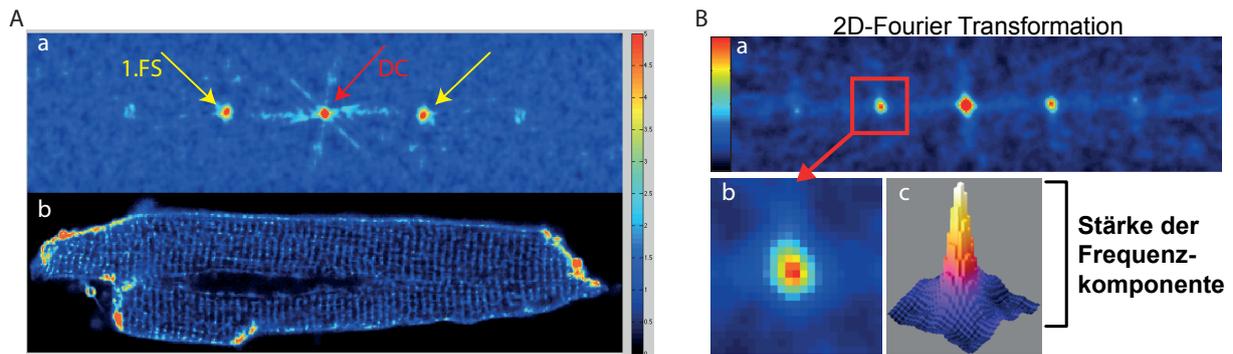


Abbildung 17: Auswertung konfokalmikroskopischer Bilder: **Ab:** konfokalmikroskopisch aufgenommenen Herzzelle, Wärmewerte der Darstellung nach Signalintensität der Fluoreszenz (rot = stärkere Intensität). **Aa:** Darstellung der Frequenzdomänen aus **Ab**, mittels FFT in MatLab erstellt. Blau = Hintergrundrauschen. Mit dem roten Pfeil ist der „direct current“ (DC) gekennzeichnet, der die Summe der Intensitätswerte aller Pixel des Bildes darstellt. Mit dem gelben Pfeil markiert ist die erste Signalspitze der mittels FFT transformierten Frequenzkomponenten (1.FS) aus **Ab**, die weiter nach außen folgenden Punkte sind die harmonischen Schwingungen der ersten Signalspitze **B:** Schema zur näheren Erläuterung eines Frequenzdomänen-Bildes (**Ba**). Der Wärme-Farbwert des hervorgehobenen Signalpunktes in **Bb** entspricht der in **Bc** auf der Y-Achse dargestellten Stärke der Frequenzkomponente. (Bild zur Verfügung gestellt von Dr. Qinghai Tian)

unterbelichtete Aufnahmen dagegen wurden ausgeschlossen, wie auch Zellen, deren Erscheinungsbild bei Betrachtung auf einen baldigen Zelltod hindeutete, erkennbar an Krümmung, Blasenbildung und Abrundung.

In der folgenden Analyse der einzelnen Bilder mit der speziell dafür geschriebenen Anwendung der Software MatLab wurde durch Markierung eines Bildbereiches von Interesse („Region of interest“, ROI) sichergestellt, dass die Auswertung auf die relevanten Bereiche der einzelnen Zelle beschränkt wurde. Dazu wurden Zellanteile, die sich nicht genau im Fokus befanden, oder die nicht eindeutig derselben, oder einer möglicherweise darunter oder darüber liegenden Zelle zuzuordnen waren, nicht mit einbezogen. Es wurde dabei darauf geachtet, offensichtliche Artefaktbereiche, die durch leichte Überbelichtung entstanden oder Detritus, der am Zellrand anhaftet, aus der ROI ausschließen, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Dazu wurde, unter Anwendung der oben genannten Kriterien, eine möglichst große Region der Zelle in der MatLab-Programmierung markiert.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels einer MatLab-Programmierung, die eine Form der Fourier-Transformation („fast Fourier transformation“, FFT) nutzt, um die Regelmäßigkeit der fluoreszierenden T-Tubuli zu bestimmen. Dabei wird das Fluoreszenzbild in seine Raumfrequenzen zerlegt. Die Stärke der Raumfrequenzen ist einheitenlos; je höher der Betrag einer bestimmten Raumfrequenz ist, desto größer dieser Wert. Abbildung **17Ab** zeigt eine zwei-

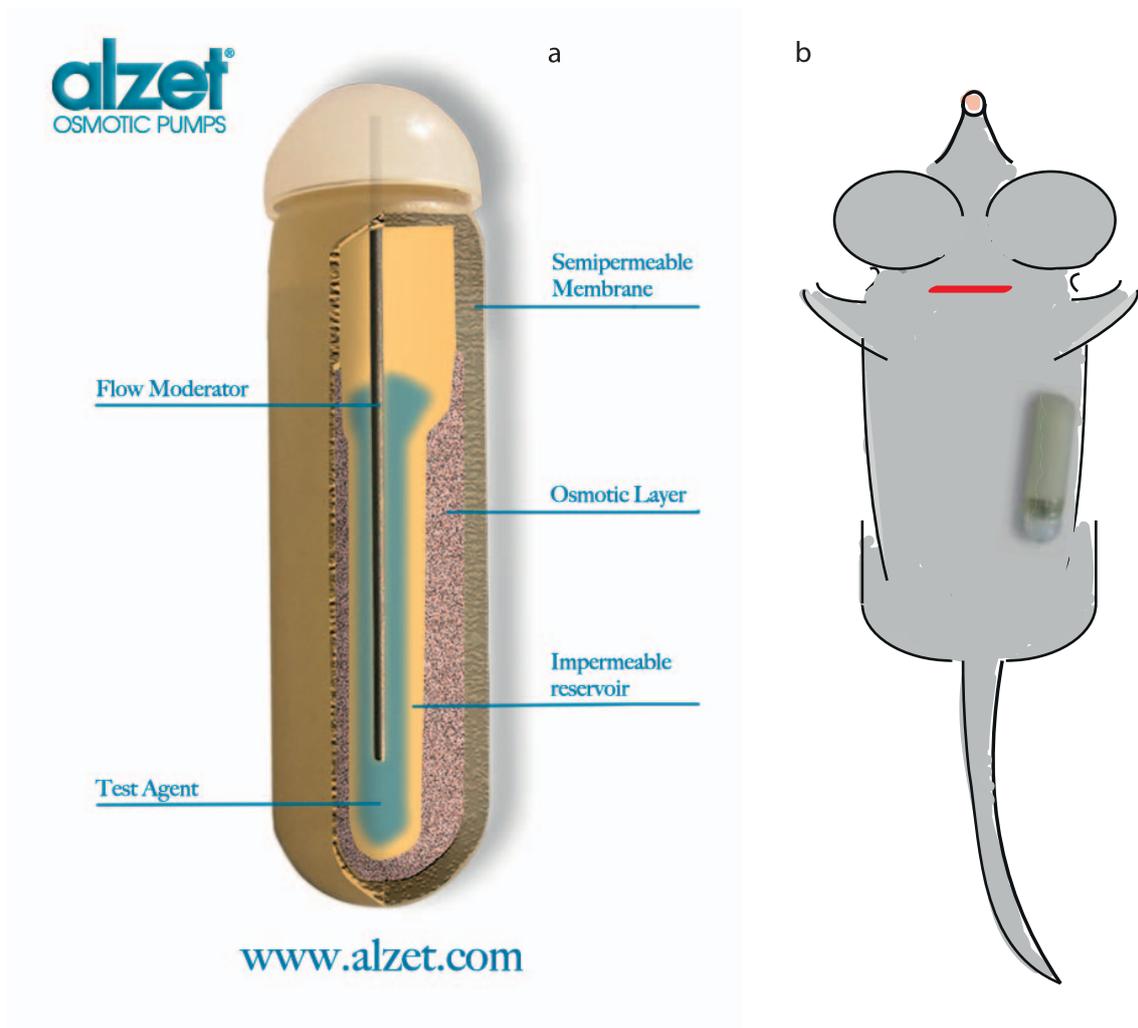


Abbildung 18: Osmotische Minipumpe: a zeigt den Aufbau der Pumpe im Schema; in blau ist die Flüssigkeit im Reservoir dargestellt, in gelb das Reservoir, das wiederum von einer Osmoseschicht umgeben ist. Umhüllt wird der Körper der Pumpe von einer semipermeablen Membran. Im Reservoir ist ein Auslass (grau) für den Wirkstoff eingelassen, in cremeweiß ist oben die Kappe mit der Auslassöffnung dargestellt. Mit der Zeit im Tierkörper dringt freies Wasser durch die äußere Membran in die osmotische Schicht ein, kann aber nicht mehr heraus. Dadurch baut sich langsam ein Druck auf die Flüssigkeit im Reservoir auf, die so gleichmäßig durch den Auslass fließt, und derart in den Körper der Maus gelangt. b zeigt die Platzierung der Pumpe im Tier, an der Flanke, den Auslass vom operativen Zugang zur subkutanen Tasche (rot) abgewendet. Das Größenverhältnis ist zutreffend. Die Pumpen-Bilder stammen von der Internetseite des Herstellers, mit freundlicher Genehmigung: <http://www.alzet.com>

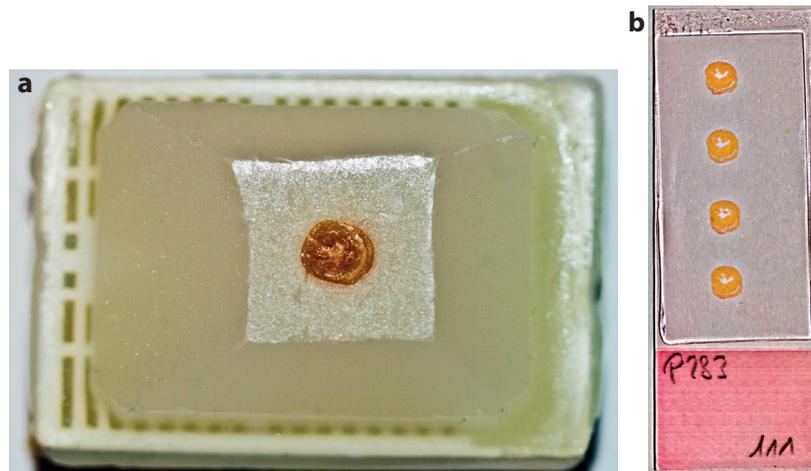


Abbildung 19: Anfertigung histologischer Präparate: In **a** ist der ausgehärtete Paraffinblock auf einem weißen Plastik-Träger mit im Paraffin zentral eingebettetem Herzen zu sehen. In **b** sind vier Schnitte dieses Herzens auf dem Objektträger zu erkennen, bereits mit Pikrosiriusrot gefärbt. Der bei mikroskopischer Betrachtung hinsichtlich Färbung und Präparation beste der vier Schnitte wurde für die Messung ausgewählt. Die Beschriftung zeigt die individuelle Nummer der Maus, von der das Herz stammte (P283) und die Nummer des Objektträgers (111).

krinsäure (Polysciences Inc, Eppelheim, Deutschland) bei einem pH-Wert von 2,0 gefärbt. Es folgte eine Waschung in 0,01 mol Salzsäure (HCl), dann wieder eine Entwässerung in obiger Alkoholreihe, und danach einmalig für wieder drei Minuten Xylol. Das anschließende Eindecken der Schnitte diente dem Luftabschluss, es verlängerte so die Haltbarkeit der Präparate. Hierzu wurde, vor Aufbringen eines Deckgläschens, Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetropft, dann das Deckgläschen vorsichtig luftblasenfrei aufgelegt. Abschließend konnte das Entellan noch bei Raumtemperatur aushärten. Ein derart gefärbter und eingedeckter Schnitt ist in Abbildung **19b** gezeigt.

Es wurden aus den verfügbaren Schnitten pro Herz jeweils zwei Objektträger ausgewählt und gefärbt. So gab es letztendlich acht einzelne gefärbte Herzschnitte eines Herzens. Da jeweils 20 Präparate in einem speziellen Halter für die Objektträger auf einmal gefärbt werden konnten, war die Färbung der Schnitte untereinander vergleichbar.

3.15 Polarisationsmikroskopie am histologischen Schnitt

Aus den acht verfügbaren gefärbten Schnitten je Herz wurde der am besten präparierte Schnitt für die Aufnahmen zur Kollagenquantifizierung ausgewählt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Gewebe nicht eingerissen, oder übereinander gefaltet war, dass möglichst keine Bereiche mit Anzeichen von Austrocknung zu erkennen waren, und wenig oder gar keine Blutreste

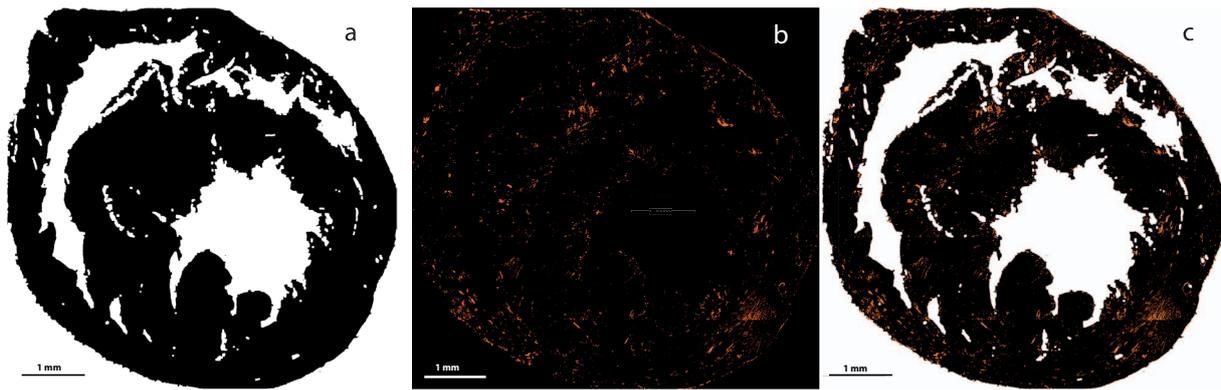


Abbildung 20: Prinzip der Messung mittels Polarisationsmikroskopie: a zeigt die gesamte Gewebefläche des Herzens, in einem binären Bild. Das Herzgewebe ist schwarz, der Hintergrund weiß. b zeigt das durch Kollagen modulierte polarisierte Licht in der Herzfläche in rot. c zeigt schematisch die Kombination aus beiden Bildern.

Auswertung der polarisationsmikroskopischen Bilder

Die Auswertung der so generierten Aufnahmen erfolgte mit dem Bildbearbeitungs- und Auswertungsprogramm „Image J“ [113]. Es wurde hierzu das Polarisationsbild und das Weißlicht-Bild genutzt. Die 100 Einzelbilder beider Aufnahmen (in Durchlicht und in den Polarisationsstellungen) wurden bereits von der Aufnahme-Software zu einem Gesamtbild kombiniert. Dann wurde zuerst das gesamte Herzgewebe als „Grundfläche“ der späteren Auswertung dargestellt. Dazu wurde an dem Durchlicht-Bild ein Grenzwert („Threshold“) gesetzt, bei dem das Herz möglichst gleichmäßig als Gewebefläche dargestellt wurde, bei dem also wenig dunkle Pixel im Herzgewebe vorkommen. Andererseits sollen gleichzeitig möglichst wenig helle Pixel im Hintergrund des Bildes erkennbar sein. Der nach diesen Kriterien ausgewählte Grenzwert musste dabei manuell an jedes Bild angepasst werden. Nun wurde dieses Bild binärisiert, und dann durch die Operationen „Dilate“ und „Erode“ noch Artefaktpixel in der Herzfläche eradiziert. Im Folgenden wurde eine ROI um möglichst viel Herzgewebe markiert und deren Bildkoordinaten gespeichert. Die Nutzung von ROI's anstelle der Markierung des gesamten Herzgewebes war hier nötig, da die folgende Untersuchung mittels polarisierten Lichtes sehr sensibel auf Artefakte im histologischen Schnitt durch Einbettung, Schneiden oder Färbung und Fixierung reagiert. Offensichtlich falsch-positive Bereiche konnten so ausgeschlossen werden.

Als nächstes wurde dann das Polarisationslichtbild bearbeitet. Auch hier wurde zuerst der Threshold manuell so gesetzt, dass das in der Polarisation leuchtende Kollagen klar sichtbar wurde, aber ohne zu große Artefaktanteile oder Hintergrundrauschen im Bild. Die individuelle manuelle Einstellung war dabei wichtig, da ja zuvor auch die Einstellung des Ablenkwinkels

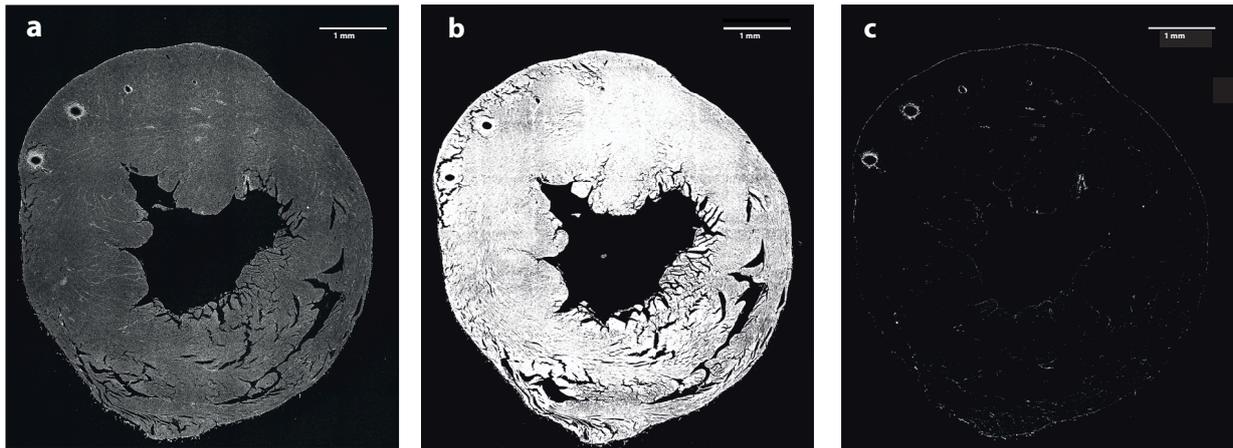


Abbildung 21: Prinzip der Auswertung der histologischen Schnitte: Ein histologischer Schnitt eines Herzens, aufgenommen mit dem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop LEICA TCS SP5, unter Verwendung von Licht der Anregungswellenlänge 543 nm, eine Emission ab 633 nm und einem 20x Objektiv. Größenverhältnisse sind durch die Skala links oben angegeben. **a:** Die noch unbearbeitete Aufnahme in Graustufen; der Hintergrund zeigt vernachlässigbare Fluoreszenz, ein Großteil des Herzgewebes eine Fluoreszenz mittlerer Intensität, das aber von Bereichen deutlicher Fluoreszenz durchzogen wird, insbesondere in der Umgebung von Gefäßen. Aus **a** wurden dann die beiden folgenden Bilder erstellt: **b:** Ein binäres Bild des Herzgewebes, der Grenzwert für die Darstellung eines Bildpunktes als „weiß“ lag bei einem Grauwert von 400 in **a**; **c:** Ein zweites binäres Bild, hier betrug der Grenzwert für die weiße Darstellung eines Bildpunktes einen Grauwert von 1300 in **a**. Aus **b** und **c** lässt sich der prozentuale Anteil des Picosiriusrot-gefärbten Kollagens am gesamten Herzgewebe berechnen.

wurden die Teilbilder wieder zu einem gemeinsamen Bild zusammengefügt. Dieses Bild entspricht der Darstellung in Abbildung 21a. Danach wurde auf dem Bild das Herzgewebe als ROI markiert und gespeichert. Dabei konnten offensichtliche Artefakte, sofern vorhanden, noch ausgeschlossen werden. Daraufhin wurde zunächst ein unterer Helligkeits-Grenzwert festgelegt, der möglichst alles sichtbare Herzgewebe einschloss und gegen den Bildhintergrund abgrenzte. Nach Festsetzen dieses Grenzwertes in der Software („Threshold: 400“) wurde das entstehende Bild der Herzgrundfläche in ein binäres Bild umgewandelt; so konnten alle zur Grundfläche des Herzschnittes gehörenden, nun weißen Pixel innerhalb der Bildregion von Interesse in der Gesamtanzahl erfasst werden. Dieser Stand ist in Abbildung 21b zu sehen.

Danach wurde der Grenzwert im gleichen Ausgangsbild angehoben („Threshold: 1300“), zu einer Schwelle, ab der nur noch Pixel erfasst wurden, die durch die Fluoreszenz des Siriusrot im Bild einen deutlich höheren Helligkeitswert aufwiesen, als das übrige kardiale Gewebe und der Bildhintergrund. Die so noch messbar fluoreszierenden Bereiche sind in Abbildung 21c zu sehen. Die beiden Grenzwerte wurden auf alle Herzen der Untersuchung angewendet, da sowohl die Färbung, als auch die Einstellungen am Konfokalmikroskop identisch waren. Die

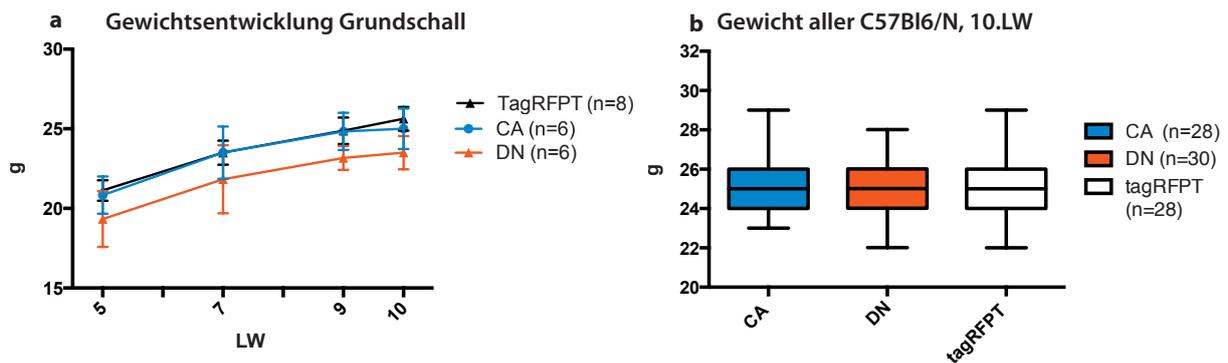


Abbildung 22: Körpergewichte der Versuchstiere C57Bl6/N: a: Entwicklung der Körpergewichte der Tiere in der ersten Versuchsgruppe mit C57Bl6-Tieren (siehe Abschnitt 4.1.3), in Lebenswoche 5, 7, 9 und 10. b: alle C57Bl6/N-Tiere des gesamten Projektes, die in der 10. Lebenswoche gewogen wurden. Gruppe DN in rot, Gruppe CA in blau, Gruppe TagRFPT in schwarz/weiß. In den Klammern hinter der Legende ist jeweils die in die Auswertung eingegangene Tierzahl n aufgeführt.

4.1.2 Ergebnis der Fluoreszenzmessung an den Organen

Diese Untersuchung erfolgte, um die Expression der transduzierten Gene auf Organebene zu analysieren. Hierbei soll insbesondere die Art und Intensität der kardialen Expression adressiert werden. Zudem konnte auch die Herzspezifität der Transduktion gegenüber anderen ausgewählten Organen untersucht werden. Genutzt wurden hierfür die zu Anfang des Projektes neonatal transduzierten FVB/N-Mäuse.

Zunächst wurde die optimale Belichtungszeit für eine detaillierte Darstellung der TagRFPT-Expression ermittelt. Diese lag für die Vorhöfe bei 10 ms, für den dickeren Ventrikel bei 21 ms.

In den Abbildungen 23, 1-3a/b zeigten sich die fluoreszierenden Areale scharf abgegrenzt vom umgebenden Gewebe. In den Vorhöfen waren die fluoreszierenden Bereiche gleichmäßig über das gesamte Gewebe verteilt. Im Ventrikel war ebenfalls eine Fluoreszenz über das gesamte Gewebe zu beobachten, jedoch erscheinen die lumennahen, endokardialen Bereiche stärker signalgebend, als die äußeren Bereiche des Myokards. Dies liegt bei genauer Betrachtung an häufigeren und dichteren Bereichen mit intensiver Fluoreszenz in der Nähe des Lumens.

Dann wurde die Fluoreszenzintensität transduzierten Gewebes mit der Fluoreszenz in nicht transduzierten Tieren verglichen. Dazu wurden die Atrien einer mit TagRFPT transduzierten Maus mit den Atrien einer Maus verglichen, die lediglich mit NaCl injiziert wurde, siehe Abbildung 23, Bild 4a/b und 5a/b. Bei einer Belichtungszeit von 10 ms war dabei die Fluoreszenz des rechten und linken Vorhofes der TagRFPT-Maus bei einer Anregungswellenlänge von 555

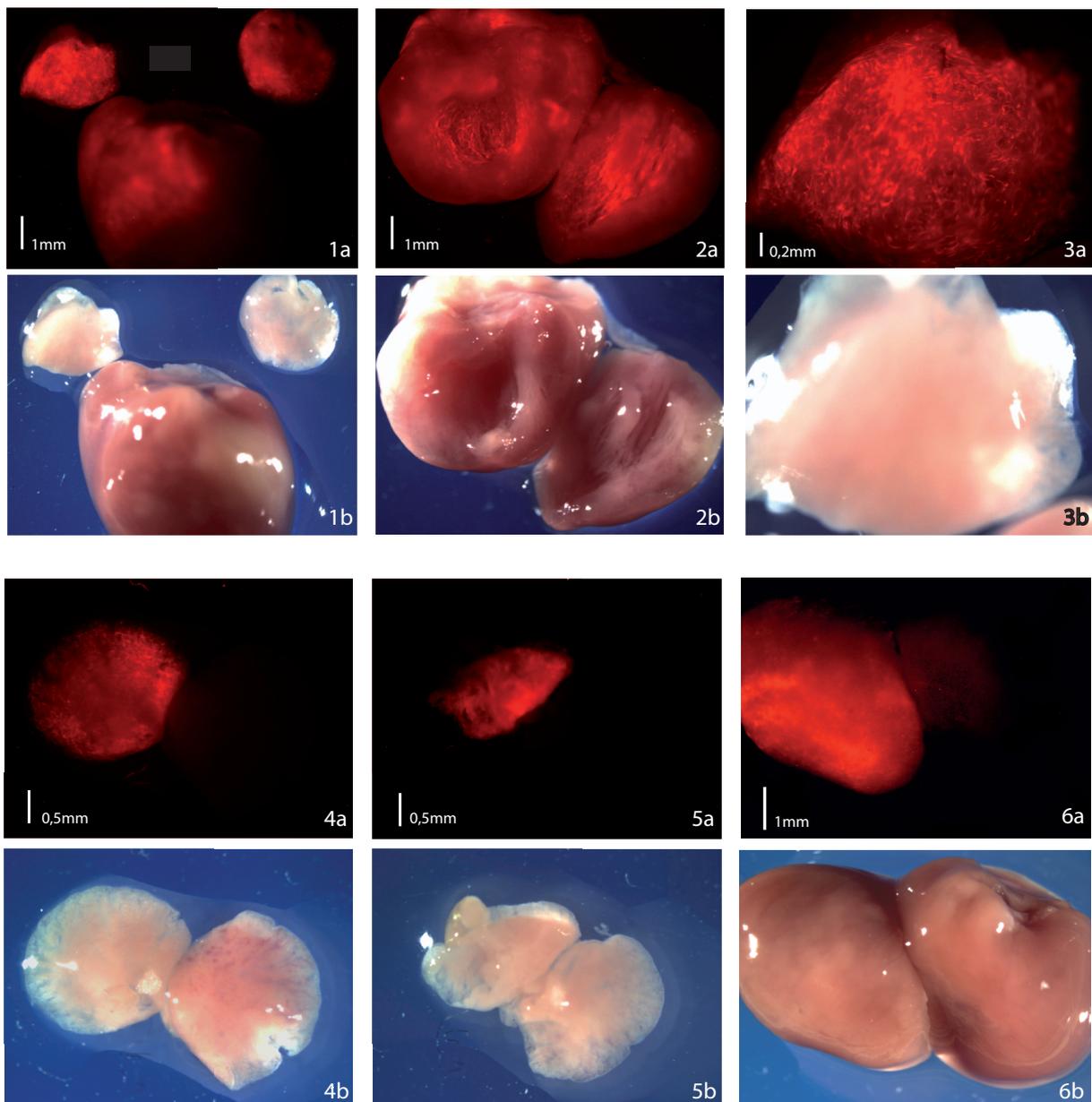


Abbildung 23: Fluoreszenz Atrien und Ventrikel: Die Bilder gleicher Nummer zeigen jeweils ein Präparat einer mit AAV-TagRFPT neonatal transduzierten FVB/N-Maus, (16. Lebenswoche) an, von dem immer in **a** die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Anregungswellenlänge 555nm, Emissionswellenlänge 584nm), und in **b** die dazu passende Weißlichtaufnahme kombiniert wurde. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzdarstellung betrug 10ms, nur in Bild **2a** 21ms. **1a/b** Der Ventrikel und die beiden bereits abgetrennten Vorhöfe, alle Bestandteile des Herzens zeigen Fluoreszenz. **2a/b**: Eröffneter Ventrikel, es sind diskrete leuchtende Bereiche sichtbar, vor allem im Inneren. **3a/b**: Vorhof rechts, stärker vergrößert, Belichtung: Die fluoreszenten Bereiche sind gleichmäßig verteilt, und deutlich abgegrenzt. **4a/b**: rechter Vorhof, von dem TagRFPT-transduzierten Tier (linkes Präparat), und einem mit NaCl-Vehikel injiziertem Kontrolltier (rechtes Präparat). Die Kontrolle des NaCl-injizierten Tieres zeigt keine Fluoreszenz. Dies gilt analog für die linken Vorhöfe in Bild **5a/b**, und die Ventrikel in **6a/b**.

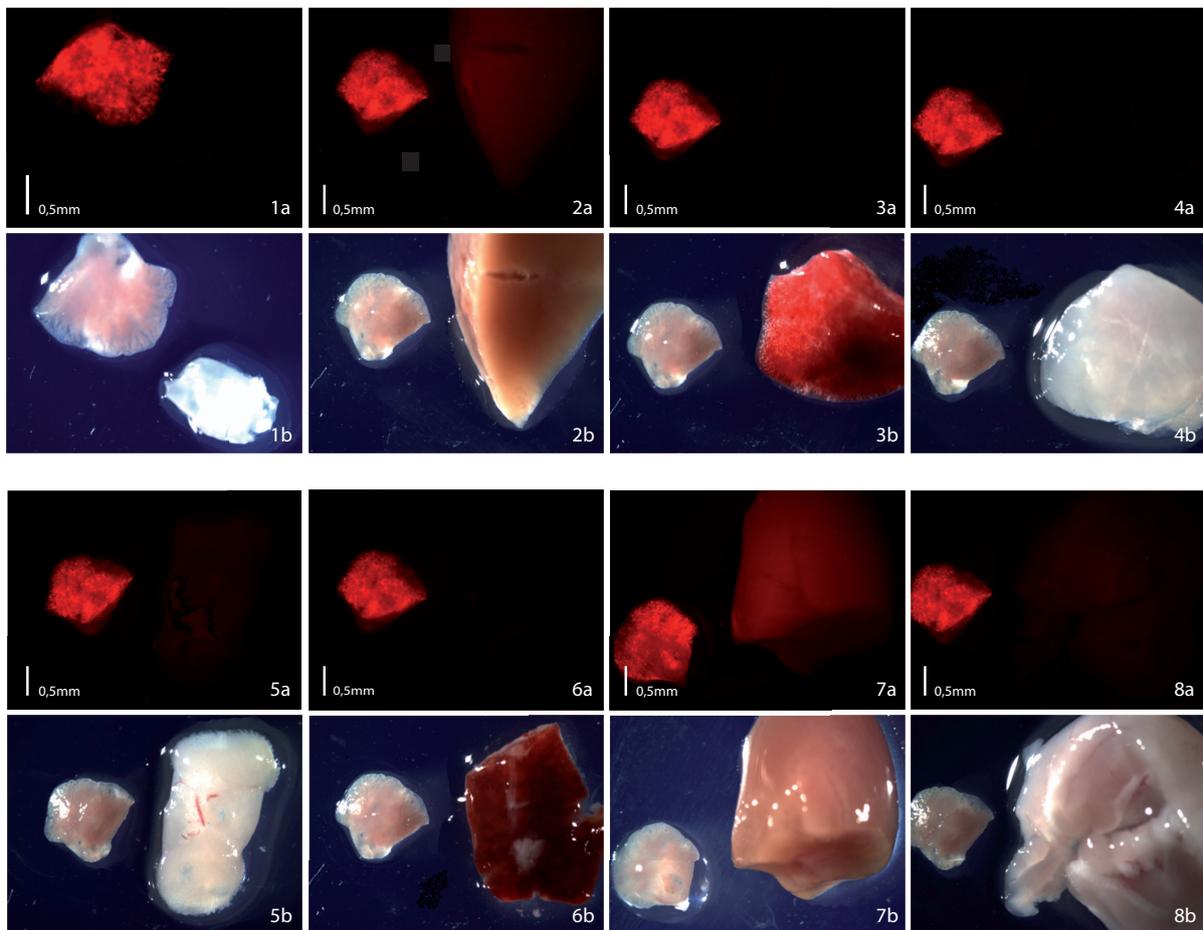


Abbildung 24: Fluoreszenz andere Organe: Abgebildet ist jeweils der rechte Vorhof aus 23 sowie ausgewählte Organe, teilweise oder vollständig. In **a** sind beide Präparate jeweils in der Fluoreszenzmessung (Belichtungszeit 10ms, Anregungswellenlänge 555nm, Emissionswellenlänge 584nm) dargestellt, in **b** im Weißlicht. Eine Fluoreszenz ist in Leber (**2a**) und Niere (**7a**) schwach, dennoch klar erkennbar; eine noch schwächere Fluoreszenz ist in Gehirn (**8a**) und Darm (**5a**) sichtbar. In Aorta (**1a**), Lunge (**3a**), Skelettmuskel (**4a**) und Milz (**6a**) ist eine spezifische Fluoreszenz nicht auszumachen.

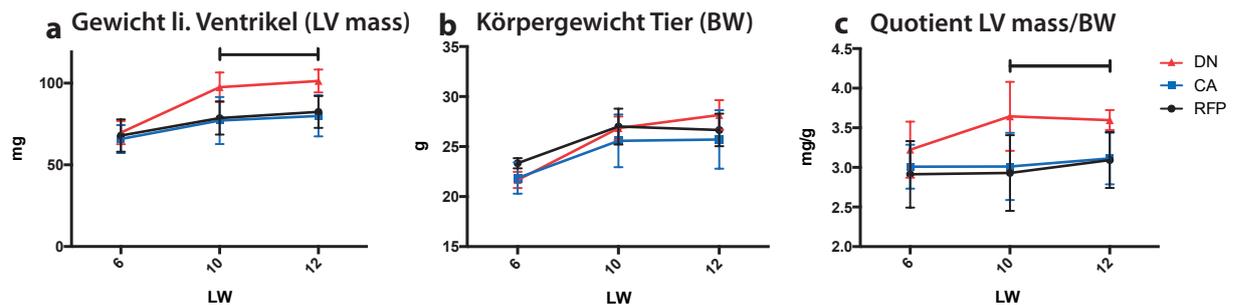


Abbildung 25: Entwicklung der normalisierten linksventrikulären Masse über die Zeit in neonatal transduzierten, männlichen FVB/N-Mäusen: Messwerte aus Lebenswoche 6, 10 und 12 der Tiere. **a:** Entwicklung der aus der Echokardiographie errechneten linksventrikulären Masse, LV mass, in mg **b:** Entwicklung der Körpergewichte der Tiere, in g; **c:** die Entwicklung des relativen linksventrikulären Gewichtes, normiert auf das Körpergewicht, in mg/g. In rot ist der Verlauf der Gruppe DN abgebildet, in blau der der Gruppe CA, und in schwarz der Verlauf der Gruppe TagRFPT. Der schwarze Balken oberhalb der Graphen zeigt an, ab wann das gemessene, bzw. das normierte linksventrikuläre Gewicht in der Gruppe DN signifikant größer war, als das der anderen Gruppen. Die Tierzahl betrug in der Gruppe DN n=6, CA n=7, TagRFPT n=6 Tiere; LW = Lebenswoche .

Entwicklung eines kardiologischen Phänotypes in C57Bl6/N nach Transduktion in der dritten Lebenswoche

Wegen der schlechten Zellisolationen aus den FVB/N-Tieren wurde die Mauslinie gewechselt; das Tiermodell bestand ab der folgenden Untersuchung aus männlichen C57Bl6/N-Mäusen, die am 21. Lebenstag transduziert wurden. Es handelte sich zunächst um die initiale echokardiographische Untersuchung zur Bestimmung des Messzeitpunktes für die folgenden Teile des Projektes. Die Untersuchung wurde an Tieren aller drei Transduktionsgruppen durchgeführt, in der 5., 7., 9. und 10. Lebenswoche. Es wurden 6 Tiere der Gruppe DN, 6 Tiere der Gruppe CA, und 8 Tiere der Gruppe TagRFPT in die Auswertung inkludiert.

In den direkt gemessenen Parametern (IVS, LVID, LVPW, LVAW, MVE, MVA, IVRT) zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. In den morphologischen und funktionellen Parametern, die daraus berechnet wurden, ergab sich das gleiche Bild. Einzig die auf das Körpergewicht der Tiere normierte linksventrikuläre Masse in der Gruppe DN nahm gegenüber beiden anderen Gruppen zu. Zu der Gruppe CA zeigte sich bereits in der siebten Lebenswoche ein signifikanter Unterschied, und ab der neunten Woche auch zur Gruppe TagRFPT (siehe Abbildung 26a) .

Die Normierung der linksventrikulären Masse auf das Körpergewicht ist dabei bedeutsam, da, wie bereits beschrieben, die Gruppe DN vom ersten Messzeitpunkt an ein durchschnittlich

geringeres Körpergewicht aufwies als die anderen Tiergruppen.

Das Wiegen der Tiere erfolgte unmittelbar vor der Ultraschalluntersuchung.

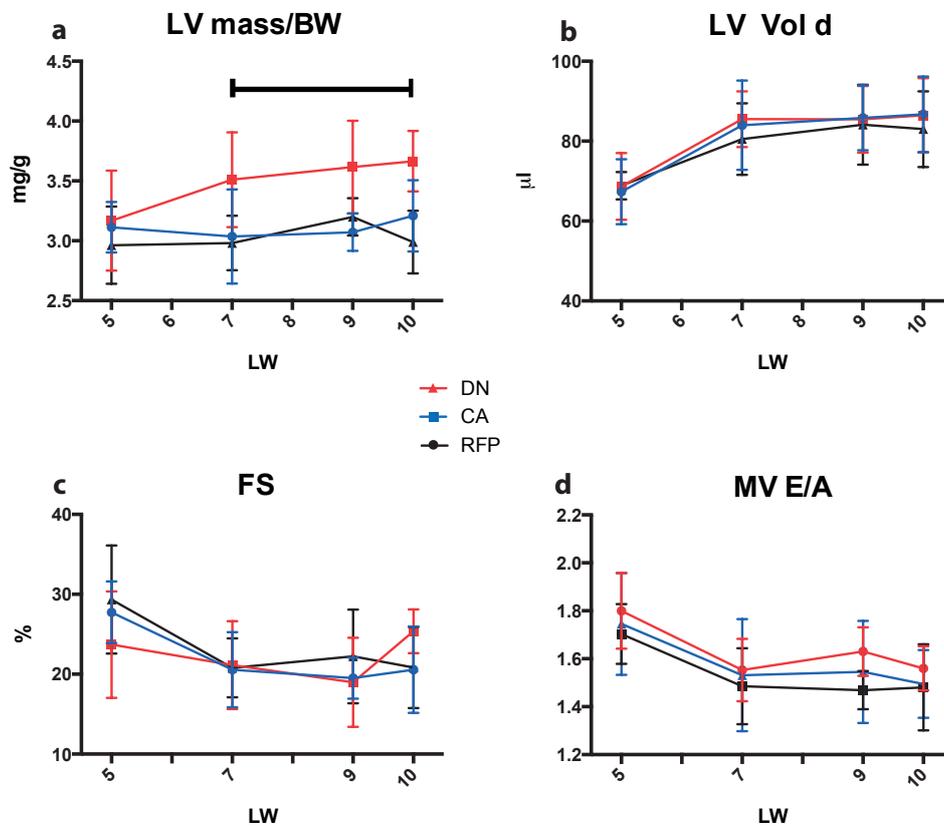


Abbildung 26: Entwicklung der echokardiographischen Parameter in C57Bl6/N-Tieren: Entwicklung wichtiger echokardiographischer Parameter in den mit 21 Tagen transduzierten C57Bl6/N-Mäusen. Betrachtet wird der Zeitraum über die 5., 7., 9. und 10. Lebenswoche. **a:** Entwicklung der LV mass/BW, in mg/g; **b:** Entwicklung des diastolischen Ventrikelvolumens (LV Vol d), in µl. **c:** FS, in %; **d:** MV E/A-Quotient des linksventrikulären Bluteinstromprofils. Der schwarze Balken über den Graphen bezeichnet den Zeitraum, ab dem eine Gruppe (hier DN) einen signifikant höheren Wert erreicht, als mindestens eine der beiden anderen Gruppen.

In der Abbildung 26 sind zudem auch die Graphen zum enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels LV Vol d in **b**, zur relativen Ventrikelverkürzung FS in **c**, und zum Verhältnis der E- zur A-Welle, MV E/A, in **d** dargestellt. In diesen zur Charakterisierung des kardialen Phänotypen bedeutsamen Parametern zeigten sich keine Besonderheiten einer Gruppe über den Beobachtungszeitraum.

Detaillierte Analyse des Phänotypes in der 10. Lebenswoche.

Für weitergehende Untersuchungen sollte ein Zeitpunkt nach der Transduktion gewählt werden, zu dem die bisher gefundenen Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant ausgeprägt

Tabelle 7: Echokardiographische Parameter in der siebten Woche nach Transduktion: Zu sehen ist jeweils der gemessene Parameter mit seiner Einheit, und der dazugehörige Wert der jeweiligen Untersuchungsgruppe, zuzüglich SEM. Die Spalten sind in der schwarzen Kopfzeile entsprechend beschriftet. Die Anzahl der Tiere je Gruppe ist direkt unter dem Gruppennamen aufgeführt. Gleiche Symbole kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Unit	CA n=7	DN n=10	tagRFPT n=8
Mittelwert ± SEM				
BW	g	25.00±0.44	24.20±0.39	25.63±0.26
HF	bpm	389.9±16.10	397.6±10.17	381.4±17.35
IVSd	mm	0.64±0.015	0.68±0.011	0.65±0.017
IVSs	mm	0.84±0.041	0.90±0.034	0.86±0.038
LVIDd	mm	4.33±0.086	4.35±0.060	4.25±0.096
LVIDs	mm	3.47±0.144	3.37±0.090	3.38±0.144
LVPWd	mm	0.62±0.026	0.68±0.024	0.63±0.024
LVPWs	mm	0.81±0.042	0.92±0.026	0.86±0.048
LVAWd	mm	0.60±0.017	0.65±0.023	0.61±0.024
LVAWs	mm	0.84±0.050	0.90±0.035 ⁺	0.86±0.032 ⁺
LV Vol d	μl	84.98±3.89	87.07±2.97	80.37±4.07
LV Vol s	μl	50.69±4.97	47.40±2.98	47.02±4.61
EF	%	41.15±3.42	45.90±2.21	42.47±3.12
FS	%	20.12±1.92	22.85±1.30	20.83±1.79
LV mass	mg	79.00±3.30	85.47±1.65	76.48±1.83
LV mass /BW	mg/g	3.16±0.114 [*]	3.53±0.095 ⁺	2.99±0.093 ⁺
MV E	mm/s	910.0±62.21	911.6±24.69	930.9±43.49
MV A	mm/s	600.7±45.84	570.1±20.89	631.7±27.69
MV E/MV A		1.53±0.061	1.61±0.034	1.48±0.064
IVRT	ms	14.46±0.68	15.85±0.89	17.88±1.40
MV decel	mm/s ²	-43529±6452 [*]	-26471±289 ⁺	-36959±2782 ⁺
MV decel t	ms	22.17±2.47 [*]	36.66±3.44 ⁺	24.95±1.91 ⁺

In der Schallkopfposition des Vierkammerblickes wurde mittels des Pulswellendopplers das Geschwindigkeitsprofil des Blutflusses durch die Mitralklappe über die Zeit gemessen. Jeweils ein beispielhafter Geschwindigkeitsverlauf über die Zeit ist je Untersuchungsgruppe in Abbildung 28 zu sehen. Bei der Messung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Spitzengeschwindigkeiten der beiden Füllungswellen (MV E, MV A) zwischen den Gruppen. Setzt man nun jeweils beide Wellen einer Maus ins Verhältnis zueinander, ergibt dies den Wert MV E/A. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied, ebensowenig wie beim Vergleich der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT).

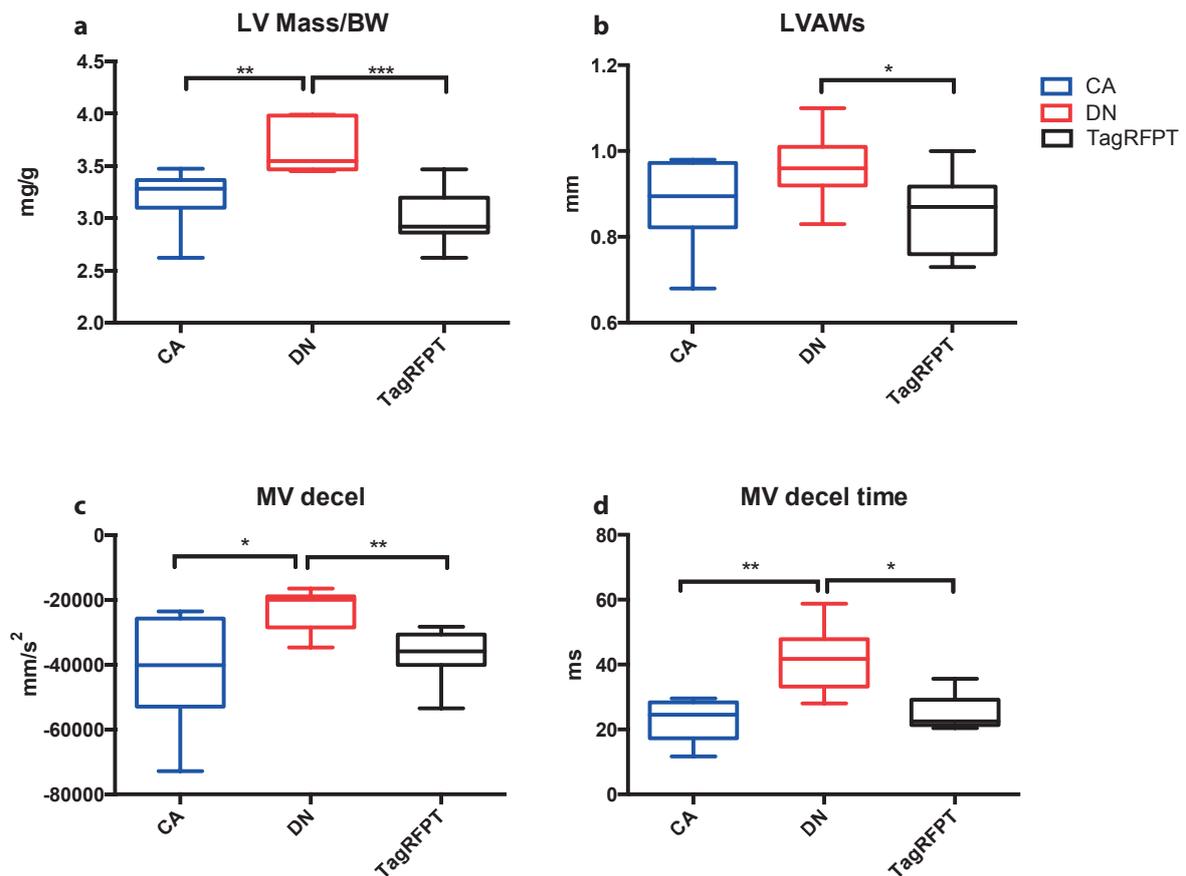


Abbildung 27: Echokardiographische Grundcharakterisierung in der 10. Lebenswoche: Ergebnis der Echokardiographie: rot = DN (n = 10), blau = CA (n = 7), schwarz = TagRFPT (n = 8).
a: Die linksventrikuläre Masse nach Normalisierung auf das Körpergewicht der Tiere (LV mass/BW), in mg/g **b:** Die Dicke der linksventrikulären Vorderwand (LVAWs) in mm **c:** Die Verlangsamung der E-Welle (MV decel) in mm/s²; **d:** Die für die Geschwindigkeitsabnahme benötigte Zeit (MV decel time) in ms.

Die letzte Messung, die im Vierkammerblick getätigt wurde, war die der Geschwindigkeitsabnahme der frühen Füllungswelle, der E-Welle („Early filling“), und die Zeit, die zwischen der erreichten Spitzengeschwindigkeit, und dem Endpunkt der Geschwindigkeitsabnahme (bis zum Beginn der atrialen Füllungswelle), verging. Hier zeigte sich eine deutliche Verlängerung dieser Zeit in der Gruppe DN gegenüber sowohl der Gruppe CA ($p = 0,01$) und TagRFPT ($p = 0,009$). Dies ist in Abbildung 27d dargestellt. Die benötigte Zeit für die Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit war dabei in der Gruppe DN verlängert (gegenüber der Gruppe CA und der TagRFPT-Kontrolle). Die Einstromgeschwindigkeit der E-Welle selbst nahm dabei in DN deutlich langsamer ab als in der Kontrollgruppe. So zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen DN und TagRFPT ($p = 0,02$), dargestellt in Abbildung 28c.

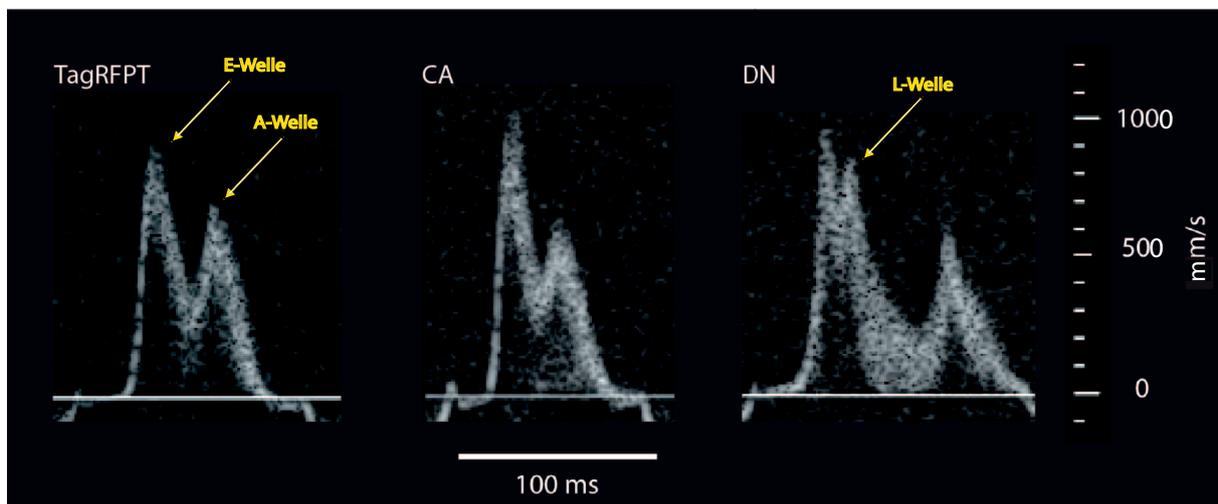


Abbildung 28: Auszug aus der PW-Doppler-Messung. PW-Doppler-Profil des Mitralklappen-Bluteinstromes in den linken Ventrikel während einer Dilatation. Die weiße Linie zeigt dabei die Blutflussgeschwindigkeit in mm/s, über die Zeit (in ms). TagRFPT und CA zeigen das für eine physiologische Herzaktion typische Strömungsprofil. E-Welle und A-Welle sind im TagRFPT-Bild mit gelbem Pfeil hervorgehoben. In dem Auszug aus einer charakteristischen Messung der Gruppe DN fällt die zweite Spitze der E-Welle auf, bezeichnet als L-Welle, im DN-Bild ebenfalls durch gelben Pfeil gezeigt.

Hierbei ist insbesondere zu erwähnen, dass die mittlere Herzfrequenz während der Messung zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war. Da die funktionellen Parameter, vor allem die der Mitralklappe, von der Frequenz direkt abhängig sind, ist zur korrekten späteren Beurteilung dieser Parameter eine vergleichbare Herzfrequenz essentiell.

Ein weiterer, jedoch nicht quantitativer Messparameter ist hier zu beachten: In der Gruppe DN trat bei 8 von 10 Tieren eine zusätzliche Geschwindigkeitsspitze im Flussprofil der Mitral-

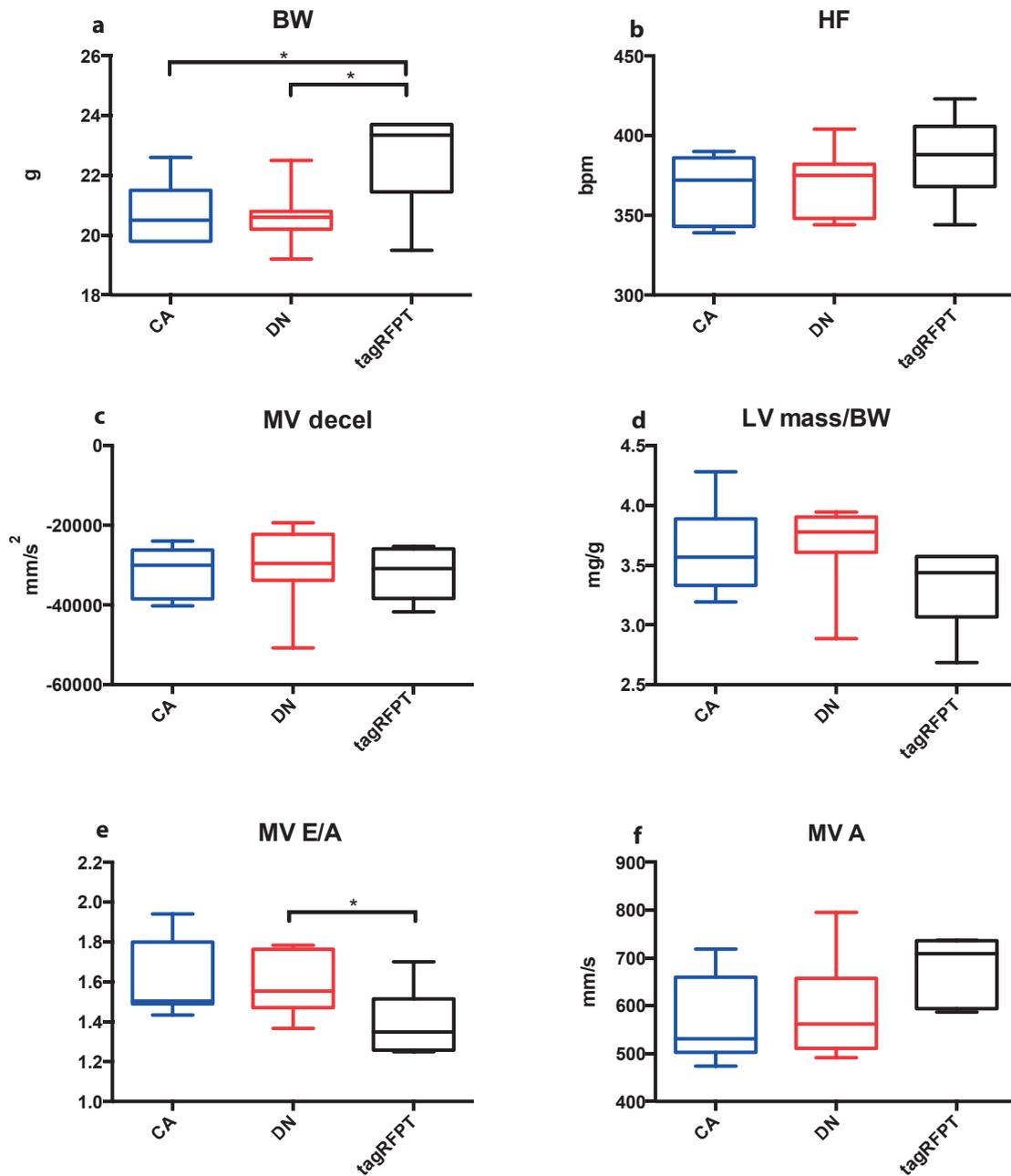


Abbildung 29: Ultraschall der neonatal injizierten C57Bl6/N: Farbcodierung wie in Abbildung 27. **a:** Körpergewicht in g; **b:** Herzfrequenz in Schlägen/Minute (1/min) **c:** Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle, in mm/s²; **d:** Auf das Körpergewicht normierte Masse des linken Ventrikels, in mg/g; **e:** Verhältnis E-Welle zur A-Welle; **f:** Geschwindigkeit der A-Welle, in mm/s.

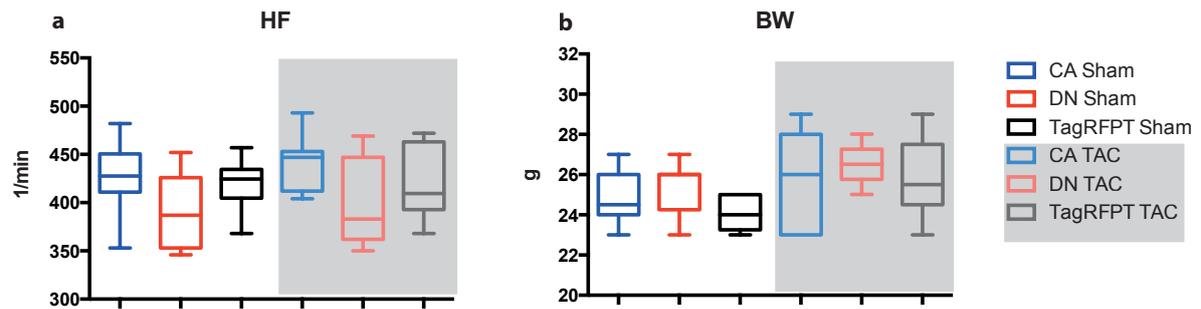


Abbildung 30: Körpergewichte und Herzfrequenz unter Narkose: a: Durchschnittliche Herzfrequenz der Mäuse während der echokardiographischen Untersuchung in Schlägen pro Minute. b: Gewicht der Tiere zum Untersuchungszeitpunkt, in g. Legende: Aufgetragen sind die Werte der Tiere der Gruppe CA (blau), DN (rot), und TagRFPT (schwarz bzw. grau), die Werte der TAC-operierten Tiere sind dabei grau hinterlegt.

Das interventrikuläre Septum:

Die Dicke des interventrikulären Septums zeigte nach der Sham-Operation in der Phase der Diastole eine signifikant größere Dicke in der Gruppe DN, gegenüber CA ($p = 0,0011$) und TagRFPT ($p < 0,0001$), in der Systole war eine signifikant größere Dicke des Septums lediglich zwischen DN und TagRFPT zu messen ($p = 0,0009$). Nach 14 Tagen der TAC-induzierten Hypertrophie-Entwicklung war das Septum in der Diastole in der Gruppe DN signifikant dicker als in der Gruppe CA ($p = 0,0008$) oder TagRFPT ($p = 0,0068$). Innerhalb der Transduktionsgruppen DN, CA und TagRFPT war diastolisch in jeder Gruppe eine signifikante Zunahme dieser Dicke nach Aortenkonstriktion zu beobachten. (DN: $p < 0,0001$; CA: $p = 0,0008$; TagRFPT: $p < 0,0001$). Auch in der Systole bestand diese hypertrophe Zunahme innerhalb der jeweiligen Gruppe (CA: $p = 0,0005$); DN: $p < 0,0001$; TagRFPT: $p < 0,0001$).

Der linksventrikuläre Innendurchmesser:

Bei diesem Messparameter ist erwähnenswert, dass sich in der diastolischen Phase des Herzzyklus in beiden Operationsbedingungen keinerlei Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gab. Ebenso entstanden innerhalb der verschiedenen PKC -Versuchsgruppen keine Unterschiede zwischen den Operationsbedingungen.

In der systolischen Phase des Herzzyklus zeigte sich lediglich eine Zunahme des Innendurchmessers in der Kontrollgruppe der TagRFPT-exprimierenden Tiere nach TAC-Operation gegenüber

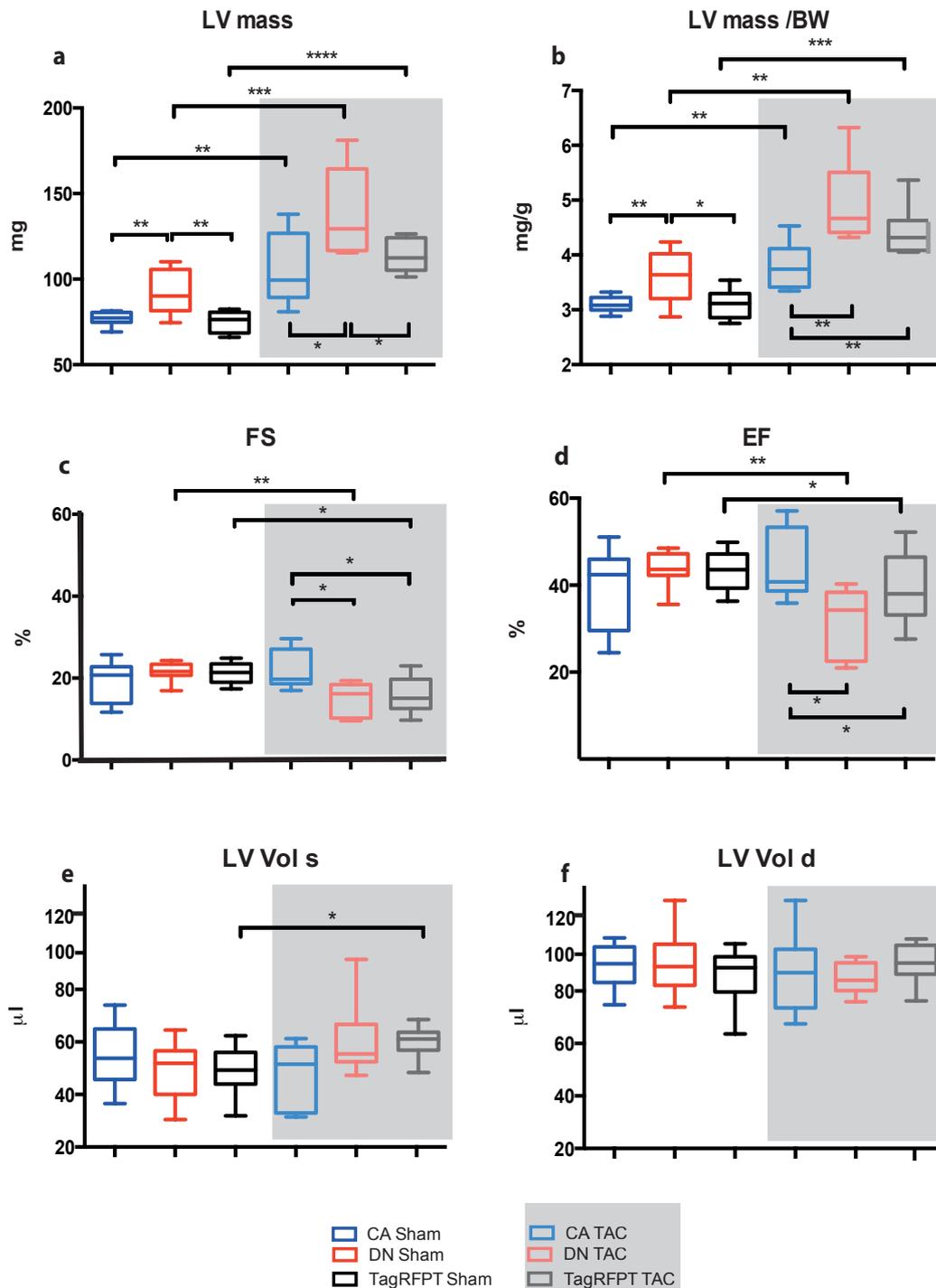


Abbildung 31: Echokardiographische Parameter nach TAC in C57Bl6/N I: Rot = DN (n(Sham) = 8, n(TAC) = 7), blau = CA (n(Sham) = 8, n(TAC) = 7), schwarz = TagRFPT (n(Sham) = 8, n(TAC) = 6); satte Farben ohne Unterlegung für Tiere der Sham-Operation, blassere Farben auf grauer Unterlegung 14 Tage TAC-induzierter Hypertrophie. Signifikante Unterschiede mit Sternen gekennzeichnet. **a:** Linksventrikuläre Masse (LV mass) in mg; **b:** Linksventrikuläre Masse, normalisiert auf das Körpergewicht (LV mass/BW), in mg/g; **c:** Relative Ventrikelverkürzung (FS) in % **d:** Auswurfraction (EF) in % **e:** Systolisches linksventrikuläres Volumen (LV Vol s) in μ l. **f:** Diastolisches linksventrikuläres Volumen (LV Vol d) in μ l

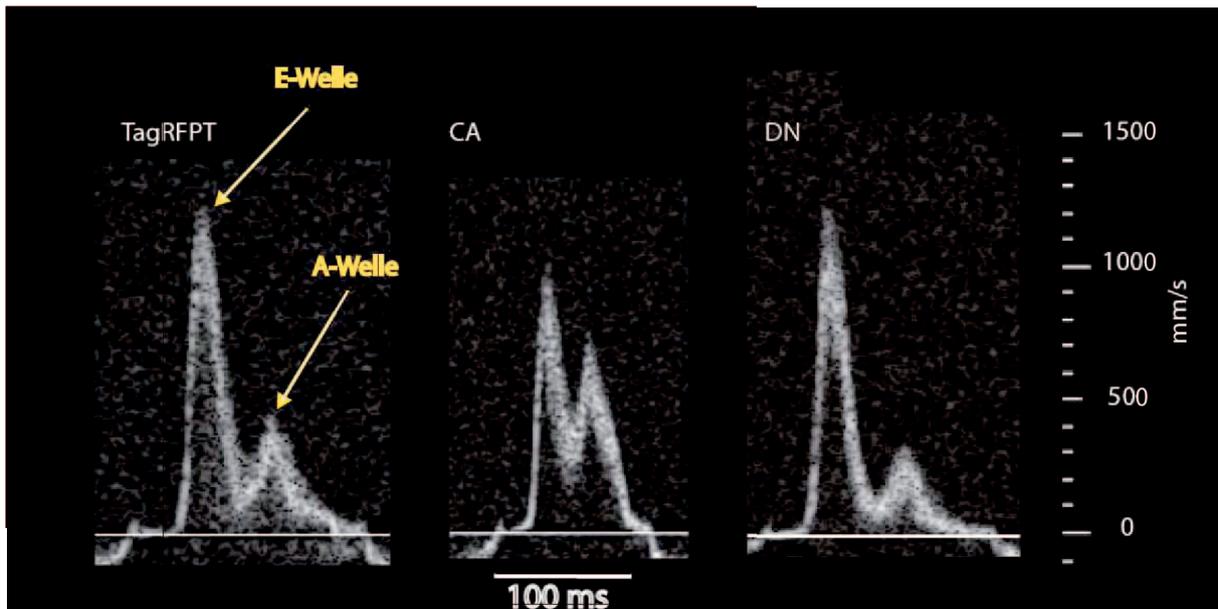


Abbildung 32: Auszüge aus der PW-Doppler-Messung, 14 Tage nach TAC: Typische Beispiele aus Tieren jeder Untersuchungsgruppe. Die Zunahme der Geschwindigkeit E-Welle und Abnahme der Geschwindigkeit der A-Welle in TagRFPT und DN war in einer Maus nach 14 Tagen Hypertrophie zu erwarten. Beide Gruppen verhielten sich hier vergleichbar. In der Gruppe DN war die zusätzliche L-Welle aus der Grunduntersuchung nicht mehr vorhanden. Die Gruppe CA zeigte ein Strömungsprofil, das dem Zustand der Kontrollbedingung nahezu entspricht.

Bei der A-Welle in Abbildung 33b zeigte sich schon in der Situation der Kontrolloperation eine signifikant kleinere Spitzengeschwindigkeit in den Tieren der Gruppe TagRFPT, verglichen mit den Werten der Tiere aus der CA-Tieren ($p = 0,0249$). Beim Vergleich der Expressionsgruppen unter der Bedingung der Aortenkonstriktion, zeigte sich eine Abnahme der Einstromgeschwindigkeit in der Gruppe DN gegenüber CA ($p = 0,013$). Innerhalb der Gruppen entwickelte sich durch Konstriktion, gegenüber der Sham-Operation, nur in der Gruppe DN eine deutliche Abnahme des Wertes der Spitzengeschwindigkeit ($p = 0,0063$).

Bei Betrachtung der isovolumetrischen Relaxationszeit in Abbildung 33d fiel kein signifikanter Unterschied zwischen allen miteinander verglichenen Gruppen auf.

Berechnete Parameter: Das Verhältnis der E-Welle zur A-Welle

Zwischen den Gruppen mit Sham-Operation zeigte sich kein Unterschied im MV E/A-Quotienten (Abbildung 33c). Ebenso entwickelte sich innerhalb der Gruppe CA zwischen den Tieren der Sham-Gruppe und der Konstriktionsgruppe kein Unterschied. Anders bei Vergleich der Operationsbedingungen in den beiden anderen Expressionsgruppen: Hier entwickelte sich sowohl bei DN als auch in der TagRFPT-Kontrollgruppe, durch die Hypertrophieinduktion

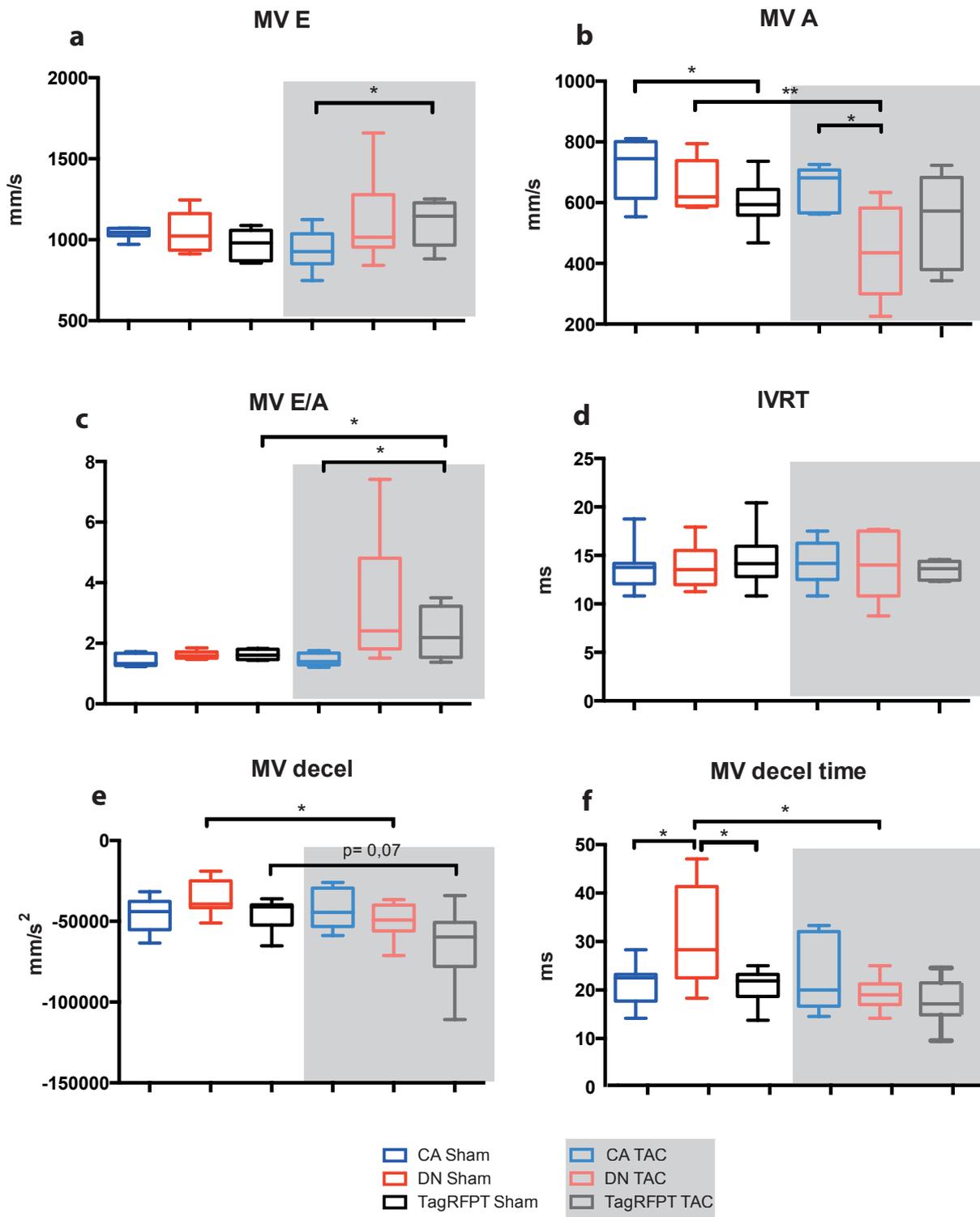


Abbildung 33: Echokardiographische Parameter nach TAC in C57Bl6/N II: PW-Doppler-Untersuchung der Mitralklappe. Farbkodierung und Anzahl der Messwerte wie in Abbildung 31. In **a**: Spitzengeschwindigkeit der E-Welle (MV E) in mm/s. **b**: Spitzengeschwindigkeit der A-Welle (MV A), in mm/s **c**: Quotient der beiden Spitzengeschwindigkeiten der Einstromwellen (MV E/A) **d**: Interventrikuläre Relaxationszeit (IVRT), in ms; **e**: Geschwindigkeitsabnahme der E-Welle (MV decel) in mm/s^2 **f**: Für die Geschwindigkeitsabnahme benötigte Zeit (MV decel time) in ms.

Tabelle 8: Echokardiographische Untersuchung, 14 Tage nach TAC-Operation: Die Tabelle zeigt die gemessenen Parameter samt ihrer Einheit für jede gemessene Gruppe. Dem Mittelwert ist jeweils der SEM beigefügt. Die Tierzahl ist für jede Gruppe angegeben. Die Beschriftung jeder Spalte findet sich in der schwarzen Zeile. Gleiche Symbole kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Unit	CA sham	DN sham	tagRFPT sham	CA TAC	DN TAC	tagRFPT TAC
Mittelwert ± SEM		n=8	n=8	n=8	n=7	n=7	n=6
BW	g	24.88±1.356	25.38±1.302	24.13±0.835	25.86±2.340	26.50±1.049	25.83±2.041
HF	bpm	426.0±13.34	390.8±13.51	419.6±9.31	441.4±11.21	400.4±17.62	420.0±15.92
IVSd	mm	0.61±0.011 ^{•+}	0.69±0.017 ^{•+*}	0.59±0.010 ^{•*}	0.78±0.041 [•]	0.96±0.045 [•]	0.77±0.030 [•]
IVSs	mm	0.81±0.028 [•]	0.87±0.015 ^{•*}	0.78±0.016 ^{•*}	1.03±0.042 [•]	1.15±0.061 [•]	0.98±0.055 [•]
LVIDd	mm	4.42±0.060	4.45±0.090	4.36±0.086	4.36±0.127	4.42±0.099	4.46±0.071
LVIDs	mm	3.52±0.263	3.43±0.331	3.44±0.279 [•]	3.40±0.366	3.76±0.369	3.75±0.173 [•]
LVPWd	mm	0.60±0.013 ^{•+}	0.68±0.022 ^{•+*}	0.61±0.008 ^{•*}	0.72±0.022 ^{•■}	0.92±0.036 ^{•■}	0.85±0.053 ^{•■}
LVPWs	mm	0.83±0.033 [•]	0.93±0.047 ^{•*}	0.81±0.023 ^{•*}	1.03±0.047 [•]	1.07±0.037 [•]	1.01±0.050 [•]
LVAWd	mm	0.61±0.013 ^{•+}	0.66±0.015 ^{•+*}	0.60±0.009 ^{•*}	0.82±0.063 [•]	0.87±0.034 [•]	0.75±0.042 [•]
LVAWs	mm	0.84±0.029 ^{•+}	0.91±0.035 ^{•+}	0.77±0.029 [•]	1.07±0.084 [•]	1.08±0.069 [•]	0.98±0.070 [•]
LV Vol d	μl	89.60±2.98	90.39±4.38	86.01±3.83	86.48±6.01	84.73±2.55	90.59±3.31
LV Vol s	μl	54.76±4.24	49.14±3.87	49.14±3.27 [•]	48.26±4.49	61.07±5.70	60.15±2.68 [•]
EF	%	39.33±3.34	43.57±1.59 [•]	43.23±1.61 [•]	44.51±3.04 ^{•■}	32.15±2.84 ^{•■}	33.26±3.44 ^{•■}
FS	%	19.21±1.79	21.43±0.90 [•]	21.19±0.90 [•]	22.05±1.80 ^{•■}	15.18±1.45 ^{•■}	15.83±1.85 ^{•■}
LV mass	mg	76.93±1.41 ^{•+}	91.78±4.68 ^{•+*}	75.00±2.16 ^{•*}	105.7±8.07 ^{•■}	138.8±9.84 ^{•■}	113.7±4.02 ^{•■}
LV mass/BW	mg/g	3.10±0.051 ^{•+}	3.62±0.167 ^{•+*}	3.11±0.093 ^{•*}	3.80±0.183 ^{•■}	4.94±0.306 ^{•■}	4.42±0.197 ^{•■}
MV E	mm/s	1038±12.99	1053±42.59	971±32.04	938±46.90 [■]	1119±104.3	1107±59.24 [■]
MV A	mm/s	713±35.74 [#]	653±29.13 [•]	600±27.45 [#]	653±28.75 [■]	436±66.01 ^{•■}	539±70.47
MV E/MV A		1.44±0.073	1.62±0.045	1.63±0.058 [•]	1.46±0.085 [■]	3.27±0.901	2.343±0.391 ^{•■}
IVRT	ms	13.87±0.94	13.91±0.78	14.64±1.01	14.29±0.85	13.73±1.23	13.50±0.42
MV decel	mm/s ²	-45721±3724	-35430±3753	-45152±3518	-42645±4600	-49705±4865	-64600±10326
MV decel t	ms	21.41±1.53 ⁺	31.15±3.63 ^{•+*}	20.91±1.26 ^{•*}	22.44±2.80	19.23±1.27 [•]	17.60±2.02

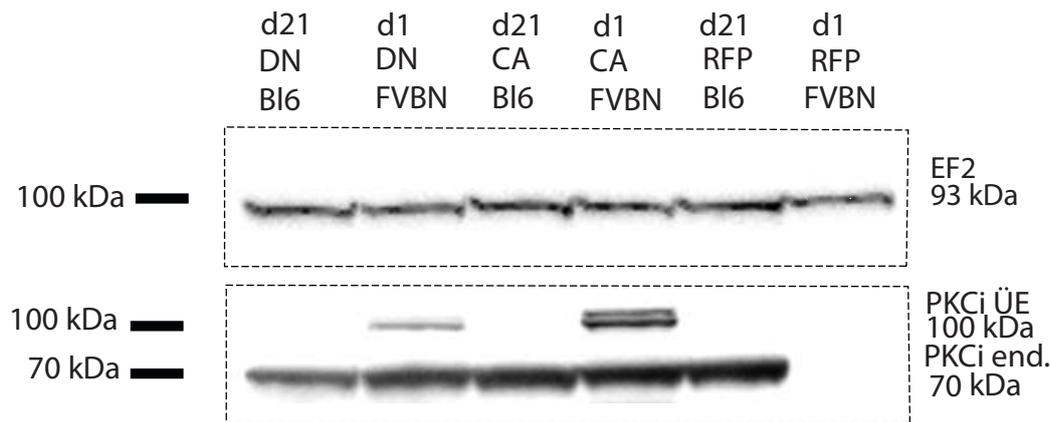


Abbildung 34: Western Blot für PKC : Vergleich neonatal injizierte FVB/N mit dreiwöchig injizierten C57Bl6/N. Links der Banden sind die Marker mit der zugehörigen Proteingröße in kDa angegeben. Die Banden auf dem Gel zeigen die mit den spezifischen Antikörpern markierten Proteine PKC der Transduktion, „PKCi-ÜE“ (100 kDa), die endogene PKC (hier als „PKC end.“ bezeichnet; bei 70 kDa) und die Ladekontrolle EF2 bei 93 kDa. CA und DN bezeichnen den Typ der überexprimierten PKC, TagRFPT die Kontrolle. „FVB/N“ steht für die Proben der neonatal transduzierten FVB/N-Tiere, „Bl6“ steht für die mit 21 Tagen transduzierten C57Bl6/N-Tiere.

jeweilige Form von PKC gekoppelt war, und damit nicht bei 35 kDa erscheinen konnte. Die Banden der TagRFPT unterschieden sich aber: Die der C57Bl6/N-Maus ist deutlich schwächer als die der FVB/N-Probe. Es ist zu bemerken, dass die Ladekontrolle eine vergleichbare Menge aufgetragenes Protein anzeigte.

Um das Bild der Expressionsbedingungen zu vervollständigen, wurden abschließend zu allen Versuchen auch neonatale C57Bl6/N-Mäuse mit den verschiedenen viralen Vektoren transduziert, und, nach der vergleichenden echokardiographischen Untersuchung, mit den neonatal transduzierten FVB/N-Tieren hinsichtlich der Proteinexpression verglichen. Zudem sollte beurteilt werden, ob nach sieben Wochen die Proteinexpression in C57Bl6/N-Tieren möglicherweise wieder abgenommen hatte, was auch eine mögliche Erklärung für die fehlenden 100 kDa Banden der CA- und DN-Überexpression wäre. Daher wurden auch Proben von Tieren nach der halben Expressionszeit, bei dreieinhalb Wochen nach Transduktion, auf die Expression der Proteine untersucht. Dann wurden die Befunde der Expression von PKC zu beiden Zeitpunkten innerhalb der Gruppe, und zu jeweils einem Zeitpunkt zwischen den Gruppen qualitativ verglichen, siehe Abbildung 36. Als Ladekontrolle diente hier ebenfalls EF2, das in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit oberhalb der PKC-Banden (in rotem Rahmen) gezeigt wird. Wieder war die Bande der endogenen PKC bei 70 kDa, und die der transduzierten PKC bei 100 kDa zu erwarten.

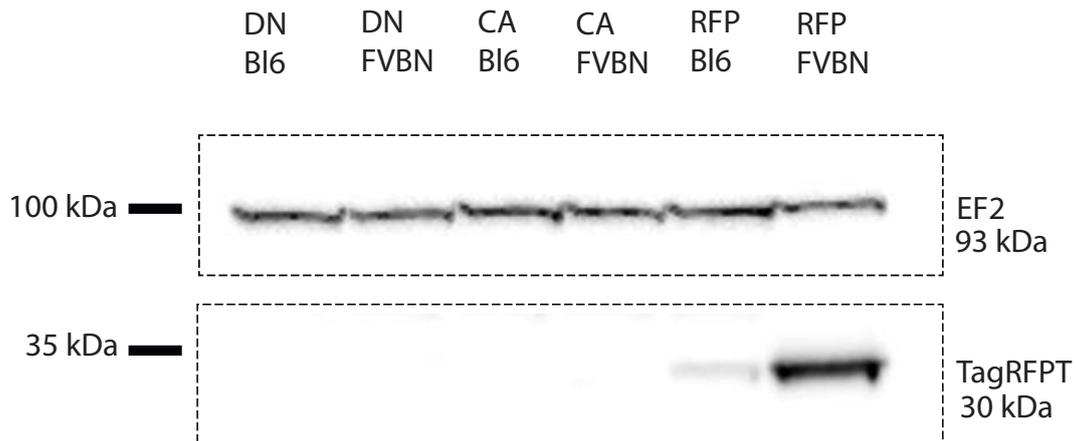


Abbildung 35: Western Blot für TagRFPT: Die aufgetragenen Proteinisolate entsprechen denen in Abbildung 34, auch die Höhe der Proteinstandardbanden ist wieder mit schwarzen Balken links skizziert, inklusive der zugehörigen Größe. EF2 bei 93 kDa ist wieder die Bande der Ladekontrolle, vergleichbar in allen Isolaten; mit TagRFPT ist die Laufhöhe des Markerproteins bei 30 kDa bezeichnet. Dieses wurde in den Proteinisolaten beider Kontrollmäuse (RFP-BI6 und RFP-FVBN) detektiert, in der BI6-Maus jedoch deutlich schwächer. In den anderen Tieren war hier keine Bande zu sehen, da TagRFPT an die überexprimierte PKC gebunden ist.

Die Ladekontrolle war überwiegend vergleichbar, lediglich die beiden FVBN-Tiere der siebten Expressionswoche zeigten eine schwächere Beladung der Geltasche mit Protein. Ebenfalls war dort das Signal der endogenen PKC schwächer, als bei allen anderen, bei denen die Bandenstärke vergleichbar war. Trotz der schwachen Beladung war jedoch in CA-FVB/N nach sieben Wochen eine Expression der PKC bei 100 kDa zu sehen. Insgesamt war bei neonataler Injektion bei allen CA- und DN-PKC-exprimierenden Tieren eine Bande zu sehen. Es gab zwischen den beiden Zeitpunkten bei den C57BI6/N-Tieren keinen deutlichen Unterschied, bei FVB/N dagegen stieg die Expression, auch im Kontext der schwächeren Beladung, offenbar an. Da es sich nur um exemplarische Western Blot-Untersuchungen handelt, wurde diese Beobachtung jedoch nicht statistisch ausgewertet. Hier war zu erkennen, dass FVB/N grundsätzlich einen Vorteil im Expressionsniveau zeigt; innerhalb der C57BI6/N-Tiere, die aufgrund der besseren Zellisolation interessant waren, war in Bezug auf das Expressionslevel die neonatale Injektion überlegen. In den TagRFPT-exprimierenden Tieren war auf gleicher Höhe keine Bande erkennbar. Knapp unterhalb der 100 kDa-Bande war bei TagRFPT-FVB/N und CA-FVB/N nach dreieinhalb Wochen eine schwache Bande erkennbar, und bei allen Proben unterhalb der 70 kDa-Bande, die jedoch nicht der endogenen oder überexprimierten PKC zugewiesen werden kann. Es handelte sich sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Die

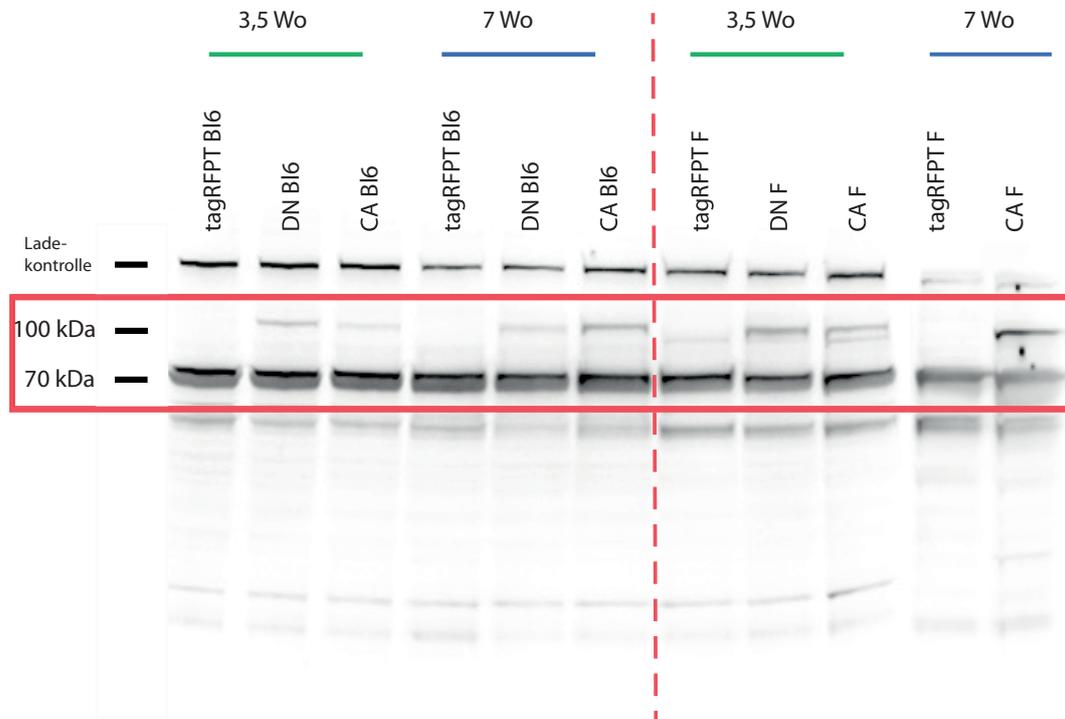


Abbildung 36: AAV-Injektion in neonatale Mäuse: Vergleich der Tiere der Linien C57Bl6/N und FVB/N nach neonataler Transduktion. Der Proteinstandard in der ersten Spalte links zeigt die Laufhöhe der Banden. Die spezifische Bande der überexprimierten PKC lag wieder bei etwa 100 kDa, die der endogenen PKC bei 70 kDa, diese beiden Banden wurden zur Übersichtlichkeit hier rot umrandet. Links der gestrichelten roten Linie befanden sich Proben von Tieren der C57Bl6/N-Linie (BI6), rechts Proben der FVB/N-Linie (F). Es handelte sich jeweils um Proben, die 3,5 Wochen (grüner Balken) oder 7 Wochen (blauer Balken) nach Transduktion entnommen wurden. TagRFPT bezeichnet die Kontrolle, hier sollte sich keine Bande bei 100 kDa finden; DN und CA bezeichnen den jeweiligen PKC -Aktivitätstyp überexprimierende Tiere. Die oberste Bande ist die Ladekontrolle. Die Beladung der 7 Wo-CA F- und TagRFPT- Tasche im Gel war schwächer als bei dem Rest der Proben. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Frau Monika Barth.

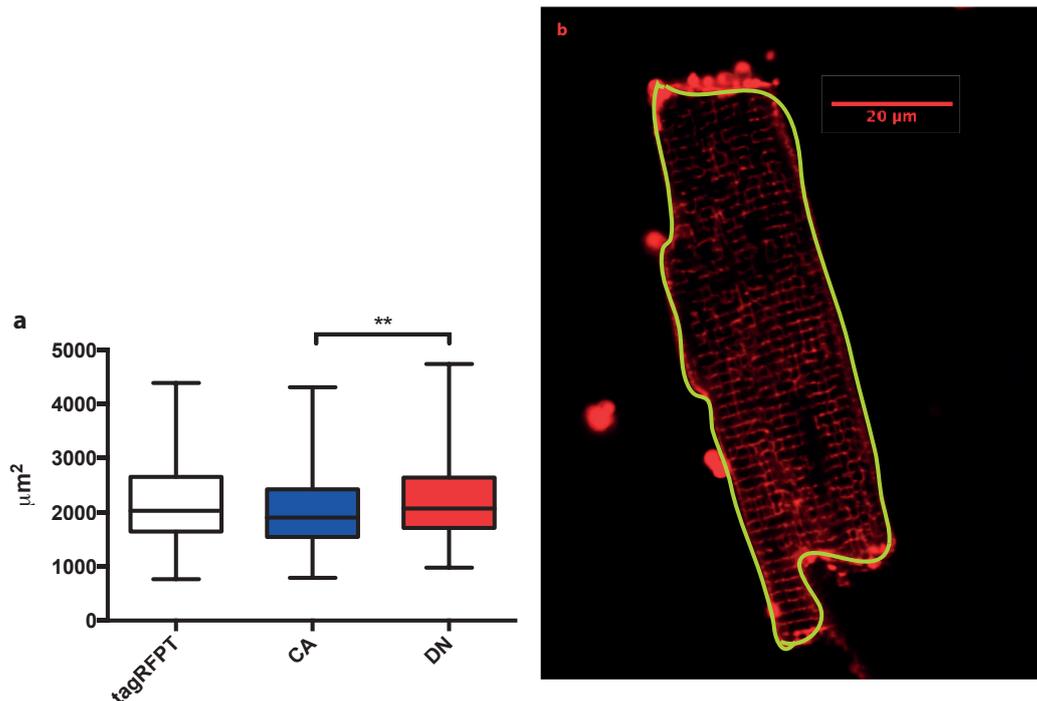


Abbildung 37: Konfokalmikroskopisch gemessene Zellgrößen: a: Abgebildet sind die Zellgrößen in μm^2 der konfokalmikroskopisch untersuchten Zellen der Gruppen TagRFPT (schwarz), CA (rot) und DN (blau). Die Kontrollgruppe TagRFPT unterschied sich nicht signifikant von CA oder DN, dagegen waren die Zellen der Gruppe CA signifikant kleiner als die der Gruppe DN. b: Zellgrößenmessung in ImageJ, beispielhaft. In rot wurde die Zellmembran samt ihrer regelmäßigen Einstülpungen angefärbt. Die Zelle wurde entlang der äußeren Membran umrandet, um so den Messbereich festzulegen.

thologischen Bedingungen im Herzen in Menschen und Tiermodellen zunehmend ungeordnet, und ihre Dichte nimmt zudem im Verlauf der Hypertrophie ab [118, 70, 73]. Somit stellte die Messung der räumlichen Anordnung der T-Tubuli einen von der Echokardiographie unabhängig prüfbar Parameter zur Untersuchung des pathologischen Zustandes der Herzen dar. Wenn eine Änderung der Anordnung und Verteilung der T-Tubuli in einer Gruppe messbar wäre, wäre dies ein Indiz für das Vorliegen einer kardialen Hypertrophie.

Es wurden aus jeweils 5 Tieren pro Gruppe $n = 190$ Zellen der Gruppe DN, $n = 241$ Zellen der Gruppe CA, und $n = 157$ Zellen der Gruppe TagRFPT in die Messung und Auswertung einbezogen.

Die Messung erfolgte, wie unter 3.11 beschrieben.

Schon in der zugrunde liegenden konfokalmikroskopischen Aufnahme war dabei die physiologische, regelmäßige Querstreifung der Herzmuskelzelle der TagRFPT-Gruppe (siehe Abbildung 38a) sichtbar. Die Regelmäßigkeit der T-Tubuli in den TagRFPT-Zellen bestätigte sich in der

Auswertung; die Stärke der Raumfrequenz betrug $12,97 \pm 0,33$ SEM. Dies ist ein arbiträrer Wert mit dementsprechend arbiträrer Einheit („arbitrary unit“, AU); je höher, desto regelmäßiger angeordnet waren die zugrunde liegenden Raumfrequenzen der Fluoreszenzsignale, und damit die T-Tubuli.

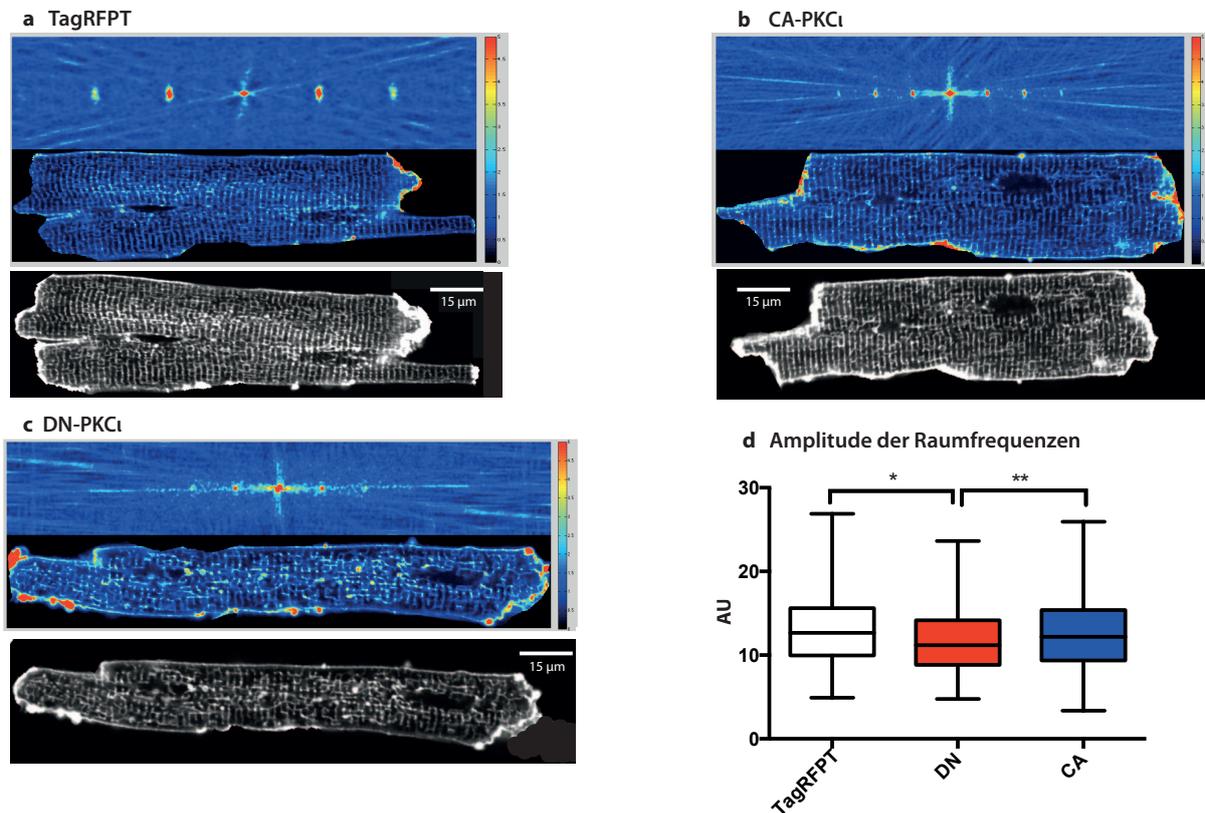


Abbildung 38: Analyse der T-tubulären Regularität isolierter Kardiomyozyten: Die Graustufen-Bilder wurden mit einem Leica TSC SP5 mit einem 63x-Objektiv aufgenommen. Abgebildet sind in a-c jeweils unten das Graustufen-Bild einer Zelle der jeweiligen Gruppe, mittig eine Abbildung der Fluoreszenzintensitäten, und oben die durch FFT erzeugte Abbildung der Frequenzdomänen der Ortsfrequenzen. Die für das mittlere und obere Bild relevante Farbskala zeigt arbiträre Werte, um starke Intensitäten (gelb-rote Farbgebung) hervorzuheben. Die Skala zur Größenbeschreibung im Graustufenbild gilt so auch für das mittlere Bild der Zellen. **a:** Analyse eine Zelle der TagRFPT-Gruppe; **b:** Zelle der Gruppe CA; **c:** Zelle der Gruppe DN. Bei direktem Vergleich von **a**, **b** und **c** war eine weniger geordnete Struktur der Querstreifung der T-Tubuli in **c** erkennbar. **d:** Die statistische Analyse der Messwerte der Raumfrequenzspitzen aller gemessenen Zellen aufgetragen; schwarz-weiß: TagRFPT (n = 157); rot: DN (n = 190); blau: CA (n = 241).

Dagegen war in den Zellen der Gruppe DN (siehe Abbildung 38c) zum Teil schon mit bloßem Auge erkennbar, dass diese Querstreifung weniger geordnet, oder teilweise völlig aufgelöst war. Die errechneten Werte Raumfrequenzspitzen lagen erwartungsgemäß auch statistisch signifi-

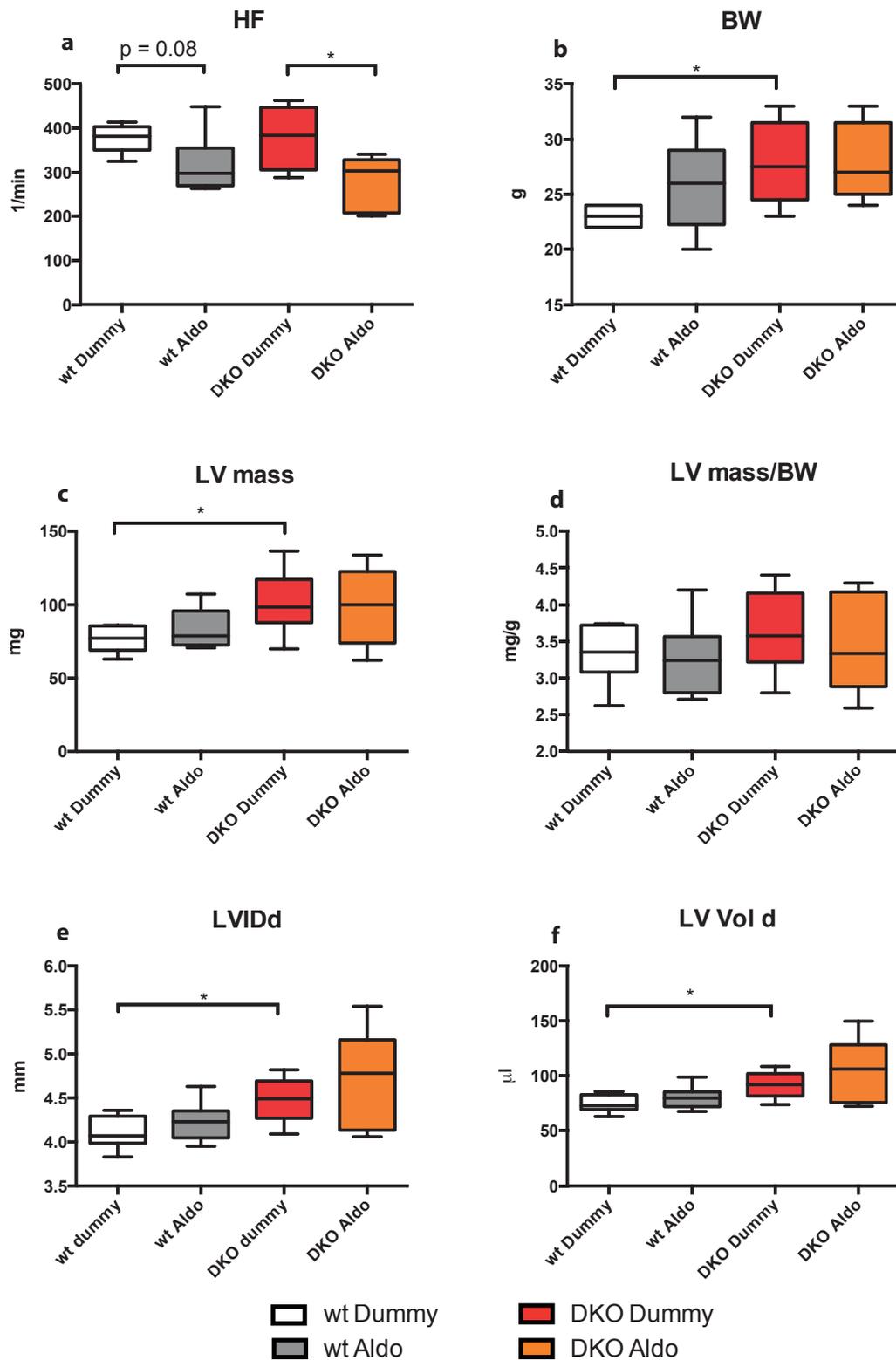


Abbildung 39: Echokardiographie nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus: In schwarz/weiß die Gruppe wt-Dummy ($n = 6$), in grau die Gruppe wt Aldo ($n = 6$), in rot die Gruppe DKO Dummy ($n = 6$), in orange die Gruppe DKO-Aldo ($n = 5$). **a:** Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min). **b:** Gewicht der Tiere in g **c:** LV mass, in mg **d:** LV mass/BW, in mg/g **e:** LVIDd in mm **f:** LV Vol d in μ l.

Tabelle 9: Echokardiographische Parameter nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus: Die Tabelle zeigt alle gemessenen Werte der echokardiographischen Untersuchung nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus, aufgelistet in der linken Spalte, die Gruppen sind in der schwarzen Kopfzeile bezeichnet, die jeweilig Tierzahl darunter angegeben. Die Werte verstehen sich als Mittelwert mit SEM. Gleichfarbige Kreise kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Einheit	wt Dummy	wt Aldo	DKO Dummy	DKO Aldo
Mittelwert ± SEM		n = 6	n = 6	n = 6	n = 5
HF	bpm	377 ± 13.19	317.2 ± 27.8 [•]	378 ± 32.64 [•]	275 ± 28.3 [•]
BW	g	23 ± 0.37 [•]	25.83 ± 1.70	27.83 ± 1.5 [•]	28 ± 1.58
IVSd	mm	0.65 ± 0.012	0.64 ± 0.0299	0.76 ± 0.059	0.69 ± 0.061
IVSs	mm	0.88 ± 0.011	0.89 ± 0.02	1.02 ± 0.078	0.97 ± 0.081
LVIDd	mm	4.11 ± 0.077 [•]	4.23 ± 0.094	4.48 ± 0.11 [•]	4.67 ± 0.26
LVIDs	mm	3.11 ± 0.065	3.14 ± 0.143	3.27 ± 0.095	3.45 ± 0.326
LVPWd	mm	0.67 ± 0.014	0.69 ± 0.066	0.69 ± 0.03	0.66 ± 0.047
LVPWs	mm	0.89 ± 0.029	0.96 ± 0.051	0.96 ± 0.047	0.96 ± 0.089
LVAWd	mm	0.63 ± 0.018	0.67 ± 0.057	0.75 ± 0.057	0.67 ± 0.037
LVAWs	mm	0.91 ± 0.039	0.92 ± 0.021	1.07 ± 0.1	0.98 ± 0.029
LV Vol d	µl	74.7 ± 3.29 [•]	80.2 ± 4.27	91.8 ± 5.26 [•]	102.8 ± 13.6
LV Vol s	µl	35.4 ± 2.66	39.8 ± 4.43	43.4 ± 2.96	51.9 ± 10.91
EF	%	48.5 ± 1.98	51 ± 3.11	51.85 ± 4.71	51 ± 6.71
FS	%	24.2 ± 1.18	25.9 ± 1.91	26.81 ± 2.99	26.6 ± 4.42
LV mass	mg	76.65 ± 3.71 [•]	83.5 ± 5.8	101.3 ± 8.99 [•]	98.7 ± 12.04
LV mass/BW	mg/g	3.34 ± 0.166	3.26 ± 0.215	3.63 ± 0.23	3.45 ± 0.308
MV E	mm/s	1045 ± 72.8	1008 ± 78.1	989 ± 82	1027 ± 57.2
MV A	mm/s	532 ± 42.2	586 ± 52.9	568 ± 45.1	598 ± 66.8
IVRT	ms	14.72 ± 0.6	17 ± 1.39	13.6 ± 0.76	15.8 ± 0.6
MV E/A		2.06 ± 0.28	1.79 ± 0.201	1.77 ± 0.114	1.76 ± 0.091

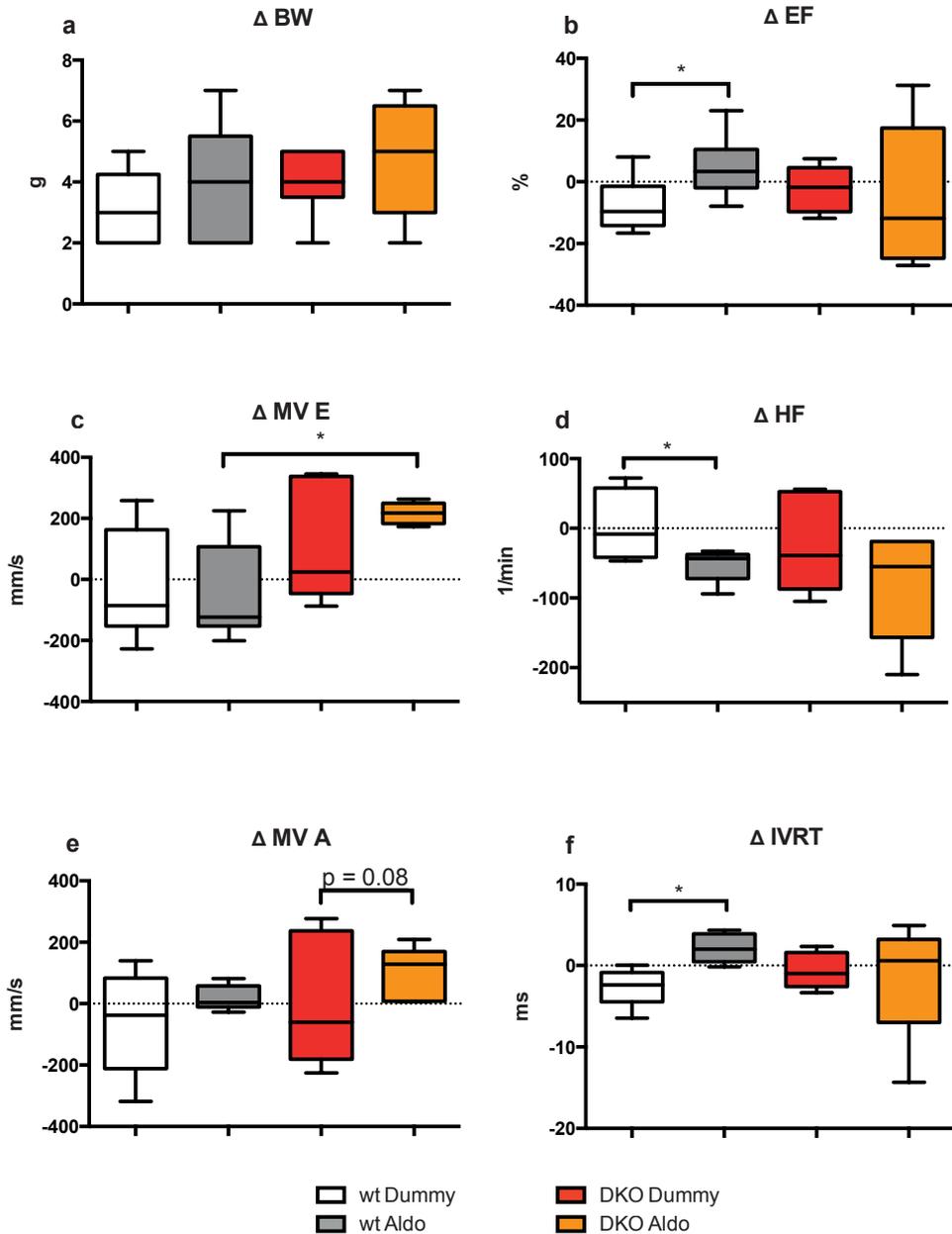


Abbildung 40: Entwicklung der echokardiographischen Messparameter während des Hyperaldosteronismus. Der Messwert vor Implantation der Minipumpe wird vom Messwert der gleichen Maus nach 6 Wochen Hyperaldosteronismus oder Dummy abgezogen. Farbcode und Tierzahl, wie in Abbildung 39. a: Körpergewichts-Differenz (Δ BW) in g; b: EF in %; c: MV E, in mm/s; d: HF in Schlägen/min; e: MV A in mm/s; f: IVRT in ms.

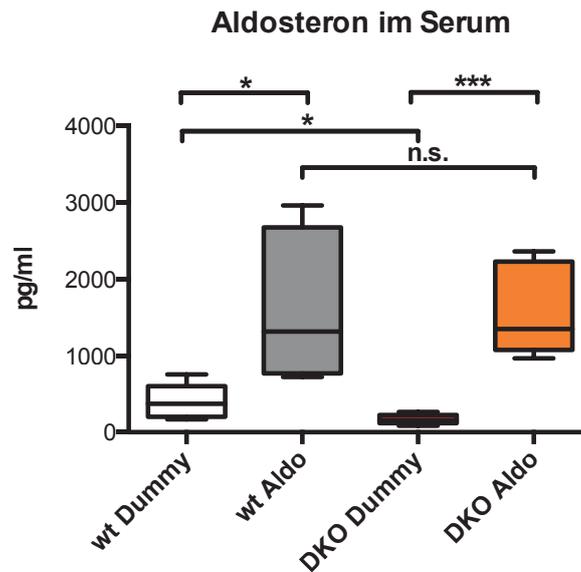


Abbildung 41: Aldosteron Gehalt im Serum: Gemessen wurde der Aldosteron Gehalt in Pikogramm (pg) je ml Serum. Tierzahlen und Farbkodierung wie in 39, nur in DKO Dummy n=5. Die Serum-Aldosteron-Werte der mit Aldosteron-Minipumpe behandelten Tiere waren erwartungsgemäß deutlich höher als in den Dummy-Gruppen. Die beiden Aldo-Gruppen unterschieden sich nicht. Bei den Kontrolltieren waren die Aldosteronwerte in den DKO-Tieren signifikant niedriger als in den Wildtyp-Tieren.

4.2.4 Kollagen Gehalt in den histologischen Schnitten

Aldosteron wirkt profibrinogen [18], während in den DKO-Tieren bereits gezeigt wurde, dass sich in älteren Tieren weniger interstitielles Kollagen im Herzen gebildet hatte als in den wt-Tieren [139]. Folglich konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der $G_{\alpha}G_{11}$ -DKO möglicherweise dem profibrinogenen Effekt des Hyperaldosteronismus entgegenwirken könnte, und unter Umständen die Kollageneinlagerung durch Aldosteron verhindern könnte. Da aus den echokardiographischen Daten bereits ein Effekt ersichtlich wurde, nämlich, dass die Wirkung von Aldosteron auf den kardialen Phänotyp in verschiedenen Parametern abhängig war vom Vorhandensein oder Fehlen der $G_{\alpha}G_{11}$ -Untereinheiten, sollte nun auch überprüft werden, ob der profibrinogene Effekt von Aldosteron im DKO wesentlich milder ausfiele als in den Wildtyp-Hezen, oder sogar ausbliebe.

Hierzu wurden die Herzen der entsprechend behandelten Tiere entnommen, histologisch präpariert, und mit Pikrosiriusrot gefärbt, wie in Abschnitt 3.14 beschrieben. Die Auswertung erfolgte dann, wie im Abschnitt 3.15 beschrieben. Dabei ist zu erwähnen, dass die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des gefärbten Kollagens zur Ergänzung der Polarisationsmi-

kanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, und zudem fielen die Messwerte insgesamt geringer aus als Werte der fluoreszenzmikroskopischen Messung (Abbildung 43a). In der Polarisationsmessung ergab sich für die Herzschnitte der DKO-Dummy-Tiere ein mittleren Anteil an polarisierendem Kollagen von $3,116 \pm 2,205$ % (SD); für die Schnitte der mit Aldosteron behandelten DKO-Tiere ergab sich ein Wert von $4,652 \pm 1,778$ %. Zur Kontrolle wurden Schnitte von Wildtyp-Tieren mit Dummy untersucht, diese zeigten $4,044 \pm 2,988$ % polarisierendes Kollagen. Wildtyp-Tiere mit sechswöchiger Aldosteron-Behandlung zeigten einen Anteil von $3,958 \pm 2,48$ % polarisierendes Kollagen.

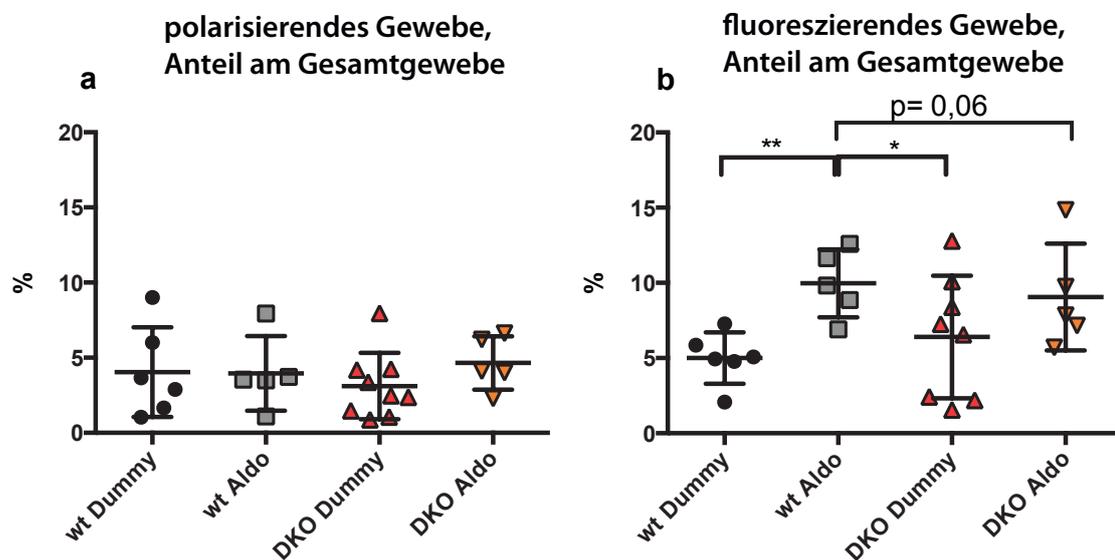


Abbildung 43: Analyse des Kollagenanteils im Herzgewebe mittels Lichtpolarisation und Konfokalmikroskopie: In beiden Graphen ist der Anteil des gemessenen Kollagens pro Herzgewebe (in %) je Gruppe dargestellt, aufgrund teilweise geringer Tierzahlen in Form der einzelnen Datenpunkte. Rote Dreiecke: DKO-Dummy, n = 9 (n = 8 in der Fluoreszenzmessung, da ein statistischer Ausreißer herausgenommen wurde); orange Dreiecke: DKO Aldo, n = 5; schwarze Kreise: wt Dummy, n = 6; graue Quadrate: wt Aldo, n = 5. a: Untersuchung mit polarisiertem Licht In b: Ergebnis der Analyse nach Fluoreszenzmikroskopie.

Die Resultate der Fluoreszenzmessung der Siriusrot gefärbten Schnitte ergab schon grundsätzlich höhere Messwerte. Die Herzschnitte der DKO-Mäuse zeigten einen mittleren Anteil fluoreszierenden Gewebes von $6,406 \pm 4,073$ % nach Implantation des Dummys, und $9,059 \pm 3,544$ % nach der sechswöchigen Applikation von Aldosteron. Abbildung 43b zeigt die statistische Auswertung dieser Methode. In den DKO-Tieren hatte dabei das fluoreszierende Gewebe

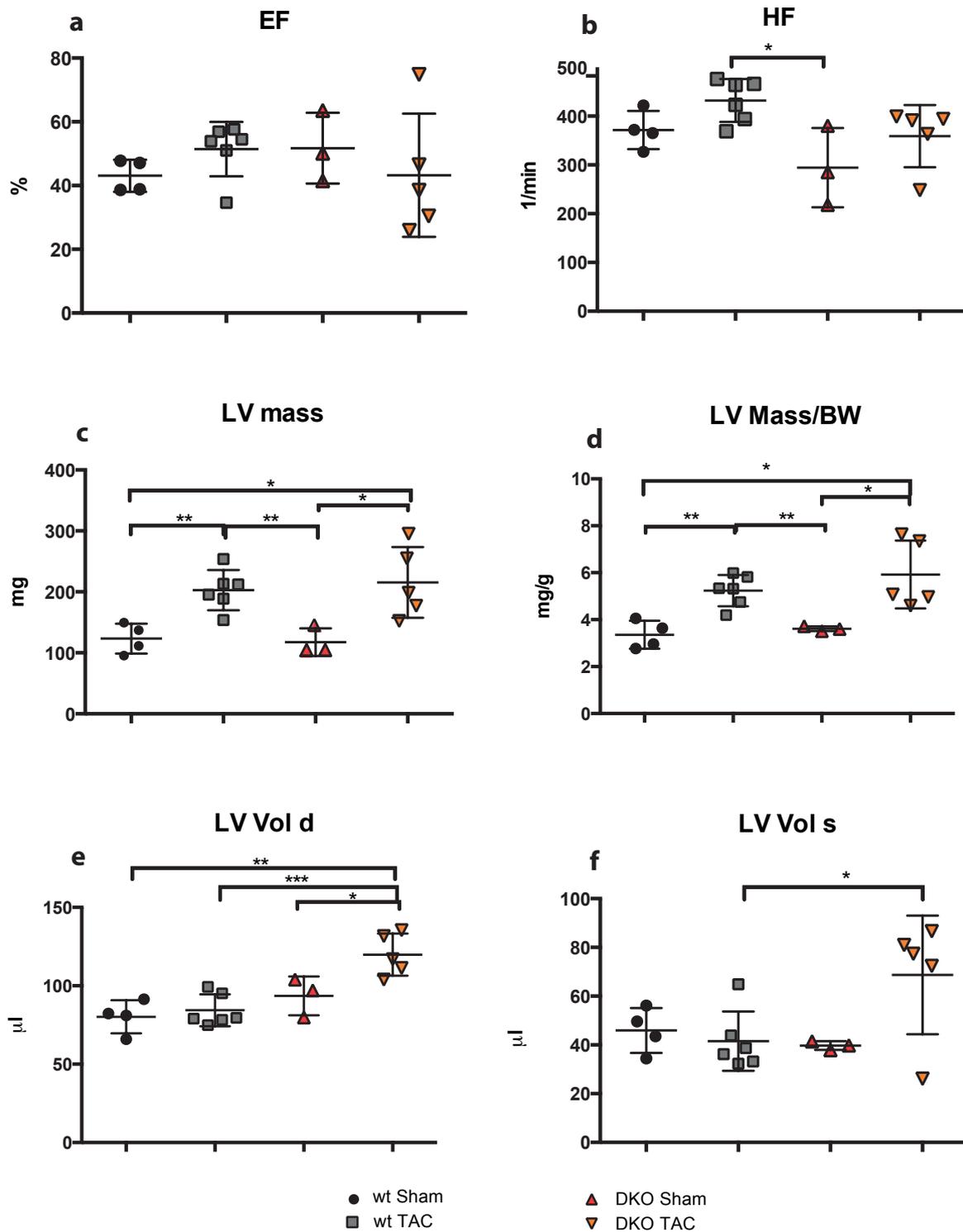


Abbildung 44: TAC-Hypertrophie und G_qG₁₁-DKO in Mäusen: Schwarze Kreise: wt sham, n = 4; graue Quadrate: wt TAC, n = 6; rote Dreiecke: DKO sham, n = 3; orange Dreiecke: DKO TAC, n = 5; a: EF in %; b: Herzfrequenz, in bpm; c: LV mass, in mg; d: LV mass normiert, in mg/g e: Diastolisches Volumen, in μl; f: Systolisches Volumen, in μl.

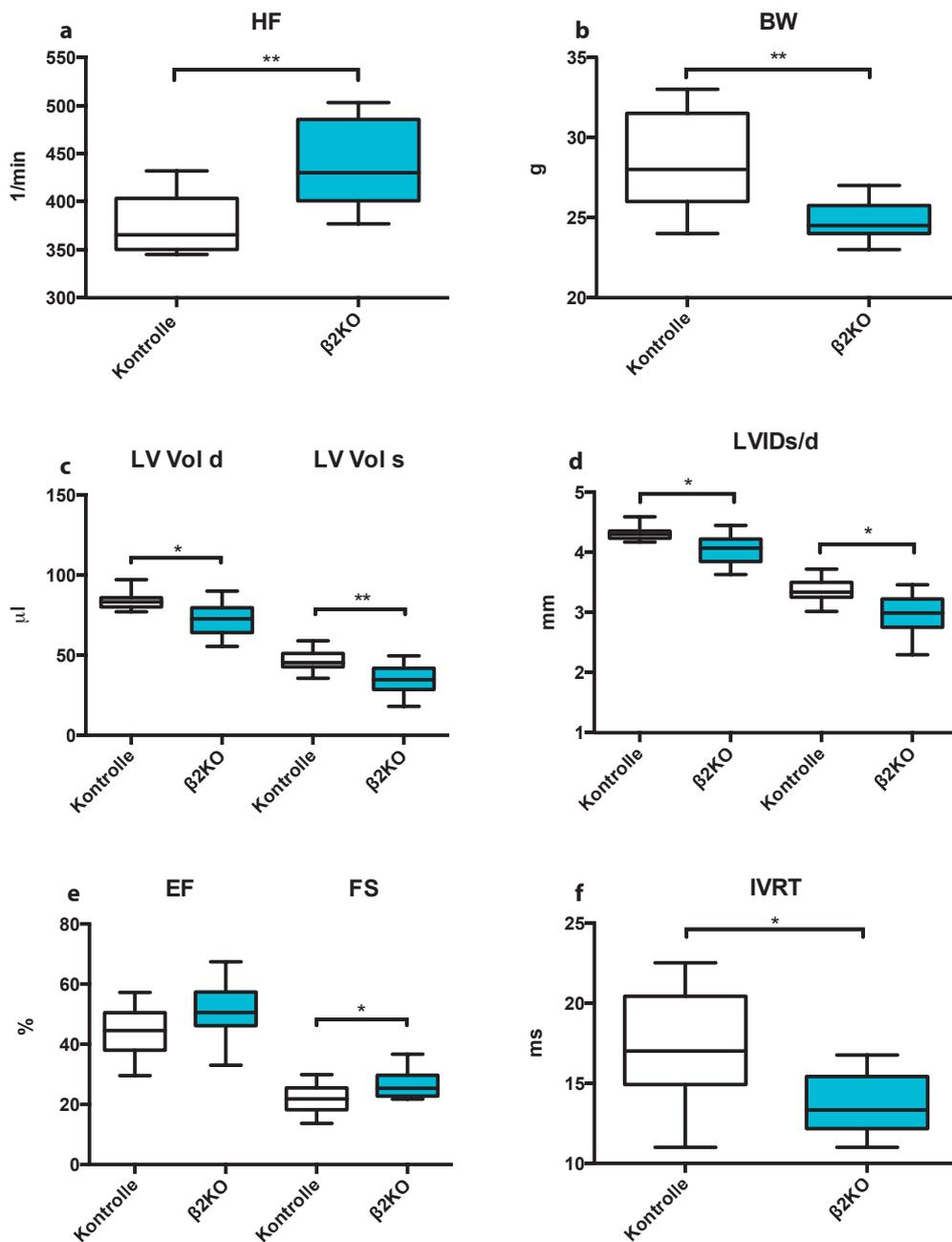


Abbildung 45: Wichtige echokardiographische Grundparameter der $Ca_v1.2-2^{-/-}$ -KO: In schwarz-weiß ist die Kontrollgruppe dargestellt (n = 9), in schwarz-blau die $2^{-/-}$ -KO-Gruppe (n = 9). **a** Herzfrequenz in 1/min; **b**: Das Körpergewicht in g **c**: linksventrikuläres Volumen, in μ l. **d**: Durchmesser des linken Ventrikels, in mm **e**: EF und FS in % **f**: IVRT, in ms.

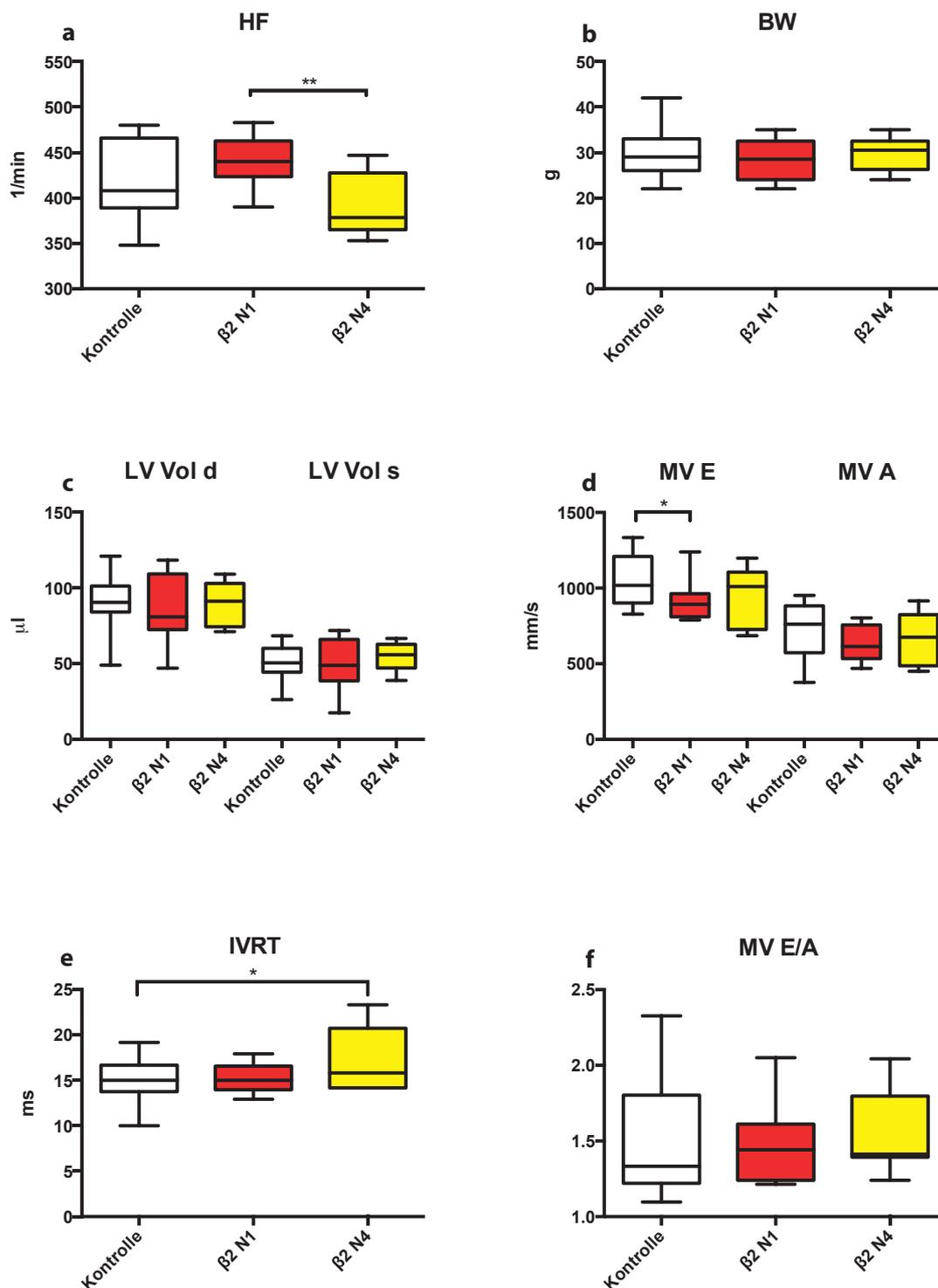


Abbildung 46: Echokardiographische Untersuchung Ca_v 2-KO mit Expression der Spleißvarianten N1 und N4: In schwarz-weiß ist die Kontrollgruppe dargestellt (n = 15), in schwarz-rot die Tiere, die die embryonale Spleißvariante N1 exprimieren (n = 10), in schwarz-gelb die Tiere, die die adulte Spleißvariante N4 (n = 10) kardial exprimieren. **a:** Herzfrequenz der Tiere in Schlägen pro Minute (1/min). **b:** Körpergewicht in g. **c:** Diastolisches und systolisches Volumen des linken Ventrikels, in μ l. **d:** Geschwindigkeit der E-Welle und der A-Welle, in mm/s. **e:** Intraventrikuläre Relaxationszeit in ms **f:** Quotient aus E- und A-Welle

Tabelle 10: Echokardiographische Parameter aller Genotypen des 2-Projektes: Die Tabelle zeigt alle gemessenen Werte der echokardiographischen Untersuchung der verschiedenen Genotypen, aufgelistet in der linken Spalte. Die Gruppen sind in der schwarzen Kopfzeile bezeichnet, die jeweilig Tierzahl darunter angegeben. Die Werte verstehen sich als Mittelwert mit SEM. Gleichfarbige Kreise kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den markierten Messwerten in diesem Parameter.

Parameter	Einheit	Kontrolle	β 2KO	β 2N1	β 2N4
Mittelwert \pm SEM		n = 24	n = 9	n = 10	n = 10
BW	g	29 \pm 0,89 [●]	24,5 \pm 0,45 ^{●●●}	28,5 \pm 1,45 [●]	30,5 \pm 1,22 [●]
IVSd	mm	0,67 \pm 0,015	0,72 \pm 0,035	0,74 \pm 0,043	0,675 \pm 0,014
IVSs	mm	0,92 \pm 0,02	0,92 \pm 0,035	0,995 \pm 0,046	0,875 \pm 0,027
LVIDd	mm	4,375 \pm 0,064	4,07 \pm 0,086	4,25 \pm 0,162	4,475 \pm 0,093
LVIDs	mm	3,425 \pm 0,063	2,99 \pm 0,118	3,445 \pm 0,169	3,64 \pm 0,084
LVPWd	mm	0,695 \pm 0,016	0,66 \pm 0,02	0,665 \pm 0,043	0,725 \pm 0,024
LVPWs	mm	0,76 \pm 0,022	0,85 \pm 0,031	0,89 \pm 0,062	0,92 \pm 0,026
LVAWd	mm	0,705 \pm 0,02	0,67 \pm 0,032	0,68 \pm 0,026	0,685 \pm 0,022
LVAWs	mm	0,95 \pm 0,025	0,94 \pm 0,043	0,975 \pm 0,035	0,935 \pm 0,028
LV Vol d	μ l	86,53 \pm 2,9 [●]	72,73 \pm 3,6 ^{●●}	80,93 \pm 7,4	91,26 \pm 4,4 [●]
LV Vol s	μ l	48,31 \pm 2,13 [●]	34,71 \pm 3,2 ^{●●●}	48,98 \pm 5,3 [●]	55,97 \pm 3,0 [●]
EF	%	44,49 \pm 1,33	50,56 \pm 3,21	41,16 \pm 2,59	39,96 \pm 1,68
FS	%	21,83 \pm 0,77 [●]	25,34 \pm 1,59 ^{●●}	20,77 \pm 0,68 [●]	19,33 \pm 1,04 [●]
LV mass	mg	88,66 \pm 4,15	72,13 \pm 4,61	84,34 \pm 7,3	91,72 \pm 3,89
LV mass/BW	mg/g	3,098 \pm 0,074	2,797 \pm 0,172	3,090 \pm 0,151	3,064 \pm 0,135
MV E	mm/s	949 \pm 29,23	907 \pm 53,93	893,6 \pm 42,3	1011 \pm 59,36
MV A	mm/s	633,5 \pm 33,95	604,7 \pm 32,8	614,1 \pm 35,75	675,2 \pm 58,39
IVRT	ms	15,38 \pm 0,65	13,33 \pm 0,64 [●]	15 \pm 0,51	15,83 \pm 1,1 [●]
MV E/A		1,43 \pm 0,065	1,467 \pm 0,098	1,44 \pm 0,08	1,413 \pm 0,092

Parameter	Einheit	β 2KO Kon	β 2KO	β 2N1	β 2N4	β 2N1N4 Kon
Mittelwert \pm SEM		n = 9	n = 9	n = 10	n = 10	n = 15
HF	bpm	365,5 \pm 11 ^{●●}	430 \pm 15 ^{●●}	440 \pm 8,8 [●]	378,5 \pm 11 ^{●●}	408 \pm 11 [●]

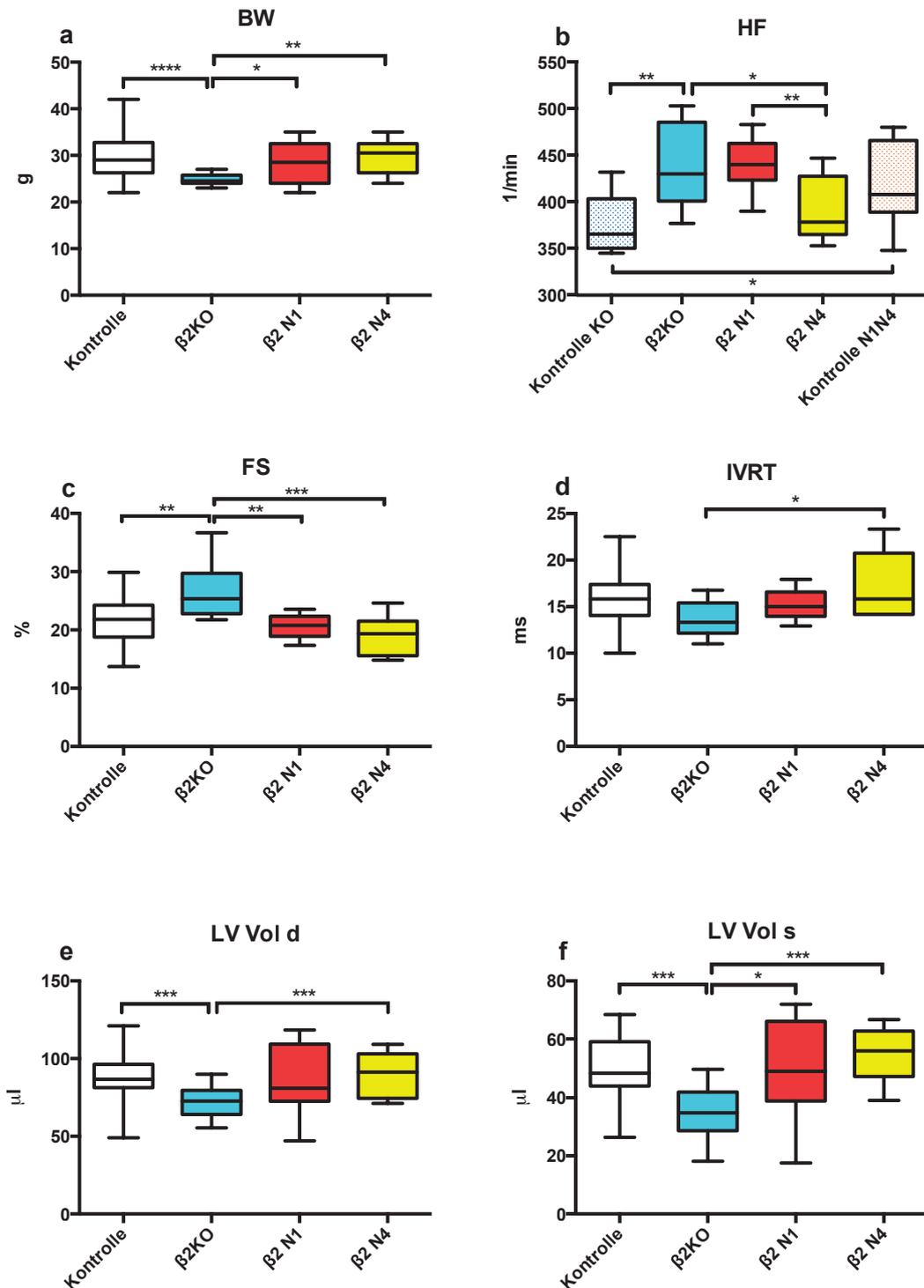


Abbildung 47: Direkter Vergleich des $Ca_v1.2-2^{-/-}$ -KO mit den beiden Rettungsvarianten: Die Farbgebung ist an die Abbildungen 45 und 46 angepasst: In weiß sind beide Kontrollgruppen zusammengefasst, wenn sie sich nicht voneinander unterschieden (dann $n = 24$); in hellblau sind die Daten der Gruppe $Ca_v 2$ -KO abgebildet, in rot die der 2 -N1-Tiere, in gelb die der 2 -N4-Tiere. **a:** Körpergewicht in g. **b:** Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min). **c:** FS in %; **d:** IVRT in ms. **e:** Diastolisches Volumen des linken Ventrikels in μ l; **f:** Systolisches Volumen des linken Ventrikels, in μ l.