

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Skelettmuskelstrukturparametern wurden **drei selektierte Mauslinien und eine Kontrolllinie** verwendet.

Die Mäuse stammten aus dem FB Genetik und Biometrie des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf. Die Bezeichnung der Linien sowie die jeweiligen Selektionskriterien gehen aus der Tabelle 12 hervor.

Tabelle 12: Übersicht über das verwendete Tiermaterial

Mauslinien	Bezeichnung	Selektion auf	Generation	Tieranzahl	
				Alter 43 Tage	Alter 73 Tage
DU-Ks	Kontrolllinie	unselektiert	83	5	5
			83		
DU-6	Wachstumslinie	Wachstum (Körpermasse)	83	5	5
			84		
DU-6+LB	kombinierte Linie/Indexlinie	Wachstum (Körpermasse) und Belastbarkeit (Laufbandleistung)	83	5	5
			84		
DU-6P	Proteinlinie	Proteinansatz	84	5	5
			84		

Insgesamt wurden 40 männliche Tiere in die elektronenmikroskopischen Untersuchungen einbezogen. Aus arbeitsorganisatorischen Gründen gehörten die untersuchten Selektionslinien nicht derselben Generation an. Bei der Wahl der Altersgruppen der zu untersuchenden Tiere wurde die Tatsache beachtet, daß sich am 43. Lebenstag die Skelettmuskelfasern des M. rectus femoris in einer intensiven hypertrophischen Wachstumsphase befinden. Die physiologische Grenze dieses Skelettmuskelfaserwachstums wird bei den Mäusen ab einem Alter von 60 Lebenstagen erreicht (REHFELDT et al., 1987; s. a. S. 37). In diesem Wachstumsplateau befinden sich die Mäuse auch am 73. Lebenstag.

Bei der **Wachstumslinie DU-6** war die Summe der Körpermassen von zwei Prüfböcken das Selektionsmerkmal. In der **kombinierten Linie Du-6+LB** wurde nach einem Basisindex selektiert, in dem die Körpermassen ($KM_{42} 2\sigma$) und die

Laufbandleistungen ($LB_{42} 2\text{♂}$) von zwei Prüfböcken nach folgender Formel verknüpft wurden (BÜNGER, 1987):

$$\text{Index} = KM_{42} 2\text{♂} \times 100 + \frac{s \cdot KM_{42} 2\text{♂} \times LB_{42} 2\text{♂} \times 100}{s \cdot KM_{42} 2\text{♂}}$$

s = Standardabweichung

Die Indexwerte wurden in jeder Generation unter Benutzung der jeweiligen generationsspezifischen Schätzwerte ermittelt. Zur Quantifizierung der Laufbandleistung mußten die beiden Prüfböcke nach einem vorgegebenen Programm mit stufenförmig erhöhten Bandgeschwindigkeiten bis zur Erschöpfung laufen (BÜNGER, 1978, 1979). Der dabei zurückgelegte Weg in Bandumdrehungen (1 U = 0,8 m) diente als Maß für die physische Belastbarkeit. In der höchsten Belastungsstufe betrug die Laufbandgeschwindigkeit $40 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$. Um den Einfluß zirkadianer Schwankungen der Ausdauerbelastbarkeit zu minimieren, wurden die Laufbandtests in der Zeit von 08.00 bis 10.00 Uhr durchgeführt. Bei der **Proteinlinie DU-6P** war der Proteinansatz in den Tierkörpern der beiden Prüfböcke nach Entfernung von Kopf, Fell, Schwanz, Magen-Darm-Trakt und Pfoten das Selektionsmerkmal.

Alle drei Selektionslinien entstammten der Auszuchtlinie Fzt:DU (SCHÜLER, 1985). Mit dem Ziel der Schaffung einer weitgehend genetisch identischen Ausgangsbasis wurden zur Erzeugung der 0. Generation Vollgeschwister auf diese drei Selektionsvarianten verteilt. Um den Effekt der Aufzuchtwurfgröße auf die Körpermasseentwicklung der Nachkommen auszuschalten, wurde die Wurfgröße bei der Geburt (0. Lebenstag) auf 8 (0. bis 15. Generation) bzw. ab der 16. Generation auf 9 Nachkommen standardisiert. Im Alter von 9 Wochen wurden die Labormäuse über einen Zeitraum von etwa 12 Tagen unter strikter Vermeidung von Vollgeschwisterpaarungen im Verhältnis 1 ♂ : 1 ♀ angepaart. Selektiert wurde nach Vollgeschwisterleistung bei einer Selektionsquote von 46 bis 49 %. Hierzu wurden zwei am 10. Lebenstag zufällig ausgewählte Prüfböcke je Wurf untersucht (Markierung durch Ohrkerbung) und nach dem 42. Lebenstag eliminiert, kamen also als Vätertiere für die Folgegeneration nicht mehr in Frage.

Ausgehend von der Genreserve des Fzt:DU-Stammes erfolgte die Züchtung der **Kontrolllinie DU-Ks**, in der ebenfalls 80 Paarungen (1 ♂ : 1 ♀) je Generation und eine entsprechende Wurfgrößenstandardisierung durchgeführt wurden. Zur Erzeugung vergleichbarer Inzuchtgrade betrug die mittlere Selektionsquote

(Zufallsauswahl) bei der Reproduktion der Folgegeneration ebenfalls etwa 46 %. Die erste Generation der Kontrolllinie DU-Ks diente als Vergleichsmaßstab für die 8. und 9. Generation der Selektionslinien. Als Kontrollwerte für die Generationen 0 bis 7 wurden die über die drei Selektionsvarianten gepoolten Werte der 0. Generation benutzt. Anschließend dienten die zeitlich korrespondierenden Werte der Linie Du-Ks jeweils als Kontrolldaten (BÜNGER, 1987).

Eine ausführliche Beschreibung des Selektionsexperimentes befindet sich bei BÜNGER (1979) und BÜNGER et al. (1983). Die Labormäuse wurden im Semi-Barriersystem gehalten, wobei ihnen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung standen.

3.2 Untersucher Skelettmuskel

Die mikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten am **M. rectus femoris**, einen doppelt gefiederten Skelettmuskel, der zusammen mit dem M. vastus lateralis, M. vastus medialis und M. vastus intermedius den M. quadriceps femoris bildet. Seine Ursprungsorte befinden sich am Ilium und Azetabulum, sein Ansatzort liegt auf der kranialen Seite der Patellaoberfläche (KLINGENER, 1964).

Zur Topographie des M. rectus femoris siehe Abbildungen 5 bis 7.

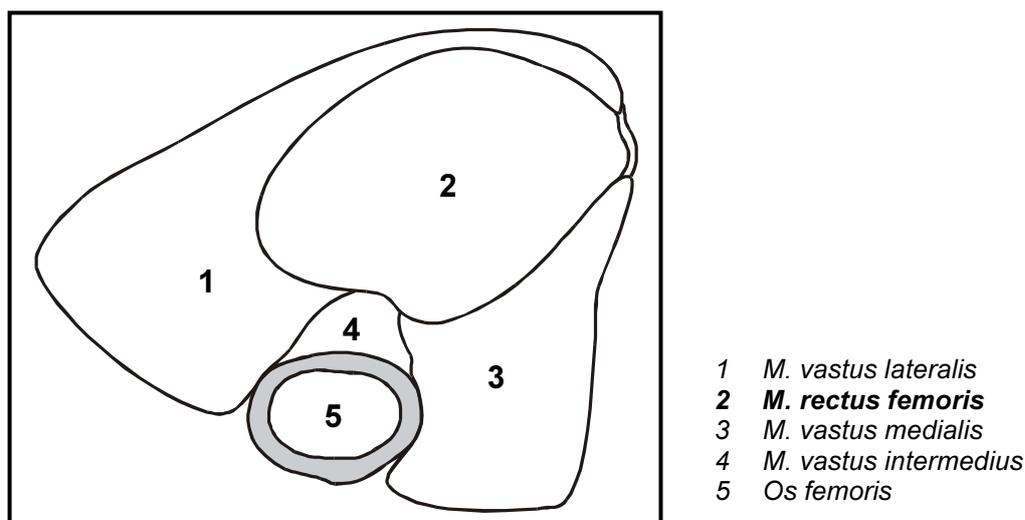


Abb. 5: Lage des *M. rectus femoris* in einem Querschnitt des Oberschenkels der Labormaus (WEBER, 1981)

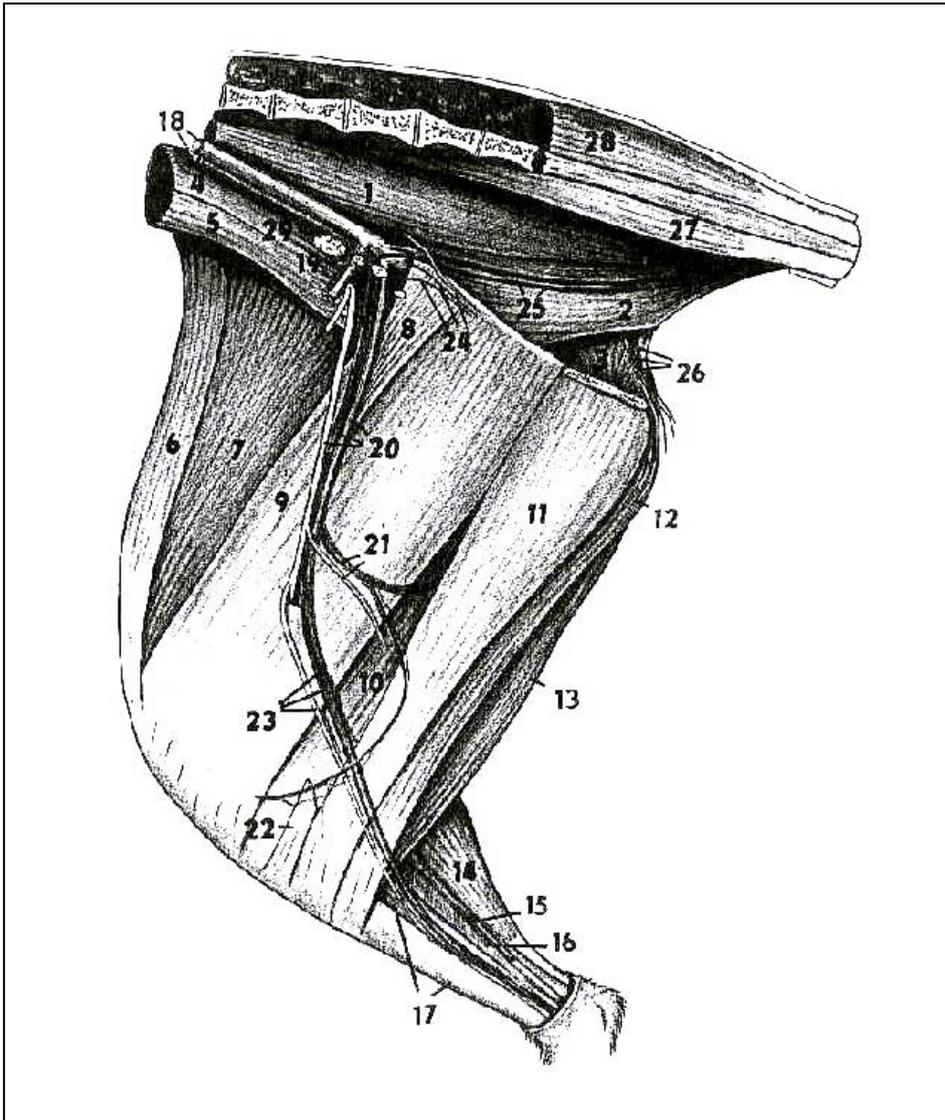


Abb. 6: Darstellung der Oberschenkelmuskulatur bei der Maus – mediale Ansicht
(nach POPESKO et al., 1992)

(Abk.: M. = Musculus; N., V., A. = Nervus, Vena, Arteria; R. = Ramus; Lnn. = Lymphonoduli)

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 1 | <i>M. coccygeus dorsalis</i> | 17 | <i>M. flexor digitorum longus, Tibia</i> |
| 2 | <i>M. coccygeus ventralis</i> | 18 | <i>A. et V. iliaca externa dextra</i> |
| 3 | <i>M. obturatorius externus,</i>
<i>Pars intrapelvina</i> | 19 | <i>Truncus pudendoepigastricus</i>
<i>V. pudendoepigastrica</i> |
| 4 | <i>M. psoas minor</i> | 20 | <i>N., A. et V. femoralis</i> |
| 5 | <i>M. psoas major</i> | 21 | <i>V. caudalis femoris proximalis,</i>
<i>R. muscularis n. femoralis</i> |
| 6 | <i>M. tensor fasciae latae</i> | 22 | <i>Insertio m. sartorii</i> |
| 7 | <i>M. rectus femoris</i> | 23 | <i>N. et A. saphena, V. saphena medialis</i> |
| 8 | <i>M. pectineus</i> | 24 | <i>A., V. et N. obturatorius</i> |
| 9 | <i>M. vastus medialis</i> | 25 | <i>A. et V. pudenda interna</i> |
| 10 | <i>M. adductor</i> | 26 | <i>A. et V. perinealis ventralis,</i>
<i>N. perinealis superficialis (N. labialis)</i> |
| 11 | <i>M. gracilis</i> | 27 | <i>M. lumbosacrocaudalis ventralis lateralis</i> |
| 12 | <i>M. semimembranosus</i> | 28 | <i>M. lumbosacrocaudalis dorsalis lateralis</i> |
| 13 | <i>M. semitendinosus</i> | 29 | <i>Lnn. iliaci laterales</i> |
| 14 | <i>M. gastrocnemius,</i>
<i>Caput mediale</i> | | |
| 15 | <i>M. tibialis caudalis</i> | | |
| 16 | <i>M. flexor digiti I (hallucis) longus</i> | | |

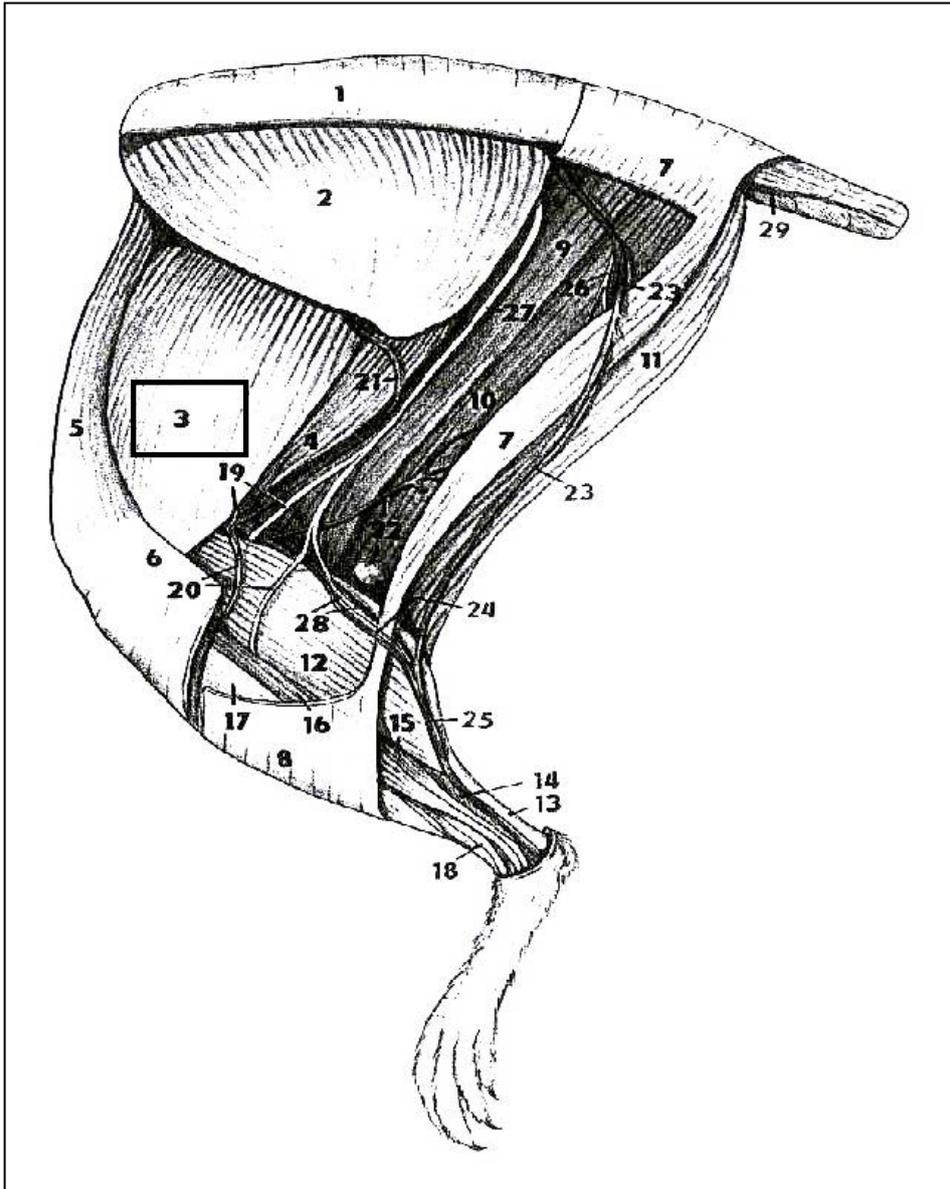


Abb. 7: Darstellung der Oberschenkelmuskulatur bei der Maus – laterale Ansicht
(nach POPESKO et al., 1992)

(Abk.: M. = Musculus; N., V., A. = Nervus, Vena, Arteria; R. = Ramus ; Ln. = Lymphonodulus)

- | | | | |
|----|--------------------------------------|----|---|
| 1 | M. gluteus superficialis | 17 | M. tibialis cranialis |
| 2 | M. gluteus medius | 18 | Tendo m. peronei longi |
| 3 | M. rectus femoris | 19 | V. caudalis femoris, N. tibialis |
| 4 | M. vastus lateralis | 20 | R. cranialis v. saphenae lateralis |
| 5 | M. tensor fasciae latae | 21 | R. ascendens v. caudalis femoris |
| 6 | Fascia lata | 22 | R. muscularis ad m. semimembranosum,
Ln. popliteus |
| 7 | M. biceps femoris | 23 | V. ischiadica |
| 8 | Fascia cruris | 24 | V. saphena lateralis |
| 9 | M. adductor | 25 | R. caudalis v. saphenae lateralis |
| 10 | M. semimembranosus | 26 | R. muscularis n. ischiadici |
| 11 | M. semitendinosus | 27 | N. ischiadicus |
| 12 | M. gastrocnemius,
Caput laterale | 28 | N. cutaneus surae caudalis,
A. caudalis femoris |
| 13 | Tendo m. tricipitis surae | 29 | V. caudalis lateralis |
| 14 | M. flexor digiti I (hallucis) longus | | |
| 15 | M. extensor digitorum lateralis | | |
| 16 | M. extensor digitorum longus | | |

 Entnahmestelle

3.3 Präparationstechnik

3.3.1 Probenentnahme

Die Mäuse wurden mittels Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Unmittelbar darauf erfolgten die Bestimmung der Körpermasse in Gramm sowie die Entnahme des gesamten M. quadriceps femoris der *linken* Körperseite durch Abtrennung von der Patella, dem Os femoris und dem Os ilium mittels Präparierschere, Pinzette und Skalpell.

Bei der Präparation des M. quadriceps femoris-Komplexes wurde darauf geachtet, daß sie unter minimaler mechanischer Beanspruchung des Untersuchungsgutes, wie etwa Zerren und Quetschen des Muskels, erfolgte. Dieser wurde sodann in einen Laborbecher gegeben, der mit auf ca. 4 °C gekühltem 3 %igen Glutardialdehyd als Fixierungsmittel gefüllt war. Die Zeitspanne zwischen der Tötung des Untersuchungstieres und diesem Erstkontakt mit dem Glutardialdehyd betrug zwischen 0,75 und 1,5 Minuten. Nach einer Einwirkungszeit des Fixierungsmittels von ca. 1 Minute wurde der M. rectus femoris freipräpariert. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und einer Skalpell- oder Rasierklinge erfolgte unter größtmöglicher mechanischer Schonung des zu untersuchenden M. rectus femoris die Abtrennung der benachbarten Muskeln. Nach der Präparation des M. rectus femoris wurde er in kleine Streifen mit einer maximalen Querschnittsfläche von 1 mm² geschnitten, um eine optimale Aufbereitung für die nachfolgenden Untersuchungen zu gewährleisten.

Die Muskelproben wurden sodann mit 3 %igem Glutardialdehyd mindestens 3 Stunden lang bei einer Temperatur von ca. 4 °C, die durch Eiskühlung sichergestellt wurde, fixiert. Im Anschluß wurden sie in 0,1 molarer Natriumphosphatpufferlösung (pH = 7,2) mehrmals gewaschen. Die Temperatur dieser Pufferlösung betrug ebenfalls ca. 4 °C.

Zeitgleich wurde der kontralaterale M. rectus femoris für die histologisch-histochemischen Untersuchungen aufbereitet. Auf die Ergebnisse wird in der Diskussion zurückgegriffen. Die Methodik ist bei FIEDLER und BRANSCHIED (1998) beschrieben.

3.3.2 Probenaufbereitung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

3.3.2.1 Einbettungstechnik

Bei der Aufbereitung der gewonnenen Skelettmuskelproben für die geplanten elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die in Tabelle 13 dargestellten Arbeitsschritte durchlaufen.

Tabelle 13: Arbeitsschritte für die Einbettung der Skelettmuskelproben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Arbeitsschritt	Chemikalien	Zeitdauer	Bemerkungen
Probenentnahme			
Probenzerkleinerung			
Vorfixation	3 % Glutardialdehyd	0,5 bis 4 Stunden	Temp. = 4 °C Lösung ist einmal zu wechseln
Waschen	Natriumphosphatpuffer (0,1 molar, pH = 7,2)	mindestens 0,5 Stunden, höchstens 3 Tage auf Puffer stehen lassen	Temp. = 4 °C Lösung ist mehrmals zu wechseln
Fixation	2 % Osmiumtetroxid	1,5 bis 2 Stunden	Temp. = 4 °C
Waschen	Natriumphosphatpuffer (0,1 molar, pH = 7,2)	15 Minuten	Temp. = 4 °C Lösung ist dreimal zu wechseln
Entwässerung	1. 30% Ethylalkohol 2. 50% Ethylalkohol 3. 70% Ethylalkohol 4. 96% Ethylalkohol 5. abs. Ethylalkohol 6. Propylenoxid	15 Minuten 30 Minuten 2 x 15 Minuten 2 x 15 Minuten 3 x 20 Minuten 2 x 7,5 Minuten	Zimmertemperatur
Entalkoholisierung	Eponmischung 1 : 1 mit Propylenoxid	45 Minuten	Zimmertemperatur
Einbettung	Eponmischung	60 Minuten	Zimmertemperatur
	Eponmischung in Silikon-Kautschuk-Formen	1. über Nacht	Temp. = 35 °C
		2. 24 Stunden	Temp. = 45 °C
		3. 24 Stunden	Temp. = 60 °C

Die Einbettung der M. rectus femoris-Teilstücke erfolgte in Form der Flacheinbettung. Diese gestattet eine gezielte Ausrichtung der streifenförmigen Skelettmuskelproben in den einzelnen mit Epon 812-Mischung gefüllten Einbettungsfächern der Silikon-Kautschuk-Formen mit dem Ziel der Schaffung einer möglichst großen exakten Querschnittsfläche für die nachfolgenden Semi- und Ultradünnschnittechniken.

Von jedem zu untersuchenden Tier wurden vom linken M. rectus femoris 5 Teilstücke eingebettet.

3.3.2.2 Herstellung und Färbung der Semidünnschnitte

Die Kunstharzblöckchen wurden für die nachfolgenden Schneidetechniken unter Verwendung einer Trimmvorrichtung (TM 60 der Fa. Reichert-Jung, Nußloch) auf die Größe der eingebetteten Skelettmuskelproben getrimmt. Hierbei wurde darauf geachtet, daß eine nichtsymmetrische Form der Querschnittsfläche der Gewebeproben entstand, um die Wiederfindung der markierten Abschnitte zu erleichtern.

Anschließend erfolgte die Herstellung von Semidünnschnitten mit einer Schnittdicke von 1 bis 5 µm. Für diesen Arbeitsschritt wurde das Gerät LKB-Ultratom III (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden) benutzt. Pro Flacheinbettung wurde 1 Semidünnschnitt angefertigt. Demzufolge standen für die Untersuchung eines Tieres bzw. eines M. rectus femoris 5 Semidünnschnitte zur Verfügung, die auf einen Objektträger aufgezoogen wurden.

Nach Lufttrocknung und Hitzefixierung in einem Heißluftsterilisator (1 Stunde bei einer Temperatur von 95 °C) wurden die Semidünnschnitte mit einer 1 %igen alkoholischen (Isopropanol : Methanol = 1 : 1) p-Phenylendiamin-Lösung gefärbt (BÖCK, 1984). Die Färbung erfolgte bei Zimmertemperatur über eine Zeitdauer von 20 Minuten. Die vollständige Auflösung des p-Phenylendiamins im Lösungsmittel wurde dadurch sichergestellt, daß die Lösung 3 Stunden vor Beginn der Färbeprozedur hergestellt wurde.

Die Färbung mit p-Phenylendiamin gestattete in den Skelettmuskelfasern die Unterscheidung zwischen Typ-I-, Typ-IIA- und Typ-IIB-Fasern anhand der Markierung von Triglyzeriden (Fettvakuolen) und Phospholipiden (Mitochondrien). Ausschlaggebend hierfür waren die Farbunterschiede, die entweder durch eine differierende Farbstoffaffinität oder unterschiedliche Fettkonzentrationen entstanden sind. So stellten sich die Fettvakuolen als dunkelbraune, fast schwarze Granula bzw. als deren „Negativbilder“ dar, während die weniger dunkelbraunen Granula als Mitochondrien anzusehen waren (s. Tabelle 6 auf Seite 14).

Nach der Färbung wurden die Semidünnschnitte in einem 1 : 1 - Gemisch von Iso-
propanol und Methanol gespült, luftgetrocknet und mit Entellan (Fa. Merck,
Darmstadt) eingedeckt.

Anschließend erfolgten die lichtmikroskopische Beurteilung der Semidünnschnitte mit
dem Ziel der Faserdifferenzierung in Typ-I-, Typ-IIA- und Typ-IIB-Fasern und die
Auswahl geeigneter Skelettmuskelfaserareale für die Herstellung der trans-
missionselektronenmikroskopischen Präparate. Als Eignungskriterien dienten die
Darstellung von korrekten Faserquerschnittsflächen sowie das Vorhandensein
möglichst vieler Typ-IIB-Fasern im Querschnittspräparat.

3.3.2.3 Herstellung und Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Nach der Selektion geeigneter Semidünnschnittareale wurden mit einem
Ultramikrotom (Ultracut S, Fa. Reichert-Jung, Nußloch) Ultradünnschnitte mit einer
Dicke von ca. 70 nm hergestellt und diese auf Kupfernetze (Target Cu, Durchmesser
3 mm, 200 Mash, Fa. Tesla, Brno) aufgebracht. Die anschließende Kontrastierung
erfolgte entweder mit dem Kontrastierungsgerät LKB 2168 Ultrastainer (LKB-
Produkte AB, Bromma, Schweden) oder per Hand.

Tabelle 14 gibt Auskunft über die Teilschritte des *maschinellen Kontrastierungs-
verfahrens*.

Tabelle 14: Kontrastierung von Ultradünnschnitten mit dem LKB 2168 Ultrastainer

Arbeitsschritt	Chemikalien	Zeitdauer	Temperatur
Kontrastierung I	Uranylazetat	30 Minuten	40 °C
Spülung I	Aqua bidestillata	4,5 Minuten	Zimmertemperatur
Kontrastierung II	Bleizitrat	1,3 Minuten	20 °C
Spülung II	Aqua bidestillata	5 Minuten	Zimmertemperatur

Die angegebenen Färbechemikalien wurden unter den Handelsnamen Ultrastain I (Uranylazetatlösung) und II (Bleizitratlösung) von der Fa. LKB-Produkter AB, Bromma (Schweden), bezogen.

Bei dem *manuellen Kontrastierungsverfahren* wurden die Ultradünnschnitte durch Auflegen der Kupfernetze auf einzelne Tropfen der Chemikalienlösungen kontrastiert. Hierbei wurden die Netze für 5 Minuten der Uranylazetatlösung und für 10 Minuten der Bleizitratlösung ausgesetzt. Zwischen und nach diesen Behandlungen erfolgten Spülungen mit Aqua bidestillata und anschließend die Lufttrocknung. Es wurden die gleichen Chemikalienlösungen wie bei der maschinellen Kontrastierung verwendet.

Pro Semidünnschnitt wurden zwei Kupfernetze mit einer variablen Anzahl von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereitgestellt.

3.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopische Sichtung der Ultradünnschnitte sowie die Anfertigung von Mikrofotogrammen erfolgte an den Transmissionselektronenmikroskopen BS 500 (Fa. Tesla, Brno) sowie EM 10 A (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) bei Spannungen von 90 kV (BS 500) bzw. 40 und 60 kV (EM 10 A).

Zunächst wurden die Kupfernetze bei 1250facher Vergrößerung orientierend durchgemustert und eine Differenzierung der dargestellten Skelettmuskelfasern in Typ-I-, Typ-IIA- und Typ-IIB-Fasern vorgenommen. Als Differenzierungskriterien kamen neben der Faserquerschnittsfläche vor allem die Größe, Anzahl und Verteilung der Mitochondrien, die Ausbildung des sarkoplasmatischen Retikulums und das Vorhandensein von Neutralfettpartikeln zur Anwendung. Da für die quantitativ-elektronenmikroskopischen Analysen das Augenmerk auf die Typ-IIB-Fasern gelegt wurde, war der nächste Arbeitsschritt das Aufsuchen geeigneter Typ-IIB-Faserareale für die fotografischen Darstellungen.

Die entsprechenden Eignungskriterien gehen aus der Tabelle 15 auf Seite 60 hervor. Von den geeigneten Typ-IIB-Fasern wurden je 15 Aufnahmen aus verschiedenen Faserbereichen bei einer Vergrößerung von 1 : 10000 angefertigt, um eine

repräsentative ultrastrukturelle Faserbeschaffenheit zu gewährleisten. Unter Berücksichtigung der Bildmaße der Glasplatten (Elektronenmikroskop BS 500) bzw. der Filmnegative (Elektronenmikroskop EM 10 A) konnte auf einem Mikrofotogramm eine Skelettmuskelfaserteilfläche von 49,0 bis 70,5 μm^2 dargestellt werden.

Tabelle 15: Eignungskriterien für die fotografische Darstellung der Skelettmuskelfasern vom Typ IIB

	Eignungskriterien
Ultradünnschnittpräparate	keine Verschmutzungen durch Chemikalienausfällungen oder Staubpartikel keine Überlagerungen von Ultradünnschnitten keine Artefakte knitterfreie Lagerung der Ultradünnschnitte auf dem Kupfernetz ausreichende Kontraste
Typ-IIB-Faserareale	Vorhandensein einer ausreichenden Faserquerschnittsfläche für die Herstellung von 15 Mikrofotogrammen exakter Querschnitt (punktförmige Darstellung der Myofilamente)

3.5 Durchführung der morphometrischen Untersuchungen und statistische Auswertung der Meßergebnisse

3.5.1 Technische Voraussetzungen

Die Auswertung der fotografischen Faserquerschnittsdarstellungen erfolgte direkt anhand der Mikrofotogramme. Hierdurch konnte ein optischer Informationsverlust, wie er beim Vergrößern und bei der Herstellung von Positivbildern entstanden wäre, ausgeschlossen werden. Die morphometrischen Bestimmungen wurden mit Hilfe des Bildanalyse-Systems Quantimet 500 (Fa. Leica Cambridge Ltd., Cambridge) vorgenommen. Das Quantimet 500 besteht aus folgenden Komponenten:

- Systemeinheit mit Mouse, Tastatur und Monitor
- CCD-Videokamera
- Softwareschutz („Dongle“)

- QWIN, DOS-Betriebssystem und Windows 3

Alle Messungen erfolgten planimetrisch am Live-Bild bei Durchlicht. Hierzu wurden die Mikrofotogramme auf einen Lichtkasten gelegt, der sich direkt unter der CCD-Videokamera befand. Störende Lichteinflüsse wurden unter Benutzung eines der Mikrofotogrammgröße entsprechenden Rahmens ausgeschaltet. Nach Fokussierung des Bildes an der Kamera erfolgte die Kalibrierung mit Hilfe eines auf das Bild aufgelegten Lineals. Bei einer Vergrößerung von 1 : 10000 entspricht 1 cm auf dem Mikrofotogramm der Darstellung von 1 μm Skelettmuskelgewebe. Für eine Strecke von 4 cm auf dem Lineal wurde eine Entfernung von 4 μm in das Bildverarbeitungsgerät eingegeben.

3.5.2 Identifizierung von Typ-IIB-Fasern

Um die Typ-IIB-Fasern fotografisch darstellen zu können, war die Typisierung der Skelettmuskelfasern mehrfach erforderlich. Zum einen mußte die Faserklassifizierung am Semidünnschnitt durchgeführt werden, um die Herstellung von geeigneten Ultradünnschnitten mit möglichst allen drei Skelettmuskelfasertypen in korrekter Ausrichtung zu ermöglichen. Die Zuordnung der Skelettmuskelfasern zu den einzelnen Fasertypen im Ultradünnschnitt war für die nachfolgenden fotografischen Arbeiten notwendig. Das Auffinden der Skelettmuskelfasern vom Typ IIB erfolgte im Semidünnschnitt anhand der Faserquerschnittsfläche, der färberischen Darstellung sowie der Menge und Verteilung der subzellulären Strukturen (s. Tabelle 6 auf Seite 14). Bei der Sichtung der Ultradünnschnitte kamen zusätzlich morphologische Kriterien wie Ausbildung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie die Größe, Struktur und die Verteilung von Mitochondrien zur Anwendung.

3.5.3 Erfassung morphologischer Parameter

Die Auswahl der Merkmale für die Untersuchung der Ultrastruktur der Skelettmuskelfaser vom Typ IIB zur Ableitung selektionsbedingter Differenzen zwischen den Mauslinien erfolgte in Auswertung von Veröffentlichungen, in denen der Skelettmuskelfaseraufbau mit bzw. ohne Berücksichtigung der Fasertypen beschrieben wird (OGATA, 1964; GAUTHIER, 1969; SCHMALBRUCH, 1971). Darüber hinaus wurden neue Parameter entwickelt und für den Vergleich der Selektionslinien herangezogen. Folgende Strukturparameter wurden bestimmt:

1. Querschnittsflächen der Myofibrillen
2. Querschnittsflächen der Myofibrillen mit Teilungsanzeichen
3. Größenverhältnisse zwischen den Myofibrillen mit Teilungsanzeichen und den Myofibrillen ohne Teilungsanzeichen
4. Prozentuale Anteile der Myofibrillen mit Teilungsanzeichen an der Gesamtmyofibrillenanzahl
5. Querschnittsflächen der Mitochondrien
6. Anzahl der Mitochondrien pro $100 \mu\text{m}^2$ Skelettmuskelfaserfläche
7. Prozentuale Anteile der Mitochondrienflächen an der Gesamtfläche der Skelettmuskelfaser vom Typ IIB
8. Prozentuale Anteile der Myofibrillenflächen an der Gesamtfläche der Skelettmuskelfaser vom Typ IIB
9. Prozentuale Anteile der Flächen der mitochondrien- und myofibrillenfreien Strukturen an der Gesamtfläche der Skelettmuskelfaser vom Typ IIB

Zunächst wurde die Anzahl der auf den Mikrofotogrammen vollständig abgebildeten Myofibrillen sowie die der Myofibrillen mit Teilungsanzeichen ermittelt, um die prozentualen Anteile der sich teilenden Myofibrillen an der Gesamtmyofibrillenanzahl berechnen zu können.

Mit Hilfe des Bildverarbeitungs- und Analysesystems Quantimet 500 wurden die Querschnittsflächen der einzelnen Myofibrillen mit und ohne Teilungsanzeichen sowie die der einzelnen Mitochondrien ermittelt. Ausgehend von den planimetrischen Messungen, die an den Myofibrillen durchgeführt wurden, konnte das unter dem Punkt 3 genannte Merkmal berechnet werden.

Für die Bestimmung der unter den Punkten 6 bis 9 aufgeführten Strukturmerkmale erfolgten die notwendigen Messungen am Quantimet 500 innerhalb eines Meßrahmens, der unter Berücksichtigung der Vergrößerung der Mikrofotogramme einen Flächeninhalt von $21,2 \mu\text{m}^2$ aufwies. Für alle in diesem Meßrahmen enthaltenen ultrastrukturellen Faserelemente wurden die jeweiligen Querschnittsflächen bestimmt. Für die Mitochondrien wurde auch die Anzahl ermittelt.

Zur Charakterisierung einer Skelettmuskelfaser vom Typ IIB wurden insgesamt 12 Mikrofotogramme ausgewertet. Pro Tier wurden an 3 zufällig ausgewählten Fasern diesen Typs die auf Seite 62 genannten Merkmale bestimmt. Pro Mauslinie und Altersgruppe erfolgten die Messungen an jeweils 5 Mäusen, d. h., pro Linie und Altersgruppe wurden 15 Skelettmuskelfasern ausgewertet. Damit wurden von 40 Mäusen 120 Skelettmuskelfasern vom Typ IIB anhand von 1440 Mikrofotogrammen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht.

Zur Ermittlung der jeweiligen Querschnittsflächen der ausgewählten ultrastrukturellen Elemente wurde die Anzahl der zu messenden Objekte pro Mikrofotogramm auf 10 Mitochondrien, 10 Myofibrillen bzw. 10 Myofibrillen mit Teilungsanzeichen begrenzt. Lag die Anzahl der zu messenden Objekte darunter, wurden alle vermessen. Dieses Vorgehen wurde anhand der Ergebnisse biometrischer Voruntersuchungen empfohlen (NÜRNBERG, prs. Mitteilung).

3.5.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der morphologischen Parameter wurde ein Modell einer vierfachen Varianzanalyse angewendet. Einbezogen wurden die Faktoren Mauslinie (DU-Ks, DU-6, DU-6+LB, DU-6P), Alter (43, 73 Tage), Skelettmuskelfaser (1, 2, 3) und Mikrofotogramm (1,...,12). Die Auswertung erfolgte mit der Prozedur „MIXED“ des Statistik-Programmpaketes SAS[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, USA, 1990). Als fixe Faktoren wurden Mauslinie und Alter, als zufällige Faktoren Skelettmuskelfaser und Mikrofotogramm verwendet. Nach eingehender Modellprüfung wurde die Wechselwirkung Linie*Alter mit in das Modell aufgenommen.

Bei der Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Mauslinien bzw. den Altersgruppen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ zugrunde gelegt.