

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Versuchstiere**

#### **3.1.1. Tierhaltung**

Die Mäuse beider Versuchsgruppen wurden in getrenntgeschlechtlichen Geschwistergruppen bis zu sechs Tieren in Makrolonkäfigen Typ II auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Als zusätzliche Rückzugsmöglichkeit dienten den Mäusen Wattedecks. Den Tieren stand Alleinfutter für Ratten und Mäuse der Firma ssniff (Inhaltsstoffe: Rohprotein 19,0%, Rohfett 3,30%, Rohfaser 4,90%, Rohasche 6,70%, sowie Zusatz von Vitaminen, Aminosäuren, Mengen- und Spurenelementen) sowie Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

Die Belüftung der Käfige erfolgte mittels einer Gebläseeinheit der Firma Ehret, wobei die Raumtemperatur konstant bei 22 +/- 2°C und die relative Luftfeuchtigkeit bei 55 +/- 5% lag.

#### **3.1.2. Genehmigung des Tierversuchs**

Da bereits eine Genehmigung für die vorausgegangenen Studien vorlag wurde am 13.5.2005 eine Änderungsanzeige an die zuständige Behörde gestellt, welche am 7.6.2005 von der Bezirksregierung Berlin genehmigt wurde.

#### **3.1.3. Untrainierte Tiere**

Eine Gruppe von 46 Tieren bestehend aus 27 weiblichen und 19 männlichen Mäusen des Stammes C57Bl/06, bzw. 129SV wurde untrainiert im Alter von 48 Wochen echokardiographisch untersucht. Die Gruppe der Weibchen bestand aus 14 Wildtypmäusen und 13 transgenen Tieren, die der Männchen aus sechs Wildtypen und 13 PKP4<sup>gt</sup> Mäusen beider Stämme. Die Untersuchungen und Auswertungen wurden hinsichtlich des Genotyps geblindet durchgeführt.

#### **3.1.4. Trainierte Tiere**

Eine Gruppe von 22 Tieren bestehend aus zwölf weiblichen und zehn männlichen Mäusen des Stammes C57Bl/06 wurde im Alter von acht Wochen einem zweimonatigen

Schwimmtraining unterzogen. Dabei handelte es sich um Gruppen bestehend aus je acht weiblichen und vier männlichen Wildtypmäusen und je vier weiblichen und sechs männlichen transgenen Tieren. Die Tiere wurden vor- und nach Beendigung des Trainings echokardiographisch untersucht. Sowohl Schwimmtraining als auch die sonographische Analyse wurde hinsichtlich des Genotyps geblindet durchgeführt.

## **3.2. Elektrophysiologische Untersuchungen**

### **3.2.1. Geräte**

Digitale Aufzeichnungen:	AC 264 EKG Verstärker (EMKA Technologies, Paris) IOX EKG-Software
Manuelle Aufzeichnungen:	EKG-Schreiber (Siemens Megacart, 1993 Siemens Erlangen)
Elektrodengel:	Elektrodengel (Signalgel, Fa. Parker; Fairfield, USA)

### **3.2.2. Durchführung**

Bei allen 48 Tieren der ersten Versuchsgruppe wurden zeitgleich sowohl ein digitales 6 Kanal EKG (EMKA Technologies ECG Autor user manual) wie auch ein manuelles 6 Kanal EKG (Siemens Megacart, 1993 Siemens Erlangen) aufgezeichnet. Es wurden die bipolaren Standardableitungen I, II und III nach Einthoven sowie die unipolaren Standardableitungen aVR, aVL, aVF nach Goldberger abgeleitet. Das manuelle EKG wurde bei einer Laufgeschwindigkeit von 20 mm/s und Amplitudenhöhe von 10 mm/mV auf handelsüblichem EKG-Papier ausgedruckt. Es wurde ein Tremorfilter 35 Hz und ein Schwächungsfilter 100 Hz verwendet.

Es wurde ein Oberflächen-EKG vor der echokardiographischen Untersuchung der Maus unter Isoflurannarkose erstellt. Am Ende der Echokardiographie wurde ein zweites EKG ebenfalls unter Isoflurannarkose, jedoch nach i.v. Injektion von Isoprenalin aufgezeichnet.

Die Tiere wurden während der gesamten Untersuchungsphase mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (2% Isofluran, 98% Sauerstoff) narkotisiert. Ein rektal eingeführter Temperatursensor ermöglichte die Regulation der Körpertemperatur mittels Wärmeplatte und einer Rotlichtlampe.

Zur Aufzeichnung der Oberflächen-EKGs wurden die Mäuse zunächst in Rückenlage gebracht. Die Gliedmaßen der Mäuse wurden mit Elektrodengel benetzt und

Schlaufenelektroden aus weichem, geflochtenem, nichtoxidierbarem Stahldraht wurden sanft darüber gezogen.

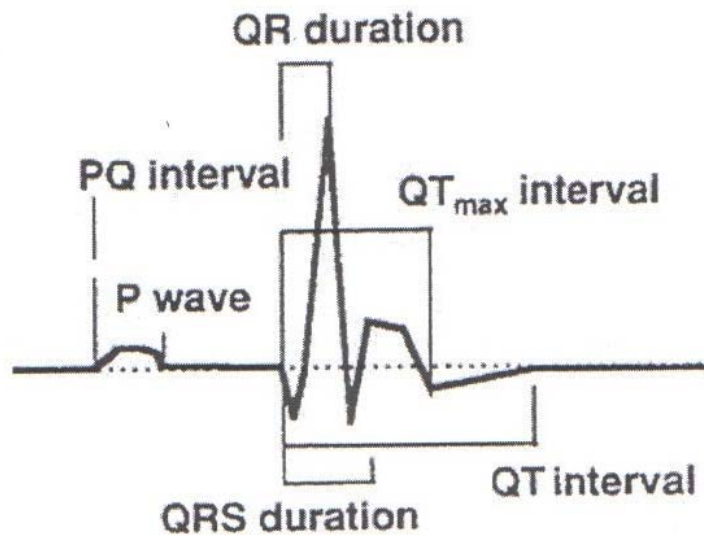
Die EKG-Schlaufenelektroden waren mit einem herkömmlichen EKG-Schreiber (Siemens Megacart, 1993 Siemens Erlangen) für die manuelle Aufzeichnungen und gleichzeitig mit einem AC 264 EKG Verstärker (EMKA Technologies, Paris) verbunden, so dass zusätzlich ein digitales EKG mit IOX-Software auf dem Computer aufgezeichnet werden konnte.

### **3.2.3. Auswertung der Oberflächenelektrokardiogramme**

Die Auswertung der Daten erfolgte bezüglich des Genotyps (Wildtyp, trangeses Tier) geblindet. Die Oberflächen-EKGs wurden digital und zum Teil manuell ausgewertet. Zur digitalen Auswertung wurde die Software „ecg Auto 1.5.7.36“ (EMKA Technologies, Paris) verwendet. Hierbei wurden automatisch bis zu 20 einzelne Herzschläge übereinander gelegt und somit ein durchschnittlicher Komplex erstellt. Bei 3 von diesen „average beats“ wurden folgende Punkte bestimmt: Anfang/ Höhepunkt/ Ende der P-Welle, Q, R, S, Anfang/ Ende der T-Welle und die Nulllinie.

Aus diesen Daten errechnet das Programm den PR-Abstand (XuBaribault Adamson), P-Wellendauer (XuBaribault Adamson), QRS-Dauer (XuBaribault Adamson), QT-Dauer (XuBaribault Adamson), S bis Anfang T-Welle (XuBaribault Adamson), T-Wellendauer (XuBaribault Adamson), RR-Abstand (XuBaribault Adamson), P-Wellen-Amplitude (mV), Q-Amplitude (mV), R-Amplitude (mV), S-Amplitude (mV), T-Wellen-Amplitude (mV), relative/ absolute Fläche unter der P-Welle (mV\*ms), relative/ absolute Fläche unter dem QRS-Komplex (mV\*ms), relative /absolute Fläche unter der T-Welle (mV\*ms) und die Herzfrequenz (Schläge/min). Dies erfolgte für jede der Standardableitungen (I, II, III, aVR, aVL, aVF). Aus den drei Einzelwerten wurde der jeweilige arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung für jeden Parameter ermittelt.

Zusätzlich wurden Papier-EKGs von einigen Mäusen manuell ausgewertet. Dabei wurde der Herzrhythmus, die Amplitude und die Dauer der P-Welle, die Amplitude des QRS-Komplexes, die Dauer des PQ sowie des RR-Intervalls bestimmt. Aus zehn gemessenen Einzelwerten wurden Mittelwert und Herzfrequenz errechnet. Hierbei wurden ebenso alle Standardableitungen analysiert.



**Abbildung 8:**  
**Schematische Darstellung eines einkanaligen Maus-Elektrokardiogramms**  
 (Hagendorff et al., 1999)

### 3.3. Echokardiographische Untersuchungen

#### 3.3.1. Geräte

Sonos 5500 (Philips Medizin Systeme GmbH; Hamburg)  
 Vevo 770 (VisualSonics Inc.; Toronto, Ontario, Canada)  
 Narkosegerät (VisualSonics Inc.; Toronto, Ontario, Canada)  
 Schermaschine (B.Braun Melsungen AG; Melsungen)

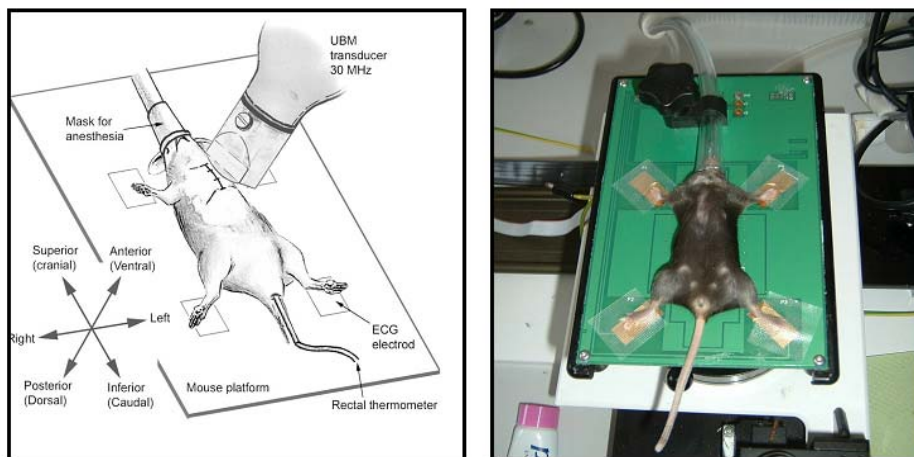
#### 3.3.2. Materialien

Ultraschallgel (Aquasonic 100; Fa. Parker; Fairfield, USA)  
 Elektrodengel (Signa Gel; Fa. Parker; Fairfield, USA)  
 Enthaarungscreme (Veet® ; Reckitt Benckiser Deutschland GmbH)  
 Klebestreifen  
 Wärmelampe

#### 3.3.3. Durchführung

Zur Durchführung der Ultraschalluntersuchung wurde die Maus zunächst unter Isoflurannarkose (Isofluran 2%, Sauerstoff 98%) anästhesiert. Anschließend musste der Brustkorb, sowie der kraniale Bauchbereich, mit Hilfe einer Schermaschine und anschließender Applikation einer medizinischen Enthaarungscreme vom Haarkleid befreit werden.

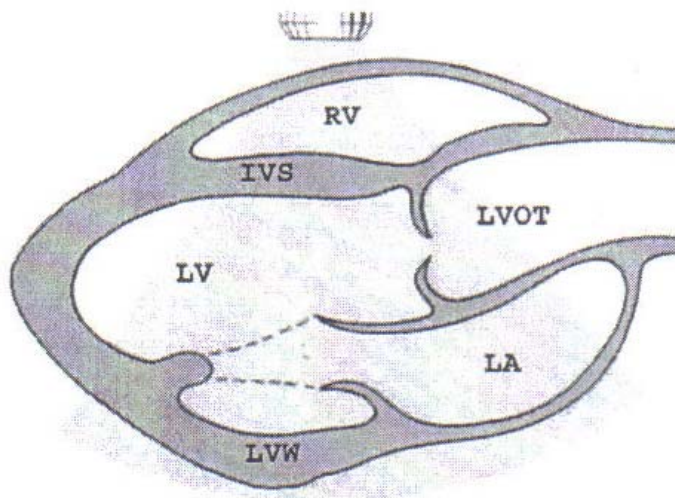
Die sedierte Maus wurde in Rückenlage mit Hilfe von Steristrips an den Gliedmaßen auf einer Metallwärmeplatte sanft fixiert. Über einen rektal eingeführten Temperaturmessfühler wurde die Temperatur der Metallplatte automatisch in Abhängigkeit zu der Körpertemperatur der Maus gegenreguliert. Während der sonographischen Untersuchung mit dem Sonos5500 Ultraschallgerät wurden mit Kontaktgel benetzte EKG-Elektrodenplättchen unter die beiden Vorderpfoten und die linke Hinterpfote geschoben und in die Fixation integriert (**Abbildung 9**). Bei dem Vevo 770 System sind die EKG-Elektrodenplättchen bereits in die Wärmeplatte integriert. So konnte simultan mit der echokardiographischen Untersuchung ein Ein-Kanal-EKG aufgezeichnet werden. Die Herzfrequenz der anästhesierten Maus wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum kontrolliert und möglichst bei 400 bpm eingestellt. Der Brustkorb wurde nun mit zentrifugiertem und angewärmtem Ultraschallgel (frei von Luftfeinschlüssen) ca. zwei Zentimeter dick bedeckt.



**Abbildung 9:**  
**Lagerung und Fixation der Maus auf einer Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen während der echokardiographischen Untersuchung**

Nach Kippen der Wärmeplatte in einem Winkel von 15° nach links wurden zunächst mit einem 15 MHz (Sonos 5500), bzw. mit einem 30 MHz (Vevo 770) Linearschallkopf Längs- und Querachsenansichten des Herzens dargestellt. Hierbei wurden humanmedizinische

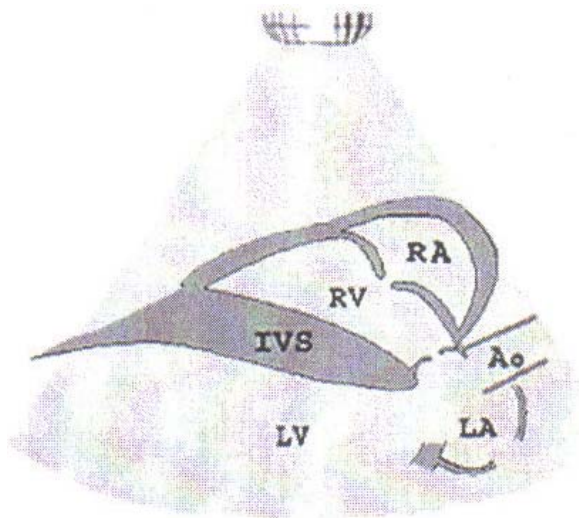
Standardeinstellungen zur Linksherzdarstellung gewählt. Bei der parasternalen langen Achsen-Ansicht liegt der Schallkopf zwischen dem linken Rippenbogen und der rechten Schulter. Hierbei sollen die Aortenklappe, die Mitralklappe und der linke Ventrikel in einer Achse liegen. Bei geschlossener Aortenklappe erschien diese als Mittelecho innerhalb der Aorta. Der linke Ventrikel schloß sich im Bild waagrecht nach links weisend an. Weiterhin sichtbar waren das linke Atrium und der rechte Ventrikel (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10:**  
**Schematische Darstellung einer echokardiographischen Längsachsenansicht des Herzens (modifiziert nach Köhler u. Tataru, 2001)**

- IVS: Inventrikuläres Septum
- LA: Linkes Atrium
- LV: Linker Ventrikel
- LVOT: Linksventrikulärer Ausflusstrakt
- LVW: Hinterwand des linken Ventrikels
- RV: Rechter Ventrikel

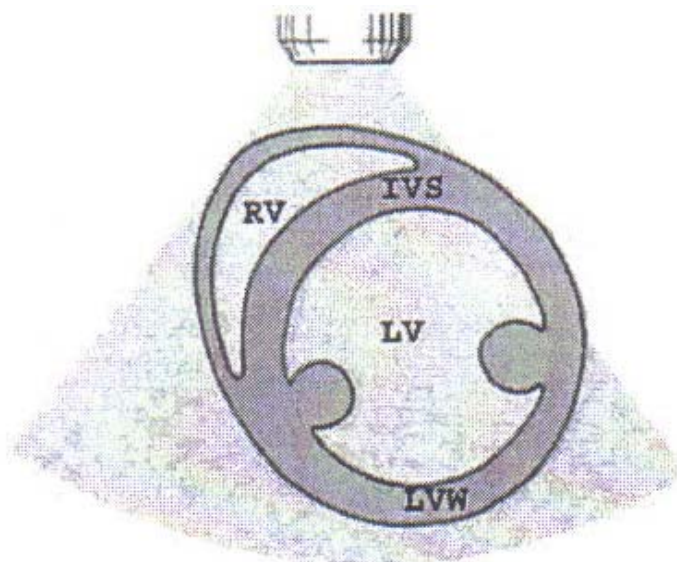
Durch Kippen des Schallkopfes um ca. 30° kann man die Trikuspidalklappe und die Pulmonalklappe, bzw. den rechtsventrikulären Ausflusstrakt (RVOT) visualisieren.



**Abbildung 11:**  
**Schematische Darstellung einer echokardiographischen Ansicht der Trikuspidal- und Pulmonalklappe des Herzens (modifiziert nach Köhler u. Tataru, 2001)**

Ao: Aorta  
 IVS: Interventrikuläres Septum  
 LA: Linkes Atrium  
 LV: Linker Ventrikel  
 RA: Rechtes Atrium  
 RV: Rechter Ventrikel

In der parasternalen Querachsenansicht (Drehung des Schallkopfes um 90° mit dem Uhrzeigersinn ausgehend von der parasternalen Längsachsenansicht) wurde die Standardeinstellung durch die Papillarmuskelebene repräsentiert. Der rechte Ventrikel lag dem runden linken Ventrikel dabei im linken oberen Bildausschnitt an (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12:**  
**Schematische Darstellung einer echokardiographischen Querachsenansicht des Herzens (modifiziert nach Köhler u. Tataru, 2001)**

IVS: Interventrikuläres Septum

LV: Linker Ventrikel  
LVW: Hinterwand des linken Ventrikels  
RV: Rechter Ventrikel

Kippt man dann den Schallkopf erneut um 30° wird der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt sichtbar. Ein Scan von der Aorten- und Mitralklappenebene bis zur Herzspitze wurde ebenfalls durchgeführt.

Time Motion-Modes (M-Mode) wurden in der parasternalen Längsachsenansicht dicht unterhalb der Mitralklappe mit Darstellung der rechten Ventrikelwand und des Ventrikels, des interventrikulären Septums, des linken Ventrikels und der linken Ventrikelwand angefertigt. Bei im Querschnitt auf Papillarmuskelebene angefertigten M-Modes wurde der Schallstrahl direkt zwischen die Papillarmuskeln gelegt. So konnten die gleichen Strukturen und die gleiche Ebene wie im Längsschnitt dargestellt werden.

Danach wurde die Maus wieder in eine waagerechte Position zurückgelagert um den 4-Kammerblick darzustellen. Der Schallkopf wurde vom kaudalen Sternum zur linken Achselhöhle weisend ausgerichtet und sanft, ohne Druck auszuüben, in das Gelkissen eingetaucht. In der bildlichen Darstellung lagen nun die beiden Vorhöfe seitenverkehrt in dem unteren Bildausschnitt. Die Hauptkammern schlossen sich den Vorhöfen im oberen Bildausschnitt an.

Zur Dopplerechokardiographie wurde ein 30 MHz- (Vevo 770) bzw. ein 12 MHz Sektorschallkopf (Sonos 5500) verwendet und die Heizplatte erneut, wie bereits beschrieben, gekippt. Dem 12 MHz Schallkopf wurde zur Linearisierung der Ultraschallsignale eine ca. 1 cm lange Vorlaufstrecke (Zeigefinger eines handelsüblichen puderfreien Latexhandschuhs) aus zentrifugiertem Ultraschallgel vorgeschaltet. Mittels Continious wave-Doppler (Sonos 5500), bzw. Pulsed wave-Doppler (Vevo 770) konnte der Blutstrom im Bereich der Aorten- und der Mitralklappe dargestellt werden. Der Schallkopf wurde dabei so ausgerichtet, dass im 2-D-Bild eine Längsachsenansicht des Herzens dargestellt wird. Der Strahl wurde durch die Aorta gelegt. Zur Darstellung des Blutstromes durch die Mitralklappe wurde der Schallkopf geneigt, so dass der Strahl durch die Mitralklappe gelegt wurde.

Zur Darstellung des Trikuspidalflusses wurde der Schallkopf so gestellt, dass der Strahl in seiner Verlängerung auf die rechte Schulter der Maus treffen würde (Annäherung an den apikalen Vierkammerblick).

Da sich häufig funktionelle und elektrophysiologische Unregelmäßigkeiten des Herzens erst unter Belastung zeigen, wurde die Untersuchung (M-Mode-Bilder des Querschnittes und Doppler-Bilder) nach intraperitonealer Gabe eines Sympathomimetikums (Isoprenalin 0,5 ml/kg KG) wiederholt. Durch Stimulation des Sympathikustonus lässt sich so eine vorübergehende Steigerung der Herzfrequenz bewirken.



Zur Minimierung der Untersuchungszeit wurden die Bilddaten digital auf Magneto-Optical Disc zur offline Analyse archiviert.

Nach der Untersuchung wurde die Maus von der Fixation befreit, sorgfältig vom Ultraschallgel gesäubert und anschließend noch mindestens zwei Stunden unter Rotlicht gehalten und beobachtet. Von der Sedation bis zum Ende der Untersuchung vergingen in der Regel 45 bis 50 Minuten.

### **3.3.4. Auswertung**

Die Analyse der Messungen erfolgte offline und von einem bezüglich des Genotyps (Wildtyp/Transgen) geblindeten Untersucher. Bei nicht optimal messbaren Variablen oder wenn die Anschallungsebene nicht den Standard Schnitten entsprach, wurden diese nicht in der Auswertung berücksichtigt.

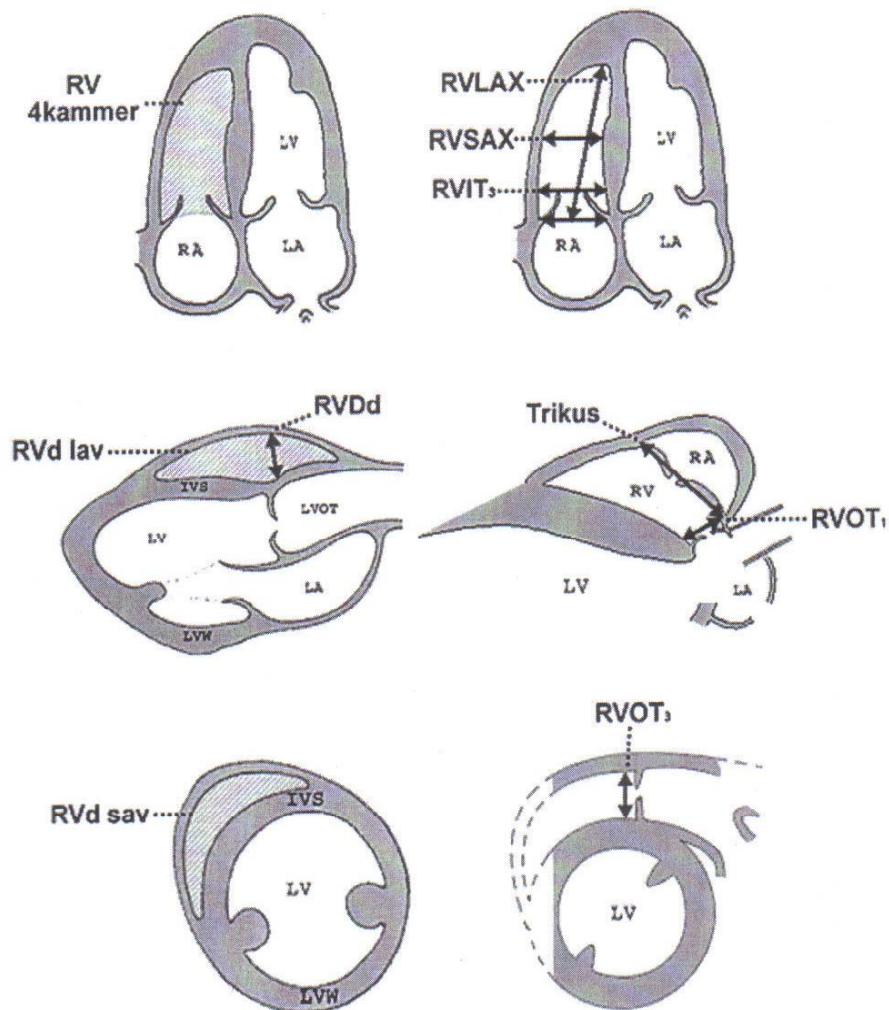
Beide Echokardiographiegeräte besitzen integrierte Meßsysteme, mit denen alle Messungen der verschiedenen Parameter ermittelt wurden. Alle quantitativen Distanzmessungen wurden nach den Leitlinien der „Amerikanischen Gesellschaft für Echokardiographie“ empfohlenen „Leading-Edge-Methode“ (jeweils von der Vorderkante der betroffenen Echolinie ausgehend) durchgeführt.

Es wurden neun Parameter zur Linksherzbestimmung in den zweidimensionalen Standardeinstellungen vermessen. In der prä-systolischen Längsachsenansicht wurde der linksatriale Durchmesser (LA), der linksventrikuläre Ausflusstrakt (LVOT) und der Aortenwurzeldurchmesser (AoV) gemessen. Für jeden Parameter in den zweidimensionalen Einstellungen wurden drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert ermittelt.

Für die weitere Linksherzvermessung wurden im M-Mode die Wanddicken des Septums (IVSd/ IVSs) und der linksventrikulären Kammerwand (LVPWd/LVPWs), sowie der linksventrikuläre Ventrikeldurchmesser (LVIDd/ LVIDs) in der Diastole und in der Systole gemessen. Aus Bildern des SONOS 5500 wurden für jeden Parameter zwei Messungen im M-Mode des Längsschnittes und drei Messungen im M-Mode des Querschnittes verwendet. Für Untersuchungen mit dem Vevo 770 wird empfohlen alle fünf Messwerte dem Querschnitt zu entnehmen. Aus diesen fünf Einzelwerten wurde dann jeweils der arithmetische Mittelwert für jeden Parameter bestimmt.

Des Weiteren wurden bei der Untersuchung der untrainierten einjährigen Mäuse 10 Parameter zur Rechtsherzbestimmung in den zweidimensionalen Standardeinstellungen gemessen (Foale et al., 1986) (**Abbildung 13**) Im apikalen Vierkammerblick wurde in der Diastole die rechtsventrikuläre Fläche (4kammer) bestimmt. Zusätzlich wurde die rechtventrikuläre Länge (RVLAX) vom Mittelpunkt des Anulus fibrosus dexter bis zum rechtsventrikulären Apex und der rechtsventrikuläre Einflusstrakt (RVIT<sub>3</sub>) im ersten Drittel

des rechten Ventrikels hinter dem Trikuspidalklappenring gemessen. Die maximale Ausdehnung im mittleren Drittel des rechten Ventrikels, der als Körper definiert wird, wird parallel zum Einflusstrakt des RVSAX gemessen. In der diastolischen Längsachsenansicht wurde die rechtventrikuläre Fläche (RVd lav) und der rechtsventrikuläre Diameter (RVDd) gemessen. Letztere Messung wurde senkrecht zur Aortenwurzel von der rechtsventrikulären freien Wand zur vorderen Begrenzung der vorderen Aortenwand vorgenommen. In der gekippten Längsachsenansicht bei gleichzeitiger Darstellung der Trikuspidal- und Pulmonalklappe, wird präsysstolisch die Trikuspidalklappe (TV) und der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt (RVOT<sub>1</sub>) gemessen. In der parasternalen Kurzachsenansicht wird diastolisch die rechtsventrikuläre Fläche (RVd sav) bestimmt. In der, von der Querachsenansicht ausgehenden rechtsventrikulären Ausflusstrakteinstellung wird präsysstolisch kurz vor dem Pulmonalklappenring der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt (RVOT<sub>4</sub>) gemessen.



**Abbildung 13: Gemessene Rechtsherzparameter modifiziert nach (FoaleNihoyannopoulosMcKennaKleinebenneNadazdin et al., 1986)**

**Trikus:** präsysolischer Durchmesser der Trikuspidalklappe, **RVDd:** diastolischer rechtventrikulärer Diameter in der Längsachsenansicht **RVLAX:** Länge des rechten Ventrikels in der Diastole, **RVSAx:** Breite des rechten Ventrikels in der Diastole, **RVIT3:** Durchmesser des Einflusstraktes des rechten Ventrikels in der Diastole, **RVOT1/ RVOT3:** präsysolischer Durchmesser des rechtventrikulären Ausflusstraktes bei gleichzeitiger Darstellung der Trikspidaleklappe/ vom Querschnitt ausgehend, **RV 4kammer/ RVd lav/ RVd sav:** diastolische Fläche des rechten Ventrikels gemessen im 4 Kammerblick/ Längsachsenansicht/ Querachsenansicht

Im CW, bzw. PW-Doppler wurden weitere 7 Linksherz- und Rechtsherzparameter gemessen. Im Aortendoppler wurde die maximale Flussgeschwindigkeit (AoVmax) als Punkt des frühdiastolischen Geschwindigkeitsmaximums, die Kontur des Aortenflusses, als Geschwindigkeits-Zeit-Integral (VTI = velocity time integral) und zur automatischen Errechnung des maximalen und durchschnittlichen Aortenflussesdruckes (Ao max PG/ Ao MPG), sowie der Abstand zwischen 2 Aortenausschlägen (Ao R-R) bestimmt.

Im Mitraldoppler wurde in der frühen Diastole die maximale Flussgeschwindigkeit (MV Vmax oder MV E-Punkt) direkt nach der Mitralöffnung gemessen. Von diesem Zeitpunkt der höchsten Flussgeschwindigkeit bis zum Ende des ersten Einstroms wurde die Dezelerationszeit (MV Decel-Zeit) in ms gemessen. Am Ende der Diastole wurde der Punkt der höchsten Flussgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Vorhofkontraktion (MV A Punkt), der zweite Einstrom, ermittelt. Zusätzlich wurde die Kontur des Mitralflusses zur automatischen Errechnung des maximalen und durchschnittlichen Mitraldruckes (MV max PG/ MV MPG) bestimmt.

Im Trikuspidaldoppler wurde ebenso der Punkt der höchsten Flussgeschwindigkeit (TV max) gemessen, im Gegensatz zum Mitraldoppler lag dieser meistens zum Zeitpunkt der Vorhofkontraktion vor, also bei dem zweiten Einstrom. Weiter wurde, ebenso wie bereits beim Aorten- und Mitraldoppler, die Kontur des Flusses umfahren um den maximalen und durchschnittlichen Trikuspidalflussdruck (TV max PG/ TV MPG) automatisch zu errechnen. Für jeden Parameter wurden jeweils drei Einzelwerte bestimmt und aus diesen der Mittelwert (arithmetisch) errechnet. Aus den gemessenen Werten wurden folgende Parameter rechnerisch ermittelt

**Tabelle 5)**

Parameter	Abkürzung	Formel	Einheit
Herzfrequenz	HF	$1000/\text{AoRR} \cdot 60$	Schläge/ min
Linksventrikuläre Verkürzungsfraction	FS	$((\text{LVIDd} - \text{LVIDs})/\text{LVIDd}) \cdot 100$	%
Herzzeitvolumen	HZV	Schlagvolumen* Herzfrequenz	ml/min
Schlagvolumen (Aorta)	SV (Ao)	$(\text{Ao}/2)^2 \cdot \pi \cdot \text{VTI}/100$	ml
Schlagvolumen (LVOT)	SV (LVOT)	$(\text{LVOT}/2)^2 \cdot \pi \cdot \text{VTI}/100$	ml
Verhältnis von E-Punkt zum A-Punkt	MV E/A	MV E-Punkt/ MV A-Punkt	
Masse des linken Ventrikels	LV Masse	$((\text{IVSd} + \text{LVIDd} + \text{LVPWd})^3 - \text{LVIDd}^3) \cdot 1,055$	mg
Verhältnis der LV Masse zum Körpergewicht	LV/BW Ratio	LV Mass/ KG	
Verhältnis vom HZV zum Körpergewicht	Cardiac Index	HZV/ KG	g

Linksventrikuläre Ejektionszeit	LVET	Zeit in ms des Aortendopplersignals	ms
Zirkuläre Faserverkürzung	Vcf	$10 \cdot FS / LVET$	circ/s
Zirkuläre Faserverkürzung nach HF korrigiert	Vcf (RR corr)	$Vcf \cdot \sqrt{(RR \cdot 100)}$	circ/s
Enddiastolisches Volumen des LV	EDV	$(7 / (2,4 + LVIDd)) \cdot LVIDd^3$	mm <sup>2</sup>
Endsystolisches Volumen des LV	ESV	$(7 / (2,4 + LVIDs)) \cdot LVIDs^3$	mm <sup>2</sup>
Ejektionsfraktion nach Teichholz	EF nach Teichholz	$(EDV - ESV) / EDV \cdot 100$	%

**Tabelle 5:**  
**Errechnete Werte aus echokardiographischen Daten**

### 3.4. Narkose

Die Tiere wurden während der echokardiographischen Untersuchung mittels Isofluran Inhalationsnarkose ruhig gestellt. Nach einer etwa zweiminütigen Anflutungsphase eines 5% Isofluran/O<sub>2</sub>- Gemisches in einer Narkosekammer, wurde die Gaszufuhr von 1,5% Isofluran/O<sub>2</sub> über einen Nasenkonus aufrecht erhalten. Die sonographische Untersuchung wurde begonnen, sobald die Herzfrequenz des Tieres relativ stabil bei etwa 400 Bpm lag.

Untersuchungen von ROTH et. al. (Roth et al., 2002) haben gezeigt, dass Isofluran als Narkotikum im Vergleich zu Ketamin-Xylazin, Ketamin-Midazolam und Tribromoethanol den geringsten Effekt auf die Parameter der sonographischen Untersuchung im Mausmodell hat. Neben der einfachen Handhabung der Inhalationsnarkose gegenüber Injektionsnarkotika, zeichnet sie sich zudem durch eine bessere Steuerbarkeit während der laufenden Studie aus.

Isofluran wirkt kaum kardiodepressiv und arrhythmogen, die Metabolisierung erfolgt nur zu 0,2% über die Leber, wobei die Toxizität gering ist. Für einige Anästhetika wurde eine unterschiedlich starke kardiodepressive Wirkung abhängig vom untersuchten Mausstamm festgestellt. Dieser Effekt war unter Isoflurannarkose nicht zu beobachten. Jedoch ist bei der vorliegenden Studie zu bedenken, dass vor allem C57BL/06-Mäuse unter Inhalationsnarkose zu Schnappatmung neigen, was die konstante Narkoseführung erschwert.

## 3.5. Schwimmtraining

### 3.5.1. Material

22 C57BL/06 Mäuse

Plastikkäfige für Ratten

Wasserthermometer

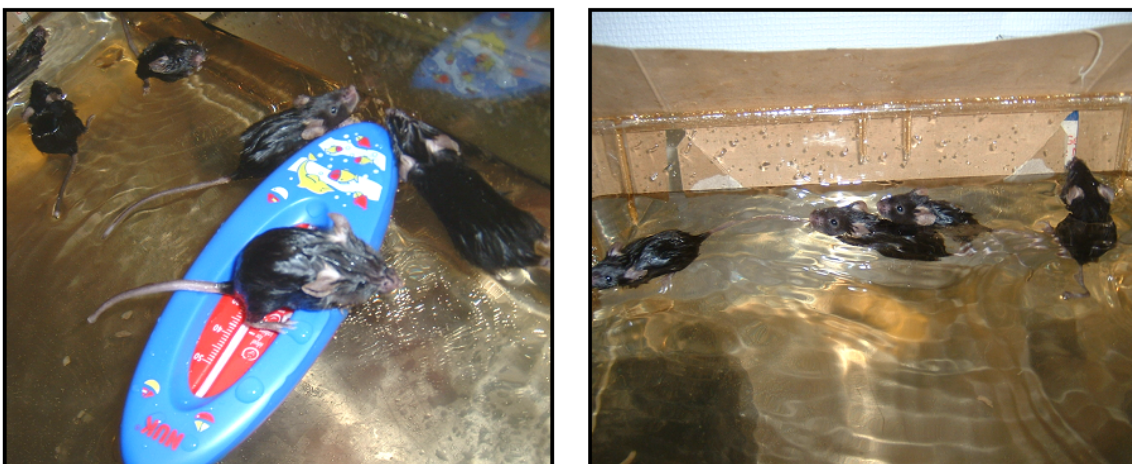
Latexhandschuh

### 3.5.2. Durchführung

Die 22 Mäuse des Stamms C57BL/06 (zwölf weiblich; zehn männlich) wurden in vier Gruppen aufgeteilt und einem achtwöchigen Schwimmtraining unterzogen. Zu Beginn des Trainings waren die Tiere acht Wochen alt. Das Training wurde hinsichtlich des Genotyps geblindet und unter ständiger Beobachtung durchgeführt.

Nach einer ersten Trainingseinheit von fünfminütiger Dauer wurde das Training täglich um 1-2 Minuten verlängert, so dass sich am Ende eine Schwimmzeit von 1,5 Stunden ergab. Die Wassertemperatur wurde während der gesamten Trainingszeit konstant bei 25°C gehalten und erschöpften Tieren wurde ein luftgefüllter Plastikhandschuh als Erholungsplattform angeboten (**Abbildung 14**).

Sowohl vor, als auch nach dem achtwöchigen Training wurde eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt.



**Abbildung 14:**  
Schwimmtraining bei konstanter Wassertemperatur unter kontinuierlicher Steigerung der Trainingszeit pro Einheit

## 3.6. Untersuchungen am isolierten Herzen nach Langendorff

### 3.6.1. Material

Krebs- Henseleit- Pufferlösung	NaCl	118 mmol
	NaHCO <sub>3</sub>	24,88 mmol
	KH <sub>2</sub> PO	1,18 mmol
	Glukose	5,55 mmol
	Na-Pyruvat	2 mmol
	MgSO <sub>4</sub>	0,83 mmol
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mmol
	KCl	4,7 mmol

Orciprenalin (Alupent®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG; Ingelheim)

Natrium-Heparin (Liquimin®; Roche Deutschland Holding GmbH; Lörrach)

### 3.6.2. Geräte

Langendorff Apparatur (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH; March-Hugstetten)

Nahtmaterial (Seide metric 3)

Präparierbesteck

Wasserbad (Durchlauferhitzer, LAUDA ecoline® 003; LAUDA)

Rollerpumpe (Isomatic®, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH; March-Hugstetten)

Perfusionsautomat (Perfusor®sacura, B. Braun Medical Inc.; Bethlehem)

### 3.6.3. Durchführung

Die Mäuse wurden heparinisiert (250 IE Natrium-Heparin, intraperitoneal), anästhesiert (2 g/kg KG Urethane in einer 2 mg/kg KG Natriumchloridlösung, intraperitoneal) und auf einer Wärmeplatte gelagert.

Nach Ausfall des Zwischenzehreflexes wurde die Maus auf dem Rücken gelagert und auf einer Styroporplatte fixiert. Die Haut wurde entlang der Medianen durchtrennt. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freipräpariert. Die Vena cava wurde am rechten Vorhof und die Aorta auf der Höhe des Aortenbogens durchtrennt und das Herz wurde entnommen. Der Organkomplex wurde unmittelbar nach der Entnahme in eine Petrischale mit einer 37°C warmen präoxygenierten Krebs- Henseleit- Pufferlösung überführt. Die etwa 3 mm lange Aorta wurde über eine Kanüle (27 Gauche) gestülpt und mit einem Faden fixiert.

Das Herz wurde an die Langendorff Apparatur angeschlossen und retrograd mit einem Perfusionsdruck von  $110 \pm 5$  mmHg und einem konstanten Fluss von  $4 \pm 1$  ml/min mit  $37^\circ\text{C}$  warmen oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Das Perfusat wurde über ein  $39,8^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad erwärmt und über eine Glasfritte moderat mit 95% Sauerstoff + 5%  $\text{CO}_2$  begast. Über eine Rollerpumpe und mit Hilfe eines Perfusionsautomaten erfolgte die Zufuhr der Wirkstofflösung. Der Zufluss war mit einem Überdruckabflusssystem versehen. Eine verstellbare Druckmembran diente der Injektionsdruckregulation. Um artifiziellen Gewebeschädigungen vorzubeugen, wurde an der linksventrikulären Seite des Apex cordis eine Injektionskanüle (1,3 mm Durchmesser) gestochen, um den Druck im Ventrikel zu mindern.

Ein 2.0 French oktapolarer elektrophysiologischer Mauselektrodenkatheter mit 0,5 mm breiten Elektroden und 0,5 mm breiten Zwischenräumen wurde über eine 2 mm große iatrogene Öffnung in den rechten Vorhof und weiter bis in den rechten Ventrikel in Septumnähe vorgeschoben, um zu stimulieren und ein intrakardiales Elektrogramm abzuleiten. EKG-Aufnahmen wurden über in Schwämme eingebettete Ag-AgCl Elektroden, die mit speziell angefertigten, gefederten Halterungen senkrecht an das Epikard gedrückt wurden, aufgezeichnet.

Die EKG-Signale wurden von einem Vorfilter mit einer Bandbreite von 0,1-300 Hz verstärkt und gefiltert. Über drei MAP-Katheter wurden simultan MAPs vom linken und rechten Ventrikel und vom Septum aufgezeichnet. Die MAP-Katheter wurden an speziell angefertigten gefederten Halterungen befestigt, die eine konstante Andruckstärke senkrecht zum Epikard gewährleisten. Die MAPs wurden mit DC-gekoppelten Vorverstärkern verschaltet (Modell 2000, EP Technologie, San Jose, CA, USA). Alle vorverstärkten Signale wurden digitalisiert und aufgezeichnet mit einer speziell angepassten halbautomatischen Software (Labview®) zur Analyse der Repolarisationen von Mäuseherzen. Dieses Programm wurde in der Arbeitsgruppe Kirchhof/ Fabritz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Knollmann/ Morad und Franz, Dept. of Pharmacology, Georgetown University, Washington DC erstellt (Fabritz et al., 2004; Fabritz et al., 2003; Knollmann et al., 2003; Kuhlmann et al., 2006).

Zur Erzeugung eines AV-Blockes wurde eine kleine anatomische Adson-Pinzette in die 2 mm große Öffnung am rechten Vorhof eingeführt und bis zum septalen Anteil des Anulus fibrosus vorgeschoben und hier vorsichtig zgedrückt. Bei erfolgreicher Blockierung wandelt sich der Herzrhythmus von dem schnellen Sinusrhythmus zu einem langsameren ventrikulären Ersatzrhythmus um.

Das Protokoll startete mit einer 10-minütigen Wartezeit, um eine Stabilität in Bezug auf die Signalqualität und des Sinusrhythmus zu gewährleisten. Anschließend wurde mit Hilfe des oktapolaren Katheters eine fixfrequente Vorhofstimulation bei 140 ms, 120 ms und 100 ms



jeweils über 40 Sekunden durchgeführt. Die tendenzielle Zykluslänge bei der Stimulation diente zur Ermittlung der AV-Knotenüberleitungszeit (Wenckebach Punkt). Nach einer kurzen Pause wird ein AV-Block induziert. Bei Persistieren des AV-Blockes, nach 5-minütiger Beobachtung durch Elektrogramm und MAP und Registrierung der spontan auftretenden Arrhythmien, wurde der Versuch fortgesetzt. Mit einer darauffolgenden programmierten Kammerstimulation bei 200 ms, 150 ms und 100 ms ( a 40 sec) und jeweils einer zusätzlichen S2 Stimulation wurde das Auftreten von Arrhythmien provoziert und die effektive Refraktärperiode (ERP) bestimmt. Danach wurde in einer 5-minütigen Einlaufphase Orciprenalin (2,5 mg/l) dem Perfusat mit 90ml/h hinzugefügt und über 10 Minuten aufgezeichnet. Anschließend wurde das Protokoll der ventrikulären Stimulation wiederholt.

#### **3.6.4. Auswertung**

Alle Aufzeichnungen wurden offline vollständig visuell kontrolliert und manuell mit Labview® ausgewertet. Bei der MAP-Analyse (monophasisches Aktionspotential) wurde das Aktionspotential (APD) bei 50, 70 und 90% der Repolarisation bestimmt. Die einzelnen MAPs mussten folgende Qualitätskriterien erfüllen: stabile Grundlinie und eine MAP-Morphologie, ein gerader Aufstrich, dessen Dauer weniger als 2 ms beträgt und eine Amplitudenhöhe von wenigstens 1 mV erreicht und eine schnelle erste Phase der Repolarisation ohne Plateau (Knollmann et al., 2001). Da es bei der typischen murinen MAP-Form kein Plateau in der frühen Repolarisationsphase gibt, wurde der Beginn der Repolarisation (0%) mit dem Peak des MAPs definiert und 100% der Repolarisation wurden in der elektrischen Diastole gemessen (Gussak et al., 2000). Die Dispersion der Repolarisation wurde definiert als Differenz der maximalen und der minimalen APD der simultan aufgenommenen MAPs (Kirchhof et al., 1996).

Zusätzlich wurden alle Aufzeichnungen auf Arrhythmien überprüft, hier wurde zwischen spontanen und induzierten unterschieden. Induzierte Arrhythmien treten bei der Kammerstimulation auf. Weiter werden monomorphe und polymorphe ventrikuläre Tachykardien, Bigemini, Triplets und Quadruplets angegeben.

Bei der Analyse der Aktivierungszeiten werden zum einen die Gesamtaktivierungszeiten der Zykluslängen im EKG, vom Anfang des Stimulus bis zum Beginn des MAP, gemessen und zusätzlich die Aktivierungszeiten der einzelnen MAPs (linksventrikulär, rechtsventrikulär und septal). Zur Ermittlung der Sinusknotenerholungszeit misst man den Abstand zwischen dem letzten MAP der Stimulation bis zum ersten spontanen Schlag.

### **3.7. Genotypisierung**

### 3.7.1. Materialien

Lysispuffer                    100 mM Tris HCl (pH8)  
                                      5 mM EDTA  
                                      0,2% SDS  
                                      200 mM NaCl

Proteinase K Stock 10mg/ml  
1 x TE Puffer  
Isopropanol  
Ethanol 70%  
3,95µl ultra clean water (MQ)  
4,0µl Betaine (5M)  
1,5µl 10x Standart PCR Puffer (Eppendorf)  
1,5µl dNTPs (2 mM)  
1,0µl Exon20-F1 (Forward Primer)  
0,5µl Invec-R1 (1. Reverse Primer)  
0,5µl Exon21-R1 (2. Reverse Primer)  
0,9µl Mg(OAC)<sub>2</sub> (3 mM)  
TAQ (Eppendorf)  
Agarose 1,4%  
Ladepuffer (Bromphenolblau, TBE, Glycerin)  
DNA molecular weight marker VIII (Roche®)  
TBE Puffer plus Ethidiumbromid  
Multicycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler); (MJ Research, Waltham, USA)

### 3.7.2. Durchführung

Die gezüchteten Tiergruppen wurden mittels PCR genotypisiert. Hierzu wurde den ca. 4 Wochen alten Mäusen ein kleines Stück der Schwanzspitze abgetrennt und in ein nummeriertes Eppendorfgefäß verbracht. Nach Zugabe von 500µl Lysispuffer und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Proben bei 55°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden dem Gemisch 500µl Isopropanol zugefügt und der Ansatz 20min bei Raumtemperatur und einer Drehgeschwindigkeit von 14000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu isolieren.

Nach Entfernung des Überstandes und Zugabe von 1 ml Ethanol (70%) wurde erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert für eine Dauer von 10 min.

Die vom Überstand befreiten Präzipitate wurden getrocknet und in 150 µl 1x TE Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Im nächsten Versuchsschritt wurde je 1 µl der extrahierten genomischen DNA jeweils 3,95 µl ultra clean water, 4,0 µl Betaine 5 M, 1,5 µl 10x Standart Puffer, 1,5 µl dNTPs, 1,0 µl Exon20-F1, 0,5 µl Invec-R1, 0,5 µl Exon21-R1 und 0,9 µl Mg (OAC)<sub>2</sub> zugegeben. Sämtliche Reagenzien, einschließlich der zuletzt hinzugefügten Taq Polymerase wurden stets auf Eis gekühlt. Die Proben wurden nun im Multicycler PTC-200 mittels eines eigens für die p0071-Linie konzipierten Cyclerprogramms inkubiert. Hierbei wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt, dann 30 sec bei 93°C denaturiert und 30 sec auf 57°C abgekühlt (Anealing). Im folgenden Extensionschritt wurde die Temperatur 4 min konstant bei 68°C gehalten um abschließend nach 30 Zyklen noch einmal für 10 min auf 72°C anzusteigen.

Die DNA-Proben wurden mit je 5 µl Ladepuffer versetzt. Anschließend konnten jeweils 5 µl Probe in die dafür vorgesehenen Taschen des 1,4% Agarosegels eingebracht werden. An die Reihe der DNA-Proben schließen sich eine Positiv- und eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) an. Sowohl vor als auch hinter der Probenreihe wurde je eine Tasche ausgespart um hier den Marker aufzutragen. Nachdem das Gel für 20 min einer Spannung von 130 V ausgesetzt wurde, ließen sich unter UV-Licht fluoreszierende Banden erkennen und die Genotypen konnten anhand der Positivkontrolle ausgewertet werden.

## **3.8. Sektion**

### **3.8.1. Material**

Sektionsbesteck

Ethanol (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

0,2% Paraformaldehyd (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

PBS/2 mM MgCl<sub>2</sub>-Lsg.            0,137 M Natriumchlorid; pH 7,4

0,0027 M Kaliumchlorid

0,01 M Phosphatpuffer

2 mM MgCl<sub>2</sub>

### **3.8.2. Durchführung**

Die zur Sektion ausgewählten Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nachdem das Fell mit Alkohol desinfiziert und angefeuchtet war, wurden Bauchhöhle und Brustkorb vorsichtig eröffnet. Leber, Nieren, Herz und Lunge wurden sorgfältig freipräpariert. Die entnommenen Organe wurden mit Hilfe einer sensiblen Waage gewogen und anschließend

in 0,2% PFA fixiert. Nach Eröffnen der Schädeldecke konnte das Gehirn entnommen und ebenfalls in Formaldehyd eingelegt werden. Die Organe wurden 2 Tage bei 4°C im Shaker belassen, bevor der PFA Überstand entfernt wurde.

Die Reagenzröhrchen wurden mit PBS/ MgCl<sub>2</sub> Lösung, welcher 30% Succrose zugefügt war, aufgefüllt und für weitere 1½ Tage bei 4°C inkubiert.

### **3.9. Paraffinschnitte**

#### **3.9.1. Materialien**

Ethanol 70%, 90%, 96%, 100% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Xylol (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Paraffin Typ 9 (MICROM, 8337) (Microm GmbH; Walldorf)

Einbettautomat Citadel 1000 (Thermo Shandon Electron Corporation®; Waltham)

Objektträger (SuperFrost® Plus; Menzel GmnH & Co KG; Braunschweig)

Deckgläser 24 x 50mm (Roth® ; Karlsruhe)

Einbettkassetten (Roth, K115.1; Karlsruhe)

Metallausgießförmchen (Firma Medite 46-3060-00)

Rotationsmikrotom Type HM 325 mit Kühleinrichtung „cool-cut“ (Microm GmbH; Walldorf)

Paraffin Ausgießstation Type EC 350-2 und Kühlplatte (Microm GmbH; Walldorf)

Microtom Klingen Feather S35 (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; Edermünde)

Kühlstation EG 1130 (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar)

Paraffin Streckbad (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar)

#### **3.9.2. Durchführung**

Die über Nacht in 4% Paraformaldehyd eingelegten Organe wurden zunächst für einige Sekunden in PBS gewaschen, um dann in der Histokinette nach unten aufgeführtem Programm in Paraffin eingebettet zu werden.

Programm:

- 1) 70% Ethanol 2 h
- 2) 90% Ethanol 2 h
- 3) 96% Ethanol 2 h
- 4) 100% Ethanol 2 h
- 5) 100% Ethanol 2 h

- 6) Xylol 20 min
- 7) Paraffin I 2 h
- 8) Paraffin II 2 h

Anschließend wurden die Organe an der Ausgießstation in mit flüssigem Paraffin befüllte Metallschälchen platziert. Die Plastikeinbettkassette wurde sanft als Deckel in das flüssige Paraffin gedrückt. Nach Härten des Paraffins auf der Kühlplatte ließ sich so der Paraffingewebeblock leicht aus der Metallkassette ausbetten.

Am Rotationsmikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und im beheizten Wasserbad gestreckt und auf die Objektträger aufgezogen.

Nachdem die Paraffinschnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C auf dem Objektträger angebacken wurden, folgte die Entparaffinierung mit Hilfe einer Alkoholreihe zur histologischen Färbung.

## **3.10. Gefrierschnitte**

### **3.10.1. Materialien**

0,2% Paraformaldehyd (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

PBS/2mM MgCl<sub>2</sub>/Succrose-Lsg.    0,137 M Natriumchlorid; pH 7,4

0,0027 M Kaliumchlorid

0,01 M Phosphatpuffer

2 mM MgCl<sub>2</sub>

30% Succrose

Tissue Tek® ( O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek )

Plastikschälchen ( Tissue-Tek® Cryomold Biopsy; Miles Inc. )

Aceton (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Objektträger „SuperFrost® Plus“ (Menzel GmnH & Co KG; Braunschweig )

Kryotom „Leica CM 1900“ (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar)

### **3.10.2. Durchführung**

Um Gefrierschnitte für eine LacZ-Färbung anzufertigen, wurden die entnommenen Organe nach dem Wiegen zunächst 2 Tage bei 4°C in 0,2% Paraformaldehyd fixiert. Um einen

besseren Erhalt der Gewebestruktur zu erreichen, wurden die Proben für weitere 1,5 Tage bei 4°C in einer PBS/ MgCl<sub>2</sub>/ Succrose-Lösung inkubiert.

Im folgenden Schritt wurden die Organe in Tissue Tek® (O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek) eingebettet. Hierzu wurde der Boden der Plastikschrälchen (Tissue-Tek® Cryomold Biopsy; Miles Inc.) mit Tissue Tek® benetzt und das jeweilige Organ sanft mit der Schnittfläche nach unten platziert. Nachdem das Plastikschrälchen mit Tissue Tek® aufgefüllt war, wurde das Präparat auf Trockeneis angefroren und im Gefrierschrank bei -80°C belassen.

Um feine Schnitte der Präparate anzufertigen, wurden die Gefrierblöcke zunächst aus den Plastikschrälchen entnommen und mit einem Tropfen Tissue Tek® auf dem Schneidestempel fixiert. Mit dem Kryotom ließen sich 17 µm dicke Gefrierschnitte der Präparate anfertigen, welche auf einen beschrifteten Objektträger aufgezogen wurden.

Abschließend wurden die Präparate 5 min in Aceton fixiert und 30 min luftgetrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C im Gefrierschrank.

## **3.11. HE-Färbung**

### **3.11.1. Material**

Xylol (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Ethanol 100% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Ethanol 96% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Ethanol 70% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Hämalaunlösung nach Mayer (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Eosinlösung (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Leitungswasser

Aqua dest.

Paramount medium (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK)

Deckgläschen (Roth® ; Karlsruhe)

### **3.11.2. Durchführung**

Die Paraffinschnitte wurden zunächst 10 min im Xylolbad und anschließend für jeweils 15 sec in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Nach einer kurzen Waschung mit Aqua dest. konnten die Präparate für 2 Minuten mit Hämalaunlösung nach Mayer (Kernfärbung) eingefärbt werden. Überschüssige Färbelösung wurde im Wasserbad entfernt so dass sich die Objektträger anschließend für 5 sec in Eosin anfärben ließen. Abschließend

wurden die gefärbten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 15 sec fixiert und eine Minute in Xylol belassen, bevor sie mit einem Deckgläschen versehen wurden.

## 3.12. $\beta$ -Galactosidase Nachweis

### 3.12.1. Materialien

Destilliertes Wasser

PBS/2 mM  $MgCl_2$ -Lsg.      0,137 M Natriumchlorid; pH 7,4  
   0,0027 M Kaliumchlorid  
   0,01 M Phosphatpuffer  
   2 mM  $MgCl_2$

Detergentien Lösung      0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3)  
   2 mM  $MgCl_2$   
   0,01% sodium desoxycholate  
   0,02% Nonident P-40; Sigma N6507

Staining solution      0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3)  
   2 mM  $MgCl_2$   
   0,01% Natrium Desoxycholat  
   0,02% Nonident P-40; Sigma N6507  
   5 mM Kalium Ferrocyanid  
   5 mM Kalium Ferrocyanid  
   20 mM X-gal

Eosin Färbelösung (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Methanol 50% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Methanol 70% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Methanol 100% (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Xylene (Fa. Merck KGaA; Darmstadt)

Paramount medium (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK)

### 3.12.2. Durchführung

Zum Nachweis der Expression des mittels Gene Trap Methode getroffenen Gens wurde eine LacZ Färbung verschiedener Organe jeweils von 4 Wildtypmäusen, 3 Heterozygoten und 4 PKP4<sup>tg</sup>-Mutanten durchgeführt. Die Färbung mit X-gal erlaubt den Nachweis von Zellen, bei denen mittels Gene Trap die Genkassette eingebaut wurde. Die eingebaute Sequenz enthält unter anderem einen Abschnitt welcher LacZ exprimiert. LacZ ist ein bakterielles Gen, das bei der Gene Trap Methode als Reportergen verwendet wird, da das Produkt,  $\beta$ -Galaktosidase, proteolytisch nicht abgebaut wird. Transfizierte Zellen können das Substrat X-gal in einen blauen Farbstoff umwandeln. Der Prozentsatz blau gefärbter Zellen wurde lichtmikroskopisch bestimmt.

Dazu wurden zunächst Gefrierschnitte von Herz, Gehirn, Nieren und Lunge wie bereits in 3.10 beschrieben, angefertigt. Die Objektträger wurden 10min in einer PBS/ 2 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung auf Eis gespült. Es folgte eine 10-minütiges Tauchbad in Detergentienlösung, ebenfalls auf Eis. Danach konnten die Schnitte für 2,5 h bei einer konstanten Temperatur von 37°C im Brutschrank im Färbebad belassen werden. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurden die Gefrierpräparate anschließend zweimalig für jeweils 5min in PBS/ 2 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Nach einer kurzen Spülung mit destilliertem Wasser wurde eine Hintergrundfärbung der Präparate mit Eosin Färbelösung für 5 sec durchgeführt. Nach einem weiteren 5-minütigen Bad in destilliertem Wasser wurden die Organschnitte je 5 min in einer aufsteigenden Methanolreihe (50%, 70% und 100%) und abschließend 10 min in Xylene dehydriert. Zur dauerhaften Fixation wurden Deckgläschen auf die Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

### **3.13. Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

#### **3.13.1. Materialien**

Fixationslösung      2% Glutardialdehyd  
                              2% Formaldehyd (frisch aus Paraformaldehyd hergestellt)  
                              in 50 mM Cacodylatpuffer (pH7,4) und 50 mM NaCl

Waschlösung            50 mM Cacodylatpuffer (pH7,4) und 100 mM NaCl

Neutralisation        50 mM Glycylglycin, 100 mM NaCl

1% Osmiumtetroxid

1% Uranylacetat in H<sub>2</sub>O



Ethanol (25%, 50%, 75%, 85%, 95%, 100%)

Propylenoxid (100%)

Epon-Einbettungsmedium nach Spurr (25%, 50%, 75%, 100%)

BEEM-Kapseln

Uranylacetat

Bleicitrat

Uranylacetat (2% in H<sub>2</sub>O)

### **3.13.2. Geräte**

Ultramikrotom Leica Ultracut III (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar)

Elektronenmikroskop Philips CM100 (Philips Medizin Systeme GmbH; Hamburg)

TVIPS Fastscan 1K CCD-Kamera (Tietz Video and Image Processing Systems GmbH; Gauting)

### **3.13.3. Durchführung**

Es wurden 1 mm<sup>3</sup> große Gewebestücke aus dem linken Ventrikel bzw. Atrium entnommen und für 2 h bei 4% in Fixationslösung eingelegt. Anschließend wurden die Präparate 2x für jeweils 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 50 mM Cacodylatpuffer (pH7,4) und 100 mM NaCl gewaschen. Nach einstündiger Inkubation in 50 mM Glycylglycin und 100 mM NaCl bei RT zur Neutralisierung der freien Aldehydgruppen wurden die Gewebe erneut, wie oben beschrieben, gewaschen. Es folgte eine einstündige Behandlung mit einer Lösung aus 1% Osmiumtetroxid, 50 mM Cacodylatpuffer und 100 mM NaCl und ein dritter Waschgang mit abschließender Waschung in destilliertem Wasser. Danach wurden die Proben über Nacht in 1% Uranylacetat in H<sub>2</sub>O belassen. Nach jeweils zehnmütiger Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Gewebe für 15 min in Propylenoxid überführt und anschließend in Epon-Einbettungsmedium nach Spurr eingebettet. Die in Beemkapseln überführten Präparate wurden zur Polymerisation für 2 Tage bei 60°C in den Brutschrank verbracht. Die mit dem Leica ultracut III angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit Reynoldsfärbelösung nachkontrastiert und unter dem Elektronenmikroskop beurteilt. Die Beurteilung der Bilder erfolgte hinsichtlich des Genotyps geblindet und wurde erst im Anschluss an die Aufnahmen ausgewertet.

### **3.14. Statistik**

Die Analyse erfolgte bezüglich des Genotyps geblindet. Alle Variablen wurden nach Genotypen mit Hilfe des Student's T test (Microsoft Exel 2000) und ANOVA analyses (SPSS Version 12) verglichen. Als signifikant wurden Unterschiede anerkannt, die einen p-Wert < 0,05 zeigten. Alle Werte wurden als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben. Zur besseren Darstellung der Unterschiede wurden die Ergebnisse der Wildtypiere gleich hundert Prozent gesetzt und so in Tabellen mit denen der Mutanten verglichen.

### **3.15. Versuchsablauf und Tierversuchsgruppen**

Die Versuche wurden möglichst paarweise mit einem transgenen und einen nichttransgenen Geschwistertier gleichen Geschlechts und gleichen Alters angeordnet. Die Durchführung erfolgte entweder gleichzeitig oder direkt hintereinander. Alle Versuchstiere stammten aus Eigenzucht. Die Tiere waren in Kleingruppen in einheitlichen Käfigsystemen im gleichen Raum aufgestellt.