

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-039-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Aus dem Institut für Veterinärphysiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Institut für Physiologie II der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

Die Phänotypisierung der XinABC-defizienten Maus

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Julia Otten, geb. Rübsteck
Tierärztin aus Aachen**

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3464

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer Meyer
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Ralf Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): myocardium, hypertrophy, alternative splicing, mutations

Tag der Promotion: 24. Juni 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Aufgaben und Funktion der Muskulatur im Organismus	9
1.2. Das Zytoskelett	9
1.2.1. Aktin	10
1.2.2. Die Intermediärfilamente	11
1.2.3. Die Mikrotubuli	11
1.2.4. Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte	11
1.3. Die quergestreifte Muskulatur	14
1.3.1. Die Skelettmuskulatur	14
1.3.2. Die Herzmuskulatur	17
1.4. Kardiale Hypertrophie	21
1.5. Die aktinbindenden Proteine Xin und XIRP2	22
1.6. Ziele dieser Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen	26
2.2. Allgemeine Präparationstechniken	26
2.2.1. Entnahme des Herzens <i>in toto</i>	26
2.2.2. Entnahme der Skelettmuskeln M. soleus und M. extensor digitalis longus	27
2.2.3. Isolation von Kardiomyozyten	28
2.2.4. Präparation der Tibia	32
2.3. Körperbasisdaten im Vergleich	32
2.4. Histologische Methoden	33
2.4.1. Methoden der Präparatherstellung	33
2.4.2. Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin im Herz- und Skelett- muskel	36

Inhaltsverzeichnis

2.4.3.	Azan-Färbung nach Heidenhain von Herzmuskelgewebe	37
2.4.4.	Indirekte Immunfluoreszenzen von Herz- und Skelettmuskelgewebe	38
2.4.5.	Histomorphometrie der Herzdimensionen	40
2.5.	Physiologische Methoden	42
2.5.1.	Kontraktilitätsversuche mit isolierten Kardiomyozyten	42
2.5.2.	In vitro Kontraktionsversuche mit isolierten Skelettmuskeln	50
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Tierzahlen	56
3.2.	Körperbasisdaten im Vergleich	57
3.2.1.	Körpergewicht	57
3.2.2.	Herzgewicht	58
3.2.3.	Tibiallänge	58
3.2.4.	Verhältnis von Herzgewicht zum Körpergewicht	59
3.2.5.	Verhältnis von Herzgewicht zur Tibiallänge	60
3.3.	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin in Herz- und Skelettmuskeln .	60
3.3.1.	Beurteilung der Herzmuskulatur	60
3.3.2.	Beurteilung der Skelettmuskulatur	61
3.4.	Azan-Färbung nach Heidenhain von Herzmuskelgewebe	65
3.4.1.	Perivaskuläre Fibrose der Koronargefäße	65
3.4.2.	Interstitielle Fibrose im Herzmuskel	67
3.5.	Vergleichende Lokalisierungsstudien verschiedener Proteine in Herzmus- kelzellen	68
3.5.1.	Connexin43/Desmoplakin	69
3.5.2.	SERCA2a/Titin (T12)	70
3.5.3.	FilaminC/Cadherin	70
3.5.4.	VASP/Titin (T12)	71
3.5.5.	Evaluierung der Glanzstreifenverteilung auf Basis von indirekter Immunfluoreszenz	71
3.6.	Histomorphometrie der Herzdimensionen	75
3.6.1.	Größenbestimmung von Herzaußenwand und des interventrikulä- ren Septums	75
3.6.2.	Größenvergleich der isolierten Kardiomyozyten	77
3.7.	<i>In vitro</i> Kontraktilitätsversuche mit isolierten Kardiomyozyten	78
3.7.1.	Sarkomerverkürzungen von Wildtyp und XinABC ^{-/-} Mäusen	78

Inhaltsverzeichnis

3.7.2.	Vergleich der Sarkomerverkürzungsamplitude von Wildtyp und XinABC ^{-/-} Kardiomyozyten	83
3.7.3.	Sarkomerlängen im Ruhezustand	83
3.7.4.	Verkürzungsgeschwindigkeiten im Vergleich	84
3.7.5.	Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten	85
3.7.6.	Evaluierung der Verkürzungsdauer	86
3.7.7.	Zusammenfassung	86
3.8.	<i>In vitro</i> Kontraktilitätsversuche mit isolierten Skelettmuskeln	87
3.8.1.	Vorversuche	87
3.8.2.	Vergleich der Skelettmuskeln zu Beginn des Messprotokolls	88
3.8.3.	Tetanisierung bei ansteigenden Stimulationsfrequenzen	89
3.8.4.	Ermüdungsprotokoll	90
3.8.5.	Residualkraft der Skelettmuskeln nach Belastung	93
3.8.6.	Zusammenfassung	93
4.	Diskussion	94
4.1.	Validität der angewandten Methoden	94
4.2.	Auswirkungen der Xin-Defizienz auf die kardiale Organ- und Zellmorphologie	96
4.3.	Frequenzabhängigkeit der Sarkomerverkürzung in isolierten murinen Kardiomyozyten von Wildtyp und XinABC ^{-/-} Tieren	100
4.4.	Der Einfluss des Genotyps auf das Kontraktionsverhalten von Skelettmuskeln	103
4.5.	Abschliessende Betrachtung	106
4.6.	Ausblick	107
5.	Zusammenfassung	109
6.	Summary - Phenotyping of XinABC-deficient Mice	110
	Literatur	111
	Appendices	119
A.	Messwerttabellen	120
B.	Publikationsverzeichnis	124

Inhaltsverzeichnis

C. Danksagung	125
D. Selbstständigkeitserklärung	126

1. Einleitung

1.1. Aufgaben und Funktion der Muskulatur im Organismus

Beweglichkeit ist für Zellen eine allgemein gültige Eigenschaft. Diese gilt während der Zellteilung ebenso wie auch für alle Stadien der Phagozytose, der amöboiden Bewegung von Leukozyten in extravaskulären Gewebebereichen und für die Muskelkontraktion. Neben Aufgaben der aktiven Kontraktion übernehmen Muskeln wichtige Funktionen bei Halte- und Stützfunktionen des Skeletts sowie in unwillkürlichen Prozessen wie Verdauung, Atmung und Herzschlag.

Ein wichtiges Kennzeichen des Muskelgewebes ist die Eigenschaft, chemische Energie in mechanische bzw. thermische Energie umzuwandeln. Diese funktionelle Spezialisierung führt zwangsläufig zur strukturellen Aufteilung. Es werden je nach physiologischen Aufgaben bzw. nach ihrer histologischen Struktur zwei Arten von Muskulatur unterschieden: Die quergestreifte sowie die glatte Muskulatur. Erstere lässt sich weiter in die Herzmuskulatur und die Skelettmuskulatur unterteilen. Die verschiedenen Muskelgewebe unterscheiden sich nicht nur anatomisch, sondern auch im Kontraktionsmechanismus.

1.2. Das Zytoskelett

In eukaryotischen Zellen übernimmt das Zytoskelett essentielle Aufgaben in Bewegungs- und Transportprozessen, Zellbewegung und äußerer Formgestaltung der Zelle. Für diese grundlegenden Eigenschaften bedienen sich Zellen verschiedener Zytoskelettsysteme: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli (AYSCOUGH und DRUBIN, 1996; GAVIN, 1997; HERRMANN und AEBI, 2000).

1. Einleitung

1.2.1. Aktin

Aktinmonomere (G-Aktin) bilden polymerisiert F-Aktin, das auch als Mikrofilament bezeichnet werden. F-Aktin besitzt polare Eigenschaften und weist eine helikale Struktur mit 8 nm Durchmesser auf. Des Weiteren besitzt es die Fähigkeit zum Selbstzusammenbau ('*self assembly*') mit dynamischen Eigenschaften, die an Bewegungsvorgängen der Zelle maßgeblich beteiligt sind. Nach SCHMIDT und HALL (1998) ist F-Aktin unter Beteiligung verschiedener aktinbindender Proteine (z.B. Filamin und α -Aktinin) in der Lage, Stressfasern oder Netzwerke aufzubauen. Diese Strukturen können entweder lose oder enggeknüpft sein und parallel oder rechtwinklig angeordnet sein (WINDER und AYSCOUGH, 2005).

Aktinfilamente sind nicht nur intrazellulär von Bedeutung, sondern stehen auch in Kontakt mit der extrazellulären Matrix ('*Extra cellular matrix*', ECM). Eine Verbindung mit Integrinen wird z.B. durch Vinculin und Talin ermöglicht (WINDER und AYSCOUGH, 2005); interzelluläre Kontakte können indirekt über Catenine hergestellt werden, die Aktinfilamente an Cadherine binden können (ANGST et al., 2001). Für die Genese von Aktinfilamenten polymerisiert G-Aktin zu F-Aktin (LODISH und BERK, 2003). Der Aufbau der Filamente hat seinen Ursprung in einem Polymerisationskeim und besteht zu Anfang aus wenigen G-Aktinmolekülen. Unter Mitwirkung des Arp2/3-Komplexes, welcher den Prozess der Keimbildung deutlich verkürzt (POLLARD und BORISY, 2003), wachsen die Filamente durch Verknüpfung weiterer Aktinmonomere. Zur geordneten Reglementierung des Wachstums setzen sich 'Capping-Proteine' an die Terminalstücke und beeinflussen den Aufbau. Am Plusende verhindert das Protein Gelsolin durch seine Bindung die weitere Anlagerung von Molekülen, am Minusende bewirkt die Bindung von z.B. Cofilin eine Beschleunigung und die Bindung von z.B. Tropomodulin eine Verzögerung des Abbaus (GREGORIO et al., 1995; SARMIERE und BAMBURG, 2004; SILACCI et al., 2004).

Des Öfteren besitzen Aktin-assoziierte Proteine mehrere Fähigkeiten, so haben beispielsweise Proteine der Ena/VASP-Familie die Fähigkeit, mit Aktin selbst Bindungen einzugehen, den schnellen Aktin-Netzwerk-Aufbau zu fördern und auch F- und G-Aktin zu binden (BACHMANN et al., 1999; PLASTINO et al., 2004). Hinzu kommt eine Interaktionsfähigkeit mit z.B. Vinculin und Profilin (KRAUSE et al., 2003); ebenfalls findet man Vertreter dieser Proteinfamilien in den Glanzstreifen des Herzens und in Tight-Junctions von Zell-Zell-Verbindungen. Als weitere Bindungspartner konnten Xin und XIRP2 identifiziert werden (EULITZ, 2005). Diese werden später im Rahmen dieser Dissertation genauer

1. Einleitung

untersucht.

1.2.2. Die Intermediärfilamente

Die Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von 10 nm und sind unpolar. Sie bestehen aus Strängen von aufgewundenen, faserigen Proteinen wie Lamin, Desmin, Keratin oder Vimentin (KIM und COULOMBE, 2007). Ihre Belastbarkeit bietet der Zelle bzw. dem Gesamtgewebe eine wesentliche Unterstützung bei starken Zugkräften (HERRMANN und AEBI, 2000). Über bestimmte Adapterproteine können Intermediärfilamente an interzelluläre Kontakte wie Desmosomen bzw. Hemidesmosomengeknüpft werden.

1.2.3. Die Mikrotubuli

Mikrotubuli bilden längliche, hohle Strukturen mit einem Durchmesser von 25 nm. Unter den permanenten Prozessen der Polymerisation und Depolymerisation durch die polaren Tubulinisoformen α - und β -Tubulin können sie ihre Länge an die Bedingungen der Zelle adaptieren. Terminal verbunden sind sie mit dem Mikrotubuliorganisierenden Zentrum (MTOC), das Zellkern-nah situiert ist. Das Plusende der Mikrotubuli orientiert sich in Richtung Zellgrenze. Eine wichtige Aufgabe der Mikrotubuli ist unter anderem die Organisation des Spindelapparates während der Mitose und der Transport von Vesikeln, wobei zusätzliche Motorproteine (Kinesine und Dyneine) involviert sind (ALBERTS, 2002).

1.2.4. Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakte

In vielzelligen Organismen sind Einzelzellen zu Geweben zusammengeschlossen. Häufig sind benachbarte Zellen durch Zellkontakte verbunden. Bei Säugetieren unterscheidet man drei verschiedene Zellkontakte: *Tight Junctions* (Verschlusskontakte), *Desmosomen* (wobei zwischen Gürteldesmosomen und Punktdesmosomen unterschieden wird) und *Gap Junctions* (Kommunikationskontakte).

In Abbildung 1.1 ist schematisch an einer Dünndarmepithelzelle eine Übersicht von interzellulären Kontakten dargestellt. Verschlusskontakte (*'Tight Junctions'*) bilden apikal um die Zelle herum gürtelförmige Nähte. An den *Tight Junctions* stehen die Zellmembranen benachbarter Zellen unmittelbar in Kontakt, was der Aufrechterhaltung der Zellpolarität

1. Einleitung

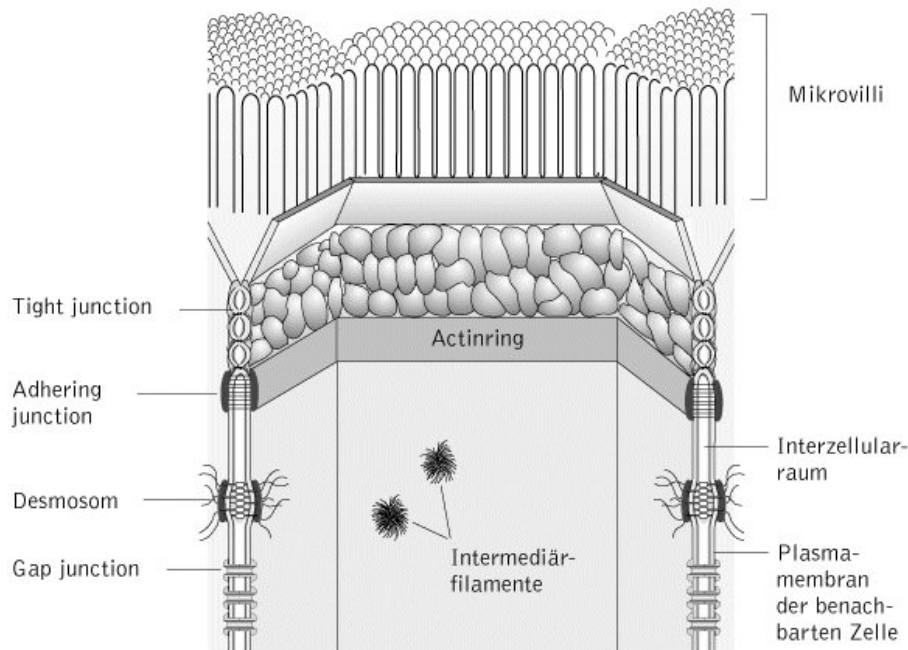


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der verschiedenen Zell/Zell-Verbindungen zwischen Dünndarmepithelzellen (BLECK, 2008).

dient und eine Diffusion innerhalb der Membran verhindert, sowie unterschiedliche Volumina des Extrazellulärraums gegeneinander abdichtet. Sie werden von Proteinen der Familie der Occludine und Claudine gebildet, die über ZO-1 bis ZO-3 mit dem Aktinzytoskelett interagieren und Ca^{2+} -abhängig sind (HARTSOCK und NELSON, 2008; MITIC et al., 2000).

Desmosomen und Gürteldesmosomen bestehen aus Transmembranproteinen der Klasse der Cadherine. Diese Verbindungen wirken wie Nieten und vereinigen die Zellen zu einer festen Epithelschicht. An den Desmosomen sind Fasern von Intermediärfilamenten verankert (z.B. Keratin in der Haut, Desmin im Herz), die sich durch eine besonders hohe Widerstandsfähigkeit auszeichnen. Ein membranah im Zytoplasma gelegener Cluster aus Desmoplakin bildet einen Plaque auf der intrazellulären Seite der Zellmembran (ANGST et al., 2001). Dieser Plaque ist auch als Ankerprotein bekannt. An diese sind intrazellulär Intermediärfilamente gebunden, die eine Verbindung zum Cytoskelett herstellen. Auf der zur Zellmembran gelegenen Seite der Plaques sind Adhäsionsproteine (Desmoglein und Desmocollin) verankert. Diese verbinden sich im Interzellularraum mit Bindungsproteinen der Desmosomen von den Nachbarzellen. Die Entfernung der Plasmamembranen im Desmosom beträgt etwa 15-25 nm.

1. Einleitung

Gap Junctions bestehen aus Connexinen, die ein verschliessbares, hexagonales Connexon bilden. Zwei Connexone zweier benachbarter Zellen bilden jeweils eine Gap Junction. Connexone lassen grössenselektiv Moleküle durchtreten: Molekülmassen von ≤ 1 kDa (H_2O , cAMP, Ionen, etc.) sind fähig den Kanal zu passieren (KUMAR und GILULA, 1996; SÖHL und WILLECKE, 2004). Gap Junctions spielen eine essentielle Rolle z.B. in der elektrischen Kopplung von Herzmuskelzellen, der elektrochemischen bzw. pharmakologischen Kopplung von Hepatozyten und in der Embryonalentwicklung.

Über Zell-Matrix-Verbindungen werden Zellen mit der extrazellulären Matrix verbunden. Die extrazelluläre Matrix besteht vorwiegend aus von der Zelle abgesonderten Glykoproteinen (z.B. Kollagen). Zell-Matrix-Verbindungen werden in zwei Gruppen aufgeteilt: Hemidesmosomen und Fokalkontakte. Beide sind mit dem Zytoskelett verbunden und setzen sich aus Transmembranproteinen der Integrinfamilie zusammen. Intrazellulär sind Hemidesmosomen mit Intermediärfilamenten verknüpft (LITJENS et al., 2006). Über Adapterproteine wie Vinculin, Filamin und α -Aktinin sind Fokalkontakte intrazellulär mit dem Aktinzytoskelett und extrazellulär mit den ECM-Proteinen wie Laminin, Kollagen oder Fibronectin verbunden (WACHSSTOCK et al., 1987; OTEY et al., 1990; LOO et al., 1998; LIU et al., 2000).

Die Glanzstreifen von Herzmuskelzellen sind Strukturen, die eine Vielzahl von Zell/Zellkontakten beinhalten. Im Herzmuskel verlaufen die Glanzstreifen (siehe auch Kapitel 1.3) stufenförmig (Abbildung 1.4), wobei man einen longitudinalen und einen transversalen Abschnitt vorfindet. Diese beiden Abschnitte unterscheiden sich durch die Verteilung der drei Zell/Zell-Verbindungen: die Fascia adherens (*Adherens Junction*), die Macula adherens (Desmosom) und die Macula comunicans (*Gap Junctions*) (SOMMER, 1979).

Die Übergänge von Muskeln zu Sehnen werden auch myotendinöse Übergänge genannt (*Myotendinous Junctions*), sie stellen eine direkte Verknüpfung von Sehnen zu Myofibrillen dar und beinhalten eine große Zahl von Zell/Matrix-Kontakten. Das terminal gelegene Sarkomer gleicht einem üblichen Sarkomer, jedoch sind die Aktinfasern verlängert und enden nicht an einer Z-Scheibe, sondern in einer dichten Bande (*Dense bands*) (TROTTER et al., 1981; YAMAGUCHI et al., 1983; TROTTER, 2002), die mit der ECM in Kontakt steht. Die ECM besteht aus überwiegend Kollagen (Typ I) und zählt als Grundlage des Sehngewebes. Die Verbindung der endständigen Filamente mit Laminin II aus der Basalmembran erfolgt über das Integrin $\alpha 7\beta 1$ D und Dystroglykankomplexen, welche direkt mit Aktinfilamenten verbunden sind.

1.3. Die quergestreifte Muskulatur

Die 'quergestreifte' Muskulatur leitet ihre Bezeichnung von der geordneten Struktur der kontraktile Myofibrillen im Zytoplasma der Muskelzelle ab. Myofibrillen erscheinen in regelmäßig aufeinanderfolgenden Querbanden, die senkrecht zur Zellmembran angeordnet sind. Betrachtet man quergestreifte Muskulatur unter einem Mikroskop mit polarisiertem Licht, so offenbart sich beim Anblick eines Längsschnittes eine abwechselnde Anordnung von dunklen und hellen Banden (anisotrope und isotrope Banden, sogenannte A- und I-Banden).

1.3.1. Die Skelettmuskulatur

Mit 'Muskulatur' im üblichen Sprachgebrauch ist die Skelettmuskulatur gemeint. Sie bildet die kontraktile Grundlage für den Bewegungsapparat. Parallel orientierte Muskelfasern werden durch Gefäße und sensible sowie motorische Nervenbahnen versorgt. Im Laufe der embryonalen Entwicklung entsteht durch die Verschmelzung von Myoblasten die Skelettmuskelzelle, die ein Synzytium bildet. Die Kerne sind spindelförmig und liegen randständig.

Jede Muskelfaser besteht aus einem Bündel longitudinal angeordneter Myofibrillen, die aus zwei Arten von Myofilamenten gebildet werden: Den dünnen und den dicken Filamenten. Die dünnen Filamente bestehen aus F-Aktin und zwei Strängen regulatorischem Tropomyosin, die umeinander gewunden sind. Viele Moleküle des Proteins Myosin bilden die dicken Filamente. Die kleinste funktionelle Einheit des Muskels wird als Sarkomer bezeichnet und wird begrenzt durch sogenannte Z-Scheiben. An diesen Z-Scheiben sind die Aktinfilamente verankert (LIEBICH, 2003).

Im relaxierten Zustand überlagern sich dicke und dünne Filamente nicht vollständig, so dass am Ende eines Sarkomers mit Hilfe eines Mikroskops eine helle Zone (nur dünne Filamente, 'I-Bande') sichtbar wird. Die Länge der dicken Filamente entspricht der Breite der A-Bande (A-Bande entspricht dem Bereich der dicken Filamente bzw. dem Bereich zwischen den I-Banden, Abbildung 1.2). Im Zentrum der A-Bande erscheint ein Bereich, in dem nur dicke Filamente liegen: die H-Zone. Sie entsteht, da die dünnen Filamente nicht vollständig über die Länge des Sarkomers reichen. Bei der Kontraktion des

1. Einleitung

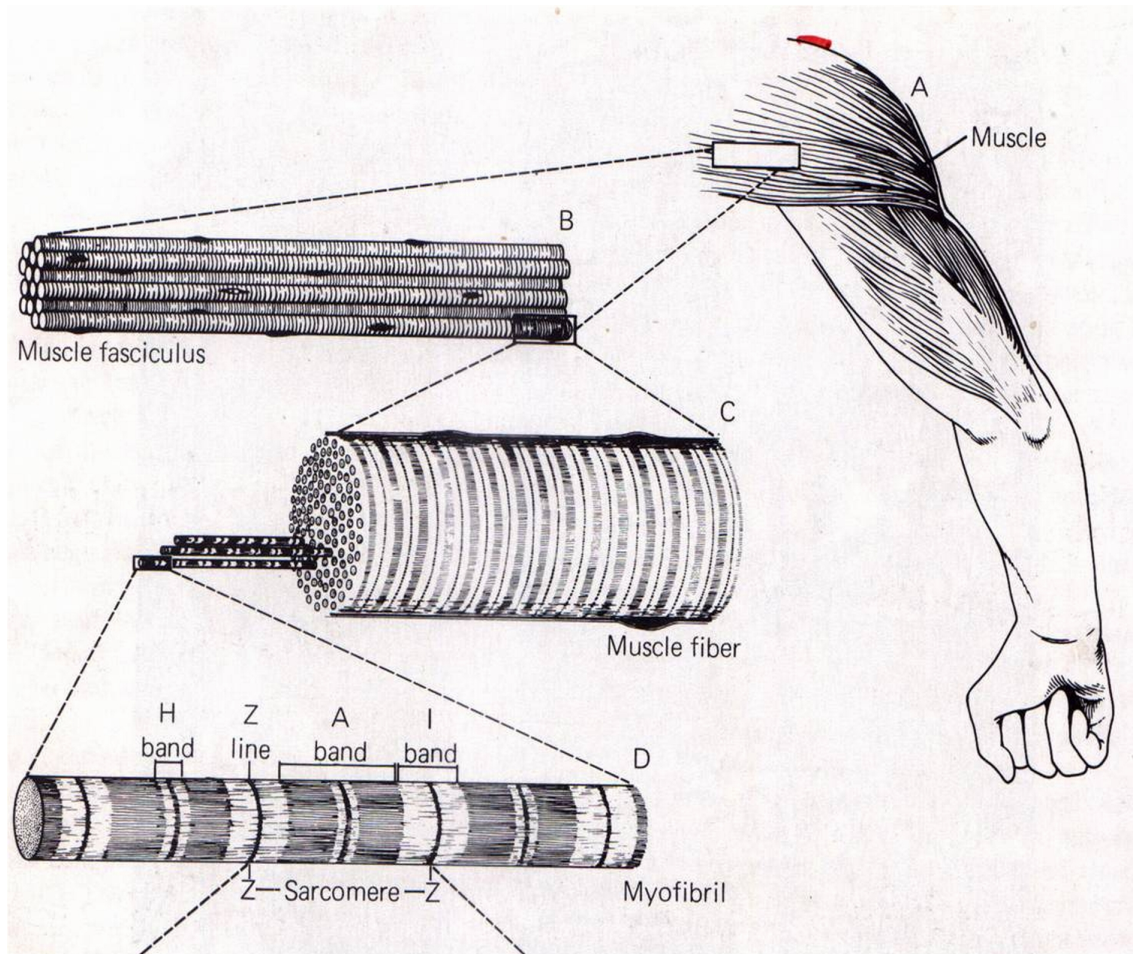


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung des lichenhistologischen und ultrastrukturellen Aufbaus des quergestreiften Skelettmuskelgewebes und der Anordnung der Myofilamentbündel Aktin und Myosin im Sarkoplasma.

Muskels verkürzen sich die Sarkomere unter Verbrauch von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die Verkürzung wird durch die Gleitfilament-Theorie beschrieben (HUXLEY und HANSON, 1954), die die Längsverschiebung der Aktin- und Myosinfilamente in verschiedenen Kontraktionsstadien erklärt.

Bekannterweise kann man die Kontraktion eines Muskels bewusst steuern, daher startet sie an der neuromuskulären Endplatte durch die Ausschüttung von Acetylcholin. Dies führt postsynaptisch zum Endplattenpotential, welches ein Aktionspotential in der Skelettmuskelzelle auslöst. Die Aktionspotentiale der Muskelzelle bewegen sich entlang des T-Tubulsystems ins Innere der Zelle und führen zur Freisetzung von Ca^{2+} Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (HASSELBACH und MAKINOSE, 1963). Die freigesetzten Io-

1. Einleitung

nen binden an den Troponin-Tropomyosin-Komplex, der auf den Aktinfilamenten liegt. Diese Bindung ist verantwortlich für eine Konformationsänderung des Troponins und eine Verlagerung des Tropomyosins, welches eine Bindung von Myosin an Aktin ermöglicht. In Ruhe sind ADP und Phosphat an Myosin gebunden. Die Myosinköpfe bilden zwischen den Filamenten Querbrücken (wie auch von LYMN und TAYLOR (1971); RUEGG (2000) beschrieben), die mit ihrem anschließenden Abknicken das Aktinfilament am Myosinfilament entlang zur Mitte des Sarkomers schieben. Die energetische Grundlage für den Kontraktionsprozess liefert die Hydrolyse von ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat.

Jedes Aktionspotential führt bei einer Muskelzelle zur Kontraktion. Da das Aktionspotential einer Skelettmuskelzelle wesentlich kürzer ist als eine zugehörige Zuckung, führen schnell aufeinanderfolgende APs zu einer Überlagerung der Zuckungen (Superposition). Die Frequenz der APs in Skelettmuskelzellen ist also ein Mechanismus zur Variation der Kontraktionsamplitude einer Muskelzelle. Im gesamten Muskel lassen sich zusätzlich mehr oder weniger motorische Einheiten rekrutieren. Unter einer motorischen Einheit versteht man ein α -Motoneuron und alle von ihm innervierten Muskelzellen (Muskelfasern).

Innerhalb eines Skelettmuskels werden die Muskelfasern in verschiedene Fasertypen anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften (z.B. Enzymaktivität) gruppiert:

- **Typ-I** Fasern: SO-Fasern kontrahieren relativ langsam und gewinnen Energie oxidativ-glykolytisch (Slow Oxidative)
- **Typ-II** Fasern: Typ II A Fasern: FOG-Fasern kontrahieren relativ schnell und gewinnen ihre Energie oxidativ-glykolytisch (Fast Oxydative Glycolytic Fibers); Typ II B Fasern: FG-Fasern kontrahieren schnell und gewinnen ihre Energie glykolytisch (Fast Glycolytic Fibers)

Typ I-Fasern werden auf Grund ihres hohen Myoglobingehalts rote Muskeln, Typ II-Fasern wegen ihres geringeren Myoglobingehalts weiße Muskeln genannt. Die physiologische Verteilung der Fasertypen liegt bei gemischten Skelettmuskeln von Typ-I zu Typ-II etwa bei 1:2. Werden die Typ-II-Fasern weiter unterteilt in ihre Subtypen, so ergibt sich ein Verhältnis von je einem Drittel Typ-I, Typ-IIa und Typ-IIb.

Die in dieser Dissertation verwendeten Skelettmuskeln setzen sich wie folgt zusammen: Der M. soleus dient im Organismus der Plantarflexion und Supination des Fußes; geprägt

1. Einleitung

wird er durch eine hohe Zahl von langsam kontrahierenden, oxidativen, ermüdungsresistenteren Typ I-Fasern (84%). Der M. tibialis cranialis dient der Beugung des Sprunggelenkes und setzt sich durchschnittlich aus 26% langsamkontrahierenden, oxidativen, ermüdungsresistenten Typ I- und 74% schnellkontrahierenden, oxidativglykolytischen Typ II-Fasern zusammen (ARIANO et al., 1973).

1.3.2. Die Herzmuskulatur

Funktionell betrachtet ist das Herz ein Hohlmuskel mit zwei Vorhöfen (Atria) und zwei Herzkammern (Ventrikel) mit Pumpfunktion (Abbildung 1.3). Es gewährleistet einen Transport von Blut durch den gesamten Organismus, der je nach körperlicher Belastung angepasst werden kann (THEWS und MUTSCHLER, 1989). Es versorgt das Zielgewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff und transportiert Stoffwechselendprodukte bzw. Botenstoffe wie Hormone. Im Wesentlichen teilt sich die Blutbahn in den Lungenkreislauf und den Körperkreislauf auf:

- Lungenkreislauf: Die rechte Herzkammer (Ventriculus dexter) pumpt das Blut über die Pulmonalklappe in die Lungenarterie und von hier über sich verzweigende Arterien und Arteriolen bis in die Kapillaren der Lunge. Dort wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und strömt weiter über die Kapillaren in Venolen und Venen bis in den linken Vorhof (Atrium). Von hier gelangt das Blut über die Mitralklappe in die linke Herzkammer (Ventriculus sinister).
- Körperkreislauf: Die linke Herzkammer pumpt mit Sauerstoff angereichertes Blut über die Aortenklappe in die Aorta. Von dort aus gelangt es in die Arterien und im weiteren Verlauf in die kleineren Arteriolen. Schließlich fließt es in die Kapillaren, die Verbindungen zwischen Arterien und Venen, welche unter anderem für den Gas- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe gewährleisten. Über die Vena cava gelangt es schließlich in den rechten Vorhof.

Die linke Herzkammer besitzt die stärkste Ventrikelwand, da von hier aus das Blut in den Körperkreislauf gepumpt wird. Um einen geordneten Pumpmechanismus zu ermöglichen, befinden sich zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern sowie zwischen Herzkammern und abführenden Arterien verschiedene Herzklappen. Die Segelklappen liegen in Fließrichtung des Blutstroms und bieten diesem keinen Widerstand, sondern werden mit

1. Einleitung

dem Blutstrom an die Wand gedrückt. Um zu verhindern, dass das Blut während der Systole des Herzmuskels falsch in die Arterien zurückfließt, schliessen sich die Segelklappen, indem sie sich gegeneinander pressen. An der Innenwand der Herzens befinden sich Muskelvorsprünge (Mm. papillares), von denen wiederum Sehnenfäden (Chordae tendinae) abgehen. Diese Sehnenfäden verhindern beim Schliessen einer Segelklappe deren Umschlagen in die Gegenrichtung. Die Taschenklappen verhindern ihrerseits, dass Blut aus der A. pulmonalis und der Aorta in die Herzkammern zurückfließt, wenn diese nach der Systole während der Diastole wieder relaxieren.

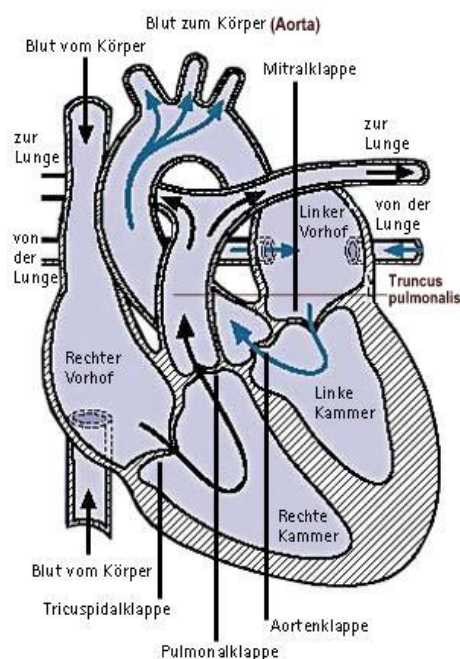


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung des Herzaufbaus mit Überblick über die Herzkammern

Der Herzmuskel ähnelt im Aufbau der quergestreiften Skelettmuskulatur. Die permanente Leistungsanforderung an den Muskel verlangt jedoch einen speziellen Aufbau, eine vegetativ-autonome Erregungsbildung und eine unabhängige myokardiale Reizweiterleitung. Herzmuskelzellen aus dem Myokard erreichen eine Länge von 50-100 μm und einen Durchmesser von 10-20 μm (THEWS und MUTSCHLER, 1989) und sind terminal durch Glanzstreifen (sogenannte 'Intercalated discs', ICD) verbunden (Abbildung 1.4). Diese Strukturen sind organkennzeichnend und kommen nur im Myokard vor. Kardiomyozyten schliessen meist nur 1-2 Kerne ein, die immer zentral gelegen sind. Die zylindrische, oft auch verzweigte Form der Kardiomyozyten ist die Grundlage für die mehrdimensionale

1. Einleitung

Belastbarkeit des Myokards.

Die Glanzstreifen verzahnen fingerförmig und beherbergen mechanische Zellkontakte und Gap Junctions zur Zell-Zell-Kommunikation. Beidseitig sind Aktinfilamente fest mit dem Plasmalemm verbunden was eine direkte Übertragung der Kontraktion auf die Nachbarzellen ermöglicht. Mechanisch werden die Glanzstreifen durch Desmosomen verstärkt (*Macula adhaerens*, siehe Abbildung 1.1). Die elektrische Erregung erfolgt in Form eines Aktionspotentials (AP). Im Herzen erfolgt die Erregung autonom über so genannte Schrittmacherzellen, spezialisierte Herzmuskelzellen, die im Sinusknoten angesiedelt sind. Von hier aus werden die Aktionspotentiale über muskuläre Leitungsbahnen über den Atrioventrikularknoten, das His-Bündel und die Purkinje-Fasern bis an das Arbeitsmyokard weitergeleitet, wobei die Weiterleitung von Zelle zu Zelle über die Gap Junctions läuft.

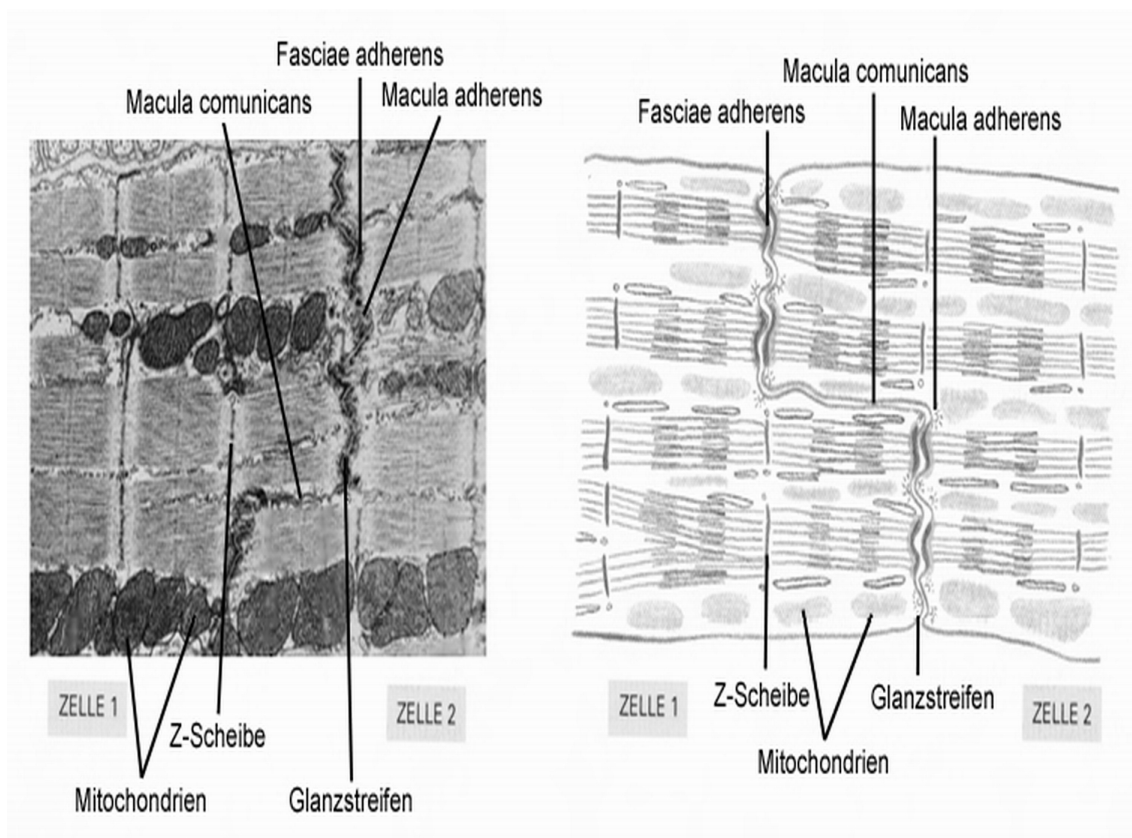


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung des lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Aufbaus des quergestreiften Herzmuskelgewebes und eines Glanzstreifens (*Discus intercalaris*)(ALBERTS, 2002).

1. Einleitung

Bei der Ausbreitung des Aktionspotentials (AP) unterliegen die verschiedenen Zentren einer strengen Hierarchie, wobei die Übergeordneten ihre Aktionspotentiale mit einer höheren Frequenz auslösen als die Untergeordneten. Fällt ein übergeordnetes Zentrum aus, so kann das nachfolgende die Schrittmacherfunktion übernehmen. Im Gegensatz zum Skelettmuskel dauert das Aktionspotential des Herzmuskels länger (ca. 300-450 ms) (SCHRADER, 1996). Intrazellulär hält die Na^+/K^+ -ATPase das Ionenmilieu bzw. das Ruhemembranpotential von -80 mV konstant. Erreicht ein Aktionspotential die Zielzellen, so öffnen sich ab einem Schwellenwert von -50 mV schnelle Na^+ -Kanäle mit der Folge eines schnelle Natriumeinstroms in die Zelle. Das Membranpotential weist bei einer Depolarisierung eine Verschiebung auf bis zu +40 mV auf (ansteigender Schenkel des Aktionspotentials). Durch die Dauer der anschließenden Inaktivierung der Natriumkanäle bestimmt sich die Refraktärzeit des Herzmuskels (THEWS und MUTSCHLER, 1989). Zusätzlich zum intrazellulären Natriumeinstrom kommt es zeitlich versetzt auch zur Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen zum Calciumeinstrom (MILLER, 1992).

Die Membran der Herzmuskelzellen bildet schlauchförmige Einstülpungen (Tubulussystem, T-Tubuli), die an ein intrazelluläres calciumspeicherndes Membransystem, das Sarkoplasmatische Retikulum gekoppelt sind (siehe Abbildung 1.4 unten). Das Sarkoplasmatische Retikulum wird wegen seines longitudinalen Verlaufs parallel zu den Myofibrillen auch L-System genannt (THEWS und MUTSCHLER, 1989). Im Skelettmuskel allgemein ist das L-System stärker als im Herzmuskel ausgeprägt.

Die Herzmuskelzellen bilden ein elektrisches Synzytium, das alle Muskelemente gleichzeitig kontrahieren lässt (SCHRADER, 1996). Ein AP breitet sich schnell über die transversalen Tubuli bis ins Innere der Zelle aus. Hier kommt es dann über den L-Typ-Kanal Ca^{2+} -Kanal zum beschriebenen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Die hierüber einwärts strömenden Ca^{2+} -Ionen machen nur einen geringen Teil des für die Kontraktion benötigten Ca^{2+} aus. An den in unmittelbarer Nähe der T-Tubuli liegenden Terminalzisternen des SR befinden sich die Ryanodinrezeptoren, Ca^{2+} -aktivierte Ca^{2+} -Kanäle, die Ionen aus den intrazellulären Speichern, in denen das Calcium an Calsequestrin gebunden vorliegt, entlassen (YANO und ZARAIN-HERZBERG, 1994). Es kommt zu einem Anstieg der internen Ca^{2+} -Konzentration von 100 nM auf über 1 μM . Diese Erhöhung veranlasst eine Bindung von Ca^{2+} an Troponin C, was die Kontraktion einleitet (siehe oben). Dieser Prozess wird elektro-mechanische Koppelung genannt (RUEGG, 2000). Die beschriebenen Ionenverschiebungen sind in der Kurve des AP für die Plateauphase verantwortlich: Der depolarisierende Calciumeinstrom sowie der repolarisierende Kaliumausstrom befinden sich im Gleichge-

1. Einleitung

wicht (THEWS und MUTSCHLER, 1989; RUEGG, 2000). Zur Repolarisation der Kardiomyozyten werden weitere Kaliumkanäle geöffnet, die Calciumleitfähigkeit der Membran nimmt weiterhin ab und die Zelle repolarisiert vollständig bis zum Ruhemembranpotential von -80 mV.

1.4. Kardiale Hypertrophie

Eine kardiale Hypertrophie entwickelt sich in der Regel als eine Anpassungsreaktion auf eine chronische Belastungszunahme des Herzens. Auf zellulärer Basis versteht man unter einer Hypertrophie die Vermehrung der kardialen Muskelmasse durch Zellwachstum. Im Gegensatz zu einer Hyperplasie bleibt hier die Zellanzahl identisch. Die Genese einer Herzhypertrophie findet oft in Erkrankungen wie Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, Aortenstenose und ischämische Herzstörungen ihre Ursache und überdauert in den meisten Fällen einen längeren Zeitraum (HELLIGE, 1991). Im Gegensatz zur pathologischen Herzhypertrophie steht die Trainingshypertrophie, die hier nicht weiter behandelt werden soll. Je nach Ätiologie der Belastung können sich unterschiedliche Hypertrophiearten entwickeln: Linksherz- bzw. Rechtsherzhypertrophie (*Cor pulmonale*). Die Zunahme der Muskelmasse gibt dem Herz die Möglichkeit, den anfänglich erhöhten Druck durch Zunahme der Ventrikelwand stärker zu kompensieren. Bei Überschreitung eines kritischen Herzgewichts auf Grund von zunehmender Belastung erreicht das Organ das Dekompensationsstadium in Form einer Dilatation, es entwickelt sich eine Herzinsuffizienz mit erhöhter Proliferation des Bindegewebes. Diese Fibrosierung vermindert die Relaxationsfähigkeit des Myokards. Morphologisch nimmt bei der Dekompensation der Ventrikel durchmesser zu, während gleichzeitig die Ventrikelwandstärke abnimmt.

Unter diesen Bedingungen steigt das endsystolische Volumen und auch der diastolische Druck. Dies verschlechtert die Situation weiter. Das Herz gerät in einen Circulus vitiosus. Unter einem Circulus vitiosus versteht man einen pathophysiologischen Prozess, bei dem sich zwei (oder mehr) gestörte Körperfunktionen im Sinne einer positiven Rückkoppelung wechselseitig beeinflussen und die Erkrankung dadurch aufrechterhalten oder beständig verstärken (THEWS und MUTSCHLER, 1989). Es kommt zum Rückwärts- und Vorwärtsversagen des Herzens mit allen dafür charakteristischen klinischen Folgen (HIERHOLZER und SCHMIDT, 1991).

1.5. Die aktinbindenden Proteine Xin und XIRP2

Von Wang et al. wurde 1999 ein Gen identifiziert, das für die frühembryonale Herzentwicklung in Hühnern von großer Bedeutung ist. Wird dieses Gen durch Antisenseinhibition blockiert, so hat dies letale Folgen für den Embryo durch einen gestörten Looping-Prozess in der Kardiomyogenese (WANG et al., 1999). Dieses Gen codiert für ein Protein, das nach dem chinesischen Wort 'Xin' für Herz benannt wurde. Sequenzuntersuchungen identifizierten ein unbekanntes, repetitives Motiv aus 16 Aminosäuren, zu dem später durch SINN et al. (2002) Homologe in der Maus und durch PACHOLSKY et al. (2004) im Menschen gefunden wurden. Eine frühembryonale Expression in quergestreifter Muskulatur wurde sowohl für murines als auch für humanes Xin festgestellt. In adulten Mäusen konnte es in Glanzstreifen und myotendinösen Übergängen nachgewiesen werden, da diese Strukturen spezielle Anheftungspunkte der myofibrillären Enden an das Sarkomer aufweisen (SINN et al., 2002). Die repetitiven Motive binden F-Actin und können es, wie bereits für Stressfasern gezeigt werden konnte, stabilisieren (PACHOLSKY et al., 2004). Bindungsstudien von Xin-Repeats an F-Aktin zeigten, dass Xin-Fragmente *in vitro* zur seitlichen Anlagerung an Aktinfilamente fähig sind. Essentiell hierfür sind sechs Xin-Repeats (CHEREPANOVA et al., 2006). Das Protein besteht aus Prolin-reichen Regionen, einem bisher unbekanntem repetitiven Motiv aus 16 Aminosäuren, DNA-Bindungsstellen, SH3-Bindungsmotive und nukleären Lokalisationssignalen. Die repetitiven Motive werden auch 'Xin-repeat-motif' genannt.

Während der Analyse von Genen, die mit Kardiomyopathien zusammen exprimiert werden (*Cardiomyopathy Associated Genes*), wurden fünf neuartige Gene identifiziert, zu denen auch das Xin-codierende Gen zählt (WALKER, 2001). Anfänglich wurde dieses Gen CMYA1 genannt (heute XIRP1). Im Säugetierorganismus besteht dieses Gen aus 2 Exons, von denen das Zweite die vollständige Protein-codierende Region besitzt. Durch Spleißen von Exon 1 zu Exon 2c bzw. durch intraexonisches Spleißen von Exon 2a zu 2c werden die Isoformen XinA, XinB und XinC im menschlichen Organismus exprimiert (VAN DER VEN et al. (2006), Abbildung 1.5 A und B). Ein weiteres Gen aus dieser Gruppe (CMYA3) wurde für die Codierung eines zweiten Xin-repeat Proteins (XIRP2) durch PACHOLSKY et al. (2004) identifiziert. VAN DER VEN et al. (2006) zeigten, dass Xin als Multiadapterprotein mit seinen Bindungspartnern (z.B. Filamin c, Mena/VASP) in Glanzstreifen sowie in den myotendinösen Übergängen der Skelettmuskulatur interagiert und kolokalisiert. Eine sehr schnelle, adaptive Hochregulierung von XIRP2 wird durch abnormen Stress wie Hy-

1. Einleitung

pertonie oder Myokardinfarkte über das RAAS-System bzw. den Angiotensinweg induziert (DUKA et al., 2006).

2007 gelang es GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) eine $XinAB^{-/-}$ (in GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) als *mXin α* -defizient bezeichnet) Maus zu generieren, die nur noch die Isoform *XinC* exprimiert. Sie entdeckten, dass diese partielle Ablation des *Xin*-Gens ($XinAB^{-/-}$) erst im fortgeschrittenen Alter zu spontaner Hypertrophie bzw. Kardiomyopathien, interstitieller Fibrose, Störungen in der kardialen Erregungsweiterleitung und Unregelmäßigkeiten in der Glanzstreifenmorphologie führt. Unabhängig davon wurde von OTTEN et al. (2010) ein Mausmodell publiziert, in dem alle *Xin*-Isoformen (im Folgenden als $XinABC^{-/-}$ bezeichnet) ausgeschaltet sind (Abbildung 1.5). Die genaue Phänotypisierung dieses Modells sowie der Vergleich zur $XinAB^{-/-}$ Maus stellt die zentrale Aufgabe dieser Dissertation dar.

Zur besseren Übersicht ist die Nomenklatur der XIRPs in Tabelle 1.1 dargestellt.

Proteinfamilie	Genname	Alternativen	Spezies
XIRP1 Orthologe	XIRP1 Xirp1 cXin	Xin, CMYA1 Xin, mXin α , Cmya1 XIRP2, CMYA3	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i> <i>Gallus gallus</i>
XIRP2 Orthologe	XIRP2 Xirp2 -	CMYA3, Myomaxin CMYA3, Myomaxin, Xin2, Xin β -	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i> <i>Gallus gallus</i>

Tabelle 1.1.: Übersicht der XIRP-Nomenklatur aus der Literatur (nach OTTEN (2009))

1. Einleitung

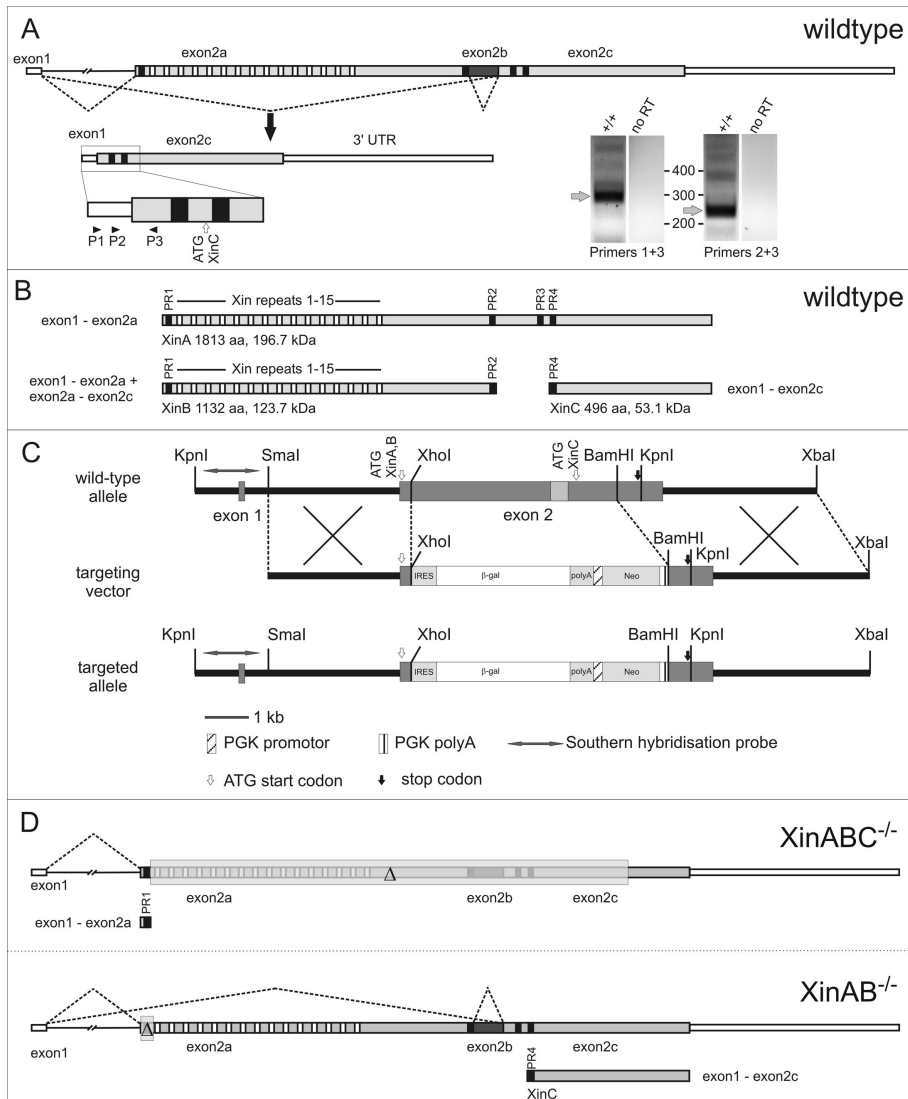


Abbildung 1.5.: Expressionsanalyse von Xininisofomen und der Vergleich zweier verschiedener Knockoutmodelle; A: Schematische Abbildung des murinen XIRP1 Gens und der Spleißvarianten (gestrichelte Linien), RT-PCR Experiment mit RNA aus Mauseherzgewebe als Vorlage und Primern (Pfeilspitzen) P1-P3 zur Bestätigung der Spleißvarianten, rechts gezeigt sind die erwarteten PCR-Produkte; B: schematische Darstellung der Proteinstruktur der alternativ gespleißten Regionen, PR-Prolinreiche Region; C: XIRP1-Aufspaltung in ES-Zellen mit Neomycinkassette und β-Galactosidase; KpnI, SmaI, XhoI und XbaI: Schnittstellen von Restriktionsenzymen; D: Vergleich der beiden Xininmutanten (oben nach OTTEN et al. (2010); unten nach GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007)), die transparent-graue Box mit Δ markiert die Genbereiche, die in beiden Mausmodellen deletiert worden sind.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Von dem aktinbindenden Protein Xin ist bekannt, dass es eine existenzielle Funktion in der kardialen Morphogenese hat und im adulten Organismus in den Glanzstreifen des Herzmuskels sowie in den myotendinösen Übergängen der Skelettmuskulatur lokalisiert ist. Des Weiteren ist bei *mXin α* -defizienten Mäusen durch GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) ein massiver kardialer Phänotyp beschrieben worden (Kapitel 1.5).

In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Herz- und Skelettmuskulatur der *XinABC^{-/-}* Maus. Mit Hilfe von histologischen und funktionellen Untersuchungsmethoden soll ergründet werden, ob Einbußen in der Organmorphologie bzw. -physiologie vorliegen. Dabei ist es Ziel, Parameter wie Körpergewicht, Organ- und Einzelzellgrößen, Fibrosierungsgrade perivaskulär und interstitiell im Myokard und des Weiteren morphometrische Herzdimensionen für jeden Genotyp individuell zu bestimmen. Für die speziellere histologische Charakterisierung der Gewebestruktur sollen lichtmikroskopische sowie immunhistochemische Färbungen eingesetzt werden. Im Anschluss an die histologischen Methoden soll die Funktionalität von isolierten Kardiomyozyten sowie ganzen Skelettmuskeln für Wildtyp und *XinABC^{-/-}* Tiere untersucht werden. Durch diese Untersuchungen werden Aussagen über die Funktion von Xin in Herz- und Skelettmuskulatur erhofft.

Abschliessend soll beurteilt werden, ob zwischen den bereits publizierten Ergebnissen der *XinAB^{-/-}* Maus und der hier untersuchten *XinABC^{-/-}* Maus Unterschiede bestehen. Eventuelle Unterschiede lassen Rückschlüsse auf die Funktion der Isoform *XinC* im Herz- und Skelettmuskel zu.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen

Die für die Studien verwendeten Versuchstiere waren weibliche Mäuse, die aus den Zuchtlinien SV129/BL6 stammten. Die Herkunft dieser Tiere war dabei die institutseigene Zucht, wobei die Stammeltern von Dr. R. Fässler (Martinsried) gezogen wurden und hier in Bonn im Haus der Experimentellen Therapie der Rheinischen Friederich Wilhelms Universität weitergezüchtet wurden. Zudem wurden Mäuse verwendet, bei denen das Protein "Xin" ausgeschaltet worden war (XinABC^{-/-}). Ihr genetischer Hintergrund basiert ebenfalls auf den Zuchtlinien SV129/BL6.

Die Haltung erfolgte unter Beachtung tierschutzrechtlicher und hygienischer Gesichtspunkte in durchsichtigen 365 x 207 x 140 mm großen, mit Tiereinstreu Granulat (Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe) eingestreuten Käfigen aus Polykarbonat unter konstant gehaltenen Umweltbedingungen (20-22°C, 50% relative Luftfeuchtigkeit und ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus). Die Käfige waren in ein Regalsystem integriert, welches jeden einzeln mit einem Zu- und Abluftstrom versorgte. Damit waren optimale hygienische Bedingungen gewährleistet. Futter (Altromin Standard Diät Maus und Ratte) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Jungtiere aus der Zucht wurden im Alter von ca. 4 Wochen von ihren Eltern getrennt und nach Geschlechtern sortiert.

2.2. Allgemeine Präparationstechniken

2.2.1. Entnahme des Herzens *in toto*

Die Versuchstiere wurden in einem Exsikkator mit Diethylether betäubt und anschließend per Genickbruch getötet. Im Folgenden wurden die Tiere auf einer Präparationsunterlage

2. Material und Methoden

fixiert, durch Trennung der Rippen vom Brustbein eröffnet und das Herz unter Berücksichtigung der Aorta entnommen. Dieses wurde in einer Petrischale mit körperwarmer EGTA-Tyrode (Zusammensetzung der Pufferlösung in Tab. 2.1) von umliegendem Bindegewebe und eventuell verbleibendem Perikard mit Hilfe von zwei spitzen Pinzetten befreit. Nach vorsichtigem Ausdrücken auf saugfähigem Zellstoff wurde das Abtropfgewicht des Organs auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ, USA) ermittelt. Anschließend wurden sie für die weiteren Versuche in den entsprechenden Medien aufbewahrt.

Substanz	EGTA-Tyrode	Messtyrode
KCl (Merck)	4 mM	4mM
NaCl (Merck)	135 mM	135 mM
CaCl ₂ (Merck)	-	1,8 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	2 mM	2 mM
BSA (Sigma)	-	1mg/ml
Trypsininhibitor (Sigma)	-	0,017 mg/ml
Glucose (Merck)	-	9 mM
EGTA (Serva)	2,6 mM	-
pH-Wert (NaOH)	7.4	7.4

Tabelle 2.1.: *Zusammensetzung der Präparations- und Perfusionslösung EGTA-Tyrode sowie der Messtyrode*

2.2.2. Entnahme der Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus*

Die auf einer Präparationsunterlage fixierten getöteten Tiere wurden an den unteren Extremitäten mittels Präparationsbesteck von Haut und Faszien befreit, so dass der Fersensehnenstrang freilag. Nach Durchtrennung dieser Struktur lag der *M. soleus* gut sichtbar zur Präparation frei. Auf Grund seiner intensiveren Rottönung war er vom umliegenden Muskelgewebe gut zu differenzieren. Anschließend wurde aus dem craniolateralen Schienbeinbereich der *M. extensor dig. longus* mit seinen drei Insertionssehnen entnommen. Beide Muskeln wurden bilateral entnommen (siehe auch Abbildung 2.1) und dann in PBS aufbewahrt. Das PBS bestand aus: 0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4.

2. Material und Methoden

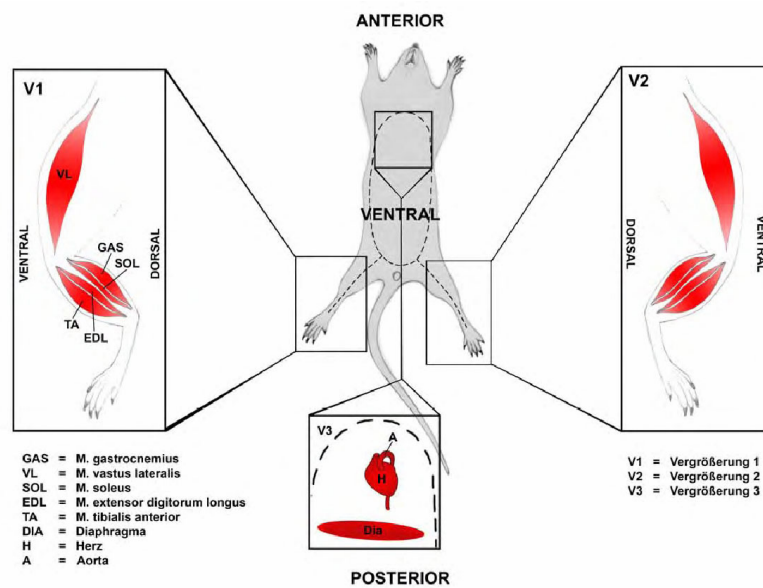


Abbildung 2.1.: *in situ*-Präparationsansicht; die gestrichelte Linie deutet die kutane Exzision an. Die Vergrößerungsbereiche V1 und V2 zeigen die Positionen der zu entnehmenden Muskeln der Hinterläufe. Vergrößerungsbereich 3 zeigt die Positionen von Diaphragma, Herz und Aorta.

2.2.3. Isolation von Kardiomyozyten

Die Herzen wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben entnommen. Das Herz wurde jeweils möglichst schnell in eine gläserne Petri-Schale mit EGTA-Tyrode gelegt. Diese Lösung diente dazu, mit Hilfe des Chelatbildners EGTA extrazelluläres Calcium abzufangen, wodurch die Calciumkonzentration auf unter 10^{-4} M gesenkt wurde, was weitere Kontraktionen des Herzens unterband. Die Zusammensetzung der Perfusionslösungen ist in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgeführt. Die Reihenfolge der Lösungen entspricht der nach Tiemann et al. (2003). Unter einer ausgeleuchteten Stereo-Lupe wurde das am Atriabereich befindliche Bindegewebe sowie verbleibende Perikardreste mittels einer Augenschere entfernt und der Aortenstumpf freipräpariert. Dieser wurde mit zwei spitzen Pinzetten erfasst und über die Spitze einer an der Petri-Schale befestigten Glaskanüle gezogen, sodass diese in das Lumen des linken Ventrikels ragte, und etwas weiter oberhalb mit einem Seidenfaden fixiert (Abbildung 2.2).

Die Glaskanüle wurde aus der Befestigung genommen und mit dem Ende der Langendorff-Perfusionsanlage (Abbildung 2.3) verbunden. Diese diente dazu, die Perfusionslösungen mit Sauerstoff anzureichern, sie auf 36°C zu erwärmen und den nötigen Perfusionsdruck

2. Material und Methoden

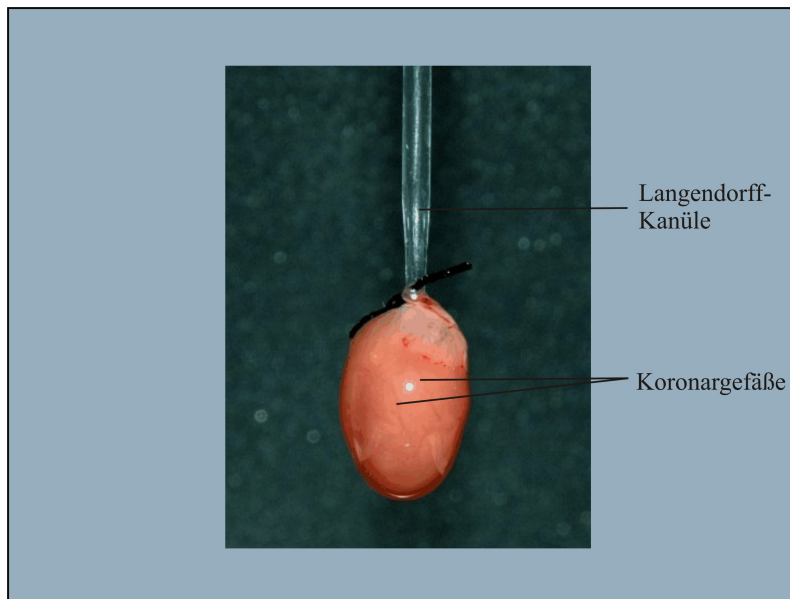


Abbildung 2.2.: Auf eine Langendorff-Kanüle aufgezoogenes Mäuseherz während der Perfusion. Die Koronargefäße sind erkennbar blutleer.

von ca. 100-200 mmWS zu erzeugen. Sie bestand aus einem Einfülltrichter, der mit einer regulierbaren Begasungsfritte versehen war, um die verwendeten Lösungen mit Sauerstoff anzureichern. Er führte in einen Überdruckkolben, in dem sich die jeweils zu perfundierende Lösung befand. Über ein Schlauchsystem, das durch einen Wärmeaustauscher führte, der über ein externes Wärmebad versorgt wurde, war dieser mit der Langendorff-Kanüle verbunden. Nachdem das Herz an dem System befestigt war, wurde der Druck über ein Sauerstoffdruckventil erhöht. Zunächst wurde ein relativ hoher Druck gewählt, um das in den Ventrikeln und den Koronargefäßen befindliche Restblut aus dem Herzen zu entfernen und somit eine gleichmäßige Durchströmung des gesamten Herzens zu gewährleisten. Nach den ersten Momenten der Perfusion wurde der Druck mit Rücksicht auf die Tropfgeschwindigkeit adjustiert. Während der laufenden Perfusion wurden regelmäßig Tropfgeschwindigkeit und Außentemperatur des Herzens kontrolliert, um eine Überhitzung des Herzens und somit einen Zelltod zu vermeiden. Durch Regelung des Sauerstoffdruckes war es möglich, die Temperatur relativ konstant auf einem Wert von 34 -36°C zu halten, was sich positiv auf die Ausbeute der Kardiomyozyten zum Ende des Versuchs hin auswirkte.

Zunächst wurde das Herz für fünf Minuten mit EGTA-Tyrode perfundiert, zur Reduktion des Calciums, das durch den in der Lösung enthaltenen Chelator EGTA abgefangen wur-

2. Material und Methoden

Substanz (Firma)	Hochkalium-Lösung	Trypsin-Lösung	Kollagenase-Lösung
KCl (Merck)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
CaCl ₂ (Merck)	0,02 mM	0,02 mM	0,02 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
Glukose (Merck)	9 mM	9 mM	9 mM
Kalium-Glutamat (Fluka)	130 mM	130 mM	130 mM
Trypsin (Roche)	-	0,4 mg/ml	-
Kollagenase Typ L (Sigma)	-	-	0,375 mg/ml
pH-Wert (KOH)	7,4	7,4	7,4

Tabelle 2.2.: *Zusammensetzung der Hochkalium-Lösung, sowie unter Zusatz der Enzyme Trypsin oder Kollagenase*

de. Nach fünf Minuten wurde die Lösung ausgetauscht. Vor dem Wechsel der Lösungen wurde die restliche alte Lösung in ein Auffanggefäß abgelassen. Erst daraufhin wurde die neue Lösung aus dem Trichter in den Überdruckkolben gefüllt. Jede neue Lösung wurde für 30 Sekunden mit reinem Sauerstoff begast, um einen ausreichenden Sauerstoff-Partialdruck zu erzielen. Als zweite Lösung wurde die Hochkalium-Lösung appliziert (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.2). Diese führte über Steigerung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit für Kalium-Ionen. Hieraus resultierte einer Depolarisierung der Zellmembran auf ca. 0 mV mit der Folge, dass die schnellen Natrium- und Calcium-Kanäle, deren Schwellenwert bei -35 mV liegt, inaktiviert wurden. Der Herzmuskel war nicht mehr zur Kontraktion fähig, was den Energieverbrauch der Zellen deutlich reduzierte und so zu einer Steigerung der Überlebensfähigkeit führte. Das Herz wurde für fünf Minuten mit dieser Lösung perfundiert. Die folgenden Schritte dienten der eigentlichen enzymatischen Aufspaltung der Zell-Matrix- bzw. der Zell-Zell-Verbindungen.

Zunächst wurde das Herz für zehn Minuten mit Trypsin-Lösung behandelt. Diese hatte die gleiche Zusammensetzung wie die Hochkalium-Lösung mit Ausnahme des Zusatzes von 0,4 mg/ml des Enzyms Trypsin (Roche, Mannheim), das aus Rinderpankreas gewonnen wurde. Trypsin spaltet Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Arginin- oder Lysinverbindungen. Unter Trypsineinfluss verringerte sich die Tropfgeschwindigkeit deutlich und die aus dem Herzen austretende Flüssigkeit wurde hochviskös. Nach weiteren zwei bis drei Minuten Perfusion mit reiner Hochkalium-Lösung wurde das Herz nun für 10 - 12

2. Material und Methoden

Minuten mit einer Hochkalium-Lösung unter Zusatz von 0,375 mg/ml Kollagenase Typ L (Sigma-Aldrich, Steinheim) perfundiert. Dieses Enzym stammt aus dem gram-negativen Bakterium *Clostridium histolyticum* und spaltet hochspezifisch Peptide mit der Aminosäuresequenz GLY-PRO-X-GLY-PRO, die im Bindegewebsprotein Kollagen mit seinem sehr hohen Prolingehalt häufig anzutreffen ist. Das X steht hier für eine variable Aminosäure. Während der Perfusion mit Kollagenase-Lösung nahm die Tropfgeschwindigkeit zum Ende wieder stark zu, was auf eine Lyse des Zellverbandes schließen ließ.

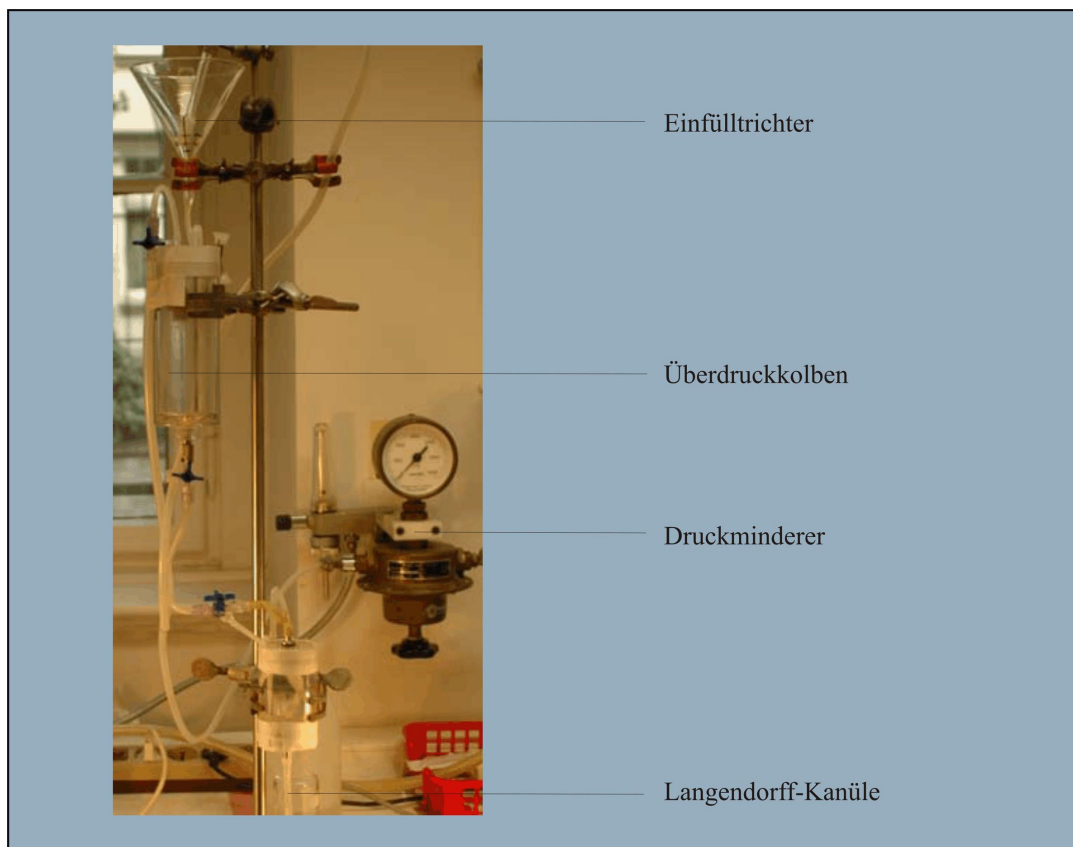


Abbildung 2.3.: *Modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage*

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Herz vorsichtig mit einer Schere eingeschnitten, um restliche Flüssigkeit aus den Herzkammern abzulassen, von der Kanüle genommen, in einem Becherglas mit auf 36°C temperierter Messtyrode überflutet und anschließend mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Die so entstandene Suspension aus Gewebetrümmern und einzelnen Zellen wurde durch einen Gaze-Filter in zwei Zentrifugenröhrchen gefüllt. Mittels einer kurzen (ca. 30 s) sanften Zentrifugation wurden die Zellen sedimentiert. Es ergaben sich optimalerweise Sedimente von bräunlich-gelber Farbe. Die-

2. *Material und Methoden*

se wurden in frischer Meßtyrode resuspendiert. Nach einer erneuten Sedimentation allein durch die Schwerkraft von ungefähr zehn Minuten wurde der entstandene Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Die Farbe des Zellpellets sollte nun gelblich sein. Die Zellen wurden in ein paar Tropfen Tyrode resuspendiert und in einen auf 36°C vorgewärmten Schliff-Erlenmeyerkolben gefüllt. Dieser wurde mit Sauerstoff begast und mit einem passenden Schliff-Deckel verschlossen. Die isolierten Kardiomyozyten wurden für Immunmarkierungen (siehe Kapitel 2.4.4) und Kontraktilitätsmessungen (siehe Kapitel 2.5.1) verwendet.

2.2.4. Präparation der Tibia

Es wurde standardmäßig das rechte Schienbein aus den Versuchstieren entnommen: die rechte Tibia wurde mit Hilfe von Präparationsbesteck und einem Skalpell vorsichtig nach Durchtrennung des Bandapparates der angrenzenden Gelenkstrukturen aus den Hintergliedmaßen herauspräpariert und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers (Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich) erfasst. Die Tibialänge wurde als Bezugsgröße für das Herzgewicht ermittelt.

2.3. Körperbasisdaten im Vergleich

Alle Versuchstiere, die für dieses Projekt als Grundlage hinzugezogen worden sind, wurden standardmäßig erfasst. Es wurden bei jeder Präparation das reine Körpergewicht (BW) nach erfolgter Tötung, das Herzgewicht (HW) und die Tibialänge (TL) festgestellt. Das Herzgewicht wurde nach Organpräparation, wie unter Kapitel 2.2 erläutert, mit einer Feinwaage (vergleiche Kapitel 2.2) gewogen und sowohl auf das Körpergewicht als auch auf die erfasste Tibialänge normiert, um einen Vergleich der Daten beider Genotypen zu ermöglichen.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Methoden der Präparatherstellung

Die Skelettmuskeln und die Herzen wurden sowohl in Paraffin eingebettet als auch kryokonserviert, um sie für Immunmarkierungen und histologische Färbungen zu verwenden.

2.4.1.1. Paraffineinbettung

Paraffineinbettung der Herzen

Mit Hilfe der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage wurden die frisch entnommenen Herzen retrograd über die Aorta mit 4% PFA in PBS für 15 Minuten perfundiert. Bei dieser Methode werden intermolekulare Brücken zwischen freien Aminogruppen gebildet, und die Proteine dadurch vernetzt. Im Anschluss wurden sie in eine Apparatur überführt, in der sie über die nächsten 24 Stunden mit 4% PFA auf PBS-Basis umspült und anschließend mit Leitungswasser für weitere 3 Stunden gewaschen wurden.

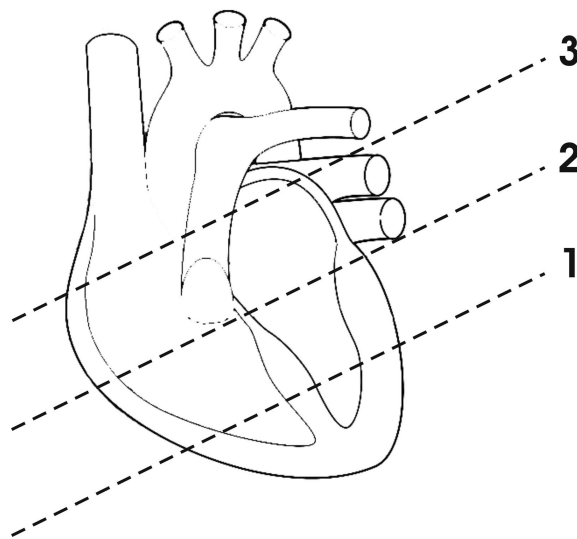


Abbildung 2.4.: Schematisierte Schnittführung am Herz vor der Paraffineinbettung

Im nächsten Schritt wurden die Herzen mit Hilfe eines Einwegskalpells an drei definierten Positionen (siehe Abbildung 2.4) zerschnitten, damit im weiteren Verlauf die Vermessung der Herzwanddicken an verschiedenen Positionen möglich war. In einer Einbettungsbox wurden die Organteile vorsichtig mit LB-Agar (Rezeptur nach Lennox, Fa. Serva Electrophoresis) überschichtet, so dass ein Verrutschen ausgeschlossen war. Die anschließende

2. Material und Methoden

Einbettung in Paraffin erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten (Histomaster, Fa. Bayimed 2052) nach folgendem Schema:

Arbeitsschritte	Inkubationslösung	Zeitraum der Inkubation
1. Entwässerung	2 mal in 96% Ethanol	je 1 Stunde
	3 mal in 100% Ethanol	je 1 Stunde
	2 mal in Chloroform (Benzol)	je 1 Stunde
2. Einbettung	in Paraffin (Paraplast, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	ca. 2 bis 3 Stunden aushärten lassen

Tabelle 2.3.: *Protokoll Paraffineinbettung*

Präparatherstellung der Herzen

Nach der Einbettung wurden mit einem Mikrotom (Euromex, NL) ca. 5 μm dicke Querschnitte des entnommenen Transplantats angefertigt und auf Glasobjektträger (Superfrost, Megro/Ratiomed) übertragen. Bis zur Verwendung wurden die Glasobjektträger in einer geeigneten Holzkiste aufbewahrt.

Paraffineinbettung der Skelettmuskeln

Nach der Präparation der Muskeln wurden diese, wie bereits für die Herzen unter Kapitel 2.4.1.1 beschrieben, in eine Apparatur überführt, in der sie für die nächsten 24 h mit 4% PFA in PBS umspült wurden und anschließend mit Leitungswasser für weitere 3 h gewaschen wurden. Anschließend wurden die Muskeln mit Hilfe eines Einwegskalpells in Hälften geteilt, so konnte die eine Hälfte des Muskels für einen Längsschnitt, die Andere für einen Querschnitt vorbereitet werden. In einer Einbettkassette (Macrosette, Fa. NeoLab) wurden die Muskelteile vorsichtig mit LB-Medium überschichtet, so dass ein Verrutschen ausgeschlossen war. Als Hilfe zur Unterscheidung der beiden Muskelteile wurden die Längsschnitte mit dem Farbstoff Eosin vorgefärbt. Die anschließende Einbettung in Paraffin erfolgte mit Hilfe des Einbettautomaten nach dem Schema der Herzparaffineinbettung.

Präparatherstellung der Skelettmuskeln

Nach erfolgter Einbettung wurden mit eines Mikrotoms ca. 5 μm dicke Querschnitte des entnommenen Präparats angefertigt und auf Glasobjektträger übertragen. Auf einem Objektträger wurden je ein Längs- und ein Querschnitt aufgebracht. Die Objektträger wurden

2. Material und Methoden

zusammen mit den Herzen in einer geeigneten Holzkiste bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.1.2. Herstellung und Fixierung von Gefrierschnitten

Die präparierten Mausorgane wurden in flüssigem Stickstoff (-180°C) schockgefroren und mit Hilfe eines Gefriermediums (Tissue Tech, Fa. Sakura Finetec) auf einer kleinen Trägerplatte eines Gefriermikrotoms befestigt. Bei dem Gefriermedium handelt es sich um eine hochviskose, gesättigte Zuckerlösung, die auf Grund ihres langsamen Gefrierhaltens gewebeschützende Eigenschaften hat. Von den so vorbehandelten Mausorganen wurden bei -20 °C mit Hilfe eines Mikrotoms Gefrierschnitte hergestellt. Die 6 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf Objektträger (Superfrost, Megro/Ratiomed) überführt, und bis zur Fixierung bei -80 °C in einer geeigneten Box gelagert.

Fixierung von Gefrierschnitten

Für die Gefrierschnitte wurde die Fixierungsmethode mit Methanol und Aceton gewählt. Die Objektträger wurden zunächst für 2-5 min bei -20 °C in Methanol fixiert und anschließend für 30 s bei -20 °C in Aceton permeabilisiert. Die Schnitte wurden unter einem Abzug luftgetrocknet, mit einem hydrophoben Stift umrandet und 10 min in PBS gewaschen.

2.4.1.3. Befestigung und Fixierung von isolierten Kardiomyozyten auf Objektträgern

Die isolierten Kardiomyozyten befanden sich nach der enzymatischen Trennung aus dem Zellverband in Tyrode. Um sie für die indirekte Immunfluoreszenz vorzubereiten, wurden auf einem Objektträger Kreise mit einem Fettstift gezogen. In diese Kreise wurde zur Beschichtung das ECM-Protein Laminin (Fa. Sigma; 20% in Tyrode) gegeben und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellsuspension mit den Kardiomyozyten aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde setzen sich die Zellen ab und der Überstand wurde abgesaugt. Die Objektträger wurden weiter zur Fixierung verwendet.

2. Material und Methoden

Fixierung von isolierten Kardiomyozyten auf Objektträgern

Die Fixierung der isolierten Kardiomyozyten wurde, wie unter Kapitel 2.4.1.2 für die Gefrierschnitte mit Methanol und Aceton beschrieben, durchgeführt.

2.4.2. Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin im Herz- und Skelettmuskel

Zur weiteren Verwendung der Paraffin eingebetteten Organe wurde eine Entparaffinierung entsprechend Tabelle 2.4 durchgeführt. Anschließend wurde die Hämatoxylin-Eosin Färbung nach dem in Tabelle 2.5 dargestellten Schema durchgeführt.

Arbeitsschritte	Inkubationslösung	Zeitraum der Inkubation
Entparaffinierung:	3 mal in Xylol	für je 3min
	2 mal in 100% Ethanol	für je 2 min
	2 mal in 96% Ethanol	für je 2 min
	1 mal in 70% Ethanol	für je 2 min
	1 mal in Aqua bidest.	für 2 min

Tabelle 2.4.: *Protokoll Entparaffinierung*

Arbeitsschritte	Inkubationslösung	Zeitraum der Inkubation
HE Färbung	1 mal Hämalaun	für 8 min
	1 mal Leitungswasser	für 10 min
	1 mal Eosin	für 10 s
	1 mal Leitungswasser	für 5 s
	1 mal 70% Ethanol	für 1 min
	2 mal 96% Ethanol	für je 1 min
	2 mal 100% Ethanol	für je 1 min
	3 mal Xylol	für je 1 min

Tabelle 2.5.: *Protokoll HE-Färbung*

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein histologisches Färbeverfahren, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Sie dient der Differenzierung unterschiedlicher Gewebestrukturen im Lichtmikroskop anhand von zwei aufeinander folgenden Färbeschritten. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure und das raue endoplasmatische Reticulum. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und dient als Nachweis für alle acidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen)

2. Material und Methoden

Strukturen rot. Durch Eosin werden vor allem die Zellproteine rot angefärbt. Nach der Hämatoxylin-Färbung sind die Zellkerne zunächst rötlich-braun sichtbar aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Durch Erhöhung des pH-Wertes ("Bläuen") mittels Spülen in reinem Leitungswasser schlägt der Farbton in das typische Blauviolett um. Anschließend folgt die Zytoplasma-Färbung in einer wässrigen Lösung von Eosin. Durch weitere Spülschritte über Ethanollösungen in aufsteigender Konzentration bis zu absolutem Ethanol wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in einem organischen Lösungsmittel wie Xylol geklärt und kann nun mit einem Eindeckmittel (Entellan, Fa. Merck) und einem Deckgläschen bedeckt werden. So bleiben Schnitt und Färbung für Jahre erhalten und mikroskopierbar.

2.4.3. Azan-Färbung nach Heidenhain von Herzmuskelgewebe

Zur Darstellung von kollagenem und retikulärem Bindegewebe wurden einzelne Gewebeschnitte mittels Azan-Färbung nach Heidenhain gefärbt. In dieser Färbemethode werden zwei Einzelfärbungen angewandt, um die unterschiedlichen Gewebestrukturen zu unterscheiden. Der erste Färbeschritt ist eine regressive Färbung, das heißt, das Gewebe wird zunächst undifferenziert gefärbt und überschüssiger Farbstoff im nächsten Schritt wieder entfernt (ähnliches Prinzip wie in der Hämatoxylin-Eosin Färbung). Der hierbei verwendete Farbstoff Azokamin färbt bei 56 °C das Gewebe zunächst rötlich an. Durch kurzes Einlegen in Anilin - Ethanol wird dann der überschüssige Farbstoff entfernt. Die regressive Färbung wird durch essigsäures Ethanol abgestoppt. Dem zweiten Farbstoff geht eine Behandlung mit Phosphorwolframsäure voraus, welches das kollagene Bindegewebe anbeizt und eine bessere Färbeaffinität des zweiten Farbstoffes Anilinblau-Orange für das Zielgewebe begünstigt. Es folgt dann die zweite Färbung mit Anilinblau-Orange bei Raumtemperatur. Das Ergebnis der Azan-Färbung nach Heidenhain zeigt kollagenes und retikuläres Bindegewebe prägnant blau, Chromatin rot, Muskelgewebe je nach Fixierung rötlich bis orange, Erythrozyten rot, Gliafasern rot, Schleim blau, sowie Zellgranula gelb, rot oder blau. Die Färbung wurde nach dem Schema in Tabelle 2.6 durchgeführt. Der Hauptfokus bei dieser Färbung lag während des Mikroskopierens auf der Untersuchung der Koronargefäße einerseits und des Herzmuskelgewebes andererseits.

2. Material und Methoden

Arbeitsschritte	Inkubationslösung	Zeitraum der Inkubation
AZAN-Färbung	1 x Azokamin (56°C)	für 15 min
	1 x Anilin-EtOH	kurz eintauchen
	1 x EtOH, essigsauer	kurz eintauchen
	1 x Phosphorwolframsäure	für 20 min
	1 x Aqua dest.	kurz eintauchen
	1 x Anilinblau-Orange	für 15 Minuten
	1 x Aqua dest.	kurz eintauchen

Tabelle 2.6.: *Protokoll AZAN-Färbung nach Heidenhain*

2.4.4. Indirekte Immunfluoreszenzen von Herz- und Skelettmuskelgewebe

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzstudien können Antigene nachgewiesen und ihre Lokalisierung innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes untersucht werden. Dazu wurden Gefrierschnitte von Mausgewebe oder isolierte Kardiomyozyten fixiert (vergleiche Kapitel 2.4.1.3), permeabilisiert und anschließend mit einer 1%igen BSA-PBS-Lösung mit 10% Ziegen Serum (NGS, Jackson/Dianova, West Grove USA) inkubiert, die unspezifische Bindungsstellen blockierte. Der Nachweis des Antigens erfolgte mit einem primären Antikörper, der das Antigen spezifisch erkannte, und einem sekundären Antikörper, der gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluorochrom gekoppelt war. Nach Anregung mit Fluoreszenzlicht emittierte das Fluorochrom Licht einer bestimmten Wellenlänge, das mit Hilfe eines Mikroskops sichtbar gemacht wurde.

Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz war es auch möglich, die Lokalisierung zweier Antigene simultan zu vergleichen. Für eine solche Doppelfärbung wurden primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet (z. B. Meerschweinchen und Kaninchen). Es wurden zwei sekundäre Antikörper eingesetzt, die jeweils spezifisch gegen einen der primären Antikörper gerichtet waren und unterschiedliche Fluorochrome (z. B. Cy3 und Alexa 488) trugen.

2.4.4.1. Blockierung und Immunmarkierung

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die fixierten Gefrierschnitte und isolierten Kardiomyozyten in einer 1%igen BSA-PBS-Lösung mit 10% NGS für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem

2. Material und Methoden

primären Antikörper, der in einer 1%igen BSA-PBS-Lösung verdünnt wurde. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde zweimal für 5 min mit 0,05% Triton100 in PBS und einmal für 5 min mit PBS gewaschen. Die folgende zweistündige Inkubation mit dem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (in 1%igen BSA-PBS verdünnt) erfolgte unter Lichtausschluss bei 37°C. Es folgten drei Waschschrte mit PBS für je 5 Minuten.

2.4.4.2. Eindeckeln, Fluoreszenzmikroskopie und elektronische Bildbearbeitung

Zum Eindeckeln wurde das Eindeckelmedium Mowiol (bestehend aus 21,8% Mowiol, 43% Glycerol, 3,6 mM Tris-HCl, pH 8,5 in H₂O bidest.) verwendet. Gefärbte Gefrierschnitte und isolierte Kardiomyozyten wurden eingedeckelt, indem ein Tropfen des Mediums auf ein Deckglas gegeben wurde. Das Deckglas wurde möglichst ohne Luftblasen auf den Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die gefärbten Präparate wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Nikon) ausgewertet. Beim Epifluoreszenzmikroskop wurde die Dokumentation mit Hilfe einer monochromen Kamera durchgeführt, die das emittierte Licht aufnahm. Um Licht mit einer HBO100 Lampe eines entsprechenden Wellenlängenbereichs zu erzeugen, wurde ein Anregungsfilter ("excitation filter", EX) eingesetzt, der Licht mit allen anderen Wellenlängen herausfilterte. Um die an die sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffmoleküle anzuregen, wurde das Licht durch einen dichroischen Spiegel ("dichroic mirror", DM) auf das Präparat gelenkt. Der angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht, das langwelliger war als das Anregungslicht und den dichroischen Spiegel daher ohne Ablenkung durchlaufen und durch den Bandpassfilter (BA) an die Kamera weitergeleitet werden konnte. Da der Bandpassfilter ebenfalls nur für Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs durchlässig war, wurde verhindert, dass emittiertes Licht eventuell kreuzangeregter anderer Fluoreszenzfarbstoffe weitergegeben wurde. Die Abbildungen wurden mit Hilfe der Computerprogramme Adobe Photoshop 7.0, ImageJ und IrfanView bearbeitet. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen von Immunmarkierungen handelt es sich auf Grund der monochromen Kamera im Mikroskop um eine Fehlfarbdarstellung, die durch das nachträgliche Einfärben und Bearbeiten mit Hilfe der genannten Computerprogramme erzielt wurde.

2. Material und Methoden

2.4.4.3. Primär- und Sekundärantikörper

In indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die im Anhang in Tabelle A.11 aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

2.4.4.4. Blockierungsseren

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde sowohl für die Blockierung als auch die Verdünnung der Primärantikörper und der Sekundärantikörper Ziegenserum verwendet.

2.4.5. Histomorphometrie der Herzdimensionen

Die hier durchgeführte Morphometrie wurde mit verschiedenen Computerprogrammen, die weiter unten beschrieben sind, vorgenommen. Um eine eventuell genotyp-abhängige pathologische Anatomie demonstrieren zu können, wurden Herzen von Wildtyp als auch von Xin defizienten Versuchstieren der identischen Methode untersucht.

2.4.5.1. Interventrikuläres Septum und Herzwanddicke

Für die Untersuchung der Herzwanddicken sowie des interventrikulären Septums wurden, Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt Herzschnitte eingesetzt. Die Vermessung der rechten und linken Ventrikelwand sowie des Septums erfolgte nach einer vorab definierten Standardmethode: es wurde an drei Positionen (siehe Abbildung 2.4) der Wanddurchmesser mit einem Maßwerkzeug der Software (Discus, Fa. Carl H. Hilgers) erfasst, die ermittelten Werte in eine Tabelle übertragen und aus diesen Einzelwerten das arithmetische Mittel gebildet. Nach Vollendung der Messungen lagen folglich Mittelwerte von allen gemessenen Strukturen an den verschiedenen Positionen im Herzen zwischen beiden Genotypen zum Vergleich vor. Der Vergleich der vorliegenden Werte wurde durch die Bildung des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung möglich.

2.4.5.2. Perivaskuläre Fibrose der Koronargefäße

Zur Beurteilung des Herzphänotyps der beiden Genotypen wurden Azan-gefärbte Herzen (siehe auch Kapitel 2.4.3) von jeweils 10 weibliche Mäuse im Alter von 12 Wochen bzw.

2. Material und Methoden

1,5 Jahre herangezogen. Es lagen also Werte zu zwei Altersgruppen für jeden Genotyp vor. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Nikon) wurden digitale Aufnahmen von Koronargefäßen bei 40facher Vergrößerung gemacht. Die fotografierten Gefäße wurden mit dem Computerprogramm ImageJ nach folgendem Planimetrie-Prinzip vermessen: von jedem Koronargefäß wurde zuerst der Außenrand des umliegenden Bindegewebes mit dem Mauscursor umfahren und der Flächeninhalt ermittelt. Nachfolgend wurde die Fläche des Gefäßlumens erfasst und von dem zuvor ermittelten Wert der Gesamtfläche subtrahiert. Das Ergebnis ist eine Flächenangabe des perivaskulären Bindegewebes. Damit eine objektive Bewertung der Resultate möglich war, wurde die Flächenangabe des Bindegewebes normiert auf die Gesamtfläche des Gefäßes, woraus sich eine prozentuale Angabe des Bindegewebsanteils ergab.

2.4.5.3. Größenvergleich der isolierten Kardiomyozyten

Während der Versuche zur Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, wurden die Größen der isolierten Zellen vermessen. Zu Beginn wurde mit Hilfe eines Referenzobjektträgers die Skala des verwendeten Okularmikrometers auf die Einheit [μm] geeicht. Während den laufenden Versuchen wurden die Länge und die Breite von 400 einzelnen Kardiomyozyten aus den *XinABC^{-/-}* Tieren und 200 einzelne Zellen aus der Wildtyp Mäusen vermessen. Zum Vergleich wurden aus allen Werten der homogenen Versuchsgruppen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung errechnet.

2.4.5.4. Evaluierung der Glanzstreifenverteilung auf Immunfluoreszenzbasis

Zur Untersuchung der Glanzstreifen wurden Einzelzellen mit Antikörpern markiert wie in Kapitel 2.4.4.3 beschrieben. Die Zellen wurden mit den primären Antikörpern Anti-Cadherin und Anti-T12 und auf einem separaten Objektträger mit Anti-Connexin43 und Anti-T12 gefärbt. Bei beiden Färbeprozeduren wurde der Antikörper Alexa488 GAR in Kombination mit IgG1 GAM TXR als Sekundärantikörper verwendet. Der Anti-T12 Antikörper markiert das Z-Scheiben Epitop des Proteins Titin und diente hier als Referenzfärbung. Mittels eines Mikroskops (siehe auch Kapitel Fluoreszenzmikroskopie) wurden digitale Aufnahmen der immunmarkierten Zellen angefertigt. An diesen Aufnahmen erfolgte folgende Auswertung: Von jeder isolierten Kardiomyozyte wurde die Anzahl der

2. Material und Methoden

terminal gelegenen Glanzstreifenstrukturen versus der Anzahl der nicht-terminal gelegenen Glanzstreifenstrukturen ermittelt. In der Gruppe der Xin-Wildtyp Versuchstieren wurde aus 46 einzelnen Zellen und aus der XinABC^{-/-} Gruppe aus 58 einzelnen Zellen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung gebildet.

2.5. Physiologische Methoden

2.5.1. Kontraktilitätsversuche mit isolierten Kardiomyozyten

2.5.1.1. Übersicht und Gruppeneinteilung

Für die in vitro-Untersuchungen wurden ventrikuläre Kardiomyozyten aus Herzen von weiblichen SV129/BL6 Wildtyp Mäusen sowie XinABC^{-/-} Mäusen isoliert (vergleiche Kapitel 2.2.3). An diesen Zellen wurde optisch die Verkürzung der Sarkomere nach elektrischer Stimulation unter Kontrollbedingungen untersucht. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur in dem beschriebenen Schliff-Erlenmeyerkolben gelagert. Zuvor wurden sie mit Sauerstoff begast und umgehend mit einem Schliff-Erlenmeyerkolbenstopfen verschlossen, so dass kein Gasaustausch mit dem Umfeld stattfinden konnte.

2.5.1.2. Übersicht über die Messapparaturen

Die Apparaturen, die zur Messung der Sarkomerlängenverkürzung benötigt werden, lassen sich dadurch einteilen, dass sie zur Erfüllung einer der drei folgenden Aufgaben dienen:

1. *Gewährleistung geeigneter Umgebungsbedingungen für die Kardiomyozyten:*
Dies ist die wichtigste Aufgabe der Versuchskammer, die die isolierten Zellen enthält. Die Schaffung einer konstanten Temperatur von ca. 36°C erfolgt über ein umspülendes Wasserbad und einem in der Kammer angebrachten Fühler zur Temperaturbestimmung. Um einen Verbrauch der Nährstoffe in der Zellsuspension zu verhindern und den Zellen ein möglichst optimales Umgebungsmilieu zu gewährleisten, wurde eine kontinuierliche Perfusion verwendet.
2. *Generierung und Steuerung der externen elektrischen Reize:*
Das vom Computer und dem Programm Clampex (Axon Instruments, Union Ci-

2. Material und Methoden

ty, CA, USA) erzeugte elektrische Reizmuster wird über einen Analog/Digital-Wandler auf ein Reizgerät geleitet, das Spannung und Dauer der Reize definiert. Das Reizgerät ist direkt mit der in der Messkammer gelegenen Reizelektrode verbunden und erzeugt so eine elektrische Feldstimulation.

3. Erfassung und Verarbeitung der Sarkomerlängenverkürzung:

Die Messkammer befindet sich auf dem Objektisch eines inversen Mikroskops. Das Bild wird von einer am Mikroskop montierten Kamera erfasst und über eine Steuerungseinheit an einen benachbarten Computer gesendet. Mit Hilfe des Programms IonWizard (IonOptix, Milton, MA, USA) wird simultan die Sarkomerlänge bestimmt, die direkt gespeichert wird.

2.5.1.3. Versuchsstand

Um Störungen während der Messungen durch Erschütterungen von außen zu minimieren, war das Mikroskop mit Versuchskammer auf einem schwingungsgedämpften Tisch positioniert, der aus einem Metallgestell mit einer mechanisch entkoppelten, quarzsandgefüllten Edelstahlwanne und einer aufliegenden 3 cm starken Granitplatte bestand (Abbildung 2.5).

2.5.1.4. Versuchskammer

Die Versuchskammer wurde von der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Institutes II der Uni Bonn aus Acrylglas hergestellt (Abbildung 2.6). Sie war kreisförmig mit einem Außendurchmesser von 5 cm. Auf dem Gleittisch des inversen Mikroskops wurde sie gegen Verrutschen gesichert und mit Justierschrauben fixiert. Um das Kammerlumen war ein Wasserdurchlauf gefräst, durch den das vom Wärmebad (Julabo F10; Julabo Inc., Allentown, PA, USA) erhitzte Wasser geleitet wurde. Mittels des im Kammerlumen angebrachten Thermofühlers konnte die in der Kammer herrschende Temperatur ständig überwacht werden und durch Regelung des Wasserbades konstant gehalten werden. Während der Messung wurde eine Temperatur von 36°C angestrebt.

Der Boden der nach oben offenen Versuchskammer bestand aus einem mit Zweikomponentenklebstoff befestigtem Deckglas der Stärke Null. Nahe dem Kammerboden lag der Zulauf der kontinuierlichen Perfusion. Die Absaugung erfolgte über eine auf der gegenüberliegenden Seite befestigte Glaskapillare von oben. Somit wurde die Kammer gleich-

2. Material und Methoden



Abbildung 2.5.: Versuchszustand. 1 Mikroskop Axiovert 100 TV; 2 IonOptix MyoCam; 3 Perfusionsystem; 4 Julabo F10 Wärmebad; 5 HyoFlo Absaugpumpe; 6 IonOptix HyperSwitch; 7 Transformator für die Xenonlampe; 8 IonOptix Fluorescence System Interface; 9 IonOptix Kamerasteuerungselement; 10 Verstärker; 11 Kontrollmonitor für die Datenerfassung; 12 Grass SD 9 Reizgerät; 13 Transformator für die Hellfeldlampe; 14 Kontrollmonitor für Steuerung des Reizmusters

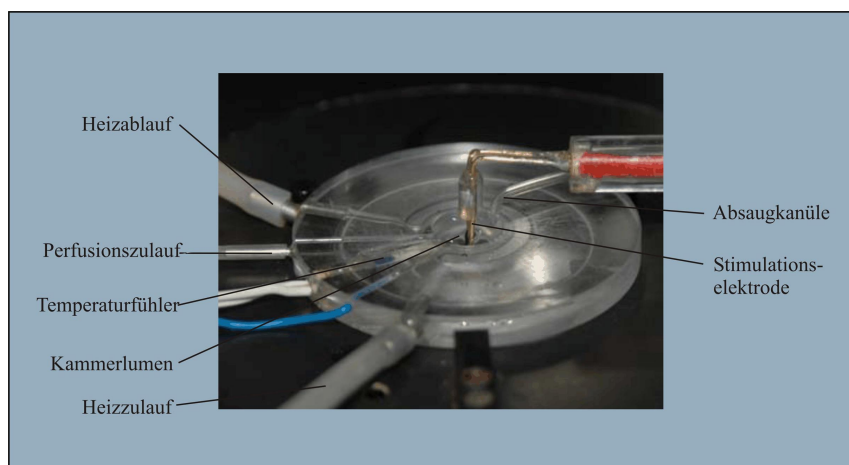


Abbildung 2.6.: Versuchskammer für isolierte Kardiomyozytenstimulation

2. Material und Methoden

mäßig und vollständig durchspült. Durch diese Komponenten konnten die Umgebungsbedingungen der Kardiomyozyten konstant gehalten werden, sodass sie auch während der Versuchsdauer (ca. 30 min) in der Versuchskammer noch messbar waren.

2.5.1.5. Beschichtung der Versuchskammer mit den Kardiomyozyten

Durch die Fließgeschwindigkeit der kontinuierlichen Perfusion wären die Zellen weggespült worden. Um dieses zu unterbinden, wurden die Kardiomyozyten mit Laminin (Sigma-Aldrich, Steinheim) am Boden der Versuchskammer adhärirt. Das Laminin wurde in einer Konzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ in Messtyrode verdünnt. Es wurden zunächst für sechs Minuten drei Tropfen des aufgelösten Laminins in die Kammer gegeben. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pasteur-Pipette wieder abgesaugt und die Zellsuspension in die Kammer gefüllt. Nach weiteren sechs Minuten waren die Zellen genügend an den Kammergrund adhärirt, sodass die Perfusion gestartet werden konnte. Während der Zeit der Anhaftung wurde das Wasserbad der Kammer ausgeschaltet, da es ansonsten durch die erhöhte Temperatur zur Zellyse gekommen wäre.

2.5.1.6. Die Perfusion

Um zuverlässige, reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen, musste die Perfusion mehrere Bedingungen erfüllen:

1. Eine adäquate Fließgeschwindigkeit war essentiell, damit die Zellen nicht von zu schnellem Fluss weggeschwemmt wurden.
2. Gleichzeitig musste eine optimale Versorgung der Zellen durch genügend Nährstoffangebot gewährleistet sein.
3. Zudem musste die Perfusion gleichmäßig erfolgen, damit die Zellen während der Messung möglichst stationär liegen blieben, was für eine erfolgreiche und genaue Messung erforderlich war.

Als Vorratsspeicher für die Perfusionslösung fungierte der Kolben einer 50 ml Perfusor-spritze, die ca. 30 cm über der Versuchskammer in einer Lochleiste angebracht war. Somit wurde der Perfusionsdruck allein über den hydrostatischen Druck der Perfusionslösung gesichert. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde über einen Tropfenzähler (Exadrop®, Braun, Melsungen) eingestellt, der in die Leitung zur Messkammer eingebaut war. Er

2. Material und Methoden

wurde konstant auf 70 Tropfen pro Minute gestellt. Bevor der Schlauch auf die Messkammer traf, erfolgte eine Erwärmung auf 36°C über einen Wärmeaustauscher, der von dem identischen Wärmebad wie die Umspülung der Versuchskammer versorgt wurde. Die Absaugung der Lösung aus der Messkammer erfolgte über eine Absaugpumpe (HyoFlo, Herts, UK), die an ein Saugflasche angeschlossen war und in dieser einen Unterdruck erzeugte. Über einen Schlauch war diese Flasche mit der Absaugkapillare verbunden.

2.5.1.7. Die elektrische Stimulation von extern

Die elektrische Stimulation erfolgte über eine Reizelektrode, die aus zwei parallel angeordneten 0,8 mm starken Golddrähten bestand. Die Elektrode war an einem Mikromanipulator befestigt, sodass sie in der Versuchskammer bewegt werden konnte. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Drähte in die Kammer eingetaucht und so verschoben, dass sich die zu messende Zelle unmittelbar zwischen ihnen befand. Die Reizelektrode war mit einem Reizgerät (Grass SD 9, Quincy, USA) verbunden, das die angelegte Spannung erzeugte. Sie betrug für jeden einzelnen Reiz 30 V mit einer Dauer von 0,4 ms. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Frequenzen gereizt, wobei in jeder Frequenz 20 Reize gesetzt wurden und auf jeden Stimulationszyklus eine 30-sekündige Pause folgte. Die Reihenfolge der Frequenzen war 0,5, 10, 1, 8, 2, 6, und 4 Hz. Die Steuerung dieses Protokolls wurde von einem Computer und dem Programm Clampex übernommen, der über einen Analog/Digital-Wandler mit dem Reizgerät verbunden war.

2.5.1.8. Prinzip der optischen Sarkomerlängenmessung

Wie in der Skelettmuskulatur sind die Myofilamente Aktin und Myosin bei Herzmuskelzellen charakteristisch angeordnet. Dadurch bildet sich im lichtmikroskopischen Bild eine Querstreifung mit alternierenden hellen und dunkleren Streifen, wobei der Abstand zwischen zwei dunklen Streifen (Z-Scheiben) die Länge eines Sarkomers bestimmt.

Durch die am inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 100 TV, Carl Zeiss, Oberkochen) befestigte Kamera (Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA) konnten diese Hell-Dunkel-Unterschiede detektiert, auf dem Bildschirm abgebildet und von der zugehörigen Software weiterverarbeitet werden. Aus ihnen wurde eine Schwingungskurve ermittelt, die im Idealfall sinusförmig war. Eine Periode dieser Kurve entsprach der Länge eines Sarkomers. Da jedoch aufgrund von biologischen Schwankungen die Kurve einer gewissen

2. Material und Methoden

Streuung unterworfen war, errechnete das Programm mittels Fast-Fourier-Transformation ein "Powerspektrum", wobei das Produkt der Grundschwingung mit seiner Amplitude aufgetragen wurde. Die Lage dessen Maximums war stellvertretend für die absolute Sarkomerlänge (Abbildung 2.7).

Während einer Sarkomerverkürzung kam es zu einer Verlagerung des Maximums des Powerspektrums. Die Kamera ermittelt Bilder mit einer Frequenz von 240 Hz, somit waren auch die sehr schnellen Veränderungen der Sarkomerlänge während einer Kontraktion messbar.

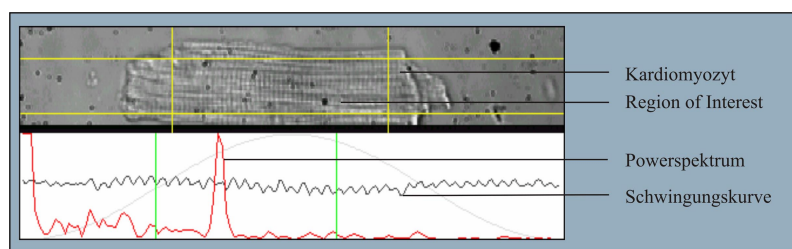


Abbildung 2.7.: Videobild eines Kardiomyozyten inklusive der Errechnung eines Powerspektrums

Zu Beginn einer Messung wurde die Kammer nach möglichst intakten, brauchbaren Zellen abgesucht. Dazu wurde vor allem darauf geachtet, dass die Zellen ihre physiologische, rechteckige Form beibehalten hatten. Im Folgenden wurde die Zelle so ausgerichtet, dass sie vollständig im Videobild zu erkennen war und dort die Sarkomerstruktur senkrecht erschien. Nur so konnte die Sarkomerverkürzung bei der ausgelösten orthograden, isotonen Kontraktion optimal und möglichst rauscharm gemessen werden. Anschließend wurde eine "Region of Interest" (ROI) definiert, in der ein Teil der Zelle eingefasst wurde, in dem die Sarkomere gut strukturiert, regelmäßig angeordnet und kontrastreich waren. Erst jetzt konnte ein Experiment gestartet werden.

2.5.1.9. Auswertung der Daten

Auswertung der Messdaten der Sarkomerverkürzung

Die gemessene und berechnete Sarkomerlänge wurde als Funktion integriert über die Zeit dargestellt, sodass je nach Stimulationsfrequenz ein charakteristisches Bild entstand. Die letzten fünf Verkürzungenamplituden eines jeden Stimulationszyklus, bei denen ein Gleichgewicht eingetreten war, wurden manuell gekennzeichnet und von der Software

2. Material und Methoden

gemittelt. Damit ein Stimulationszyklus in die Auswertung übernommen werden konnte, wurde darauf geachtet, dass jeder der 20 Reize zu einer einwandfreien Sarkomerverkürzung ohne Zwischenzuckung geführt hatte und dass nicht unmittelbar vor oder nach dem Zyklus Spontankontraktionen der isolierten Kardiomyozyten stattgefunden hatten.

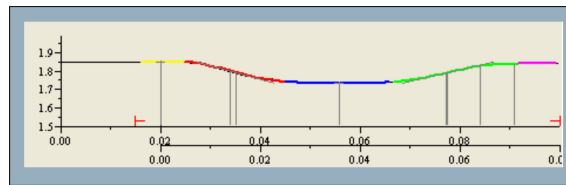


Abbildung 2.8.: *Gemittelte Sarkomerverkürzung aus den letzten 5 Verkürzungen einer Stimulationsserie. Die x-Achse entspricht dabei der Zeit, die y-Achse gibt die Sarkomerlänge an*

An der gemittelten Sarkomerverkürzung errechnete die Software fünf verschiedene Parameter, die nachher statistisch ausgewertet wurden: Die Ruhesarkomerlänge, die Verkürzungsamplitude, die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie die Verkürzungsdauer:

- **Ruhesarkomerlänge:** Die Ruhesarkomerlänge wurde direkt durch das Programm erfasst. Die aus den letzten fünf Verkürzungen gemittelte Ruhesarkomerlänge entsprach bei den niedrigen Frequenzen (≤ 6 Hz) derjenigen, die manuell vor Beginn einer Reizserie festgestellt werden konnte. Bei den hohen Frequenzen (> 6 Hz) allerdings hatten die Zellen nach einer Kontraktion nicht genügend Zeit, ihre Sarkomere in den Bereich der Ruhesarkomerlänge zu relaxieren. Deshalb ermittelte die Software eine kürzere Ruhesarkomerlänge. Diesem Umstand musste bei der Auswertung dieses Parameters Rechnung getragen werden.
- **Verkürzungsamplitude:** Die Verkürzungsamplitude wurde von der IonWizard Software errechnet. Dabei wurde die Differenz gebildet zwischen der Ruhesarkomerlänge und dem Wert am Minimum einer Verkürzungszacke. Aufgrund der oben erläuterten Verschiebung der Ruhesarkomerlänge bei den hohen Frequenzen (> 6 Hz) werden bei diesen nicht die wirklichen Verkürzungsamplituden angegeben. Deshalb wurde hier die Differenz zwischen der von der Software errechneten Ruhesarkomerlänge und der manuell ermittelten vor Beginn eines Stimulationszyklus zu den Werten hinzu addiert.
- **Minimale Sarkomerlänge während der Verkürzung**

2. Material und Methoden

- Verkürzungsgeschwindigkeit: Die Verkürzungsgeschwindigkeit der Sarkomere wurde von der Software errechnet als die größte Steigung des absteigenden Schenkels der Verkürzungszacke.
- Relaxationsgeschwindigkeit: Diese wurde analog zur Verkürzungsgeschwindigkeit durch die Steigung des aufsteigenden Schenkels der Verkürzungszacke errechnet.
- Verkürzungsdauer: Diese wurde von der Software ermittelt als die Zeit vom Beginn der Verkürzung bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Sarkomerlänge wieder 90% der vorausgehenden Ruhesarkomerlänge erreicht hat. Dieser Parameter dient also zur Charakterisierung des Relaxationsverhaltens der Kardiomyozyten

Diese von IonWizard erfassten Daten wurden mit Microsoft Excel nach Parametern und Gruppen sortiert und evaluiert, jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung errechnet und zur weiteren Auswertung und graphischen Darstellung auf GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen.

Ermittlung der Regressionskurven Die aus den zwanzig externen Reizen, mit denen die Zellen in jeder Frequenz stimuliert wurden, resultierenden Verkürzungen führten zu einem für jede Stimulationsfrequenz typischen Bild. Bei den niedrigen Frequenzen (≤ 6 Hz) nahm die Sarkomerverkürzung bei jedem Reiz sukzessive ab, sodass sich eine sogenannte negative Herzterappe zeigte. Bei den Frequenzen ≥ 6 Hz zeigte sich eine positive Herzterappe. Gegen Ende einer jeden Reizserie war zu erkennen, dass die Verkürzungen ein Gleichgewicht erreicht hatten, d.h., dass die nachfolgenden Verkürzungen sich nicht mehr massgeblich in der Amplitude änderten. Es wurde eine Regressionskurve durch die Minima einer jeden Herzterappe errechnet. Die Berechnung dieser Kurve erfolgte mit der Formel 2.9.

$$y = (ss_1 - (s_1 - postrest))^{-x/\tau_1} + (ss_1 - ss_2)^{-x/\tau_2} - (ss_1 - ss_2)$$

Abbildung 2.9.: *Postrest: Sarkomerlänge bei maximaler erster Verkürzung; ss_1 : Sarkomerlänge bei maximaler zweiter Verkürzung; ss_2 : Sarkomerlänge im Gleichgewicht (bei maximaler zwanzigster Verkürzung)*

Statistik Zunächst wurden aus den erhobenen Daten mithilfe von Microsoft Excel das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ermittelt und diese mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 statistisch ausgewertet und graphisch abgebildet. Zur Testung der

2. Material und Methoden

Gruppenunterschiede bezüglich der einzelnen Parameter wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls post hoc test berechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5%. Die Daten wurden graphisch in X-Y-Plots oder Balkendiagrammen als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

2.5.2. In vitro Kontraktionsversuche mit isolierten Skelettmuskeln

Ziel dieses Versuchs ist die Erfassung von entstehenden Kräften während isometrischer Kontraktionen in den Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus* mit Hilfe eines Kraftumwandlers, einem so genannten Isometric Force Transducers (Scientific Instruments, Heidelberg, Deutschland).

2.5.2.1. Übersicht und Gruppeneinteilung

Für die in vitro-Untersuchungen der beiden Skelettmuskeln *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus* wurden diese aus den distalen Hinterextremitäten von je 5 weiblichen SV129/BL6 Wildtyp sowie *XinABC^{-/-}* Mäusen beidseitig freipräpariert. Für jeden Genotyp wurde eine Gruppe mit Mäusen im Alter von ca. 12 Wochen gebildet.

2.5.2.2. Präparation und Inkubation der Muskeln während der Versuche

Für die folgenden Versuche wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, bilateral der Tarsalbeuger *M. soleus* und der Akrinstrecker *M. extensor digitalis longus* der distalen Hinterextremität von Mäusen beider Genotypen freipräpariert. Nach der Sektion aus dem Körper wurden die vier isolierten Muskeln, die mit intakten Insertionssehnen präpariert wurden, in einer Petrischale (mit 20 cm-Durchmesser) in Ringer-Laktat-Lösung (Zusammenfassung siehe Tabelle 2.7) mit Carbogen (5 Volumenteile CO₂ auf 95 Volumenteile O₂) zur pH-Wert Stabilisation begast. Das Gas wurde durch einen durchgängig gelöcherten Plastikschlauch, der in einen Siliconguss auf dem Boden der Schale eingelassen war, in die Nährlösung geführt und darin ausgelassen. Über diese Begasung wurden für die Skelettmuskeln optimale Umgebungsbedingungen gesichert: Bei Raumtemperatur wurde der Muskelmetabolismus so weit heruntergefahren, dass die Muskeln ohne große Schwierigkeiten die Gesamtversuchsdauer von ca. vier Stunden überlebten. Des Weiteren

2. Material und Methoden

wurde durch die Begasung mit Carbogen einer Hypoxie im Muskelgewebe und über die Ringer-Lactat-Lösung einem Nährstoffmangel vorgebeugt.

Inhaltsstoff	mM	g/mol	g/1l
NaCl	118	58,4	6,8912
KCl	3,4	74,56	0,253504
MgSO ₄	0,8	120,37	0,096296
KH ₂ PO ₄	1,2	136,09	0,163308
Glucose	11,1	180,16	1,999776
NaHCO ₃	25	84,01	2,10025
CaCl ₂	2,5	110,99	0,277475

Tabelle 2.7.: Protokoll Ringer-Lactat-Lösung zur Inkubation der Muskeln während der Versuche

2.5.2.3. Versuchsaufbau

Die gesamten in dieser Arbeit erfolgten Messungen mit Skelettmuskeln wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Daniela Wenzel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fleischmann, Physiologisches Institut I der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn in einer von Scientific Instruments (SI, in Heidelberg) konzipierten Apparatur erarbeitet und durchgeführt. Hierbei kamen die folgenden Geräte zum Einsatz: Ein PC mit der Software "Twitch" (alle Komponenten stammen von der Firma Scientific Instruments, Heidelberg), ein dazugehöriger Küvettentisch (MKT1) für den Force Transducer (Kraftwandler) sowie eine höhenverstellbare Einzelkuvette und eine Stimulationseinheit ("Stimulator Unit", STIM2).

Messung	M. soleus (SOL)	M. extensor digitalis longus (EDL)
1. Messung	10-20 Einzelzuckungen	10-20 Einzelzuckungen
2. Messung	Tetanimessungen von 10, 20, 40 und 80 Hz	Tetanimessungen von 10, 20, 40, 80 und 120 Hz
3. Messung	Ermüdungsprotokoll 20 Reize/min	Ermüdungsprotokoll 6 Reize/min
4. Messung	10-20 Einzelzuckungen	10-20 Einzelzuckungen

Tabelle 2.8.: Übersicht der durchgeführten Messungen mit Skelettmuskeln

Kernstück des gesamten Versuchsaufbaus (Abbildung 2.10) ist der als unterstes Element aufgebaute Küvettenblock. Über das in die Kuvette integrierte Organbad wird der Muskel im Verlauf der Versuche mit Nährlösung versorgt, die Begasung mit Carbogen erfolgt über eine in die Messapparatur eingelassene und mit einem Ventil regulierbare Gasversorgung.

2. Material und Methoden

Die Küvette besteht hierbei aus zwei Teilen, die in freier Verbindung miteinander stehen: Einem größeren Bad, in das die Carbogenzufuhr mündet und dem kleineren Muskelbad. Das Gesamtvolumen der Küvetten beträgt 2 ml.

Zum Ein- und Ausspannen der Präparate ist der gesamte Küvettenblock durch eine Schraube höhenverstellbar, der Muskel wird also durch Herablassen des Blockes aus dem Organbad entnommen. Der Muskel wird auf der linken Seite (siehe Abbildung 2.10 Nr. 5) mit einem Haken und auf der rechten Seite mit einer Einspannklammer im Organbad gehalten. Während die linke Haltestruktur lediglich als Einspannvorrichtung dient, ist die andere Seite direkt mit dem Force Transducer verbunden. Dieser befindet sich auf einem mobilen Schlitten, der mittels einer Mikrometerschraube zu Anpassung an die Muskellänge zur Vordehnung des Muskels horizontal bewegt werden kann. Der Kraftaufnehmer wiederum liefert seine Daten an ein Interface (Fa. AD instruments), das unmittelbar mit dem Messcomputer verbunden ist. Dieser registriert in einer kontinuierlichen Messung die Daten der Einzelzuckungen und der Tetani und erlaubt erste Umrechnungen. Die Stimulation der Muskelpräparate erfolgt mittels zweier Platinelektroden, die seitlich in das Organbad hineinragen. Folglich werden die Muskelfasern nicht direkt über die Klammern stimuliert, sondern mit einem rechteckigen Impuls von 5 ms Dauer über eine Feldstimulation mit einer Spannung von 4 Volt. Die Impulse werden hierbei von der Stimulationseinheit ("Stimulator Unit", Abbildung 2.10, Nr. 2) generiert; diese ermöglicht eine individuelle Einstellung von Impulsdauer, -stärke, und -rate je nach Versuchsziel.

2.5.2.4. Durchführung der Messungen

Nach erfolgter Präparation wurden die Muskelfasern zunächst weiter in Ringer-Lactat-Lösung unter Carbogenbegasung aufbewahrt. Zu Beginn jedes Versuchs wurde der Muskel aus der Badlösung in die Versuchsanordnung überführt und zügig in die dafür vorgesehenen Haltevorrichtungen eingespannt. Nach einer Zeitspanne von 5 min zur Erholung des Muskels wurde die Begasung der Nährlösung im Organbad so adjustiert, dass die Blasenbildung des Carbogens möglichst keine Schwingungen auf den Muskel übertrug. Im nächsten Schritt erfolgte eine erste Stimulation des jeweiligen Muskels (1. Messung) mit einer Frequenz von 1 Hz. Es wurden ca. 10 bis 20 Einzelzuckungen ausgelöst. Nach Erreichen eines Gleichgewichts wurde mit der Vordehnung der Muskelstreifen begonnen, dieser Schritt wurde wiederholt bis ein optimaler Bereich auf der Ruhedehnungskurve erreicht war. Die erzielten Werte wurden als Ausgangswerte für die nun folgenden Ein-

2. Material und Methoden

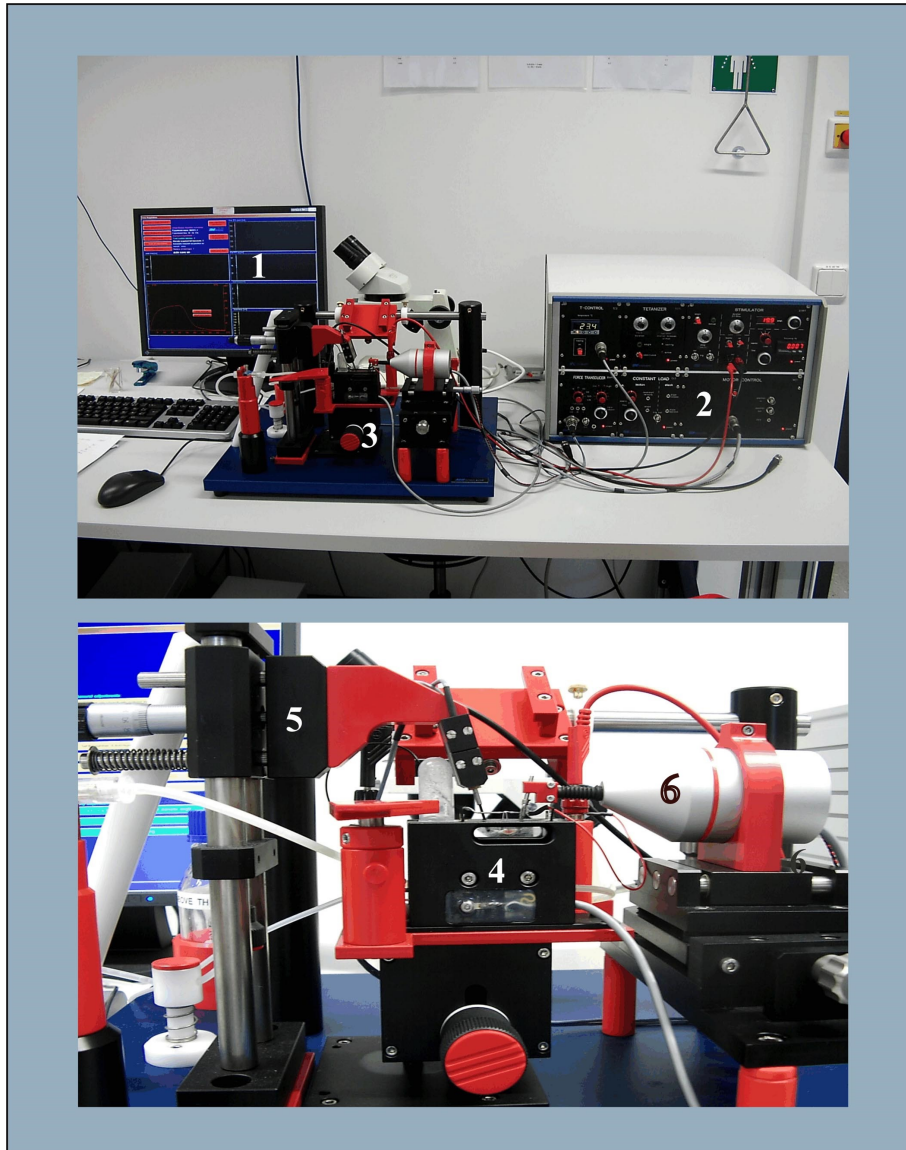


Abbildung 2.10.: Versuchsstand Isometric Force Transducer: 1 PC mit Software "Twitch"; 2 Stimulator Unit; 3 Küvettenblock mit Force Transducer und Vorrichtung für Muskelbefestigung; 4 in Küvettenblock integriertes Organbad mit Perfusionslösung; 5 Halterung und Befestigungshaken für Muskeln; 6 Force Transducer/Kraftwandler

2. Material und Methoden

zelversuche zu Grunde gelegt. Die Zuteilung der einzelnen Muskeln zu den jeweiligen Protokollen erfolgte standardisiert (siehe Tabelle 2.8)

2.5.2.5. Auswertung der Daten

Die Registrierung der erfassten Daten erfolgte mit Hilfe der Software Twitch (Scientific Instruments, Heidelberg). Diese misst und speichert kontinuierlich den gesamten Kurvenverlauf der Einzelzuckung (Abbildung 2.11). Während der Experimente wurden grundsätzlich folgende Parameter ermittelt:

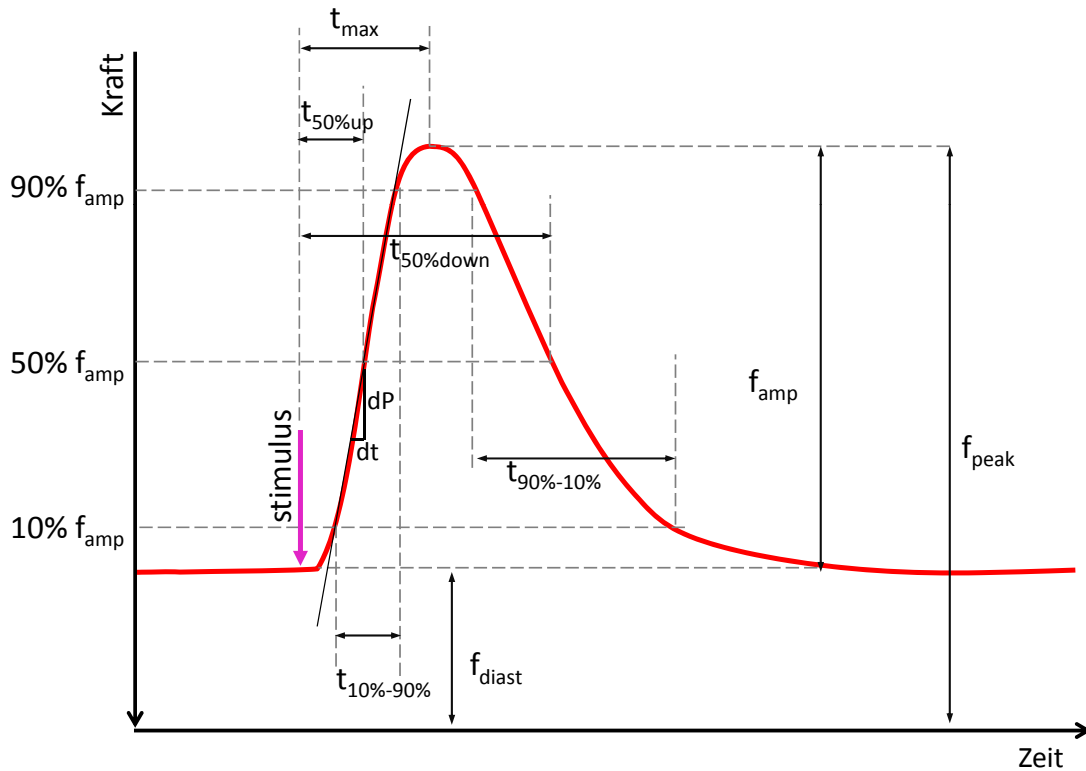


Abbildung 2.11.: Erfasste Parameter während der Kontraktion: **1** t_{max} , Zeit bis zur maximalen Kontraktion; **2** $t_{50\%up}$ Zeit bis Zuckungskraft 50% der Amplitude erreicht hat ($f_{peak} - f_{diast}$); **3** $t_{50\%down}$ Zeit, bis die Zuckungskraft nach Maximalkraft auf 50% der Amplitude abgesunken ist ($f_{peak} - f_{diast}$); **4** f_{peak} Maximalwert der Kraft; **5** f_{diast} Elastizität vor Stimulus; **6** dP/dt_{maxup} maximale Kraftzunahmegeschwindigkeit; **7** $dP/dt_{maxdown}$ maximale Kraftabnahmegeschwindigkeit; **8** v_{contr} Kontraktionsgeschwindigkeit ($f_{peak} - f_{diast}$)/ t_{max} ; **9** ($90\%f_{amp} - 10\%f_{amp}$)/ $t_{5\%-95\%}$ (nur in exportierten Daten); **10** ($90\%f_{amp} - 10\%f_{amp}$)/ $t_{95\%-5\%}$ (nur in exportierten Daten)

2. Material und Methoden

Übersicht der analysierten Parameter bzw. deren Verhältnisse:

- Amplitude in [μN] bzw. [mN]: Der Wert gibt den Punkt mit dem maximalen Kraftaufwand an.
- Zeit von T_{max} bis $T_{50\%down}$ in [ms]: Werte erlauben indirekt Aussage über Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum
- maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dp/dt_{max} in [mN/ms]
- 10-90% $_{down}$ in [μ/ms]: Relaxationsgeschwindigkeit von 90% bis 10% der maximalen Kontraktionskraft
- 10-90% $_{up}$ in [$\mu\text{N}/\text{ms}$]: Kontraktionsgeschwindigkeit von 10% bis 90% der maximalen Kontraktionskraft
- dp/dt_{down} in [mN/ms]: Zeitpunkt der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit
- dp/dt_{up} in [mN/ms]: Zeitpunkt der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurden Umrechnungen von Kraft oder Zeiten als absolute und als prozentuale Veränderung zur Ausgangssituation vorgenommen.

Statistik

Alle in diesem Kapitel ausgeführten Ergebnisse wurden, so nicht anders erwähnt, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Signifikanz der ermittelten Daten wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) geprüft. Wenn in der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied bestand, wurde eine post-hoc Analyse mit dem Dunnett t-Test oder mittels der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Datenerhebung erfolgte mit der Tabellenkalkulationssoftware MS Excel (Fa. Microsoft), die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistikprogramme SigmaPlot für Windows und GraphPad Prism 4.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Tierzahlen

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurden Mäuse des Stammes SV129/BL6 verwendet, denen das Protein Xin vollständig fehlt. Im Allgemeinen wurden diese Mäuse in allen Versuchen mit Wildtypmäusen verglichen. Für die Gewinnung der Körperbasisdaten (Kapitel 3.2) wurden Werte von insgesamt 142 Versuchstieren zu Grunde gelegt. Für die histologischen Methoden (Kapitel 3.3 bis 3.6) wurden 52 Mäuse verwendet; dabei gingen Daten von 40 Tieren in die Arbeit ein. Diese Summe schlüsselt sich in zwei Gruppen von jeweils 10 jungen Tieren (Gruppe 1: Wildtyp; Gruppe 2: $XinABC^{-/-}$; Alter ca. 12 Wochen) und zwei weiteren Gruppen mit je 10 alten Tieren (Gruppe 3: Wildtyp; Gruppe 4: $XinABC^{-/-}$; Alter ca. 1,5 Jahre) auf. Für die Versuche zur Kardiomyozytenkontraktilität flossen Ergebnisse von weiteren 40 Tieren in die Auswertung mit ein. Für die Analyse der Skelettmuskelkontraktilität wurden die Messergebnisse von 10 Versuchstieren zu Grunde gelegt.

Insgesamt wurden mehr Tiere präpariert als oben dargestellt, da nicht alle Herzen erfolgreich in Einzelzellen überführt werden konnten. Zum einen war die Präparation der Herzen nicht immer erfolgreich, weil die Aorta bei der Exzision zu kurz abgetrennt worden war und somit nicht mehr an der Kanüle befestigt werden konnte. Diese manuellen Fehler wurden jedoch mit zunehmender Erfahrung in der Präparation immer seltener. Zum anderen gab es eine Reihe von Zellisolationen, bei denen ein sehr geringer Anteil an lebenden Zellen gewonnen wurde, obwohl keine offensichtlichen Fehler aufgetreten waren. Dies kann zum Teil an der Zusammensetzung der Präparationslösungen und zum Teil an der jeweiligen Maus gelegen haben, ein kausaler Zusammenhang konnte allerdings nicht ergründet werden.

3. Ergebnisse

3.2. Körperbasisdaten im Vergleich

Während der Versuchsdurchführung wurden folgende Körperparameter von jedem Versuchstier erfasst: Das Körpergewicht (BW), Herzgewicht (HW) und die Tibiallänge (TL). Aus den gemessenen Daten wurden die Verhältnisse von Herzgewicht zu Tibiallänge (HW/TL) und Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW) gebildet. Diese bieten einen Bezugspunkt bei der Feststellung einer Hypertrophie. Für die Ermittlung der Parameter wurden für die Gruppen 1 und 2 jeweils 40 Tiere (Alter: 11,5 Wochen \pm 13 Tage) und für die Gruppen 3 und 4 jeweils 31 Tiere (Alter: 83 Wochen \pm 14 Tage) hinzugezogen. Die vollständigen Messwerte sind in Tabelle A.1 im Anhang zusammengefasst.

3.2.1. Körpergewicht

In Abbildung 3.1 ist das durchschnittliche Körpergewicht der jungen und alten Mäuse (alle weiblich) aus den genotypgepaarten Gruppen dargestellt. Im Alter von ca. 12 Wochen wogen die Wildtyp Tiere (aus Gruppe 1) im Vergleich zu den $XinABC^{-/-}$ Tieren (Gruppe 2) durchschnittlich etwa gleich viel. Im Alter existierten jedoch Unterschiede: Die Wildtyp Tiere der Gruppe 3 zeigten ein um ca. 24 g höheres Körpergewicht als die $XinABC^{-/-}$ Tiere der Gruppe 4. Hieraus resultierte der statistisch signifikante Unterschied mit einem p-Wert von $<0,0001$ im t-test.

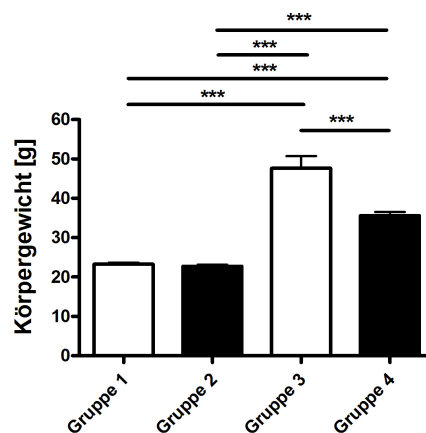


Abbildung 3.1.: Vergleich des Körpergewichts von Wildtyp (WT) und $XinABC^{-/-}$ Mäusen (Gruppe 1: junge WT, Gruppe 2: junge $XinABC^{-/-}$, Gruppe 3: alte WT, Gruppe 4: alte $XinABC^{-/-}$), Signifikanz und Standardabweichung werden durch '*' und Balken im Graphen indiziert, '***' zeigen $p \leq 0,001$ an.

3. Ergebnisse

3.2.2. Herzgewicht

Bei der Präparation des Herzens wurde auf eine vollständige Befreiung von adipösen Ad-nexen sowie des Herzbeutels geachtet. Anschließend wurde zunächst die Restflüssigkeit aus dem Herz mittels eines Zellstofftuchs herausgesaugt und das Netto-Herzgewicht mit einer Feinwaage bestimmt.

Im Vergleich der altersidentischen Gruppen 1 und 2 zeigte sich praktisch kein Unterschied. Auch im Vergleich von Gruppe 3 mit Gruppe 4 zeigte sich nur ein kleiner, nicht signifikanter Anstieg im durchschnittlichen Herzgewicht (Abbildung 3.2). Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass in beiden altersidentischen Genotypgruppen kein Indiz für eine kardiale Hypertrophie vorlag.

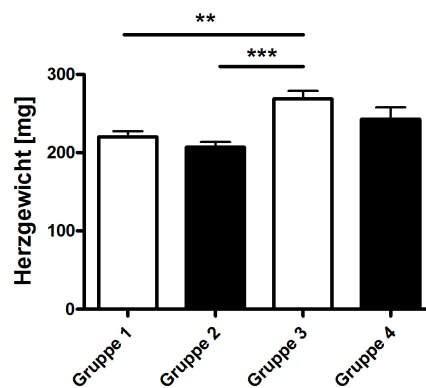


Abbildung 3.2.: Vergleich des Herzgewichtes von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen, Gruppeneinteilung siehe Abbildung 3.1

3.2.3. Tibiallänge

In Abbildung 3.3 ist die durchschnittliche Tibiallänge (Schienbeinlänge) der Gruppen 1 bis 4 in [mm] dargestellt. Die Mittelwerte jeder Gruppe waren nahezu identisch. Es konnte weder ein genotyp- noch ein altersabhängiger Unterschied zueinander festgestellt werden.

3. Ergebnisse

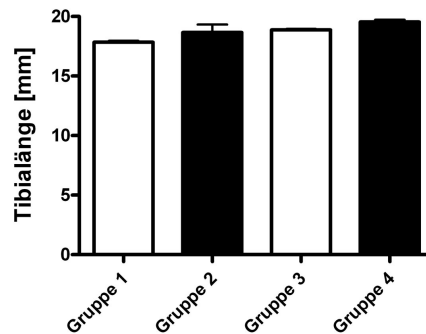


Abbildung 3.3.: Vergleich der Tibialänge in [mm], Gruppeneinteilung siehe Abbildung 3.1, Standardabweichung wird durch Balken im Graphen indiziert

3.2.4. Verhältnis von Herzgewicht zum Körpergewicht

Um eine mögliche kardiale Hypertrophie zu erkennen, wird das Herzgewicht einer Maus im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht betrachtet. Im Vergleich der altersgleichen Gruppen 1 und 2 betrug der Unterschied im Mittel 0,2 mg/g, was statistisch nicht signifikant war. Das Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht zeigte den in altersäquivalenten Gruppen 3 und 4 eine minimale Zunahme bei den $XinABC^{-/-}$ Tieren. Interessanterweise nahm der Herz-Körpergewichtsindex mit zunehmendem Alter in beiden Genotypen signifikant ab. Dies war auf die deutliche Zunahme im Körpergewicht zurückzuführen (Abbildung 3.4).

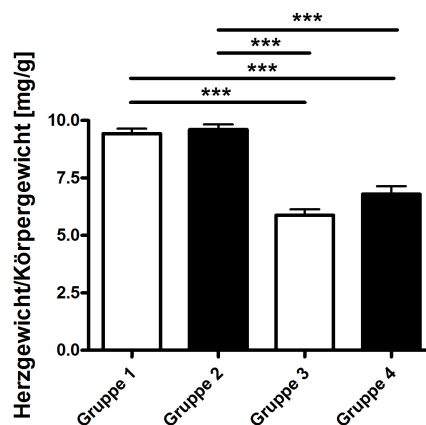


Abbildung 3.4.: Verhältnis von Herzgewicht zum Körpergewicht in [mg/g]; Gruppeneinteilung siehe Abbildung 3.1, Standardabweichung wird durch Balken im Graphen indiziert, Signifikanzen von $p \leq 0,001$ mit *** markiert.

3. Ergebnisse

3.2.5. Verhältnis von Herzgewicht zur Tibiallänge

Ein weiterer Bezugspunkt für die Feststellung einer Hypertrophie stellt die Tibiallänge dar. Sie gilt hier als Parameter für die Körpergröße eines Tieres. Für die Bewertung wird das Herzgewicht einer Maus ins Verhältnis zur Tibiallänge gesetzt und analog zum Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht (Kapitel 3.2.4) evaluiert. Abbildung 3.5 zeigt den Vergleich der Korrelation des durchschnittlichen Herzgewichts zur Tibiallänge der jeweiligen Gruppen. Im Vergleich der gleichaltrigen Gruppen (Gruppen 1 und 2, sowie 3 und 4) zeigt sich kein signifikanter Unterschied, es ist jedoch innerhalb der genotypidentischen Gruppen ein geringer Anstieg im Alter zu erkennen. Auch hier zeigt sich bei der Auswertung der Verhältnisse kein Beweis für das Vorliegen einer Hypertrophie.

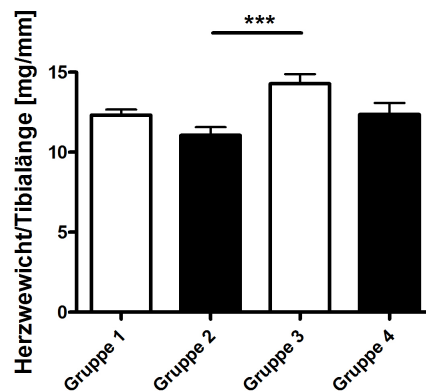


Abbildung 3.5.: Verhältnis von Herzgewicht zur Tibiallänge in [mg/mm]; Gruppeneinteilung siehe Abbildung 3.1, Standardabweichung wird durch Balken im Graphen indiziert, Signifikanzen von $p \leq 0,001$ mit *** markiert.

3.3. Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin in Herz- und Skelettmuskeln

3.3.1. Beurteilung der Herzmuskulatur

Zur Beurteilung der allgemeinen histologischen Situation im Herzgewebe wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von je 10 Tieren pro Genotyp und Altersgruppe untersucht und analysiert. Bestimmte Regionen wie z.B. die Glanzstreifen (Intercalated discs), Querstreifung, Kerne und Bindegewebe wurden weiterhin mit stärkerer Vergrößerung genauer

3. Ergebnisse

beurteilt. Dies bietet den Vorteil, dass Areale mit eventueller zellulärer bzw. histologischer Veränderung besser erkannt werden können.

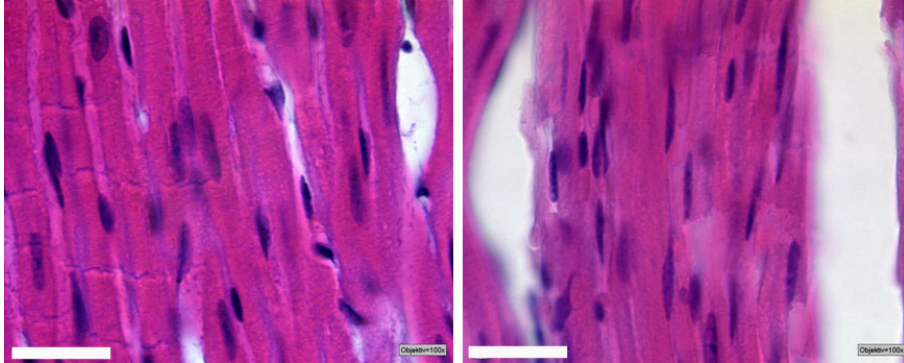


Abbildung 3.6.: *Histologischer Längsanschnitt durch Herzmuskelgewebe; Hämatoxylin-Eosinfärbung von paraffineingebetteten Herzmuskeln von Wildtyp (links) und $XinABC^{-/-}$ (rechts) Mäusen, Maßstabsbalken (weiss): 20 μ m*

In den mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Präparaten (Beispiel: Abbildung 3.6) ist ein intakter Verbund von Herzmuskelzellen erkennbar. Das Gewebe ist geprägt von ein- bzw. zweikernigen Kardiomyozyten mit mehrheitlich zentraler Lokalisation. Mit Hilfe eines in die Software Diskus eingebetteten Messsystems wurden die Kernlänge und -breite bestimmt. Hier ist kein Unterschied der Größe von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Kernen erkennbar. Bei geeigneter Schnittführung ist der Verlauf der Glanzstreifen über die Gesamtbreite der einzelnen Kardiomyozyten zu verfolgen. Sowohl in Übersichtsaufnahmen als auch in Detailaufnahmen mit höherer Vergrößerung sind keine sichtbaren Unterschiede in der Struktur der Muskulatur bemerkbar. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Herzen von beiden Genotypen in der Histologie unauffällig sind.

3.3.2. Beurteilung der Skelettmuskulatur

Das Xin Repeat Protein 1 (XIRP1 bzw. 'Xin') wird in der Literatur als Bestandteil der myotendinösen Übergänge von Skelettmuskeln beschrieben (SINN et al., 2002). Für die Analyse eines möglichen Phänotyps der $XinABC^{-/-}$ Maus sind repräsentativ Skelettmuskeln der Hinterextremitäten aus Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren beidseitig präpariert worden: der M. soleus und M. tibialis cranialis. Die Muskelproben wurden mit den myotendinösen Übergängen (Muskel-Sehnenübergängen) präpariert, da das Protein Xin im adulten Organismus hier lokalisiert ist. Es sind jeweils Längs- und Querschnitte durch die einzelnen Muskeln angefertigt worden.

3. Ergebnisse

Der Längsschnitt durch den M. soleus ermöglicht eine Beurteilung der Lage der Muskelfasern und der Zellkerne. Durch die Verschmelzung der einkernigen Myoblasten zu Myotuben entstehen vielkernige Zellen (Synzytien). Durch die Ausbildung der Myofibrillen in den Skelettmuskelzellen werden die Zellkerne jeweils an den Rand gedrängt.

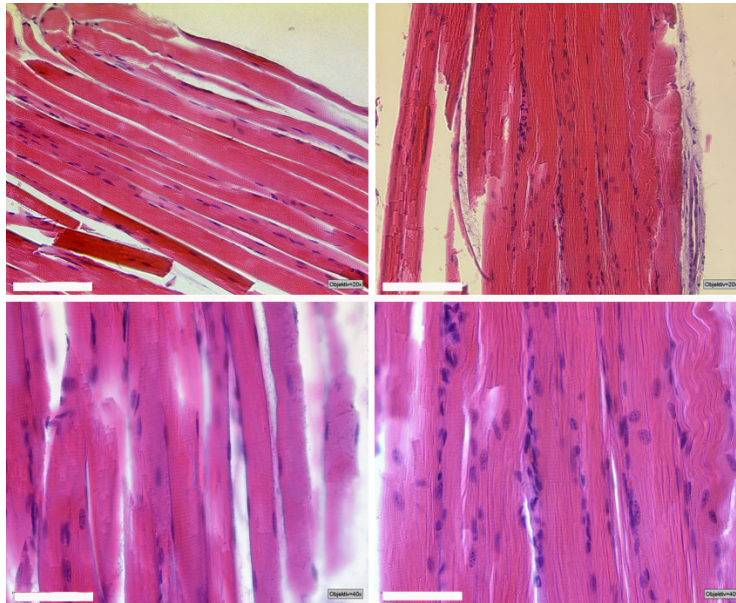


Abbildung 3.7.: Längsverlauf M. soleus (HE-Färbung), oben links Ausschnitt aus Wildtypmuskel, darunter Vergrößerung; oben rechts Ausschnitt aus $XinABC^{-/-}$ Muskel mit darunterliegender Ausschnittsvergrößerung (Maßstabsbalken oben: 100 μm , Maßstabsbalken unten: 50 μm)

Der Längsschnitt in Abbildung 3.7 des M. soleus zeigt im Wildtyppräparat (links) eine regelmäßige, skelettmuskelspezifische Anordnung der Gewebebestandteile: die Kerne liegen peripher der parallel angeordneten Myofibrillen. Im $XinABC^{-/-}$ Längsschnitt (rechts) verlaufen die Fibrillen wie im Wildtyppräparat regelmäßig parallel und liegen dicht aneinandergereiht. Zwischen den einzelnen Myofibrillen sind inhomogen verteilte Ansammlungen von polymorphen Zellen bzw. basophilen Strukturen zu erkennen. Die Vergrößerungsaufnahme des $XinABC^{-/-}$ Muskels zeigt eine deutlich unregelmäßigere Verteilung der Zellkerne als im Präparatanschnitt des Wildtypmuskels.

Im Querschnitt durch den M. soleus (Abbildung 3.8) zeigen sich keine strukturellen Unterschiede im Vergleich der beiden Genotypen. Wie die höhere Vergrößerung (Abbildung 3.8, untere Reihe) zeigt, sind sowohl Myofibrillenquerschnitt als auch die Kernlokalisation in beiden Proben miteinander übereinstimmend. Auch in nachfolgenden Schnittebenen sind keine abnormen Zellinfiltrationen wie im Längsschnitt (Abbildung 3.7) zu erkennen.

3. Ergebnisse

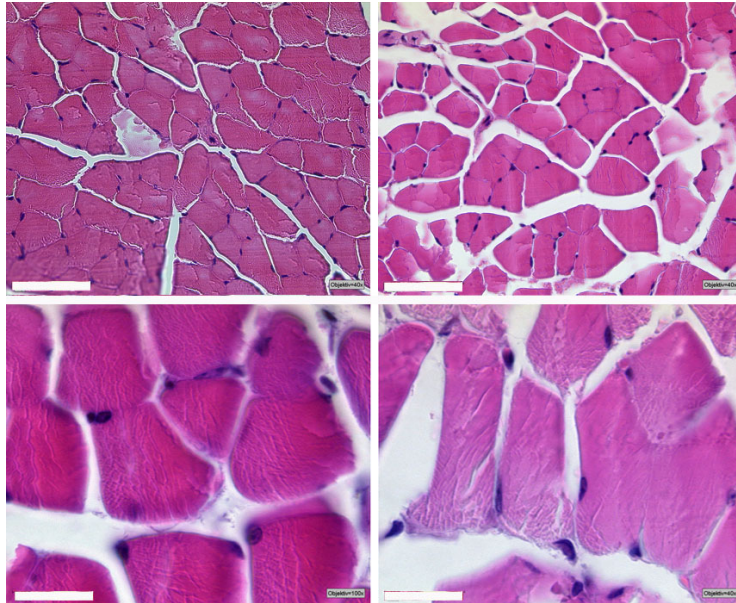


Abbildung 3.8.: Querschnitt durch den *M. soleus* (HE-Färbung), oben links Ausschnitt aus Wildtypmuskel, unten links Vergrößerung; oben rechts Ausschnitt aus Muskel *XinABC*^{-/-} Tiere, unten rechts Vergrößerung (Maßstabsbalken oben: 50 µm, Maßstabsbalken unten: 20 µm)

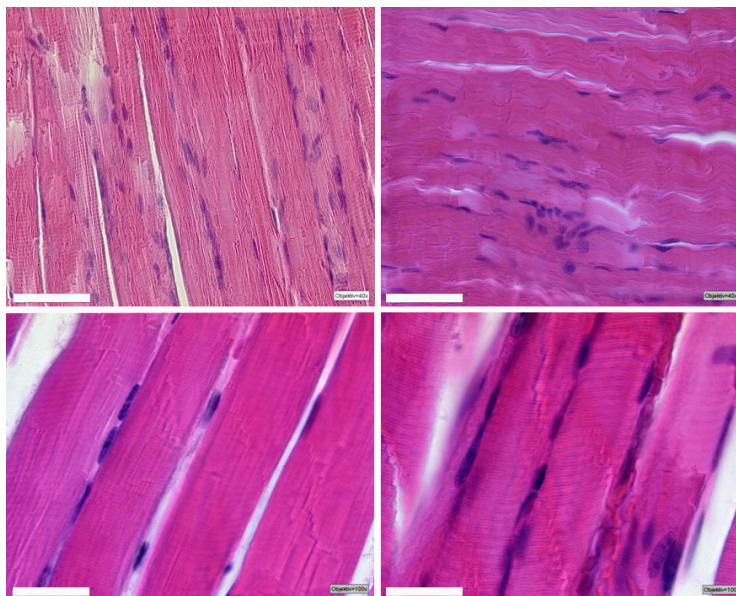


Abbildung 3.9.: Längsschnitt des *M. tibialis cranialis*; oben links Ausschnitt aus Wildtypmuskel, unten links Vergrößerung; oben rechts Ausschnitt aus *XinABC*^{-/-} Muskel, unten rechts Vergrößerung (Maßstabsbalken oben: 50 µm, Maßstabsbalken unten: 20 µm)

3. Ergebnisse

Der M. tibialis cranialis dient zur Dorsalflexion und Supination des Fußinnenrandes; er verläuft entlang der Lateralseite des Beines neben dem Schienbein und endet kurz vor dem Tarsalgelenk. Er läuft in einer Sehne aus, die von den Bändern des Sprunggelenkes umgeben wird und an der Innenseite des Fußes, etwa in der Mitte des Fußspans inseriert. Im Längsanschnitt (Abbildung 3.9) sind analog zum M. soleus die Anordnung der Myofibrillen bzw. Kerne bei beiden Genotypen identisch. Auffällig ist jedoch eine Wellenbildung in der $XinABC^{-/-}$ Probe, die in mehreren präparierten Muskeln unabhängig von einander auftrat. Dies wird mit der Brüchigkeit bei allen tiefgefrorenen $XinABC^{-/-}$ Muskelproben in Verbindung gebracht werden.

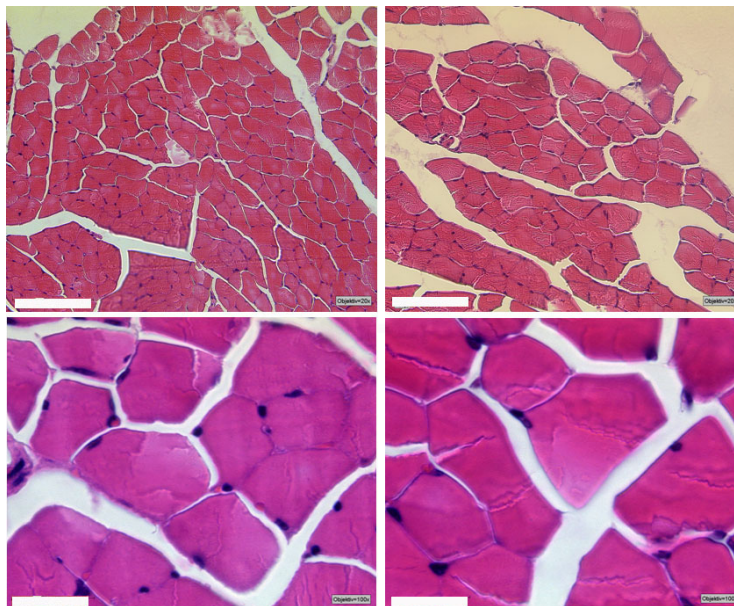


Abbildung 3.10.: Querschnitt durch den M. tibialis cranialis (HE-Färbung), oben links: Ausschnitt aus einem Wildtypmuskel, unten links: Vergrößerung; oben rechts: Ausschnitt aus $XinABC^{-/-}$ Muskel mit vergrößertem Endomyosium, unten rechts: Vergrößerung; Maßstabsbalken oben: 100 μm (Maßstabsbalken unten: 20 μm)

In Abbildung 3.10 sind je ein Querschnitt sowie eine Ausschnittsvergrößerung durch den Skelettmuskel M. tibialis cranialis repräsentativ für Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäuse gezeigt. Deutlich erkennbar ist auf allen untersuchten Präparaten, dass die Muskeln der $XinABC^{-/-}$ Tiere an ihrem Endomyosium weniger Zusammenhalt besitzen als die Wildtyp Mäuse. Sichtbar wird dies an der Größe der Faserzwischenräume. Interessanterweise zeigten die $XinABC$ -defizienten Muskeln in gefrorenem Zustand auch einen geringeren Zusammenhalt als die Wildtypmuskeln, was zu Folge hat, dass sie ohne äußere Einwirkung in mehrere Teile zerfielen. Während der Betrachtung bei höherer Vergrößerung im

3. Ergebnisse

Mikroskop fallen, wie beim *M. soleus* bereits beschrieben, jedoch keine weiteren strukturellen Unterschiede auf.

3.4. Azan-Färbung nach Heidenhain von Herzmuskelgewebe

In der Literatur ist beschrieben, dass eine isoformspezifische Ablation des Proteins Xin ($XinAB^{-/-}$ -Tiere) zu pathologischen Veränderungen am Herzen während der Embryonalentwicklung und auch in der adulten Organmorphologie führt (GUSTAFSON-WAGNER et al., 2007). So haben die $XinAB^{-/-}$ eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels und auch eine Hypertonie. Um den Effekt einer vollständigen Xinablation auf das Herz in der $XinABC^{-/-}$ Maus der AG Fürst zu untersuchen ($XinABC^{-/-}$ -Tiere), wurden diese gezielt auf die putative Herzhypertrophie untersucht.

3.4.1. Perivaskuläre Fibrose der Koronargefäße

Als histologische Charakteristika einer Hypertrophie zählen neben einer Zellvergrößerung und einer Desorganisation der Muskelzellen auch Veränderungen bzw. Einengungen der intramuralen Koronargefäße. Folge einer Anpassung an erhöhten Blutdruck ist eine perivaskuläre Bindegewebeinlagerung der Koronargefäße zur mechanischen Stabilisation (Fibrose). Mit Hilfe der Azan-Färbung nach Heidenhain wurde in Gefrierschnitten von Herzmuskelgewebe aus Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Proben kollagenes Bindegewebe differenziert von der Umgebung dargestellt.

In Abbildung 3.11 sind einige Präparate exemplarisch gezeigt. In Gruppe 2 ist ein erhöhter Anteil von blaugebeiztem Bindegewebe um die Gefäße sichtbar, Gruppe 4 weist dies nicht auf. Möglicherweise gab es im jungen Alter eine erhöhte perivaskuläre Fibrose in $XinABC^{-/-}$ Herzen, die sich mit zunehmendem Alter wieder normalisierte.

Die Evaluierung der digitalen Aufnahmen erfolgte mittels eines softwarebasierten Systems, das die Bindegewebsfläche relativ zur Gesamtfläche des Koronargefäßes errechnet. Es erlaubt somit eine Aussage über den Bindegewebsanteil von der Gesamtgefäßfläche bzw. den Fortschritt der Fibrosierung (Fibrosegrad).

3. Ergebnisse

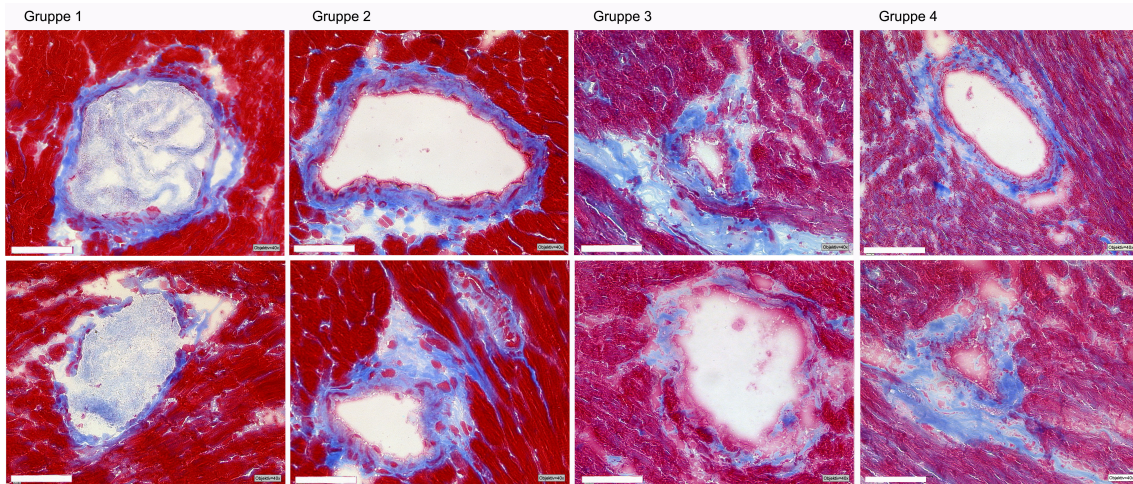


Abbildung 3.11.: Azan-Färbung nach Heidenhain von Koronargefäßen, je zwei repräsentative Bilder für die Gruppen 1 bis 4, n=10 Tiere/Gruppe, Maßstabsbalken: 50 µm

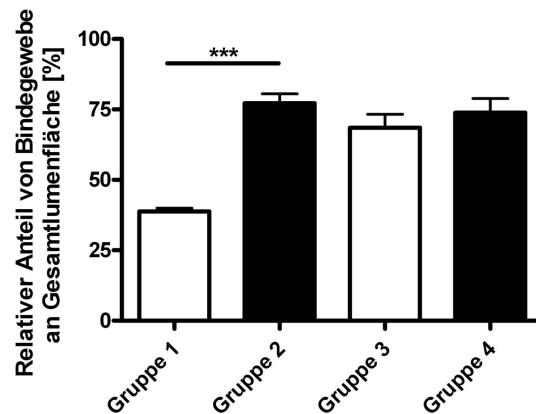


Abbildung 3.12.: Quantifizierung des perivaskulären Bindegewebes um die Koronargefäße im Herzmuskel. Gezeigt wird hier der relative Bindegewebsanteil an der Gesamtlumenfläche der Gruppen 1 bis 4, Standardabweichung durch Balken und Signifikanz von $p \leq 0,001$ mit *** markiert

3. Ergebnisse

Abbildung 3.12 zeigt die Quantifizierung der perivaskulären Fibrose der alterskorrelierten Genotypgruppen. Im Vergleich der altersidentischen Gruppen zeigte sich, dass der perivaskuläre Bindegewebsanteil in Gruppe 2 signifikant höher ist als in Gruppe 1 ($p < 0,0001$). Dieses Phänomen ist im Vergleich der Gruppen 3 und 4 nicht wiederzufinden ($p = 0,4467$) und bestätigen somit die Aussage von oben. Die vollständigen Messwerte sind im Anhang in Tabelle A.2 gezeigt.

3.4.2. Interstitielle Fibrose im Herzmuskel

Im Krankheitsverlauf einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) liegt im Allgemeinen die Anpassungsreaktion der einzelnen Herzmuskelzellen im Vordergrund. Wie bereits zuvor beschrieben, liegt dann eine Hypertrophie vor, wenn die Zellen zwar in ihrer Anzahl gleichbleibend sind, jedoch ihre Größe zunimmt. Es ist eine Reihe von kausalen Ursachen für eine Hypertrophie bekannt, die in der Einleitung näher aufgegriffen wurden.

Als Begleitsymptom sind neben der Zellvergrößerung auch der Gewebeerersatz bzw. die Gewebestabilisation durch Kollagen- bzw. Bindegewebeinlagerungen, eine sogenannte interstitielle Fibrose, bekannt. In den jungen $XinABC^{-/-}$ Mäusen (Gruppe 2) sind signifikant höhere Fibrosewerte um die Koronargefäße festgestellt worden (Kapitel 3.4). Die Messungen der Gruppen 3 und 4 erwiesen, dass sich die perivaskuläre Fibrose des jungen Alters mit der Zeit normalisiert und keine signifikanten Unterschiede im fortgeschrittenen Alter von 1,5 Jahren mehr vorzufinden sind.

In dieser Studie liegt der Fokus auf der Untersuchung des gesamten Gewebeverbandes der Herzen. Kardiale interstitielle Fibrose entsteht, wenn die Produktion von extrazellulärer Matrix dauerhaft gesteigert ist. Die gezeigte perivaskuläre Fibrose ließ vermuten, dass bei den $XinABC^{-/-}$ Mäusen potentiell im gesamten Myokard eine vermehrte Einlagerung von Bindegewebe vorliegen könnte. Es ist bekannt, dass die Akkumulation von Kollagenfibrillen im extrazellulären Raum nicht nur zu einer Vergrößerung des Herzens führt, sondern auch die elektromechanischen Eigenschaften des Myokards beeinträchtigt (DHEIN und HAMMERATH, 2001; LAI et al., 2007).

In Abbildung 3.13 sind repräsentativ Ausschnitte aus Azan-gefärbtem Herzmuskelgewebe der Gruppen 1 bis 4 dargestellt. Es offenbart sich in allen Bildern der gleiche Anblick, denn es fallen im Vergleich von Gruppe 1 und 2 sowie Gruppe 3 und 4 keinerlei strukturelle Unterschiede in Form von besonderen Bindegewebeinlagerungen auf. Lediglich

3. Ergebnisse

die Integrität des Gewebes scheint unterschiedlich zu sein, was sich in den Geweberrissen im Dünnschnitt zeigt und höchstwahrscheinlich auf präparationsbedingte Artefakte zurückzuführen ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine Hinweise einer interstitiellen Fibrose vorliegen.

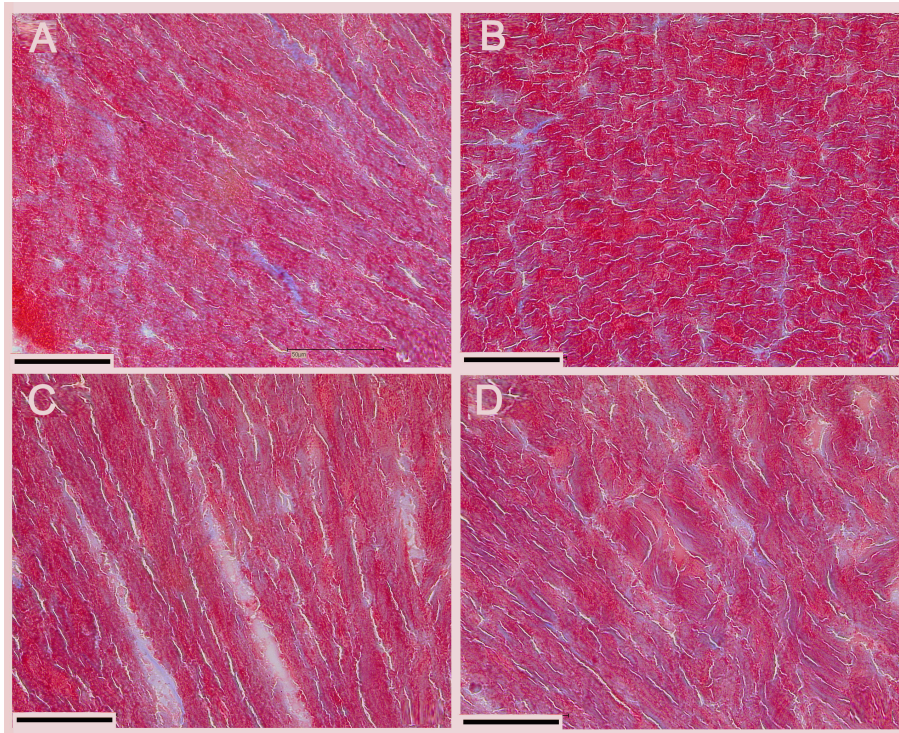


Abbildung 3.13.: Vergleich von Azan-gefärbtem Herzmuskelgewebe mit Hinblick auf interstitielle Fibrose bei Gruppe 1 (A) und Gruppe 2 (B) sowie Gruppe 3 (C) und Gruppe 4 (D), Maßstabsbalken: 50 μm

3.5. Vergleichende Lokalisierungsstudien verschiedener Proteine in Herzmuskelzellen

Unter einer Hypertrophie versteht man im pathophysiologischen Sinne eine Vergrößerung eines begrenzten Gewebeteils oder eines vollständigen Organs. Dieser Größenzunahme liegt eine gleich bleibende Zellzahl zu Grunde, wobei lediglich die Zellausmaße nach oben abweichen. Diese abnorme Veränderung wird nicht durch eine Zellschwellung (wie z.B. durch Stoffwechselprodukteinlagerungen oder Wassereinstrom), sondern durch eine erhöhte Syntheseleistung der Zelle hervorgerufen. Die Genese einer Hypertrophie kann

3. Ergebnisse

sowohl ihren Ursprung in endogenen oder exogenen Faktoren wie z.B. anabole Hormone haben, als auch eine physiologische Anpassungsreaktion auf funktionelle Mehrbelastung sein (z.B. Sportlerherz). All diese Symptome sind makroskopisch im Gesamtorgan je nach Stadium gut zu diagnostizieren.

Um auch auf mikroskopischer bzw. auf zellulärer Ebene nach Hinweisen für morphologische Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Xin-defizienten Genotypen zu suchen, wurden murine Kardiomyozyten enzymatisch isoliert (Methode siehe Kapitel 2.2.3), fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Die hier verwendeten Antikörper markierten Proteine, die funktionell und strukturell eine bedeutende Rolle in der Muskelkontraktion übernehmen. Für die Färbungen wurden Antikörper gewählt, die gegen Proteine im Myofibrillenapparat, sarkoplasmatischen Retikulum oder den Glanzstreifen der Herzzellen gerichtet waren. Zur Detektion wurden die Primärantikörper mit fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist in Tabelle A.11 im Anhang dargestellt. Im Folgenden werden die Immundoppelfärbungen genauer erläutert:

3.5.1. Connexin43/Desmoplakin

Das Protein Connexin43 wird hauptsächlich in Herzmuskel- und Epithelgewebe sowie Gliazellen exprimiert (VAN DER VEN et al., 2006). Es trägt als Grundbaustein der Gap Junctions maßgeblich zur interzellulären Kommunikation bei, in dem es den Austausch sowohl von geladenen als auch von ungeladenen Substanzen durch die Kanalporen ermöglicht. Das Eiweiß Desmoplakin gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die mit Desmosomen assoziiert sind. Diese Strukturen kommen gehäuft in Geweben mit hoher mechanischer Belastung wie z.B. dem Herzmuskel vor. Im Organismus übernimmt es eine essentielle Rolle bei der Verankerung von Intermediärfilamenten an Desmosomen zu benachbarten Zellen (GARROD und CHIDGEY, 2008).

Wie in Abbildung 3.14.A zu erkennen ist, färbt Anti-Connexin43 spezifisch die Glanzstreifenareale. In den Zellen von XinABC^{-/-} Tieren (Abbildung 3.14.B) ist zusätzlich eine Bindung an Strukturen der Längsseiten der Kardiomyozyten zu beobachten (siehe auch Kapitel 3.15). Die Markierung dieser Strukturen lässt darauf schließen, dass zusätzlich Glanzstreifen entlang der Zelle existieren. Erwartungsgemäß kann in den Wildtypzellen auch das Desmoplakin in den desmosomalen Bereichen der Glanzstreifen nachgewiesen

3. Ergebnisse

werden (Abbildung 3.14.A und 3.14.B). Die Laterallokalisierung der Demoplakinfärbung in den isolierten $XinABC^{-/-}$ Zellen bestätigt somit die Connexin43 Färbung.

3.5.2. SERCA2a/Titin (T12)

Das Protein SERCA ist eine ATP-abhängige Calciumpumpe, deren Isoform SERCA2a in der Membran des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Reticulums sowohl in Typ I Skelettmuskelfasern als auch in Herz- und Glattmuskelgewebe vorkommt (JESSUP et al., 2009). Die Z-Scheiben wurden mit dem Titin-spezifischen Antikörper T12 markiert (VAN VEEN et al., 2006). Diese Immundoppelfärbung ist von Wildtypzellen in Abbildung 3.14.C und von $XinABC$ -defizienten Zellen in Abbildung 3.14.D gezeigt. Erwartungsgemäß markiert der Anti-SERCA2a Antikörper eine Querstreifung, die vermutlich an den Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Reticulums lokalisiert. Die SERCA ist in regelmäßig angeordnet und zeigte keinerlei Unterschied in Wildtyp- und $XinABC^{-/-}$ -Zellen. Die Detektion mit dem T12-Antikörper gegen das Z-Scheibenepitop des Titins ergab die erwartete Färbung der Z-Banden sowohl in Wildtyp als auch in $XinABC^{-/-}$ Zellen.

3.5.3. FilaminC/Cadherin

FilaminC (FlnC) ist ein aktinbindendes Protein (ABP) und dient durch die Dimerisierung seiner Struktur der Quervernetzung von Aktinfilamenten im Zytoskelett. Für FilaminC wird in der Literatur durch VAN DER VEN et al. (2006) eine Lokalisation in den Glanzstreifen und in der Z-Scheibe für den Herzmuskel beschrieben. Die Cadherinfamilie beinhaltet eine Reihe von Adhäsionsproteinen, die vor allem in Desmosomen und Adherens Junctions vorkommen. Cadherine spielen eine Rolle bei der Stabilisierung von Zell-Zellkontakten, in der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und der interzellulären Signaltransduktion. In Abbildung 3.14.E und 3.14.F sind repräsentativ isolierte Zellen von Wildtypen (Bildreihe E) und Xin -defizienten Tieren (Bildreihe F) dargestellt. FilaminC und Cadherin konnten in den beschriebenen Lokalisierungen für beide Genotypen nachgewiesen werden. Der anti-Cadherin Antikörper als Marker für desmosomale Strukturen wies, ebenso wie die zuvor beschriebene Connexin43-Färbung, eine erhöhte längslaterale Lokalisierung in den $XinABC^{-/-}$ Herzmuskelzellen auf.

3. Ergebnisse

3.5.4. VASP/Titin (T12)

Der Anti-VASP Antikörper markiert das Eiweiß VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein). Neben der aktinbindenden Eigenschaft übernimmt es auch regulatorische Aufgaben; es ist ein Substrat der cGMP-abhängigen Proteinkinase I. Für VASP wird eine Lokalisierung in Fokal-Adhäsionen beschrieben (REINHARD et al., 1995). Der Anti-T12 Antikörper markiert, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, das Z-Scheiben Epitop des Proteins Titin in Herz- und Skelettmuskel. Exemplarische Färbungen dieser Kombination sind in Abbildung 3.14.G und 3.14.H gezeigt: erwartungsgemäß markierte der Anti-T12 Antikörper die Z-Scheiben. Es war eine deutliche Querstreifung über die Gesamtlänge jeder Zelle zu erkennen; offensichtlich hat Xin keinen Einfluss auf die Lokalisation von Titin, da in allen untersuchten Kardiomyozyten keine mikroskopischen Unterschiede bei beiden Genotypen gezeigt werden konnten. Der gegen das Protein VASP gerichtete Antikörper wies in den Glanzstreifenstrukturen eine offensichtlich veränderte Lokalisierung in den $XinABC^{-/-}$ Herzmuskelzellen auf, auffällig waren hier erneut die lateralen Häufungen von Glanzstreifenmarkierungen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kardiomyozyten normale Z-Scheiben, aber eine veränderte Glanzstreifenorganisation zeigen.

In Abbildung 3.15 sind zur Verdeutlichung der pathologischen Verteilung von Glanzstreifen in $XinABC^{-/-}$ Zellen Kardiomyozyten exemplarisch abgebildet. Die Antikörper Anti-Connexin43 und Anti-Cadherin dienen hier erneut der spezifischen Markierung dieser Strukturen. Eine statistische Auswertung der längslateralen Immunmarkierungen erfolgt in Kapitel 3.5.5.

3.5.5. Evaluierung der Glanzstreifenverteilung auf Basis von indirekter Immunfluoreszenz

Während der Auswertung von Immunmarkierungen mit isolierten Kardiomyozyten fällt eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Glanzstreifenmarkierungen auf, die an den Längsseiten der Herzmuskelzellen von $XinABC^{-/-}$ Tieren lokalisiert sind. Diese Markierungen sind spezifisch für Gap Junctions und Adherens Junctions. Um diesem Leitsymptom näher auf den Grund zu gehen, wurden eine statistische Auswertung dieser Markierungen auf der Basis von $n=46$ Wildtypzellen (von 10 Tieren) und $n=58$ $XinABC^{-/-}$ Zellen (von 10 Tieren) erhoben. Für die Evaluierung wurden Markierungen mit den Antikörpern ge-

3. Ergebnisse

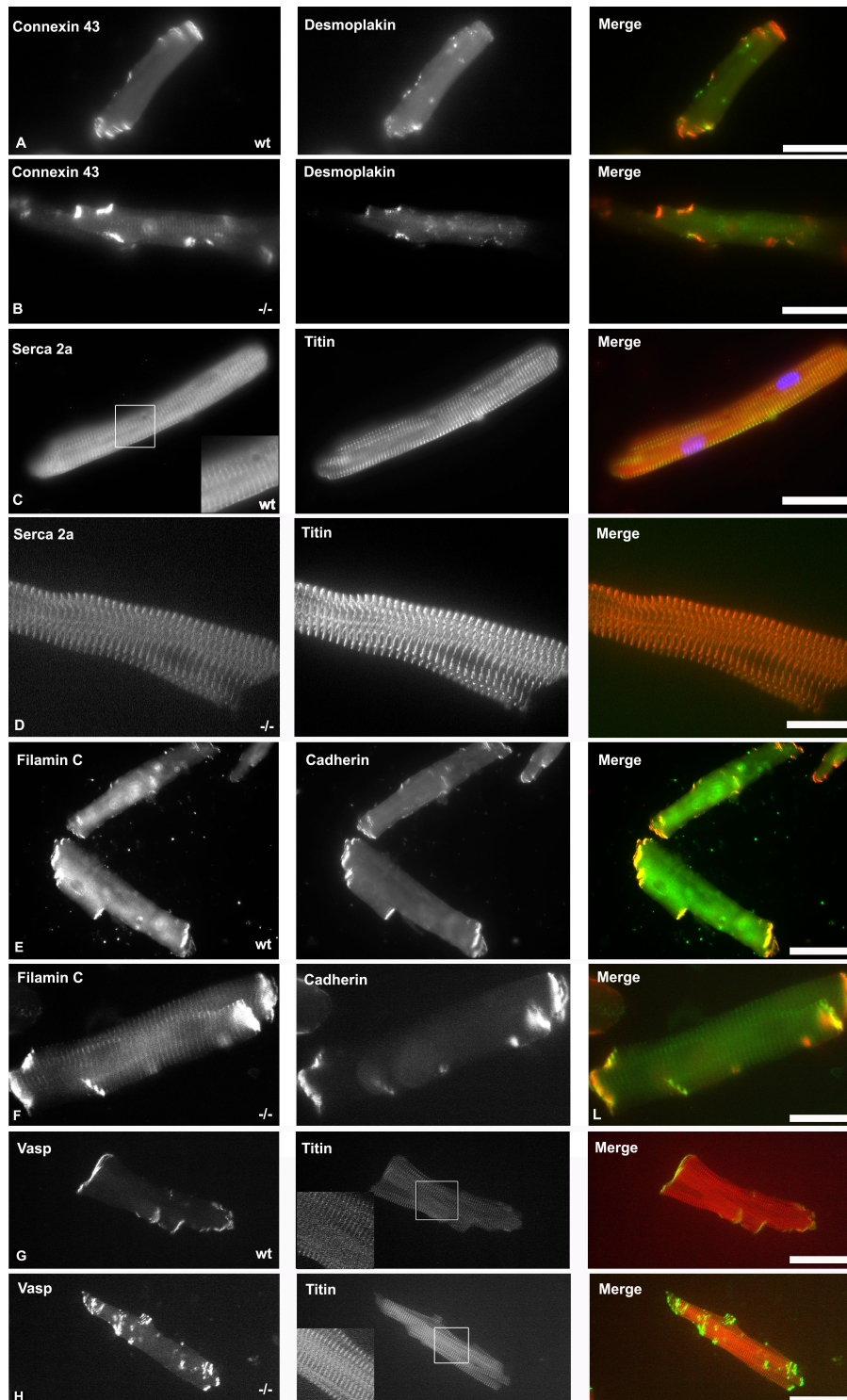


Abbildung 3.14.: Lokalisation von Proteinen in Kardiomyozyten (Maßstabsbalken in Bildreihen A-C, E, G-H: 50µm, D und F: 20µm)

3. Ergebnisse

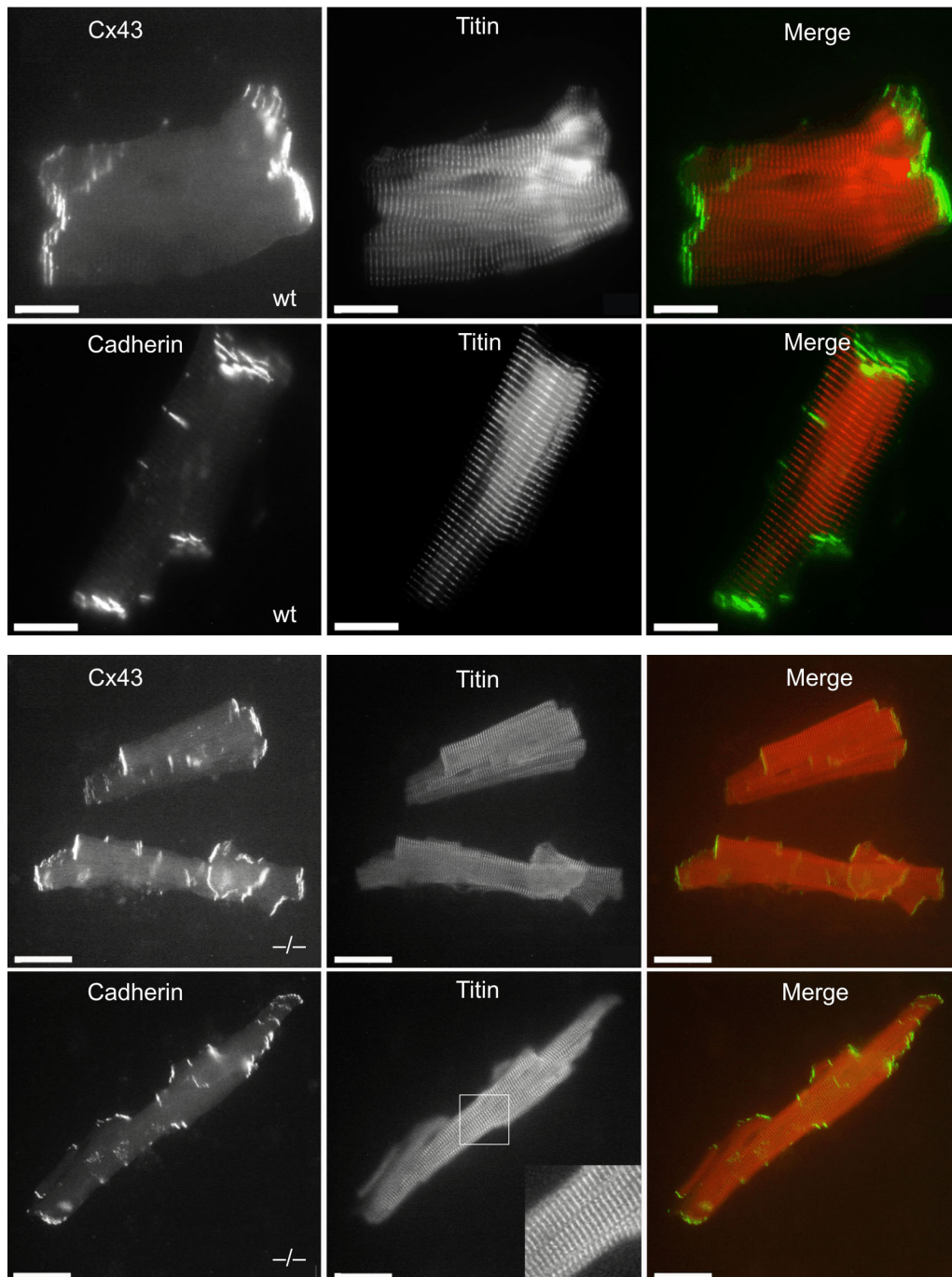


Abbildung 3.15.: Lokalisation von Connexin43/Cadherin sowie Titin (T12)/Cadherin in Kardiomyozyten (Maßstabsbalken in Wildtyp Bildreihen: 20 μ m, in $XinABC^{-/-}$ Bildreihen: 50 μ m)

3. Ergebnisse

gen Connexin 43 und Cadherin eingesetzt. Die vollständigen Messwerte sind im Anhang in Tabelle A.6 angegeben.

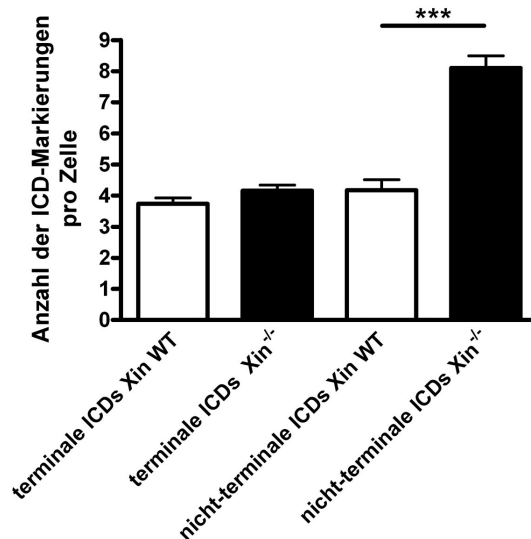


Abbildung 3.16.: *Evaluierung der Glanzstreifenverteilung in isolierten Kardiomyozyten. Es wurden terminal zu nicht-terminal gelegenen Immunmarkierungen analysiert, Standardabweichungen werden durch Balken und Signifikanzen von $p \leq 0,001$ mit "****" im Graph angegeben, ICD=Intercalated disc/Glanzstreifen*

In Abbildung 3.16 sind die Anzahl der terminal und der nicht-terminal gelegenen Glanzstreifenmarkierungen der beiden Genotypen im Vergleich aufgetragen. Wie bereits in den zahlreichen Immundoppelfärbungen der isolierten Kardiomyozyten festgestellt wurde, ergab auch die statistische Auswertung signifikante Unterschiede bei den XinABC^{-/-} Kardiomyozyten. Es zeigte sich im Vergleich zu Wildtypzellen eine signifikant höhere Anzahl von lateralen Glanzstreifenmarkierungen an den XinABC^{-/-} Zellen; jedoch unterscheidet sich die Anzahl der Glanzstreifenmarkierungen mit terminaler Lokalisation zwischen beiden Gruppen nicht. Exemplarische Färbungen, die diese Befunde belegen, sind in Abbildung 3.15 gezeigt.

3.6. Histomorphometrie der Herzdimensionen

3.6.1. Größenbestimmung von Herzaußenwand und des interventrikulären Septums

Zur Untersuchung, welchen Effekt die Ausschaltung des Xin Gens auf die Morphologie des Herzens hat, wurden Herzen von Wildtyp- und $XinABC^{-/-}$ -Tieren an drei definierten Positionen (siehe Abbildung 2.4) zerteilt, in Paraffin eingebettet, anschliessend $10\ \mu\text{m}$ dick geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Für diese Versuche werden Herzen der altersabgestimmten Gruppen 1 und 2 verglichen; gleiches gilt für die Gruppen 3 und 4. Nach Ermittlung der Wand- und Septumsmaße über die Software Diskus wurden die Resultate statistisch ausgewertet.

Um eine gute Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten, wurden alle Herzen vor der Fixierung nach einem Standardprotokoll (siehe Kapitel 2.2.3) mit EGTA-Tyrode retrograd über die Aorta perfundiert und auf diese Weise dilatiert.

Abbildung 3.17 zeigt die Dicke der linken Ventrikelaußenwand und des interventrikulären Septums der beiden altersabgestimmten Genotypgruppen im Vergleich: Im Alter von ca. 12 Wochen zeigten die $XinABC^{-/-}$ Tiere (Gruppe 2, Abbildung 3.17.A und B) sowohl im Septum als auch in der linken Ventrikelaußenwand einen Befund wie bei den Wildtyp Tieren (Gruppe 1): Die Herzbereiche, die im Gesamtorgan näher an der Herzbasis und der Herzspitze liegen (Schnittposition 1 und 3 in Abbildung 2.4), waren auf Grund der physiologischen Organabrundung im Myokard und Septum etwas dicker als im AV-Klappenbereich (Schnittposition 2 in Abbildung 2.4). Im Alter von ca. 1,5 Jahren waren die Maße der linken Ventrikelaußenwand und des interventrikulären Septums auf allen drei Schnittebenen 1 bis 3 äquivalent. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Gruppen 3 und 4 festgestellt werden (Abbildung 3.17.C und 3.17.D). Diese Messergebnisse zeigten keine Anzeichen, die auf eine kardiale Hypertrophie hinweisen. Weiterhin wird diese Beobachtung davon gestützt, dass kein vermehrtes Auftreten von vorspringenden Muskelbälkchen in das Herzlumen und auch kein Auftreten von Muskelgewebe am His-Bündel des Reizweiterleitungssystems im Herzen vorlag, was charakteristisch bei der Genese einer Hypertrophie wäre. Die vollständigen Messergebnisse werden im Anhang in den Tabellen A.3 und A.4 dargestellt.

3. Ergebnisse

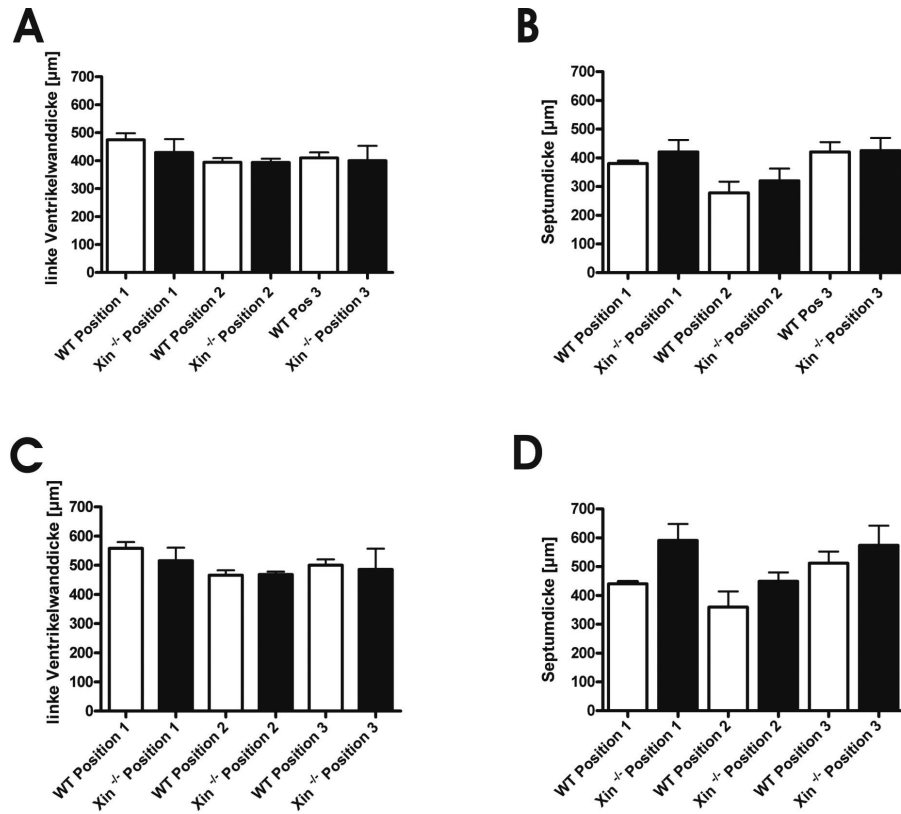


Abbildung 3.17.: Auswertung der Herzwanddicken von jungen (A,B) und alten (C,D) Wildtyp sowie $XinABC^{-/-}$ Tieren an 3 Schnittpositionen (siehe auch Abbildung 2.4); A,C: Septumdicke in [μm], $n=10/\text{Genotyp}$; B,D: Dicke der linken Ventrikelwand in [μm], $n=10/\text{Genotyp}$, Standardabweichung wird durch Balken im Graph indiziert

3. Ergebnisse

3.6.2. Größenvergleich der isolierten Kardiomyozyten

Zu den ersten Anzeichen einer Hypertrophie zählt eine Zellvergrößerung. Diese Größenzunahme kann physiologischen oder pathophysiologischen Ursprungs sein. Nachdem bei der Vermessung der Organmorphologie (siehe auch Kapitel 3.6) keine sichtbaren Anzeichen einer Organvergrößerung gefunden wurden, wurde im nächsten Schritt auf zellulärer Ebene nach Anzeichen einer Hypertrophie gesucht. Enzymatisch isolierte Kardiomyozyten aus dem Ventrikelmuskulatur von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen werden mittels eines geeichten Okularmikrometers vermessen: Zur Beurteilung der Zellen werden jeweils die Länge und die Breite der einzelnen Zellen erfasst. In die Auswertung gingen je 70 Zellen von 5 Tieren im Alter von 6 Monaten je Genotyp ein. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.18 und im Anhang in Tabelle A.5 dargestellt.

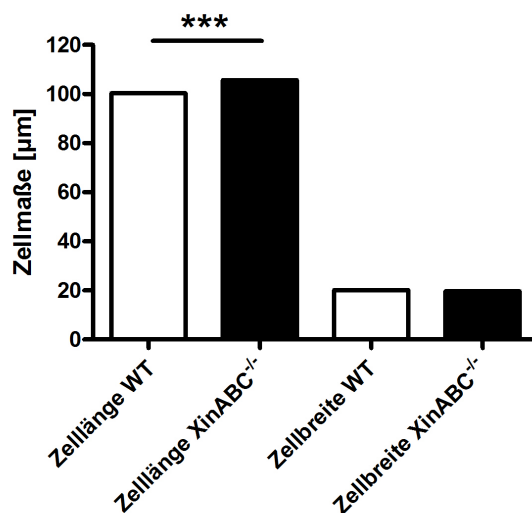


Abbildung 3.18.: Quantifizierung der Zelldimensionen, Vergleich von Zelllänge und Zellbreite bei isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren, Standardabweichung wird durch Balken und Signifikanzen mit "***" im Graph notiert, die Standardabweichung ist auf Grund der hohen Stichprobenzahl so gering, dass sie in der Abbildung nicht erscheint

In Abbildung 3.18 sind die beiden Parameter Zelllänge und -breite aus Zellen von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren im Vergleich aufgetragen. Während in der Zellbreite zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied auftrat, unterschieden sich die Zellen von $XinABC^{-/-}$ Tieren in ihrer Länge von denen des Wildtyps. Im Durchschnitt waren sie um $2,67\mu\text{m}$ länger als Wildtyp Zellen, folglich ergab sich in der Auswertung ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $<0,0001$. Zusammenfassend gibt die signifikant grössere

3. Ergebnisse

Zelllänge in den XinABC-defizienten Zellen einen Hinweis auf einen möglichen Phänotyp. Jedoch zeichnen sich nach HUNTER und CHIEN (1999) druckbelastete Herzen vor allem durch eine Vermehrung des Durchmessers der einzelnen Kardiomyozyten aus, volumenbelastete Herzen dagegen vergrößern sich eher harmonisch und nehmen im Durchmesser und in der Länge zu.

3.7. *In vitro* Kontraktilitätsversuche mit isolierten Kardiomyozyten

Die Ergebnisse der Experimente, die in diesem Abschnitt dargestellt werden, wurden an isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen im Alter von 12-16 Wochen gewonnen. Es gingen Daten von 20 Tieren in die Auswertung ein. Es sollte die Sarkomerverkürzung von isolierten Kardiomyozyten als Parameter für die Leistungsfähigkeit der Herzen untersucht werden. Dies geschah sowohl über die Zeit von 20 externen Reizen als auch im Ruhezustand. Zur Charakterisierung der Situation im Gleichgewicht wurden die jeweils 5 letzten Verkürzungen einer Reizserie von 20 Stimuli bei jeder Frequenz zusammengefasst und gemittelt. Die Zahlenwerte aller Daten dieses Abschnitts sind im Anhang in Tabelle A.7 angegeben.

3.7.1. Sarkomerverkürzungen von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen

Die Originalregistrierungen von Zellen beider Genotypen zeigen die Sarkomerlänge jeweils während einer Stimulationsserie in Abhängigkeit von der Zeit. Pro Frequenz und Gruppe wurden die Daten von 5-10 Zellen gemittelt. Es ist zu erkennen, dass die Ruhesarkomerlänge bei den Zellen der XinABC^{-/-} Tiere sichtbar über der der Wildtypzellen liegt mit einem Unterschied von durchschnittlich ca. 0,02 μm . Auch fällt bereits auf, dass die Sarkomerverkürzungsamplitude der Xin-defizienten Zellen kleiner ist als die der Wildtypzellen.

Nach der 30-sekündigen Stimulationspause war die erste Sarkomerverkürzung (die sogenannte "Post-rest" Verkürzung) bei allen Gruppen und Frequenzen am größten. Bei den Frequenzen 0,5 bis einschließlich 4 Hz zeigten die Zellen eine negative Herztreppe.

3. Ergebnisse

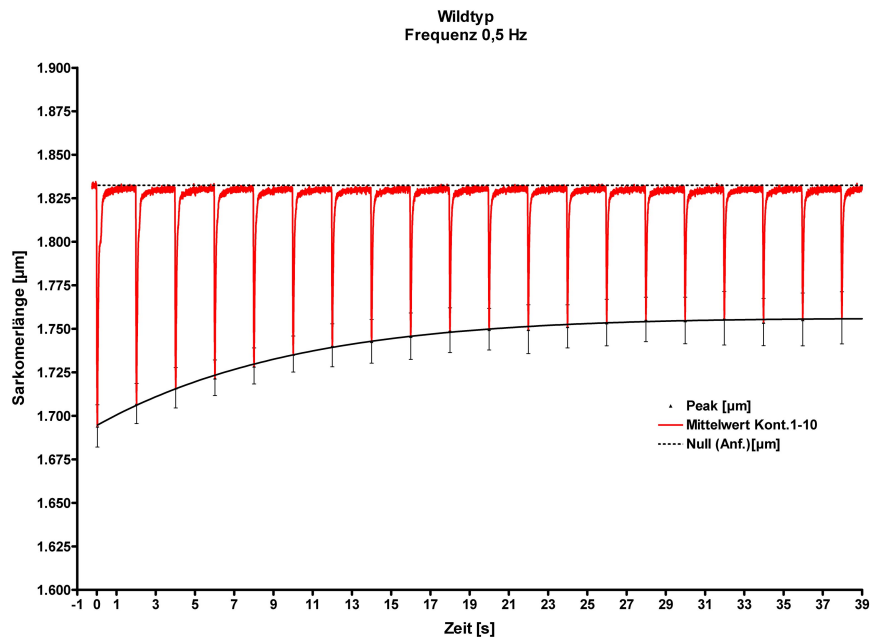


Abbildung 3.19.: Originalregistrierung der isolierten Herzmuskelzellen von Wildtypmäusen bei 0,5 Hz ($n=10$ weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

Dies bedeutet, dass die einzelnen Verkürzungen bis zum "Steady State" sukzessiv an Größe abnahmen. Ab 6 Hz entwickelten die Zellen beider Gruppen eine positive Herztreppe. Dieser Wechsel von negativer zu positiver Herztreppe bei höheren Frequenzen wurde zuerst von TIEMANN et al. (2003) beschrieben. Abbildungen 3.19 bis 3.24 zeigen die Originalregistrierungen der beiden Genotypen bei den beispielhaften Frequenzen von 0,5, 6 und 10 Hz. Zusätzlich enthalten sie die Regressionskurven, die nach der Formel in Abbildung 2.9 berechnet wurden.

3. Ergebnisse

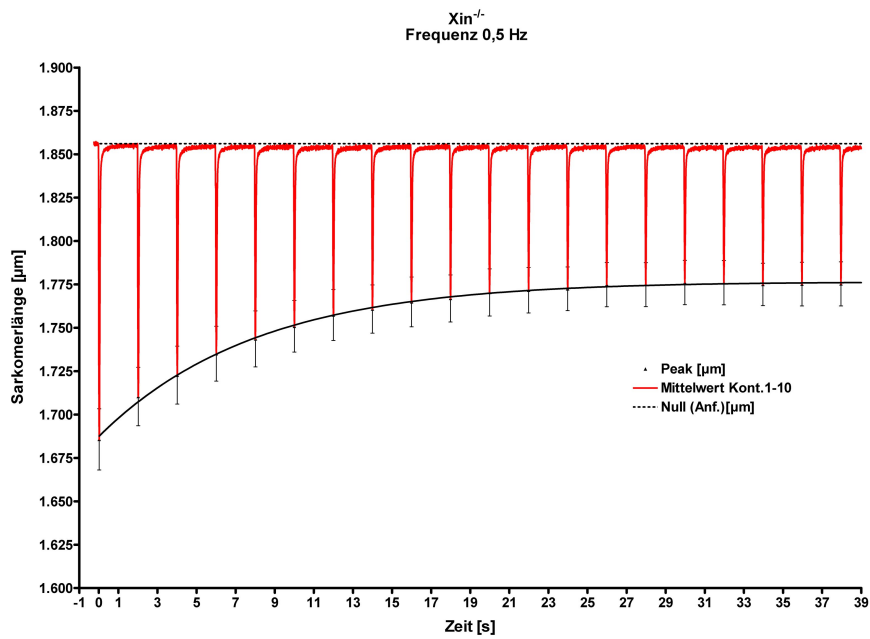


Abbildung 3.20.: Originalregistrierung der isolierten Kardiomyozyten von Xin-defizienten Mäusen bei 0,5 Hz ($n=10$ weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

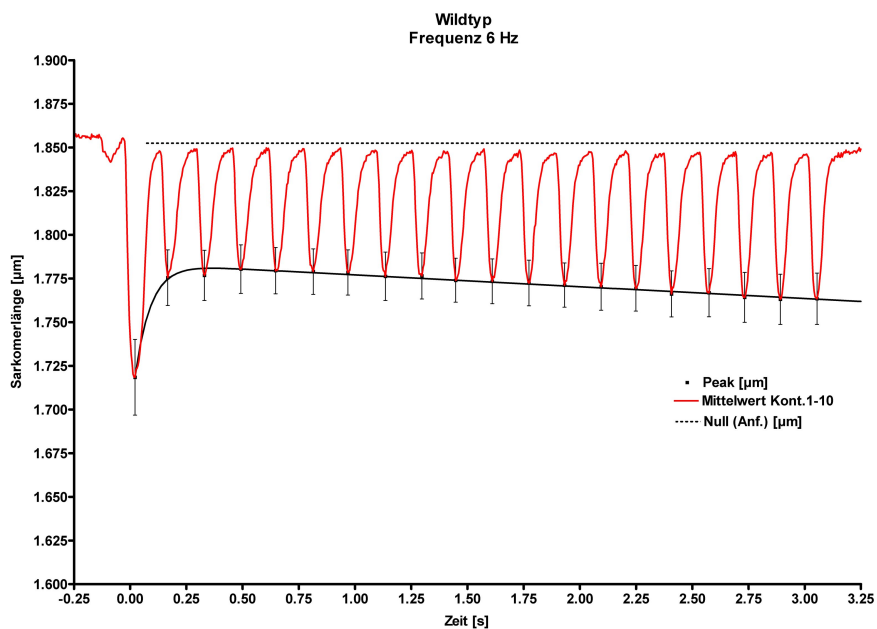


Abbildung 3.21.: Originalregistrierung der isolierten Herzmuskelzellen von Wildtypmäusen bei 6 Hz ($n=10$ weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

3. Ergebnisse

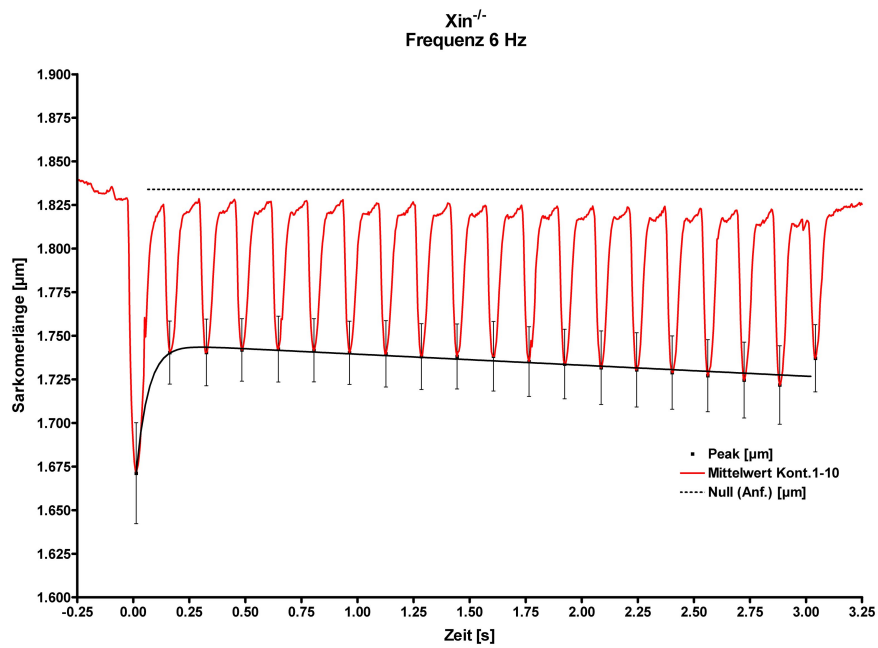


Abbildung 3.22.: Originalregistrierung der isolierten Kardiomyozyten von Xin-defizienten Mäusen bei 6 Hz ($n=10$ weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

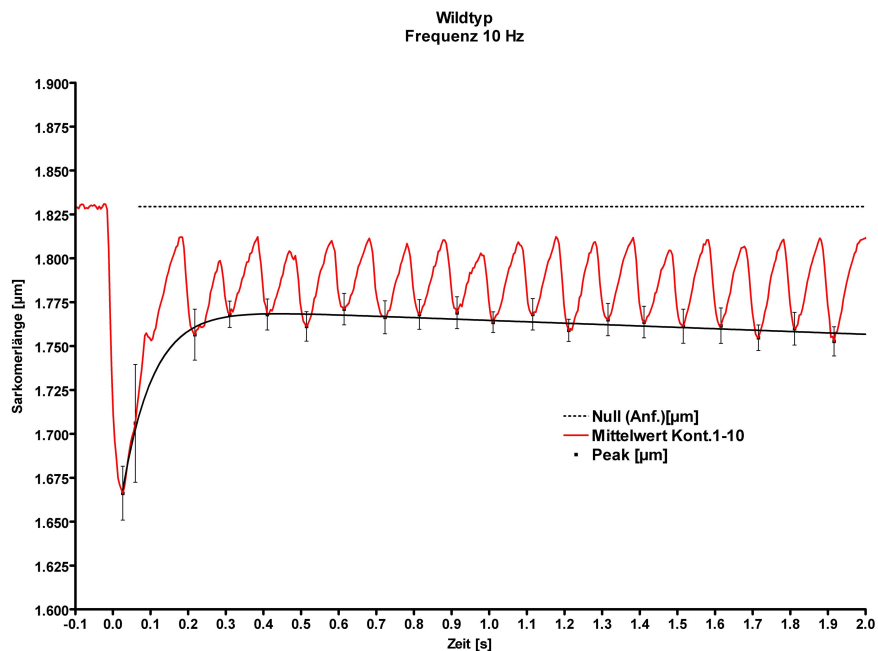


Abbildung 3.23.: Originalregistrierung der isolierten Herzmuskelzellen von Wildtypmäusen bei 10 Hz ($n=10$ weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

3. Ergebnisse

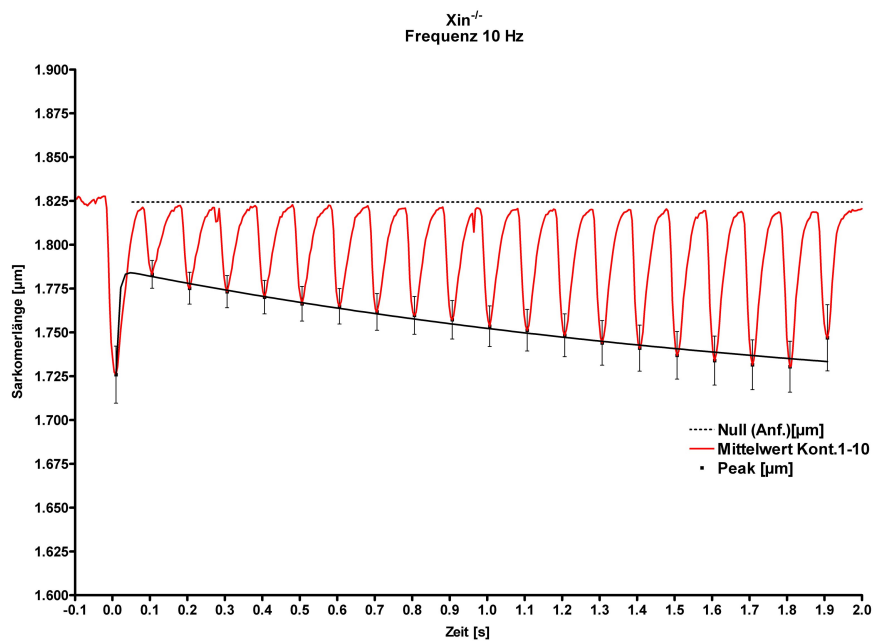


Abbildung 3.24.: Originalregistrierung der isolierten Kardiomyozyten von Xin-defizienten Mäusen bei 10 Hz (n=10 weibliche Mäuse, 12 Wochen alt)

3. Ergebnisse

3.7.2. Vergleich der Sarkomerverkürzungsamplitude von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Kardiomyozyten

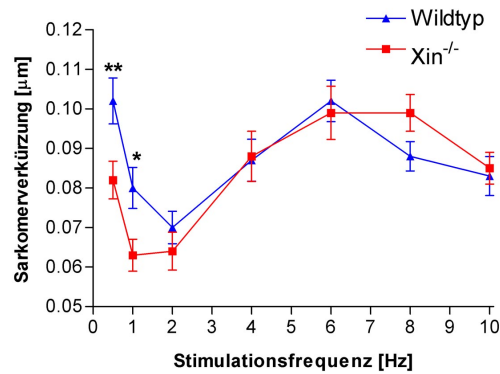


Abbildung 3.25.: Vergleich der Sarkomerverkürzung von isolierten Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Kardiomyozyten in Frequenzabhängigkeit, Signifikanzen werden durch "*" indiziert.

Um die Auswirkung des Fehlens des Xin Gens auf die Sarkomerverkürzung zu untersuchen, wurden die Sarkomerverkürzungsamplitude von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Zellen miteinander verglichen. In Abbildung 3.25 ist die Sarkomerverkürzungsamplitude in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Zwischen den beiden Kurven der Wildtyp (blaue) und den $XinABC^{-/-}$ Zellen (rote) zeigten sich nur bei Frequenzen ≤ 1 Hz signifikante Unterschiede: Die $XinABC^{-/-}$ Zellen verkürzten ihre Sarkomere durchschnittlich um ca. 0,02-0,03 μm weniger als Zellen von Wildtyp Mäusen. Innerhalb der höheren Frequenzen ≥ 2 Hz ging diese Divergenz verloren und die $XinABC^{-/-}$ Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied mehr zu den Kontrollzellen. Auch im Bereich der physiologischen Herzfrequenz bei ca. 10 Hz unterschieden sich die Kontraktionsamplituden nicht.

3.7.3. Sarkomerlängen im Ruhezustand

Der Parameter Ruhesarkomerlänge betrachtet die Sarkomerlänge der Zellen im unstimulierten Zustand. Die Werte werden direkt von der verwendeten Software IonWizard erfasst und berechnet.

In Abbildung 3.26 ist die Ruhesarkomerlänge der beiden Gruppen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Interessanterweise zeigten die $XinABC^{-/-}$ Kar-

3. Ergebnisse

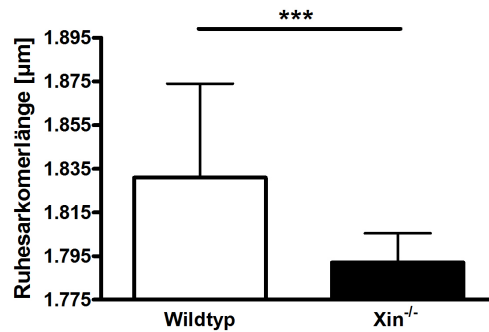


Abbildung 3.26.: Ruhesarkomerlänge der Einzelherzzellen von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren bei 10 Hz im Vergleich, Signifikanz und Standardabweichung werden durch '*' und Balken im Graphen indiziert

diomyozyten bei allen applizierten Frequenzen eine sichtbar höhere Ruhesarkomerlänge. Die Sarkomerlängen der beiden Gruppen unterschieden sich um ca. 0,01-0,05 μm je nach Frequenz. Hinzukommend zeigte sich bei den Stimulationen mit 0,5 Hz, 2 Hz und 10 Hz eine signifikant veränderte Frequenzabhängigkeit: Besonders bei der physiologischen Frequenz von 10 Hz bringen die Kontrollzellen der Wildtyp Mäuse eine deutliche Verringerung der Sarkomerlänge zu Tage, im Gegensatz hierzu nimmt die Sarkomerlänge der $XinABC^{-/-}$ Herzmuskelzellen im Mittel sogar noch zu. Die $XinABC^{-/-}$ Zellen relaxieren zwischen den Kontraktionen bei 10 Hz nahezu vollständig (vergleiche Abbildungen 3.23 und 3.24).

3.7.4. Verkürzungsgeschwindigkeiten im Vergleich

Zur Ermittlung der Verkürzungsgeschwindigkeiten wird die erste Ableitung am steilsten Punkt eines abfallenden Schenkels einer Sarkomerverkürzungskurve gebildet. Die so ermittelten Werte geben die Sarkomerverkürzungsgeschwindigkeit in $[\mu\text{m/s}]$ wieder. Auf der Y-Achse von Abbildung 3.27 sind die Werte mit einem negativen Vorzeichen versehen, da die Ableitung an einem abfallenden Ast der Kontraktionskurve gebildet worden ist. Die Verkürzungsgeschwindigkeit wies eine vergleichbare Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz auf ebenso wie die Verkürzung selbst. $XinABC^{-/-}$ Zellen kontrahieren bei Stimulationsfrequenzen ≥ 2 Hz signifikant schneller als Kontrollzellen.

3. Ergebnisse

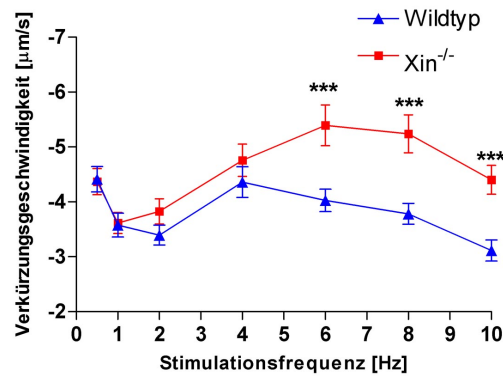


Abbildung 3.27.: Darstellung der Verkürzungsgeschwindigkeit der isolierten Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen, Standardabweichung und Signifikanz werden durch Balken und '*' im Graphen indiziert.

3.7.5. Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten

Analog zur Verkürzungsgeschwindigkeit wird mit Hilfe des IonWizard Programms an der steilsten Stelle des aufsteigenden Schenkels der Kontraktionskurve die erste Ableitung ermittelt, deren Ergebnis die Relaxationsgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ angibt.

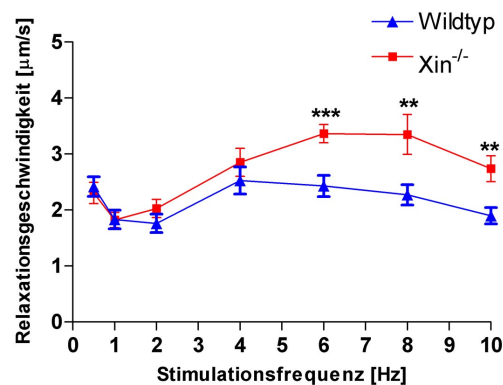


Abbildung 3.28.: Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit in [$\mu\text{m/s}$] von isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Signifikanz wird durch '*' im Graphen indiziert.

In Abbildung 3.28 ist die Relaxationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Auch hier ist, analog zur Kontraktionsgeschwindigkeitskurve, ein biphasischer Verlauf beider Kurven zu sehen. Ein Minimum beider Kurven liegt im

3. Ergebnisse

Intervall zwischen 1 Hz und 2 Hz. Wie im vorherigen Kapitel bereits beobachtet, zeigten sich Unterschiede zwischen den Genotypen, dabei wiesen die $XinABC^{-/-}$ Zellen die höhere Relaxationsgeschwindigkeit ≥ 6 Hz auf.

3.7.6. Evaluierung der Verkürzungsdauer

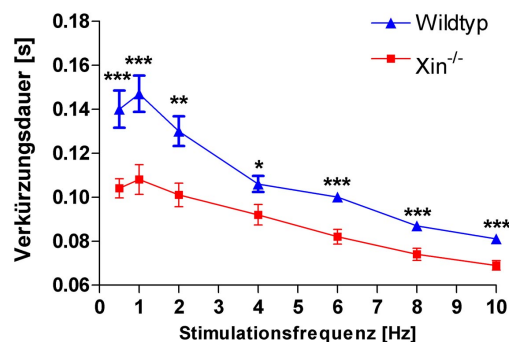


Abbildung 3.29.: Vergleich der Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz, Standardabweichung und Signifikanz werden durch Balken und '*' im Graphen indiziert

Aus der Verkürzung der Kardiomyozyten wird die Verkürzungsdauer errechnet. Sie gibt die Zeit an zwischen Beginn der Verkürzung und dem Zeitpunkt, an dem die Sarkomere sich bis auf 90% der Ruhesarkomerlänge relaxiert haben. In Abbildung 3.29 sind die Werte der durchschnittlichen Verkürzungsdauer der Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Zellen in Sekunden angegeben. Die Verkürzungsdauer nimmt mit steigender Stimulationsfrequenz ab. Grundsätzlich zeigen die beiden abgebildeten Kurven einen nahezu parallelen Verlauf: Die Kurve der $XinABC^{-/-}$ Zellen ist um ca. 0,04 s nach unten verschoben, und weist bei allen Stimulationsfrequenzen signifikant geringere Werte auf. Die $XinABC^{-/-}$ Zellen hatten also bei allen Frequenzen eine signifikant niedrigere Verkürzungsdauer.

3.7.7. Zusammenfassung

In den Kontraktilitätsversuchen mit isolierten Kardiomyozyten wurde untersucht, welche Auswirkung die Ablation von Xin auf die Funktionalität der Herzmuskelzellen hat. Es wurden enzymatisch isolierte Zellen von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren untersucht. Im Ruhezustand weisen die Zellen der Wildtypmäuse eine höhere Sarkomerlänge auf.

3. Ergebnisse

Unter einer externen, elektrischen Feldstimulation zeigten die $XinABC^{-/-}$ Zellen eine signifikant kleinere Sarkomerverkürzungsamplitude bei Frequenzen ≤ 1 Hz. Im Vergleich zu Zellen der Kontrollgruppe zeigte sich bei Frequenzen ≥ 6 Hz eine deutlich schnellere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Entsprechend sind die Verkürzungsdauern im gesamten Frequenzbereich signifikant verringert bzw. für die Kontrollgruppe erhöht.

3.8. *In vitro* Kontraktilitätsversuche mit isolierten Skelettmuskeln

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurden an Skelettmuskeln (M. soleus und M. extensor digitorum longus) von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen gewonnen. In die Auswertung gingen Daten von 10 Mäusen (5 $XinABC^{-/-}$ und 5 Wildtyp) im Alter von ca. 20 Wochen ein. Ziel dieser Untersuchung war es, einen möglichen Effekt der *Xin*-Defizienz auf die Kontraktionseigenschaften der Skelettmuskeln herauszufinden. Es wurden Messungen zur Untersuchung der Anfangskraft, Tetanisierbarkeit und ein Ermüdungsprotokoll erstellt. Die Zahlenwerte aller Daten dieses Abschnitts sind im Anhang in Tabellen A.8, A.9 und A.10 angegeben.

3.8.1. Vorversuche

Um die Aussagekraft der Versuche an den jeweiligen Skelettmuskeln beurteilen zu können, wurden Vorversuche vorgenommen. Diese wurden ohne Berücksichtigung des Genotyps des jeweiligen Versuchstieres unter definierten Kontrollbedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 2.8). Nachdem bezüglich der Kraftentwicklung ein "Steady-State" erreicht worden ist, wurden die Skelettmuskeln nach einem definierten Reizmuster tetanisiert und anschliessend über einen Zeitraum von ca. 20 Minuten kontinuierlich stimuliert. Bei jedem applizierten Stimulationsreiz wurde ein Messwert aufgenommen. Es wurden sowohl der M. soleus als auch der M. extensor digitorum longus hinsichtlich ihres Kontraktionsverhaltens untersucht. Nach Auswertung der Vorversuche wurde die Wichtigkeit einer möglichst genauen Präparation der Skelettmuskeln deutlich. Eine exakte bzw. präzise Isolierung der Skelettmuskeln mit allen anatomisch-vorhandenen Insertionssehnen war die

3. Ergebnisse

grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche Messung. Bei Fehlen einer Sehne war es unmöglich, während des Versuchsverlaufs reproduzierbare Messungen zu erstellen.

3.8.2. Vergleich der Skelettmuskeln zu Beginn des Messprotokolls

Nach Befestigung der Muskeln in der Versuchsapparatur wurde unter Adjustierung einer Mikrometerschraube eine individuelle Ruhedehnungskurve unter isometrischen Bedingungen erstellt. Die Kraftwerte von ca. 20 Einzelreizen wurden sowohl zu Beginn der Messungen als auch nach Ende gemittelt und evaluiert (vergleiche 1. und 4. Messung in Tabelle 2.8). Anschließend wurden für beide Genotypen die unter Kapitel 2.5.2.5 genannten Parameter ausgewertet. Zunächst wird die Initialkraft der Muskeln besprochen, sämtliche weitere erfassten Parameter werden in Kapitel 3.8.5 aufgeführt und erläutert.

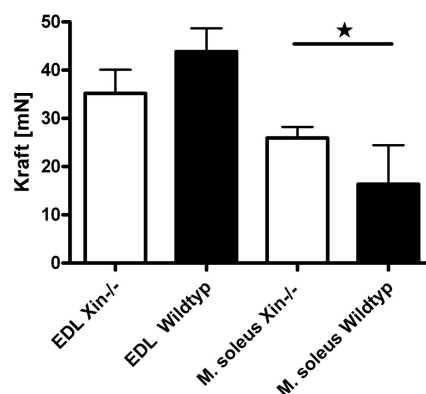


Abbildung 3.30.: Vergleich der Initialkraft vom *M. extensor digitalis longus* (EDL) und *M. soleus* aus Wildtyp und *XinABC^{-/-}* Mäusen, Signifikanzen und Standardabweichung sind mit '*' und Balken indiziert

In Abbildung 3.30 ist die gemittelte Anfangskraft des *M. soleus* von *XinABC^{-/-}* und Wildtyp-Tieren zu Beginn der Messungen dargestellt. Unter optimaler Muskelvorspannung konnte gezeigt werden, dass der *M. soleus* der *XinABC^{-/-}* Gruppe eine signifikant höhere Anfangskraft aufbringen konnte als der *M. soleus* der Wildtyp-Tiere. Der *M. soleus* der *XinABC^{-/-}* Gruppe kontrahierte durchschnittlich 10 mN stärker als der *M. soleus* der Wildtypen. Im Vergleich der beiden *M. extensorii* der beiden Genotypen offenbarten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.

3. Ergebnisse

3.8.3. Tetanisierung bei ansteigenden Stimulationsfrequenzen

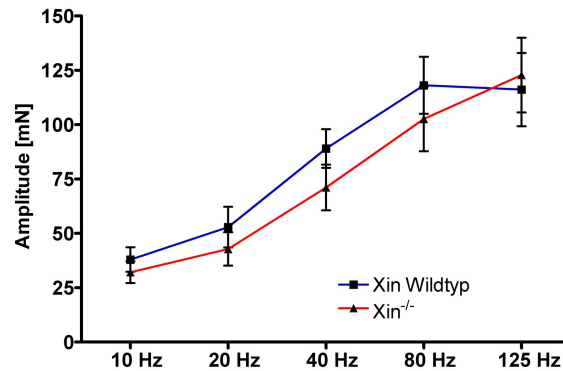


Abbildung 3.31.: Maximale Kraftentwicklung des *M. extensor digitorum longus* von Wildtyp und *XinABC*^{-/-} Mäusen bei verschiedenen Frequenzen im Vergleich, Standardabweichung wird durch Balken indiziert

Nach der Ermittlung der Initialkraft wurden die Muskeln auf ihre Tetanisierbarkeit untersucht. Es wurde ein Stimulationsmuster definiert, das auf die Eigenschaften der jeweiligen Muskeln speziell abgestimmt ist: Der EDL ist mit Frequenzen von 10, 20, 40, 80 und 125 Hz und der *M. soleus* mit 10, 20, 40 und 80 Hz stimuliert worden. In Abbildung 3.31 ist die Kontraktionsamplitude der tetanisierten Muskeln als Funktion der applizierten Stimulationsfrequenz aufgetragen.

Mit zunehmender Stimulationsfrequenz nahm die Kontraktionskraft bei beiden Genotypen linear zu, wobei die Kraft der Kontrollmuskeln oberhalb von 80 Hz nicht weiter stieg. Die *XinABC*^{-/-} Muskeln lagen bei allen Stimulationsfrequenzen, ausser 125 Hz, in der Kraft unter den Kontrollmuskeln. Jedoch wurde bei keiner Frequenz eine signifikante Reduktion erzielt.

Als langsamer Muskel wurde der *M. soleus* mit vier Frequenzen stimuliert. In Abbildung 3.32 zeigt die Frequenzabhängigkeit der Kraft für beide Genotypen einen ansteigenden, parallelen Verlauf, jedoch ist die Kurve der *XinABC*^{-/-} um ca. 20 mN nach oben verschoben. Überraschenderweise zeigt der Vergleich beider Genotypen beim *M. soleus* deutlich markantere Unterschiede in der Maximalkraft als beim *M. extensor digitorum longus*. Der *M. soleus* der *XinABC*^{-/-} Tiere wies im Mittel mehr Kraft während der Tetani auf als der Muskel der Wildtyp Gruppe.

3. Ergebnisse

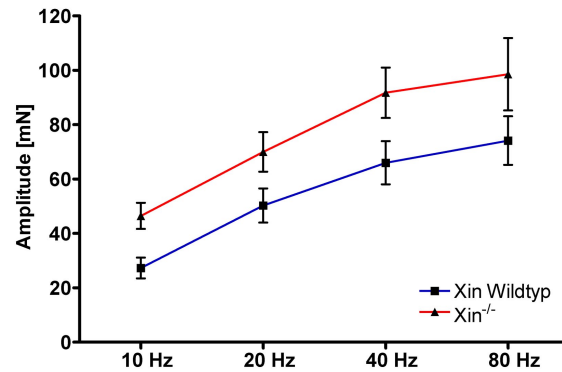


Abbildung 3.32.: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung des *M. soleus* von Wildtyp und *XinABC^{-/-}* Mäusen bei verschiedenen Frequenzen, Standardabweichung wird durch Balken notiert

3.8.4. Ermüdungsprotokoll

In einem weiteren Schritt wurde die Ermüdbarkeit für jeden Muskeltyp getestet. Über eine Zeitspanne von ca. 20 Minuten wurden die Muskeln mit einer definierten Stimulationsfrequenz gereizt. Die Kraft wurde über den gesamten Verlauf des Versuchs aufgezeichnet.

Nach einer Stimulation des *M. soleus* mit einer Frequenz von 20 Stimuli/Minute zeigte sich, dass der *M. soleus* der Wildtypgruppe im Durchschnitt eine höhere Restkraft als der *XinABC^{-/-}* Gruppe zu besitzen scheint.

Während der Stimulationsreihe mit einer Frequenz von 6 Reizen pro Minute kontrahierten die *Musculi extensorii digitali longi* der *XinABC^{-/-}* nicht anders als die der Wildtypgruppe (Abbildung 3.33). Der in Abbildung 3.34 gezeigte Kraftverlust wird durch die Bildung der Differenz aus Initial- und Residualkraft des Muskels errechnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass der *M. soleus* der *XinABC^{-/-}* Mäuse im Mittel mehr Kraft verlor als die Testmuskeln der Wildtypmäuse. Erneut erreichen die Messwerte nicht das Signifikanzniveau ($p=0,07$). Im Fall des *M. extensor digitalis longus* ergab die Berechnung des Prozentualen Kraftverlustes (Delta, Kehrwert) keinerlei Unterschiede ($p=0,81$), dargestellt in Abbildung 3.34.

Interessanterweise sind jedoch signifikante Unterschiede in der Kontraktionsgeschwindigkeit der getesteten Muskeln zu erkennen (Abbildung 3.35). Der *M. soleus* der *XinABC^{-/-}* Tiere offenbarte deutlich schnellere Kontraktionen während der 3. Messung im Vergleich

3. Ergebnisse

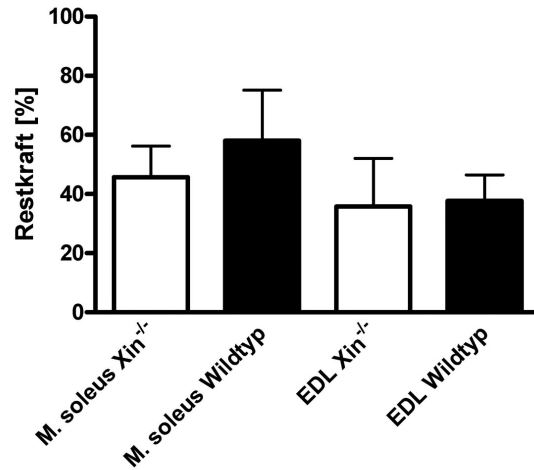


Abbildung 3.33.: Vergleich der Restkraft von *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus* (EDL) von Wildtyp und Xin-defizienten Mäusen nach der 3. Messung (normiert auf die Anfangskraft).

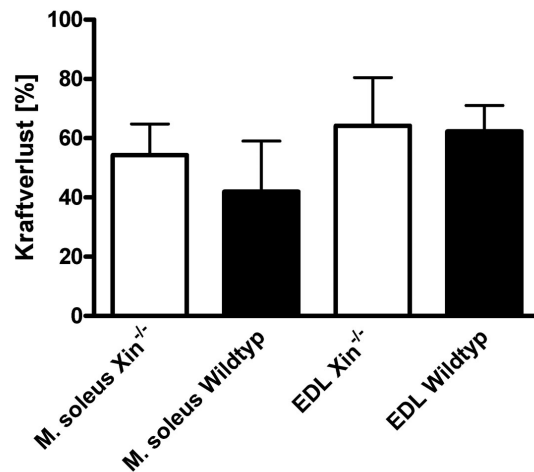


Abbildung 3.34.: Vergleich des Kraftverlusts des *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus* (EDL) von Wildtyp und Xin-defizienten Mäusen während der 3. Messung (normiert auf die Anfangskraft), Standardabweichung wird durch Balken indiziert

3. Ergebnisse

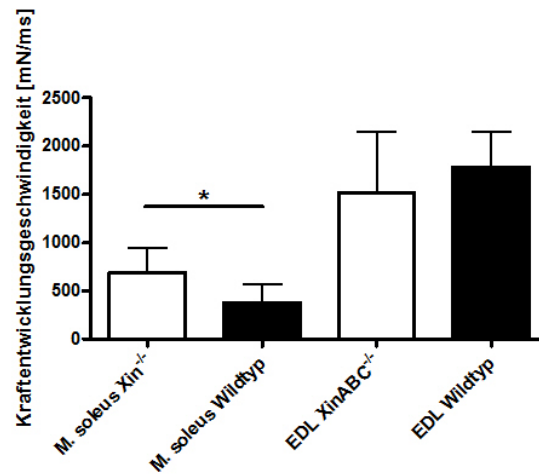


Abbildung 3.35.: Darstellung der Kontraktionsgeschwindigkeit von *M. soleus* und *M. extensor digitalis communis* von Wildtyp und *XinABC^{-/-}*, mit Standardabweichung als Balken und Signifikanz als '*' dargestellt

zum Wildtyp. Ähnliche Tendenzen im Kontraktionsverhalten konnten für den *M. extensor digitalis communis* nicht festgestellt werden.

3. Ergebnisse

3.8.5. Residualkraft der Skelettmuskeln nach Belastung

In Anlehnung an die erste Messung wurde nach den Versuchen (1.-3. Messung) die Residualkraft als Äquivalent zur Initialkraft ermittelt. In Abbildung 3.36 ist die gemittelte Endkraft des M. extensor digitalis longus der beiden genotypgepaarten Gruppen abgebildet. Analog zu den Auswertungen der Anfangskraft (Kapitel 3.8.2) zeigen die ermittelten Messergebnisse im Vergleich keinen Unterschied. So brachte der M. extensor digitalis longus beider Genotypen im Durchschnitt nahezu identisch viel Endkraft auf. Auch hier wird die Endkraft aus 10 Einzelreizen gemittelt. Es konnten keine statistischen Unterschiede ermittelt werden.

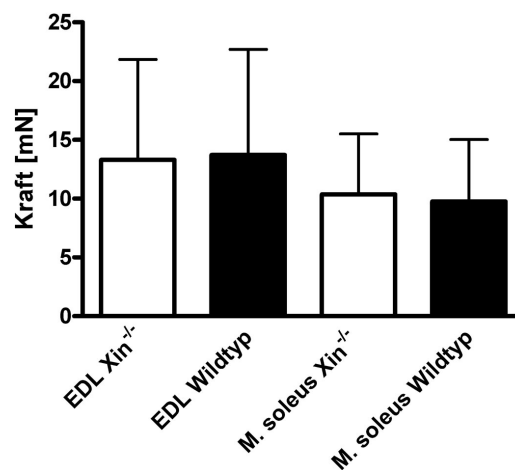


Abbildung 3.36.: Vergleich der Residualkraft von *M. soleus* und *M. extensor digitalis longus* (EDL) von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren (normiert auf Werte aus 1. Messung), Standardabweichung als Balken indiziert

3.8.6. Zusammenfassung

Im Vergleich der M. solei und M. extensorii von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Mäusen mit und ohne Belastung zeigte der M. soleus von $XinABC^{-/-}$ Tieren eine signifikante erhöhte Initialkraft. Unter den applizierten Reizmustern erbrachte er durchschnittlich höhere, jedoch statistisch nicht signifikante Kraftmaximalwerte. Der M. soleus der Xin -defizienten Tiere verfügte über eine schnellere Kontraktionsentwicklung als der Muskel der Wildtypiere. Für die M. extensorii konnte kein signifikanter Unterschied in den Messungen festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1. Validität der angewandten Methoden

Um die Validität der erzielten Ergebnisse beurteilen zu können, ist es erforderlich, sowohl Qualität und Quantität der Isolierungs- bzw. Präparationsmethoden als auch die Reliabilität der Messmethoden zu bewerten. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Technik der Isolation der Kardiomyozyten bereits in vielen Arbeiten, zunächst von Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen (MEYER, 1989; LINZ und MEYER, 2000) und zuletzt auch von Mäusen (TIEMANN et al., 2003; KEMPELMANN, 2005; BAUMGARTEN et al., 2006) erfolgreich durchgeführt. Es wurden dabei sowohl eine hohe erreichte Quantität an lebenden Zellen (bis ca. 70 %) als auch gute qualitative Eigenschaften der Zellen erreicht.

In den Experimenten wurden optisch die absolute Sarkomerlänge und die Verkürzung der Sarkomere gemessen. Das für die Messung der Sarkomerverkürzung verwendete Reizmuster aus sieben verschiedenen Frequenzen ist mit Rücksicht auf mögliche beeinflussende Faktoren gewählt worden (bei physiologischen Bedingungen von 36°C, 1,8 mM Ca²⁺). Eine 30-sekündige Pause zwischen zwei Frequenzen diente dazu, die Zellen vor jeder Messung in den Ruhezustand zu bringen. Das abwechselnde Muster aus niedrigen und höheren Frequenzen sollte unterbinden, dass ein Einfluss durch eine Folge ansteigender oder absteigender Frequenzen auf die Messungen ausgeübt wird. Die höchste gemessene Frequenz ist 10 Hz, die bereits bei TIEMANN et al. (2003) verwendet wurde. In dieser Arbeit wurde bei Mäusen unter Kontrollbedingungen eine Herzfrequenz von $580 \pm 11 \text{ min}^{-1}$ gemessen. Dies entspricht einer Herzfrequenz von ca. 9,5 Hz. Damit liegt die hier *in vitro* angewendete Frequenz von 10 Hz im *in vivo* Normbereich. In allen Publikationen anderer Arbeitsgruppen wurden isolierte Kardiomyozyten nur mit niedrigeren Frequenzen stimuliert (NAIR und NAIR, 2001). Diese Methode der Messung der Sarkomerverkürzung, die hier angewendet wurde, ist unabhängig von der Zellgröße und hat damit entscheidende Vorteile gegenüber der häufig verwendeten Zellverkürzungsmessung (*Edge detection*),

4. Diskussion

bei der die Verschiebung der Zellränder als Maß für die Verkürzung hinzugezogen wird. Wie NAIR und NAIR (2001) zeigten, besteht eine Korrelation zwischen der Zellgröße und dem Alter der Versuchstiere. Aus diesem Grund ist bei der Edge-detection-Methode eine Normierung auf die Zelllänge im Ruhezustand nötig. Bei der Messung der Sarkomerverkürzung kann jedoch darauf verzichtet werden.

Die Versuchsreihe der Skelettmuskelkontraktilität setzt eine Versuchsumgebung mit standardisierten Bedingungen voraus. Der Versuchsstand wurde vor Präparation der Skelettmuskeln einsatzfertig vorbereitet, um eventuellen Verzögerungen im Versuchsablauf, die die Präparatqualität der Muskeln erheblich beeinflussen können, vorzubeugen. Zur Präparation wurden stets Mäuse gleichen Alters und Geschlechts verwendet. In Vorversuchen wurde die Belastbarkeit der Präparate evaluiert. Durch die Erstellung einer Ruhe-Dehnungskurve von jedem Muskel wurde seine Unversehrtheit überprüft. Überlebte der Muskel diese Messung unbeschadet, so gilt dies meist auch für die Dauer des Versuchs von maximal 4 Stunden. Löste sich ein Muskel während der Versuchsdurchführung aus der Befestigung, so wurde er nicht mit in die statistischen Auswertung aufgenommen. Damit wurden möglichst identische Bedingungen für jedes Präparat geschaffen, annähernd zuverlässig erreicht. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die angewendete Methode valide und reproduzierbar ist und mit Ergebnissen aus der jeweiligen Literatur übereinstimmt (HAMILTON et al., 2006).

Für die histologische Bearbeitung der Präparate wurden Färbeprotokolle aus unserer Arbeitsgruppe verwendet, die bereits in früheren Studien als Arbeitsleitfaden dienten (EULITZ, 2005; VAN DER VEN et al., 2006). Zu vergleichende Präparate wurden unter identischen Bedingungen gefärbt. Dies sollte eine gleichbleibende Qualität der Färbungen gewährleisten. Die Bilderfassung der aller lichtmikroskopischen Präparate wurde jeweils mit den selben Mikroskopen durchgeführt, um Einflüsse bedingt durch den Gebrauch verschiedener Hardware zu eliminieren. Die histologischen Färbungen wiesen auch in wiederholten Versuchen gleichbleibende Ergebnisse auf und unterstrichen somit die Zuverlässigkeit der verwendeten Protokolle und Materialien.

4.2. Auswirkungen der Xin-Defizienz auf die kardiale Organ- und Zellmorphologie

Die Herzmuskulatur unterliegt, wie die Skelettmuskulatur, in der frühen Entwicklung sowie während hypertrophem Wachstum aufwendigen Remodellierungsprozessen. Diese morphogenetischen Prozesse umfassen eine Reorganisation von dünnen Filamenten, die in der Anfangsphase noch in unterschiedlichen Längen und willkürlicher Orientierung vorliegen. Aus Stressfaser-ähnlichen Strukturen werden gebündelte Filamente mit uniformen Längen und Bindung an der Z-Scheibe gebildet. Diese Anordnung stellt Verbindungen sowohl zu benachbarten Myofibrillen als auch zur extrazellulären Matrix und angrenzenden Zellen über spezialisierte Membrankomplexe her. Veränderungen mit derartig umfangreichen Ausmaß setzen eine ständige Kontrolle und Koordination der Aktivität mehrerer Proteine voraus, die die Polymerisationsdynamik, Filamentlänge als auch die dreidimensionale Anordnung der Filamente beeinflussen.

Das Protein Xin besitzt Eigenschaften, die es für eine Schlüsselposition in der Kontrolle der kardialen Morphogenese qualifizieren. Von WANG et al. (1999) wurde die Inhibition der Xinexpression in Hühnerembryonen beschrieben. Eine Xindefizienz äussert sich demnach in einer Verdickung der Herzwände sowie in multiplen Invaginationen in den Herzinnenraum; diese pathologischen Strukturen verhindern den Ablauf des evolutionsphysiologischen Loopingprozesses.

Grundsätzlich ist aus der Literatur für Xin-defiziente Tiere bekannt, dass eine partielle Genablation des XIRP1 mit kardialer Hypertrophie und Überleitungsstörungen in der Herzerregung in Verbindung gebracht wird (GUSTAFSON-WAGNER et al., 2007). Weiterhin wird eine Lokalisierung in der Fascia adherens (siehe auch Abbildung 1.1) (SINN et al., 2002) sowie eine Bindung an Aktinfilamente (PACHOLSKY et al., 2004; CHEREPANOVA et al., 2006), an β -Catenin (CHOI et al., 2007), an Filamin C und an Mena/VASP (VAN DER VEN et al., 2006) beschrieben. Diese Eigenschaften implizieren für Xin eine Aufgabe als Adapterprotein, das offensichtlich am Umbau des Aktinzytoskeletts beteiligt ist. Otten et al. (2010) legen die Vermutung nahe, dass der ausschlaggebende Ursprung der verschiedenen Phänotypen der beiden Mausmodelle über die Aufklärung des Spleißvorganges des XIRP1 Gens eine Expression der XinC Isoform in den zuvor von Gustafson-Wagner et al. (2007) beschriebenen XinAB^{-/-} Mäusen anzunehmen ist.

4. Diskussion

Um eine qualitative Aussage über das Maß einer Hypertrophie machen zu können, ist es hilfreich, feste Bezugspunkte für jedes Einzeltier festzulegen. So wurde das Herzgewicht sowohl für sich separat betrachtet, als auch in Bezug zum Körpergewicht und zur Tibialänge gesetzt. Verändert sich nun das Herzgewicht durch Myokardzunahme, so wird aus der Veränderung der Verhältnisse zu einander deutlich ersichtlich, ob das Myokard lediglich dem Wachstum des Körpers folgt, oder ob es sich um einen unabhängigen Prozess handelt. In dieser Arbeit zeigten die Messwerte für das Herzgewicht separat sowie die Verhältnisse von Herzgewicht/Körpergewicht als auch von Herzgewicht/Tibialänge, dass für die $XinABC^{-/-}$ Mäuse nicht mit einer kardialen Hypertrophie zu rechnen ist. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den altersidentischen Gruppen der beiden Genotypen vor. Läge eine Hypertrophie vor, so wären ein Anstieg im Herzgewicht sowie eine Veränderung in den Verhältnissen zu Gunsten des Herzgewichts zu verzeichnen.

Um einen ersten histologischen Eindruck der Gewebestruktur des Myokards zu erhalten, wurden aus verschiedenen Bereichen des Herzens HE-Färbungen angefertigt. Es war gut zu erkennen, dass die markante Herzstruktur mit seiner charakteristischen Anordnung der Kardiomyozyten, den Kernen und den Glanzstreifen anatomisch ungestört vorlag. Der Vergleich beider Genotypen zeigte auch in Gewebeausschnitten mit höherem Vergrößerungsfaktor keinerlei Unterschiede. Wären die Herzen der $XinABC$ -defizienten Tiere von einer Hypertrophie geprägt, so würde sich histopathologisch eine deutliche Verbreiterung der Kardiomyozyten zeigen. In den Untersuchungen zu den Zelldimensionen zeigte sich jedoch nur eine Zellverlängerung, keine Zellverbreiterung. Weiterhin ist bekannt, dass von einer Hypertrophie gezeichnete Kardiomyozyten eine Polyploidisierung der Kerne aufweisen (THOMAS, 2004). Die Kerne sind groß, hyperchromatisch und - auf einem Querschnitt - bizarre gestaltet. Derartige Polymorphismen konnten in keinem Präparat beider Genotypen beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der Fibroseuntersuchung mit Hilfe der Azanfärbung nach Heidenhain wiesen eine perivaskuläre Fibrose der Koronargefäße bei Jungtieren der Mutante auf. Jedoch konnte dieser Unterschied nicht mehr im Alter zwischen beiden Genotypen beobachtet werden. Unterliegen die Koronargefäße einem erhöhten Blutdruck (Hypertonie) als Begleitsymptom bei Herzerkrankungen wie z.B. bei ischämischer Kardiomyopathie, findet während der Remodellierungsprozesse im Myokard eine Ausbildung von vermehrtem interstitiellen Bindegewebe und einer perivaskulären Fibrose statt (THEWS und MUTSCHLER, 1989). Die bei den jungen $XinABC^{-/-}$ Mäusen festgestellten Befunde könnten darauf zurückzuführen sein, dass in der Jugend pathologische Blut-

4. Diskussion

druckverhältnisse in Form von Hypertonie vorliegen könnten. Da im Alter bei beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede mehr festzustellen waren, lassen diese Befunde die Vermutung zu, dass eine Regression der perivaskulären Fibrose innerhalb des physiologischen Alterungsprozess stattfindet.

In Übereinstimmung mit dem Fehlen einer hypertrophen Veränderung des Myokards und auch der Herzgewichte ließ sich ebenfalls keine Zunahme des Bindegewebanteils im Herzen der $XinABC^{-/-}$ Mäusenachweisen. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Gustafson-Wagner et al. (2007) für $XinAB^{-/-}$ Mäuse. Homozygote $XinAB^{-/-}$ Mäuse wiesen, wie die heterozygoten $XinAB^{+/-}$ Tiere in milderer Ausprägung auch, signifikant mehr Bindegewebseinlagerungen im Myokard als Begleiterscheinung der Ventrikelhypertrophie auf. Jedoch kann dieser Unterschied in der kardialen Fibrose zwischen $XinABC^{-/-}$ und $XinAB^{-/-}$ Tieren als eine Folge der divergierenden kardialen Hypertrophie angesehen werden.

Ein Fokus bei der Phänotypisierung der Mäuse war es, Herzmuskelzellen an besonderen Strukturen, den Glanzstreifen zu untersuchen. Sie sind im Myokard an ihren Enden durch diese verknüpft. Glanzstreifen gewährleisten mit Hilfe von Gap Junctions durch Bildung eines funktionellen Synzytiums die Erregungsweiterleitung. Die Untersuchungen an $XinAB^{-/-}$ Mäusen durch Immunfärbungen haben gezeigt, dass Connexin43 vermehrt in lateralen Zellkontakten gezeigt werden konnte und quantitative Analysen ein vermindertes Expressionslevel in diesen Zellen ergaben. Weiterführende Untersuchungen mit Antikörpern gegen Plakoglobin, α -Catenin und p120^{ctn} (phosphoryliertes Protein der Cateninfamilie) gerichtet, wiesen keine Abweichungen in der Lokalisierung, jedoch meist ein geringeres Expressionslevel im Vergleich zum Wildtyp auf (GUSTAFSON-WAGNER et al., 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und indirekter Immunfluoreszenz die Lokalisierung verschiedener Proteine wie Connexin43, FilaminC, Titin und SERCA2a in isolierten Kardiomyozyten untersucht. Weiterführend wurde mit speziellen Markierungen von Glanzstreifen durch Antikörper gegen Cadherin und VASP untersucht. Bei der Auswertung der Präparate zeigte sich, dass Markierungen des Sarkoplasmatischen Retikulums durch einen SERCA2a-spezifischen Antikörper sowie myofibrilläre Markierungen durch Titin (Z-Scheibenepitop) keine Abweichung gegenüber den Wildtypzellen aufwiesen. Auch die Anordnung der Z-Scheiben war in den Xin -defizienten Zellen nicht beeinflusst.

4. Diskussion

Jedoch wurde in Immunmarkierungen mit Connexin43 und Cadherin bei den $XinABC^{-/-}$ Mäusen veränderte Positionen gezeigt. Die Proteine Connexin43 und Cadherin, die hauptsächlich in Gap Junctions und Adherens Junctions vorkommen, lagen nicht wie in Wildtypzellen nur in terminalen Glanzstreifenstrukturen vor, sondern vermehrt in lateralen Positionen. Dies wurde durch die statistische Auswertung bestätigt, hier erwies sich die Anzahl von lateralen Kontakten in $XinABC^{-/-}$ Zellen als signifikant erhöht. Interessanterweise konnte das Protein VASP, ein direkter Bindungspartner von Xin, auch in den $XinABC^{-/-}$ Zellen in gewohnter Lokalisierung in den Glanzstreifen aufgefunden werden. Eine Xinablation scheint daher die Verteilung von VASP nicht zu beeinflussen.

Die polare Lage der Glanzstreifen in Herzmuskelzellen erleichtert bei der Reizweiterleitung im Myokard die Verbreitung in Längsrichtung, da der Gewebewiderstand in dieser Richtung geringer ist als in Transversalrichtung (Anisotropie). DHEIN et al. (1999) sowie DHEIN und HAMMERATH (2001) zeigten, dass ausgekoppelte Areale in der Zellmembran mit erhöhtem Gewebewiderstand zu einer Störung der Erregungsausbreitung mit nachfolgender Herzrhythmusstörung führen. Dies kann bis zur Auflösung von Reentry-Arrhythmien führen (DHEIN und HAMMERATH, 2001). Für $XinAB^{-/-}$ Mäuse wurden bereits bei Messungen mit einem Elektrokardiogramm (EKG) verlängerte Werte für die P-Welle und QT-Interval festgestellt, womit ein Defekt in der Erregungweiterleitung in Atriae und Ventrikeln des Herzens vermutet wurde (LAI et al., 2007; GUSTAFSON-WAGNER et al., 2007). OTTEN et al. (2010) zeigten jedoch, dass unter Stimulation im intrakardialen EKG die HV-Werte (Erregungsdauer von His-Bündel bis zum Beginn des QRS-Komplexes) für die $XinABC^{-/-}$ Tiere signifikant kürzer ist. Dies bestätigt eine schnellere Überleitungszeit im speziellen Erregungsleitungssystem der Ventrikel. Gegensätzlich zu den Ergebnissen von $XinAB^{-/-}$ Mäusen zeigte sich in der EKG Analyse eine Tendenz zu einem verlängerten QRS-Interval, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Xin-Defizienz einen eher geringgradigeren Effekt auf die untersuchten elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens hat als vermutet wurde. Die erhöhte Anzahl von seitlich gelegenen Glanzstreifenstrukturen könnte über einen verminderten interzellulären Widerstand der Ursprung für die erhöhte Erregungsgeschwindigkeit sein. Diese Unterschiede scheinen keinen offensichtlich veränderten Phänotyp hervorzurufen, jedoch könnte sich die Situation unter Stress bzw. Belastung wesentlich anders entwickeln.

4.3. Frequenzabhängigkeit der Sarkomerverkürzung in isolierten murinen Kardiomyozyten von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren

Beim Menschen führt die Erhöhung der Herzfrequenz in der Regel zu einer Steigerung der myokardialen Kontraktilität (BOWDITCH, 1871). Dieses Phänomen wird als positive Kraft-Frequenz-Beziehung, als 'positive Herzterrasse' oder nach dem Erstbeschreiber der Relaxationsstörung als 'Bowditch-Effekt' bezeichnet. Auf zellulärer Ebene wurde bei Steigerung der Herzfrequenz eine Zunahme des Calciumkonzentrationsgefälles zwischen Systole und Diastole (sog. Calciumtransient) gemessen (HATTORI et al., 1991). Nach einer bestimmten Zeit stellte sich letztendlich ein Gleichgewicht ein.

Der Verlauf von Herzterrasse ist speziesabhängig, wobei Herzmuskeltrabekel vom Menschen (PIESKE et al., 1999), Herzmuskelstreifen vom Frosch (NIEDERGERKE, 1955) und Kaninchen (MAIER et al., 2000) positive Herzterrasse ausbilden. Ein positiver Verlauf führt zu einer Vergrößerung der Kontraktionsamplitude bei jedem Schlag, bis sich ein frequenztisches Gleichgewicht eingestellt hat. Für Kardiomyozyten von Ratten wurden von BERS (2001) negative Herzterrasse beschrieben, während von BORZAK et al. (1991) Herzterrasse abhängig von der Stimulationsfrequenz beobachtet wurden: Negative Herzterrasse bei niedrigen Frequenzen und positive Herzterrasse bei höheren Frequenzen.

Für Mäuse beschrieben TIEMANN et al. (2003) an Hand von Messungen an isolierten Kardiomyozyten bei Frequenzen von ≤ 4 Hz negative Herzterrasse. Bei Stimulationsfrequenzen ab 6 Hz traten positive Herzterrasse auf. In dieser Studie wurden an isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp und $XinABC^{-/-}$ Tieren vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die Ausbildung einer Herzterrasse nach einer Stimulationspause hat ihre molekulare Grundlage in der anfänglichen Ca^{2+} Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums. Durch das erste AP nach einer Pause (Post Rest) wird ein bestimmter Prozentsatz Ca^{2+} -Ionen im Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Bei manchen Spezies wie der Maus ist das Sarkoplasmatische Retikulum nach einer Pause voll Ca^{2+} . Dies führt zu einer Freisetzung von viel Ca^{2+} während der Post Rest Verkürzung und einer entsprechend großen Verkürzungsamplitude. Für die die folgenden Verkürzungsamplituden sind drei Mechanismen entscheidend:

4. Diskussion

1. Wieviel Ca^{2+} strömt pro Zeit durch die L-Typ-Kanäle in die Zelle ein.
2. Wieviel Ca^{2+} wird durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle eliminiert.
3. Wieviel Ca^{2+} wird durch die SERCA-ATPase in das Sarkoplasmatische Retikulum zurückgepumpt.

Bei niedrigen Frequenzen kommt es relativ selten zum Ca^{2+} -Einstrom und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher kann relativ viel Ca^{2+} aus der Zelle pumpen. In Folge dessen ergibt sich eine negative Treppe. Bei höheren Stimulationsfrequenzen werden mehr APs pro Zeit ausgelöst und es werden fließt entsprechend mehr Ca^{2+} pro Zeit in die Zelle. Dadurch, dass die Zelle relativ länger depolarisiert ist, kann der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher weniger Ca^{2+} aus der Zelle transportieren und die SERCA übernimmt einen größeren Anteil. Dies führt zu einer zunehmenden Füllung des Sarkoplasmatischen Retikulums mit Ca^{2+} und damit zu einer positiven Herzterre. Sowohl bei einer positiven wie bei einer negativen Treppe wird nach einigen Verkürzungen ein neues Gleichgewicht erreicht (BERS, 2001). In diesem Gleichgewicht werden genauso viele Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma eliminiert wie Ca^{2+} -Ionen über den L-Typkanal in die Zelle gelangen.

Die Frequenzabhängigkeit der Verkürzung im Gleichgewicht folgt einer zweigipfligen Funktion mit einem Maximum bei 0,5 Hz und einem bei oberhalb von 6 Hz. Dies galt für beide untersuchten Genotypen. Dieser markante zweigipflige Verlauf von murinen isolierten Kardiomyozyten ist speziesspezifisch und wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben (BORZAK et al., 1991; ITO et al., 2000; STUYVERS et al., 2002; TIEMANN et al., 2003). Für weitere Versuchstierspezies wie Ratte und Meerschweinchen sowie für humane isolierte Kardiomyozyten wurde von PIESKE et al. (1999); PETROFF et al. (2003) und ENDOH (2004) eine positive Kraft-Frequenz-Korrelation gezeigt. Die Verkürzung und die Relaxationsgeschwindigkeit zeigten einen vergleichbaren Verlauf. Jedoch zeigen die $\text{XinABC}^{-/-}$ Zellen signifikant schnellere Verkürzungen ab Frequenzen ≥ 6 Hz. Wildtypzellen relaxieren ab ≥ 6 Hz nur unvollständig, da ihre Kontraktionsdauer zu hoch ist. Die adulte Maus hat eine physiologische Herzfrequenz von ca. 9,5 Hz, bei der ebenfalls eine positive Kraft-Frequenz-Korrelation gezeigt werden konnte (TIEMANN et al., 2003). Interessanterweise zeigen die $\text{XinABC}^{-/-}$ Kardiomyozyten signifikant schnellere Verkürzungsgeschwindigkeiten je mehr die applizierte Simulationsfrequenz der physiologischen Herzfrequenz ähnelt. Entsprechend verhält sich auch das Relaxationsverhalten bei eben diesen Frequenzen, die Kardiomyozyten brauchen signifikant kürzer um zu relaxieren. Folglich ist auch die Verkürzungsdauer für $\text{XinABC}^{-/-}$ Zellen signifikant kürzer.

4. Diskussion

Eine positive Kraft-Frequenz-Korrelation wird auch als positive Inotropie bezeichnet. Positive Inotropie hat ihren Ursprung in einer erhöhten Verfügbarkeit von freien Calciumionen. Der generelle Zusammenhang zwischen Stimulationsfrequenz und Inotropie wurde bereits oben beschrieben.

Jedoch weist die Calciumhomöostase im Myokard im Vergleich der Tierarten Unterschiede auf, da der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher jeweils andere Kapazitäten hat. Während der Relaxation ist er in Maus und Ratte nur mit einer Beteiligung von 7% an der Calciumeliminierung beschäftigt, beim Kaninchen sind es 28% nach BERS (2002) sowie BERS und WEBER (2002). Den größten und somit wichtigsten Anteil (bei Mäusen und Ratten: 92%) übernimmt jedoch die SERCA, die begleitend von Calciumpumpen und -uniportern in der Zellmembran unterstützt wird (BERS, 2002). Da die Maus eine sehr hohe SERCA-Aktivität im Vergleich zu anderen Tierarten hat, führt dies zu einer höheren Calciumkonzentration im sarkoplasmatischen Retikulum während der Diastole. Die positive Inotropie kann ebenso von einem weiteren Faktor positiv beeinflusst werden: An Hand von Meerschweinchenpapillarmuskeln konnte eine frequenzabhängige Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration nachgewiesen werden (WANG et al., 1988). Wäre eine ähnliche Ionenverteilung bei der Maus vorzufinden, wäre die Eliminierung von Calcium über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auf Grund der erhöhten Natriumkonzentration verringert. Die hohe Kapazität der SERCA in der Maus begünstigt schnellere Verkürzungsgeschwindigkeiten der Herzmuskelzellen. Steigt folglich die zytosolische Calciumkonzentration, sorgt eine schnelle Eliminierung durch z.B. die SERCA für eine erneute Kontraktionsfähigkeit. Für die $\text{XinABC}^{-/-}$ Zellen ist nicht nur die Verkürzungsgeschwindigkeit gesteigert, sondern auch die Relaxationsgeschwindigkeit, was die Vermutung der höheren SERCA-Aktivität untermauert. Im Vergleich von Immunmarkierungen der SERCA2a ist in isolierten Herzmuskelzellen kein sichtbarer Unterschied in der Lokalisation zu erkennen. Dies läßt vermuten, dass die gemessenen Unterschiede auf Phospholamban zurückzuführen sind. Phospholamban hemmt die SERCA2a, bzw. phosphoryliertes Phospholamban verliert den hemmenden Einfluss auf die SERCA2a. Eine verminderte Expression von Phospholamban oder ein erhöhter Phosphorylierungsgrad könnten also die verstärkte SERCA2a Aktivität erklären. Hier sind weitere quantitative Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene erforderlich, um zuverlässige Aussagen treffen zu können.

Im Ruhezustand weist ein Sarkomer im Herzmuskel physiologischerweise eine Länge von ca. $1,8 \mu\text{m}$ und einen Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ auf. Isolierte Kardiomyozyten von $\text{XinABC}^{-/-}$ Mäusen zeigen in den vorliegenden Ergebnissen eine signifikant erhöhte Ru-

4. Diskussion

hesarkomerlänge bei allen Stimulationsfrequenzen. Grundsätzlich ist bekannt, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Ruhesarkomerlänge von Herzmuskelzellen hat (POHLMANN et al., 2007). Wenn hier tatsächlich eine verringerte Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen der Auslöser für diese markanten Abweichungen vom Wildtyp ist, kann dies mit einer gesteigerten SERCA Aktivität im Herzen begründet werden. Jedoch geben die Immunfluoreszenzstudien keinen Hinweis auf eine Lokalisations- und folglich einer eventuell damit verbundenen Funktionsstörung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass $\text{XinABC}^{-/-}$ Tiere die tendenziell leistungsfähigeren Herzmuskelzellen besitzen als Wildtypiere. Diese Zellen kontrahieren und relaxieren bei der physiologischen Herzfrequenz schneller, was auch die verminderte Verkürzungsdauer belegt. Ein interessanter Aspekt für die weitere Erforschung wäre eine identische Untersuchung an gealterten isolierten Kardiomyozyten.

4.4. Der Einfluss des Genotyps auf das Kontraktionsverhalten von Skelettmuskeln

Schon zu Beginn der Erforschung von Xin wurde eine Lokalisierung in Herz- und Skelettmuskulatur nachgewiesen (SINN et al., 2002). Es lokalisiert während der Embryonalentwicklung ab E10.0 unter anderem in Glanzstreifen und sich entwickelnden Somiten. Im ausgewachsenen Organismus findet man Xin neben der kardialen Lokalisation in den Glanzstreifen auch im Skelettmuskel in speziellen Zell-Zell-Kontakten, den myotendinösen Übergängen. An diesen Strukturen werden im Muskel entstehende Kräfte auf die Knochen übertragen und spielen folglich für den physiologischen Bewegungsablauf eine unabkömmliche Rolle. Als die $\text{XinABC}^{-/-}$ Mäuse generiert worden sind, war deren Viabilität fraglich, denn die vorhergegangenen Versuche mit Antisenseinhibition störten den kardialen Loopingprozess derartig entscheidend, dass letale Folgen für den Organismus vermutet wurden (WANG et al., 1999). Eine ähnliche Störung durch die vollständige Genablation wurde auch in der Skelettmuskulatur vermutet. Die $\text{XinABC}^{-/-}$ Mäuse entwickeln sich jedoch völlig unbeeinträchtigt hinsichtlich ihres Genotyps, so dass kein sichtbarer Unterschied zu Wildtypmäusen besteht.

Im direkten Umgang während eines Laufbandleistungstrainings war ein signifikant erhöhter Bedarf an Pausen bei den XinABC -defizienten Mäusen feststellbar (MÜLLER, 2007). Auf Grund dessen war eine weitere Absolvierung des Trainings nur nach Anpassung der

4. Diskussion

Laufgeschwindigkeit auf die Bedürfnisse der $XinABC^{-/-}$ Tiere möglich, wobei die Wildtypiere das Anfangspensum problemlos bewältigten. Bei der Evaluierung der Schrittlänge fiel eine signifikante Verkürzung bei $XinABC^{-/-}$ Mäusen auf. Diese Befunde weisen auf eine *in-vivo* eingeschränkte Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur von $XinABC^{-/-}$ Mäusen hin. Allerdings sei hier die geringe Probandenzahl von $n=4$ pro Genotyp in der Studie erwähnt, die keine repräsentative Aussage, vielleicht aber eine Tendenz über das Leistungsvermögen der Tiere erlaubt. Bisher sind aus Studien zur Analyse von Xin bzw. sein Einfluss auf den Skelettmuskel kaum weitere Erkenntnisse bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden präparierte Skelettmuskeln unter elektrischer Feldstimulation auf ihr Kontraktionsvermögen und ihre Belastbarkeit untersucht. Ziel dieser Untersuchung war die Erforschung, ob die Xin defizienz die vorweg vermutete Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur tatsächlich mit sich bringt. Es wurden zielgerichtet Muskeltypen ausgewählt, die eine charakteristische Fasertypenverteilung besitzen. Der *M. soleus* weist eher langsame, der *M. extensor digitalis longus* eher schnelle Muskelfasertypen auf, was den Muskeln ihre jeweiligen Kraft- und Ausdauereigenschaften verleiht. Weiterhin erfüllten die gewählten Muskeln die anatomische Voraussetzung, mit ihren verhältnismäßig langen Insertionssehnen gut in der Apparatur angebracht werden zu können. Zur ersten Einschätzung der Skelettmuskeln wurde die Initialkraft bestimmt, die das Kontraktionsvermögen der jeweiligen Genotypen unter identischen Voraussetzungen vergleicht. Im Rahmen dieser Versuche zeigte der *M. soleus* der $XinABC^{-/-}$ Mäuse eine im Durchschnitt signifikant erhöhte Kraft. Selbst unter tetanischen Reizmustern wies der *M. soleus* der $XinABC^{-/-}$ stetig erhöhte Kräfte auf. Begleitet von einer signifikant erhöhten Kontraktionsgeschwindigkeit offenbart sich auch ein stärkerer Kraftverlust über die Dauer des Ermüdungsprotokolls. Die Ergebnisse für den *M. extensor digitalis communis* brachten kaum genotypspezifische Unterschiede zu Tage. Interessanterweise zeigten die *Mm. solei* und die isolierten Kardiomyozyten der $XinABC^{-/-}$ Mäuse beide eine signifikant erhöhte Kontraktionsgeschwindigkeit. Ob hier ähnliche Mechanismen, wie die bereits für die Kontraktilität der Kardiomyozyten erwähnte erhöhte Calciumkonzentration im SR dafür verantwortlich ist, bleibt weiter, auch immunhistochemisch, zu ergründen.

Die histologische Untersuchung vom Querschnitt von Skelettmuskeln zur Beurteilung der Faserdicken weist keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. Da die Länge der Muskelfasern innerhalb eines Muskels stark variiert und somit nicht alle Fasern von einem Ende des Muskels zum anderen verlaufen, kann es allerdings passieren, dass sich

4. Diskussion

im histologischen Querschnitt sowohl Muskelfasern befinden, die wie gewünscht etwa auf Höhe der Fasermittte angeschnitten sind, als auch Fasern, die an ihren konisch zugespitzten Faserenden getroffen sind. Dadurch kann der Eindruck von Kaliberschwankungen entstehen, die in diesem Fall jedoch physiologisch sind. Als pathologische Kalibervariation wird ein vermehrtes Auftreten von atrophischen und/oder hypertrophischen Fasern bezeichnet (SCHROEDER, 1982).

Auffällig ist, dass das Endomysium bei den $XinABC^{-/-}$ Querschnittpräparaten vergrößert war bzw. weniger Zusammenhalt zeigte. Hinzukommend ist eine erhöhte Brüchigkeit der kryokonservierten Skelettmuskelpräparate der $XinABC^{-/-}$ Mäuse in den histologischen Versuchen beobachtet worden. Vermutlich ist diese mangelhafte Gewebeintegrität auf eine veränderte extrazelluläre Matrix zurückzuführen. Denn wäre diese Brüchigkeit auf Grund von präparationsbedingten Artefakten entstanden, so hätte dies auch bei den Wildtyp-Skelettmuskeln auftreten können.

Bei weiterer histologischer Bewertung der Skelettmuskeln war im *M. soleus* der $XinABC$ -defizienten Mäuse eine auffällig dichte Immunzellinfiltration erkennbar. Grundsätzlich kann bei pathologischen Muskelveränderungen die zelluläre Immunantwort oft verschiedenste Formen annehmen. Eine zelluläre Reaktion kann sowohl innerhalb der Fasern stattfinden als auch im Interstitium. Auf den hier verwendeten Paraffinschnitten ist der Leukozyten-Zelltyp grundsätzlich zwar besser als auf Gefrierschnitten zu erkennen, allerdings bedarf es hier genauerer Spezifikation der Zelltypen. Die zelluläre Infiltration besteht zumeist aus Lymphozyten und Monozyten, die sich in ihrer weiteren Entwicklung zu Makrophagen differenzieren. Nur in sehr seltenen Fällen spielen neutrophile Granulozyten oder Plasmazellen eine Rolle. Besonders in geschädigten oder nekrotischen Fasern stellt sich eine starke zelluläre Reaktion als massive Anhäufung von Entzündungszellen dar. Zelluläre Reaktionen wie die Infiltration durch Entzündungszellen sind nicht spezifisch und werden oft als Zeichen einer echten Muskelentzündung (Myositis) misinterpretiert (DUBOWITZ, 1973). Diese Immunzellinfiltrate sind vermutlich auf Grund von Prozessen des Zelluntergangs, die durch Stress bzw. Belastung entstanden sind, taxiert worden. Bemerkenswert ist jedoch erneut, dass sich dies auf Präparate vom *M. soleus* der $XinABC^{-/-}$ Mäuse beschränkt.

Xin übernimmt offenbar eine wichtige Funktion in Regenerationprozessen nach Muskelverletzungen, denn posttraumatisch wird 12 Stunden danach auf mRNA Basis eine 16fache Hochregulierung beobachtet. Hinzukommend wurde auch eine Lokalisierung in Satellitenzellen beschrieben (HAWKE et al., 2007), was die Beteiligung an Regenerations-

4. Diskussion

prozessen bzw. Reparaturprozessen nahelegt. Im Allgemeinen sind Satellitenzellen als Vorläuferzellen von Myoblasten für die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur verantwortlich. In der Literatur wurde für Xin publiziert, dass es sich anfänglich in einem autoinhibierten Status befindet, bis eine Konformationsänderung, induziert durch eine Bindung an α -Catenin, die Bindungskapazität zu Aktinfilamenten erhöht (CHOI et al., 2007). Dieser Mechanismus würde die Lokalisierung in Glanzstreifen und myotendinösen Übergängen erklären. Im Gegensatz dazu wird durch HUANG et al. (2006) für murines XIRP2 eine Rekrutierung von α -Aktinin an die Z-Scheibe beschrieben, um die Bündelung von Aktin zu bewerkstelligen. Mit diesen Fähigkeiten trägt es maßgeblich zur Herstellung und Integrität des Zytoskeletts bei. Obwohl der genaue Signalweg von Xin nicht genau bekannt ist, legen diese Ergebnisse eine hohe Bedeutung der XIRP Protein Familie für die Muskelreparatur durch Aktinfilamentumbau nahe.

Schlussfolgernd wäre es denkbar, dass $XinABC^{-/-}$ Mäuse von einer gestörten Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur betroffen sind. Allerdings sei hier kritisch erwähnt, dass dies bisher nur in Zellkultur erforscht wurde. Der Sachverhalt muss nicht zwangsläufig die Verhältnisse *in-vivo* widerspiegeln (HAWKE et al., 2007). Weiterhin besteht die Vermutung, dass eine Xin-Defizienz zwar zu einer Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur führt, jedoch kann durch eine Hochregulierung auf molekularer Ebene von XIRP2 das Ausmaß der Beeinträchtigung im Phänotyp deutlich minimiert werden. Dies wird auch durch die Ergebnisse für $XinAB^{-/-}$ von GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) gestützt, in denen ein signifikanter Anstieg auf Expressionslevelbasis von $mXin\beta$ festgestellt wurde. Im Hinblick auf die Zukunft wäre die Generierung einer Doppelmutante von Xin und XIRP2 interessant, um eine Evaluierung des Zusammenspiels der beiden Proteine zu ermöglichen.

4.5. Abschliessende Betrachtung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die $XinABC^{-/-}$ Maus mit Hinblick auf die $XinAB^{-/-}$ Maus zu phänotypisieren bzw. zu vergleichen. In den Ergebnissen dieser Arbeit liegen Hinweise für einen deutlich milderen Phänotyp als erwartet vor. Höchstwahrscheinlich ist dieser vergleichsweise milde Phänotyp auf die funktionelle Kompensation durch das XIRP2 Gen (auch Myomaxin in HUANG et al. (2006) bzw. $mXin\beta$ in GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) genannt) zurückzuführen. Die Expression für dieses Gen wurde für $XinAB^{-/-}$ Mäuse als

4. Diskussion

signifikant erhöht beschrieben, es liegt jedoch in den $XinABC^{-/-}$ Mäusen nicht erhöht vor (OTTEN et al., 2010).

Im Vergleich der Primärstruktur von Xin und XIRP2 ist eine sehr hohe Ähnlichkeit erkennbar. Für beide Proteine wurden ähnliche Bindungsstellen für F-Aktin gezeigt (PACHOLSKY et al., 2004), sowie in bisher unpublizierten Versuchen für β -Catenin, Mena/VASP und FilaminC vorhergesagt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass durch die fehlende Expression von XinC in den $XinABC^{-/-}$ Mäusen ein milderer Phänotyp vorliegt als bei den $XinAB^{-/-}$ Tieren. XinC scheint für die Leistungsfähigkeit des Herzens eher nachteilig zu sein. In der Untersuchung von gesundem und hypertrophen humanem Herzmuskelgewebe wurde die XinC Isoform nur in hypertrophen Proben nachgewiesen (OTTEN et al., 2010). Um jedoch ein besseres Verständnis für diese Ergebnisse zu entwickeln, wird es auch in Zukunft von grosser Bedeutung sein, die Rolle und Aufgaben der Xinisoformen in gesundem und dem erkrankten Herz zu erforschen. Hierbei sollte auch die Identifizierung weiterer Bindungspartner neben FilaminC berücksichtigt werden.

Dennoch ist es weiterhin ungeklärt, warum bei $XinABC$ -defizienten Tieren die Auswirkungen auf das Herz in Entwicklung und Leistungsfähigkeit eher geringgradiger Natur sind im Vergleich zum Xin Knock-down durch Antisenseinhibition in Hühnerembryonen. Eine jüngst durchgeführte Analyse von Genen, die für die XIRPs in Vertebraten kodieren, könnte eine mögliche Ursache für diese Fragestellung zu Tage gebracht haben: Während das Genom von Fischen und Säugtieren 3 bzw. 2 homologe Gene umfasst, wurde im Hühnergenom lediglich ein Gen identifiziert (GROSSKURTH et al., 2008). Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, dass das Fehlen eines zweiten XIRP Gens in Vögeln die funktionelle Kompensation, wie in dieser Dissertation bei Mäusen beobachtet, ausschliesst.

4.6. Ausblick

Kardiomyopathien und ihre Folgen sind eine der Haupttodesursachen kardiovaskulärer Erkrankungen. Trotzdem greifen die heute verfügbaren therapeutischen Optionen erst bei den negativen Folgen, z.B. im Dekompensationsstadium dieser Erkrankung an, anstatt die wirklichen Ursachen der Herzinsuffizienz zu beheben.

Xin ist heutzutage als Protein in vielen Krankheitskomplexen beteiligt. Sowohl bei Reparaturprozessen während der Wundheilung als auch in entwicklungsbiologischen Prozes-

4. Diskussion

sen der Herzentstehung scheint es von grosser Bedeutung. In Studien dieser Dissertation und von GUSTAFSON-WAGNER et al. (2007) wurde durch die Phänotypisierung von zwei verschiedenen Xin-defizienten Mausmodellen die Bedeutung der einzelnen Xin-Isoformen ansatzweise erforscht. Schwerpunktmäßig wurde dabei aus kardiologischen Gesichtspunkten bewertet. Hier sind sowohl histologische als auch funktionelle Abweichungen der Kardiomyozyten aufgetreten, was die Ergründung des molekularen Hintergrundes einzelner untersuchter Parameter wie z.B. Enzymaktivitäten der SERCA2a bzw. eventuelle Signalwege für die Zukunft nahelegt. Auf Grund der Xin-Lokalisierung in myotendinösen Übergängen wurde auch im Rahmen dieser Dissertation zielgerichtet die Leistungsfähigkeit bestimmter Skelettmuskeln untersucht. Funktionelle Anomalien der Xin-defizienten Muskeln sind aus der Untersuchung mit einem isometrischen Kraftwandler bekannt, jedoch ist die Diagnostik auf histologischer bzw. immunhistochemischer Basis, besonders mit Hinblick auf die Fasertypenverteilung, weiterhin aussichtsreich.

Für die Zukunft ist die Generierung eines Xin/XIRP2-defizienten Mausmodells mit anschließender Phänotypisierung von grossem Interesse, denn eine vollständige Defizienz beider Gene eröffnet die Möglichkeit, die Bedeutung und Funktion der einzelnen Isoformen von Xin bzw. XIRP2 präziser zu identifizieren. Es bleibt zunächst auch die Frage offen, in wie weit die Viabilität der Doppelmutante von der Xin/XIRP2-Defizienz beeinflusst ist.

5. Zusammenfassung

Die Phänotypisierung der $XinABC^{-/-}$ Maus Xin ist ein Aktin-bindendes Protein, das in quergestreifter Muskulatur und Herzmuskulatur von Vertebraten exprimiert wird. Es spielt eine entscheidende Rolle in Muskelregeneration und embryonaler Herzmorphogenese. Es ist bekannt, dass eine partielle Xin-Ablation zu einem kardialen Phänotyp mit einer Hypertrophie und interstitiellen Fibrose führt. Mit Hilfe eines Knockoutmodells wurde bei einem Mausstamm eine Deletionsmutante von allen Xin-Isoformen geschaffen. Ziel dieser Studie war es, die Funktion von Xin auf den Phänotyp im Organismus zu definieren bzw. Unterschiede zum partiellen Knockout darzustellen.

$XinABC^{-/-}$ Tiere zeigten hier einen verhältnismäßig milden Phänotyp: Herzgewicht, das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge und Organmaße zeigten keine Abweichung von Wildtypmäusen. In jungen $XinABC^{-/-}$ Mäusen zeigte sich eine verstärkte perivaskuläre Fibrose der Koronargefäße, die sich jedoch im Alter zurückbildet. Auffallende Unterschiede wurden auf ultrastruktureller Ebene an isolierten Kardiomyozyten beobachtet: $XinABC^{-/-}$ zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl von nicht-terminal, längslateral der Zelle lokalisierten Glanzstreifenstrukturen. In Kontraktilitätsuntersuchungen wiesen isolierte Kardiomyozyten ohne elektrische Stimulation eine erhöhte Ruhesarkomerlänge auf. Die Verkürzungsdauer war generell erniedrigt, während eine verringerte Verkürzungsamplitude nur bei niedrigen Stimulationsfrequenzen (0,5 und 1 Hz) gemessen wurde. Bei Stimulationen über 4 Hz kontrahierten und relaxierten die $XinABC^{-/-}$ Zellen signifikant schneller. In Kontraktilitätsuntersuchungen von einzelnen Skelettmuskeln zeigte der M. soleus der $XinABC^{-/-}$ Mäuse eine erhöhte Initialkraft und schnellere Kontraktionsgeschwindigkeiten bei allen applizierten Frequenzen im Vergleich zum M. soleus der Wildtypmäuse. Diese Unterschiede waren beim M. extensor digitalis longus nicht vorhanden. Im Vergleich der beiden Mausmutanten stellte sich für das vollständige Fehlen der Isoformen XinA bis XinC ein verhältnismäßig milderer Phänotyp im Herz heraus als erwartet. Anscheinend hat das noch vorhandene XinC in der partiellen Mutante einen erheblichen Einfluss auf den Hypertrophiegrad der Herzen.

6. Summary - Phenotyping of XinABC-deficient Mice

Xin is an actin-binding protein which is expressed in striated muscle and cardiac muscle of vertebrates. It is implicated to play a crucial role in muscle regeneration and embryonic cardiac morphogenesis. According to an earlier publication, a partial Xin gene ablation leads to hypertrophied hearts and interstitial fibrosis. A mouse model with a full deletion of the Xin gene was generated. Aim of this study was to characterize this mouse model and thus the impact of Xin on the cardiac phenotype and to point out possible differences of both genotypes in contrast.

XinABC^{-/-} mice showed a very mild phenotype: heart weight, heart weight to tibia length ratios and cardiac dimensions were not altered. Increased perivascular fibrosis was only found in hearts of young XinABC^{-/-} mice. Striking differences were revealed in isolated cardiomyocytes: XinABC^{-/-} cells demonstrated a significantly increased number of non-terminally localized ID-like structures. Furthermore, resting sarcomere length was increased, sarcomere shortening, peak shortening at 0,5-1 Hz, and the duration of shortening were decreased and shortening and relengthening velocities were accelerated at frequencies above 4 Hz in XinAB^{-/-} cardiomyocytes. Contractility measurements of isolated skeletal muscles revealed significant differences in initial force and contraction velocity in the M. soleus of XinABC^{-/-} mice at all applied frequencies. This could not be shown for the M. extensor digitorum longus.

Total Xin deficiency leads to topographical ID alterations, premature fibrosis and subtle changes in contractile behaviour; this is a milder cardiac phenotype than that observed in XinAB^{-/-} mice, which still can express XinC. Together with the finding that XinC is detected solely in cardiomyopathic human tissues (OTTEN et al., 2010), it suggests that its expression is responsible for the stronger dominant phenotype in XinAB^{-/-} mice. Furthermore, it hints that XinC may be part of the development of human cardiac hypertrophy.

Literaturverzeichnis

- Alberts, Bray (2002).** *Molecular biology of the cell, 4th edition*, Garland Publishing, Inc. New York and London.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. und Magee, A. I. (2001).** *The cadherin superfamily: diversity in form and function.* J Cell Sci, 114:629–641.
- Ariano, M. A., Armstrong, R. B. und Edgerton, V. R. (1973).** *Hindlimb muscle fiber populations of five mammals.* J Histochem Cytochem, 21:51–55.
- Ayscough, K. R., Drubin, D. G. (1996).** *ACTIN: general principles from studies in yeast.* Annu Rev Cell Dev Biol, 12:129–160.
- Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U. und Reinhard, M. (1999).** *The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation.* J Biol Chem, 274:23549–23557.
- Baumgarten, Georg, Knuefermann, P., Schuhmacher, G., Vervölgyi, V., von Rappard, J., Dreiner, U., Fink, K., Djoufack, C., Hoeft, A., Grohé, C., Knowlton, A. A., Meyer R. (2006).** *Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia.* Shock, 25:43–49.
- Bers, D. M. (2001).** *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, 2. edn.* Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 1:all.
- Bers, D. M. (2002).** *Cardiac excitation-contraction coupling.* Nature, 415:198–205.
- Bers, D. M., Weber, C. R. (2002).** *Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes.* Ann N Y Acad Sci, 976:500–512.
- Bleck, T. (2008).** *Zell-Zell-Verbindungen.* www.wissenschaft-online.de, 2:3. 113

- Borzak, S., Murphy, S., Marsh, J. D. (1991).** *Mechanisms of rate staircase in rat ventricular cells.* Am J Physiol, 260:H884–H892.
- Bowditch, H (1871).** *Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen.* Ber Sächs Ges (Akad) Wiss, 23:652-689.
- Cherepanova, O., Orlova, A. , Galkin, V. E. , van der Ven, P. F. M., Fürst, D. O., Jin, J.-P., Egelman, E. H. (2006).** *Xin-repeats and nebulin-like repeats bind to F-actin in a similar manner.* J Mol Biol, 356:714–723.
- Choi, S., Gustafson-Wagner, E. A., Wang, Q., Harlan, S. M., Sinn, H. W., Lin, J. L.-C., Lin, J. J.-C. (2007).** *The intercalated disk protein, mXina, is capable of interacting with β -catenin and bundling actin filaments.* J Biol Chem, 282:36024–36036.
- Dhein, S., Hammerath, S. B. (2001).** *Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 364:397–408.
- Dhein, S., Krüsemann, K., Schaefer, T. (1999).** *Effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid on the activation and repolarization wavefronts in isolated rabbit hearts.* Br J Pharmacol, 128:1375–1384.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H. (1973).** *Muscle Biopsy: A Modern Approach.* Lehrbuch. London, Philadelphia, W. B. Saunders.
- Duka, A., Schwartz, F., Duka, I., Johns, C., Melista, E., Gavras, I., Gavras, H. (2006).** *A novel gene (Cmya3) induced in the heart by angiotensin II-dependent but not saltdependent hypertension in mice.* Am J Hypertens, 19:275–281.
- Endoh, H., Masao, L. (2004).** *Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance.* Eur J Pharmacol, 500:73–86.
- Eulitz, S. (2005).** *Charakterisierung der Interaktionen von Xin-Repeat Proteinen mit Aktinzytoskelett-assoziierten Proteinen.* Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie, Universität Potsdam.
- Garrod, D., Chidgey, M. (2008).** *Desmosome structure, composition and function.* Biochim Biophys Acta, 1778:572–587.

- Gavin, R. H. (1997).** *Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton.* Int Rev Cytol, 173:207–242.
- Gregorio, C. C., Weber, A. , Bondad, M., Pennise, C. R., Fowler, V. M. (1995).** *Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes.* Nature, 377:83–86.
- Grosskurth, S. E., Bhattacharya, D., Wang, Q., Lin, J. J.-C. (2008).** *Emergence of Xin demarcates a key innovation in heart evolution.* PLoS One, 3:e2857.
- Gustafson-Wagner, E. A, Sinn, H.W., Chen, Y.-L., Wang, D.-Z., Reiter, R. S., Lin, J. L.-C., Yang, B., Williamson, R. A., Chen, J., Lin, C.-I., Lin, J. J.-C. (2007).** *Loss of mXin α , an intercalated disk protein, results in cardiac hypertrophy and cardiomyopathy with conduction defects.,* Am J Physiol, 293:H2680–H2692.
- Hamilton, E. J., Berg, H. M., Easton, C. J., Bakker, A. J. (2006).** *The effect of taurine depletion on the contractile properties and fatigue in fast-twitch skeletal muscle of the mouse.,* Amino Acids, 31:273–278.
- Hartsock, A., Nelson, W. J. (2008).** *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.* Biochim Biophys Acta, 1778:660–669.
- Hasselbach, W., Makinose, M. (1963).** *Über den Mechanismus des Ca²⁺ Transports durch die Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums.,* Biochem Z, 339:94–111.
- Hattori, Y., Toyama, J., Kodama, I. (1991).** *Cytosolic calcium staircase in ventricular myocytes isolated from guinea pigs and rats.* Cardiovasc Res, 25:622–629.
- Hawke, T. J., Atkinson, D. J., Kanatous, S. B., van der Ven, P. F. M., Goetsch, S. C., Garry, D. J. (2007).** *Xin, an actin binding protein, is expressed within muscle satellite cells and newly regenerated skeletal muscle fibers.* Am J Physiol 293:C1636–C1644.
- Hellige, G. B. D., Bretschneider, H. J., Kreuzer H. (1991).** *Pathophysiologie des Menschen.* Lehrbuch. VCH, Weinheim - Basel - Cambridge - New York.

- Herrmann, H., Aebi, U. (2000).** *Intermediate filaments and their associates: multitalented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.* Curr Opin Cell Biol, 12:79–90.
- Hierholzer, K., Schmidt, R. F. (1991).** *Pathophysiologie des Menschen.* Lehrbuch. VCH Edition Medizin.
- Huang, H.-T., Brand, O. M., Mathew, M., Ignatiou, C., Ewen, E. P., McCalmon, S. A., Naya, F. J. (2006).** *Myomaxin is a novel transcriptional target of MEF2A that encodes a Xin-related α -actinin-interacting protein.* J Biol Chem, 281:39370–39379.
- Hunter, J. J., Chien, K. R. (1999).** *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.* N Engl J Med, 341:1276–1283.
- Huxley, H., Hanson, J. (1954).** *Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation.* Nature, 173:973–976.
- Ito, K., Yan, X., Tajima, M., Su, Z., Barry, W. H., Lorell, B. H. (2000).** *Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts.* Circ Res, 87:588–595.
- Jessup, J. A., Westwood, B. M., Chappell, M. C., Groban, L. (2009).** *Dual ACE inhibition and AT1 receptor antagonism improves ventricular lusitropy without affecting cardiac fibrosis in the congenic mRen2. Lewis rat.* Ther Adv Cardiovasc Dis, 3:245–257.
- Kempelmann, H. (2005).** *Der Einfluß von Gelsolin auf die Verkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der Maus.* Dissertation Medizinische Fakultät Universität Bonn.
- Kim, S., Coulombe, P. A. (2007).** *Intermediate filament sca_old's fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm.* Genes Dev, 21:1581–1597.
- Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J., Gertler, F. B. (2003).** *Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration.* Annu Rev Cell Dev Biol, 19:541–564.
- Kumar, N. M., Gilula, N. B. (1996).** *The gap junction communication channel.* Cell, 84:381–388.

- Lai, Y.-J., Chen, Y.-Y., Cheng, C.-P., Lin, J. J.-C., Chudorodova, S. L., Roshchevskaya, I. M., Roshchevsky, M. P., Chen, Y.-C., Lin, C.-I. (2007).** *Changes in ionic currents and reduced conduction velocity in hypertrophied ventricular myocardium of Xlna-deficient mice.* Anadolu Kardiyol Derg, 7 Suppl 1:90–92.
- Liebich, H. J. (2003).** *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.* Lehrbuch. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Linz, K. W., Meyer, R. (2000).** *Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits.* Pflugers Arch, 439:588–599.
- Litjens, S., de Pereda, J. M., Sonnenberg, A. (2006).** *Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes.* Trends Cell Biol, 16:376–383.
- Liu, S., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H. (2000).** *Integrin cytoplasmic domainbinding proteins.* J Cell Sci, 113:3563–3571.
- Lodish, H., Berk, A. (2003).** *Molekulare Zellbiologie.* Lehrbuch. Spektrum Akad. Verl., 5. Auflage.
- Loo, D. T., Kanner, S. B., Aruffo A. (1998).** *Filamin binds to the cytoplasmic domain of the $\beta 1$ -integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction.* J Biol Chem, 273:23304–23312.
- Lynn, R. W., Taylor, E. W. (1971).** *Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.* Biochemistry, 10:4617–4624.
- Maier, L. S., Bers, D. M., Pieske, B. (2000).** *Differences in Ca^{2+} -handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -content in isolated rat and rabbit myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 32:2249–2258.
- Meyer, R (1989).** *Oberflächenstruktur, Membranströme und Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen.* Habilitationsschrift Medizinische Fakultät Universität Bonn.
- Miller, R. J. (1992).** *Voltage-sensitive Ca^{2+} channels.* J Biol Chem, 267:1403–1406.
- Mitic, L. L., Itallie, C. M. V., Anderson, J. M. (2000).** *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins.* Am J Physiol 279:G250– G254.

- Müller, C (2007).** *Die Rolle des Xin Proteins bei der Veränderung der quergestreiften Muskulatur in Mäusen.* Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie, Universität Bonn.
- Nair, R. R., Nair, P. (2001).** *Age-dependent variation in contractility of adult cardiac myocytes.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 33:119–125.
- Niedergerke, R. (1955).** *The staircase phenomenon in the frog's ventricle and the action of calcium.* J Physiol, 128:55P.
- Otey, C. A., Pavalko, F. M., Burridge, K. (1990).** *An interaction between α -actinin and the β 1 integrin subunit in vitro.* J Cell Biol, 111:721–729.
- Otten, Cecile (2009).** *Functional analysis of the xirp genes during zebrafish embryonic muscle development.* Doktorarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Otten, J., van der Ven, P. F. M., Vakeel, P., Eulitz, S., Kirfel, G., Brandau, O., Boesl, M., Schrickel, J. W., Linhart, M., Hayess, K., Naya, F. J., Milting, H., Meyer, R., Fürst, D. O. (2010).** *Complete loss of murine Xin results in a mild cardiac phenotype with altered distribution of intercalated discs.* Cardiovasc Res, 85(4):739–750.
- Pacholsky, D., Vakeel, P., Himmel, M., Löwe, T., Stradal, T., Rottner, K., Fürst, D. O., van der Ven, P. F. M. (2004).** *Xin repeats define a novel actin-binding motif.* J Cell Sci, 117:5257–5268.
- Petroff, M., Vila, G., Palomeque, J., Mattiazzi, A. R. (2003).** *$Na^{(+)}$ - Ca^{2+} exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium.* J Physiol, 550:801–817.
- Pieske, B., Maier, L. S., Bers, D. M., Hasenfuss, G. (1999).** *Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium.* Circ Res, 85:38–46.
- Plastino, J., Olivier, S., Sykes, C. (2004).** *Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion.* Curr Biol, 14:1766–1771.

- Pohlmann, L., Kröger, I., Vignier, N., Schlossarek, S., Krämer, E., Coirault, C., Sultan, K. R., El-Armouche, A., Winegrad, S., Eschenhagen, T., Carrier, L. (2007).** *Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes.* *Circ Res*, 101:928–938.
- Pollard, T. D., Borisy, G. G. (2003).** *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.* *Cell*, 112:453–465.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., Walter, U. (1995).** *The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins.* *EMBO J*, 14:1583–1589.
- Sarmiere, P. D., Bamberg, J. R. (2004).** *Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin.* *J Neurobiol*, 58:103–117.
- Schmidt, A., Hall, M. N. (1998).** *Signaling to the actin cytoskeleton.* *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:305–338.
- Schmidt, R. F., Thews, G. (2000):** *Physiologie des Menschen. Lehrbuch.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Schrader, R., Klinke, S., Silbernagel, J. (1996).** *Das Herz. Lehrbuch.* Thieme Verlag, Stuttgart – New York.
- Schroeder, JM (1982).** *Pathologie der Muskulatur.* Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.
- Sohl, G., Willecke, K., (2004).** *Gap junctions and the connexin protein family.* *Cardiovasc Res*, 62:228–232.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., Hayoz, D. (2004).** *Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions.* *Cell Mol Life Sci*, 61:2614–2623.
- Sinn, H. W., Balsamo, J., Lilien, J., Lin, J. J.-C. (2002).** *Localization of the novel Xin protein to the adherens junction complex in cardiac and skeletal muscle during development.* *Dev Dyn*, 225:1–13.
- Sommer, J., Johnson E.A. (1979).** *The Cardiovascular System, Handbook of Physiology,* American Physiological Society of Bethesda.

- Stuyvers, B. D., McCulloch, A. D., Guo, J., Duff, H. J., ter Keurs, H. E. D. J. (2002).** *Effect of stimulation rate, sarcomere length and Ca^{2+} on force generation by mouse cardiac muscle.* J Physiol, 544:817–830.
- Thews, G., Mutschler, E. (1989).** *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart.
- Thomas, C. (2004).** *Histopathologie kompakt.* Schattauer Verlag. Stuttgart.
- Tiemann, K., Weyer, D., Djoufack, P. C., Ghanem, A., Lewalter, T., Dreiner, U., Meyer, R., Grohe, C., Fink, K. B. (2003).** *Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 284:H464–H474.
- Trotter, J. A., Corbett, K., Avner, B. P. (1981).** *Structure and function of the murine muscle-tendon junction.* Anat Rec, 201:293–302.
- Trotter, J. A. (2002).** *Structure-function considerations of muscle-tendon junctions.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 133:1127–1133.
- Veen, T. A. B. van, van Rijen, H. V. M., Jongsma, H. J. (2006).** *Physiology of cardiovascular gap junctions.* Adv Cardiol, 42:18–40.
- Ven, P. F. M. van der, Ehler, E., Vakeel, P., Eulitz, S., Schenk, J. A., Milting, H., Micheel, B., Fürst, D. O. (2006).** *Unusual splicing events result in distinct *Xin* isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP.* Exp Cell Res, 312:2154–2167.
- Wachsstock, D. H., Wilkins, J. A., Lin, S. (1987).** *Specific interaction of vinculin with alpha-actinin.* Biochem Biophys Res Commun, 146:554–560.
- Walker, M. G. (2001).** *Pharmaceutical target identification by gene expression analysis.* Mini Rev Med Chem, 1:197–205.
- Wang, D. Y., Chae, S.W., Gong, Q. Y., Lee, C. O. (1988).** *Role of *aiNa* in positive force-frequency staircase in guinea pig papillary muscle.* Am J Physiol, 255(6 Pt):C798–C807.
- Wang, D. Z., Reiter, R. S., Lin, J. L., Wang, Q., Williams, H. S., Krob, S. L., Schultheiss, T. M., Evans, S., Lin, J. J. (1999).** *Requirement of a novel gene, *Xin*, in cardiac morphogenesis.* Development, 126:1281–1294.

Literaturverzeichnis

Winder, S. J., Ayscough, K. R. (2005). *Actin-binding proteins.* J Cell Sci, 118:651–654.

Yamaguchi, M., Robson, R. M., Stromer, M. H. (1983). *Evidence for actin involvement in cardiac Z-lines and Z-line analogues.* J Cell Biol, 96:435–442.

Yano, K., Zarain-Herzberg, A. (1994). *Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties.* Mol Cell Biochem, 135:61–70.

A. Messwerttabellen

Parameter	Junge Wildtyp (n=41)	Junge XinABC ^{-/-} (n=41)	Alte Wildtyp (n=31)	Alte XinABC ^{-/-} (n=31)
Herzgewicht [mg]	220.21±45.57	206.98±43.03	268.73±56.08	242.61±83.09
Körpergewicht [g]	23.25±2.78	22.71±2.62	47.63±16.86	35.56±5.22
Tibiallänge [mm]	17.84±0.74	18.66±4.23	18.87±0.49	19.55±1
HW/TL [mg/mm]	12.31±2.29	11.06±3.23	14.28±3.25	12.37±3.85
HW/BW [mg/g]	9.43±1.37	9.60±1.42	5.87±1.41	6.79±1.85

Tabelle A.1.: Körperbasisdaten von jungen und alten Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen im Vergleich, Signifikanzen in Fettdruck dargestellt

Parameter	Wildtyp	XinABC ^{-/-}	Anzahl
Jung (12 W.)	38.8±4.2	77.23±12.02	n=13
Alt (1,5 J.)	68.52±14.17	73.88±14.92	n=9

Tabelle A.2.: Relativer Bindegewebsanteil an Gesamtfläche des Koronargefäßlumens in [%] von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen, Signifikanzen in Fettdruck dargestellt

Septumdicke Position im Herz	junge WT (n=10)	junge XinABC ^{-/-} (n=10)	alte WT (n=10)	alte XinABC ^{-/-} (n=10)
Position 1 [µm]	380±24.9	420±120	440.1±24.9	590.9±169.9
Position 2 [µm]	278±110	320±120	359.7±162.1	449.1±92.8
Position 3 [µm]	420±98	425±126	511.7±121.6	573.9±204.5

Tabelle A.3.: Herzseptumdicke an verschiedenen Schnittpositionen von jungen (ca. 12 W.) und alten (ca. 1.5 J.) Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen im Vergleich

A. Messwerttabellen

Ventrikeldicke Position im Herz	junge WT (n=10)	junge XinABC ^{-/-} (n=10)	alte WT (n=10)	alte XinABC ^{-/-} (n=10)
Position 1 [μm]	474.8±65.4	429.1±135.8	557.8±65.4	515.1±135.8
Position 2 [μm]	394.3±42.9	393.4±38.1	465.8±50.4	468.3±30
Position 3 [μm]	409.6±56.5	399.9±150	500.1±59.7	485.9±212

Tabelle A.4.: Ventrikelwanddicke an verschiedenen Schnittpositionen von jungen (ca. 12 W.) und alten (ca. 1.5 J.) Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen im Vergleich

Parameter	Wildtyp	XinABC ^{-/-}	Anzahl Zellen
Breite [μm]	20.18±0.18	19,61±0.18	n=70
Länge [μm]	100.34±0.52	105.62±0.62	n=70

Tabelle A.5.: Zellgrößen von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen, Signifikanzen in Fettdruck dargestellt

Lokalisation	Wildtyp	XinABC ^{-/-}
terminal	3.739±1.255	4.155±1.424
lateral	4.174±2.312	8.103±2.995
gesamt	7.913±2.632	12.259±3.630
Anzahl Zellen	n=46	n=58

Tabelle A.6.: Verteilung der terminal- und längslateral-gelegenen Glanzstreifenmarkierungen auf Immunfluoreszenzbasis in isolierten Kardiomyozyten, Signifikanzen sind in Fettdruck markiert

A. Messwerttabellen

Parameter	Frequenz	XinABC ^{-/-}			Wildtyp		
		Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl
Peaksizes	0,5	0,082	0,041	74	0,102	0,05	74
	1	0,063	0,033	67	0,08	0,046	79
	2	0,064	0,039	66	0,07	0,034	69
	4	0,088	0,047	55	0,087	0,039	54
	6	0,099	0,041	37	0,102	0,04	58
	8	0,099	0,034	53	0,088	0,03	65
	10	0,085	0,028	49	0,083	0,032	42
Baseline	0,5	1,848	0,036	74	1,827	0,063	74
	1	1,841	0,037	61	1,826	0,061	79
	2	1,837	0,039	64	1,817	0,063	69
	4	1,83	0,041	53	1,81	0,069	54
	6	1,82	0,042	40	1,814	0,076	58
	8	1,83	0,044	53	1,811	0,075	49
	10	1,831	0,043	49	1,792	0,087	42
T-bI90%	0,5	0,104	0,035	66	0,14	0,073	74
	1	0,108	0,053	61	0,147	0,073	79
	2	0,101	0,043	64	0,13	0,056	69
	4	0,092	0,034	53	0,106	0,027	54
	6	0,082	0,022	42	0,1	0,014	58
	8	0,074	0,02	53	0,087	0,016	65
	10	0,069	0,015	49	0,081	0,012	42
S contract	0,5	-4,364	2,048	74	-4,409	2	74
	1	-3,611	1,596	69	-3,573	1,928	79
	2	-3,821	1,861	66	-3,39	1,503	69
	4	-4,753	2,134	53	-4,358	2,052	54
	6	-5,39	2,399	42	-4,023	1,544	58
	8	-5,236	2,512	53	-3,779	1,531	65
	10	-4,397	1,843	49	-3,112	1,242	42
S relax	0,5	2,305	1,538	66	2,417	1,503	74
	1	1,821	1,064	61	1,831	1,496	79
	2	2,027	1,298	64	1,761	1,371	69
	4	2,852	1,829	53	2,528	1,768	54
	6	3,365	1,832	126	2,43	1,436	58
	8	3,35	2,585	53	2,271	1,451	65
	10	2,738	1,616	49	1,898	0,942	42

Tabelle A.7.: Messwerte der Kontraktilitätsmessungen an isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen

Parameter	M. soleus				M. extensor digitalis longus			
	Wildtyp		XinABC ^{-/-}		Wildtyp		XinABC ^{-/-}	
Initialkraft [mN]	16,33±8,11	n=8	25,93±6,46	n=8	43,84±9,68	n=8	35,19±14,71	n=8
Residualkraft [mN]	9,75±5,27	n=8	10,36±5,15	n=8	13,71±8,97	n=5	13,30±8,54	n=9

Tabelle A.8.: Messwerte der Initialkraft und Residualkraftmessungen an Skelettmuskeln mit einem isometrischen Kraftwandler von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen

A. Messwerttabellen

Frequenz	M. soleus				M. extensor digitalis longus			
	Wildtyp		XinABC ^{-/-}		Wildtyp		XinABC ^{-/-}	
10 Hz	27,28±10,91	n=8	46,46±15,14	n=10	37,96±12,54	n=5	32,12±14,97	n=9
20 Hz	50,28±17,73	n=8	69,96±23,05	n=10	52,88±20,94	n=5	42,83±22,99	n=9
40 Hz	65,99±22,41	n=8	91,74±29,30	n=10	89,03±19,90	n=5	71,12±31,60	n=9
80 Hz	74,15±25,28	n=8	98,54±37,71	n=8	118,12±29,40	n=5	102,66±44,71	n=9
125 Hz	-	-	-	-	116,13±37,69	n=5	122,80±51,55	n=5

Tabelle A.9.: Messwerte des Tetanisierungsprotokolls in [mN] an Skelettmuskeln mit einem isometrischen Kraftwandler von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen

Parameter	M. soleus				M. extensor digitalis longus			
	Wildtyp		XinABC ^{-/-}		Wildtyp		XinABC ^{-/-}	
Restkraft	58,04±17	n=8	45,70±10	n=10	37,73±8	n=5	35,79±16	n=9
Kraftverlust	41,95±17	n=8	54,29±10	n=10	62,26±8	n=5	64,20±16	n=9
v-Contract	378,72±190	n=8	688,38±251	n=8	1782,59±365	n=4	1514,00±635	n=9

Tabelle A.10.: Messwerte des Ermüdungsprotokolls an Skelettmuskeln mit einem isometrischen Kraftwandler von Wildtyp und XinABC^{-/-} Mäusen; Restkraft und Kraftverlust in [%] und v-contract in [mN/ms] angegeben

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
Cx43	anti Kaninchen	1:100	AG Willecke (Uni Bonn)
Desmoplakin	anti Maus	1:250	AG Ullrich (Uni Stuttgart)
SERCA2a	anti Kaninchen	1:100	Fa. Abcam
Titin (T12)	anti Maus	1:10	AG Fürst (Uni Bonn)
FilaminC	anti Maus	1:1	AG Fürst (Uni Bonn)
Cadherin	anti Kaninchen	1:100	AG Fürst (Uni Bonn)
VASP	anti Kaninchen	1:1000	AG Ullrich (Uni Stuttgart)
Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
Cy2	anti Kaninchen	1:500	AG Fürst (Uni Bonn)
Cy5	IgG1 anti Maus	1:500	AG Fürst (Uni Bonn)
Fitc	anti Kaninchen	1:200	AG Fürst (Uni Bonn)
TXR	IgG1 anti Maus	1:200	AG Fürst (Uni Bonn)
Alexa488	IgG1 anti Maus	1:500	AG Fürst (Uni Bonn)

Tabelle A.11.: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunmarkierungen

B. Publikationsverzeichnis

Complete loss of murine Xin results in a mild cardiac phenotype with altered distribution of intercalated discs

Julia Otten; Peter F.M. van der Ven; Padmanabhan Vakeel; Stefan Eulitz; Gregor Kirfel; Oliver Brandau; Michael Boesl; Jan W. Schrickel; Markus Linhart; Katrin Hayess; Francisco J. Naya; Hendrik Milting; Rainer Meyer; Dieter O. Fuerst Cardiovascular Research 2010, 85, 739-750

C. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die Ermöglichung der Arbeit, sowie die stets freundliche und engagierte Betreuung, die Unterstützung und die vielen kritischen und anregenden Diskussionen während der gesamten Zeit.

Frau Prof. Dr. Heike Tönhardt für die Bereitschaft, diese Dissertation extern zu betreuen und den fachübergreifenden Austausch.

Herrn Prof. Dr. Dieter O. Fürst und seinen Mitarbeitern für die freundliche Betreuung, die aufschlussreichen Diskussionen und die Einarbeitung in die Histologie am Institut für Zellbiologie.

Prof Dr. Fleischmann und Dr. Daniela Wenzel danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, die tatkräftige Unterstützung sowie den interessanten Austausch rund um das Thema Skelettmuskelkontraktilität.

Frau Hanne Bock für die hervorragende, selbständige technische Unterstützung und die vielen anregenden und aufmunternden Gespräche.

Der gesamten Arbeitsgruppe Prof. Fürst für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die bereichernde Zusammenarbeit und interessante Zeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Frau Ute Kukulies, Frau Cilli Hennes sowie den anderen technischen Mitarbeitern im Institut für Zellbiologie für die tatkräftige Unterstützung, aufmunternde Worte und jeden Menge Spaß, die erheblich zum Arbeitsalltag beigetragen haben.

Frau Dr. Katharina Stranzenbach und Herrn Stefan Eulitz, ohne die so mancher Büroalltag wirklich grau geblieben wäre, besonders möchte ich Frau Anja Linnemann danken, die immer mit kritischen Gedanken beim Schreiben dieser Arbeit ein offenes Ohr für mich hatte und für sportlichen Freizeitausgleich gesorgt hat.

Danken möchte ich besonders meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und auch stets mit aufmunternden Worten weitergeholfen haben. Ohne sie säße ich nicht hier. Meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, Geduld und Interesse an meiner Arbeit während der gesamten Zeit.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank meinem Mann Tom, der mich auf dem gesamten Weg liebevoll unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

D. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Siegburg, den 24.6.2011

Julia Otten