

# Charakterisierung der Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) im murinen Herzen

---

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität zu Berlin

vorgelegt von

Ulrike Lisewski  
aus Berlin

Juni, 2009

Dissertation angefertigt am  
Max-Delbrück-Centrum  
Neuromuskuläre und kardiovaskuläre Zellbiologie  
Arbeitsgruppe geleitet von Professor Dr. Michael Gotthardt  
Robert-Rössle-Str. 10  
13122 Berlin-Buch

Die Dissertation wurde angefertigt vom 01.02.2006-09.06.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gotthardt

Disputation am : 7.10.2009

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Lage und Funktion des Herzens.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Der Herzzyklus.....	4
2.1.2	Aufbau und Funktion des Reizleitungssystems.....	4
2.1.3	Elektromechanische Kopplung.....	9
<b>2.2</b>	<b>Das Elektrokardiogramm .....</b>	<b>11</b>
2.2.1	Der Sinusrhythmus.....	11
2.2.2	Atrio-ventrikuläre Überleitungsstörungen.....	12
2.2.3	Sinu-atriale Blockierungen .....	14
<b>2.3</b>	<b>Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR).....</b>	<b>15</b>
2.3.1	Das CAR-Gen und CAR-Splicevarianten .....	15
2.3.2	Die CAR-Proteinstruktur .....	17
2.3.3	Subzelluläre Lokalisation und Interaktionspartner .....	18
2.3.4	Gewebespezifische und entwicklungsregulierte CAR-Expression.....	19
2.3.5	Expression von CAR bei Herzerkrankungen .....	21
<b>2.4</b>	<b>Zielstellung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Chemikalien .....	23
3.1.2	Geräte .....	23
3.1.3	Enzyme.....	24
3.1.4	Kits .....	24
3.1.5	Antikörper .....	25
3.1.6	Oligonukleotide.....	26
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.2.1	Tierexperimentelle Praxis .....	28
3.2.2	Kardiologische Phänotypisierung.....	30
3.2.3	Nukleinsäureanalytik .....	33
3.2.4	Proteinchemische Methoden.....	37
3.2.5	Zellkulturtechniken .....	39
3.2.6	Histologie .....	40
3.2.7	Apoptosebestimmung .....	46
3.2.8	Proliferationsanalyse.....	46
3.2.9	Statistik.....	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiermodelle zur Untersuchung von CAR im adulten und embryonalen Herzen.....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Verifizierung des $\alpha$ MHC-CAR-KO-Modells .....	48
4.1.2	Verifizierung des induzierbaren MCM-CAR-KO-Modells .....	50

<b>4.2</b>	<b>CAR ist für eine normale Herzentwicklung essentiell .....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Bei CAR-defizienten Embryonen ist die atrio-ventrikuläre Erregungsüberleitung verlängert.....	52
4.2.2	CAR-defiziente Embryonen haben eine normal entwickelte Herzstruktur .....	53
4.2.3	CAR-Defizienz führt im embryonalen Herzen weder zur Apoptose noch zu erhöhter Proliferation. ....	55
<b>4.3</b>	<b>Kardiologische Phänotypisierung der adulten CAR-defizienten Tiere.....</b>	<b>56</b>
4.3.1	Die Entwicklung einer Kardiomyopathie bei CAR-Defizienz ist altersabhängig.....	56
4.3.2	CAR-Deletion in der adulten Maus führt zu einem AV-Block .....	58
4.3.3	Die Funktion von Sinus- und AV-Knoten ist in CAR-KO-Tieren beeinträchtigt.....	61
<b>4.4</b>	<b>Strukturelle und mechanistische Analyse der CAR-defizienten adulten Tieren.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	CAR im AV-Knoten .....	65
4.4.2	Eine CAR-Defizienz führt zu einer veränderten AV-Knoten-Morphologie .....	66
4.4.3	Das Ventrikelmyokard ist nach CAR-Deletion strukturell unverändert.....	67
4.4.4	CAR-Deletion führt zu einer veränderten Expression von Connexinen .....	69
4.4.5	Bei CAR-defizienten Tieren ist die Anzahl der Cx45-Gap Junctions verringert.....	72
4.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	74
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
5.1	Die herzspezifische CAR-Deletion führt zur embryonalen Letalität.....	77
5.2	Bei einer CAR-Defizienz bleibt die Struktur des embryonalen Herzens erhalten.....	79
5.3	In CAR-defizienten embryonalen Herzen ist die Erregungsleitung von Vorhöfen zu Ventrikeln verzögert.....	80
5.4	CAR-Defizienz führt im adulten Myokard zur Beeinträchtigung des Sinusknotens und des AV-Knotens.....	81
5.5	Der elektrophysiologische Phänotyp resultiert aus einem Einfluss von CAR auf Connexine.....	82
5.6	Die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie ist altersabhängig .....	88
5.7	Weiterführende Studien .....	89
5.7.1	CAR bei Herzrhythmusstörungen.....	89
5.7.2	CAR in der DCM-Pathogenese .....	90
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>108</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>

## 2 Einleitung

### 2.1 Lage und Funktion des Herzens

Das Herz (*Cor*) ist ein Hohlmuskel, welcher sich retrosternal im Thorax befindet und als zentrales Organ des kardiovaskulären Systems die Blutversorgung des Körpers steuert. An das Herz grenzen beidseitig lateral die Lungenflügel, dorsal die Aorta sowie der Ösophagus, kranial die großen Stammgefäße und kaudal das Diaphragma (Waldeyer, 2002).

Das Herz gliedert sich in eine rechte und linke Herzhälfte, die durch das Septum voneinander getrennt sind. Jede Herzhälfte besteht aus einem Vorhof (*Atrium dextrum* bzw. *Atrium sinistrum*) und einer Herzkammer (*Ventriculus dexter* bzw. *Ventriculus sinister*), welche durch eine segelförmige Herzklappe funktionell voneinander separiert sind. Im rechten Herzen wird diese Aufgabe durch die Trikuspidalklappe, im linken Herzen durch die Mitralklappe übernommen (Abb. 1). Die Verbindung der Herzklappen über Sehnenfäden mit den Ventrikelwänden gewährleistet den Verschluss der Herzkammern nach jeder Kontraktion, so dass ein Zurückfließen des Blutes in die Vorhöfe unterbunden wird. Durch den bei der Kammererschaffung entstehenden Unterdruck im Ventrikel werden die Klappen geöffnet und das Blut strömt durch die Sogwirkung aus den Vorhöfen in die Ventrikel (Waldeyer, 2002; Schmidt et al., 2004).

Das venöse Blut des Körpers wird durch die obere und untere Hohlvene, *Vena cava superior* und *inferior*, in den rechten Vorhof geleitet und strömt anschließend in die rechte Herzkammer. Von der rechten Herzkammer wird das Blut in den Lungenkreislauf über den *Truncus pulmonalis*, welcher sich in die *Arteria pulmonalis dextra* und *sinistra* verzweigt, ausgestoßen. Das von dort mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt durch die Lungenvenen, *Venea pulmonales*, über den linken Vorhof in den linken Ventrikel. Dieser pumpt das sauerstoffreiche Blut über die Aorta in den Körperkreislauf. Sowohl der *Truncus pulmonalis* als auch die Aorta sind von den Herzkammern durch taschenförmige Gefäßklappen (Pulmonal- und Aortenklappe) getrennt. Zusammen mit den Ventrikelklappen liegen diese in der Ventil- bzw. Klappenebene des Herzens (Waldeyer, 2002; Schmidt et al., 2004).

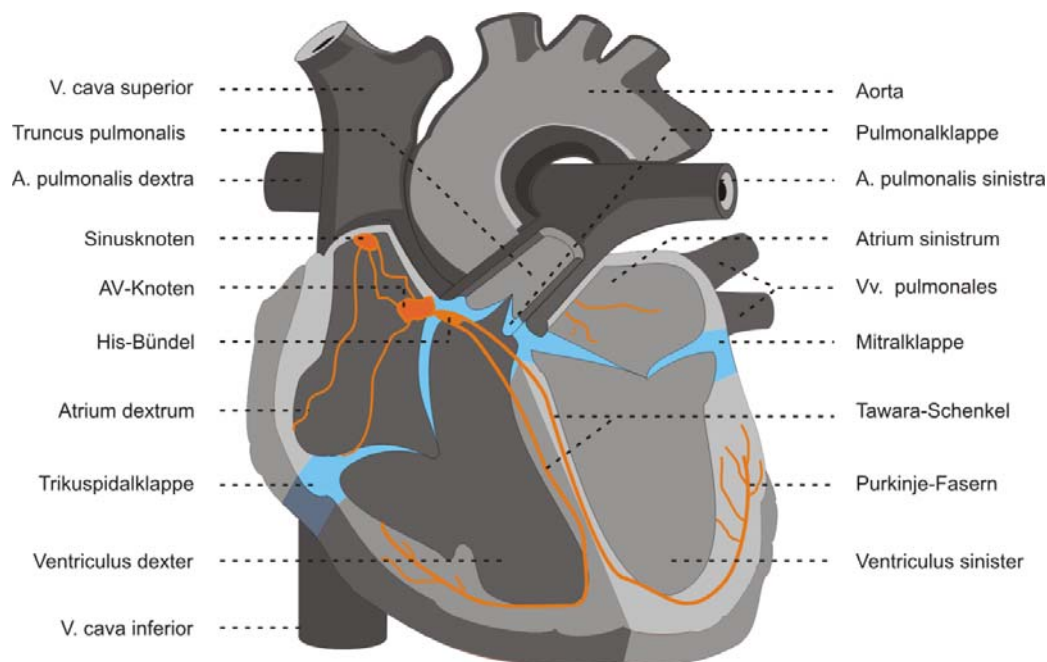
### **2.1.1 Der Herzzyklus**

Vorhöfe und Herzkammern arbeiten in einem ständigen Wechsel von Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole). Um eine optimale Auswurfleistung zu erzielen, sind Systole und Diastole der Atria und Ventrikel zeitlich exakt aufeinander abgestimmt. So kontrahiert die Vorhofmuskulatur vor der Kammermuskulatur, so dass am Ende der Kammerdiastole auch aktiv Blut in die Kammer gepresst wird. Während der Kammerdiastole erweitern sich die Ventrikel durch Erschlaffung der Ventrikelmuskulatur und es entsteht eine Sogwirkung, die das Blut durch das Öffnen der Herzklappen aus den Vorhöfen in die Kammern fließen lässt. Die Füllungsphase ist mit dem Schließen der Klappen beendet. Die Kammersystole unterteilt sich in eine Anspannungsphase und Austreibungsphase. In der Anspannungsphase kontrahiert die Ventrikelmuskulatur, während sich in der anschließenden Austreibungsphase der intraventrikuläre Druck so erhöht, dass dies zum Öffnen der Aorten- bzw. Pulmonalklappe führt und das Blut in den Körper- bzw. Lungenkreislauf ausgestoßen wird. Mit Schließen der Taschenklappen ist diese Phase beendet, und die Diastole der Kammer beginnt (Schmidt et al., 2004).

### **2.1.2 Aufbau und Funktion des Reizleitungssystems**

Das Reizleitungssystem des Herzens (auch als Erregungsleitungssystem bezeichnet) steuert die Koordination der Herzkontraktion und sorgt für eine schnelle Erregungsweiterleitung, so dass Systole und Diastole korrekt ablaufen. Es besteht aus spezialisierten Herzmuskelzellen, so genannten Schrittmacherzellen, welche autonom erregbar sind (myogene Erregung). Das Erregungsleitungssystem setzt sich in einer hierarchischen Ordnung aus mehreren Strukturelementen zusammen. Fällt ein übergeordnetes Erregungszentrum aus, so kann die hierarchisch untergeordnete Komponente als aktueller Schrittmacher fungieren. Bei einem gesunden Herzen hat die Erregung des Herzens ihren Ursprung im Sinusknoten, der durch seine hohe Erregungseigenfrequenz hierarchisch am höchsten steht und daher die Funktion des primären Schrittmachers übernimmt. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof an der Mündung der oberen Hohlvene (Waldeyer, 2002; Schuster und Trappe, 2005). Der von ihm gebildete elektrische Impuls wird auf die atrialen Herzmuskelzellen übergeleitet (sinuatriale Erregungsleitung) und breitet sich über die beiden Vorhöfe aus (intraatriale Erregungsausbreitung). Die ihm untergeordnete Komponente ist der Atrio-Ventrikuläre-Knoten (AV-Knoten), welcher eine elektrische Verbindung der Vorhöfe mit den Herzkammern gewährleistet (atrio-ventrikuläre Überleitung) und sich im rechten atrialen

Septum an der Grenze zum ventrikulären Septum befindet. Der AV-Knoten geht über in das His-Bündel, welches sich im Ventrikelseptum in den rechten, in den vorderen linken sowie den hinteren linken Tawara-Schenkel aufteilt. Diese Bestandteile verlaufen vorrangig an der Innenschicht der Herzwand (Endokard) und sind entscheidend für die Erregung der Kammermuskulatur (intraventrikuläre Erregungsausbreitung). Über die Purkinje-Fasern, welche sich ausgehend von den Tawara-Schenkeln verzweigen, werden die elektrischen Signale auf benachbarte Herzmuskelzellen (Kardiomyocyten) übertragen. Die elektrische interzelluläre Kopplung der Kardiomyozyten wird durch direkte Zell-Zell-Kontakte, den Gap Junctions, vermittelt (Waldeyer, 2002; Schuster und Trappe, 2005).



**Abb. 1: Anatomie des Herzens und des Erregungsleitungssystems (orange dargestellt) in der Frontalansicht (adaptiert aus: A. Waldeyer, A. Mayet, Anatomie des Menschen (II). De Gruyter, 16. Aufl., Berlin, 1993).** Jede Herzhälfte besteht aus einem Vorhof (*Atrium dextrum* bzw. *Atrium sinistrum*) und einer Herzkammer (*Ventriculus dexter* bzw. *Ventriculus sinister*). Das venöse Blut des Körpers wird durch die obere und untere Hohlvene, *Vena cava superior* und *inferior*, in den rechten Vorhof geleitet. Von der rechten Herzkammer wird das Blut in den Lungenkreislauf über den *Truncus pulmonalis*, welcher sich in die *Arteria pulmonalis dextra* und *sinistra* verzweigt, ausgestoßen. Das sauerstoffreiche Blut gelangt durch die Lungenvenen, *Venea pulmonales*, über den linken Vorhof in den linken Ventrikel und wird über die Aorta in den Körperkreislauf ausgeworfen. In blau dargestellt sind die Trikuspidalklappe, die Mitralklappe und die Pulmonalklappe. Das Reizleitungssystem besteht aus dem Sinusknoten, dem Atrio-Ventrikulären-Knoten (AV-Knoten), dem His-Bündel, den Tawara-Schenkeln und den Purkinje-Fasern.

### **2.1.2.1 Die nervale Kontrolle von Erregungsbildung und Erregungsleitung**

Das Erregungsleitungssystem unterliegt der stetigen Kontrolle durch sympathische und parasympathische Nerven des vegetativen Nervensystems. Dadurch wird die Schlagfrequenz, Kontraktionskraft und Erregungsleitungsgeschwindigkeit des Herzens an die jeweiligen körperlichen Anforderungen angepasst. Die Innervation des Herzens erfolgt durch Transmitter der sympathischen Nervenfasern, Noradrenalin und Adrenalin, sowie durch den parasympathischen Botenstoff Acetylcholin. Die sympathische Wirkung auf Schrittmacherzellen ist positiv chronotrop, d.h. es kommt zu einer Frequenzsteigerung der Spontandepolarisation. Zusätzlich wird die Erregungsleitung, besonders im AV-Knoten, gesteigert (positiv dromotrop). Die Signalkaskade führt über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren über einen G-Protein gekoppelten Signalweg zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Acetylcholin, als parasympathischer Transmitter, hat antagonistische Wirkung. Durch inhibitorische G-Proteine bewirkt es eine Hemmung der Adenylatzyklase. Zum einen wirkt es auf den Sinusknoten negativ chronotrop, zum anderen negativ dromotrop auf die AV-Knotenzellen, was insgesamt zu einer Erregungsverlangsamung führt (Schmidt et al., 2004).

### **2.1.2.2 Die Erregung von Kardiomyozyten des Erregungsleitungssystems**

Bei den Zellen des Erregungsleitungssystems, den Schrittmacherzellen, handelt es sich um spezialisierte Kardiomyozyten. Die Schrittmacherzellen weisen kein stabiles Ruhepotential auf und besitzen daher die Fähigkeit spontan zu depolarisieren. Ihr Ruhepotential von -60 mV ist geringer als jenes der ventrikulären Kardiomyozyten (Abb. 2A). Der Einwärtsgleichrichterstrom der Kaliumionen, der in Arbeitsmyokardzellen für das Entstehen des Ruhepotentials verantwortlich ist, existiert in diesen Zellen nicht (Schmidt et al., 2004).

Für das Entstehen des Aktionspotentials sind mehrere einwärts gerichtete Ionenströme verantwortlich, welche in Arbeitsmyokardzellen nicht vorhanden sind. Für den Beginn der Depolarisation ist ein Schrittmacherstrom über HCN-Kanäle (*hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated channel*) bestimmend, welcher vor allem durch Natriumionen getragen wird. Außerdem werden nach Erreichen des Schwellenwertes von ca. -40 mV Calciumkanäle vom L-Typ aktiviert, über welche ein langsamer Calciumeinstrom zur ersten Phase des Aktionspotentials führt. Das Membranpotential kann einen Wert bis zu +20 mV annehmen. Die Depolarisation weist im Vergleich zu den Myokardzellen kein Plateau auf. Die anschließende Aktivierung eines verzögerten Kaliumeinstroms führt zu einer langsamen Repolarisation und Inaktivierung der L-Typ-Kanäle (Pfreundschuh und Schölmerich, 2004).



Eine Übersicht über Kanäle, die im AV-Knoten des murinen Herzens identifiziert wurden gibt die Tab. 1.

**Tab. 1: Expression von Kanälen im murinen AV-Knoten.**

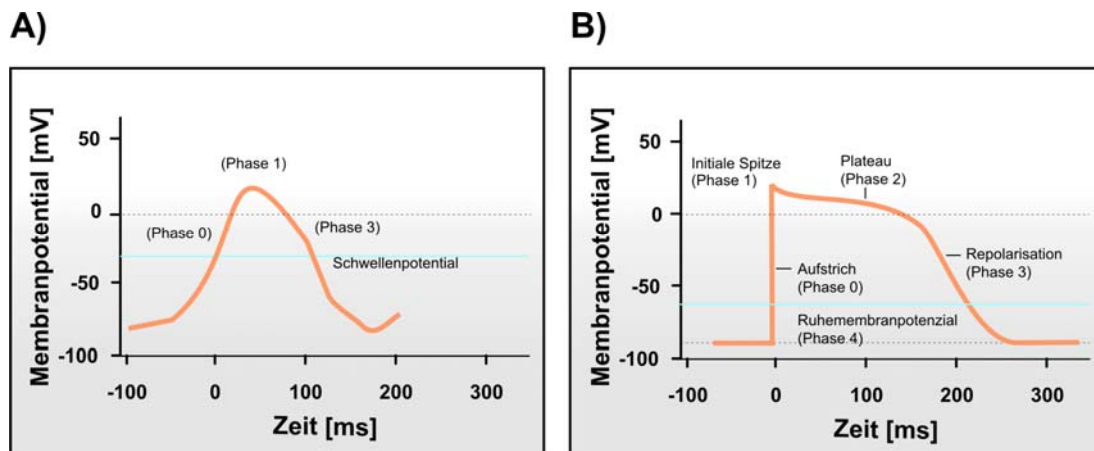
<b>Kaliumkanäle</b>			
<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Methode</b>	
KCN6	Kv1.6	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
KCNAB1	Kvβ1	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
KCNE1	MinK	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
KCNJ2	Kir2.1	TMO, IF	(Dobrzynski et al., 2006)
KCNJ11	Kir6.2	TMO, IF	(Dobrzynski et al., 2006)
KCNN2	SK2	Mikroelektronen, IF	(Zhang et al., 2008)
<b>Calciumkanäle</b>			
<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Methode</b>	
CACNA1G	Cav3.1	IF	(Mangoni et al., 2006)
CACNA2D2	Cavα2δ2	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
CACNG7	Cavγ7	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
<b>Natriumkanäle</b>			
<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Methode</b>	
SCN5A	Nav1.5	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
SCN3A	Nav1.3	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
SCN1A	Nav1.1	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
SCN9A	Nav1.7	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)
<b>Andere</b>			
<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Methode</b>	
HCN4	HCN4	IF	(Yamamoto et al., 2006)
SLC8A1	NCX1	(KT) <i>Real time</i> -PCR	(Marionneau et al., 2005)

IF: Immunfluoreszenz; KT: Koch-Triangel; TMO: Transgener Modellorganismus

### 2.1.2.3 Erregung der Arbeitsmyokardzelle

Im Gegensatz zu Schrittmacherzellen benötigen Muskelzellen des Arbeitsmyokards einen elektrischen Impuls für die Bildung eines Aktionspotentials. Ohne diesen verbleiben sie in einem Ruhezustand, bei welchem das Membranpotential bei ca. -90 mV liegt (Abb. 2B). Das Ruhemembranpotential entspricht etwa dem Nernst-Gleichgewichtspotential für Kaliumionen. Ursache für dieses Potential ist eine hohe Leitfähigkeit von Kaliumkanälen, die nach einer Membrandepolarisation ab -70 mV inaktiviert werden. Der Strom der Kaliumionen durch diese Kanäle wird als K<sup>+</sup>-Einwärtsgleichrichter bezeichnet. Kardiomyozyten sind über Gap Junctions elektrisch miteinander gekoppelt. Durch Ladungverschiebungen an der

Membran benachbarter Zellen wird beim Erreichen des Schwellenwertes ein Aktionspotential ausgelöst. Der  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter wird durch das Schließen der Kaliumkanäle gestoppt, und es beginnt die Phase 0 (Aufstrich) des Aktionspotentials durch einen schnellen  $Na^+$ -Einstrom. Das Membranpotential strebt in dieser Phase dem Gleichgewichtspotential für  $Na^+$ -Ionen (+60 mV) entgegen. Der Einstrom von  $Na^+$ -Ionen erfolgt vorrangig durch spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle, welche ab Werten von -40 mV geschlossen werden. Das Aktionspotential erreicht auf Grund dessen nur einen *overshoot* von +20 mV. Anschließend tritt die Zelle in eine beginnende Repolarisation ein, welche Phase 1 des Aktionspotentials darstellt. Ursache für die partielle Repolarisation ist ein transienter Ausstrom von Kalium- und Chloridionen (Pfreundschuh und Schölmerich, 2004; Schmidt et al., 2004).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Verlaufes eines Aktionspotentials **A)** einer Schrittmacherzelle und **B)** einer Herzmuskelzelle (adaptiert aus: Schmidt, Lang, Thews; Physiologie des Menschen; Springer Verlag, Heidelberg, 2005). Im Vergleich zu Ventrikelmyozyten weisen Schrittmacherzellen kein stabiles Ruhemembranpotential (Phase 4) und keine lange Depolarisationsphase (Phase 2) auf, weshalb ihr Aktionspotential schneller beendet ist. Die Phase 0 des Aktionspotentials ist bei Schrittmacherzellen deutlich länger.

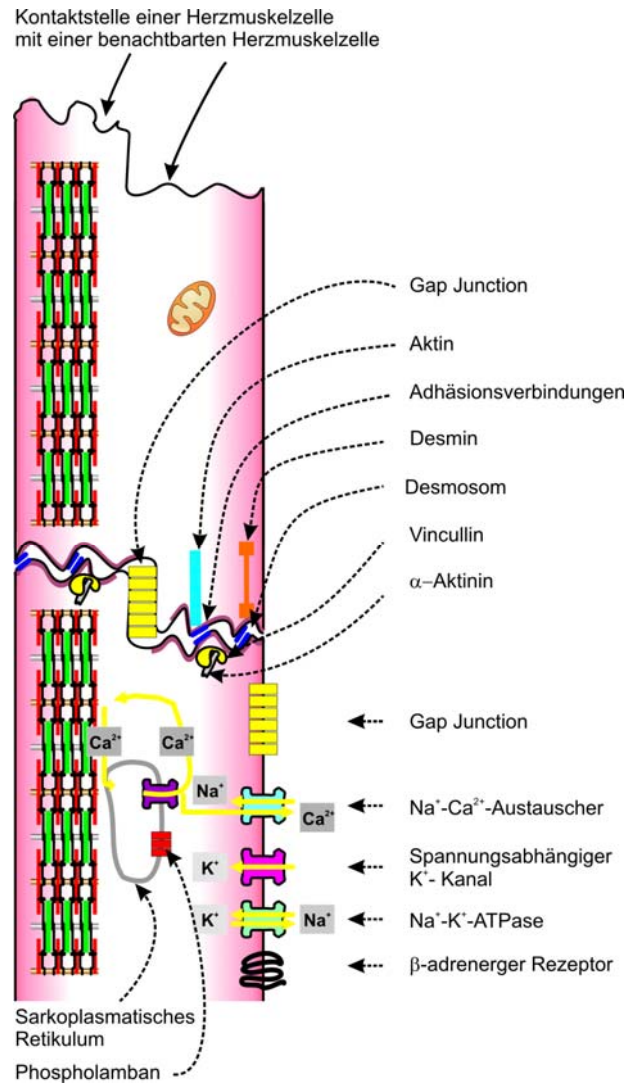
Das Aktionspotential der Arbeitsmyokardzelle ist sehr lang. Eine Besonderheit ist die zweite Phase, welche eine 200 bis 400 ms andauernde Depolarisation darstellt und als Plateau verläuft. Das Membranpotential liegt in dieser Phase bei 0 mV. Bestimmend für diese Phase ist ein langsamer Calciumeinstrom, der auf die lange Öffnungszeit von spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanälen beruht. In dieser Phase ist die Zelle absolut refraktär. Nach Inaktivierung schließt sich die Phase 3, die endgültige Repolarisation, an. An der Repolarisation beteiligt ist ein  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter, welcher erst in der depolarisierten Zelle und mit zeitlicher Verzögerung aktiviert wird. Phase 4 des Aktionspotentials ist die

Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials, welches durch den  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter bestimmt wird (Pfreundschuh und Schölmerich, 2004; Schmidt et al., 2004).

### **2.1.3 Elektromechanische Kopplung**

Die Muskulatur des Herzens ist eine gesonderte Form der quergestreiften Muskulatur, die aus den Herzmuskelzellen, den Kardiomyozyten, aufgebaut ist. Herzmuskelzellen sind über besondere Kontaktstellen, den Glanzstreifen (*Intercalated discs*) miteinander verbunden (Abb. 3). Die Glanzstreifen beinhalten mehrere Zellkontaktformen, wie Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und Gap Junctions (Welsch, 2006). Adhäsionsverbindungen bestehen aus Proteinen der Cadherinfamilie, welche Aktinfilamente mit Ankerproteinen, wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, Vinkulin und  $\alpha$ -Aktinin verbinden (Li et al., 2006). Zusammen mit den Desmosomen, welche die Intermediärfilamente (hauptsächlich Desmin) mit der Zelloberfläche verbinden, sind beide für die Vermittlung der kontraktile Kraft auf die benachbarte Zelle verantwortlich (Li et al., 2006). Desmosomen stellen sehr enge Zellkontakte dar. Die Hauptproteine sind Desmoglein und Desmocollin, welche ebenfalls zu den Cadherinen gezählt werden und mit den Ankerproteinen Desmoplakin und Plakoglobin interagieren (Gallicano et al., 1998). Gap Junctions sind Transmembrankanäle (Nexus), die die Zytoplasmen benachbarter Zellen direkt verbinden und die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten gewährleisten. Sie sind hauptsächlich in den Glanzstreifen lokalisiert, verbinden aber auch die Zellen lateral miteinander (Peters, 2006). Durch Gap Junctions wird der Austausch von verschiedenen Ionen und anderen kleinen Molekülen bis 1 kDa gewährleistet. Darunter fallen auch wichtige Botenstoffe wie Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) oder cAMP. Ein Gap Junction-Kanal wird von zwei Hemikanälen (auch Connexon) gebildet. Jeder Hemikanal ist Bestandteil einer Zelle und ist aus sechs Connexinmolekülen aufgebaut (Duffy et al., 2006). Im Herzen existieren unterschiedliche Connexine (Cx). Cx40 ist vorrangig in den Vorhöfen und dem Reizleitungssystem, vor allem im His-Bündel und in den Purkinje-Fasern vorhanden. Cx45 ist das dominierende Connexin im Sinusknoten und AV-Knoten. In diesen Strukturelementen konnte auch ein weiteres Connexin, Cx30.2, nachgewiesen werden (Kreuzberg et al., 2006). Cx43 ist besonders hoch außerhalb des Erregungsleitungssystems im atrialen und ventrikulären Myokard exprimiert (Duffy et al., 2006). Je nach Cx-Isoform werden die Eigenschaften der Gap Junctions bestimmt. So gehören Cx45 und Cx30.2 zu den Kanälen mit geringer Leitfähigkeit, während Cx40 und Cx43 Kanäle mit hoher Leitfähigkeit bilden, um eine schnelle Erregung und Kontraktion der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten zu gewährleisten. Cx45 und Cx30.2 sorgen vor allem im AV-Knoten für

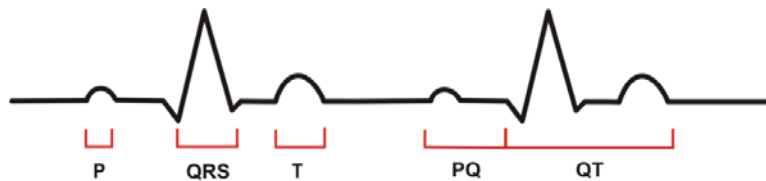
eine verlangsamte Erregungsleitung, so dass eine retrograde Erregung ausgehend von den Kammern auf die Vorhöfe unterbunden wird (Kreuzberg et al., 2006).



**Abb. 3: Die Zellkontakte der Kardiomyozyten (adaptiert aus: Welsch; Lehrbuch für Histologie; Elsevier Urban & Fischer, München, 2005).** Der Glanzstreifen (*Intercalated disc*) ist die interzelluläre Verbindung der Kardiomyozyten und besteht aus transversalen und longitudinalen Komponenten, die stufenförmig angeordnet sind. Zu den transversalen Komponenten gehören Desmosomen, welche mit Desmin verbunden sind, und Adhäsionsverbindungen, die über α-Aktinin und Vincullin die Aktinfilamente verankern. Zu den longitudinalen Komponenten tragen hauptsächlich Gap Junctions bei.

## 2.2 Das Elektrokardiogramm

Durch ein Elektrokardiogramm können über die Körperoberfläche die elektrischen Aktionen des Herzmuskels aufgezeichnet werden. Im Oberflächen-EKG werden Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung durch EKG-Zacken oder Wellen repräsentiert (Abb. 4). Die P-Welle entspricht der Erregungsausbreitung im Vorhof (intraatrial). Das PQ-Intervall ist die Ausbreitungszeit der Erregung von den Vorhöfen zu den Herzkammern (atrio-ventrikulär). Der darauf folgende QRS-Komplex zeigt die Erregung der Herzkammer an (intraventrikulär). Durch die ST-Strecke wird der Beginn der Kammererregung angezeigt, während die T-Welle das Ende der ventrikulären Erregung repräsentiert. Die QT-Zeit ergibt sich aus der gesamten intraventrikulären Erregungsdauer. Sie ist herzfrequenzabhängig und wird deshalb oft als relative QT-Zeit angegeben. Aus dem Oberflächen-EKG sind die elektrischen Vorgänge im Sinusknoten sowie der sinu-atrialen Erregungsüberleitung nicht ersichtlich. Zur Beurteilung der Sinusknotenfunktion müssen zusätzliche invasive elektrophysiologische Untersuchungen zur Diagnostik herangezogen werden. Ebenfalls nicht aus dem EKG erkennbar ist die Rückbildung der Erregung in den Vorhöfen, da diese zeitlich mit der Depolarisation der Ventrikel zusammenfällt und vom QRS-Komplex überlagert wird (Schuster und Trappe, 2005).



**Abb. 4: Komponenten des Oberflächen-EKGs.** Die P-Welle entspricht der intraatrialen Erregungsausbreitung. Der QRS-Komplex zeigt die Erregung der Herzkammer an. Die T-Welle repräsentiert das Ende der ventrikulären Erregung. Das PQ-Intervall ist die Ausbreitungszeit der Erregung von den Vorhöfen zu den Herzkammern (atrio-ventrikulär). Die QT-Zeit ergibt sich aus der gesamten, intraventrikulären Erregungsdauer.

### 2.2.1 Der Sinusrhythmus

Der normale Rhythmus des Herzens ist der normofrequente Sinusrhythmus, welcher elektrographisch folgende Kriterien erfüllt: normal konfigurierte und regelmäßige P-Wellen, konstante P-Wellenabstände und einen zu jeder P-Welle dazugehörenden QRS-Komplex (Abb. 5A) (Schuster and Trappe, 2005).

## **2.2.2 Atrio-ventrikuläre Überleitungsstörungen**

Atrio-ventrikuläre (AV) Überleitungsstörungen sind Störungen der Erregungsüberleitung von den Vorhöfen (atrial) auf die Kammern (ventrikulär) und werden als AV-Blockierungen bezeichnet. Sie entstehen durch eine Funktionsstörung im AV-Knoten oder im His-Bündel. Nach dem Ausmaß der Blockierung werden drei Schweregrade unterschieden (Benson, 2004).

### **2.2.2.1 Der AV-Block 1. Grades**

Zur Analyse von Überleitungsstörungen zwischen Vorhöfen und Herzkammern wird das aus dem EKG ermittelte PQ-Intervall herangezogen. Eine Verlängerung des PQ-Intervalls ist ein Hinweis auf eine verzögerte Erregungsüberleitung von Vorhöfen zu den Kammern. Wird jedoch jede Vorhoferregung auf die Kammern übertragen und ist ausschließlich die PQ-Zeit verlängert, so wird diese Veränderung als ein AV-Block 1. Grades beschrieben (Abb. 5B) (Aase et al., 2001; Pfreundschuh und Schölmerich, 2004).

### **2.2.2.2 Der AV-Block 2. Grades**

Beim dem AV-Block 2. Grades wird nicht jede Vorhofaktion auf die Kammern übertragen. Es werden bei diesem Grad der Erkrankung zwei Haupttypen unterschieden (Silverman et al., 2004).

#### **2.2.2.2.1 Typ I (Mobitz I oder Wenckebach-Typ)**

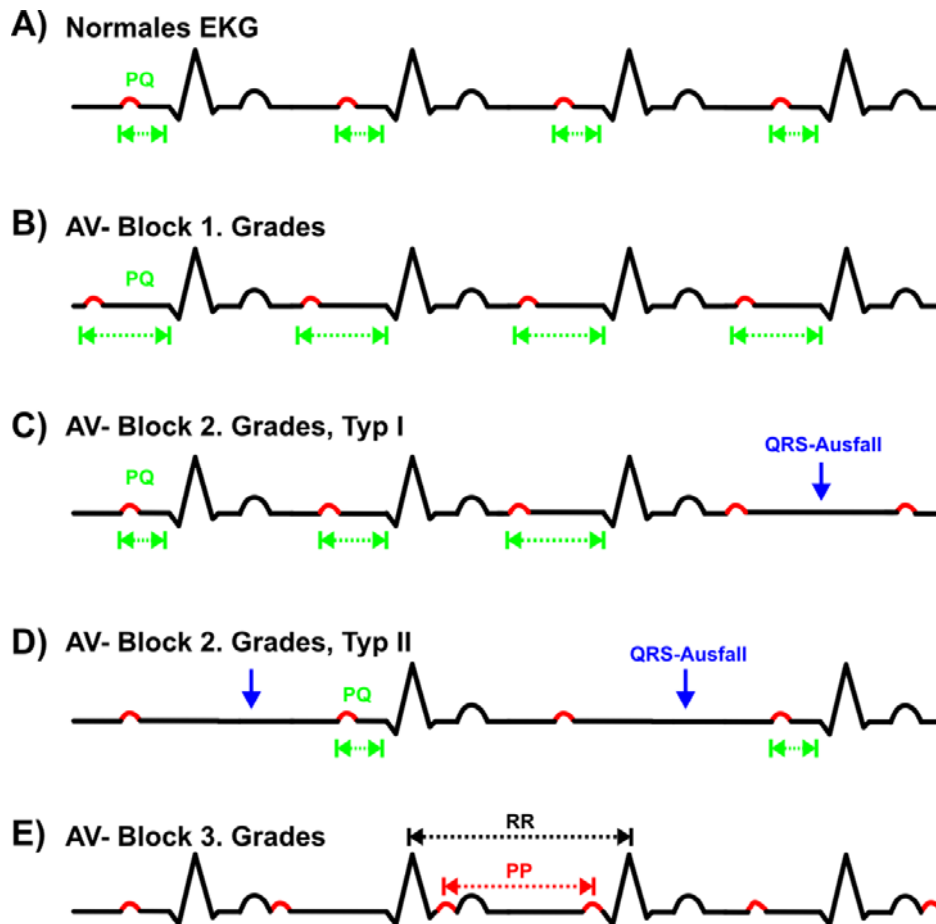
Der Typ I des AV-Blockes ist dadurch gekennzeichnet, dass sich ausgehend von einer normalen PQ-Zeit mit jeder folgenden Herzerregung das PQ-Intervall progressiv verlängert bis die Vorhoferregung nicht mehr auf die Kammern übertragen wird. Im EKG wird dies ersichtlich durch eine vereinzelte P-Welle auf die kein QRS-Komplex folgt (Abb. 5C) (Pfreundschuh und Schölmerich, 2004).

#### **2.2.2.2.2 Typ II (Mobitz II)**

Fällt in regelmäßigen Abständen ein QRS-Komplex aus ohne vorherige, stetige Zunahme des PQ-Intervalls, so handelt es sich um einen AV-Block des Typs II. Abhängig davon, welche Überleitung regelmäßig ausfällt, entsteht ein x:1 Vorhof-Kammer-Rhythmus. Würde z.B. jede zweite Überleitung ausfallen, so würde es sich um einen 2:1 Rhythmus handeln (Abb. 5D). Die Unterbrechung der AV-Überleitung betrifft zum einen den AV-Knoten selbst, zum anderen den His-Bündel-Bereich. Erstere wird dann als proximaler totaler AV-Block definiert (Silverman et al., 2004).

### 2.2.2.3 Der AV-Block 3. Grades (Totaler AV-Block)

Bei diesem Grad der Blockierung handelt es sich um eine komplette Dissoziation von Vorhof- und Kammererregung. P-Wellen und QRS-Komplexe weisen keine zeitliche Kopplung auf. Ein PQ-Intervall ist demzufolge nicht mehr ermittelbar. Für das Überleben notwendig ist das Einspringen eines tertiären Schrittmachers zur Gewährleistung der Kammererregung (Abb. 5E) (Kasahara et al., 2001; Schuster and Trappe, 2005).



**Abb. 5: EKG und seine Veränderungen bei einem AV-Block.** A) Normales EKG bei Sinusrhythmus. B) Beim AV-Block 1° wird jede P-Welle von einem QRS-Komplex gefolgt, jedoch ist die PQ-Zeit verlängert. C) Beim AV-Block 2°, Typ I verlängert sich die PQ-Zeit zunehmend bis ein QRS-Komplex ausfällt. D) Beispiel-EKG eines 2:1 AV-Blocks 2°, Typ II. Zwei P-Wellen werden von einem QRS-Komplex gefolgt. E) Beim AV-Block 3° schlagen die Vorhöfe (P-Wellen) und Kammern (QRS-Komplexe) regelmäßig, aber unabhängig voneinander. Die P-Welle wird nicht mehr von einem QRS-Komplex gefolgt. Die Abstände der P-Wellen (PP) sind deutlich kürzer, als die Abstände der R-Zacken (RR). Die Vorhoffrequenz ist damit höher, als die Frequenz der Kammererregung.

### 2.2.3 Sinu-atriale Blockierungen

Bei sinu-atrialen (SA) Blockierungen entstehen zwar Impulse im Sinusknoten, aber die sinu-atriale Erregungsleitung ist insofern unterbrochen, dass nicht jeder Sinusknotenimpuls übergeleitet wird. Intermittierend kommt es zum P-Wellen-Ausfall (Schuster und Trappe, 2005).

SA-Blockierungen werden analog den AV-Blockierungen in drei Schweregrade unterteilt. Der erste Grad der Blockierung kann dabei elektrokardiographisch nicht diagnostiziert werden. Der SA-Block 2° wird in einen Typ I (Wenckebach Typ) und einen Typ II (Mobitz) unterschieden. Beim Typ I kommt es zu einer progredienten Verzögerung der sinu-atrialen Überleitung bis zum Ausfall einer Vorhoferregung, während beim Typ II fehlende P-Wellen ohne Erregungsleitungsverzögerung charakteristisch sind. Ein SA-Block 3° ist durch eine vollständige Unterbrechung der sinu-atrialen Überleitung gekennzeichnet. Ebenso typisch für diesen Grad der Blockierung ist das Auftreten sekundärer oder tertiärer Automatiezentren mit verbreiterten QRS-Komplexen (Schuster und Trappe, 2005).

Als Syndrom des kranken Sinusknotens (Sick-Sinus-Syndrom, SSS) wird eine symptomatische Sinusknotenfunktionsstörung bezeichnet. Eine Sonderform ist das Brady-Tachykardie-Syndrom (Brady-Tachy-Syndrom), bei dem es zwischenzeitlich zu tachykarden Phasen kommt (Lei et al., 2008).

Falls kein Sinuspuls gebildet oder übergeleitet wird und auch kein anderes Erregungsbildungszentrum im Vorhof einspringt, kann ein Ersatzrhythmus, der seinen Ursprung in der AV-junktionalen Region hat, einspringen. Die Vorhöfe werden nunmehr ausgehend von dieser Region retrograd erregt. Häufig entstehen AV-junktionale Ersatzrhythmen bei SA-Blockierungen 3. Grades oder einem Sinusknotenstillstand. Für das EKG typisch sind schmale QRS-Komplexe und veränderte P-Wellen, deren Auftreten und Form von der atrialen, retrograden Leitung beeinflusst werden. Fällt die retrograde Erregung zeitlich mit der Kammererregung zusammen, so finden sich keine P-Wellen im EKG, da diese im QRS-Komplex verborgen sind. In anderen Fällen sind die P-Wellen, die retrograd auf die Vorhöfe geleitet werden, am Ende der QRS-Komplexe assoziiert (Yu et al., 1996; Schuster und Trappe, 2005).



## **2.3 Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR)**

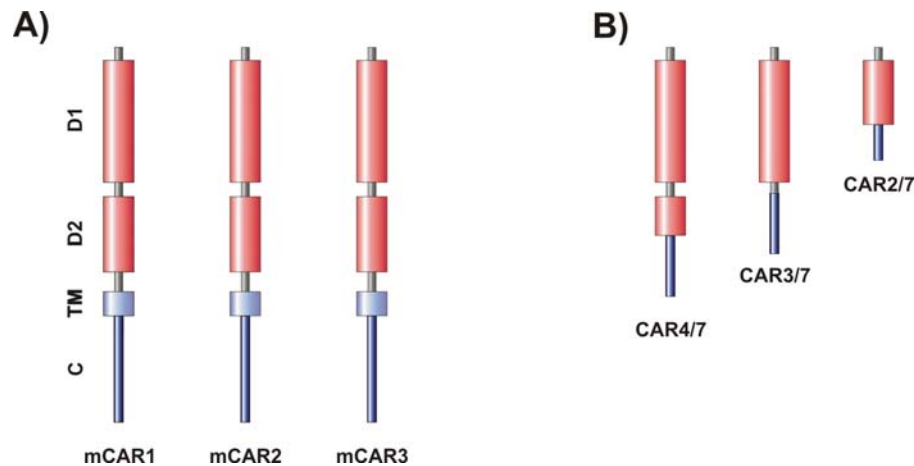
Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wurde zunächst als Rezeptor für Coxsackie B-Viren (CVB) und einige Adenoviren entdeckt (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997; Carson et al., 1997). CAR wird zu der CTX (*cortical thymocyte marker protein, Xenopus*)-Proteinfamilie gezählt. CTX-Proteine gehen auf einen Rezeptor zurück, der zunächst auf Froschthymocyten entdeckt wurde (Chrétien et al., 1998). Viele Mitglieder der CTX-Familie sind in der interzellulären Kontaktbildung involviert und eine große Anzahl von ihnen ist in Tight Junction lokalisiert. Tight Junction erhalten die Barrierefunktion von Epithelien aufrecht und kontrollieren somit den Durchfluss von Ionen und Makromolekülen. Vertreter dieser Familie sind CLMP, ESAM (Raschperger et al., 2004) und einige der JAM- (*junctional adhesion molecules*) Proteine (Mandell et al., 2007). Von dieser Familie ist ebenso JAM-A als ein Virusrezeptor identifiziert worden (Barton et al., 2001).

CAR ist ein einzelsträngiges Typ I Transmembranprotein, welches zwei extrazelluläre, immunglobulinähnliche (Ig) Domänen besitzt und zur Immunglobulinsuperfamilie gezählt wird (Dorner et al., 2005). Durch Dimerisierung der N-terminalen extrazellulären Domäne kann CAR homotypische Zellverbindungen in transfizierten Zellen (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001). bilden. Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor konnte bereits in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. So weist CAR beim Menschen (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997), Mäusen (Bergelson et al., 1998), Hunden (Fechner et al., 1999), Schweinen (Fechner et al., 1999), Rindern (Thoelen et al., 2001) und Fischen (Petrella et al., 2002) eine hoch konservierte Sequenz auf.

### **2.3.1 Das CAR-Gen und CAR-Splicevarianten**

Das murine CAR-Gen wurde auf den distalen Teil des Chromosoms 16 gemappt. Es besteht aus wenigstens 8 Exons mit Intron-Exon-Grenzen ähnlich dem humanen CAR. Die Struktur des humanen CAR-Gens weist hohe Ähnlichkeiten zum murinen CAR-Gen auf und wurde auf das Chromosom 21 gemappt (Bowles et al., 1999). Von den membranständigen Rezeptorformen sind zwei Spliceformen (CAR1 und CAR2) bekannt, die sowohl im humanen als auch im murinen Organismus nachgewiesen wurden und sich ausschließlich in der Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden (Chen et al., 2003). Exon 1-6 des CAR-Gens codieren für die extrazellulären und transmembranen Domänen. Für die murinen Splicevarianten codiert das Exon 7 für die zytoplasmatische Domäne von mCAR1, für mCAR2 codiert das Exon 8. RT-PCR-Analyse (Reverse Transkriptase-PCR) spricht dafür,

dass die Transkription 141 bis 161 Nukleotide vor dem ATG-Translationsstartcodon beginnt (Chen et al., 2003). Eine weitere Splicevariante (mCAR3) konnte bisher nur im murinen Herzen nachgewiesen werden (Coyne und Bergelson 2005). Alle Splicevarianten unterscheiden sich ausschließlich in der zytoplasmatischen Domäne (Abb. 6A).



**Abb. 6: CAR und bekannte CAR-Splicevarianten.** A) Der membranständige Rezeptor besteht aus zwei extrazellulären Ig-Domänen (D1 und D2), einem transmembranen alpha-helikalen Abschnitt (TM) und der zytoplasmatischen Domäne (C), welche bei mCAR1, mCAR2 und mCAR3 unterschiedlich ist. Die löslichen Formen von CAR resultieren aus Splicen zwischen den Exons A) 2 und 7 (CAR2/7), B) 3 und 7 (CAR3/7) sowie C) 4 und 7 (CAR4/7). Diese variieren in der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne und unterscheiden sich von den membranständigen Rezeptorformen durch die fehlende transmembrane und veränderte zytoplasmatische Domäne.

Wie bei vielen Proteinen der Immunglobulinsuperfamilie, die ebenfalls von Viren als Rezeptoren benutzt werden, konnten auch lösliche Formen von CAR nachgewiesen werden (Dorner et al., 2004). So enthält Pleuralexsudat von Patienten mit malignen Atemwegserkrankungen lösliches CAR-Protein, welches nachweislich eine adenovirale Gentherapie inhibiert (Bernal et al., 2002). Es konnten bisher drei lösliche Formen von CAR durch RT-PCR identifiziert werden, welche durch alternatives Splicen zwischen den Exons 2 und 7 (CAR2/7), 3 und 7 (CAR3/7) sowie 4 und 7 (CAR4/7) erzeugt werden (Abb. 6B). Diese variieren in der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne und unterscheiden sich von den membranständigen Rezeptorformen durch die fehlende Transmembrandomäne und durch eine veränderte zytoplasmatische Domäne (Dorner et al., 2004). Jede Isoform kann eine CVB3-Infektion von HeLa-Zellen inhibieren, indem die lösliche Rezeptorform sowohl die extrazelluläre Domäne von CAR auf der Zelloberfläche als auch das CVB3-Capsid bindet (Dorner et al., 2004). Ob lösliches CAR letztlich durch die proteolytische Spaltung des

membranständigen Rezeptors oder durch alternatives Splicen nach einer *de novo* Synthese entsteht, konnte bisher noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Die Expression und Funktion der löslichen CAR-Rezeptorformen sind bisher nur unzureichend charakterisiert. Die *in vitro* Ergebnisse deuten an, dass lösliches CAR durch seine antiviralen Eigenschaften eine protektive Rolle im Organismus übernimmt (Dorner et al., 2004).

### **2.3.2 Die CAR-Proteinstruktur**

Die CAR-cDNA kodiert für ein 365 Aminosäuren (AS) langes Protein. Die Abspaltung eines Signalpeptids von 19 AS führt aber zu einem verkürzten 346-AS-Protein. Glykosylierung von CAR führt dazu, dass das Protein nach SDS-Gelelektrophorese bei 46 kDa, anstatt bei dem vorausgesagten Molekulargewicht von 38 kDa, zu detektieren ist. CAR ist ein Transmembranprotein vom Typ I, welches eine einzelne Membrandomäne, zwei extrazelluläre Domänen (D1 und D2) und eine zytoplasmatische Domäne enthält (Coyne et al., 2005; Freimuth et al., 2008).

Die extrazellulären Domänen sind 216 Aminosäuren lang und sind vom Immunglobulinähnlichen Typ. Die D1-Domäne zeigt eine typische Beta-Faltblattstruktur, während die D2-Domäne einige strukturelle Abweichungen aufweist (Jiang et al., 2004). Durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass D2 zusätzlich zu den  $\beta$ -Faltblatt-Motiven eine  $\alpha$ -Helix (Reste 185-192) enthält, welche an der Bindung möglicher Interaktionspartner beteiligt sein könnte (Jiang und Caffrey, 2007). Beide Domänen weisen potentielle N-Glykosylierungsstellen auf. Veränderungen in dem Glykosylierungsmuster haben keine Auswirkungen auf die subzelluläre Rezeptorlokalisierung. Allerdings beeinflusst besonders die Glykosylierung der D2-Domäne die adenovirale Bindung und Infektion (Excoffon et al., 2007). Die D1-Domäne ist sowohl Bindestelle für Adenoviren als auch für CVB. Aber beide Viren erkennen unterschiedliche Sequenzen innerhalb dieser Domäne (He et al., 2000). Röntgenstrukturanalysen zeigen eine Dimerisierung sowohl zwischen den D1-Domänen zweier CAR-Moleküle als auch zwischen der D1-Domäne und Adeno- bzw. Coxsackieviren (Jiang et al., 2004). Auch in Lösung konnten D1-Domänen als Dimer nachgewiesen werden. Die Dissoziationskonstante von 16  $\mu$ M (van Raaij et al., 2000) ist denen anderer Adhäsionsmoleküle ähnlich (Atkins et al., 1999; van der Merwe et al., 1994). Diese biochemischen und strukturellen Untersuchungen der D1-Domäne deuten stark daraufhin, dass CAR die Fähigkeit besitzt homotypische Zellkontakte auszubilden. Die zytoplasmatische Domäne von CAR ist für die Bindung von Adenoviren und CVB nicht

essentiell (Wang und Bergelson, 1999), sondern vermittelt Signale, die unter anderem das Zellwachstum beeinflussen (Excoffon et al., 2004) oder die subzelluläre Lokalisation von CAR bestimmen (Cohen et al., 2001). In Zellkultorexperimenten, in denen CAR-Varianten exprimiert wurden, die eine verkürzte C-Domäne aufwiesen und Veränderungen in den Signalsequenzen hatten, konnte auch eine veränderte Lokalisation der CAR-Mutanten in der Epithelzellmembran beobachtet werden (Cohen et al., 2001). 2006 konnte das fehlerhafte Targeting auch *in vivo* gezeigt werden (Raschperger et al., 2006).

Die zytoplasmatische Domäne (C-terminale Domäne) beinhaltet zwei membrannahe Cysteine (259 und 260) deren S-Acetylierung notwendig für eine stabile Verankerung von CAR in der Zellmembran ist. So konnte beobachtet werden, dass CAR auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nur gering exprimiert wird. Eine fehlende Acetylierung könnte von diesen Zellen als ein möglicher Mechanismus genutzt werden, um eine Verankerung von CAR in der Zellmembran zu verhindern. Allerdings hat ein fehlender Palmitylrest keine Auswirkung auf die Virusbindung an den Rezeptor (van't Hof und Crystal, 2002). Die zytoplasmatische Domäne von CAR weist in den letzten vier Aminosäuren ein PDZ (PSD-95/DigA/ZO-1)-Bindungsmotiv (Lim et al., 2008) mit der Sequenz GSIV auf (Excoffon et al., 2004). Das C-terminale Motiv XS/TXV (wobei X jede Aminosäure sein kann) repräsentiert die Klasse 1 der PDZ-Bindungsmotive für Interaktionen mit PDZ-Domänen Proteinen (Sheng und Sala, 2001). Die Deletion des PDZ-Bindungsmotivs hat keinen Effekt auf die Adenovirusbindung, jedoch zeigte sich ein verlangsamtes Wachstum dieser Zellen (Excoffon et al., 2004).

### **2.3.3 Subzelluläre Lokalisation und Interaktionspartner**

CAR ist Bestandteil der Tight Junction in Epithelzellen (Cohen et al., 2001). Die zytoplasmatische Domäne von CAR enthält potentielle Signalsequenzen zur Interaktion mit Tyrosinkinasen und ein hydrophobes Bindungsmotiv, welches für die Interaktion mit PDZ-Proteinen, wie ZO-1 (Zonula occludens) oder anderen Membran-assoziierten-Guanylat-Kinase (MAGUK)-Proteinen bekannt ist (González-Mariscal et al., 2000). Außerdem reguliert die C-terminale Domäne die Lokalisation von CAR in der Zelle (Cohen et al., 2001). Mittels konfokaler Mikroskopie und Dünnschichtelektronenmikroskopie konnte die subzelluläre Lokalisation von CAR in primären humanen Epithelzellen des Respirationstraktes beobachtet werden. So befindet sich CAR am apikalen Pol der seitlichen Zellmembran. Dort ist es co-lokalisiert mit ZO-1, einem Tight Junction assoziierten Protein. Durch eine Co-Immunpräzipitation konnten potentielle Bindungspartner wie auch ZO-1 und

andere Tight Junction-Proteine ermittelt werden. ZO-1, das zentrale Strukturprotein der Tight Junctions, fungiert als interzelluläres Gerüstprotein und verbindet transmembrane Rezeptorproteine mit den Komponenten des Zytoskeletts und intrazellulären Signalmolekülen (Bazzoni et al., 2000; Cohen et al., 2001; Fanning et al., 2002). Innerhalb der Tight Junction interagiert ZO-1 direkt mit Occludin (Fanning et al., 1998) und Claudin (Itoh et al., 1999), ebenso wie mit JAM (Bazzoni et al., 2000). In nicht polarisierten Zellen ist CAR an den interzellulären Kontaktstellen, wie den Glanzstreifen der Kardiomyozyten ebenfalls zusammen mit ZO-1, lokalisiert (Noutsias et al., 2001).

Aus einem *Yeast two hybrid screen* konnten weitere mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, welche direkt mit der zytoplasmatischen Domäne des CAR-Proteins interagierten. So konnten Interaktionen mit MUPP1 (*multi-PDZ domain protein 1*) gezeigt werden, welches mit Claudin, einem weiteren Tight Junction-Protein, sowie (Coyne et al., 2004) TAPP1 (Coyne et al., 2005), welches in den Phosphatidylinositol-Signalweg involviert ist, interagiert. Des Weiteren wurden Interaktionen zu JAM (Luissint et al., 2008), PICK, PSD 95 sowie zu MAGI-1 (Excoffon et al., 2004), einem bekannten Tight Junction assoziierten Protein der MAGUK-Familie, beschrieben. Proteine der MAGUK-Familie sind bekannt für Interaktionen mit  $\beta$ -Catenin, RapGEP, Synaptopodin und  $\alpha$ -Aktinin 4 (Dobrosotskaya und James, 2000; Ide et al., 1999; Mino et al., 2000; Patrie et al., 2002). Es ist ebenfalls eine Interaktion von CAR mit  $\beta$ -Catenin postuliert worden (Coyne et al., 2004). Zusätzlich interagiert CAR mit dem Ligand des Numb-X2 (LNX2) Proteins (Mirza et al., 2005), einem PDZ-Protein, welches den Notch-Signalweg im ZNS reguliert. Allerdings ist für LNX nicht bekannt, dass es mit Tight Junction in Epithelzellen assoziiert ist (Dho et al., 1998).

### **2.3.4 Gewebespezifische und entwicklungsregulierte CAR-Expression**

Mit großem Interesse wurde die Expression von CAR in Geweben, vor allem wegen der Möglichkeit der Genterapie mit adenoviralen Vektoren, untersucht (Honda et al., 2000). Die Expression von CAR in Geweben ist sehr komplex und stark entwicklungsreguliert (Philipson und Pettersson, 2004). Eine CAR-Expression konnte in der embryonalen Entwicklung ab Tag E7 durch *Real time*-PCR nachgewiesen werden (Asher et al., 2005).

Im Epithelgewebe einiger Organe konnte die Expression sowohl im embryonalen als auch im adulten Entwicklungsstadium gezeigt werden. In Epithelzellen wurde CAR als Bestandteil der Tight Junction identifiziert und ist dort an der basolateralen Membran lokalisiert (Cohen et

al., 2001). In der Ratte wurde CAR im Epithel der Trachea und der Bronchien, aber nicht der Lungenalveolen nachgewiesen (Tomko et al., 2000). Epithelgewebe von Haut, Niere, Pankreas, Leber und Darm zeigten ebenfalls ein starkes CAR-Signal (Tomko et al., 2000).

Die CAR-Expression ist während der Embryogenese besonders im zentralen und peripheren Nervensystem sowie im Herzen streng reguliert. Im Maus-Embryo ist die CAR-Expression im Gehirn besonders hoch, aber diese sinkt innerhalb des ersten postnatalen Monats stark ab (Honda et al., 2000; Xu und Crowell, 1996; Hotta et al., 2003). Das starke Vorkommen von CAR könnte Ursache dafür sein, dass neugeborene Mäuse besonders häufig im Vergleich zu adulten Tieren an einer Encephalitis durch eine CVB-Infektion erkranken (Feuer et al., 2005). Durch die Etablierung immunhistochemischer Nachweismethoden konnte die regionale Expression von CAR im Gehirn untersucht werden. Am Tag E15 der Embryonalentwicklung der Ratte war die Expression im Gehirn im Vergleich zum adulten Organ besonders hoch (Honda et al., 2000; Tomko et al., 2000). CAR wird in unterschiedlichen Regionen des Gehirns exprimiert (Honda et al., 2000). Postnatal konnte CAR im cerebralen Kortex, im Cerebellum und im Gehirnstamm bis zum Tag 7 nachgewiesen werden. Im olfaktorischen Bulbus konnte CAR bis zu 21 Tagen postnatal detektiert werden, jedoch nimmt auch in dieser Region die Expression mehr und mehr ab. Im adulten Gehirn der Ratte ist die CAR-Expression auf die ependymalen Zellen entlang des Ventrikelsystems begrenzt (Tomko et al., 2000). Die transiente Expression von Zelladhäsionsmolekülen ist ausschlaggebend für die Ausbildung von Nervenverbindungen (Honda et al., 2000).

Der Nachweis der CAR-Expression im Herzen ist medizinisch relevant, da Infektionen mit Adenoviren und CVB zu einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCMi) führen können. Die CAR-Expression ist im Vergleich zum Gehirn ebenfalls streng während der Herzentwicklung reguliert. Während große Mengen des Proteins im embryonalen Herzen nachzuweisen sind, ist das Vorkommen im adulten Organ deutlich geringer, wie es bei Mäusen und Ratten gezeigt werden konnte (Ito et al., 2000; Fechner et al., 2003; Kashimura et al., 2004). Vergleicht man die CAR-Expression in unterschiedlichen Organen, so ist die Expression im adulten Herzen stark reduziert (Tomko et al., 2000). Ein ähnliches Expressionsprofil konnte auch beim Menschen beobachtet werden. In humanen Föten ist eine CAR-Expression nachweisbar, während im adulten humanen Herzgewebe wenig oder gar kein CAR exprimiert wird (Noutsias et al., 2001). In embryonalen Zellen ist CAR zunächst

diffus in der Membran verteilt, während im Myokard von Erwachsenen CAR Bestandteil der Glanzstreifen ist (Noutsias et al., 2001; Kashimura et al., 2004).

Weitere Analysen weisen ebenfalls auf eine entwicklungsregulierte Expression von CAR im Skelettmuskel hin. Auch in der Skelettmuskulatur verringert sich die CAR-Expression in der postnatalen Phase zunehmend. In der glatten Muskulatur hingegen konnte bisher keine CAR-Expression nachgewiesen werden (Pointis und Segretain, 2005).

Über das Vorkommen im Endothel gibt es unterschiedliche Ergebnisse. So konnten einige Gruppen in diesen Zellen CAR nachweisen (Carson et al., 1999; Nasuno et al., 2004) während andere keinen Hinweis auf eine CAR-Expression in Endothelzellen fanden (Noutsias et al., 2001; Fechner et al., 2003). Diese kontroversen Beobachtungen könnten ein Hinweis auf eine mögliche Expressionsregulation durch inflammatorische Mediatoren sein. In Zellkulturexperimenten konnte bereits demonstriert werden, dass sich CAR durch den Einfluss von TNF $\alpha$  in endothelialen Zellen herunterregulieren ließ (Dorner et al., 2005).

### **2.3.5 Expression von CAR bei Herzerkrankungen**

In Zellkulturexperimenten an Rattenkardiomyozyten konnte beobachtet werden, dass sich die CAR-Expression durch eine Cytokinbehandlung induzieren ließ (Ito et al., 2000). In einem Herzinfarktmodell bei Ratten konnte darüber hinaus *in vivo* gezeigt werden, dass die CAR-mRNA drei Wochen nach dem Infarkt bis zu 10-fach im Vergleich zu nicht Infarkt-Tieren hochreguliert wurde. Bereits 6 Tage nach dem Infarkt konnte CAR in der Infarktzone immunhistochemisch nachgewiesen werden, während das umgebende Myokard kein verstärktes CAR-Signal aufwies. Diese Ergebnisse deuten an, dass CAR eine Funktion in der Geweberegeneration übernimmt (Fechner et al., 2003). Untersuchungen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie unterstützen diese Annahme, da bei ihnen CAR im Myokard vermehrt nachgewiesen werden konnte (Noutsias et al., 2001). Außerdem wurde postuliert, dass die individuelle CAR-Expression das Risiko erhöht an einer Myokarditis zu erkranken. Bisher konnte jedoch noch kein genetischer Defekt im CAR-Gen als potenzielle Krankheitsursache festgestellt werden (Bowles et al., 2002).

## **2.4 Zielstellung der Arbeit**

In dieser Arbeit sollte die biologische Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors im murinen Herzen untersucht werden.

Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor vermittelt die Bindung und die Internalisierung von Coxsackie B-Viren und einigen Adenoviren. Die biologische Funktion des Rezeptors im Herzen ist aber nur unzureichend beschrieben worden. Expressionsanalysen zeigten eine starke Regulation der CAR-Expression in unterschiedlichen Organen während der Embryonalentwicklung, so auch im Herzen. Außerdem konnte eine verstärkte Expression von CAR bei bestimmten Erkrankungen, wie Herzinfarkt und dilatativer Kardiomyopathie, im Myokard nachgewiesen werden. CAR ist zum einen Eintrittspforte für Viren, die zu einer Myokarditis mit dilatativer Kardiomyopathie führen können, zum anderen ist CAR an der Regeneration des erkrankten Myokards beteiligt.

Zur Untersuchung der biologischen Funktion von CAR im murinen Herzen, wurden zwei Knockout (KO)-Modelle charakterisiert. Ein herzspezifischer CAR-KO unter Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors wurde für die Analysen am embryonalen Herzen verwendet. Zur Untersuchung des Rezeptors im adulten Herzen wurde ein weiteres CAR-KO-Modell herangezogen, bei welchem die CAR-Deletion im Herzen zu jedem willkürlichen Zeitpunkt der Herzentwicklung induziert werden konnte.



### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders ausgewiesen, von Roth, GE Healthcare und Sigma-Aldrich bezogen.

##### 3.1.2 Geräte

**Tab. 2: Verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller und Typ
Absauggerät	Pharmacia, LKB-Pumpe P1
Anästhesie-Einheit	AgnTho's, Univentor 400, AgnTho's, Stellar A30
Chemilumineszenz-Imager	Fujifilm, LAS-1000
Geldokumentation	Syngene, GENE GENIUS
Gelsystem (Mini) für Agarosegele	Cosmo Bio Co, Mupid 21
Gelsystem für SDS-PAGE	GE-Healthcare, Hoefer Small gel unit
Gelsystem	Renner
Tissue-Processor	TP 1020, Leica
EKG-Gerät	EP Tracer, Cardio Tek
Elektronenmikroskop	Zeiss 910
Inkubator für Zellkultur	Binder, APT Line CB 150
Inkubator für Histologie	Memmert
Konfokales Mikroskop	Leica, TCS SP5/Carl Zeiss, LSM 5 Pascal
Kryostat	Cryocut 3000 (Leica)
Homogenisator	IKA®-Werk, Ultra-Turrax T-8
Mikroskop	Olympus, CK30/Leica, DMI 6000 B
Mikrotom	Mirom coll cut HM3555
Einbettmaschine für Paraffinpräparate	Leica, EG 1140 H
PCR-Maschine	MJ Research, PTC-200
Power supply	Biometra, 105BIO-LVD
PCR-Maschine für <i>Real time</i> -PCR	Applied Biosystems, 7900HT
Pipetten	Gilsen/Eppendorf

Gerät	Hersteller und Typ
Spektrophotometer	Amersham, Ultraspec 2100 pro /PqLab, NanoDrop ND-1000
Stereomikroskop	Leica, MZ75
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Temperatur-Kontrollmodul	Föhr Medical Instruments , TKM-0902
Temperatursensor	Föhr Medical Instruments , Pt-100
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge/Eppendorf, centrifuge 5804
Ultraschallgerät	Visual Sonics Vevo 770 Version 1.2.0
Ultraschallkopf	RMV704/RMV710 (Visual Sonics)
UV-Einheit	Olympus, U-RFL-T
Wasserbad	Haake, DC10
Western Blot-Apparatur	BioRad, Mini Trans. Blot Cell
Wärmeplatte	Föhr Medical Instruments, EHE-3501/280/140/11
Zentrifuge für 96 Well-Platten	Sigma, 4K15, Rotor: 09100

### 3.1.3 Enzyme

Proteinase K für den Verdau von Mausgewebe wurde von Merck und die Taq-DNA-Polymerase für PCR von Invitex bezogen. Für den Verdau der DNA wurde die DNase I von Ambion verwendet.

### 3.1.4 Kits

**Tab. 3: Verwendete Kits.**

Kit	Hersteller
In Situ Cell death detection kit, Fluorescein	Roche
H&E Staining for LCM	MMI
Masson-Trichrom	Sigma
ABC-Elite	Vektor
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
Thermoscript First-Strand Synthesis System	Invitrogen

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primäre Antikörper

**Tab. 4: Verwendete Primärantikörper.**

Antikörper	Spezies	IF	WB	Hersteller
$\alpha$ -Aktin	K		1:1000	Sigma
$\alpha$ -Aktinin (EA53)	M	1:500; A; P		Sigma
$\alpha$ -Tubulin	M	1:100; P	1:1000	Oncogene
aktivierte Caspase 3	K	1:500		Cell Signaling
CAR	K	1:50; P	1:1000	Santa Cruz
CAR	K	1:500; P		AG Prof. Dr. Rathjen
ChAT	Z	1:100; P		Millipore
Connexin 40	K	1:100; A; P	1:1000	Lifespan Bioscience
Connexin 43	M	1:100; M	1:1000	Chemicon
Connexin 43	K	1:1000; P	1:1000	Sigma
Connexin 45	M		1:1000	Chemicon
Connexin 45	K	1:100; A	1:1000	Zymed
Desmoplakin	M	unverd.		Progen
GAPDH	M		1:2000	ABR
HCN4	R	1:200; P		Abcam
Ki67	K	1:500		Novocastra
N-Cadherin	M	1:100; A; P	1:1000	Zymed
Neurofilament 160	H	1:500; A; P		Abcam

H: Huhn; K: Kaninchen; M: Maus; R: Ratte; Z: Ziege; unverd.: unverdünnt; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot; A: Acetonfixierung; P: Paraffinfixierung; M: Methanolfixierung

### 3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

**Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper.**

Sekundärantikörper	Spezies	IF	WB	Hersteller
Anti-K-Alexa Fluor 555	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-K-Alexa Fluor 568	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-K-Alexa Fluor 647	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-M-Alexa Fluor 555	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-M-Alexa-Fluor 647	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-R-Alexa-Fluor 555	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-H-Alexa-Fluor 555	Z	1:1000		Invitrogen
Anti-M-IgG-biotinyliert	Z	1:500		Jackson
Anti-Z-IgG-biotinyliert	D	1:500		Jackson
Anti-M-IgG-HRP-konjugiert	Z		1:2000	Calbiochem
Anti-K-IgG-HRP-konjugiert	Z		1:5000	GE Healthcare
Streptavidin 555		1:500		Invitrogen
Streptavidin 647		1:500		Invitrogen

H: Huhn; K: Kaninchen; M: Maus; R: Ratte; Z: Ziege; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot; Jackson: Jackson ImmunoResearch Laboratories

### 3.1.6 Oligonukleotide

**Tab. 6: Verwendete Genotypisierungsprimer.**

Primer	Sequenz
CAR P1-3 f	CCATGCACAGGGTGATCTG
CAR P1-3 r	TGAGACTAAAAACCAGCAGCTTC
CAR P1-5 f	AACCTAGCCATTCAAAAAGAAGG
CAR P1-5 r	CTCCCTAACCTTGATCGATACC
Cre1200	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC
Cre800	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG

r: revers; f: forward

**Tab. 7: Verwendete Primer zur *Real time*-PCR.**

Primer und Sonden	Sequenz
18S RNA f	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
18S RNA r	TGGGCAAATGCTTTCGCTC
18S RNA-Sonde	6-FAM-TGGACCGGCGCAAGACGGAC-TAMRA
Maus-GAPDH-154f	GGC AAA TTC AAC GGC ACA GT
Maus-GAPDH-223r	AGA TGG TGA TGG GCT TCC C
GAPDH-Sonde	6-FAM-AGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-TAMRA
CAR02 f	ACTTTGAACGTGCGCCTCAGA
CAR02 r	TGTAATGCCATCGGTCTTGT
CAR02-Sonde	6-FAM-CGTACTTGAAGTTAGCGGGTGCCA-TAMRA
CX30.2 f	GACGCGGTGCAGCTACAGT
CX30.2 r	ATGCGGAAGATCAGCATGATC
CX30.2-Sonde	6-FAM- CGCTCGTGGGTCGTCTCTGGC-TAMRA
CX37-2008 f	CCCAGGGTGGCCGAAA
CX37-2008 r	ACACATACTGCTTCTTGGATGCA
CX37-2008-Sonde	6-FAM-CCCCTAGCCGCCCAACAGCT-TAMRA
CX40 f	CAGCCTGGCTGAACTCTACCA
CX40 r	CTGCCGTGACTTGCCAAAG
CX40-Sonde	6-FAM-CGCTGTCTGGATCTTCTTCCAGCCCAG-TAMRA
HCN4 f	GGGTTAAGTCAGCAGGGTTTTG
HCN4 r	GCATCGTCAGGTCCCAGTAAA
HCN4-Sonde	6-FAM-ATTATCCACCCCTACAGTGACTTCAGA-TAMRA

r: revers; f: forward

Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ synthetisiert. Alle weiteren Primer für *Real time*-PCR wurden über die MWG Biotech AG bezogen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierexperimentelle Praxis

Die für die Experimente benötigten Mäuse stammten aus eigener Zucht. Die Tiere wurden in IVC-Käfigen (individually ventilated cages) in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums Berlin gehalten. Sie erhielten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter und hatten einen 12 h Tag/Nacht Rhythmus. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und waren von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

#### 3.2.1.1 PCR-Protokolle zur Genotypisierung

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch Verwendung des Soriano-PCR Protokolls zur Detektion der wt-, recf- und rec-Banden. Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

**Tab. 8: Pipettierschema zur Detektion von wt-, recf-, rec-Banden.**

	Endkonzentration	Volumen
Gitschier-Puffer (10x)	1x	2,5 µl
DMSO	10%	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 mM	1,25 µl
Primer forward (10 µM)	0,2 µM	0,5 µl
Primer revers (10 µM)	0,2 µM	0,5 µl
BSA (10 mg/ml)	0,08 mg/ml	0,2 µl
DNA-Template	20-50 ng	1,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,025 U/µl	0,125 µl
Steriles ddH <sub>2</sub> O		ad 25 µl

Gitschier-Puffer (10x): 166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris, pH 8,8; 67 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM β-Mercaptoethanol; 67 mM EDTA

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial)	1x	94°C	1 min	20 s
Annealing (initial)	1x	60°C	2 min	
Elongation (initial)	1x	65°C	5 min	
Denaturierung	40x	94°C	30 s	

Annealing	40x	60°C	30 s
Elongation	40x	65°C	1 min
Syntheseschritt (final)	1x	65°C	10 min
Kühlung		4°C	∞

**Tab. 9: Primerpaare und erwartete Produktgröße zur Genotypisierung der Tiere.**

PCR	Primer	PCR Produkt
CAR recf	P1-5 forward	wt (419) bp
	P1-3 revers	recf (349) bp
CAR rec	P1-3 forward	rec (251) bp
	P1-3 revers	

Der Nachweis der Cre-Rekombinase erfolgte durch Nachweis des PCR-Produkts von 400 bp. Für einen PCR-Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

**Tab. 10: Pipettierschema für einen Cre-PCR-Ansatz.**

	Endkonzentration	Volumen
Puffer (10×) (Invitrogen)	1x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 mM	1,25 µl
Primer Cre 800 (10 µM)	0,6 µM	1,5 µl
Primer Cre 1200 (10 µM)	0,6 µM	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mg/ml)	1,5 mg/ml	0,75 µl
DNA-Template	20-50 ng	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,04 U/µl	0,2 µl
Steriles ddH <sub>2</sub> O		ad 25 µl

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial)	1x	94°C	2 min
Denaturierung	35x	94°C	15 s
Annealing	35x	49°C	15 s
Synthese	35x	72°C	45 s
Synthese (final)	35x	72°C	8 min
Kühlung		4°C	∞

### 3.2.1.2 Verpaarungen

Es wurden männliche 129S6/C57BL6-Mäuse (MHC<sup>+</sup> recf/wt) mit weiblichen 129S6/C57BL6-Mäusen (recf/recf) verpaart. Der Tag, an dem der vaginale Plaque sichtbar war, wurde als Tag 0.5 *post conceptionem* (E0.5) definiert. Die Embryonen wurden zu Zeitpunkten verschiedener Entwicklungsstadien präpariert und das Alter anhand der Somitenzahl bestimmt. Die Embryonen wurden präpariert und für histologische Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen in 4% PFA in PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2 H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) über Nacht bei 4°C fixiert. Für andere Experimente wurde das Herz unter RNase-freien Bedingungen entnommen, in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.1.3 Tamoxifenbehandlung

Für die Tamoxifenbehandlung der induzierbaren CAR-MCM-KO-Mäuse wurden 100 mg Tamoxifen in 0,6 ml Ethanol (absolut) mit 9,4 ml Erdnußöl versetzt und mittels Ultraschall aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert (Kuhbandner et al., 2000). Für die Versuche wurden nur männliche 2-3 Monate alte Tiere verwendet, wobei 30 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht intraperitoneal in MCM- und Kontrolltieren einmal täglich 5 Tage injiziert wurde. Nach 2-tägiger Pause wurde das Injektionsschema wiederholt. Für die Konduktanzkatheteruntersuchung wurden zusätzlich 5-6 Monate alte Tiere mit Tamoxifen injiziert.

## 3.2.2 Kardiologische Phänotypisierung

### 3.2.2.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie erlaubt die Untersuchung der Herzfunktion am lebenden Tier. Die echokardiographischen Untersuchungen wurden in der Core-Facility-Ultraschall am MDC durchgeführt. Es wurden für die Aufnahmen das Schallgerät von Visual Sonics (Visual Sonics Vevo 770 Version 1.2.0) mit dem Schallkopf RMV710 (Visual Sonics) verwendet. Die Tiere wurden mit 2% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert und die Narkosetiefe durch Überprüfung der Reflexe und der Atmung beobachtet. Zur Untersuchung wurde das Bauchfell rasiert. Während der Untersuchung wurde über eine Rektalsonde kontinuierlich die Temperatur des Tieres kontrolliert und durch gezielte Wärmezufuhr ein Auskühlen des Tieres verhindert. Die Herzaktivität wurde durch die Aufnahme eines EKGs über die Extremitätenableitung verfolgt. Die Echokardiographie erfolgte unter Narkose mit



0,5-1,5% IsoFlo (Abott). Die Daten wurden durch Schall des linken Herzens in der parasternalen Achse im M-Modus und B-Modus aufgenommen. Im M-Modus wurde die zeitliche Veränderung der Position der unterschiedlichen Herzstrukturen in einer Linie unter dem Schallkopf betrachtet. Der B-Modus hingegen gibt ein zweidimensionales Bild von der Tiefen- und Längenausdehnung des Gewebes unter dem Schallkopf wieder.

### **3.2.2.2 Doppler-Ultraschall an Embryonen**

Die Untersuchung der embryonalen Herzfunktion wurde durch einen echokardiographischen Doppler-Ultraschall in der Core-Facility-Ultraschall am MDC durchgeführt. Eine Doppleruntersuchung dient der Messung der Blutströmungsgeschwindigkeit. Der Blutfluss durch die Mitralklappe wird durch den E-Peak und A-Peak repräsentiert. Der Blutfluss durch die Aorta während der Systole wird durch das Ausflusstraktsignal (OF) wiedergegeben. Für die embryonale Echokardiographie wurden trächtige Mäuse (s. 3.2.1.2) zum entsprechenden Trächtigkeitstag mit 2% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert und das Bauchfell rasiert. Die Narkose wurde durch Prüfung der Reflexe und der Atmung kontrolliert. Sowohl die Temperatur als auch die Herzaktivität des Muttertiers wurden kontinuierlich beobachtet und dokumentiert. Das Abdomen des Muttertiers wurde durch einseitige Inzision eröffnet. Vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquasonic 100, Parker Laboratories) wurde auf die Embryonen *in utero* aufgetragen und der Ultraschallkopf RMV704 (Visual Sonics) vorsichtig auf jeden einzelnen platziert. Es wurden der A-Peak der Mitralklappe und das Ausflusstraktsignal (OF) aufgenommen. Die Messung des PQ\*-Intervalls erfolgte vom Beginn des A-Peaks bis zum Beginn des Ausflusstraktsignals. Die linksventrikuläre Ejektionszeit (ET) wurde vom Beginn bis zum Ende des OF-Signals ermittelt. Die Herzfrequenz wurde ausgehend vom A-Peak über 4 Herzschläge berechnet.

### **3.2.2.3 Konduktanzkatheteruntersuchung**

Die hämodynamische Messung wurde von Dr. Dirk Westermann durchgeführt. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Thiopental (125 mg/kg) narkotisiert. Nach Intubation und Beatmung wurde nach Eröffnung des Thorax ein 1,4 F Mikrokonduktanz-Druck-Katheter (ARIA SPR-719, Millar Instruments, Inc, Texas, USA) in den linken Ventrikel (LV) eingeführt, um kontinuierlich die Druck-Volumen-Änderung im linken Ventrikel in einem *open-chest*-Modell zu messen. Die Berechnung des Volumensignals wurde mit der hypertonen Saline-Waschtechnik durchgeführt. Die systolische Herzfunktion

wurde quantifiziert durch den LV-endsystolischen Druck ( $P_{\max}$ , mmHg) und der Druckänderung pro Zeit  $dP/dt_{\max}$  (mmHg/s) als ein Maß für die LV-Kontraktilität. Die diastolische Herzfunktion wurde durch den LV-enddiastolischen Druck ( $P_{\min}$ , mmHg) und der entsprechenden Druckänderung  $dP/dt_{\min}$  (mmHg/s) gemessen. Die allgemeine Herzfunktion wurde quantifiziert durch das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV und EDV,  $\mu\text{l}$ ), der berechneten Ejektionsfraktion (EF, %) und der Herzfrequenz (HF, Schläge/min).

#### **3.2.2.4 Elektrokardiographie**

Zur Ableitung der elektrischen Herzaktivität dient das Oberflächen-EKG. Die Tiere wurden mit 2% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert und die Narkosetiefe durch Überprüfung der Reflexe und der Atmung beobachtet. Während der Untersuchung wurde leicht mit Isofluran (1,5% IsoFlo/Luftgemisch) anästhesiert. Das Oberflächen-EKG wurde von vier Extremitäten abgeleitet und mit dem EP Tracer; CardioTek aufgenommen. Die Messung erfolgte innerhalb von 5 Minuten. Von jeder Maus wurden 90 Sekunden des EKGs aufgenommen. Die Auswertung erfolgte regulär über die 2. Extremitätenableitung. Es wurden die Parameter RR, PQ, QRS, ST und QT bestimmt.

#### **3.2.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) *in vivo***

Die EPU wurde von Dr. Robert Fischer durchgeführt. Die *in vivo* EPU ( $n=21$ ) wurde etabliert, um die atriale und ventrikuläre Erregungsleitung und die Induzierbarkeit von Arrhythmien zu überprüfen (Berul et al., 1997). Es wurde zur Messung eine digitale EP-Einheit verwendet (EP Tracer; CardioTek). Die Tiere wurden zunächst in einer abgedunkelten Inhalationskammer durch Isofluran (2% IsoFlo/Luftgemisch) in Narkose versetzt. Die Narkosetiefe wurde durch Reflexüberprüfung kontrolliert. Die Körpertemperatur wurde ständig über eine rektale Temperatursonde überprüft und durch eine Wärmeplatte konstant gehalten. Ein octapolarer 2-French-Elektroden-Katheter (CIBer mouse cath; NuMed, Inc) wurde über die *Vena cava superior* in den rechten Vorhof und anschließend in die rechte Herzkammer entlang der Reizleitung eingeführt. Zur Testung der Induzierbarkeit von Arrhythmien wurde nach einem programmierten ventrikulären Stimulationsprotokoll verfahren. Kurzintervallstimuli mit zeitlichen Abständen unter 60 ms wurden zusätzlich angewendet. Als Arrhythmie wurde das Auftreten von mindestens drei arrhythmischen Ereignissen gewertet.

### **3.2.2.6 Telemetrie**

Die Durchführung der Telemetrie erfolgte durch Ralph Plehm und Reika Langangki am MDC und wurde mit Hilfe von Dr. R. Fischer ausgewertet. Für eine kontinuierliche Aufnahme des EKGs ohne Anästhesie diente die Telemetrie. Dafür wurden den Tieren subkutan Radiotransmitter unter Isoflurananästhesie implantiert (TA10ETA-F20; DSI, Inc.). Das Hauptstück des Transmitters wurde auf dem Rücken des Tieres fixiert. Die beiden Ableitungen wurden subkutan ähnlich der zweiten Ableitung im EKG platziert (rechts oberhalb und links unterhalb des Thorax). Nach der Operation wurden die Tiere einzeln in Käfigen gehalten. Die Käfige wurden zur kontinuierlichen Aufnahme über den Empfänger platziert. Nach einer Woche wurde mit der Tamoxifeninjektion für zwei Wochen begonnen und die Aufnahmen über 8 Wochen aufgezeichnet.

## **3.2.3 Nukleinsäureanalytik**

### **3.2.3.1 Isolation genomischer DNA aus Mausgewebe**

Zur Präparation genomischer DNA wurde Gewebe aus der Schwanzspitze verwendet. Zur Gewinnung wurden 2-4 mm der Schwanzspitze entfernt und zunächst bei -20°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurde das Gewebe nach dem Auftauen mit 700 µl Tailpuffer (20 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS; 4 mM NaCl) und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 52°C unter Schütteln bei 650 rpm (Eppendorf, Thermomixer comfort) inkubiert. Die Proteinase K wurde anschließend bei 95°C 10 Minuten inaktiviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert und bei 20800 g 5 Minuten zentrifugiert. Die 500 µl obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,3 ml eiskaltem Ethanol (99,8%) versetzt und 10 min gut gemischt. Danach wurde die ausgefallene DNA für 30 min bei 20800 g, 4°C abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde ca. 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) vorsichtig resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### **3.2.3.2 Präparation genomischer DNA aus embryonalem Gewebe**

Für die Gewinnung embryonaler, genomischer DNA wurde die Schwanzspitze des Embryos in 100 µl Lysispuffer (50 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM TrisHCl, pH 8,9; 0,01% Gelatine;

0,45% Tween 20; 0,45% NP40) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 52°C unter Schütteln bei 650 rpm (Eppendorf, Thermomixer comfort) inkubiert. Anschließend folgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 10 Minuten. Für die Genotypisierung wurden 1 µl direkt für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.

### **3.2.3.3 Isolation von RNA**

100 mg des in flüssigen N<sub>2</sub>-gefrorenen, adulten Herzgewebes wurden in 1 ml Trizol überführt und 3x 20 s mit dem Ultra-Turrax T-8 (Ika-Werk) homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde das Lysat 5 min bei RT geschüttelt und 10 min bei 15300 g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 15300 g für 10 min. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 10 min bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt (s. 3.2.3.4) und die RNA aufgereinigt (s. 3.2.3.5). Für embryonales Herzgewebe wurde das Herz unter RNase-freien Bedingungen präpariert, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolation wurden 5 Herzen pro Genotyp in 600 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) aufgenommen und anschließend nach den Herstellerangaben verfahren. Der DNase I-Verdau (2 U, Ambion) erfolgte auf der Säule (Qiagen).

### **3.2.3.4 Nukleinsäurekonzentrationsmessung**

Die Messung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch im UV-Spektrometer oder mittels Nanodrop nach Herstellerangaben (Nanodrop ND-1000) bei 260 nm.

### **3.2.3.5 RNA-Aufreinigung**

Die isolierte RNA aus adultem Gewebe wurde für 20 min bei 37°C mit DNase I (2 U, Ambion) behandelt und anschließend mit dem RNeasy-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es erfolgte erneut eine Konzentrationsbestimmung. Die Qualität der RNA wurde anschließend durch ein 1,2 %iges Formamidgel überprüft (s. 3.2.3.9). Dabei wurde nach den Angaben des RNeasy-Kits von Qiagen verfahren.

### 3.2.3.6 cDNA-Synthese

Zur Durchführung einer quantitativen *Real time*-PCR wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das Thermoscript First-Strand cDNA Synthese-Kit von Invitrogen verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

dNTP Mix (10 mM)	2 µl
Random Primer (50 ng/µl)	1 µl
RNA-Template 1 µg	entsprechend
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 12 µl

Es erfolgte zunächst die Denaturierung der RNA bei 65°C für 5 min und danach wurden die notwendigen Komponenten für die cDNA-Synthese hinzugefügt.

cDNA-Synthese-Puffer (5x)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNase (40 U/µl)	1 µl
Thermoscript Reverse Transkriptase (15 U/µl)	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 µl

### 3.2.3.7 *Real time*-PCR

Für die quantitative *Real time*-PCR wurde der qPCR Master Mix Plus Kit (Eurogentec) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Es wurde folgendes Programm verwendet:

Annealing	1x	50°C	2 min
Denaturierung	1x	95°C	10 min
Denaturierung	50x	95°C	15 s
Amplifizierung	50x	60°C	1 min
Kühlung		4°C	∞

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Sequence Detection System 1.2 von Applied Biosystems unter Verwendung der CT-Methode, welche im Handbuch 2 des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System beschrieben wurde.

### 3.2.3.8 Agarosegelelektrophorese

Die Größe von DNA-Molekülen kann durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert werden. Die Geschwindigkeit mit der sich die linearisierten Moleküle durch das Gel bewegen ist umgekehrt proportional zu dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Bei ringförmigen Molekülen kann es durch die coiled- bzw. supercoiled-Strukturen zu einer Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit führen, so dass diese Strukturen bei einem geringeren Molekulargewicht nachzuweisen sind. Analytische Agarosegelelektrophoresen werden dazu verwendet, die Größen und Reinheit von DNA-Molekülen zu bestimmen oder den Erfolg eines Restriktionsverdau zu beurteilen. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden in der Regel 1,5%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde mit 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgeköcht, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer (Cosmo Bio Co, Mupid 21) überführt und diese mit 0,5x TAE aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Orange G-Loading-Puffer (0,5% Orange G; 50% Glycerol; 25 mM EDTA) versetzt. In jede Geltasche wurden 20 µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 0,5x TAE-Puffer bei 50 V oder 100 V durchgeführt bis der Farbmarker die Mitte des Agarosegels überschritten hatte. Als Größenstandard dienten für 1,5%igen Agarosegele 5 µl des GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht mit dem Gel-Imager sichtbar gemacht.

### 3.2.3.9 Formamidgelelektrophorese

Um die RNA-Qualität zu überprüfen wurden 100-500 µg der Gesamt-RNA auf ein denaturierendes Formamidagarosegel aufgetragen. Es wurde dafür ein 1,2%iges FA-Gel verwendet, welches aus UltraPure™ Agarose, 1x FA-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0; 250 mM Formaldehyd) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt wurde. Die RNA-Probe wurde mit 5x Loading-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) versetzt und die Elektrophorese 40 min bei 100 V in der Mupid®-ex-Gelkammer (Eurogentec GmbH) durchgeführt. Die ribosomale RNA wurde mit Hilfe der UV-Einheit (U-RFL-T; Olympus) bei 312 nm sichtbar gemacht. Das alleinige Vorhandensein der 28S- und 18S-RNA ohne weitere Banden wies eine ausreichende Qualität der RNA nach. Zusätzliche Banden zeigten eine bereits degradierte RNA an.

### **3.2.4 Proteinchemische Methoden**

#### **3.2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde nach Laemmli durchgeführt. Es wurden zwei Gele verwendet, die sich in der Porengröße und in den pH-Werten der Puffer unterschieden, was eine bessere Trennung der Proteine garantierte. Im Sammelgel bewegen sich Proteinen entlang eines Feldstärkegradienten in der Reihenfolge ihrer elektrischen Beweglichkeit und lagern sich zu Proteinstapeln an der Grenzfläche von Sammel- und Trenngel zusammen. Im Trenngel wird Glycin zum Ladungsträger und die Trennung erfolgt vorrangig nach der Molekülgröße. Das anionische SDS maskiert durch Mizellenbildung die Proteineigenladung und es entsteht ein relativ konstantes Ladungs- und Massenverhältnis, welches zur Trennung der Proteine nach ihren molekularen Massen führt. Zur Isolation von Gesamtprotein aus Herzgewebe wurden 20 mg Gewebe mit 500 µl Aufschlusspuffer (8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 3% SDS; 75 mM DTT; 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8) versetzt und mit Ultraschall unter Kühlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 20800 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -80°C gelagert. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mit 4-fachem Laemmli-puffer (50 mM Tris; 1% β-Mercaptoethanol; 2% SDS; 10% Glycin; 0,1% Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese mit 1x Laufpuffer (1% SDS; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA, pH 8,0) erfolgte mit der Hoefer Small gel unit (GE-Healthcare) 15 min bei 90 V und dann bei 120 V. Als Größenstandard wurden 5 µl vom Page Ruler Prest. Prot. Ladder Plus (Fermentas) verwendet.

#### **3.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch die Bradford-Methode**

Für die Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Bradford verwendet. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie G-250 an das Protein und die damit verbundene Veränderung der Absorption des Farbstoffs. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Photometer gegen Wasser als Leerwert gemessen. Die Eichkurve wurde mit BSA erstellt. Es wurde die Reagenzlösung von Bio Rad verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

#### **3.2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Amidoblack**

Die Amidoblackmethode wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung angewendet, da bei Lysepuffern mit hoher SDS- und Harnstoffkonzentration die Bradford-Proteinbestimmung

gestört wird (Schaffner und Weissmann, 1973). Es wurde eine BSA-Eichreihe durchgeführt. Von der Proteinlösung wurden je 1 µl auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) aufgetragen. Dann erfolgte die Inkubation der Membran in 0,1% Amidoschwarzlösung (45% Methanol; 10% Essigsäure; 0,1% Amidoschwarz) für 1 min. In mehreren Waschschritten wurde die Membran in Entfärbelösung (90% Methanol; 2% Essigsäure) unter Schütteln entfärbt, bis die Proteinspots deutlich sichtbar waren. Die Proteinspots wurden mit dem Skalpell möglichst gleichgroß ausgeschnitten, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Elutionslösung (50% Ethanol; 0,05 mM EDTA; 25 mM NaOH) 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Es erfolgte die photometrische Messung der eluierten Lösung bei 630 nm.

#### **3.2.4.4 Western Blotting**

Unter Western Blotting versteht man den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Membran. Es wurden zwei Schwämme, zwei Whatmanpapiere sowie eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Deutschland) für 5 Minuten in Blottransferpuffer (25 mM Tris; 160 mM Glycin; 10% Ethanol) äquilibriert. In die Blotkassette wurde ein „Sandwich“, bestehend aus je einem Schwammpolster und einem Whatmanpapier an beiden Seiten sowie dem dazwischen liegenden Gel mit aufliegender Nitrocellulosemembran, eingebracht. Vorhandene Luftblasen wurden beim Aufeinanderlegen der Bestandteile entfernt. Die Kassette wurde in die Tankblotapparatur (Mini Trans. Blot Cell, BioRad) so eingebracht, dass die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt war. Das Elektroblothing erfolgte unter Kühlung für eine Stunde bei 250 mA. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-S-Färbelösung (Sigma) für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Wasser (bidest.) gespült bis die gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden. Zum Entfärben wurde die Membran für ungefähr 5 Minuten in PBS-T (PBS; 1% Tween 20) unter Schütteln inkubiert.

#### **3.2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen**

Der spezifische Nachweis der geblotteten Proteine erfolgte immunologisch durch Antikörper. Zur Blockierung von unpezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 30 Minuten in Blockierungspuffer (5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T) inkubiert und zweimal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper wurde eine Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Blotmembran dreimal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten, sekundären



Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran jeweils für 5 Minuten mit PBS-T und im Anschluss mit PBS gewaschen. Die Blotmembran wurde mit dem ECL-System (Enhanced-Chemiluminescence-Luminol) entwickelt. Für die Blotentwicklung wurde die Membran mit Whatmanpapier getrocknet und in eine Folie eingeschlagen. Vom Supersignal Kit (Pierce) wurden jeweils 0,5 ml der Lösung A und B miteinander gut gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit einer LAS-1000-Kamera (Fuji, Japan) aufgenommen. Für die quantifizierende Western Blot-Analyse wurde die Software Aida Image Analyzer v.3.52 verwendet. Zur Detektion von  $\alpha$ -Aktinin als Referenzprotein wurde die Nitrozellulosemembran für 2 h in Stripping-Puffer (200 mM Glycin; 0,1% SDS; 0,1% Tween 20; pH 2,6) bei RT inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS-T gewaschen. Zur Antikörperfärbung wurde wie oben beschrieben verfahren.

### **3.2.5 Zellkulturtechniken**

#### **3.2.5.1 Isolation von primären Kardiomyozyten zur Immunfärbung**

Zur Isolation primärer, embryonaler Kardiomyozyten wurden die Herzen von Embryonen präpariert und alle folgenden Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Gewebe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 50  $\mu$ l Trypsin-Medium (DMEM [Invitrogen]; 0,05% Trypsin; 10 mM EDTA) überführt. Die Schwanzspitze der Embryonen wurde für die Genotypisierung verwendet. Die Herzen wurden für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 800 g für 5 min wurde der Überstand in ein vorgewärmtes Reaktionsgefäß mit 500  $\mu$ l Medium (DMEM; 10% FCS [Sigma]) überführt. Die Zellen wurden auf einer 24-Well-Platte ausplattiert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Inkubator Binder) inkubiert. Nach 1 h Stunde wurden die Zellen erneut ausgesät, um die Anzahl an Fibroblasten zu reduzieren. Für eine Antikörperfärbung wurden die Zellen auf Laminin beschichteten Glas-Coverslips (Roth) ausplattiert. Das Medium wurde nach 24 h erneuert. Für die Immunzytochemie wurden die Zellen bei RT 10 min mit 4% PFA fixiert dann 3x 10 min mit PBS gewaschen und bis zur Färbung bei 4°C in PBS gelagert. Für die Immunfärbung wurde wie unter 3.2.6.7 verfahren.

## 3.2.6 Histologie

### 3.2.6.1 Allgemeine histologische Arbeiten

#### 3.2.6.1.1 Einbetten von Gewebe in Paraffin

Das Gewebe wurde über Nacht in 4% PFA in PBS bei 4°C fixiert. Adulte Mausherzen wurden zuvor mit dem Fixierungsmittel perfundiert. Dann erfolgte das Wässern des Gewebes für mindestens 2 h. Zur Dehydrierung und Paraffinisierung der Organe wurde der Tissue-Processor (TP1020) von Leica verwendet. Für adultes Gewebe wurde folgendes Programm mit Vakuum verwendet, für embryonales Gewebe jedoch ohne Vakuum:

70% Ethanol	1x 1 h
90% Ethanol	1x 1 h
96% Ethanol	2x 1 h
100% Ethanol	3x 1 h
Rotihistol	3x 1 h
Paraffin	2x 1 h

Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet. Es wurden dafür Rotilabo-Einbettkassetten (Roth) und die EG 1140 H-Maschine (Leica) verwendet.

#### 3.2.6.1.2 Deparaffinisierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Das eingebettete Gewebe wurde mit dem Mikrotom (HM3555, Leica) unter Kühlung geschnitten. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Histo Bond, Marienfeld) aufgezogen. Zur Deparaffinisierung wurden die Schnitte 3x 5 min in Rotihistol inkubiert. Zur Rehydrierung erfolgte eine 3 malige 5-minütige Inkubation in 100% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte in Lösungen absteigender Alkoholkonzentration (90%, 80%, 70%) für 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden mehrmals mit Aqua dest. gespült und bis zur Färbung in Aqua dest. belassen.

### 3.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsverfärbung histologischer Präparate. Die Zellkerne werden durch Hämatoxylin blau, das Zytoplasma rot gefärbt.

### 3.2.6.2.1 HE-Färbung für Paraffinschnitte

Zur Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin wurden 5 µm dünne Paraffinschnitte verwendet. Die Schnitte wurden 3x 5 Minuten in Rotihistol deparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) jeweils 5 Minuten rehydriert und in Aqua dest. gespült. Dann erfolgte eine Inkubation in Meyers Haemalaun-Lösung für 5 min und Bläuung der Schnitte für 5 min unter fließendem Leitungswasser. Die Färbung wurde mit Aqua dest. gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte mit Eosin 30 Sekunden gefärbt und in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) jeweils 20 Sekunden dehydriert und mit Roti Histokitt (Roth) eingedeckelt.

### 3.2.6.2.2 HE-Färbung für Lasermikrodissektion

Zur Durchführung der Lasermikrodissektion wurden 10 µm dicke Kryoschnitte auf MMI-Objektträger aufgezogen und bis zur Färbung bei -20°C kurzfristig gelagert. Zur Färbung wurden die Hämatoxylin- und Eosinlösung des MMI-Kits verwendet. Die Schnitte wurden zunächst mit eiskaltem Isopropanol (70%) für 30 Sekunden benetzt und anschließend mit 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Die Schnitte wurden mit Lösung 1 des MMI-Kits zum Färben der Zellkerne 1,5 min inkubiert und anschließend mit 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Zur Färbung des Zytoplasmas wurde Lösung 2 (MMI-Kit) für 30 Sekunden auf die Schnitte aufgetragen und mit 70%igem Isopropanol gespült. Danach erfolgte die Inkubation der Schnitte für 1 Minute in 100%igem Isopropanol. Die Schnitte wurden in einen RNase-freien Glasbehälter überführt und im Exsikator für mindestens 45 Minuten unter Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen konnten die Schnitte unter dem Laserdissektionsmikroskop geschnitten werden.

### 3.2.6.3 Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung ist eine histologische Färbung zur Detektion fibröser Gewebestrukturen. Während die Zellkerne schwarz und das Zytoplasma rot gefärbt werden, kann das Bindegewebe durch Blaufärbung vom umliegenden Gewebe gut unterschieden werden. Nach Deparaffinisierung der 5 µm Schnitte in Rotihistol (Roth) und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und über Nacht bei RT in Bouin-Lösung (Sigma) fixiert. Die Schnitte wurden durch mehrmaliges Spülen unter fließendem Leitungswasser vom Fixierungsmittel befreit, in Aqua dest. überführt und konnten anschließend gefärbt werden. Alle Färbeschritte wurden bei RT durchgeführt. In einer Testfärbung wurden zunächst die Färbekonditionen bestimmt. Die Färbung erfolgte mit der

Hämatoxylin-Arbeitslösung (Sigma) und dem Masson-Trichom-Kit (Sigma) nach Herstellerangaben. Zur Zellkernfärbung wurde die Hämatoxylin-Arbeitslösung aus Hämatoxylin A (Sigma) und Hämatoxylin B (Sigma) im Verhältnis 1:1 gemischt und konnte 4 Wochen verwendet werden. Die Schnitte wurden in dieser Lösung 7 min inkubiert und zur Bläuung 7 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Zytoplasmafärbung erfolgte durch 4-minütige Inkubation in Biebrich-Scharlachrot. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. mehrmals gespült bis die überschüssige Rotfärbung entfernt wurde. Im Phosphorwolframsäure-Phosphormolybdänsäure-Gemisch wurden die Schnitte 3 Minuten gebeizt und die kollagenhaltigen Gewebestrukturen für die Färbung mit Anilinblau vorbereitet. Die Blaufärbung bindegewebiger Strukturen wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit Anilinblau erzielt. Die Schnitte wurden durch Spülen mit Aqua dest. von der überschüssigen Farbe befreit und nach anschließender Dehydrierung durch Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration in Roti Histokitt (Roth) eingebettet.

#### **3.2.6.4 Dreidimensionale Rekonstruktion des AV-Knotens**

Zur dreidimensionalen Rekonstruktion des AV-Knotens wurden die Herzen mit 4% PFA in PBS perfundiert, über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (s. 3.2.6.1). Es wurden vom Herzen 5 µm dicke Schnitte durchgängig unter Kühlung angefertigt und jeder Verlust eines Schnittes wurde dokumentiert. Zur Anfertigung der Schnitte wurde das Mikrotom (HM3555, Leica) verwendet. Die Schnitte wurden sequentiell trichrom gefärbt (s. 3.2.6.3). Unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX51) wurde der AV-Knoten zentriert ausgerichtet, fotografiert und mittels der Meta Imaging Series Software (MDS Analytical Technologies) dreidimensional zusammengesetzt. Das Volumen des AV-Knotens wurde mit Hilfe der Software zur dreidimensionalen Rekonstruktion von MetaMorph 7.1.7 berechnet.

#### **3.2.6.5 Immunfärbung von Paraffinschnitten**

Die Paraffinschnitte wurden für 1 h bei 60°C inkubiert und dann 3x 5 min in Rotihistol (Roth) deparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe rehydriert (s. 3.2.6.1). Zur Demaskierung wurden die Schnitte 20 min in Natriumcitrat-Puffer (10 mM, pH 6,0) bis zum Sieden erhitzt und 20 min bei RT abgekühlt. Die Schnitte wurden gründlich mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung und Blockierung wurden die Schnitte für 1 h in Blockierungsreagenz (10% Serum; 0,3% Triton X-100; 0,2% BSA in PBS) bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte zur Inhibierung endogener Peroxidasen eine Inkubation der Schnitte

mit 3% Wasserstoffperoxid für 10 min. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinkonjugierter Antikörper verwendet. Die Amplifikation wurde durch die Verwendung des ABC-Elite-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Detektion des Signals erfolgte mit DAB (Dako). Zwischen jedem Schritt erfolgte das Waschen der Schnitte für 3x 5 min mit PBS-T und 3x 5 min mit PBS. Nach Entwicklung der Färbung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Sigma) gegengefärbt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit Roti Histokitt (Roth) eingebettet.

### 3.2.6.6 Acetylcholinesterase (AChE)-Färbung von Kryoschnitten

Die Acetylcholinesterase-Färbung ist ein colorimetrischer Enzymtest zur Detektion von Gewebebereichen, welche eine hohe Acetylcholinesteraseaktivität aufweisen. Diese Bereiche werden durch Entwicklung eines braunen Präzipitates sichtbar gemacht. Zur Identifizierung des AV-Knotens wurden die Herzen mit PBS, anschließend mit 4% PFA in PBS perfundiert und entnommen. Die Herzen wurden in 30% Sucrose ü.N. inkubiert und anschließend in OCT (Sakura) eingebettet und bis zum Schneiden bei -20°C gelagert. Das Herz wurde von der Hinterwand geschnitten. In regelmäßigen Abständen von 25 µm wurden Schnitte für den Enzymtest verwendet. Dazwischenliegende Schnitte wurden für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet (s. 3.2.6.7). Das AChE-Färbeprotokoll wurde von El-Badawi und Schenk übernommen (El-Badawi und Schenk, 1967). Die Kryoschnitte wurden zuvor in 4% PFA in PBS fixiert. Für eine Färbung von 2 h bei 37°C wurden die Schnitte 1 min fixiert. Bei einer Färbung über Nacht bei RT wurde die PFA-Fixierung auf 20 min ausgeweitet. Nach der Fixierung wurden die Schnitte gründlich mit eiskaltem Aqua dest. gespült. Für die Färbelösung wurden verwendet:

	Acetylcholinthiocholiniodid	125 mg
(0,82%)	Natriumacetat	158 ml
(0,6%)	Essigsäure	5 ml
(2,94%)	Natriumcitrat	12 ml
(0,75%)	Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 ml
(0,137%)	Iso-OMPA	5 ml
(0,165%)	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	25 ml
	ddH <sub>2</sub> O	20 ml
	Endvolumen	250 ml

Zur Beendigung der Färbung wurden die Schnitte mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit Methylgrün (Vector) nach Herstellerangaben gegengefärbt.

### **3.2.6.7 Immunfärbung von Kryoschnitten**

Für die Immunfärbung von Kryoschnitten wurden für die Antikörperfärbung zunächst die optimalen Bedingungen ausgetestet. Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet, das Herz entnommen, in PBS gewaschen und in einem mit OCT (Sakura) gefüllten Aluminiumbehältnis orientiert und in N<sub>2</sub>-gekühltem Isopropanol eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zum Schneiden bei -80°C. Bevor die Herzen geschnitten werden konnten, wurden sie zunächst für mindestens 2 Stunden bei -20°C gelagert. Erforderte die Antikörperbindung eine PFA-Fixierung wurden die Mäuse durch eine tiefe Äthernarkose getötet und das Herz zunächst mit PBS, anschließend mit 4%igem PFA perfundiert und entnommen. Diese Art der Gewebebehandlung hat den Vorteil, dass das Gewebe besser erhalten bleibt und die Artefaktbildung beim Schneiden reduziert wird. Das Gewebe wurde ü.N. mit 4% PFA bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 30% Sucrose bei 4°C für 6 h. Das Gewebe wurde dann mit OCT (Sakura) eingebettet und am Kryostat (Cryocut 3000, Leica) bei -25°C 5-8 µm dick geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Histo Bond, Marienfeld) übertragen. Die Kryoschnitte wurden anschließend bei -20°C gelagert. Für die Immunfärbung wurden die Kryoschnitte 1 h bei 37°C getrocknet. Für unfixierte Schnitte wurden je nach Antikörper die Schnitte 10 Minuten mit Aceton fixiert und anschließend 30 min bei 37°C getrocknet. Danach erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung (10% Serum; 0,3% Triton; 0,2% BSA) für 1 h bei RT. Anschließend erfolgten 4 Waschschrte für jeweils 5 min mit PBS und die Inkubation bei 4°C ü.N. mit dem primären Antikörper (s. Tab. 4). Die Schnitte wurden dann 6x 10 min bei RT mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (s. Tab. 5) für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Für die Cx45-Färbung wurde ein biotinkonjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet und anschließend mit Streptavidin Alexa Fluor 555 bzw. 647 das Signal amplifiziert. Die Kerne wurden mit DAPI (1:1000 in PBS [Roth]) gefärbt und dafür 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 2x 5 min mit PBS und 3x 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Fluoreszenz-Mounting-Medium (DakoCytomation) eingedeckelt. Die Färbung wurde mit dem konfokalen Lasermikroskop (Leica SP5) verfolgt und die Bilder mit Adobe Photoshop CS3 analysiert.

### 3.2.6.8 Laserdissektionsmikroskopie

Zur Isolation von Gewebe aus dem AV-Knoten wurde das Gewebe zügig entnommen, in eiskaltem PBS-DEPC gewaschen und in einem OCT (Sakura) gefüllten Aluminiumgefäß in N<sub>2</sub>-gekühlten Isopropanol eingefroren und bei -80°C gelagert. Vor dem Schneiden wurde das Gewebe ca. 1 Stunde bei -20°C gelagert. Zum Schneiden wurde ein RNase-freies Kryostatmesser verwendet und dieses nach jedem Schnitt mit 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gesäubert. Es wurden von der Herz hinterwand ca. 200 µm entfernt und anschließend von dieser abwechselnd 5 µm Schnitte für die AChE-Färbung (s. 3.2.6.6) und 4x 10 µm für die Lasermikrodissektion verwendet. Das Aufziehen der Schnitte erfolgte auf die MMI-Objektträger unter Säubern des Gegenstücks mit RNaseZap (Sigma). Die Schnitte wurden kurzzeitig bei -20°C gelagert und noch am selben Tag für die Lasermikrodissektion verwendet. Zur Identifizierung des AV-Knotens wurde die AChE-Färbung bei 37°C für 2 h durchgeführt. Durch die AChE-positiven Schnitte konnten die dazwischenliegenden Schnitte für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet werden (s. 3.2.6.2.2). Durch die Übersichtsfärbung, anatomische Lage und Zellformunterschiede konnte die AV-Knotenregion auf den Schnitten identifiziert werden. Durch das Mikroskop (Nikon Eclipse TE 300) und Videokamera (Sony color video camera 3CCD) wurden die Schnitte ausgerichtet und mit dem Laser (MMI Cellcut Laser) der AV-Knotenbereich geschnitten. Dafür wurden über die Software (MMI-Cell Tools) die Laserstärke (85%), die Geschwindigkeit (8%) und der Fokus (55%) eingestellt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Unter RNase-freien Bedingungen wurden die Gewebestücke in eiskaltem Lysispuffer (RNeasyMicro Kit) überführt, gevortext und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert.

### 3.2.6.9 Elektronenmikroskopie

Die Ultrastrukturanalyse wurde in der Core-Facility-Elektronenmikroskopie durch Uta Wrackmeyer durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Ether getötet und anschließend die Herzen mit 4%-iger PFA-Lösung (4% PFA; 1,25% Glutardialdehyd [EM grade]; 0,08% Phosphatpuffer [1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O]) perfundiert. Ein kleines Stück des linken Ventrikels (2x2x2 mm) wurde in 2,5% Glutardialdehyd in Phosphatpuffer über Nacht bei 4°C fixiert. Das Gewebe wurde dann mit 1% OsO<sub>4</sub> für 2 h bei Raumtemperatur nachfixiert, mit aufsteigender Ethanolreihe und Propylenoxid dehydriert und in Poly/Bed<sup>R</sup> 812 (Polysciences, Inc., Eppelheim) unter Berücksichtigung der Orientierung eingebettet. Es wurden ultradünne Schnitte von 70 nm Dicke angefertigt und diese anschließend mit Uranylacetat und Bleicitrat

kontrastiert. Zur Analyse der Schnitte wurde das Elektronenmikroskop Zeiss 910 und die CCD Kamera von Proscan verwendet.

### **3.2.7 Apoptosebestimmung**

Die Apoptosebestimmung wurde sowohl auf Kryoschnitten als auch auf Paraffinschnitten durchgeführt. Zur Apoptosebestimmung wurden 5 µm Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden für 1 h bei 60°C inkubiert und dann 3x 5 Minuten in Rotihistol deparaffinisiert und anschließend in absteigender Alkoholreihe rehydriert (s. 3.2.6.1.2). Zur Demaskierung wurden die Schnitte 20 min in Natriumcitrat-Puffer (10 mM, pH 6,0) bis zum Sieden erhitzt und anschließend 20 min bei RT abgekühlt. Zur Bestimmung apoptotischer Zellkerne wurde der „In Situ Cell death detection kit, Fluorescein“ (Roche) verwendet und der Test lt. Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:1000 in PBS) durch 30-minütige Inkubation gefärbt. Für die Bestimmung erhöhter aktivierter Caspase 3-Aktivität wurden Paraffinschnitte wie unter 3.2.6.5 und Kryoschnitte wie unter 3.2.6.7 behandelt. Als primärer Antikörper wurde ein anti-Caspase 3-Antikörper (aktivierte Form, Cell Signaling) 1:100 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziegen-anti-Kaninchen (1:1000 in PBS) eingesetzt.

### **3.2.8 Proliferationsanalyse**

Zur Durchführung des Proliferationstestes wurden sowohl Paraffinschnitte nach 3.2.6.5 als auch Kryoschnitte nach 3.2.6.7 verwendet. Es wurde ein anti-Ki67-Antikörper (Novocastra) 1:500 verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde für Immunfluoreszenz ein Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper Alexa Fluor 555 verwendet.

### **3.2.9 Statistik**

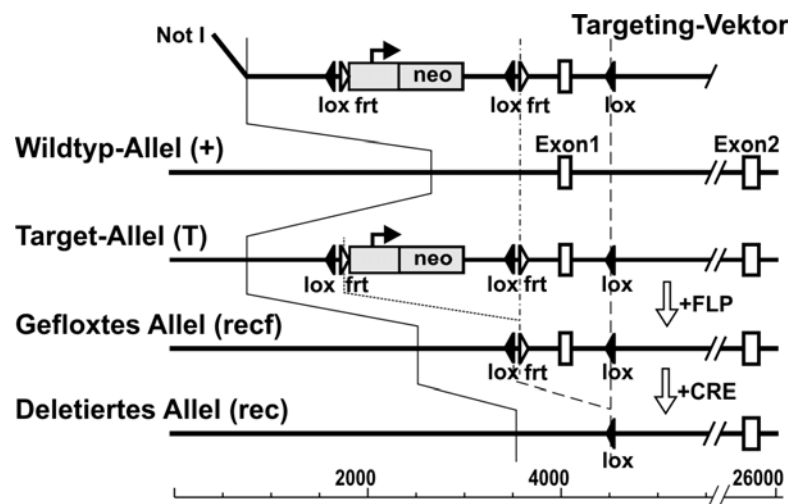
Für die Auswertung wurde die Prism 5.0-Software (GraphPad Software Inc.) verwendet. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Mittelwert aus den Messwerten jeder Gruppe durch den t-Test auf ihre Signifikanz hin geprüft. Für die EPU-Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test und für die hämodynamischen Daten (Konduktanzmessung) der Two-Way-Anova-Test verwendet. Dabei wurden P-Werte von \*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$  als signifikant angesehen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tiermodelle zur Unterschung von CAR im adulten und embryonalen Herzen

Zur Untersuchung der Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors im Herzen wurden zwei konditionelle CAR-KO-Modelle generiert. Das Exon 1 des CAR-Gens, welches das Translationsstartcodon ATG enthält, wurde von LoxP-Sequenzen flankiert. Die Deletion des Exon 1 erfolgte durch die Expression der Cre-Rekombinase. Die herzspezifische Expression dieses Enzyms wird durch den  $\alpha$ MHC (*alpha myosin heavy chain*)-Promotor gewährleistet. Zur zeitlichen Steuerung der Rekombination wurden außerdem MerCreMer (MCM)-Transgene Tiere genutzt, bei denen durch Injektion von Tamoxifen die Rekombination induziert werden kann. Tamoxifen, ein Östrogenanalogon, bindet an die mutierte Domäne des Östrogenrezeptors im Zytoplasma. Dieser wird in den Zellkern transloziert und kontrolliert so die Expression der Cre-Rekombinase (Sohal et al., 2001).



**Abb.7: Targeting-Strategie der CAR-KO-Modelle.** Das Exon 1 des CAR-Gens wurde mit LoxP-Sequenzen und einer Neomycinkassette, welche FRT-Sequenzen enthielt, flankiert. Die Neomycinkassette wurde durch die Expression der FLP-Rekombinase in der Keimbahn entfernt. Das „gefloxt“ CAR-Exon 1 wurde durch die Verpaarung von Lox homozygoten Tieren mit Cre positiven Tieren in den Kardiomyozyten deletiert. Es wurde ein herzspezifisches und ein induzierbares, herzspezifisches CAR-KO-Modell generiert. Unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors wird beim ersten die Cre-Rekombinase und beim zweiten das MCM-Fusionsprotein exprimiert.

#### 4.1.1 Verifizierung des $\alpha$ MHC-CAR-KO-Modells

Zur Untersuchung der Funktion von CAR im Herzen wurde ein herzspezifisches KO-Tiermodell analysiert. Unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors wird die Rekombinase ab dem 8 Tag der Embryonalentwicklung exprimiert (Molkentin et al., 1994). Da die publizierten konventionellen CAR-KO-Embryonen eine Herzfehlbildung entwickelten, die zur einer Letalität führte (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006), war zu erwarten, dass die herzspezifische Deletion von CAR ebenfalls letal verläuft. Es wurden deshalb Cre-positive, heterozygote Tiere mit homozygoten lox-Tieren verpaart, um eine Letalitätsuntersuchung an Embryonen ab einem Alter von 9 Tagen zu starten. Das schlagende Herz wurde dabei als Vitalitätskriterium gewertet. Die Deletion von CAR hatte bis zum Tag E11.5 der Embryonalentwicklung keine Auswirkung auf das Erscheinungsbild der Embryonen. Ab Tag E12.5 führte die Deletion allerdings zur Letalität. Nach Tag E13.5 konnten nur noch bereits resorbierte Embryonen beobachtet werden. Der prozentuale Anteil der genotypischen Verteilung unterlag dabei den Mendelschen Gesetzen (Tab. 11).

**Tab. 11: Embryonale Letalität des herzspezifischen CAR-KO-Modells.**

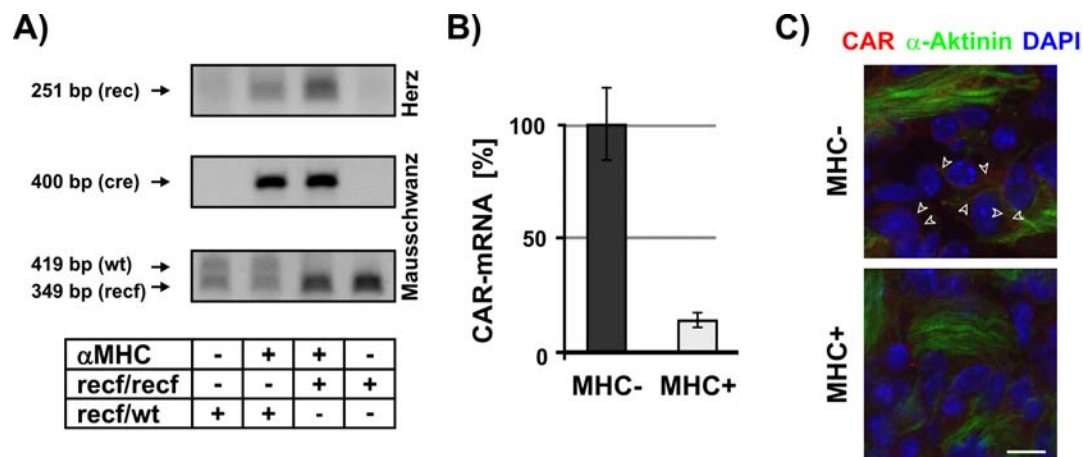
	MHC-		MHC+	
	CARrecf/wt	CARrecf/recf	CARrecf/wt	CARrecf/recf
<b>E9.5</b>	1 (20)	1 (20)	1 (20)	2 (40)
<b>E10.5</b>	1 (14)	3 (42)	2 (28)	1 (14)
<b>E11.5</b>	28 (33)	20 (23)	21 (24)	17 (20)
<b>E12.5</b>	16 (47)	8 (24)	9 (26)	1 (3)
<b>E13.5-15.5</b>	12 (48)	5 (20)	8 (32)	0
<b>&gt; P1</b>	95 (30)	137 (43)	85 (27)	0

Gezeigt ist die Anzahl und Prozentzahl (in Klammern) der lebenden Embryonen. Die herzspezifische CAR-Deletion führt zur embryonalen Letalität ab Tag E12.5. Die Verteilung der Genotypen erfolgte nach den Mendelschen Gesetzen. E: embryonales Alter; P: postnatales Alter

Die Bestimmung des Genotyps der Embryonen erfolgte durch PCR mit der aus dem Mausschwanz stammenden DNA. Wie erwartet, konnte bei den CAR-defizienten Embryonen ein PCR-Produkt der Cre-Rekombinase in der Mausschwanz-DNA von 400 bp und in der Herz-DNA eine Rec-Bande von 251 bp als Zeichen der Rekombination nachgewiesen werden (Abb. 8A). Nach erfolgreicher Deletion des CAR-Exons sollte sowohl die CAR-mRNA als auch das CAR-Protein herunterreguliert sein. Die Quantifizierung der CAR-mRNA durch

*Real time*-PCR ergab, dass CAR auf RNA-Ebene auf unter 20% im Vergleich zu den Kontrollembryonen reguliert war (Abb. 8B).

Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von CAR konnte auf Kryoschnitten embryonaler Herzen am Tag E11.5 CAR bei den Kontrollen, aber nicht bei den CAR-defizienten Embryonen gefärbt werden. Der CAR-Antikörper wurde von Prof. Dr. Fritz Rathjen zur Verfügung gestellt. In den Kontrollherzen ist CAR entlang der Zellmembran der Kardiomyozyten verteilt. Es wurde publiziert, dass eine CAR-Deletion im embryonalen Herzen zur Verminderung der Dichte und zur Desorganisation der Myofibrillen führt (Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Die korrekte Anordnung der Myofibrillen wurde mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Aktinin überprüft. Die Herzen beider Genotypen zeigten bei dieser Färbung keine Unterschiede. Die Organisation und Dichte der Myofibrillen blieb nach CAR-Deletion im embryonalen Herzen erhalten (Abb. 8C). Die Färbung wurde auch an isolierten embryonalen Kardiomyozyten am Tag E11.5 durchgeführt und bestätigte das oben beschriebene Ergebnis.



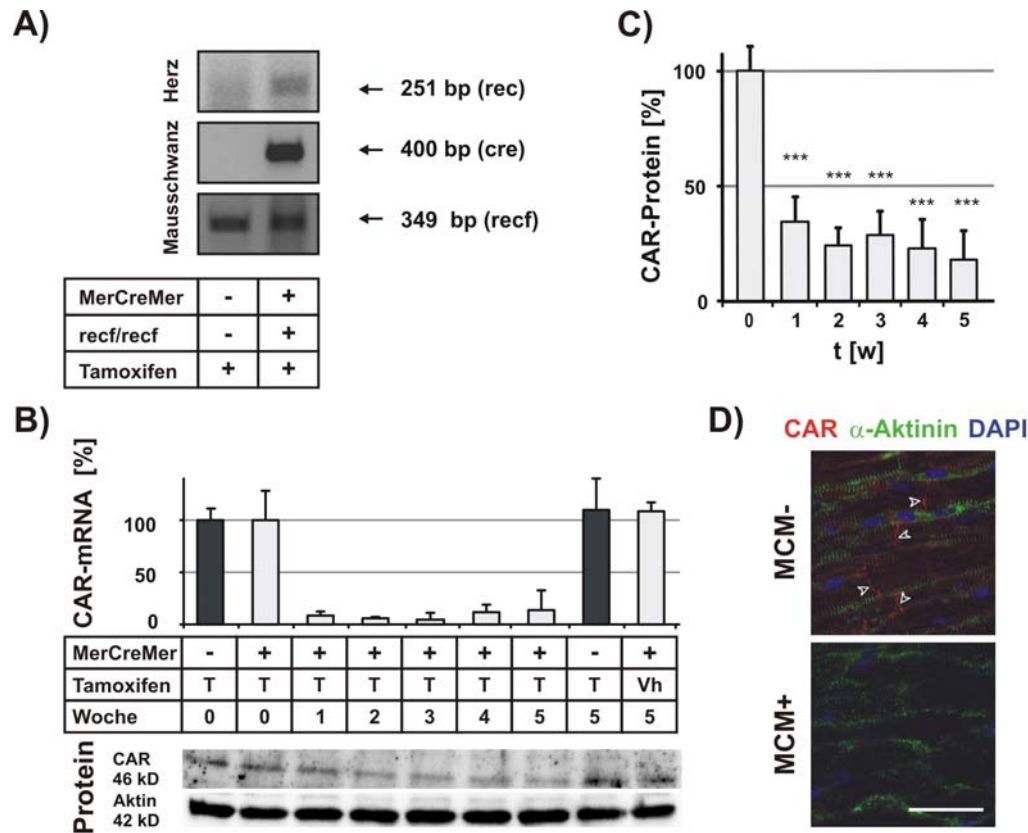
**Abb. 8: Verifizierung des herzspezifischen  $\alpha$ MHC-CAR-Knockouts.** A) PCR von geflochten, heterozygoten und KO-Embryonen. Bei Cre-positiven Embryonen konnten die Cre-Bande im Mausschwanz und die Rec-Bande im Herzen als Zeichen der Rekombination nachgewiesen werden. B) Die *Real time*-PCR gepoolter Herzen am Tag E11.5 (N=5) von CAR-defizienten Embryonen (MHC<sup>+</sup>) und Kontrollen (MHC<sup>-</sup>) zeigte eine Reduktion der CAR-mRNA unter 20% bei MHC<sup>+</sup>-Herzen im Vergleich zu MHC<sup>-</sup>-Herzen. C) Kryoschnitt eines MHC<sup>-</sup>-Herzens und eines MHC<sup>+</sup>-Herzes, immungefärbt mit Antikörpern gegen CAR und  $\alpha$ -Aktinin. CAR (rot, Pfeile) ist bei dem Kontrollherz entlang der Kardiomyozytenmembran lokalisiert, während der MHC<sup>+</sup>-Embryo keine CAR-Färbung im Herzen zeigte. Die  $\alpha$ -Aktinin-Färbung (grün) zeigte die regelrechte Anordnung der Myofibrillen bei MHC<sup>-</sup>- und MHC<sup>+</sup>-Herzen. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Messbalken: 10  $\mu$ m.

#### 4.1.2 Verifizierung des induzierbaren MCM-CAR-KO-Modells

Da die herzspezifische Deletion des CAR-Exon 1 zur embryonalen Letalität am Tag E12.5 führte, wurde ein induzierbares CAR-KO-Modell verwendet, um die Funktion von CAR im adulten Herzen der Maus näher zu charakterisieren. Durch die Injektion von Tamoxifen in den Intraperitonealraum der Maus konnte die CAR-Deletion im Herzen induziert werden. Eine Behandlungseinheit setzte sich aus einer täglichen Injektion von Tamoxifen über 5 Tage mit anschließender zweitägiger Injektionspause zusammen. Für die Experimente wurden nur männliche Tiere im Alter von 60 bis 80 Tagen injiziert. Zunächst wurde bei diesem Modell der Verlauf der CAR-Defizienz bestimmt, indem sowohl geflochte, Cre-positive (MCM<sup>+</sup>) als auch geflochte, Cre-negative Tiere (MCM<sup>-</sup>) mit Erdnussöl und dem in Öl gelösten Tamoxifen über verschiedene Zeiträume behandelt wurden. Die Behandlungsdauer war einwöchig (w1) bis fünfwöchig (w5). Zum Zeitpunkt vor der Behandlung (w0) und nach Beendigung jeder Behandlungseinheit (w1, w2, w3, w4, w5) wurde Herzgewebe für die Analysen entnommen. Die genotypische Bestimmung erfolgte durch PCR. Es wurde erwartet, dass die Behandlung mit Tamoxifen zur Deletion des CAR-Exon 1 im Herzen führt und dass mittels PCR eine Rec-Bande bei 251 bp, als Zeichen der Rekombination in der DNA des Herzens nachgewiesen werden kann. Das Ergebnis der Genotypisierung entsprach der Erwartung (Abb. 9A). Die Quantifizierung von CAR auf mRNA-Ebene wurde durch eine *Real time*-PCR analysiert. Bereits eine Woche nach der Tamoxifenbehandlung war die CAR-mRNA auf 10% im Vergleich zu den Kontrollen herunterreguliert (Abb. 9B).

Im Western Blot ist CAR als Proteinbande bei 46 kDa detektierbar und die quantitative Western-Blot-Analyse ergab eine signifikante Reduktion des CAR-Proteins auf 25% zum Zeitpunkt w5 im Vergleich zu geflochten, Cre-positiven Tieren ohne Induktion. Als Referenzprotein wurde Aktin verwendet (Abb. 9B und 9C). Zur Untersuchung der Lokalisation von CAR wurden Kryoschnitte von Herzen angefertigt und mit Antikörpern gegen CAR und  $\alpha$ -Aktinin immungefärbt. In Kardiomyozyten der Kontrollen ist CAR nachweisbarer Bestandteil der Glanzstreifen. Nach Behandlung mit Tamoxifen und Induktion der CAR-Defizienz konnte kein CAR-Signal mehr detektiert werden. Die  $\alpha$ -Aktinin-Färbung zeigte sowohl in den Kontrollherzen als auch in den CAR-defizienten Herzen eine korrekte Organisation der Myofibrillen in den Kardiomyozyten (Abb. 9D).

Die erfolgreiche Deletion von CAR konnte in dem verwendeten KO-Model auf DNA-, RNA- und Proteinebene bestätigt werden. Für alle nachfolgenden Analysen wurden die Tiere für 2 Wochen mit Tamoxifen behandelt.

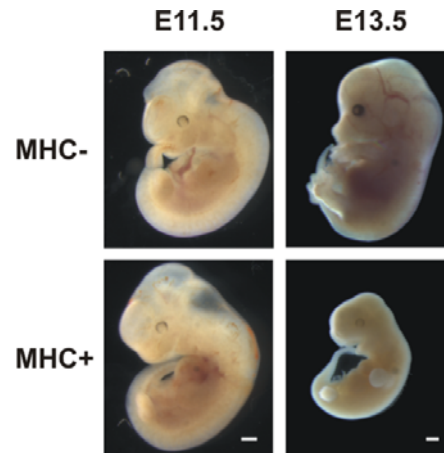


**Abb. 9: Verifizierung des induzierbaren CAR-KO-Modells.** A) Die Genotypisierung tamoxifenbehandelter Kontrolltiere ( $MCM^-$ ) und CAR-deletierter Tiere ( $MCM^+$ ) zeigte bei beiden eine Recf-Bande in der Mausschwanz-DNA. Bei  $MCM^+$ -Tieren konnte die Cre-Bande in der Mausschwanz-DNA und die Rec-Bande in der Herz-DNA nachgewiesen werden. B) Die *Real time*-PCR ergab ein Absinken der CAR-mRNA auf  $< 10\%$  im Vergleich zu den Kontrollen 1 Woche nach Induktion. C) Quantifizierende Western Blot Analyse ergab eine signifikante Reduktion des CAR-Proteins bis auf 25% im Vergleich zu nicht induzierten  $MCM^+$ -Herzen 5 Wochen nach Induktion. (N=3 pro Genotyp und Zeitpunkt) Signifikanztest: T-Test, \*\*\*  $P \leq 0,001$ . D) Immunfluoreszenzfärbung von CAR (rot, Pfeile) und  $\alpha$ -Actinin (grün) von Kryoschnitten adulter Herzen. In  $MCM^-$ -Herzen ist CAR in den Glanzstreifen lokalisiert. Bei  $MCM^+$  konnte kein CAR-Signal detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Messbalken: 25  $\mu m$ .

## 4.2 CAR ist für eine normale Herzentwicklung essentiell

Zur Untersuchung der Funktion von CAR im Herzen wurde ein konditioneller Knockout verwendet, bei welchem die Cre-Rekombinase-Expression durch den  $\alpha$ MHC-Promotor kontrolliert wird. Die durchgeführte Letalitätsanalyse ergab, dass die CAR-Deletion zur

embryonalen Letalität am Tag E12.5 führte. CAR-defiziente Embryonen waren bis zum Tag E11.5 in der Entwicklung unauffällig, während ab Tag E12.5 tote Embryonen und zum späteren Zeitpunkt (ab E13.5) nur noch resorbierte Embryonen zu beobachten waren (Abb. 10).

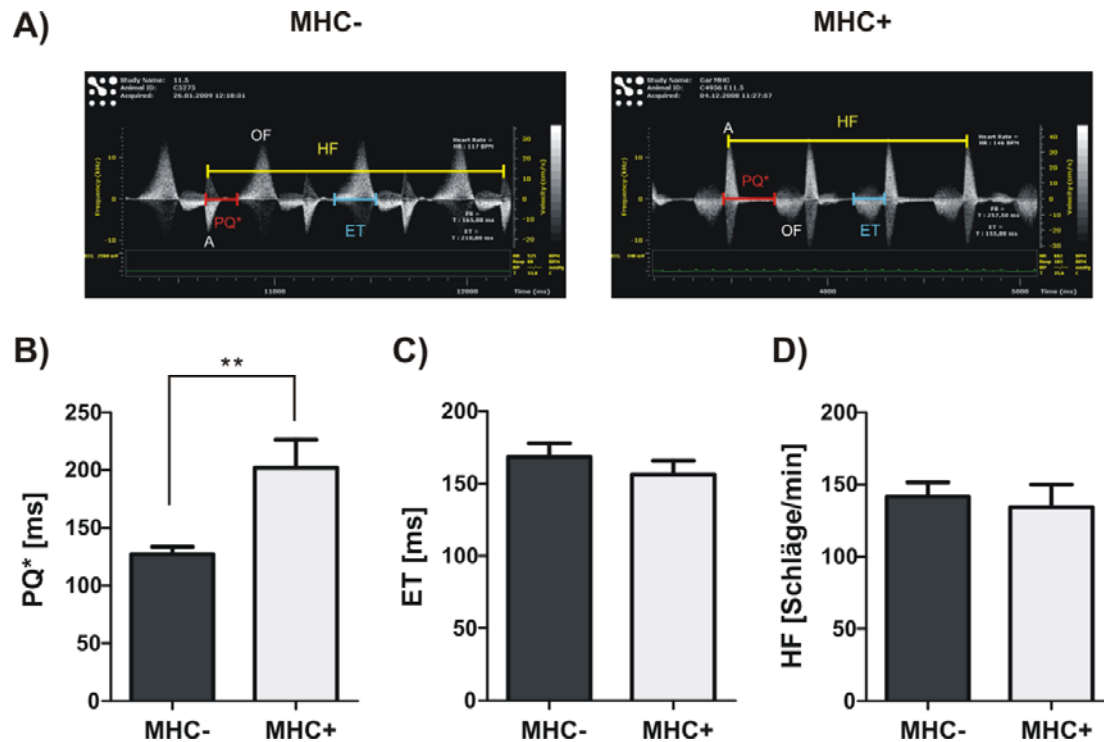


**Abb. 10: Aufnahmen von Embryonen im Alter E11.5 und E13.5.** CAR-defiziente Embryonen (MHC<sup>+</sup>) zeigten in der Entwicklung bis zum Tag E11.5 keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen (MHC<sup>-</sup>). Die Deletion des CAR-Exon 1 führte zu einer embryonalen Letalität am Tag E12.5. Nach Tag E13.5 waren die CAR-defizienten Embryonen bereits resorbiert. Messbalken: 500  $\mu$ m.

#### 4.2.1 Bei CAR-defizienten Embryonen ist die atrio-ventrikuläre Erregungsüberleitung verlängert

Zur Untersuchung der embryonalen Herzfunktion wurde eine Ultraschall-Doppler-Untersuchung *in utero* in der Core-Facility-Ultraschall unter der Leitung von Dr. Arnd Heuser von Martin Taube durchgeführt. Dadurch war es möglich, die Herzfrequenz (HF), die linksventrikuläre Ejektionszeit (*ejection time*, ET) und das PQ\*-Intervall zu messen. Der Blutfluss von den Vorhöfen in die Ventrikel durch die Mitralklappe wird durch den A-Peak repräsentiert und ist analog der atrialen Depolarisation. Das Ausflusstraktsignal (*outflow*, OF) entsteht durch den durch die Aortenklappe fließenden Blutstrom und korreliert zeitlich mit der beginnenden Depolarisation des Ventrikels. Um die Erregungsüberleitungszeit von den Vorhöfen zu den Kammern zu ermitteln, wurde die Zeit von Beginn des A-Peaks bis zum Beginn des Ausflusstraktsignals gemessen (Abb. 11A). Dieses Intervall (PQ\*) ist mit dem PQ-Intervall des EKGs vergleichbar (Lim et al., 2008). Die so ermittelten PQ\*-Intervalle von jeweils 10 Embryonen eines Genotyps zeigten, dass bei CAR-defizienten Embryonen eine signifikante Verlängerung ( $P=0,0084$ ) der PQ-Zeit vorlag (Abb. 11A). Die Differenz der gemittelten PQ\*-Intervalle zu den Kontrollen lag bei 75 ms. Dagegen sind die ET-Intervalle

und die Herzfrequenzen der CAR-defizienten Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Abb. 11B und 11C). Um Einflüsse der Mutter während der Messung auszuschließen, wurden die Herzfrequenzen und die Temperaturen der Muttertiere gemessen und dokumentiert. Beide Parameter lagen im Normbereich. Die herzspezifische Deletion von CAR führte zu einer verzögerten Erregungsüberleitung von den Vorhöfen zu den Herzkammern.



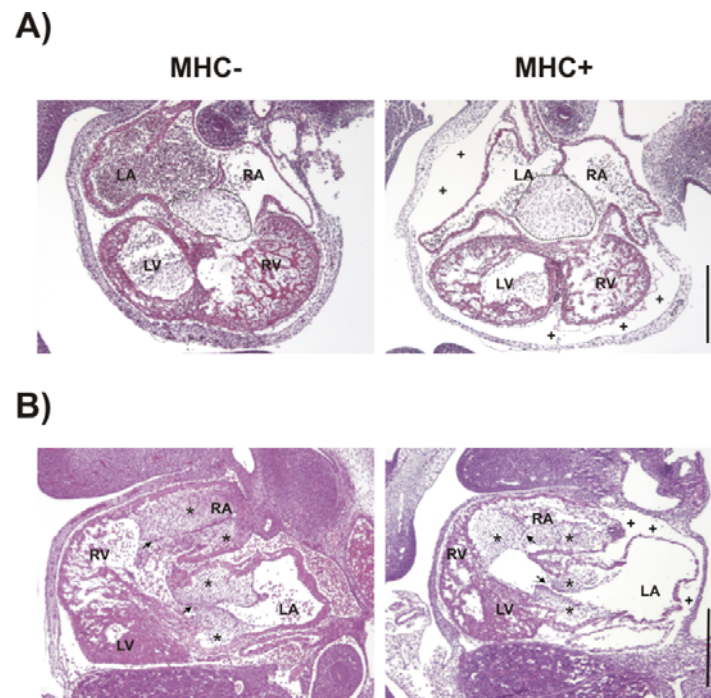
**Abb. 11: Die herzspezifische CAR-Deletion führte zu einer atrio-ventrikulären Überleitungsstörung.** A) Repräsentative Doppler-Ultraschall-Aufzeichnung eines CAR-defizienten Embryos (MHC<sup>+</sup>) und einer Kontrolle (MHC<sup>-</sup>) am Tag E11.5. Das PQ\*-Intervall (rot) wurde von Beginn des A-Peaks bis zum Beginn des Ausflusstraktsignals (OF) gemessen. Das ET-Intervall (blau) erstreckt sich vom Beginn bis zum Ende des OF-Signals. Die Herzfrequenz (HF, gelb) wurde über 4 Herzschläge ausgehend vom A-Peak gemessen. B) MHC<sup>+</sup>-Embryonen zeigten am Tag E11.5 im Vergleich zu den Kontrollen (MHC<sup>-</sup>) ein signifikant verlängertes PQ\*-Intervall. C) Das ET-Intervall war durch die CAR-Deletion unverändert. D) Die Herzfrequenzen der untersuchten Embryonen lagen im Normbereich (N=20). Signifikanztest: T-Test, \*\*, P ≤ 0,01.

#### 4.2.2 CAR-defiziente Embryonen haben eine normal entwickelte Herzstruktur

Durch die herzspezifische Deletion von CAR und die festgestellte Letalität am Tag E12.5 konnte eine Veränderung der Herzstruktur erwartet werden. Dafür wurden Paraffinschnitte

von E11.5 alten Embryonen mit Hämatoxylin & Eosin (HE) gefärbt und im Lichtmikroskop untersucht. Es konnte kein Unterschied in der allgemeinen Herzstruktur festgestellt werden, jedoch war ein beginnendes perikardiales Ödem bei CAR-defizienten Embryonen als Zeichen eines insuffizienten Herzens zu beobachten. Es waren bei CAR-defizienten Embryonen beidseitig Vorhöfe, Herzkammern und beide atrio-ventrikulären Kanäle vorhanden. Die Herzklappen und die Größe des endokardialen Kissens waren in KO-Embryonen und Kontrollen nicht unterschiedlich entwickelt (Abb. 12A und 12B).

Die herzspezifische CAR-Deletion führte zur Entwicklung eines perikardialen Ödems, jedoch nicht zu einer lichtmikroskopisch beobachtbaren veränderten Herzmorphologie am Tag E11.5.

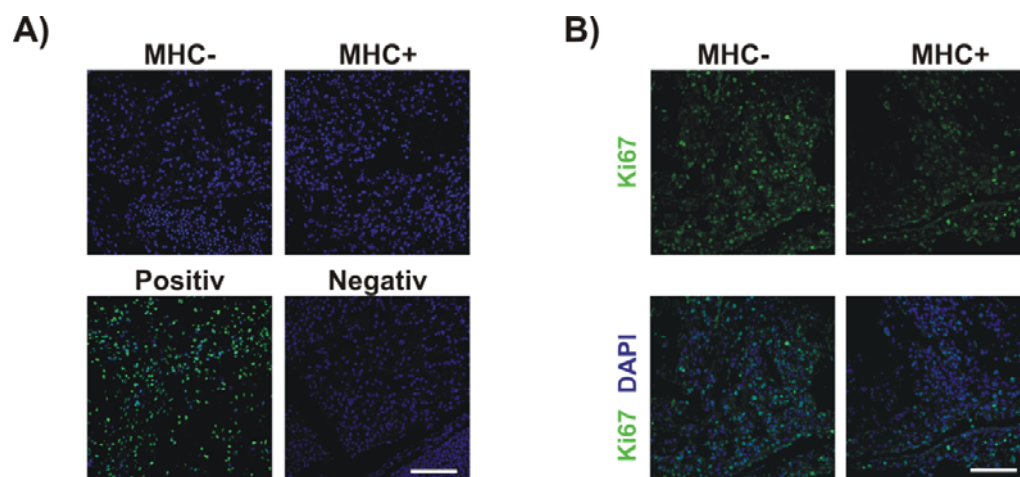


**Abb. 12: CAR-defiziente Embryonen zeigten ein beginnendes perikardiales Ödem bei sonst normal entwickelter Herzstruktur am Tag E11.5.** HE gefärbte Paraffinschnitte von Herzen CAR-defizienter Embryonen (MHC<sup>+</sup>) und Kontrollen (MHC<sup>-</sup>) in transversaler und sagitaler Schnittebene zeigten normal entwickelte Vorhöfe, Herzkammern, Herzklappen sowie beidseitig vorhandene atrio-ventrikuläre Kanäle. Bei CAR-defizienten Embryonen zeigte sich ein beginnendes perikardiales Ödem (gekennzeichnet durch +). Pfeile weisen auf die atrio-ventrikulären Kanäle und \* auf die Herzklappen. Die unterbrochende Linie umrandet das endokardiale Kissen. LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; LA: linkes Atrium; RA: rechtes Atrium; Messbalken: 500 µm.



### 4.2.3 CAR-Defizienz führt im embryonalen Herzen weder zur Apoptose noch zu erhöhter Proliferation

Da die herzspezifische Deletion des CAR-Exon 1 zur embryonalen Letalität am Tag E12.5 führte, konnte erwartet werden, dass das Gleichgewicht zwischen proliferierenden und apoptotischen Signalen bei der Herzentwicklung gestört ist. Zur Untersuchung wurden Paraffinschnitte von Embryonen am Tag E11.5 für einen TUNEL *assay* verwendet. Die bei der Apoptose entstehenden DNA-Einzelstrangbrüche können mittels eines Cell Death Detection-Kits (Roche) durch Fluorescein nachgewiesen werden. Nach Färbung der Zellkerne mit DAPI ist es möglich, apoptotische Zellkerne zu identifizieren. Ein weiteres Zeichen für eine Apoptose ist das verstärkte Vorhandensein der aktivierten Form der Caspase 3. Dafür wurden Paraffinschnitte von Embryonen am Tag E11.5 mit einem Antikörper gegen das Spaltprodukt der Caspase 3 gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnten weder TUNEL-positive Zellkerne (Abb. 13A), noch ein verstärktes Caspase 3-Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Morphologisch konnten keine Apoptosezeichen, wie Chromatinkondensation und verkleinerte Zellkörper nachgewiesen werden.



**Abb. 13: Untersuchung von Apoptose und Proliferation nach herzspezifischer CAR-Deletion an embryonalen Herzschnitten am Tag E11.5.** A) Der TUNEL *assay* zur Detektion apoptotischer Zellkerne zeigte keine positiven Kerne bei CAR-defizienten Embryonen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI (blau) verwendet. Die zur Beurteilung des *assays* durchgeführte Positivkontrolle wies apoptotische Zellkerne (grün) nach. Da die Negativkontrolle keine apoptotischen Zellkerne anfärbte, konnte von der korrekten Durchführung des Experimentes ausgegangen werden. B) Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-Ki67-Antikörper (grün) und DAPI-Färbung (blau). Es konnte keine verstärkte Proliferation bei CAR-defizienten Tieren (MHC<sup>+</sup>) im Vergleich zu den Kontrollen (MHC<sup>-</sup>) nachgewiesen werden. Messbalken: 100  $\mu$ m.

Zur Untersuchung der Proliferation wurden Paraffinschnitte von Embryonen am Tag E11.5 mit dem Proliferationsmarker Ki67 gefärbt und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte im Herzen CAR-defizienter Tiere kein verstärktes Ki67-Signal beobachtet werden (Abb. 13B).

Die herzspezifische CAR-Deletion führte im embryonalen Herzen zu keiner verstärkten Apoptose bzw. Proliferation.

### **4.3 Kardiologische Phänotypisierung der adulten CAR-defizienten Tiere**

Nach Verifizierung des Modells (s. 4.1.2) wurden die Tiere zwei Wochen mit Tamoxifen behandelt. Da als Folge der Deletion eine veränderte Herzfunktion zu erwarten war, wurden die Tiere zunächst kardiologisch untersucht.

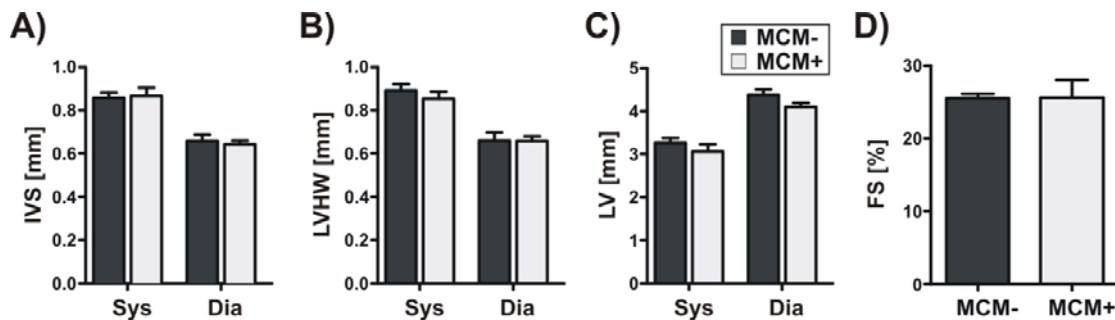
#### **4.3.1 Die Entwicklung einer Kardiomyopathie bei CAR-Defizienz ist altersabhängig**

Da CAR als ein Tight Junction-Protein durch Dimerisierung den Kontakt benachbarter Epithelzellen vermittelt, war anzunehmen, dass CAR in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten eine analoge Funktion ausübt. Eine CAR-Defizienz könnte daher zur Störung der interzellulären Verbindungen der Kardiomyozyten führen und eine strukturelle Veränderung des Myokards im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) begünstigen. Zur Untersuchung der Herzmorphologie und Herzfunktion wurde ein Herzultraschall (Echokardiographie) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der CAR-Defizienz in der Core-Facility-Ultraschall durchgeführt. Da bereits nach einwöchiger Tamoxifenbehandlung die Deletion von CAR verifiziert wurde (s. 4.1.2), wurde mit der Untersuchung zu den Zeitpunkten w1, w2 und w3 Wochen nach der Induktion begonnen. In der Routineuntersuchung wurden die Wanddicken und Durchmesser während der Systole (Sys) und Diastole (Dia) des linken Ventrikels ermittelt und daraus die Verkürzungsfraction (*Fractional Shortening*, FS) und die Ejektionsfraction (EF) berechnet. Die FS ergibt sich aus dem Verhältnis der Differenz des enddiastolischen und endsystolischen Ventrikeldurchmessers zum enddiastolischen Durchmesser und ist die Verkürzung des Herzens während der Kontraktion. Die EF ist das Verhältnis des Schlagvolumens zum enddiastolischen Volumen und ist ein Maß für die systolische Herzfunktion. Das Schlagvolumen berechnet sich durch die Differenz aus

enddiastolischen und endsystolischen Volumen. FS und EF werden als relative Werte angegeben (Wilkenshoff und Kruck, 2008).

Bei den CAR-defizienten Tieren und Kontrolltieren waren die Abmessungen des ventrikulären Septums (IVS, Abb. 14A), der linksventrikulären Hinterwand (LVHW, Abb. 14B), der linke Ventrikeldurchmesser (LV, Abb. 14C) und die daraus berechneten Parameter FS (Abb. 14D) und EF zwischen beiden Genotypen unverändert.

Eine Deletion von CAR führte entgegen der Erwartung zu keiner Beeinträchtigung der kontraktile Eigenschaften des Herzes.

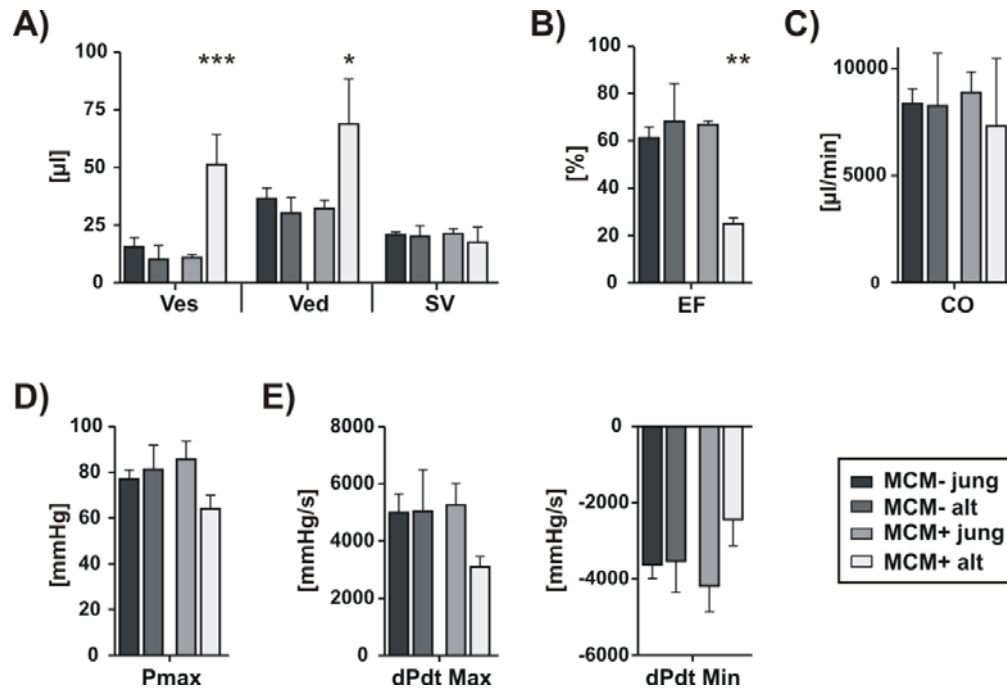


**Abb. 14: Echokardiographie an CAR-defizienten Tieren (MCM<sup>+</sup>) und Kontrollen (MCM<sup>-</sup>).** A) Das Ventrikelseptum (IVS), B) die linksventrikuläre Hinterwand (LVHW) sowie C) der Ventrikeldurchmesser (LV) waren während der Systole (Sys) und Diastole (Dia) bei MCM<sup>+</sup>-Tieren im Vergleich zu MCM<sup>-</sup>-Tieren drei Wochen nach der Induktion unverändert (N=14). Fehlerbalken repräsentieren SEM.

Da bei den untersuchten Tieren keine Anzeichen einer dilatativen Kardiomyopathie zu diagnostizieren waren und sich das Risiko für diese Erkrankung mit zunehmendem Alter erhöht (Elkilany et al., 2008), wurde zusätzlich eine Herzkatheteruntersuchung an Tieren unterschiedlichen Alters von Dr. Dirk Westerman an der Charité durchgeführt. Die Positionierung des Katheters in den linken Ventrikel (LV) erlaubte die kontinuierliche Messung der Druck-Volumen-Änderung. Durch die Messung des linksventrikulären, endsystolischen Drucks ( $P_{\max}$ , mmHg) konnten Rückschlüsse auf die systolische Funktion des linken Ventrikels geschlossen werden. Durch die Änderung des Drucks pro Zeiteinheit  $dP/dt_{\max}$  [mmHg/s] konnte die Kontraktilität beurteilt werden. Die allgemeine Herzfunktion wurde mittels der endsystolischen und enddiastolischen Volumina ( $V_{es}$  und  $V_{ed}$ , [μl]) sowie der EF [%] ermittelt. Das Herzzeitvolumen (*cardiac output*, CO) wurde durch das Schlagvolumen und die Herzfrequenz berechnet. CAR-defiziente Tiere im Alter von 2-3 Monaten hatten eine normale Herzfunktion, während eine CAR-Defizienz bei älteren Tieren (5-6 Monate) zu

erhöhten endsystolischen und enddiastolischen Volumina sowie eine verringerte Ejektionsfraktion führte (Abb. 15A und 15B).

Eine CAR-Defizienz führte nur in älteren Tieren zu einer dilatativen Kardiomyopathie.



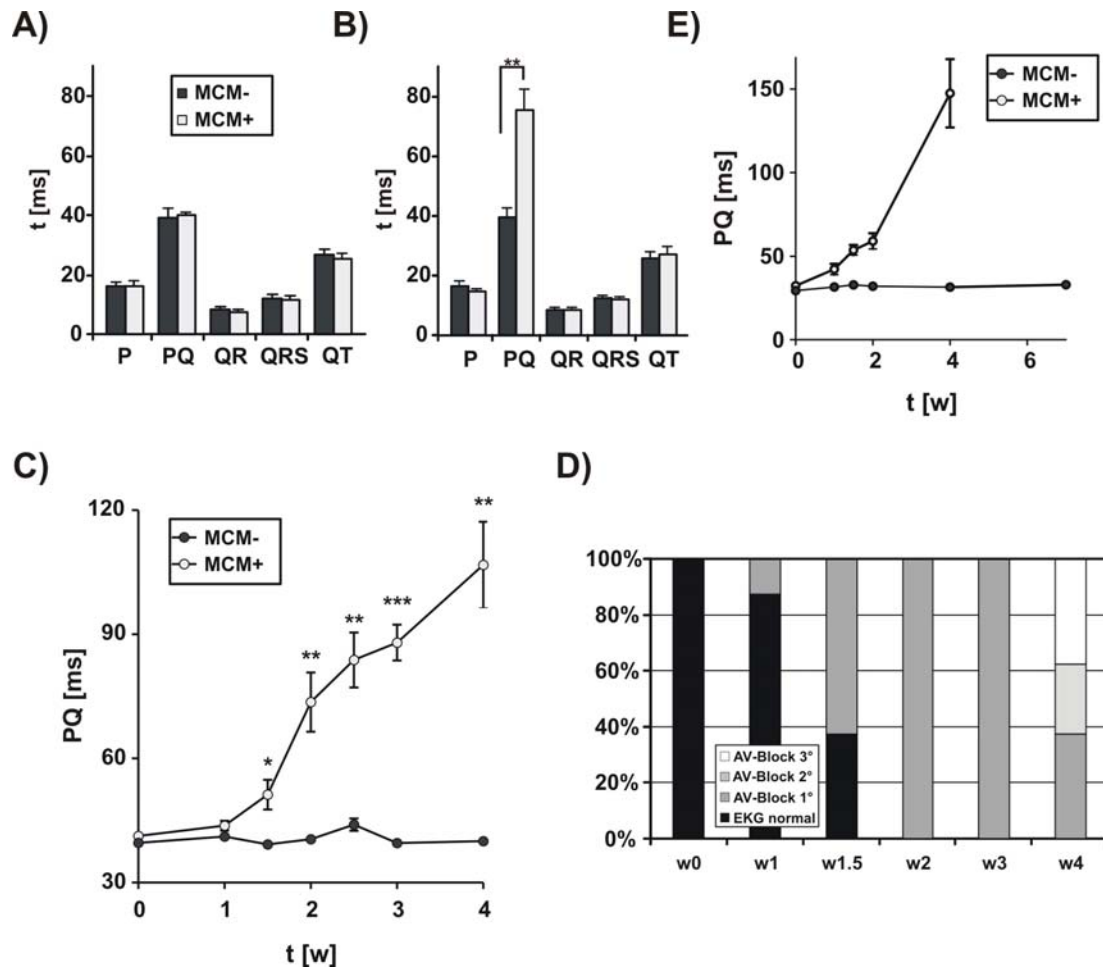
**Abb. 15: Herzkatheteruntersuchung CAR-defizienter junger (2-3 Monate) und älterer Tiere (5-6 Monate).**

A, B) CAR-defiziente, 2-3 Monate alte Tiere zeigten eine normale Herzfunktion, während eine CAR-Defizienz bei älteren Tieren (5-6 Monate) zu erhöhten endsystolischen (Ves) und enddiastolischen (Ved) Volumina sowie zu einer verringerten Ejektionsfraktion (EF) führte. Das Schlagvolumen (SV) war unverändert. C) Das Herzzeitvolumen (*cardiac output*, CO) war zwischen beiden Genotypen unverändert. D) Der linksventrikuläre endsystolische Druck (Pmax) und E) Änderung des Drucks pro Zeiteinheit dP/dt Max [mmHg/s] waren unverändert. Die Änderung des enddiastolischen Drucks pro Zeit dP/dt Min [mmHg/s] war ebenfalls unverändert (N=19). Fehlerbalken repräsentieren SEM. Signifikanztest: Two-Way-Anova, \*, P ≤ 0,05; \*\*, P ≤ 0,01; \*\*\*, P ≤ 0,001.

#### 4.3.2 CAR-Deletion in der adulten Maus führt zu einem AV-Block

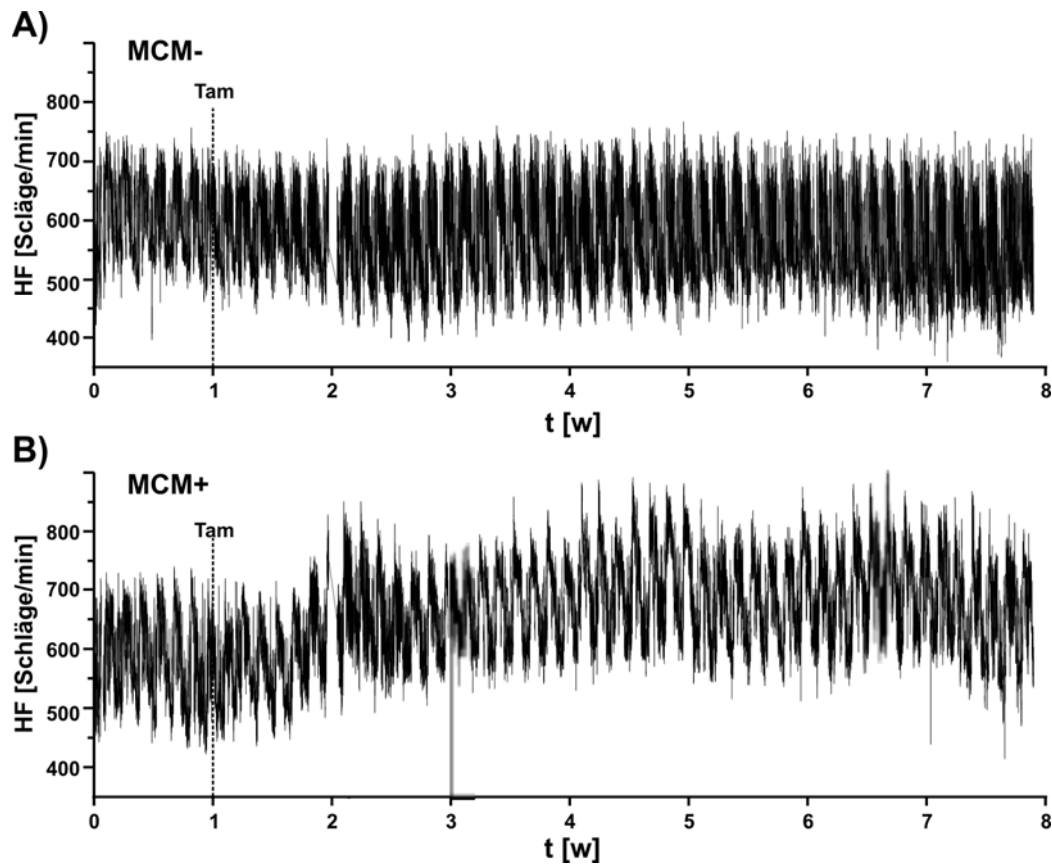
Die Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen CAR-deletierten Tieren und Kontrollen. Die routinemäßige Aufnahme des EKGs während des Ultraschalls wies jedoch pathologische Auffälligkeiten auf. Die Durchführung eines Oberflächen-EKGs zeigte bei CAR-defizienten Tieren eine progrediente Erregungsleitungsblockade zwischen Vorhöfen und Herzkammern (AV-Block). Für eine genauere elektrophysiologische Untersuchung mittels Oberflächen-EKG wurde ein neues Experiment mit jeweils 8 Tieren jeden Genotyps gestartet, um den zeitlichen Verlauf der

Blockade zu charakterisieren. Zum Zeitpunkt w0 wurde kein Tier mit Tamoxifen behandelt und alle Tiere zeigten normale EKG Aufzeichnungen (Abb. 16A).



**Abb. 16: CAR-Deletion im adulten Herzen führt zu einem AV-Block.** A) Alle EKG-Parameter waren zum Zeitpunkt vor Induktion (w0) zwischen CAR-defizienten Tieren (MCM<sup>+</sup>) und Kontrolltieren (MCM<sup>-</sup>) unverändert (N=8 pro Genotyp). B) 2 Wochen nach Induktion (w2) war das PQ-Intervall von MCM<sup>+</sup>-Tieren erhöht. Andere Parameter waren nicht betroffen. C) Das PQ-Intervall von MCM<sup>+</sup> und MCM<sup>-</sup> gemessen zum Zeitpunkt vor Induktion (w0) bis 4 Wochen nach Induktion (w4) war bereits nach 1,5 Wochen signifikant bei MCM<sup>+</sup> verlängert. Das PQ-Intervall verlängerte sich progredient und zeitlich parallel zur Induktion der CAR-Defizienz. D) Das erhöhte PQ-Intervall korrelierte mit der Entwicklung eines AV-Blockes 1. bis 3. Grades. Zum Zeitpunkt vor der Injektion (w0) zeigten alle MCM<sup>+</sup>-Tiere ein normales EKG. Nach der Induktion haben alle Tiere mit CAR-Defizienz einen AV-Block 1. Grades. Zum Zeitpunkt 4w erhöhte sich der Anteil der höhergradigen AV-Blockierungen. E) Um einen Effekt der Anästhesie auszuschließen, wurde eine telemetrische EKG-Aufzeichnung bis 8 Wochen nach Induktion durchgeführt, die das Ergebnis des Oberflächen-EKGs bestätigte. Das PQ-Intervall der CAR-defizienten Tiere verlängerte sich progredient. Ab 4 Wochen nach der Induktion war es durch das Auftreten höhergradiger AV-Blockierungen nicht mehr möglich ein konstantes PQ-Intervall zu messen (N=6). Fehlerbalken repräsentieren SEM. Signifikanztest: T-Test, \*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ .

Bereits 1,5 Wochen nach Induktion der CAR-Deletion zeigten die  $MCM^+$ -Tiere erste Zeichen einer Erregungsblockade, welche sich in einem verlängerten PQ-Intervall von  $51 \pm 4$  ms im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $39 \pm 1$  ms) äußerte (Abb. 16C). Ein verlängertes PQ-Intervall entspricht einem AV-Block 1. Grades, welcher bei allen CAR-defizienten Tieren ab 2 Wochen nach Induktion (Abb. 16B und 16D) gemessen wurde. Höhergradige Blockierungen der Erregungsleitung konnten ab der Woche 4 diagnostiziert werden. So hatten 25% der Tiere mit CAR-Defizienz einen AV-Block 2. Grades und 37,5% eine komplette Unterbrechung der Erregungsleitung zwischen Vorhöfen und Herzkammern, was als AV-Block 3. Grades bezeichnet wird (Abb. 16D). Die Diagnosen wurden von Dr. Robert Fischer gestellt.

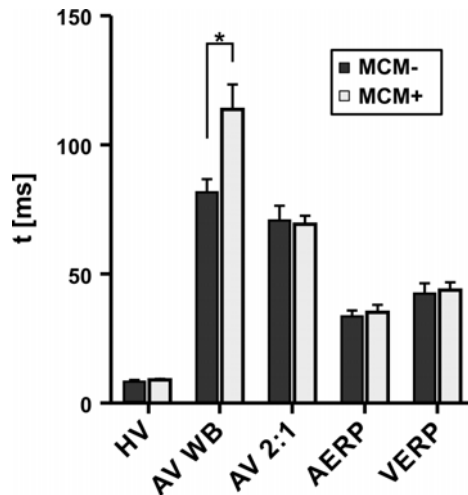


**Abb. 17: Telemetrische Untersuchung der Herzfrequenz in CAR-defizienten Tieren.** Repräsentative telemetrische Aufzeichnungen der Herzfrequenz von A) einem Kontrolltier ( $MCM^+$ ) und B) einem CAR-defizienten Tier ( $MCM^+$ ) zeigten zwischen beiden Genotypen keine unterschiedliche Herzfrequenz. Bereits 2 Wochen nach der Induktion, erhöhte sich die Herzfrequenz des CAR-defizienten Tieres im Vergleich zur Kontrolle.

Um einen Effekt der Anästhesie auszuschließen, wurden zusätzlich CAR-defiziente Tiere und Kontrolltiere durch eine telemetrische EKG-Aufzeichnung bis 8 Wochen nach Induktion 24 h überwacht. Die Untersuchung wurde am MDC durch Ralph Plehm und Raika Langanki durchgeführt. Das PQ-Intervall der CAR-defizienten Tiere verlängerte sich progredient. Ab 4 Wochen nach Induktion war es durch das Auftreten höhergradiger AV-Blockierungen nicht mehr möglich ein PQ-Intervall zu messen (Abb. 16E). Durch die telemetrische Untersuchung konnte festgestellt werden, dass sich die Herzfrequenz bei CAR-defizienten Tieren 2 Wochen nach der Induktion im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte. Die Herzfrequenz der Kontrolltiere war nach der Tamoxifenbehandlung unverändert (Abb. 17).

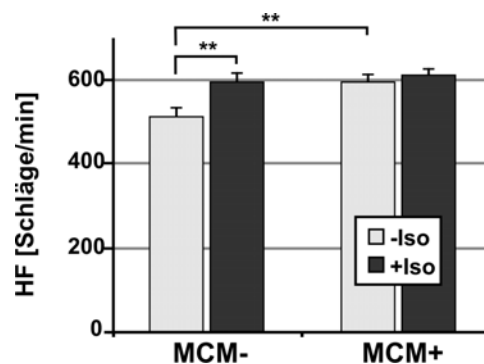
#### **4.3.3 Die Funktion von Sinus- und AV-Knoten ist in CAR-KO-Tieren beeinträchtigt**

Zur genaueren Charakterisierung des elektrophysiologischen Phänotyps und um die Ätiologie des atrio-ventrikulären Erregungsleitungsdefektes näher zu beschreiben, wurde eine *in vivo* elektrophysiologische Untersuchung (EPU) an CAR-defizienten Tieren (N=12) und Kontrollen (N=11) 4 Wochen nach der KO-Induktion von Dr. Robert Fischer durchgeführt. Dazu wurde ein Herzkatheter in den rechten Vorhof und anschließend in die rechte Herzkammer platziert. Über diesen Katheter war es möglich elektrische Signale der Vorhöfe und Herzkammern aufzunehmen sowie zusätzlich das Myokard elektrisch zu stimulieren, um differentialdiagnostisch die Form der Arrhythmie zu definieren. Außerdem wurde die Herzaktivität pharmakologisch durch die Gabe von Isoproterenol beta-adrenerg stimuliert. Aus den erhaltenen Aufnahmen der elektrischen Herzsignale konnten Parameter bestimmt werden, welche Aufschluss über den Ursprungsort der Arrhythmie gaben. Zwischen den Tieren mit CAR-Defizienz und den Kontrollen gab es keine signifikanten Unterschiede in den atrialen (AERP) und ventrikulären Refraktärperioden (VERP). Ebenso waren das His-Ventikel-Intervall (HV) sowie die AV-Knoten 2:1-Erregungszeit (AV 2:1) unverändert. Es konnten weder in den Vorhöfen noch in den Herzkammern Arrhythmien nach einer elektrischen Stimulation induziert werden. Die Katheterisierung des rechten Vorhofes zeigte, dass die Weckebach-Periodizität (AV-WB), welche die elektrische Leitung von den Vorhöfen zu den Ventrikeln repräsentiert, in den Tieren mit CAR-Defizienz im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verlängert war (Abb. 18). Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Oberflächen-EKGs zum Zeitpunkt 4w (s. 4.3.2) konnten auch bei dieser Untersuchung bei CAR-defizienten Tieren AV-Blockierungen vom ersten bis zum dritten Grad festgestellt werden.



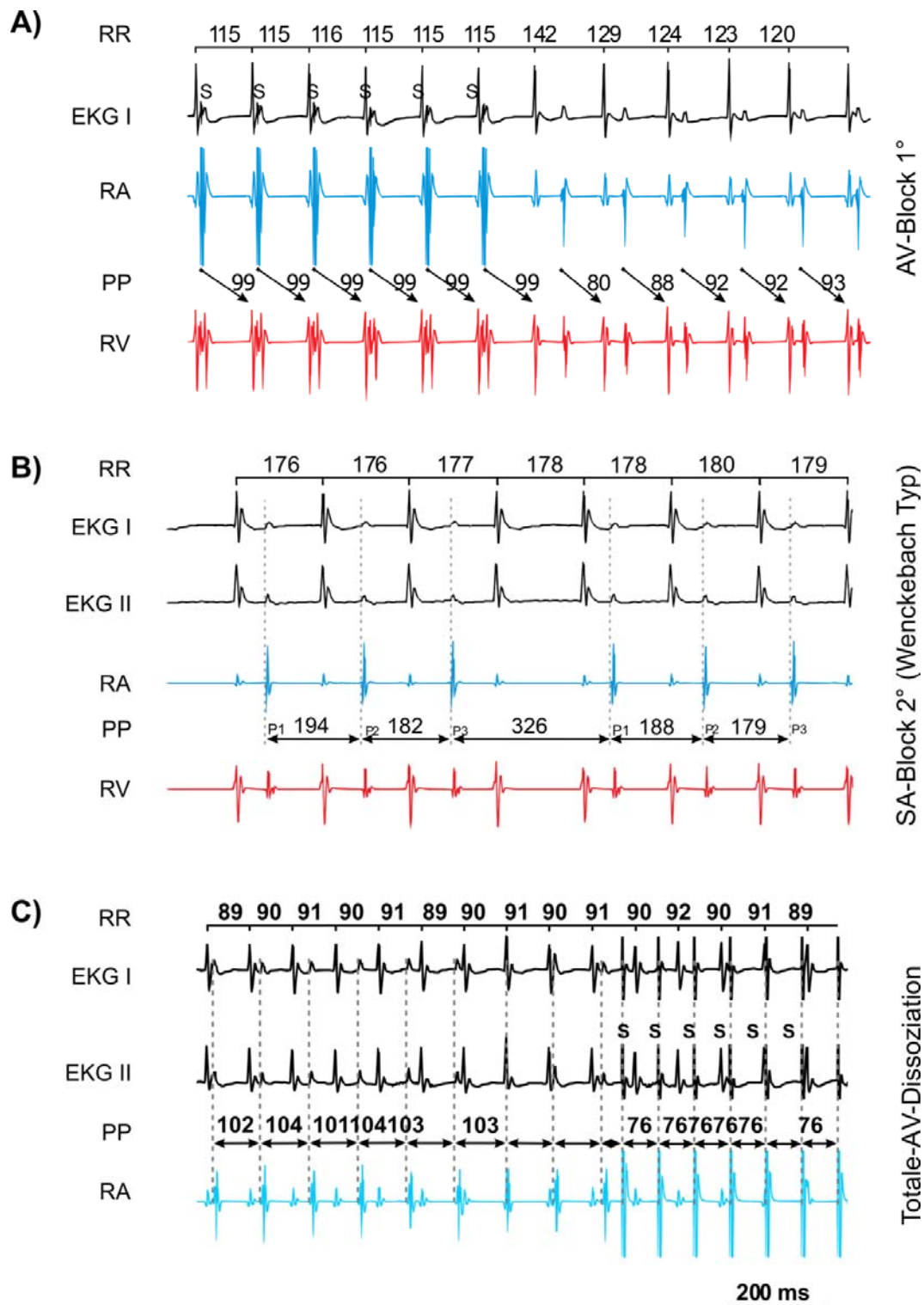
**Abb. 18: Phänotypisierung durch eine *in vivo* elektrophysiologische Untersuchung (EPU).** Durch die Katheterisierung CAR-defizienter Tiere (MCM<sup>+</sup>) und Kontrollen (MCM<sup>-</sup>) 4 Wochen nach der Induktion konnten folgende Parameter bestimmt werden, die unverändert waren: His-Ventrikel (HV)-Intervall, AV-Knoten 2:1-Erregungszeit (AV 2:1), atriale (AERP) und ventrikuläre effektive Refraktärzeit (VERP). Es konnte dadurch eine Beteiligung des His-Bündels ausgeschlossen werden. Einzig signifikant erhöht war die Wenckebach-Periodizität (AV-WB). Fehlerbalken repräsentieren SEM. Signifikanztest: Mann-Whitney-U-Test, \*,  $P \leq 0,05$ .

Die Verabreichung von Isoproterenol hatte keinen Effekt auf die atrio-ventrikuläre Erregungsleitung. Die Herzfrequenz von CAR-defizienten Tieren war durch die Anwesenheit AV-junktionaler Ersatzrhythmen im Vergleich zu den Kontrolltieren vor der Isoproterenolapplikation tachykard. Nach intraperitonealer Injektion von Isoproterenol erhöhte sich, wie erwartet werden konnte, die Herzfrequenz bei den Kontrolltieren. Die tachykarde Herzfrequenz konnte bei CAR-defizienten Tieren durch Isoproterenol nicht weiter gesteigert werden (Abb. 19).



**Abb. 19: Herzfrequenzabhängigkeit nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol.** Bei Kontrollherzen (MCM<sup>-</sup>) wird die Herzfrequenz durch Isoproterenol gesteigert. Bei Tieren mit CAR-Defizienz (MCM<sup>+</sup>) ist die Herzfrequenz zu den Kontrollen ohne Stimulation signifikant erhöht und konnte nach Isoproterenolgabe nicht weiter gesteigert werden. Fehlerbalken repräsentieren SEM. Signifikanztest: Mann-Whitney-U-Test, \*\*,  $P \leq 0,01$ .





**Abb. 20: In CAR-defizienten Herzen ist neben der AV-Knoten-Funktion auch die Sinusknotenfunktion beeinträchtigt.** A) Gezeigt sind hier die simultanen Aufnahmen vom Oberflächen-EKG und der intrakardialen Signale durch die EPU des rechten Vorhofes (RA-blau) und des rechten Ventrikels (RV-rot). Das erste Auftreten des KO-Phänotyps war der eines AV-Blockes 1. Grades. Durch die elektrische Stimulation (S) konnte die elektrische Erregungsleitung zwischen Vorhöfen und Herzkammern in CAR-defizienten Tieren nachgewiesen werden, jedoch war das PQ-Intervall konstant verlängert. Der letzte elektrische Stimulus wurde von einem

verlängerten RR-Intervall (142 ms) gefolgt. Der initiierte Sinusrhythmus war langsamer als vor der elektrischen Stimulation mit einer teilweisen Verbesserung der atrio-ventrikulären Leitung, ersichtlich aus dem kürzeren PQ-Intervall ( $PQ < 80$  ms). Die erhöhte Herzrate (kurze RR-Intervalle) führte zu einer verzögerten AV-Leitung (erhöhte PQ-Intervalle). B) Die CAR-Defizienz führte zu einer Beeinträchtigung der elektrischen Leitung im AV-Knoten und im Sinusknoten. Beispielaufnahme eines sinu-atrialen Blocks 2. Grades, Wenckebach Typ. Die sinu-atriale Erregung war zunächst nur verzögert (PP zum Beginn 182 ms) bis zur Blockierung, die sich durch ein PP-Intervall von 326 ms darstellt. Kombiniert mit dem SA-Block kommt es hier zu einer völligen Unterbrechung der atrio-ventrikulären Leitung. C) Beispielaufnahme eines totalen AV-Blocks. Nach der Stimulation verkürzten sich die PP-Intervalle, die RR-Intervalle blieben dabei unbeeinflusst. Dies resultierte aus einer elektrischen Entkopplung von Vorhöfen und Kammern.

Durch die EPU war es ebenfalls möglich, im Gegensatz zum Oberflächen-EKG, die Funktion des Sinusknotens zu beurteilen. So konnten auch SA-Blockierungen festgestellt werden (Abb.: 20). Bei 50% der CAR-defizienten Tiere wurde das Syndrom eines kranken Sinusknotens (Sick-Sinus-Syndrom) diagnostiziert. Diese Form der Funktionsstörung äußerte sich in einer Sinusknoten-Tachykardie oder -Bradykardie. Zusätzlich konnten junktionale Rhythmen bei 50% der CAR-defizienten Tiere festgestellt werden, die ihren Ursprung in der AV-Knoten Region hatten. Eine Zusammenfassung der elektrophysiologischen Defekte in CAR-defizienten Tieren gibt Tab. 12. Demzufolge führte eine CAR- Deletion zu einer Beeinträchtigung der Funktion des AV-Knotens und des Sinusknotens, während die ventrikulären Bestandteile des Erregungsleitungssystems, wie His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern unbeeinträchtigt waren.

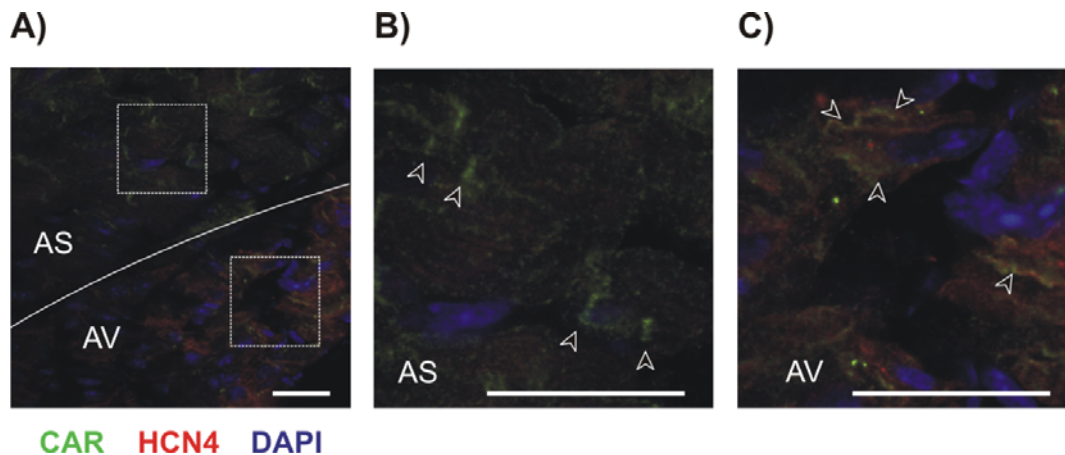
**Tab. 12: Charakterisierung der Erregungsleitungsdefekte mittels EPU-Katheter.**

	MCM-	MCM+
<b>Normal</b>	11 (100)	0
<b>AV-Überleitungsdefekt</b>	0	12 (100)
<b>AVB 1°</b>	0	3 (25)
<b>AVB 2°</b>	0	1 (8)
<b>AVB 3°</b>	0	8 (67)
<b>Sick-Sinus-Syndrom</b>	0	6 (50)
<b>Sinustachykardie</b>	0	2 (17)
<b>Sinubradykardie</b>	0	4 (33)
<b>AV-Junktionaler Rhythmus</b>	0	6 (50)

Es ist die Anzahl der Tiere mit der Diagnose und in Klammern die Prozentzahl der Tiere angegeben.



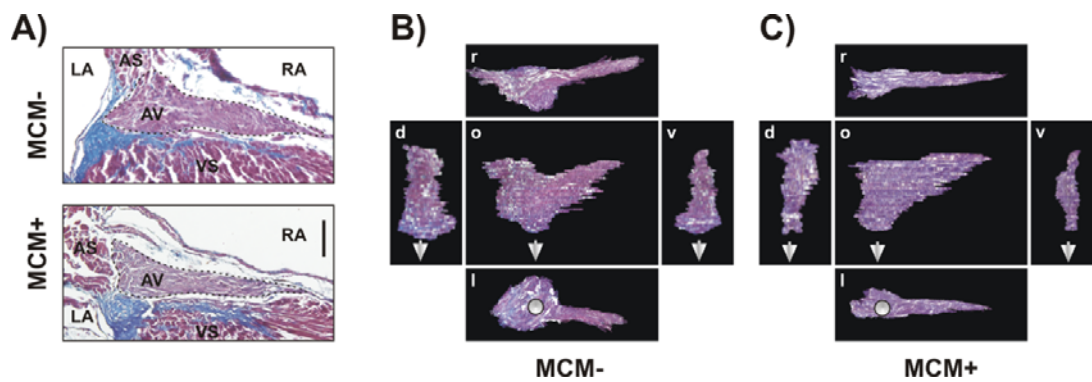
Um die Expression von CAR im AV-Knoten nachzuweisen, wurden nach Identifizierung der AV-Knotenregion durch die AChE-Färbung Kryoschnitte mit Antikörpern gegen CAR und HCN4, einem Markerprotein des Erregungsleitungssystems (Yamamoto et al., 2006), co-immun gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine unterschiedliche Verteilung von CAR in AV-Knotenzellen im Vergleich zu den atrialen Kardiomyozyten (Abb. 22A). Während CAR im Atrium Bestandteil der Glanzstreifen ist (Abb. 22B), ist CAR im Nodalbereich in der Membran der AV-Knotenzellen homogen verteilt (Abb. 22C).



**Abb. 22: Lokalisation von CAR im AV-Knoten.** A) Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von CAR im AV-Knoten: CAR (grün) und HCN4 (rot). Die Quadrate zeigen Vergrößerungen in B und C. B) CAR (Pfeile) ist im atrialen Septum in den Glanzstreifen lokalisiert. C) Im Gegensatz zu atrialen Kardiomyozyten ist CAR (Pfeile) in AV-Knotenzellen entlang der Membran verteilt. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Messbalken: 25  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2 Eine CAR-Defizienz führt zu einer veränderten AV-Knoten-Morphologie

Durch die Entwicklung eines AV-Blocks in adulten CAR-defizienten Tieren war anzunehmen, dass dieser zu einer Veränderung der AV-Knoten-Morphologie führt. Zur histologischen Beurteilung des AV-Knotens wurden von Herzen CAR-defizienter Tiere ( $\text{MCM}^+$ ) und Kontrollen ( $\text{MCM}^-$ ) 8 Wochen nach Induktion Schnittserien durch den AV-Knotenbereich angefertigt und nach Masson trichromgefärbt (Abb. 23A). Vergleiche sequentiell gefärbter Paraffinschnitte zeigten eine geringe Reduktion der AV-Knotenfläche in  $\text{MCM}^+$ -Herzen (N=4) im Vergleich zu den Kontrollherzen (N=4). Zur Quantifizierung wurde das AV-Knotenvolumen mittels einer 3D-Rekonstruktion berechnet (Abb. 23B und 23C). Bei  $\text{MCM}^+$ -Herzen war das Volumen um ca.  $\frac{1}{3}$  geringer ( $6,2 \pm 1,9 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; N=2), als bei den  $\text{MCM}^-$ -Herzen ( $10,9 \pm 1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; N=2).

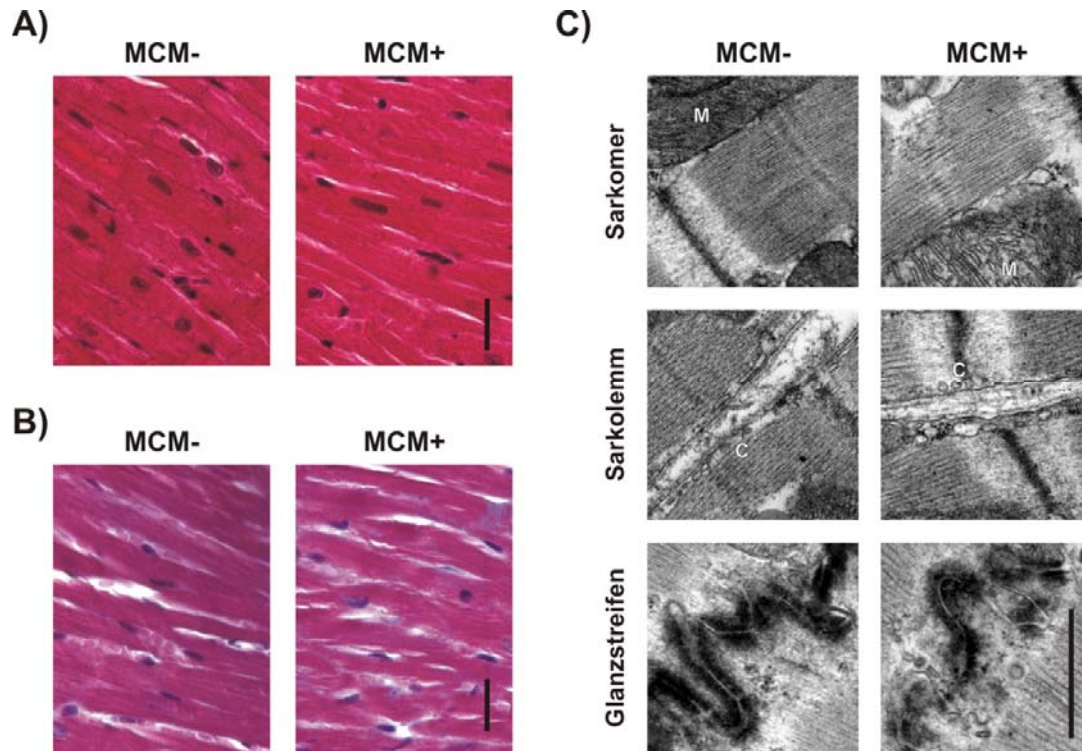


**Abb. 23: Verringerte Größe des AV-Knotens in adulten Herzen von CAR-defizienten Tieren.** A) Masson-Trichrom-Färbung von MCM<sup>-</sup> und MCM<sup>+</sup>-Herzen 8 Wochen nach der Induktion zur Färbung des AV-Knotens und Identifizierung des umgebenden Bindegewebes. Der zentral fibröse Körper der Trikuspidalklappe erscheint blau und der AV-Knoten (AV) kann vom umgebenden Myokard unterschieden werden. VS: ventrikuläres Septum; AS: atriales Septum; LA: linkes Atrium; RA; rechtes Atrium. B, C) Dreidimensionale Rekonstruktion des AV-Knotens von einem B) MCM<sup>-</sup> und C) einem MCM<sup>+</sup>-Herzen zur Untersuchung des AV-Knotens in verschiedenen Ebenen (o, oben; l, links; r, rechts; d, dorsal; v, ventral). Die verringerte Größe spiegelt sich auch in einem reduzierten Volumen des AV-Knotens wieder. Das Volumen des AV-Knotens der MCM<sup>+</sup>-Tiere war um ca.  $\frac{1}{3}$  reduziert im Vergleich zu den Kontrollen (N=4). Die Überleitung zum His-Bündel wird durch die weißen Pfeile angezeigt. Messbalken: 100  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Das Ventrikelmyokard ist nach CAR-Deletion strukturell unverändert

Um strukturelle Veränderungen in der Herzmuskulatur zu untersuchen wurden Paraffinschnitte von CAR-defizienten Herzen und Kontrollen 2, 4 und 8 Wochen nach Induktion mit Hämatoxylin & Eosin gefärbt, wodurch unter dem Lichtmikroskop das Zytoplasma hellrot und die Zellkerne dunkelblau erscheinen. Nach lichtmikroskopischer Betrachtung konnten keine Veränderungen der Herzmuskulatur nach CAR-Defizienz festgestellt werden (Abb. 24A). Pathologische Prozesse am Herzen gehen häufig mit einem Umbau der Herzmuskulatur einher, wobei Herzmuskelgewebe durch Bindegewebe ersetzt wird. Durch eine Masson-Trichrom-Färbung werden solche kollagenen Fasern durch eine Blaufärbung dargestellt und grenzen sich daher deutlich vom Zytoplasma der Kardiomyozyten ab. Es wurden Paraffinschnitte von CAR-defizienten Herzen und Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (2w, 4w, 8w) trichromgefärbt. Außer der physiologisch vorhandenen Bindegewebsstrukturen, wie z.B. der Herzklappen, war zu den untersuchten Zeitpunkten kein vermehrtes Bindegewebe zu beobachten (Abb. 24B).

In den lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen gab es keinen Hinweis, dass eine CAR-Defizienz im Herzen zu strukturellen Veränderungen oder zu bindegewebigen Umbauprozessen im Ventrikelmyokard führt.



**Abb. 24: Die Struktur des Herzmuskels ist in CAR-defizienten Tieren unverändert.** Paraffinschnitte von Kontrollherzen (MCM<sup>-</sup>) und CAR-defizienten Herzen (MCM<sup>+</sup>) wurden zum Zeitpunkt 8w mit A) Hämatoxylin & Eosin, oder B) nach Masson trichromgefärbt. Bindegewebe und Kollagen zeichnen sich durch eine Blaufärbung ab. Das Zytoplasma der Herzmuskelzellen ist rot, die Zellkerne sind schwarz gefärbt. Messbalken: 20  $\mu$ m. C) In der Ultrastrukturanalyse von Herzen CAR-defizienter Tiere und Kontrollen 12 Wochen nach Induktion gab es keine Hinweise auf Veränderungen zwischen MCM<sup>+</sup> und MCM<sup>-</sup> in der Sarkomerstruktur, den lateralen Zellgrenzen und Glanzstreifen. Die Größe der Mitochondrien sowie die Anzahl der Clathrinvesikel waren zwischen beiden Genotypen unverändert. C: Zytosol; M: Mitochondrium. Messbalken: 500 nm.

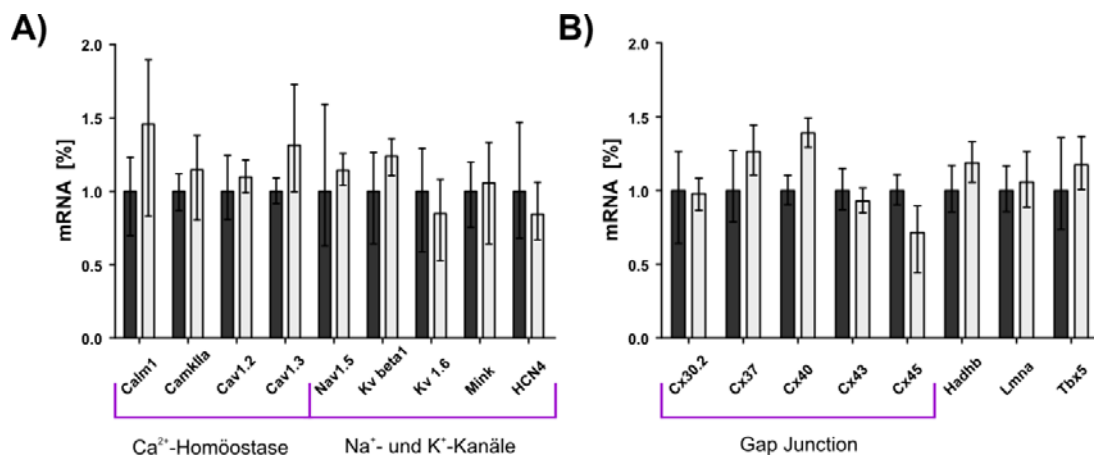
Da lichtmikroskopisch keine Veränderungen der Struktur zu beobachten waren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen in der Core-Facility durch Uta Wrackmeyer durchgeführt. Die Ultrastrukturanalyse der Zellkontakte zwischen Kardiomyozyten erfolgte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzen CAR-defizienter Tiere und Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktion (4w, 5w, 12w). Die Ultrastruktur der Membran und der Glanzstreifen waren zwischen beiden Genotypen unverändert. Die Kardiomyozyten der MCM<sup>+</sup>-Tiere zeigten keine veränderte Größe der Mitochondrien, was durch oxidativen Stress verursacht werden könnte. Bei gestörten endozytotischen Vorgängen

ist zu erwarten, dass die Anzahl an Clathrinvesikeln verändert ist. Dies war bei CAR-defizienten Tieren nicht zu beobachten (Abb. 24C).

Eine CAR-Defizienz führt demzufolge zu keiner strukturellen Veränderung der Zellkontakte zwischen Kardiomyozyten des Ventrikelmyokards. Typische Veränderungen der Zellen, die bei oxidativem Stress oder gestörter Endozytose auftreten, wurden nicht festgestellt.

#### **4.4.4 CAR-Deletion führt zu einer veränderten Expression von Connexinen**

Aufgrund der umfassenden elektrophysiologischen Untersuchung war es möglich, die Ursache des AV-Blocks auf eine Funktionsstörung im AV-Knoten örtlich zu begrenzen. Da es sich um eine Unterbrechung der elektrischen Leitung handelt, war zu erwarten, dass insbesondere die Expression von Genen verändert ist, welche für Kanäle kodieren, die an der Aktionspotentialbildung oder elektrischen Zell-Zell-Kopplung beteiligt sind. Zur RNA-Isolation wurden Vorhöfe und Ventrikel CAR-defizienter Tiere und Kontrollen verwendet, um die daraus umgeschriebene cDNA für eine *Real time*-PCR zu verwenden. Um die Expression von Genen zu untersuchen, die mit dem Auftreten des elektrophysiologischen Phänotyps assoziiert sein könnten, wurde eine *Real time*-PCR mit cDNA der Vorhöfe zum Zeitpunkt w4 durchgeführt. Es wurde die Expression Calciumstoffwechsel-regulierender Gene, wie Calmodulinkinase IIa (CamkIIa), Calmodulin 1 (Calm1) sowie der spannungsabhängigen Calciumkanäle, Cav1.2 und Cav1.3, analysiert (Abb. 25A). Es wurde kein Unterschied in der Regulation dieser Gene zwischen den MCM<sup>+</sup>- und MCM<sup>-</sup>-Herzen beobachtet. Die Expressionsanalyse von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Nav1.5, Nav1.7) und Kaliumkanälen (Kv1.2, Kvβ1, Kv1.6, Mink) sowie dem nukleotidabhängigen HCN4-Kanal zeigte ebenfalls keine Veränderung zwischen beiden Genotypen (Abb. 25A). Die Untersuchung der Expression der herzspezifischen Connexine Cx30.2, Cx40, Cx43 und Cx45 war ebenfalls nicht beeinflusst. Cx37, als ein Connexin des Gefäßendothels, wurde zusätzlich in die Analyse miteinbezogen und war ebenfalls nicht reguliert (Abb. 25B). Weitere Gene (Tbx5, Hadhb und Lmna), welche in publizierten Tiermodellen mit einem verlängerten PQ-Intervall assoziiert sind (Casimiro et al., 2001; Mori et al., 2006; Kao et al., 2006), waren nach CAR-Deletion im Vergleich zu den Kontrollen in der Expression unverändert (Abb. 25B).



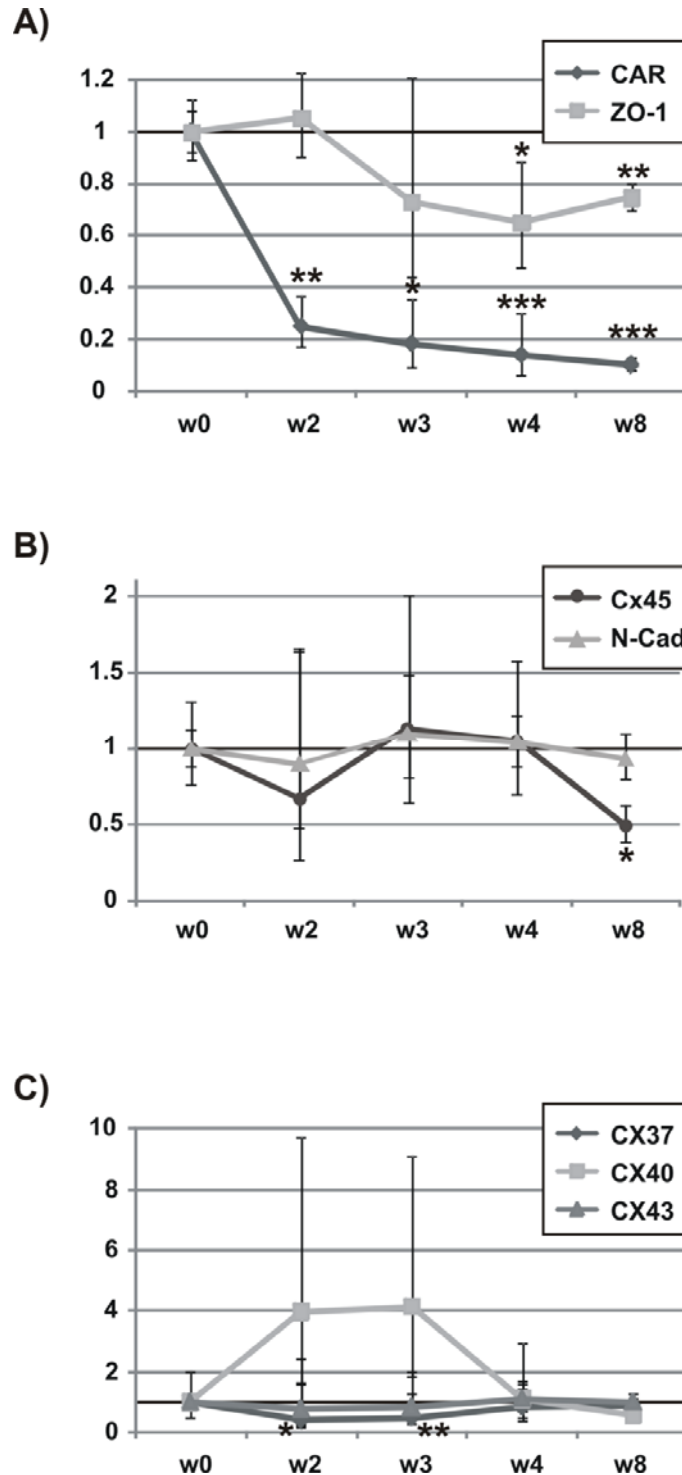
**Abb. 25: Real time-PCR von Vorhöfen CAR-defizienter Tiere (MCM<sup>+</sup>) und Kontrollen (MCM<sup>-</sup>) 4 Wochen nach der Induktion.** Gene, die A) am Calciumstoffwechsel beteiligt sind oder B) für Kalium- und Natriumkanäle kodieren, waren in ihrer Expression unverändert. C) Cx37, als Bestandteil der Gap Junctions des Gefäßendothels, war ebenfalls nicht reguliert. Die Expression der herzspezifischen Connexine (Cx30.2, Cx40, Cx43, Cx45) war unverändert. D) Die Expression der Phänotyp-assoziierten Gene Tbx5, Hadhb und Lmn war von der CAR-Deletion unbeeinflusst (N=3). Fehlerbalken repräsentieren die SD.

Zur Untersuchung des grundlegenden Mechanismus des AV-Blocks wurde ein *Dye coupling assay* von Dr. Rene Jüttner am MDC durchgeführt, um die Funktion der Gap Junctions zu untersuchen. Dafür wurden Herzschnitte CAR-defizienter Tiere und Kontrollen verwendet. Einzelne Kardiomyozyten wurden mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein injiziert. Dieses Experiment machte es möglich die direkte Zell-Zell-Kommunikation zwischen Kardiomyozyten zu untersuchen. Parallel zum zeitlichen Verlauf der AV-Blockierung nahm die zelluläre Austauschfläche von Woche 3 bis 4 bei den CAR-defizienten Kardiomyozyten signifikant zu (Lisewski et al., 2008).

Da dieses Experiment auf eine Beeinträchtigung der Gap Junction-Funktion hinwies, wurde die Expressionsanalyse auf das Ventrikelmyokard ausgeweitet und die Expression von Connexinen speziell im Zeitraum (w0, w2, w4, w8) der Phänotypentwicklung analysiert. Für dieses Experiment wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils 3 Tiere untersucht. CAR war ab dem Zeitpunkt w2 in CAR-defizienten Herzen signifikant reduziert. Sein Adapterprotein ZO-1 wurde ab Woche 4 nach Induktion signifikant herunterreguliert (Abb. 26A). Mit der Entwicklung des Phänotyps wurde auch die Expression von einigen Connexinen verändert. Die Connexin 37-mRNA ist zum Zeitpunkt w2 und w3 kurzzeitig signifikant verringert (Abb. 26C). Die anderen Connexine sind zu diesen Zeitpunkten unverändert. Jedoch ist 8 Wochen nach der Induktion (w8) die Cx45-Expression signifikant niedriger im Vergleich zu den



Kontrollen. Die Expression von N-Cadherin ist zu allen Zeitpunkten unbeeinflusst geblieben. Durch die herzspezifische CAR-Deletion war neben dem Adapterprotein ZO-1 auch Connexin 45 langfristig im Ventrikelmyokard herunterreguliert (Abb. 26 A, B).

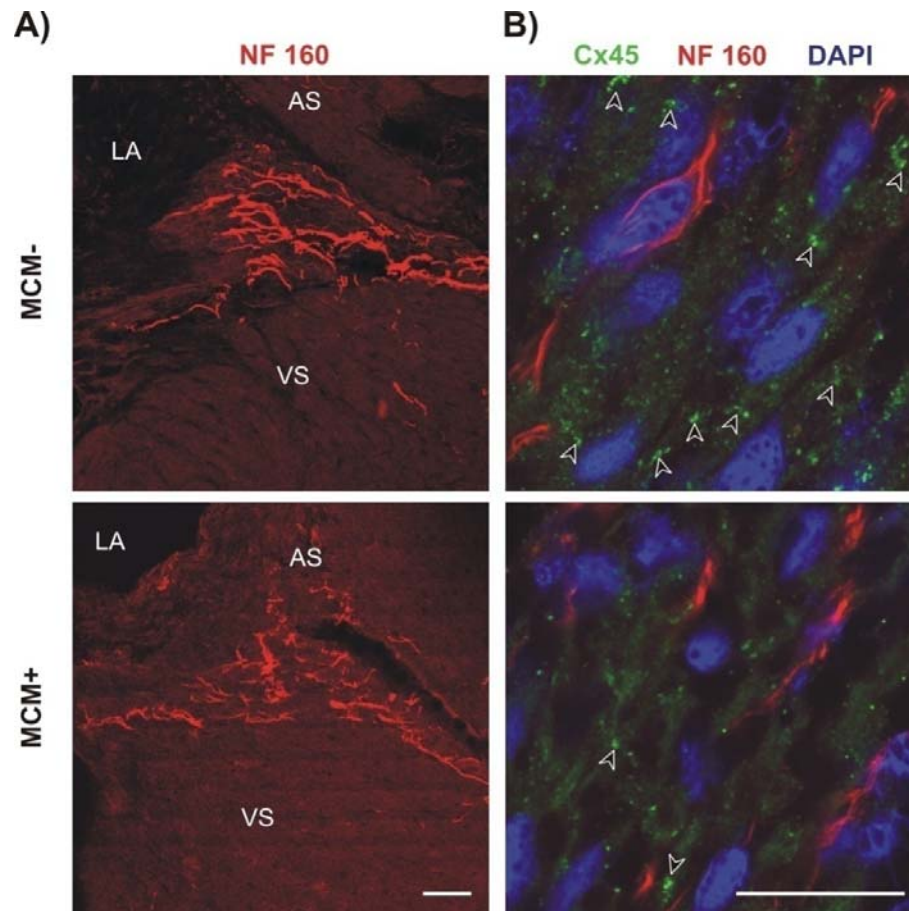


**Abb. 26: Veränderte Expression von Proteinen der Zell-Zell-Kontakte in CAR defizienten-Herzen.**

A) Expression von CAR ist ab w2 signifikant reduziert. Die Expression des Adapterproteins ZO-1 ist ab w4 signifikant herunterreguliert. B) Cx45 ist das einzige Connexin was zu einem späten Zeitpunkt signifikant reduziert war. Die Expression von N-Cadherin (N-Cad) ist zu allen Zeitpunkten unverändert. C) Die Expression von Cx37 war nur zeitweise signifikant reduziert, während die Cx40-Expression tendenziell zu diesen Zeitpunkten erhöht war, aber nicht signifikant verändert. Die Expression von Cx43 war unverändert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Signifikanztest: T-Test, \*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

#### 4.4.5 Bei CAR-defizienten Tieren ist die Anzahl der Cx45-Gap Junctions verringert

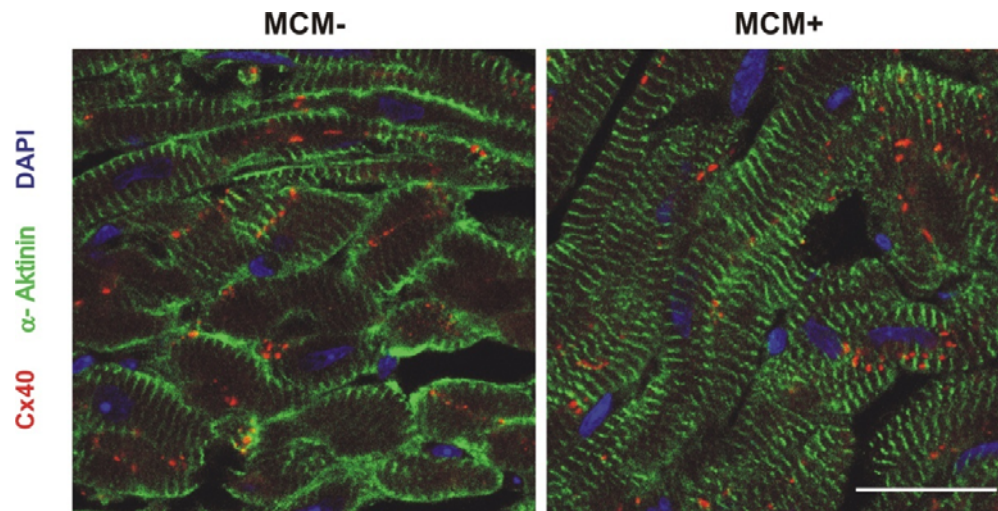
Da die Expression der Cx45-mRNA signifikant zum Zeitpunkt w8 reduziert war, konnte erwartet werden, dass Cx45 als vorherrschendes Connexin im AV-Knoten mislokalisiert und die Anzahl der Gap Junctions abnimmt. Dafür wurden AV-Knoten CAR-defizienter Herzen und Kontrollen durch eine AChE-Färbung identifiziert und Kryoschnitte dieser Region mit Antikörpern gegen Neurofilament 160 (NF160) und Cx45 zu den Zeitpunkten w8 und w12 immungefärbt. NF 160 ist ein Marker des Erregungsleitungssystems und besonders stark im AV-Knoten exprimiert (Abb. 27A) (Rothenberg et al., 2005). Während zum Zeitpunkt w8 keine Unterschiede zwischen CAR-defizienten Herzen und Kontrollen zu beobachten waren, war die Anzahl der Gap Junctions zum Zeitpunkt w12 nach CAR-Deletion verringert (Abb. 27B).



**Abb. 27: Cx45 ist nach CAR-Defizienz im AV-Knoten herunterreguliert.** A) Zur Markierung des AV-Knotens wurde ein anti-NF 160-Antikörper (rot) verwendet. Messbalken: 40  $\mu\text{m}$ . B) Immunfluoreszenzfärbung von NF 160 (rot) und Cx45 (grün) von CAR-defizienten Herzen ( $\text{MCM}^-$ ) und Kontrollen ( $\text{MCM}^+$ ). In  $\text{MCM}^+$ -Herzen ist die Anzahl der Cx45-Gap Junctions verringert. Die Zellkerne (blau) wurden DAPI gefärbt. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

Die Immunfärbung von Cx30.2 und ZO-1 konnte nicht durchgeführt werden, da die verfügbaren Antikörper auf den Gewebeschnitten nicht funktionierten.

Die Lokalisation von Cx40, als ein weiteres Connexin im Reizleitungssystem, wurde ebenfalls in einer Immunfärbung mit anti- $\alpha$ -Aktinin zu den Zeitpunkten 4w, 8w, 12w überprüft. Die Lokalisation der Gap Junctions und der Myofibrillen war bei beiden Genotypen regelrecht (Abb. 28). Die Überprüfung anderer Zellkontakte, wie der Adhäsionsverbindungen und der Desmosomen, durch anti-N-Cadherin und anti-Desmoplakin, zeigte eine physiologische Verteilung der Proteine sowohl im AV-Knoten als auch im Myokard.



**Abb. 28: Die Lokalisation von Cx40 ist durch die CAR-Defizienz nicht betroffen.** Immunfluoreszenzfärbung von Cx40 (rot) und  $\alpha$ -Aktinin (grün) von CAR-defizienten Herzen ( $MCM^+$ ) und Kontrollen ( $MCM^-$ ). In  $MCM^+$ -Herzen ist die Lokalisation von Cx40 und der Myofibrillen regelrecht. Die Zellkernfärbung (blau) erfolgte durch DAPI. Messbalken: 25  $\mu$ m.

Die Anzahl der Cx45-Gap Junctions ist in CAR-defizienten Herzen 12 Wochen nach Induktion verringert, während Cx40 unabhängig vom Phänotyp korrekt lokalisiert. Die  $\alpha$ -Aktinin-Färbung zeigte die regelrechte Weiterleitung der Myofibrillen. N-Cadherin, und Desmoplakin waren von der Deletion von CAR nicht betroffen.

#### 4.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die biologische Funktion von CAR im murinen Herzen wurde mit Hilfe von zwei konditionellen CAR-KO-Modellen charakterisiert. Bei beiden Modellen, dem  $\alpha$ -MHC-CAR-KO und dem induzierbaren, herzspezifischen MCM-CAR-KO, konnte die CAR-Deletion durch PCR verifiziert und eine CAR-Defizienz auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden.

Da die herzspezifische CAR-Deletion unter Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors zu einer Letalität im embryonalen Alter von E12.5 Tagen führte, wurde der induzierbare KO analysiert, um die Funktion von CAR im adulten Herzen zu untersuchen. Für die Induktion der CAR-Defizienz wurden Mäuse im Alter von 2-3 Monaten mit Tamoxifen behandelt. Die Untersuchung der Herzfunktion durch Oberflächen EKG, Telemetrie und EPU ergab, dass eine CAR-Defizienz im adulten Herzen zu einer progressiv verlaufenden AV-Blockierung und Sinusknotendysfunktion führte. Durch Echokardiographie und Konduktanzkatheteruntersuchung konnte bei diesen Tieren eine Erkrankung des Myokards ausgeschlossen werden. Allerdings konnte die zusätzliche Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie bei älteren Mäusen, durch die Konduktanzkathetermessung beobachtet werden. Um jedoch den Mechanismus des elektrophysiologischen Phänotyps separat zu untersuchen und um Sekundäreffekte zu reduzieren, wurden diese Tiere nicht in die weiteren Analysen mit einbezogen.

Durch die EPU konnte der Ursprung des AV-Blocks auf die nodale Region örtlich begrenzt werden. Strukturelle Untersuchungen des AV-Knotens ergaben eine geringfügig veränderte AV-Knotenfläche und verringertes Volumen des AV-Knotens. Im Myokard konnten dagegen auch ultrastrukturell keine Veränderungen infolge einer CAR-Defizienz nachgewiesen werden. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte CAR im AV-Knoten in Herzen von Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. In AV-Knotenzellen ist die Lokalisation von CAR im Vergleich zum Myokard unterschiedlich. Während in ventrikulären Kardiomyozyten CAR Bestandteil der Glanzstreifen ist, ist CAR in Nodalzellen eher homogen in der Zellmembran verteilt. Expressionsanalysen im Zeitraum der Phänotypentwicklung ergaben eine signifikante mRNA-Reduktion von ZO-1 4 Wochen sowie von Cx45 8 Wochen nach der Induktion. Im AV-Knoten selbst konnte durch Immunfluoreszenztechnik gezeigt werden, dass bei CAR-defizienten Tieren die Anzahl der Cx45-Gap Junctions verringert war. Da Cx45 das dominierende Connexin im Sinus- und AV-Knoten ist, und ZO-1 sowohl mit CAR als auch mit Cx45 interagiert, ist es möglich, dass der Mechanismus des Phänotyps auf eine

Unterbrechung dieser Interaktion beruht, die mit verminderter Expression von ZO-1 und mit reduzierten Cx45-Gap Junctions einhergeht.

Zur Untersuchung der embryonalen Letalität des  $\alpha$ -MHC-CAR-KO-Modells wurden Embryonen im Alter von 11.5 Tagen untersucht. CAR-defiziente Embryonen zeigten zunächst ein unauffälliges Erscheinungsbild. Histologische Untersuchungen wiesen auf ein beginnendes perikardiales Ödem hin. Die Proliferations- und Apoptosestudien zeigten weder verstärkte noch verminderte Signale. In Anlehnung an den elektrophysiologischen Phänotyp des induzierbaren KO-Modells, wurde eine Dopplerultraschalluntersuchung an Embryonen etabliert, die ebenfalls eine verzögerte atrio-ventrikuläre Überleitung nachwies.

## 5 Diskussion

CAR wurde vor über 10 Jahren als Rezeptor für Coxsackieviren und Adenoviren (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997) kloniert. Seine Funktion in Epithelzellen konnte durch Zellkulturexperimente gut charakterisiert werden, die Funktion in anderen Organen, wie dem Herzen, war aber nur wenig erforscht. CAR ist in Epithelzellen Bestandteil der Tight Junctions und vermittelt durch Homo-Dimerisierung interzelluläre Kontakte (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001). Expressionsanalysen wiesen auf eine starke Regulation von CAR im Herzen hin. In den Kardiomyozyten ist CAR in den Glanzstreifen zusammen mit Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und Gap Junctions lokalisiert (Fechner et al., 2003; Sanford et al., 2005). Tight Junctions wurden im Herzen bisher nicht beschrieben. Claudin-5, ein typisches Tight Junction-Protein, ist in Kardiomyozyten nicht in den Glanzstreifen, sondern in der lateralen Membran lokalisiert (Sanford et al., 2005). Infektionen insbesondere mit Coxsackieviren vom Typ B können im Herzen eine Myokarditis mit anschließender dilatativer Kardiomyopathie (DCM) hervorrufen, welche heutzutage bei ungünstigem Verlauf die Hauptindikation für eine Herztransplantation darstellt (Mohacsi und Carrel, 2005). Die eigentliche biologische Funktion von CAR im Herzen war aber nur unzureichend beschrieben. Bei Patienten mit Herzinfarkt oder Kardiomyopathie wurde eine verstärkte Expression von CAR in den Kardiomyozyten nachgewiesen, was für eine regenerative Funktion von CAR im erkrankten Myokard spricht (Fechner et al., 2003). Diese Beobachtungen deuteten auf eine ambivalente Rolle von CAR im Herzen hin. Einerseits vermittelt CAR den Viruseintritt, was zu einer Herzerkrankung führt, andererseits scheint CAR für die Regenerationsfähigkeit des erkrankten Herzens notwendig zu sein. Die Funktion von CAR in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen konnte *in vivo* erst durch die Verfügbarkeit von Tier-KO-Modellen genauer untersucht werden. Das wachsende, wissenschaftliche Interesse an CAR äußert sich unter anderem in der Anzahl der publizierten CAR-KO-Modelle innerhalb der letzten vier Jahre. Unabhängig voneinander haben fünf verschiedene Labore vier konventionelle und fünf konditionelle, herzspezifische CAR-KO-Modelle publiziert (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008). Eine Übersicht über die publizierten CAR-KO-Modelle gibt Tab. 13.

Ziel meiner Arbeit war es, die Funktion von CAR im Herzen mit Hilfe zweier herzspezifischer CAR-KO-Modelle zu charakterisieren. Da die CAR-Deletion zu einer embryonalen Letalität am Tag E12.5 führte, wurde zum besseren Verständnis der Funktion

von CAR im adulten Myokard ein durch Tamoxifen induzierbares, herzspezifisches CAR-KO-Modell verwendet. Bei beiden Modellen wurde das Exon 1 des CAR-Gens, welches das Transkriptions- und Translationsstartcodon enthielt, deletiert, was zu einer Eliminierung aller CAR-Isoformen führte. Die herzspezifische Expression der Cre-Rekombinase wurde durch den  $\alpha$ MHC-Promotor kontrolliert.

**Tab. 13: Zusammenfassung der publizierten CAR-KO-Modelle.**

	Asher 2005	Dorner 2005	Chen 2006	Chen 2006	Chen 2006	Lim 2008	Lim 2008	Lisewski 2008	Lisewski 2008
<b>Tiermodell</b>									
Exon	2	1	2	2	2	2	2	1	1
Konventionell	+	+	+			+			
Konditional				TNT	$\alpha$ MHC		$\alpha$ MHC	$\alpha$ MHC	
Induzierbar									MCM
<b>Phänotyp</b>									
Letalität	E11.5	E11.5- E12.5	E11.5- E12.5	E12.5	+	E12.5	-	E12.5	-
Herz-morphologie	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Apoptose	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	n.u.	n.u.
Fibrose	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.
AV-Block	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	+	n.u.	+
Sinusknoten	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+
<b>CAR-Funktion</b>									
Zellkontakte	n.u.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	+
Myofibrillen	n.u.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.	-
Kompartiment	n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+
Gewebeumbau	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.
Elektrophysiologie	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	+	n.u.	+

n.u.: nicht untersucht; +: verändert; -: nicht verändert; TNT: Troponin I;  $\alpha$ MHC: *alpha Myosin heavy chain*; MCM: MerCreMer

## 5.1 Die herzspezifische CAR-Deletion führt zur embryonalen Letalität

In den publizierten konventionellen Knockout-Modellen wurde entweder das Exon 1 oder das Exon 2 deletiert, um die Expression sowohl der transmembranen als auch der löslichen Rezeptorform zu eliminieren. Die Eliminierung des translationalen Startcodons (Dorner et al., 2005) oder die Unterbrechung des Leserahmens durch Einführung eines Stoppcodons nach 75

bp (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008) führte zur embryonalen Letalität zwischen Tag E11.5 und E12.5. Obwohl CAR im gesamten Organismus deletiert wurde, traten vor allem Herzfehlbildungen auf, die zur Letalität beitrugen (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Diese Modelle implizieren, dass CAR eine wichtige Rolle in der Morphogenese und Differenzierung des Herzens übernimmt. Die Analyse herzspezifischer CAR-KOs zeigte, dass eine CAR-Deletion vor dem Tag E9.5 zur embryonalen Letalität mit Herzfehlbildungen führte (Chen et al., 2006), während Mäuse mit einer CAR-Deletion ab E11.5 sich bis zum adulten Stadium entwickelten (Chen et al., 2006; Lim et al., 2008). Der von mir analysierte  $\alpha$ MHC-CAR-KO war embryonal letal am Tag E12.5 (s. Tab. 11). Dies kann durch die unterschiedliche KO-Strategie im Vergleich zu den anderen  $\alpha$ MHC-CAR-Modellen begründet sein. Während in den CAR-KO-Modellen von Chen (Chen et al., 2006) und Lim (Lim et al., 2008) die Deletion des Exon 2 zu einer Verschiebung des Leserahmens führt, aus der ein Stoppcodon nach 75 bp resultiert, führt eine Deletion des Exon 1 zu einer Eliminierung des einzigen Transkriptions- und Translationsstartcodons. Das durch die Deletion entstandene 75 bp-Produkt wurde zwar als funktionslos beschrieben (Asher et al., 2005), ob dies auch tatsächlich der Fall ist, wurde nicht nachgeprüft. Auch wäre es möglich, dass im Laufe der Verpaarungen zur Stammerhaltung Mutationen aufgetreten sein könnten, so dass dieser Transkriptionsstopp nicht erfolgt und ein funktionsfähiges Protein translatiert wird. Das würde auch die Diskrepanzen bezüglich der Letalität zwischen den beiden  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Modellen von Chen (Chen et al., 2006) und Lim (Lim et al., 2008) erklären. Während sich bei dem einen nur 24% der KO-Embryonen bis zum adulten Stadium entwickelten (Chen et al., 2006), sind bei dem anderen alle KO-Tiere überlebensfähig (Lim et al., 2008). Für den von mir untersuchten  $\alpha$ MHC-CAR-KO konnte im Vergleich zu den anderen letal verlaufenden CAR-KO-Modellen ein ähnlicher Letalitätszeitpunkt festgestellt werden (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008). Das Herz entwickelt sich in der Maus ab Tag E7.5 der Embryonalentwicklung (Ferdous et al., 2009). CAR scheint daher im mittleren Stadium der Embryonalentwicklung zwischen Tag E11.5 und E12.5, insbesondere für die Herzentwicklung essentiell zu sein. Da das Erscheinungsbild der  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Embryonen bis zum Tag E11.5 unauffällig war (s. Abb. 10), wurden die weiteren Analysen mit Embryonen in diesem Alter durchgeführt.



## **5.2 Bei einer CAR-Defizienz bleibt die Struktur des embryonalen Herzens erhalten**

Für die konventionellen CAR-KO-Modelle (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008) und den ebenso letal verlaufenden Troponin I (TNT)-CAR-KO (Chen et al., 2006) führte eine CAR-Defizienz zu Veränderungen der Herzmorphologie. So entwickelte der TNT-CAR-KO eine linksventrikuläre Hyperplasie, veränderte sinu-atriale Herzklappen und eine Ausweitung der Kardinalvenen (Chen et al., 2006). Bei dem konventionellen CAR-KO von Dorner war nur ein einzelner atrio-ventrikulärer Kanal angelegt. Außerdem waren neben einem ausgeprägten perikardialen Ödem das endokardiale Kissen vergrößert und die Stammgefäße dilatiert (Dorner et al., 2005). Asher et al. (2005) beschrieben für ihren konventionellen CAR-KO eine Degeneration der Ventrikelwand und eine thorakale Hämorrhagie. Die histologischen Untersuchungen des von mir analysierten  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Modells am Tag E11.5 wiesen auf ein beginnendes, perikardiales Ödem hin. Ein perikardiales Ödem kann infolge eines insuffizienten Herzens entstehen und konnte auch bei Embryonen mit induzierter Hypoxie und Hypoglykämie beobachtet werden (Smoak, 1997; Ream et al., 2008). Andere KO-Embryonen entwickelten ebenfalls ein perikardiales Ödem, so z.B. ARA9 (*aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9*)-KOs, NFATc3-KOs oder NFATc4-KOs (Bushdid et al., 2003; Lin et al., 2007). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Entwicklung des Ödems ein Symptom des insuffizienten Herzens war und nicht direkt durch die CAR-Deletion hervorgerufen wurde.

In einem konventionellen CAR-KO-Modell (Dorner et al., 2005) und dem TNT-CAR-KO (Chen et al., 2006) zeigten Ultrastrukturanalyse und Immunfluoreszenzfärbungen, dass eine CAR-Deletion zu einer verminderten Organisation und Dichte der Myofibrillen führt (Dorner et al., 2005). Durch Immunfluoreszenzfärbungen von Schnitten embryonaler Herzen und durch Färbung isolierter, embryonaler Kardiomyozyten mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Aktinin konnte die Anordnung der Myofibrillen nach CAR-Deletion verfolgt werden. Die Orientierung und Dichte der Myofibrillen blieben in CAR-defizienten Herzen erhalten (s. Abb. 8C).

Der TNT-CAR-KO entwickelte eine Hyperplasie des linken Ventrikels. Diese wurde neben der histologischen Veränderung, außerdem durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 nachgewiesen (Chen et al., 2006). Die  $\alpha$ MHC-KO-Embryonen zeigten keine erhöhte Anzahl proliferierender Kardiomyozyten in der Ki67-Färbung (s. Abb. 13B). Somit konnte eine Hyperplasie ausgeschlossen werden.

In dem konventionellen CAR-KO von Asher konnte am Tag E10.5 eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Herzen nachgewiesen werden, die durch eine Immunfärbung gegen die aktivierte Form der Caspase 3 und in der Histologie beobachtet wurden (Asher et al., 2005). Die  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Embryonen wurden am Tag E11.5 durch einen TUNEL assay (s. Abb. 13A) und immunhistochemisch durch einen Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase 3 untersucht. Diese Experimente wiesen keine verstärkte Apoptose nach. Morphologische Veränderungen der Zellkerne infolge eines apoptotischen Prozesses konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

### **5.3 In CAR-defizienten embryonalen Herzen ist die Erregungsleitung von Vorhöfen zu Ventrikeln verzögert**

Die Untersuchung der Herzfunktion von  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Embryonen wurde am Tag E11.5 mittels Doppler-Ultraschall durchgeführt. Da EKG-Untersuchungen an Embryonen noch nicht etabliert sind, wurde für die Beurteilung der atrio-ventrikulären Erregungsleitung das PQ\*-Intervall ermittelt, welches dem PQ-Intervall im EKG näherungsweise entspricht. Das PQ\*-Intervall war infolge der CAR-Defizienz signifikant erhöht, was einem AV-Block 1° im EKG gleichkommt (s. Abb. 11B). Dieser Phänotyp ist dem des induzierbaren MCM-CAR-KO-Modells ähnlich. Adulte MCM-KO-Tiere entwickelten einen AV-Block 1° zwei Wochen nach der Induktion, jedoch traten ab 4 Wochen nach der Induktion auch totale AV-Blockierungen auf (s. Abb. 16D).

Bei einem publizierten konventionellen CAR-KO-Modell, bei welchem das CAR-Exon 2 deletiert wurde, konnte auch ein verlängertes PQ\*-Intervall gemessen werden (Lim et al., 2008). Diese KO-Embryonen verstarben ebenfalls am Tag E12.5. Die Struktur des Herzens war durch die CAR-Defizienz nicht verändert. Einige KO-Embryonen entwickelten jedoch ein perikardiales Ödem. Bei diesem Modell und bei den  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Embryonen waren das ET-Intervall und die Herzfrequenz zwischen den Genotypen unverändert. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass CAR im embryonalen Herzen ebenfalls eine spezifische Funktion in der atrio-ventrikulären Erregungsleitung übernimmt. Lim et al. (2008) sehen den AV-Block 1° als mögliche Ursache für die Letalität ihres konventionellen CAR-KOs an. In humanen Föten führt ein AV-Block 1° nicht zur Letalität, allerdings ist die Mortalität bei Föten mit höhergradigen Blockierungen erhöht (Friedman et al., 2002; Boutjdir, 2000; Skog et al., 2008). Durch die Letalität der  $\alpha$ MHC-CAR-KO-Embryonen am Tag E12.5 war es nicht möglich, die Herzfunktion zu einem späteren Zeitpunkt zu überprüfen. Es ist aber

wahrscheinlich, dass sich wie bei den adulten MCM-KO-Tieren die Erregungsblockade progressiv verstärkt, so dass ein totaler AV-Block im Embryo zur plötzlichen Letalität führte.

#### **5.4 CAR-Defizienz führt im adulten Myokard zur Beeinträchtigung des Sinusknotens und des AV-Knotens**

Zum besseren Verständnis der Funktion von CAR im adulten Myokard wurde ein induzierbarer, herzspezifischer CAR-KO verwendet. Die Deletion des Exon 1 führte zur Eliminierung aller CAR-Isoformen. Die Induktion der Exondeletion durch Tamoxifen erlaubte die Untersuchung der Funktion von CAR im adulten Myokard, da die Deletion sonst zur embryonalen Letalität führte. Der Verlust von CAR im adulten Herzen führte zu einem AV-Block und zum Teil zu einer Funktionsstörung im Sinusknoten. Andere Bestandteile des Herzerregungsleitungssystems und das Arbeitsmyokard selbst waren an der Entwicklung der Arrhythmie nicht beteiligt. Die detaillierte Charakterisierung der elektrischen Aktivität von CAR-defizienten Herzen zeigte keinen Unterschied in der atrialen Depolarisation, so dass eine verlangsamte atriale Erregungsleitung als Ursache des verlängerten PQ-Intervalls ausgeschlossen werden konnte. Physiologisch wird das PQ-Intervall hauptsächlich durch die Erregungsweiterleitung im AV-Knoten wie auch durch das His-Bündel bestimmt. Das im Vergleich zu den Kontrolltieren unveränderte HV-Intervall spricht dafür, dass CAR die atrio-ventrikuläre Erregungsübertragung direkt im AV-Knoten kontrolliert. Obwohl die AV-Leitung verlängert war, zeigten CAR-defiziente Tiere eine signifikante Erhöhung der Herzrate im Vergleich zu den Kontrollen 4 Wochen nach der Induktion (s. Abb. 19), was durch die Telemetrie an nicht narkotisierten Tieren bestätigt wurde (s. Abb. 17). Die kurzzeitige Anästhesie durch Isofluran hatte weder Einfluss auf die Änderung des PQ-Intervalls noch auf die Herzfrequenz. Im frühen Stadium der AV-Erregungsunterbrechung resultierte die erhöhte Herzfrequenz aus einer erhöhten Frequenz des Sinusknotens. Zum späteren Zeitpunkt bei Unterbrechung der sinu-atriale Erregungsleitung traten junktionale Ersatzrhythmen auf, die ihren Ursprung in der AV-Region hatten. Diese bestimmten die Herzfrequenz und waren Ursache der Tachykardie in CAR-defizienten Tieren.

## **5.5 Der elektrophysiologische Phänotyp resultiert aus einem Einfluss von CAR auf Connexine**

Das Myokard des Herzens ist aus verschiedenen individuellen Zellen mit hochspezialisierten Kontakten zur Gewährleistung der mechanischen und elektrischen Kopplung aufgebaut. Die Kommunikation entlang der Myofibrillen erfolgt vorrangig durch die Glanzstreifen, welche verschiedene Zellkontaktformen beinhalten. Bisher wurden drei Zellkontaktformen für die Glanzstreifen funktional beschrieben: Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und Gap Junctions. Die Unterbrechung dieser Kontakte kann zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und zu Herzrhythmusstörungen führen (Kirchhoff et al., 1998; Perriard et al., 2003). Die Kanäle werden von Connexinen gebildet, welche im Herzen ein striktes Expressionsmuster in den Zellen des Herzerregungsleitungssystems aufweisen. So ist im Sinusknoten und AV-Knoten hauptsächlich Cx45 exprimiert, während in atrialen Kardiomyozyten Cx40 und im Arbeitsmyokard Cx43 dominiert (Kreuzberg et al., 2006). Die unterschiedlichen Öffnungseigenschaften der Gap Junctions sind notwendig für einen geregelten Zyklus der Herzkontraktion und Veränderungen in der Kanalzusammensetzung sind mit dem Auftreten ventrikulärer Arrhythmien assoziiert (Wilhelm et al., 2006; Betsuyaku et al., 2006).

In Folge einer Unterbrechung der Zellkopplung, welche aus einer verminderten Anzahl an Connexinen resultiert und sich sehr schnell nach einem Myokardinfarkt einstellt, erhöht sich damit auch das Risiko zusätzlich auftretender, lebensbedrohlicher Arrhythmien (Beardslee et al., 2000). Zu dem primären Defekt der Connexine sind einige Mechanismen beschrieben worden, die sekundär die Expression der Connexine und damit die Bildung und die Funktion der Gap Junctions beeinträchtigen können. So gehen Mutationen oder veränderte Expressionen von Proteinen der Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und ihrer assoziierten Proteine (N-Cadherin,  $\beta$ -Catenin,  $\gamma$ -Catenin, Plakophilin-2) mit einer veränderten Connexinexpression und Beeinträchtigung der Erregungsleitung einher (Li et al., 2005; Saffitz, 2006; Oxford et al., 2007).

CAR, als bekanntes Protein der Tight Junctions in Epithelzellen und der Glanzstreifen in Kardiomyozyten, übernimmt im Herzen eine bisher unbekannte Rolle im Erregungsleitungssystem. Eine CAR-Defizienz im Tiermodell führte zu einem AV-Block und zu einer Beeinträchtigung der Sinusknotenfunktion. Die umfangreiche Untersuchung des elektrophysiologischen Phänotyps ergab, dass die Ursache der AV-Blockierung in der AV-

Knotenregion selbst entstanden war und dass eine Beteiligung des His-Bündels ausgeschlossen werden konnte. Um mögliche strukturelle Veränderungen des AV-Knotens zu untersuchen, wurden Serien histologischer Schnitte durch die AV-Knotenregion angefertigt und der AV-Knoten dreidimensional rekonstruiert (s. Abb. 23). Bei Patienten mit AV-Blockierungen konnten histologische Veränderungen des AV-Knotens beobachtet werden, wie z.B. ein verkleinerter Knoten, verstärkte Fibrose und Fetteinlagerungen (Nguyen et al., 1988). Die strukturellen Veränderungen des AV-Knotens waren jedoch gering. Das Volumen war um ca.  $\frac{1}{3}$  in CAR-defizienten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen verringert, jedoch konnten keine anderen strukturellen Veränderungen beobachtet werden. Es war daher unwahrscheinlich, dass dies die alleinige Ursache für die Herzrhythmusstörung war. Zum besseren Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus wurden Literaturdaten von Tiermodellen herangezogen, die ähnliche elektrophysiologische Defekte, insbesondere ein verlängertes PQ-Intervall, entwickelten (s. Tab. 14). Alle Connexinisoformen sind im KO-Modell mit dem Auftreten von Erregungsleitungsdefekten assoziiert. Aus einem beschriebenen Mechanismus, bei welchem die Deletion von N-Cadherin die Funktion von Cx43 beeinflusst, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass CAR die elektrische Verbindung über Gap Junctions beeinflussen könnte (Li et al., 2005; Li et al., 2008). Mutationen in Kanälen humaner Gene, wie z.B. KCNE1, KCNJ2, SCN5A, welche auch im murinen AV-Knoten exprimiert werden (s. Tab. 1), führen zu einer anderen Form von Arrhythmie, dem Long-QT-Syndrom (Fodstad et al., 2004; Wolf und Berul, 2008). Die funktionelle Beteiligung dieser Kanäle am AV-Block war daher unwahrscheinlich. Die echokardiographischen Untersuchungen an CAR-defizienten Tieren im Zeitraum der Entstehung des AV-Blocks schlossen aus, dass sich die Arrhythmie in Folge einer Myokarderkrankung entwickelte (s. Abb. 14). Die histologischen Untersuchungen an Ventrikelmyozyten gaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Myokards (s. Abb. 24). Bisher waren noch keine Daten über die Größe des murinen AV-Knotens verfügbar. Zur Berechnung des AV-Knotenvolumens, wurde dieses mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion des AV-Knotens ermittelt. Da die geringe Größe des AV-Knotens von  $10,9 \pm 1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  (N=2) funktionale Studien erschwerte, wurde die Gap Junction-Funktion an Kardiomyozyten des Ventrikels überprüft. Dafür wurde eine Dye-Kopplungsstudie als ein *proof of concept* (Machbarkeitsstudie) etabliert. Das Dye-Kopplungsexperiment ist an isolierten Kardiomyozyten gängig. Zur Funktionsüberprüfung der Gap Junctions bei Erhalt der Zellverbindungen wurde das Experiment von Dr. Rene Jüttner an Herzschnitten etabliert. Es konnte eine signifikante Erhöhung der longitudinalen und transversalen

Kopplungseffizienz 3 Wochen nach Induktion festgestellt werden, was auf eine Interaktion von CAR und Gap Junctions hinwies (Lisewski et al., 2008).

**Tab. 14: Tiermodelle mit Erregungsblockierungen.**

Gen	Protein	Modell	Zusätzliche EP-Defekte	Referenz
<b>Cacna1d</b>	L-Type Ca-Kanal	KO	QRS abnorm, Sinusarrhythmie	(Platzer et al., 2000)
<b>Egf-R</b>	EGF-Rezeptor	KO	QRS abnorm; QT verlängert	(Chen et al., 2000)
<b>EphA3</b>	Eph Rezeptor A3	KO	Bradykardie	(Stephen et al., 2007)
<b>Cx40</b>	Connexin 40	KO	verlängertes P, QT; QRS abnorm	(Kirchhoff et al., 1998)
<b>Cx43</b>	Connexin 43	KO	QRS abnorm	(Reaume et al., 1995) (Flenniken et al., 2005)
<b>Cx45</b>	Connexin 45	KO	Totaler Block	(Kumai et al., 2000) (Nishii et al., 2003)
<b>Hadhb</b>	HAC-CoA-dehyd	ENU	AV-Block mit plötzlichem Tod	(Kao et al., 2006)
<b>Kcnq1</b>	K Kanal Q1	KO	verlängertes QT, QRS abnorm	(Casimiro et al., 2001)
<b>Lmna</b>	Lamin A	KI	QRS abnorm	(Casimiro et al., 2001)
<b>Nkx2.5</b>	NK2 TF related 5	KO	Het: verlängertes PQ KO: kein AV-Knoten	(Biben et al., 2000) (Jay et al., 2004)
<b>Scn5A</b>	Na Kanal V $\alpha$	KO	verlängertes P, Tachykardie	(Papadatos et al., 2002) (Remme et al., 2006)
<b>Tbx5</b>	T-box5	KO	QRS abnorm, Tachykardie	(Moskowitz et al., 2004) (Mori et al., 2006)
<b>Agtr1a</b>	Ang II-Rezeptor	TG	QRS abnorm	(Hein et al., 1997)
<b>Tead4</b>	TEA domain 4	TG	QRS abnorm	(Chen et al., 2004)
<b>Vegfb</b>	VEGF B	KO	Isolierter AV-Block 1°	(Aase et al., 2001)

ENU: ENU Mutagenese-Screen; HAC-CoA dehyd: Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase; KI: Knockin; KO: Knockout; TG: Transgen; EP: elektrophysiologisch; Het: Heterozygote Tiere

CAR könnte für die elektrische Kopplung der Zellen wichtig sein, indem es die Kompartimentalisierung der Connexine beeinflusst, ähnlich wie es für N-Cadherin und Connexine beschrieben wurde. Infolge einer N-Cadherin-Defizienz konnte eine reduzierte

Cx40- und Cx43-Expression beobachtet werden (Li et al., 2005). Auf molekularer Ebene wurde eine funktionale Interaktion von Gap Junctions und Tight Junctions durch Co-Immunpräzipitation und Co-Lokalisation von Cx40 und Cx43 mit Tight Junction-Proteinen oder Tight Junction assoziierten Proteinen (Occludin, Claudin-5 und ZO-1) in Endothelzellen gezeigt (Nagasawa et al., 2006).

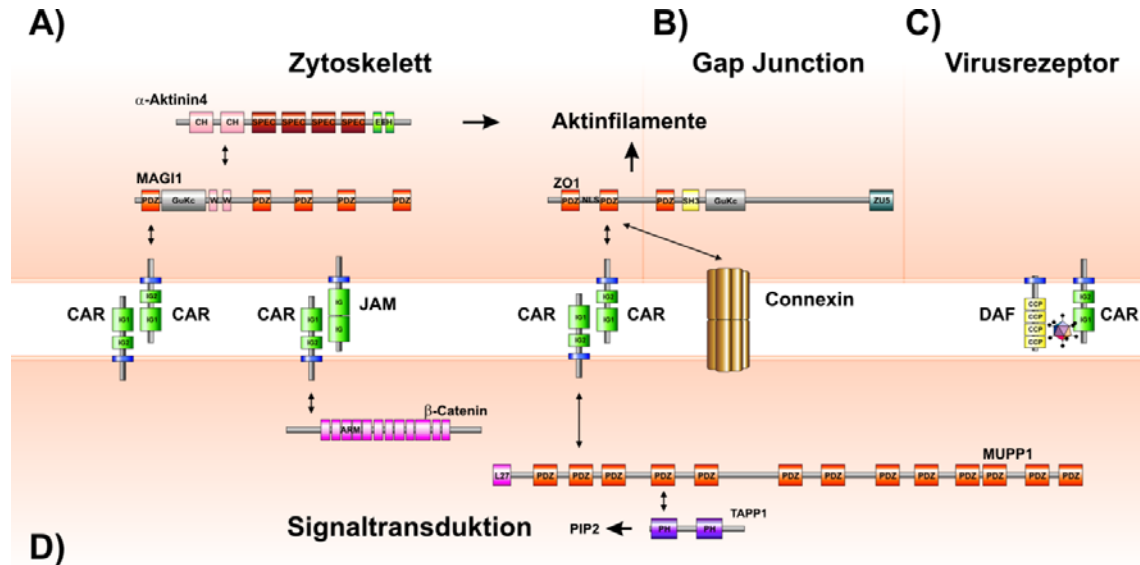
Die erhöhte Kopplungseffizienz führte nicht zu einer verlangsamten atrio-ventrikulären Erregungsleitung in CAR-defizienten Tieren, deutete aber an, dass die Funktion der Kardiomyozyten, im Gegensatz zu den AV-Knoten-Zellen, nicht nur durch die Gap Junction-Funktion bestimmt wird. Diese Unterschiede könnten auf der unterschiedlichen Expression der Connexine (Cx43 im Arbeitsmyokard, Cx45 in den AV-Knotenzellen) beruhen oder durch die spezifische Lokalisation von CAR in diesen beiden Zelltypen bedingt sein. AV-Knotenzellen unterscheiden sich durch ihre rundlich bis ovale Zellform deutlich von den Kardiomyozyten der Atria oder Ventrikel. Glanzstreifen als strukturelle Komponente der Zellkommunikation existieren in diesen Zellen nicht. Auch der Verlauf des Aktionspotentials von ventrikulären Kardiomyozyten und Schrittmacherzellen ist unterschiedlich, da dieses durch anderen Kanäle reguliert wird (s. Abb. 2). CAR lokalisiert in AV-Knotenzellen nicht wie für ventrikuläre Kardiomyozyten beschrieben in den Glanzstreifen (s. Abb. 9D) (Fechner et al., 2003), sondern ist eher homogen in der Zellmembran verteilt (s. Abb. 22C). Es wäre ebenfalls denkbar, dass mehrere CAR-Isoformen im Herzen exprimiert werden. Im murinen Organismus sind bisher drei Isoformen bekannt (Coyne et al., 2005), allerdings ist ihre gewebespezifische Verteilung nicht gut erforscht. So könnten auch unterschiedliche CAR-Isoformen im AV-Knoten, Sinusknoten und Arbeitsmyokard existieren, die ausgehend von ihren zytoplasmatischen Domänen in andere Signalkaskaden involviert sind. Diese Faktoren könnten den isolierten Effekt von CAR auf AV-Knotenzellen erklären.

Die atrio-ventrikuläre Erregungsleitung ist gleich in mehreren Connexin-KO-Modellen unterbrochen, wie im herzspezifischen Cx45-KO-Modell (Nishii et al., 2003) oder in dem Cx40-KO-Modell. Bei diesem führt eine Cx40-Defizienz zu einem intraatrialen Block, ektopischen Rhythmen und veränderter atrialer Erregung (Kirchhoff et al., 1998). Bei CAR-defizienten Tieren konnten allerdings keine ektopischen Rhythmen des Cx40-KO-Modells oder spontane bzw. induzierbare ventrikuläre Arrhythmien des Cx43-KO-Modells (Danik et al., 2008) festgestellt werden. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab, dass die Funktion von Cx40- und Cx43-Gap Junctions erhalten geblieben war, während dies ein weiteres Indiz für die spezifische Rolle von CAR in der AV-Erregungsübertragung darstellt.

Durch Lasermikrodissektion wurde versucht AV-Knotengewebe aus CAR-defizienten Herzen und Kontrollen zu gewinnen, um daraus die Gesamt-RNA zu isolieren. Aufgrund der geringen Größe des AV-Knotens war es nicht möglich, ausreichend Material für dieses Experiment zu erhalten. Für die Analyse wurde daher die RNA der Atria und Ventrikel verwandt. Da die mRNA Phänotyp-relevanter Gene zum Zeitpunkt 4w nicht verändert war (s. Abb. 25) und eine Beeinträchtigung der Gap Junction-Funktion vermutet wurde, wurde speziell die Connexin-Expression über den Zeitraum der Arrhythmie-Entwicklung verfolgt. Auf molekularer Ebene war auffällig, dass Cx40 weder auf RNA noch auf Proteinebene verändert war. Die Cx45-Expression war dagegen reduziert (Abb. 26) (Lisewski et al., 2008). Zusammen mit der funktionellen Analyse könnte Cx40 oder Cx45 in CAR-defizienten Tieren an der Phänotypentwicklung beteiligt sein, da beide mit einem Erregungsblock-Phänotyp assoziiert sind. Wie aber auch durch die Immunfluoreszenzuntersuchung beider Connexine gezeigt werden konnte, wurden nur die Cx45-Gap Junctions von der CAR-Defizienz beeinflusst (s. Abb. 27) und nicht die Cx40-Gap Junctions (s. Abb. 28). In Zellkultur-experimenten konnte bisher gezeigt werden, dass ZO-1 in Epithelzellen sowohl mit CAR als auch mit Cx45 interagiert (Kausalya et al., 2001). Durch eine Co-Immunpräzipitation konnte eine indirekte Interaktion von CAR mit Cx45 über ZO-1 gezeigt werden (Lim et al., 2008). In einem konditionellen CAR-KO-Modell, welcher ebenfalls einen AV-Block entwickelte, führte eine CAR-Defizienz zur Reduktion von ZO-1 und Cx45 (Lim et al., 2008). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass CAR, als ein bekanntes Tight Junction-Protein, indirekt die Funktion von Gap Junctions beeinflussen kann, speziell der Cx45-Gap Junctions über ZO-1. Eine Unterbrechung dieser Interaktion könnte sowohl den AV-Block als auch das Syndrom des kranken Sinusknotens erklären, da Cx45 das dominierende Connexin in diesen Strukturen ist. Ein weiteres Indiz für die Interaktion von CAR und Gap Junctions zeigten Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen von Cx43 an isolierten Kardiomyozyten, die eine Verminderung des Cx43-Proteins nachwiesen (Lisewski et al., 2008). Da Cx43 nicht im AV-Knoten und kaum im Sinusknoten exprimiert ist (Kreuzberg et al., 2006), ist eine Beeinflussung der elektrischen Leitung direkt im AV-Knoten unwahrscheinlich. Die elektromechanischen Eigenschaften der Gap Junctions und die Art ihrer Regulation werden durch die Connexinisoform festgelegt, welche unterschiedlich durch Phosphorylierung, pH-Wert oder Calciumkonzentration reguliert werden (van Veen et al., 2006). Dies könnte den Einfluss der CAR-Deletion auf Cx45 und nicht auf Cx40 erklären. Zusätzlich wird die Gap Junction-Aktivität durch das Vorhandensein von heterotypischen Kanälen bestimmt, wie sie für Cx45/Cx40 und Cx43/Cx45 beschrieben wurden (Bruzzone et



al., 1993; Martinez et al., 2002). Auf mRNA-Ebene wurde auch Cx37 kurzfristig 2 und 3 Wochen nach der KO-Induktion herunterreguliert. Cx37 wird vor allem von kardiovaskulären Endothelzellen exprimiert und nicht von Kardiomyozyten (van Veen et al., 2006). In einem konventionellen Cx37-KO-Modell führte zwar eine Cx37-Defizienz zur Reduzierung der Zellkopplung im Aorten-Endothel, aber sonst war der Phänotyp unauffällig. Die Herzfunktion wurde nicht beeinträchtigt (Simon et al., 2004). Eine reduzierte Cx37-Expression ist zwar im Zusammenhang mit der Entwicklung von Hyperlipidämie und Hypertonie beobachtet worden, allerdings nicht mit der Entwicklung einer Arrhythmie (Yeh et al., 2003; Yeh et al., 2006). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Reduktion dieses Connexins einen Einfluss auf die Entwicklung des AV-Blocks hatte. Der kurzfristige Einfluss der CAR-Deletion auf das Cx37 im Gefäßendothel könnte daher sekundär bedingt sein.



**Abb. 29: CAR ist ein multifunktionaler Rezeptor, welcher in verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zell-Zell-Kontaktbildung, interzelluläre Kommunikation und Signaltransduktion involviert ist.** A) CAR kann über seine extrazellulären Ig-Domänen homo- oder heterodimerisieren, z.B. mit JAM. Die zytosplasmatische Domäne interagiert mit verschiedenen PDZ-Proteinen, wie ZO-1 und MAGI1, welche die Aktinfilamentformation beeinflussen können. B) Das Adapterprotein ZO-1 interagiert sowohl mit CAR als auch mit Gap Junctions. C) Zusammen mit DAF (*decay accelerating factor*) / CD55 vermittelt CAR die Bindung und Internalisierung von CVB3. D) In der Signaltransduktion ausgehend von CAR sind β-Catenin und MUPP1 beteiligt. MUPP1 interagiert mit TAPP1, das in den Phosphatidylinositol-Signalweg (PIP2) involviert ist.

Nicht veröffentlichte Expressionsdaten zeigten keine Veränderungen in den Expressionen der potentiellen CAR-Interaktionspartner, wie MUPP1 (Coyne et al., 2004), MAGI1 (Excoffon et al., 2004), β-Catenin (Coyne et al., 2004) (s. Abb. 29A, B). Durch eine α-Aktinin-Immunfluor-

reszenzfärbung konnte die regelrechte Anordnung der Myofibrillen trotz CAR-Defizienz bestätigt werden, so dass die Interaktion über MAGI1 und  $\alpha$ -Aktinin4 für die Phänotypentwicklung unbedeutend ist. Außerdem sind die kontraktile Komponenten in den Zellen des Erregungsleitungssystems kaum vorhanden, so dass auch in der Immunfluoreszenz in diesen Zellen  $\alpha$ -Aktinin nicht angefärbt werden konnte. Neben der bekannten Funktion von CAR als einen Virusrezeptor (s. Abb. 29C) (Coyne et al., 2005) und Zell-Zell-Kontaktprotein (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001; Zen et al., 2005) konnte eine unbekannte Funktion von CAR im Herzerregungsleitungssystem charakterisiert werden. Diese könnte auf einer Interaktion von CAR mit Cx45-GAP Junctions über das gemeinsame Adapterprotein ZO-1 beruhen (s. Abb. 29B).

### ***5.6 Die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie ist altersabhängig***

Durch die Konduktanzkatheteruntersuchung adulter CAR-defizienter Herzen konnte festgestellt werden, dass eine CAR-Deletion bei Mäusen im Alter von 5-6 Monaten zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt. Wird die Induktion bei jüngeren Mäusen (2-3 Monate) durchgeführt, so bleibt die Ventrikelfunktion erhalten und das Myokard ultrastrukturell unverändert. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter das Risiko für Herzerkrankungen steigt (Koonen et al., 2007). Es konnten einige Faktoren identifiziert werden, die mit dem altersbedingten Entstehen von Herzerkrankungen im Zusammenhang stehen, so wie Gefäßveränderungen (Lakatta et al., 2009) und Stoffwechsel-assoziierte Faktoren (Slawik und Vidal-Puig, 2006; Dyck et al., 2006). Lim konnte bei seinem herzspezifischen CAR-KO zeigen, dass diese Tiere im Alter von 5 Monaten ebenfalls eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten und dass diese mit einer verringerten Expression von  $\beta$ -Catenin und ZO-1 assoziiert war (Lim et al., 2008). Ultrastrukturell waren die Myofibrillen desorganisiert, ähnlich wie es von Dorner im konventionellen CAR-KO-Embryo gezeigt wurde (Dorner et al., 2005; Lim et al., 2008). Eine veränderte Stoffwechsellage im älteren Herzen könnte dazu beitragen, dass der Verlust von CAR im Ventrikel nicht ausreichend kompensiert wird. Über die Interaktionspartner  $\beta$ -Catenin (Coyne et al., 2004) und ZO-1 (Noutsias et al., 2001) könnten die kontraktile Strukturen so beeinträchtigt werden, dass dies zu einer Verminderung der Herzfunktion führt. Auch könnte MAGI1 (Noutsias et al., 2001), welches ebenfalls über  $\alpha$ -Aktinin4 eine Verbindung von CAR zu den kontraktile Elementen der

Herzmuskelzelle herstellt, an diesem Prozess beteiligt sein (s. Abb. 29A). Die Rolle von CAR in der Pathogenese von Kardiomyopathien gilt es zukünftig näher zu untersuchen (s. 5.7.2).

## **5.7 Weiterführende Studien**

### **5.7.1 CAR bei Herzrhythmusstörungen**

Viele Erkrankungen sind mit Tight Junctions assoziiert, so z.B. Gehörlosigkeit, maligne Erkrankungen und Allergien (Cereijido et al., 2007). Diese Arbeit beschreibt eine neue Rolle des Tight Junction-Proteins CAR in der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen. CAR könnte ein potentieller Marker für Familien mit AV-Block sein. Außerdem könnten diese neuen Ergebnisse Hinweise liefern, wie Virusproteine oder Autoantikörper mit Tight Junction-Proteinen interagieren und zu Arrhythmien führen (Sato et al., 1989). Die Lyse von Virusproteinen von infizierten Zellen ist ein wichtiger Mechanismus zur Unterbrechung der CAR-CAR-Interaktion in Tight Junctions und ermöglicht den Viruseintritt durch die Zellmembran der Epithelzellen (Walters et al., 2002). Die virusinfizierte Unterbrechung der CAR-Dimere könnte im Herzen einen ähnlichen Effekt hervorrufen, wie der Verlust des CAR-Proteins und zur verminderten Zellkopplung und Arrhythmie führen, welche bei viralen Myokarditiden auftreten (Kishimoto et al., 1984). Bei einer Patientin mit einer rheumatischen Erkrankung waren Autoantikörper, welche zur Dysregulation der Calcium-Homöostase im Herzen führten, die Ursache für einen AV-Block (Salomonsson et al., 2005). Ein ähnlicher Mechanismus könnte durch Autoantikörper entstehen, die mit CAR interagieren. Zum direkten Nachweis, dass eine CVB-Infektion Herzrhythmusstörungen auslösen kann, sind weitere elektrophysiologische Untersuchungen mittels EKG oder EPU an CVB3-infizierten Mäusen durchzuführen. Auch ist zu überprüfen, ob eine Immunisierung von Mäusen durch Blutseren mit CAR-Antikörpern zu einer Herzrhythmusstörung führt, wie es für die Autoantikörper gegen die nukleären Proteine Ro und La beschrieben wurde (Boutjdir et al., 1997). Dafür ist es notwendig, einen Nachweistest für CAR-Autoimmunantikörper zu etablieren. Anschließend kann durch genaue Recherche von Patientendaten untersucht werden, ob eine CVB-Infektion mit dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen assoziiert ist. Die Blutseren von Patienten, die in Folge einer CVB-Infektion eine Arrhythmie entwickelten, sollten zunächst auf Autoimmunantikörper gegen CAR oder gegen die lösliche CAR-Rezeptorform getestet werden.

### 5.7.2 CAR in der DCM-Pathogenese

Die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) in Tieren höheren Alters deutet daraufhin, dass CAR auch für diesen Pathomechanismus eine Funktion ausübt. Bisherige Daten sprechen dafür, dass CAR am Geweberegenerationsprozess des erkrankten Myokards beteiligt ist. So ist die CAR-Expression im Herzen bei DCM oder nach einem Myokardinfarkt erhöht (Fechner et al., 2003). Inwieweit das Fehlen von CAR im Gegensatz dazu eine DCM begünstigen kann, gilt es in der Zukunft näher zu erforschen. Durch den Einsatz kardiovaskulärer Operationsmethoden, kann im Tiermodell eine Kardiomyopathie erzeugt werden. Durch einen abdominalen Arterien-Venen-Shunt kann das Herz durch ein erhöhtes Blutvolumen diastolisch belastet werden. Bei der Durchführung des „Aortic Bandings“ hingegen wird durch die Verengung der Aorta das Herz systolisch belastet. Bei Wildtyptieren sollte das Herz eine Hypertrophie entwickeln. An diesen Tieren könnte zunächst die Re-Expression von CAR im Herzen untersucht werden. Dadurch wäre es möglich, weitere Informationen über die Funktion von CAR im Regenerationsprozess des erkrankten Myokards zu erhalten. Zusätzlich kann überprüft werden, wie sich eine CAR-Deletion auf das schon vorbelastete Herz auswirkt. Erste vorläufige Untersuchungen im Tiermodell deuteten an, dass mit zunehmendem Alter eine dilatative Kardiomyopathie durch eine CAR-Defizienz begünstigt wird. Durch Transkriptions- und Proteomanalysen würden dann die beteiligten Signalwege untersucht werden. Diese Erkenntnisse könnten dazu dienen, den Pathomechanismus der inflammatorischen Kardiomyopathie aufzuklären und potentielle neue Therapiestrategien zu entwickeln.

## 6 Zusammenfassung

Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wurde zunächst als ein Virusrezeptor beschrieben, welcher die Bindung und Internalisierung von CVB und einigen Adenoviren vermittelt (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997). Als Zellkontaktprotein in Tight Junctions der Epithelzellen (Coyne et al., 2005) sorgt CAR durch Homo-Dimerisierung für die Aufrechterhaltung der interzellulären Diffusionsbarriere (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001). In den Kardiomyozyten ist CAR Bestandteil der Glanzstreifen. Erkrankungen des Herzens, wie Herzinfarkt oder Kardiomyopathie können zu einer verstärkten CAR-Expression führen (Fechner et al., 2003). Die physiologische Funktion von CAR im gesunden Herzen war bislang aber nur unzureichend charakterisiert. Durch konventionelle CAR-KO-Modelle konnte vermutet werden, dass CAR für die Herzentwicklung essentiell ist (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005). In dieser Arbeit sollte die biologische Funktion von CAR im murinen Herzen durch die Analyse von zwei konditionellen CAR-KO-Tiermodellen untersucht werden. Es standen ein herzspezifisches und ein induzierbares, herzspezifisches CAR-KO-Modell für die Analyse zur Verfügung. Unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors wird beim ersten die Cre-Rekombinase, beim letzten das MCM-Fusionsprotein exprimiert. Beide Modelle wurden verifiziert und kardiologisch phänotypisiert. Es konnte festgestellt werden, dass CAR für die Herzentwicklung essentiell ist. Eine CAR-Deletion in Kardiomyozyten führte zur embryonalen Letalität am Tag E12.5 mit einem beginnenden perikardialen Ödem, aber mit unveränderter Herzmorphologie. Verstärkte Proliferation oder Apoptose konnten in CAR-defizienten Embryonen nicht beobachtet werden. Um die Funktion von CAR im adulten Herzen zu untersuchen, wurde ein induzierbares, herzspezifisches CAR-KO-Modell analysiert. Die CAR-Defizienz im adulten Myokard führte bei den Tieren zu einem progressiven AV-Block und zu einer Sinusknotendysfunktion. Untersuchungen an CAR-defizienten Embryonen konnten ebenfalls eine AV-Erregungsleitungsstörung im Herzen nachweisen. Diese Ergebnisse weisen auf eine bisher unbekannte Rolle von CAR im Reizleitungssystem des Herzens hin. Der molekulare Mechanismus könnte auf der Interaktion von CAR mit Gap Junction-Proteinen beruhen. Wird die Interaktion von CAR mit Cx45 über ZO-1 unterbrochen (Lim et al., 2008), ist eine gestörte Kommunikation zwischen den Zellen des Reizleitungssystems und damit eine gestörte Erregungsleitung zu erwarten.

Die veränderte Kommunikation über Gap Junctions kann zu unterschiedlichen Effekten im Herzen führen. Im Reizleitungssystem entwickelten sich ein AV-Block und das Syndrom des kranken Sinusknotens, während ventrikuläre Arrhythmien nicht auftraten. Eine mögliche

Erklärung sind die zellulären und molekularen Unterschiede zwischen Schrittmacherzellen und Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards, welche Zellform, elektrische Erregung, Proteinexpression und CAR-Lokalisation betreffen.

Bisher ist kein genetischer Defekt im CAR-Gen als krankheitsrelevant beschrieben worden. Die neuen tierexperimentellen Erkenntnisse implizieren, dass CAR in der Pathogenese von Herzrhythmusstörungen unklarer Genese eine Rolle spielt. Weiterhin könnten Arrhythmien bei Kardiomyopathie-Patienten die Folge einer Autoimmunreaktion gegen CAR sein. Damit empfiehlt sich die Berücksichtigung von CAR und Proteinen der Tight Junctions in der Entwicklung von Screening-Strategien für Arrhythmie-Patienten und als mögliche Zielproteine für therapeutische Ansätze.

## 7 Summary

The Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor (CAR) was discovered as a virus receptor for coxsackie- and adenoviruses and mediates both virus binding and internalization (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997). It is closely associated with the tight junction in epithelial cells (Coyne et al., 2005) and it is important for cell-cell attachment by homo-dimerization (Honda et al., 2000; Cohen et al., 2001). In the heart CAR is a component of the intercalated disk in cardiomyocytes and in cardiac diseases, such as myocardial infarction or cardiomyopathy, CAR is up-regulated (Fechner et al., 2003), but the function in the healthy myocardium, has not been well characterized. CAR is highly expressed in the developing heart and deletion of CAR in a conventional KO results in heart failure that leads to embryonic lethality (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005). These findings let to assume that CAR could play an important role in cardiac development and tissue remodelling. Aim of this study was to investigate the biological function of CAR in the heart with the help of two conditional CAR KO models. One is a heart specific KO with expression of the Cre recombinase under the control of  $\alpha$ MHC promoter. The other is a heart specific inducible CAR KO (dependent on tamoxifen-treatment). After verification of the two KO models the cardiac function was evaluated. CAR deletion in cardiomyocytes results in embryonic lethality at E12.5 with lightly signs of pericardial edema, but it was not related to altered organization of myofibrils and increased proliferation or apoptosis. The inducible CAR KO model was used to investigate the role of CAR in the adult myocardium. Functional analysis of the CAR deficient adult mice revealed progressive atrio-ventricular block and sinus node dysfunction that developed in parallel with the loss of CAR. Echocardiography of cardiac KO embryos showed a similar atrio-ventricular conduction defect. These novel findings indicated a specific function of CAR in the conduction system of the heart. The underlying mechanism could involve the interaction between CAR and gap junction proteins.

The disruption of the published interaction between CAR and Cx45 via ZO-1 (Lim et al., 2008) is expected to affect communication between the cells of the conduction system and thus cause an impaired electrical conduction. An altered cell-cell communication can cause differential effects in the heart - on the one hand the development of an AV block, on the other hand an increased coupling in the ventricle. A possible explanation could be derived from the cellular and molecular differences between cells of the conduction system and the ventricular myocardium, which include differences in cell shape, action potential propagation, protein expression, and localization of CAR.

So far, no genetic defect underlying human disease has been described in the literature. The *in vivo* data imply CAR in the pathogenesis of arrhythmia of unknown cause. Furthermore, they raise the possibility that CAR directed auto-antibodies might contribute to the development of arrhythmia in patients suffering from cardiomyopathy. These novel mechanistic insights into the interaction of CAR and gap junction proteins could help explain the association of viral disease and arrhythmia and suggest CAR as a drug target not only in viral myocarditis, but also in arrhythmia.



## 8 Literaturverzeichnis

- Aase, K., von, E. G., Li, X., Ponten, A., Thoren, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., et al. (2001). Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* *104*, 358-364.
- Asher, D., Cerny, A., Weiler, S., Horner, J., Keeler, M., Neptune, M., Jones, S., Bronson, R., Depinho, R., and Finberg, R. (2005). Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* *42*, 77-85.
- Atkins, A. R., Osborne, M. J., Lashuel, H. A., Edelman, G. M., Wright, P. E., Cunningham, B. A., and Dyson, H. J. (1999). Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *FEBS Lett* *451*, 162-168.
- Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., Nusrat, A., Parkos, C. A., and Dermody, T. S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* *104*, 441-451.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., and Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem* *275*, 20520-20526.
- Beardslee, M. A., Lerner, D. L., Tadros, P. N., Laing, J. G., Beyer, E. C., Yamada, K. A., Kléber, A. G., Schuessler, R. B., and Saffitz, J. E. (2000). Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ. Res* *87*, 656-662.
- Benson, D. W. (2004). Genetics of atrioventricular conduction disease in humans. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* *280A*, 934-939.
- Bergelson, J., Cunningham, J., Droguett, G., Kurt-Jones, E., Krithivas, A., Hong, J., Horwitz, M., Crowell, R., and Finberg, R. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* *275*, 1320-1323.
- Bergelson, J., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M., Wickham, T., Crowell, R., and Finberg, R. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* *72*, 415-419.
- Bernal, R., Sharma, S., Gardner, B., Douglas, J., Bergelson, J., Dubinett, S., and Batra, R. (2002). Soluble coxsackievirus adenovirus receptor is a putative inhibitor of adenoviral gene transfer in the tumor milieu. *Clin Cancer Res* *8*, 1915-1923.
- Berul, C., Christe, M., Aronovitz, M., Seidman, C., Seidman, J., and Mendelsohn, M. (1997). Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest* *99*, 570-576.
- Betsuyaku, T., Nnebe, N. S., Sundset, R., Patibandla, S., Krueger, C. M., and Yamada, K. A. (2006). Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* *290*, H163-171.

- Biben, C., Weber, R., Kesteven, S., Stanley, E., McDonald, L., Elliott, D., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., Feneley, M., et al. (2000). Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ Res* 87, 888-895.
- Boutjdir, M. (2000). Molecular and ionic basis of congenital complete heart block. *Trends Cardiovasc. Med* 10, 114-122.
- Boutjdir, M., Chen, L., Zhang, Z. H., Tseng, C. E., DiDonato, F., Rashbaum, W., Morris, A., el-Sherif, N., and Buyon, J. P. (1997). Arrhythmogenicity of IgG and anti-52-kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circ. Res* 80, 354-362.
- Bowles, K., Gibson, J., Wu, J., Shaffer, L., Towbin, J., and Bowles, N. (1999). Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum Genet* 105, 354-359.
- Bowles, N., Ni, J., Marcus, F., and Towbin, J. (2002). The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 39, 892-895.
- Bruzzone, R., Haefliger, J. A., Gimlich, R. L., and Paul, D. L. (1993). Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol. Biol. Cell* 4, 7-20.
- Bushdid, P. B., Osinska, H., Waclaw, R. R., Molkentin, J. D., and Yutzey, K. E. (2003). NFATc3 and NFATc4 Are Required for Cardiac Development and Mitochondrial Function. *Circ Res* 92, 1305-1313.
- Carson, S., Chapman, N., and Tracy, S. (1997). Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 325-328.
- Carson, S., Hobbs, J., Tracy, S., and Chapman, N. (1999). Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density. *J Virol* 73, 7077-7079.
- Casimiro, M., Knollmann, B., Ebert, S., Vary, J., Greene, A., Franz, M., Grinberg, A., Huang, S., and Pfeifer, K. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2526-2531.
- Cerejido, M., Contreras, R., Flores-Benitez, D., Flores-Maldonado, C., Larre, I., Ruiz, A., and Shoshani, L. (2007). New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res* 38, 465-478.
- Chen, B., Bronson, R., Klamann, L., Hampton, T., Wang, J., Green, P., Magnuson, T., Douglas, P., Morgan, J., and Neel, B. (2000). Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet* 24, 296-299.

- Chen, H., Baty, C., Maeda, T., Brooks, S., Baker, L., Ueyama, T., Gursoy, E., Saba, S., Salama, G., London, B., et al. (2004). Transcription enhancer factor-1-related factor-transgenic mice develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation. *Circulation* 110, 2980-2987.
- Chen, J., Ghosh, R., Finberg, R., and Bergelson, J. (2003). Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene. *DNA Cell Biol* 22, 253-259.
- Chen, J., Zhou, B., Yu, Q., Shin, S., Jiao, K., Schneider, M., Baldwin, H., and Bergelson, J. (2006). Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res* 98, 923-930.
- Chrétien, I., Marcuz, A., Courtet, M., Katevuo, K., Vainio, O., Heath, J. K., White, S. J., and Du Pasquier, L. (1998). CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur. J. Immunol* 28, 4094-4104.
- Cohen, C. J., Gaetz, J., Ohman, T., and Bergelson, J. M. (2001). Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J. Biol. Chem* 276, 25392-25398.
- Cohen, C., Shieh, J., Pickles, R., Okegawa, T., Hsieh, J., and Bergelson, J. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15191-15196.
- Coyne, C., Voelker, T., Pichla, S., and Bergelson, J. (2004). The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem* 279, 48079-48084.
- Coyne, C. B., and Bergelson, J. M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev* 57, 869-882.
- Danik, S. B., Rosner, G., Lader, J., Gutstein, D. E., Fishman, G. I., and Morley, G. E. (2008). Electrical remodeling contributes to complex tachyarrhythmias in connexin43-deficient mouse hearts. *FASEB J* 22, 1204-1212.
- Dho, S. E., Jacob, S., Wolting, C. D., French, M. B., Rohrschneider, L. R., and McGlade, C. J. (1998). The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J. Biol. Chem* 273, 9179-9187.
- Dobrosotskaya, I. Y., and James, G. L. (2000). MAGI-1 interacts with beta-catenin and is associated with cell-cell adhesion structures. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 270, 903-909.
- Dobrzynski, H., Billeter, R., Greener, I., Tellez, J., Chandler, N., Flagg, T., Nichols, C., Lopatin, A., and Boyett, M. (2006). Expression of Kir2.1 and Kir6.2 transgenes under the control of the alpha-MHC promoter in the sinoatrial and atrioventricular nodes in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 41, 855-867.

- Dorner, A., Xiong, D., Couch, K., Yajima, T., and Knowlton, K. (2004). Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J Biol Chem* *279*, 18497-18503.
- Dorner, A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F., et al. (2005). Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* *118*, 3509-3521.
- Duffy, H. S., Fort, A. G., and Spray, D. C. (2006). Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv Cardiol* *42*, 1-17.
- Dyck, J. R., Hopkins, T. A., Bonnet, S., Michelakis, E. D., Young, M. E., Watanabe, M., Kawase, Y., Jishage, K., and Lopaschuk, G. D. (2006). Absence of Malonyl Coenzyme A Decarboxylase in Mice Increases Cardiac Glucose Oxidation and Protects the Heart From Ischemic Injury. *Circulation* *114*, 1721-1728.
- El-Badawi, A., and Schenk, E. (1967). Histochemical methods for separate, consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in cryostat sections. *J Histochem Cytochem* *15*, 580-588.
- Elkilany, G. E. N., Al-Qbandi, M. A., Sayed, K. A., and Kabbash, I. (2008). Dilated cardiomyopathy in children and adults: what is new? *ScientificWorldJournal* *8*, 762-775.
- Excoffon, K. J. D. A., Gansemer, N., Traver, G., and Zabner, J. (2007). Functional effects of coxsackievirus and adenovirus receptor glycosylation on homophilic adhesion and adenoviral infection. *J. Virol* *81*, 5573-5578.
- Excoffon, K. J. D. A., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G. L., and Zabner, J. (2004). A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J. Cell. Sci* *117*, 4401-4409.
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem* *273*, 29745-29753.
- Fanning, A. S., Ma, T. Y., and Anderson, J. M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* *16*, 1835-1837.
- Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H., et al. (1999). Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* *6*, 1520-1535.
- Fechner, H., Noutsias, M., Tschoepe, C., Hinze, K., Wang, X., Escher, F., Pauschinger, M., Dekkers, D., Vetter, R., Paul, M., et al. (2003). Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* *107*, 876-882.

- Ferdous, A., Caprioli, A., Iacovino, M., Martin, C. M., Morris, J., Richardson, J. A., Latif, S., Hammer, R. E., Harvey, R. P., Olson, E. N., et al. (2009). Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 814-819.
- Feuer, R., Pagarigan, R. R., Harkins, S., Liu, F., Hunziker, I. P., and Whitton, J. L. (2005). Coxsackievirus targets proliferating neuronal progenitor cells in the neonatal CNS. *J. Neurosci* *25*, 2434-2444.
- Flenniken, A., Osborne, L., Anderson, N., Ciliberti, N., Fleming, C., Gittens, J., Gong, X., Kelsey, L., Lounsbury, C., Moreno, L., et al. (2005). A *Gja1* missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development* *132*, 4375-4386.
- Fodstad, H., Swan, H., Auberson, M., Gautschi, I., Loffing, J., Schild, L., and Kontula, K. (2004). Loss-of-function mutations of the K<sup>+</sup> channel gene *KCNJ2* constitute a rare cause of long QT syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *37*, 593-602.
- Freimuth, P., Philipson, L., and Carson, S. D. (2008). The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* *323*, 67-87.
- Friedman, D. M., Rupel, A., Glickstein, J., and Buyon, J. P. (2002). Congenital heart block in neonatal lupus: the pediatric cardiologist's perspective. *Indian J Pediatr* *69*, 517-522.
- Gallicano, G., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998). Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol* *143*, 2009-2022.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* *11*, 315-24.
- He, X., Asthana, S., and Sorger, P. K. (2000). Transient sister chromatid separation and elastic deformation of chromosomes during mitosis in budding yeast. *Cell* *101*, 763-75.
- Hein, L., Stevens, M., Barsh, G., Pratt, R., Kobilka, B., and Dzau, V. (1997). Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6391-6396.
- Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y., Odani, S., et al. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* *77*, 19-28.
- Hotta, Y., Honda, T., Naito, M., and Kuwano, R. (2003). Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res* *143*, 1-13.

- Ide, N., Hata, Y., Nishioka, H., Hirao, K., Yao, I., Deguchi, M., Mizoguchi, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., et al. (1999). Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene* *18*, 7810-7815.
- Ito, M., Kodama, M., Masuko, M., Yamaura, M., Fuse, K., Uesugi, Y., Hirono, S., Okura, Y., Kato, K., Hotta, Y., et al. (2000). Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* *86*, 275-280.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol* *147*, 1351-1363.
- Jay, P., Harris, B., Maguire, C., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., Kupershmidt, S., Roden, D., Schultheiss, T., O'Brien, T., et al. (2004). Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest* *113*, 1130-1137.
- Jiang, S., and Caffrey, M. (2007). Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 2. *Protein Sci.* *16*, 539-542.
- Jiang, S., Jacobs, A., Laue, T. M., and Caffrey, M. (2004). Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 1. *Biochemistry* *43*, 1847-1853.
- Kao, H., Cheng, C., Chen, Y., Hung, S., Huang, C., Millington, D., Kikuchi, T., Wu, J., and Chen, Y. (2006). ENU mutagenesis identifies mice with cardiac fibrosis and hepatic steatosis caused by a mutation in the mitochondrial trifunctional protein beta-subunit. *Hum Mol Genet* *15*, 3569-3577.
- Kasahara, H., Wakimoto, H., Liu, M., Maguire, C. T., Converso, K. L., Shioi, T., Huang, W. Y., Manning, W. J., Paul, D., Lawitts, J., et al. (2001). Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Clin Invest* *108*, 189-201.
- Kashimura, T., Kodama, M., Hotta, Y., Hosoya, J., Yoshida, K., Ozawa, T., Watanabe, R., Okura, Y., Kato, K., Hanawa, H., et al. (2004). Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. *Virchows Arch* *444*, 283-292.
- Kausalya, P. J., Reichert, M., and Hunziker, W. (2001). Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett* *505*, 92-96.
- Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagendorff, A., Kruger, O., Traub, O., and Willecke, K. (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* *8*, 299-302.
- Kishimoto, C., Matsumori, A., Ohmae, M., Tomioka, N., and Kawai, C. (1984). Electrocardiographic findings in experimental myocarditis in DBA/2 mice: complete atrioventricular block in the acute stage, low voltage of the QRS complex in the subacute stage and arrhythmias in the chronic stage. *J Am Coll Cardiol* *3*, 1461-1468.

- Koonen, D. P. Y., Febbraio, M., Bonnet, S., Nagendran, J., Young, M. E., Michelakis, E. D., and Dyck, J. R. B. (2007). CD36 expression contributes to age-induced cardiomyopathy in mice. *Circulation* *116*, 2139-2147.
- Kreuzberg, M., Willecke, K., and Bukauskas, F. (2006). Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med* *16*, 266-272.
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* *28*, 15-22.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* *127*, 3501-3512.
- Lakatta, E. G., Wang, M., and Najjar, S. S. (2009). Arterial aging and subclinical arterial disease are fundamentally intertwined at macroscopic and molecular levels. *Med. Clin. North Am* *93*, 583-604, Table of Contents.
- Lei, M., Huang, C. L., and Zhang, Y. (2008). Genetic Na<sup>+</sup> channelopathies and sinus node dysfunction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *98*, 171-178.
- Li, J., Levin, M., Xiong, Y., Petrenko, N., Patel, V., and Radice, G. (2008). N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility. *J Mol Cell Cardiol* *44*, 597-606.
- Li, J., Patel, V., Kostetskii, I., Xiong, Y., Chu, A., Jacobson, J., Yu, C., Morley, G., Molkentin, J., and Radice, G. (2005). Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res* *97*, 474-481.
- Li, J., Patel, V., and Radice, G. (2006). Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. *Clin Med Res* *4*, 42-52.
- Lim, B., Xiong, D., Dorner, A., Youn, T., Yung, A., Liu, T. I., Gu, Y., Dalton, N. D., Wright, A. T., Evans, S. M., et al. (2008). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest* *118*, 2758-2770.
- Lin, B. C., Sullivan, R., Lee, Y., Moran, S., Glover, E., and Bradfield, C. A. (2007). Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality. *J. Biol. Chem* *282*, 35924-35932.
- Lisewski, U., Shi, Y., Wrackmeyer, U., Fischer, R., Chen, C., Schirdewan, A., Jüttner, R., Rathjen, F., Poller, W., Radke, M. H., et al. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* *205*, 2369-79.
- Luissint, A., Lutz, P. G., Calderwood, D. A., Couraud, P., and Bourdoulous, S. (2008). JAM-L-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is regulated in cis by alpha4beta1 integrin activation. *J. Cell Biol* *183*, 1159-1173.

- Mandell, K. J., Berglin, L., Severson, E. A., Edelhofer, H. F., and Parkos, C. A. (2007). Expression of JAM-A in the human corneal endothelium and retinal pigment epithelium: localization and evidence for role in barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48, 3928-3936.
- Mangoni, M. E., Traboulsi, A., Leoni, A., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H., et al. (2006). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ. Res* 98, 1422-1430.
- Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., and Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol. (Lond.)* 562, 223-234.
- Martinez, A. D., Hayrapetyan, V., Moreno, A. P., and Beyer, E. C. (2002). Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ. Res* 90, 1100-1107.
- van der Merwe, P. A., Barclay, A. N., Mason, D. W., Davies, E. A., Morgan, B. P., Tone, M., Krishnam, A. K., Ianelli, C., and Davis, S. J. (1994). Human cell-adhesion molecule CD2 binds CD58 (LFA-3) with a very low affinity and an extremely fast dissociation rate but does not bind CD48 or CD59. *Biochemistry* 33, 10149-10160.
- Mino, A., Ohtsuka, T., Inoue, E., and Takai, Y. (2000). Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation (MAGI)-1/brain angiogenesis inhibitor 1-associated protein (BAP1) as a scaffolding molecule for Rap small G protein GDP/GTP exchange protein at tight junctions. *Genes Cells* 5, 1009-1016.
- Mirza, M., Raschperger, E., Philipson, L., Pettersson, R. F., and Sollerbrant, K. (2005). The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNX2). *Exp. Cell Res* 309, 110-120.
- Mohacsi, P., and Carrel, T. (2005). [Indication, management and problems of cardiac transplantation]. *Ther Umsch* 62, 473-476.
- Molkentin, J. D., Kalvakolanu, D. V., and Markham, B. E. (1994). Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol* 14, 4947-4957.
- Mori, A., Zhu, Y., Vahora, I., Nieman, B., Koshiba-Takeuchi, K., Davidson, L., Pizard, A., Seidman, J., Seidman, C., Chen, X., et al. (2006). Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol* 297, 566-586.
- Moskowitz, I., Pizard, A., Patel, V., Bruneau, B., Kim, J., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C., Seidman, C., and Seidman, J. (2004). The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development* 131, 4107-4116.



- Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., and Sawada, N. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 208, 123-132.
- Nasuno, A., Toba, K., Ozawa, T., Hanawa, H., Osman, Y., Hotta, Y., Yoshida, K., Saigawa, T., Kato, K., Kuwano, R., et al. (2004). Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in neointima of the rat carotid artery. *Cardiovasc Pathol* 13, 79-84.
- Nguyen, H., Wolfe, J., Holmes, D., and Edwards, W. (1988). Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases. *J Am Coll Cardiol* 11, 662-671.
- Nishii, K., Kumai, M., Egashira, K., Miwa, T., Hashizume, K., Miyano, Y., and Shibata, Y. (2003). Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun Adhes* 10, 365-369.
- Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warraich, R., Yacoub, M., et al. (2001). Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104, 275-280.
- Oxford, E., Musa, H., Maass, K., Coombs, W., Taffet, S., and Delmar, M. (2007). Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res* 101, 703-711.
- Papadatos, G., Wallerstein, P., Head, C., Ratcliff, R., Brady, P., Benndorf, K., Saumarez, R., Trezise, A., Huang, C., Vandenberg, J., et al. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6210-6215.
- Patrie, K. M., Drescher, A. J., Welihinda, A., Mundel, P., and Margolis, B. (2002). Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J. Biol. Chem* 277, 30183-30190.
- Perriard, J., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med* 13, 30-8.
- Peters, N. (2006). Gap junctions: clarifying the complexities of connexins and conduction. *Circ Res* 99, 1156-1158.
- Petrella, J., Cohen, C., Gaetz, J., and Bergelson, J. (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J Virol* 76, 10503-10506.
- Pfrendschuh, M., and Schölmerich, J. (2004). *Pathophysiologie Pathobiochemie* 2nd ed. (Urban & Fischer Bei Elsevier).

- Philipson, L., and Pettersson, R. F. (2004). The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 273, 87-111.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 102, 89-97.
- Pointis, G., and Segretain, D. (2005). Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab* 16, 300-306.
- van Raaij, M. J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J. M., and Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure* 8, 1147-1155.
- Raschperger, E., Thyberg, J., Pettersson, S., Philipson, L., Fuxe, J., and Pettersson, R. (2006). The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res* 312, 1566-1580.
- Raschperger, E., Engstrom, U., Pettersson, R. F., and Fuxe, J. (2004). CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem* 279, 796-804.
- Ream, M., Ray, A. M., Chandra, R., and Chikaraishi, D. M. (2008). Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 295, R583-595.
- Reaume, A., de Sousa, P., Kulkarni, S., Langille, B., Zhu, D., Davies, T., Juneja, S., Kidder, G., and Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Remme, C., Verkerk, A., Nuyens, D., van Ginneken, A., van, B. S., Belterman, C., Wilders, R., van Roon, M., Tan, H., Wilde, A., et al. (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 114, 2584-2594.
- Rothenberg, F., Nikolski, V. P., Watanabe, M., and Efimov, I. R. (2005). Electrophysiology and anatomy of embryonic rabbit hearts before and after septation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H344-351.
- Saffitz, J. (2006). Connexins, conduction, and atrial fibrillation. *N Engl J Med* 354, 2712-2714.
- Salomonsson, S., Sonesson, S., Ottosson, L., Muhallab, S., Olsson, T., Sunnerhagen, M., Kuchroo, V., Thoren, P., Herlenius, E., and Wahren-Herlenius, M. (2005). Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J Exp Med* 201, 11-17.

- Sanford, J. L., Edwards, J. D., Mays, T. A., Gong, B., Merriam, A. P., and Rafael-Fortney, J. A. (2005). Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. *J Mol Cell Cardiol* 38, 323-32.
- Sato, Y., Osaku, A., Koyama, S., Mizukawa, S., Onikura, S., Yagi, H., Suzuki, T., Sawada, T., Uchiyama, T., Kanmatsuse, K., et al. (1989). Complete atrioventricular block associated with regional myocardial scarring in a patient with Coxsackie B2 myocarditis. *Jpn Heart J* 30, 935-941.
- Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56, 502-514.
- Schmidt, R. F., Lang, F., and Thews, G. (2004). *Physiologie des Menschen*. MIT Pathophysiologie 29th ed. (Springer-Verlag GmbH).
- Schuster, H., and Trappe, H. (2005). *EKG-Kurs für Isabel* 4th ed. (Thieme, Stuttgart).
- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci* 24, 1-29.
- Silverman, M. E., Upshaw, C. B., and Lange, H. W. (2004). Woldemar Mobitz and His 1924 Classification of Second-Degree Atrioventricular Block. *Circulation* 110, 1162-1167.
- Simon, A. M., McWhorter, A. R., Dones, J. A., Jackson, C. L., and Chen, H. (2004). Heart and head defects in mice lacking pairs of connexins. *Dev. Biol* 265, 369-383.
- Skog, A., Wahren-Herlenius, M., Sundstrom, B., Bremme, K., and Sonesson, S. (2008). Outcome and Growth of Infants Fetally Exposed to Heart Block-Associated Maternal Anti-Ro52/SSA Autoantibodies. *Pediatrics* 121, e803-809.
- Slawik, M., and Vidal-Puig, A. J. (2006). Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res. Rev* 5, 144-164.
- Smoak, I. W. (1997). Brief hypoglycemia alters morphology, function, and metabolism of the embryonic mouse heart. *Reprod. Toxicol* 11, 495-502.
- Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M., and Molkenstin, J. D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ. Res* 89, 20-25.
- Stephen, L., Fawkes, A., Verhoeve, A., Lemke, G., and Brown, A. (2007). A critical role for the EphA3 receptor tyrosine kinase in heart development. *Dev Biol* 302, 66-79.
- Thoelen, I., Keyaerts, E., Lindberg, M., and Van Ranst, M. (2001). Characterization of a cDNA encoding the bovine coxsackie and adenovirus receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 288, 805-808.

- Tomko, R., Johansson, C., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J., and Philipson, L. (2000). Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 255, 47-55.
- Tomko, R., Xu, R., and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3352-3356.
- van't Hof, W., and Crystal, R. (2002). Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Virol* 76, 6382-6386.
- van Veen, T. A. B., van Rijen, H. V. M., and Jongsma, H. J. (2006). Physiology of cardiovascular gap junctions. *Adv Cardiol* 42, 18-40.
- Waldeyer, A. (2002). *Anatomie des Menschen* 17th ed. (Gruyter).
- Walters, R., Freimuth, P., Moninger, T., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789-799.
- Wang, X., and Bergelson, J. (1999). Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73, 2559-2562.
- Welsch, U. (2006). *Sobotta Lehrbuch Histologie mit StudentConsult-Zugang: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. StudentConsult 2nd ed. (Urban & Fischer Verlag).
- Wilhelm, M., Kirste, W., Kuly, S., Amann, K., Neuhuber, W., Weyand, M., Daniel, W. G., and Garlichs, C. (2006). Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation. *Heart Lung Circ* 15, 30-37.
- Wilkenshoff, U., and Kruck, I. (2008). *Handbuch der Echokardiographie* 3rd ed. (Thieme, Stuttgart).
- Wolf, C. M., and Berul, C. I. (2008). Molecular Mechanisms of Inherited Arrhythmias. *Curr Genomics*. 9, 160-168.
- Xu, R., and Crowell, R. L. (1996). Expression and distribution of the receptors for coxsackievirus B3 during fetal development of the Balb/c mouse and of their brain cells in culture. *Virus Res* 46, 157-170.
- Yamamoto, M., Dobrzynski, H., Tellez, J., Niwa, R., Billeter, R., Honjo, H., Kodama, I., and Boyett, M. R. (2006). Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc. Res* 72, 271-281.
- Yasuhara, O., Matsuo, A., Bellier, J., and Aimi, Y. (2007). Demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type in the rat heart. *J Histochem Cytochem* 55, 287-99.

- Yeh, H., Lee, P., Su, C., Tian, T., Ko, Y., and Tsai, C. (2006). Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment. *Am. J. Hypertens* *19*, 129-135.
- Yeh, H., Lu, C., Wu, Y., Chen, C., Hong, R., Ko, Y., Shiao, M., Severs, N. J., and Tsai, C. (2003). Reduced expression of endothelial connexin37 and connexin40 in hyperlipidemic mice: recovery of connexin37 after 7-day simvastatin treatment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* *23*, 1391-1397.
- Yu, J. C. L., Lauer, M. R., Young, C., Liem, L. B., Hou, C., and Sung, R. J. (1996). Localization of the origin of the atrioventricular junctional rhythm induced during selective ablation of slow-pathway conduction in patients with atrioventricular node reentrant tachycardia. *American Heart Journal* *131*, 937-946.
- Zen, K., Liu, Y., McCall, I. C., Wu, T., Lee, W., Babbin, B. A., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2005). Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2694-2703.
- Zhang, Q., Timofeyev, V., Lu, L., Li, N., Singapuri, A., Long, M. K., Bond, C. T., Adelman, J. P., and Chiamvimonvat, N. (2008). Functional roles of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in atrioventricular nodes. *Circ Res* *102*, 465-71.

## 9 Veröffentlichungen

### Publikationen:

Shi Y, Chen C, **Lisewski U**, Wrackmeyer U, Radke M, Westermann D, Sauter M, Tschöpe C, Poller W, Klingel K, Gotthardt M. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. (2009) *J Am Coll Cardiol.* (14)1219-26.

**Lisewski U**, Shi Y, Wrackmeyer U, Fischer R, Chen C, Schirdewan A, Jüttner R, Rathjen F, Poller W, Radke MH, Gotthardt M. The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. (2008) *J Exp Med.* (10):2369-79.

Weidemann W, Stelzl U, **Lisewski U**, Bork K, Wanker EE, Hinderlich S, Horstkorte R. The collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1) and the promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) bind to UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), the key enzyme of sialic acid biosynthesis. (2006) *FEBS Lett.* (2006) (28-29):6649-54.

Sollwedel A, Bertoja AZ, Zenclussen ML, Gerlof K, **Lisewski U**, Wafula P, Sawitzki B, Woiciechowsky C, Volk HD, Zenclussen AC. Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. (2005) *J Immunol.* (8):4875-85.

### Vorträge:

- 10/2006 MDC, Butterfly-Seminar "CAR in embryonic development & heart disease"  
 10/2008 MDC, Cardiovascular Research Retreat, Hubertusstock  
 "Arrhythmia in a CAR KO model."

### Posterpräsentation:

- 04/2009 MDC / FMP PhD-Symposium  
 04/2009 6<sup>th</sup> International Ascona, Workshop on Cardiomyocyte Biology, CH;  
 "The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication." (Posterpreis)

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AV	atrio-ventrikulär
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CO	Herzzeitvolumen ( <i>cardiac output</i> )
CVB3	Coxsackie Viren Typ B3
Cx	Connexin
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EKG	Elektrokardiogramm
ECL	Enhanced-Chemiluminescence-Luminol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektions Fraktion
ENU	Ethylnitrosoharnstoff
ET	Ejektionszeit
FA	Formamid
FS	Verkürzungsfraction
FCS	Fötale Kälberserum
H&E	Hämatoxylin/Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
HV	His-Ventrikel
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunoglobulin

iso-OMPA	Tetraisopropylpyrophosphamid
kDa	Kilo Dalton
KI	Knockin
KO	Knockout
LV	Linker Ventrikel
OF	Ausflustraktsignal ( <i>outflow</i> )
MCM	MerCreMer
mRNA	Messenger RNA
P	pressure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSS	Sick-Sinus-Syndrom
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
Tam	Tamoxifen
TE	Tris-EDTA
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	Polyoxymethylenether
U	Unit
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp



---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Gotthardt danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für seine außerordentlich gute Betreuung, Motivation und freundliche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Mutzel für sein Interesse und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Unterstützung möchte ich mich bei den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Gotthardt bedanken.

Dr. Yu Shi danke ich für die Einarbeitung in das Projekt, die enge Zusammenarbeit und Unterstützung bei expressionsanalytischen Untersuchungen.

Uta Wrackmeyer möchte ich für ihr starkes Mitwirken im CAR-Projekt, ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die Durchführung der Elektronenmikroskopie danken.

Bei Dr. Michael Radke möchte ich mich für die große Hilfe bei der 3D-Rekonstruktion bedanken. Den Azubis Regina Piske, Mandy Terne, Carolin Schmidt und Melanie Manzke danke ich für ihre Motivation und ihren Fleiß beim Durchführen der Laborarbeiten.

Katharina Rost danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Geduld beim Lesen der Arbeit.

Bei Beate Golbrich und Nora Bergmann möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Dr. Robert Fischer möchte ich mich für die außerordentlich gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank für das Interesse und Engagement bei der Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen.

Martin Taube und Dr. Arnd Heuser möchte ich für die Durchführung der Echokardiographie- und Ultraschalluntersuchungen danken.

Des Weiteren möchte ich mich für die Durchführung der Konduktanzkatheteruntersuchung bei Dr. Dirk Westermann bedanken.

Herrn Prof. Dr. Fritz Rathjen danke ich für die Bereitstellung des CAR-Antikörpers und Dr. Rene Jüttner danke ich für die Etablierung und Durchführung der Dye-Kopplungsstudie.

Ralph Plehm und Reika Langangki möchte ich für die Durchführung der Telemetrie danken.

Für die Einführung in die Laserdissektionsmikroskopie möchte ich mich bei Bianca Kochnowsky und Dr. Qing Wang bedanken.

Zu ganz großem Dank bin ich meiner Familie und meinen Freunden verpflichtet, die mich durch ihren Zuspruch und ihr Verständnis hervorragend unterstützt haben.