

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. M. J. Lohse

**Longitudinale Untersuchungen der kardialen  
Morphologie von *knockin*-Mäusen mit humanen  
Myosinmutationen**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Robert Blankenburg  
aus Sebnitz

Würzburg, August 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Schmitt

Korreferent: Prof. Dr. med. S. Frantz

Dekan: Professor. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2012

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Bedeutung von Herz-Kreislaferkrankungen	1
1.2. Definition der Kardiomyopathie	2
1.3. Einteilung der Kardiomyopathie	2
1.4. Epidemiologie	4
1.5. Aufbau und Funktion der Herzmuskelzelle	4
1.5.1. Aufbau der Kardiomyozyten	4
1.5.2. Aufbau der Sarkomere	5
1.5.3. Der Kontraktionsablauf	7
1.5.4. Aufbau des Myosins	8
1.6. Die Genetik der schweren Kette des kardialen Myosins	10
1.7. Hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie	11
1.7.1. Hypertrophe Kardiomyopathie	12
1.7.1.1. Makroskopische und Mikroskopische Veränderungen der hypertrophen Kardiomyopathie	12
1.7.1.2. Pathophysiologische Veränderungen und Klinik der hypertrophen Kardiomyopathie	13
1.7.1.3. Genetik der hypertrophen Kardiomyopathie	14
1.7.2. Dilatative Kardiomyopathie	16
1.7.2.1. Makroskopische und Mikroskopische Veränderungen der dilatativen Kardiomyopathie	16
1.7.2.2. Pathophysiologische Veränderungen und Klinik der dilatativen Kardiomyopathie	16
1.7.2.3. Genetik der dilatativen Kardiomyopathie	17
1.8. Therapeutische Optionen der hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie	19
1.9. Tiergenetik und molekulare Methoden – Transgene Tiermodelle	20

1.10.	Untersuchte Myosin Mutationen	22
1.10.1.	Übersicht über die untersuchten Gene der β-Myosin Mutationen	23
1.10.2.	Dilatative Kardiomyopathie	23
1.10.2.1.	Mutation S532P (Serin 532 Prolin)	23
1.10.2.2.	Mutation F764L (Phenylalanin 764 Leucin)	24
1.10.3.	Hypertrophe Kardiomyopathie	25
1.10.3.1.	Mutation R453C (Arginin 453 Cystein)	25
1.10.3.2.	Mutation R719W (Arginin 719 Tryptonin)	26
1.10.3.3.	Mutation V606M (Valin 606 Methionin)	26
1.10.4.	Phospholamban	26
	Zielsetzung	28
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1.1.	Herzexplantationverfahren für <i>wheat germ agglutinin</i> - Färbung und Hämalaun/Eosin-Färbung	30
2.1.2.	Kardioplegie	31
2.2.	Histologie	32
2.2.1.	Einbettung und Anfertigung der Herzquerschnitte	32
2.2.2.	Hämalaun/Eosin Färbung der Paraffinschnitte	33
2.2.3.	WGA Färbung der Paraffinschnitte und isolierter Zellen	34
2.3.	Operative Stenosierung des Aortenbogens	34
2.4.	Myozytenisolierung	35
2.5.	Planimetrie	39
2.5.1	Vermessen der Herzquerschnitte nach HE-Färbung	39
2.5.2.	Vermessen der Myozyten im Querschnitt nach <i>wheat</i> <i>germ agglutinin</i> -Färbung	40
2.5.3.	Vermessen isolierter Myozyten nach <i>wheat germ</i> <i>agglutinin</i> -Färbung	41
2.6.	Auswertung und Darstellung der Präparate	42
2.7.	Umrechnung der Messwerte von Pixel in Mikrometer	42
2.8.	Statistik	43
2.9.	Maushaltung	43

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1.	Maus- und Herzgewicht	44
3.1.1.	Mausgewicht	44
3.1.2.	Herzgewicht	45
3.1.3.	Herzgewicht zu Mausgewicht	45
3.1.4.	Herzgewicht zu Nierengewicht	46
3.1.5.	Herzgewicht zu Tibialänge	48
3.2.	Ergebnisse der Hämalaun Eosin-Färbung	48
3.2.1.	Herzfläche im medianen Querschnitt	48
3.2.2.	Fläche des linken Ventrikels im medianen Herzquerschnitt	51
3.2.3.	Fläche des linksventrikulären Lumen im medianen Herzquerschnitt	53
3.2.4.	Herzwandfläche des linken Ventrikels im medianen Querschnitt	56
3.2.5.	Septumstärke	58
3.2.6.	Stärke der linksventrikulären freien Herzwand	60
3.3.	Ergebnisse der <i>wheat germ agglutinin</i> -Färbung	62
3.3.1.	Zellfläche	62
3.4.	Ergebnisse der Myozytenisolierung	64
3.4.1.	Myozytenfläche	64
3.4.2.	Myozytenbreite	66
3.4.3.	Myozytenlänge	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1.	Einleitung	70
4.2.1.	Phänotypisierung des Wildtyps	72
4.2.2.	Phänotypisierung der Mäuse mit dem PLN <sup>R9C</sup> -Transgen	73
4.2.3.	Phänotypisierung der Mäuse mit stenosierter Aorta	74
4.2.4.	Phänotypisierung heterozygoter FL/+ und SP/+ Mäuse	76
4.2.5.	Phänotypisierung homozygoter FL/FL- und SP/SP-Mäuse	77
4.2.6.	Phänotypisierung heterozygoter Genotyp RC/+-, RW/+-, VM/+ Mäuse	80

4.2.7.	Phänotypisierung homozygoter VM/VM-Mäuse	81
4.3.	Vergleich der Morphometrie isolierter Myozyten und Herzquerschnitte	83
4.4	Detektion geeigneter Parameter zur Differenzierung hypertropher und dilatativer kardialer Morphologien	84
4.4.1	Diagnostische und morphologische Grundlagen der HCM und DCM	84
4.4.2.	Herzgewicht	86
4.4.3	Herzfläche und linksventrikuläre Fläche im medianen Querschnitt	87
4.4.4.	Linksventrikuläres Lumen im medianen Querschnitt	88
4.4.5.	Herzwandfläche im medianen Querschnitt	89
4.4.6.	interventrikuläre Septumstärke und freie Herzwandstärke	89
4.4.7.	Zellfläche im medianen Querschnitt	90
4.4.8.	Zellfläche (längs) nach Myozytenisolierung	91
4.4.9.	Myozytenbreite und Länge nach Myozytenisolierung	92
4.5.	Parameter zur frühzeitigen Identifikation myokardialer Hypertrophie und Dilatation	92
4.6.	Differenzierte Betrachtung der Entwicklung des homozygoten und heterozygoten Genotyps	94
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6.1.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>6.2.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>6.3.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>110</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

### 1. Einleitung

#### 1.1. Klinische und ökonomische Relevanz von Herz-Kreislaufkrankungen

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stehen in Deutschland mit circa 45% aller Todesfälle an der Spitze der Mortalitätsstatistik (Statistisches Bundesamt, 2008). Über 91 % der an Herz-/Kreislaufkrankungen Verstorbenen waren über 65 Jahre alt. Bei der Betrachtung der Krankheitskosten sind Herz-/Kreislaufkrankungen, zum Beispiel im Jahr 2004 mit 35,5 Mrd. EUR, ebenfalls an erster Stelle ([www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de) - Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen kommt die *American Heart Association (AHA) Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee* in ihrem *Update* von 2006 und 2007, sowie die WHO, die kardiovaskuläre Erkrankungen an erster Stelle der Todesursachen in den Industrieländern führt (Thom et al., 2006; Rosamond et al., 2007).

Die Zahlen und Angaben sind beispielhaft für die Prägnanz kardiovaskulärer Erkrankungen. Zudem ist ihre Inzidenz in den letzten Jahrzehnten trotz aller medizinischen Fortschritte stetig steigend, während die Häufigkeit anderer Krankheits- und Todesursachen, insbesondere bei Infektionserkrankungen, aufgrund besser Möglichkeiten der Prävention und Therapie rückläufig ist ([www.berlin-institut.org](http://www.berlin-institut.org)). Ursachen sind vor allem die gestiegene Lebenserwartung der Bevölkerung sowie das Fehlen erfolgreicher neuer Therapiestrategien.

Die häufigsten Herz-/Kreislaufkrankungen gemäß den aktuellen Statistiken des Statistischen Bundesamtes Deutschland sind die chronisch ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz. Der zweithäufigste Grund der Herzinsuffizienz und die häufigste Ursache für Herztransplantationen sind Kardiomyopathien.

### 1.2. Definition der Kardiomyopathie

Die WHO definierte 1980 erstmals die Kardiomyopathien als eine „Herzmuskelerkrankung unbekannter Ursache“ und erweiterte diese Definition 1995 um die Aussage: „Alle Erkrankungen die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen, werden als Kardiomyopathie bezeichnet“. (WHO, 1980) Aufgrund des aktuellen Wissenstandes hat die *AHA* im März 2006 folgende Definition der Kardiomyopathie vorgeschlagen: „Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise, aber nicht zwingend, eine pathologische Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Ihre Ätiologie ist vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien können auf das Herz begrenzt oder Teil eines Syndroms sein. Sie führt zu einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen oder kardiovaskulär bedingten Todesfällen“ (Maron et al., 2006).

### 1.3. Einteilung der Kardiomyopathie

Man unterscheidet primäre und sekundäre Kardiomyopathien (Abb. 1 und 2). Primäre Kardiomyopathien haben ihre Ursache im Herzmuskel selbst, während sekundäre Kardiomyopathien im Rahmen von Systemerkrankungen mit extrakardialer Ursache auftreten und häufig an anderen Organen symptomatisch werden. (Maron et al., 2006) Gebräuchlicher als die kausale Einteilung der Kardiomyopathie ist die klinische Abgrenzung verschiedener kardiomyopathischer Krankheitsbilder. Am häufigsten sind hypertrophische (HCM) und dilatative (DCM) Formen der Kardiomyopathie. Außerdem werden restriktive Kardiomyopathien (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien (ARVCM) und die nicht klassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM) unterschieden (Richardson et al., 1995).

# 1. EINLEITUNG

---

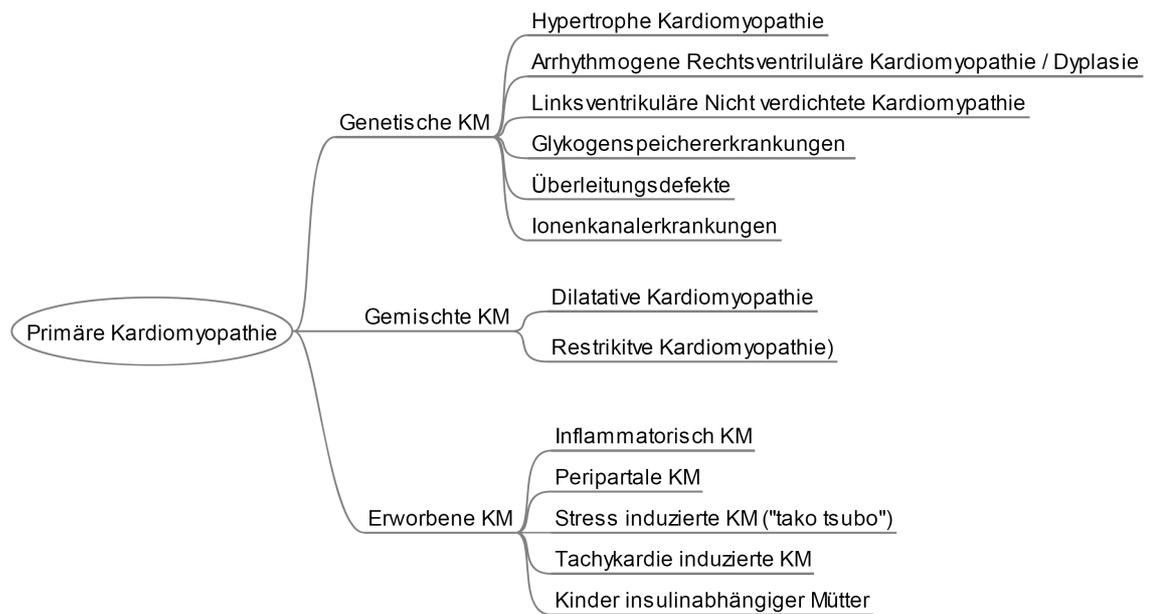


Abb. 1: Schematische Darstellung der Einteilung der primären Kardiomyopathie, bei der die Klinik der Erkrankung vorwiegend bzw. ausschließlich das Myokard betrifft. Die Einordnung erfolgt anhand der genetischen bzw. nicht genetischen Ätiologie. Diese Einteilung hat orientierenden Charakter, dass heißt primär genetisch bedingte Erkrankungen können ebenso nicht genetischer Ätiologie sein (Maron et al., 2006).

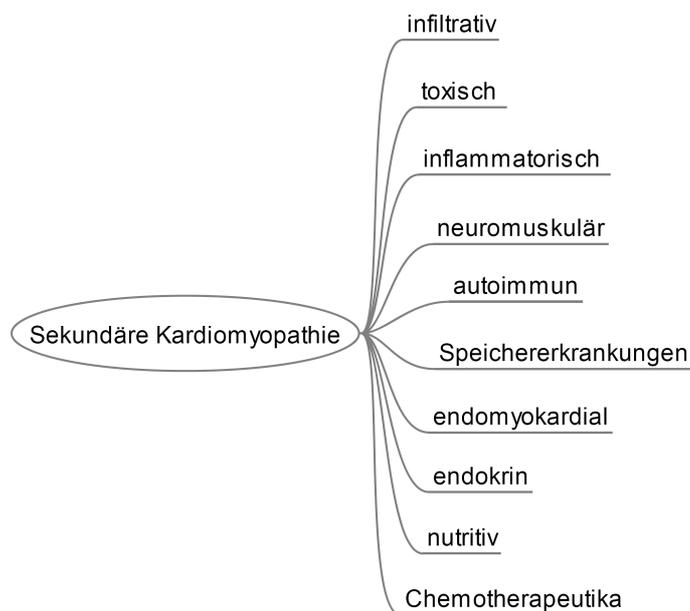


Abb. 2: Schematische Darstellung der Einteilung der sekundären Kardiomyopathie. Diese repräsentiert systemische Erkrankungen die das Myokard involvieren und zu pathologischen Veränderungen im Sinne einer Kardiomyopathie führen können (Maron et al., 2006).

### 1.4. Epidemiologie

Für hypertrophe Kardiomyopathien ergaben epidemiologische Studien eine Prävalenz von 200 Fällen pro 100000 Einwohner (Maron et al., 1995). Die jährliche Inzidenz liegt bei rund 19 Neudiagnosen pro 100000 Einwohner (Bagger et al., 1984; Codd et al., 1989). Im Gegensatz dazu haben die angeborenen Formen der DCM eine jährliche Inzidenz von etwa 5 bis 7,9 Erkrankungen je 100000 Einwohner und eine Prävalenz von 36,5 je 100000 Einwohner (Dec et al., 1994; Codd et al., 1989; Gillum 1986; Bagger et al., 1984).

Jedoch muss zwischen den angeborenen (genetischen) und den erworbenen Formen unterschieden werden. Die genetisch bedingte hypertrophische Kardiomyopathie ist häufiger als die genetisch bedingte dilatative Form. Während der überwiegende Teil der HCM genetisch bedingt ist, liegen der DCM in etwa 70 % der Fälle erworbene Ursachen zugrunde (Cohn et al., 1997, Codd et al., 1989). Angeborene und erworbene Ursachen zusammen genommen ist die DCM häufiger. Der Schwerpunkt in der Verteilung liegt bei der männlichen Bevölkerung (m:w = 3:1) (Coughlin et al. 1993).

Bei der Betrachtung der erhobenen epidemiologischen Daten ist darauf zu achten, dass die Penetranz altersabhängig ist und die Treffsicherheit zur Diagnosestellung stark vom Einsatz der diagnostischen Maßnahmen abhängt (Fatkin et. al., 2002).

### 1.5. Aufbau und Funktion der Herzmuskelzelle

#### 1.5.1. Aufbau der Kardiomyozyten

Das muskuläre Hohlorgan Herz, bestehend aus zwei Vorhöfen und zwei Herzkammern, erhält durch rhythmische Kontraktionen der Kardiomyozyten den Körperkreislauf und somit die Durchblutung aller Organe aufrecht. Die Kardiomyozyten bestehen aus einer Vielzahl an Myofibrillen, die parallel zueinander angeordnet sind und so additiv Kraft generieren können.

Die aus Myofibrillen bestehenden Kardiomyozyten besitzen meist zwei zentral

gelegene ovoide Zellkerne. Bei der Darstellung der zellulären Feinstruktur fallen ferner die große Anzahl der Mitochondrien sowie ihre Querstreifung auf.

Die Krafttransmission der verzweigten, End zu End verbundenen Kardiomyozyten findet über Disci intercalares, sogenannte Haftungskomplexe, statt. Diese bestehen aus der Fasciae adhaerens (Adhärenzkontakte) und Maculae adhaerens (Desmosomen). In diesen Komplexen sind die Nexus (*gap junctions*) für die Reizleitung im Verband verantwortlich. Im Zusammenwirken kommt es zur Kraftentwicklung und Kontraktion. (Karp G., „Molekulare Zellbiologie“, Springer Verlag, 2005)

### 1.5.2. Aufbau der Sarkomere

Sarkomere sind mit 2-2,5  $\mu\text{m}$  die kleinsten kontraktile Einheiten der Muskelzellen, beziehungsweise des Muskels. Jede Muskelzelle erscheint vollgestopft mit Sarkomeren. Die Muskelkontraktion entsteht durch longitudinale Verschiebungen der dicken und dünnen Filamente der Sarkomere gegeneinander. Die dünnen Filamente bestehen aus Aktin,  $\alpha$ -Tropomyosin, Troponin C, T und I. Die wichtigsten Bausteine der dicken Filamente sind die schweren Ketten des Myosins. Myosin stellt den Kontakt zum Aktin der dünnen Filamente her und fungiert als molekularer Motor der Muskelkontraktion. Die dicken Filamente bestehen ferner aus der essentiellen und regulatorischen Myosinleichtkette (ELC, RLC), dem Myosinbindungsprotein C und Titin. Diese Myosinfilamente sind mittels elastischer Titinfilamenten an zentralen M-Scheiben geknüpft. (Morita et al., 2005; Seidman et al., 2001)

## 1. EINLEITUNG

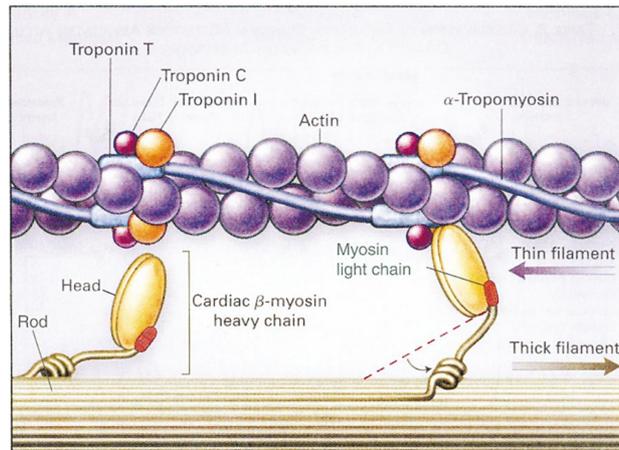


Abb. 4: Schematische Darstellung des dünnen Filaments (oben bestehend aus Troponin T, C und I,  $\alpha$ -Aktin und  $\alpha$ -Tropomyosin) und des dicken Filaments (unten, bestehend aus dem Myosinkopf und Myosinschwanz sowie der leichten und schweren  $\beta$ -Myosinkette ( $\beta$ -MHC) des kontraktiven Apparates, dem Sarkomer (Seidman et al., 2001)

Weitere Bausteine der Sarkomere sind Verankerungsproteine, die überwiegend in den flankierenden Z-Streifen lokalisiert sind und die Sarkomere und deren Bausteine untereinander verbinden, sowie Regulatorproteine, die den koordinierten Ablauf der Aktin-Myosin-Interaktion steuern. (s. Abb. 3)

Kontraktile Proteine	Verankerungsproteine	Regulatorproteine
Aktin	Aktinin	Tropomyosin
Myosin	Myosinbindungsprotein	Troponin
	Desmin	
	Myomesin	
	Nebulin	
	Telethonin	
	Titin	
	M-Protein	

Abb. 3: Übersicht der Sarkomerproteine und deren funktionelle Einordnung (Morita et al., 2005).

An der Überlappungsregion der dünnen und dicken Filamente, entsteht eine anisotrope, dunkle Schicht, die A-Bande genannt wird. Außerhalb der A-Banden, also zwischen Myosin und Z-Streifen, befindet sich die lichtmikroskopisch helle I-Bande (I=isotrop). Im Zentrum der A-Banden liegt die helle H-Bande. Hier befinden sich ausschließlich dicke Filamente. Im Zentrum der H-Bande ist die M-Linie zu sehen. Diese ist die Bindungszone der dicken

Myosinfilamente, sowie ruhendes Zentrum auf das sich, bei einer Kontraktion, die Z-Scheiben zu bewegen. (Priewe J., „Das Erste“, Urban&Fischer Verlag, 2007; Karp G., „Molekulare Zellbiologie“, Springer Verlag, 2005)

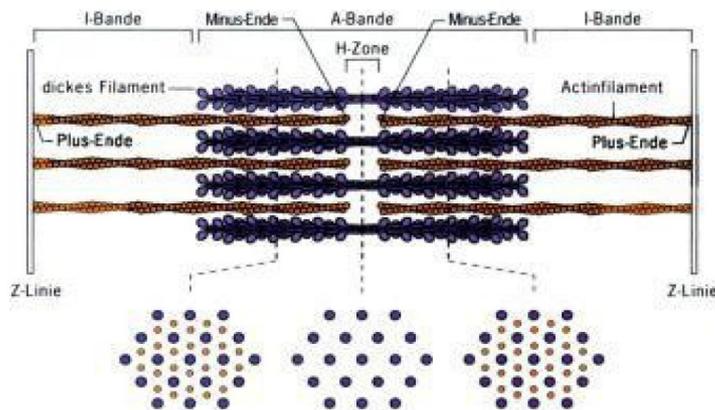


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sarkomers mit seinen dicken und dünnen Filamenten sowie der Einteilung in Banden und Zonen (J.Auber / Photo Researchers, Karp, „Molekulare Zellbiologie“, Springer Verlag, 2005).

### 1.5.3. Der Kontraktionsablauf

Erstmals 1957 beschreibt Huxley die Entstehung der Kontraktion im Sarkomer durch die Filamentgleittheorie. Sie beschreibt die zyklische Bewegung in den Sarkomeren von Aktin und Myosin, die von Aktivierungs-, Konformationsänderungs- und Dissoziationsprozessen gekennzeichnet ist und zu einer Muskelkontraktion führt. Diese Theorie ist bis heute in der Wissenschaft anerkannt und vielfach bestätigt.

Der Kontraktionszyklus beginnt mit einem Anstieg des zytosolischen Kalziums von ca.  $10^{-8}$  mol/l auf  $10^{-5}$  mol/l, was zu einer Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes führt. Das Tropomyosin verschiebt sich und verändert seine Position am Aktinfilament. Somit wird eine Myosinbindungsstelle frei. Das ist die Voraussetzung für die folgende Bindung des Myosins an das Aktin. Der Myosinkopf ist in Ruhe vom Aktin getrennt und verfügt über gebundenes Adenosintriphosphat (ATP). Aufgrund der erhöhten intrazellulären Kalzium Konzentration kann der aktivierte Myosinkopf dank seiner Adenosintriphosphatase (ATPase) das gebundene ATP spalten, was die Bindung von Aktin und Myosin zur Folge hat. Durch die freiwerdende Energie kommt es zu einer Konformationsänderung im Myosin mit der Folge, dass sich

das Aktinfilament zur Mitte des Sarkomers bewegt, d.h. von der äußeren Z-Scheibe auf die innere M-Scheibe zu. Nach der Konformationsänderung mit sinkender Kalzium Konzentration im Sarkomer folgt die Bindung eines erneuten ATP Moleküls an das Myosin, das sich anschließend vom Aktin löst und in seine Ausgangsposition zurückstellt. Jeder Kontraktionszyklus dauert etwa 50 ms und mit jeder Aktin-Myosin Interaktion verschieben sich Filamente gegeneinander um rund 36 nm.

(Capello et. al., 2007; T.J. Purcell et al., 2005; Silbernagel, „Taschenatlas Physiologie“, Silbernagl, 2001).

### 1.5.4. Aufbau des Myosins

Das Myosin gehört zu der großen Gruppe kontraktile Motorproteine. Zurzeit sind mindestens 19 Myosinklassen und Subklassen bekannt mit 139 Mitgliedern (Abb. 6). Davon codiert das menschliche Genom für mehr als 40 Gene des Myosins die in 11 Klassen eingeteilt werden können. Allen Myosinklassen ist gemein, dass sie eine Aktin bindende Domäne aufweisen und ATP zur Gewinnung von Bewegungsenergie hydrolysieren können (Foth et al., 2006; Hodge et Cope, 2000).

Die Klasse II wird als konventionelles Myosin bezeichnet und ist Bestandteil der kardialen und Skelettmuskulatur. Alle anderen sind sogenannte unkonventionelle Myosine. Sie besitzen unter anderem Aufgaben wie den intrazellulären Vesikeltransport in humanen Zellen. (Hodge et Cope, 2000)

# 1. EINLEITUNG

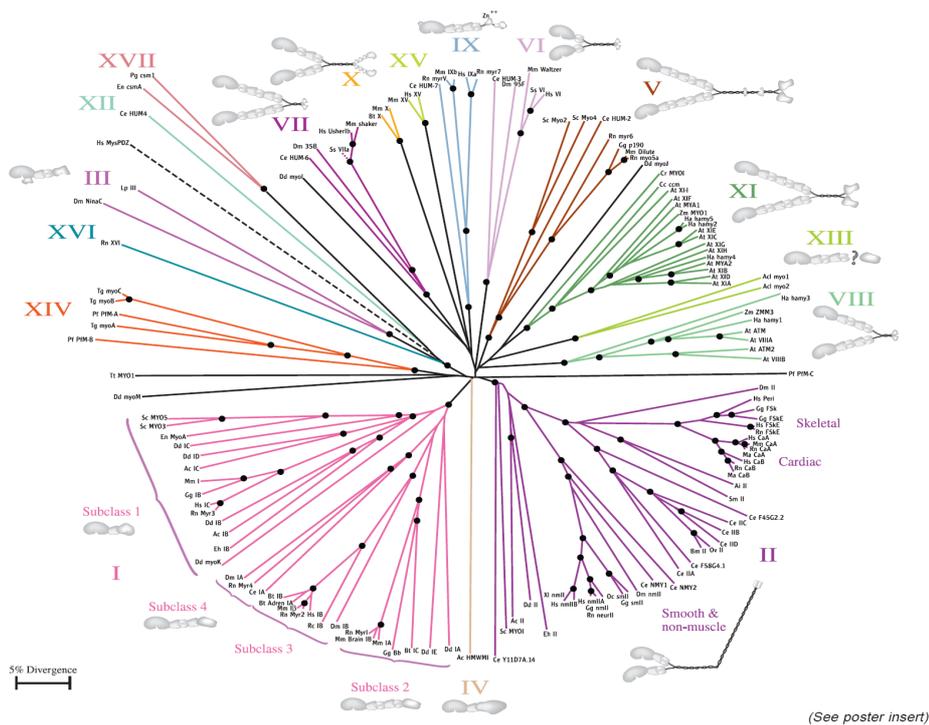


Abb. 6: Darstellung des phylogenetischen Stammbaums der Proteinfamilie der Myosine (Hodge et Cope, 2000)

Es gibt Isoformen der schweren Kette des Myosins (MHC),  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC. Die Isoform- $\alpha$  der schweren Myosinkette kommt im Embryonenherz und im Atrium des erwachsenen Herz vor. Die Isoform der  $\beta$ -MHC dagegen ist im Ventrikel und der langsamen Skelettmuskulatur lokalisiert. Im Gegensatz zur Verteilung des Myosin in humaner Muskulatur dominiert das  $\alpha$ -MHC in adulten Mäusen und Ratten im Atrium und dem Ventrikel des Herzens (Bonne et al., 1998).

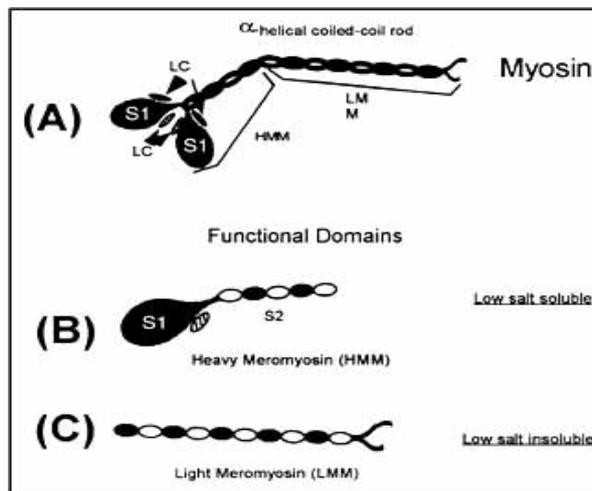


Abb. 7: Darstellung der Struktur des Myosins (Beschreibung s.u.) (M. Wick et al., Bulletin, Ohio State University).

Das Myosin ist wie folgt gegliedert: Es besteht aus zwei globulären Köpfen mit einer Aktin-Bindungsstelle und der ATP-Bindungsdomäne, sowie einer flexiblen Halsregion (HMM) und einem filamentösen Schwanz (LMM).

Die schweren Ketten bestehen aus einer 2 nm starken, langen Polypeptidkette mit einem globulären N-terminalen Ende (1300 Aminosäuren), das eine Aktin-Bindungsstelle und eine ATP Hydrolysefunktion enthält. Das C-terminale Ende (800 Aminosäuren) weist eine verdrillte  $\alpha$ -Helix Struktur („*coiled coil*“) auf. Zwei schwere Myosinketten verdrillen sich zu einem Myosin-Dimer und bilden aus monomeren Polypeptidketten eine Superhelix. Diese besteht aus 300-400 Myosin-Dimeren und ist circa 10 nm stark. Sie bilden ein dickes Filamentbündel, was eine Gesamtlänge des Moleküls von ca. 160 nm ergibt.

Die essentiellen und regulatorischen leichten Myosinketten bestehen aus relativ kleinen Molekülen und binden an den Hals- bzw. Kopfbereich des Myosins. Durch die Protease Trypsin wird Myosin in das schwere Meromyosin, die das Kopfteil und ein Stück der Superhelix enthält, und das leichte Meromyosin gespalten, mit der Superhelix und dem Schwanzteil. Papain kann das schwere Meromyosin in Subfragment 1 (S1, SF1) und 2 (S2, SF2) spalten. Das Subfragment S1 enthält die isolierte Motordomäne. Das Subfragment S2 besteht aus dem hydrophilen Hals, welches für die segmentale Flexibilität verantwortlich ist (M. Wick et al., Bulletin, Ohio State University, McLachlan and Karn, 1982; [www.flexikon.doccheck.com](http://www.flexikon.doccheck.com)).

### 1.6. Die Genetik der schweren Kette des kardialen Myosins

Das Gen (MYH7) für das Protein der schweren Kette des kardialen Myosins ( $\beta$ -MHC) liegt beim Menschen auf Chromosom 14q12 und besteht aus 22883 Basenpaaren. Seine 40 Exons exprimieren insgesamt 1935 Aminosäuren mit einem Gesamtgewicht von rund 200 Kilo-Dalton (Saez et al., 1987; Matsuoka et al., 1989).

Mutationen im MYH7-Gen sind die häufigste Ursache genetischer Kardiomyopathien. Es handelt sich vorwiegend um Punktmutationen. Nur

selten sind Deletion und Insertion vorhanden. Die erste Mutation, Punktmutation Arg403Glu in Exon 13, auf MYH7 wurde im Jahr 1990 entdeckt (Geisterfer-Lowrance et al., 1990) Seither wurden über 200 Mutationen allein auf MYH7 bekannt. Zum größten Teil betreffen sie den Myosinkopf, wo sie verteilt, innerhalb und außerhalb funktioneller Areale lokalisiert sind. Mutationen im Myosinkopf verursachen etwa 35-40 % aller HCM-Fälle. Als Ursache einer genetisch bedingter DCM sind sie deutlich seltener. Die ersten zwei DCM Mutationen (Ser532Pro und Phe764Leu) wurden im Jahr 2000 von Kamisago et al. beschrieben.

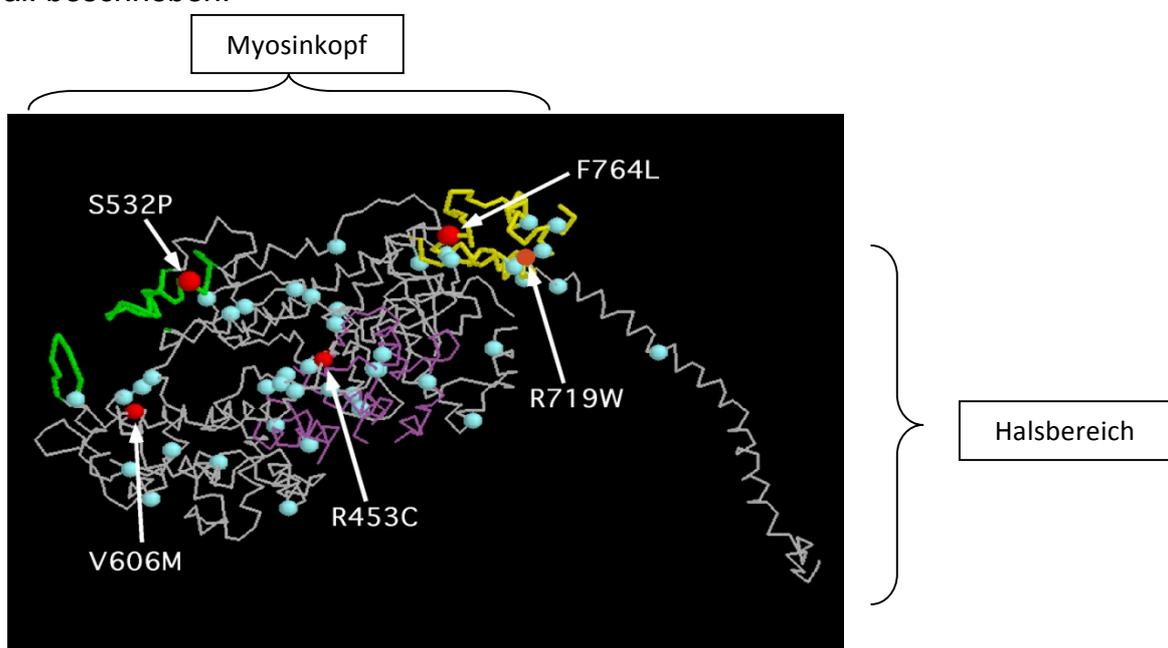


Abb. 8: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus des Myosinkopfes mit Halsbereich und die Lokalisation der hier untersuchten Mutationen S532P, V606M, R453C, R719W, F764L (rote Punkte). Die blauen Punkte zeigen Mutationen im Myosinkopf die zu einer HCM führen, die grüne Domäne zeigt die Aktinbindungsregion, die violette Domäne die ATP Bindungsregion und gelb stellt die Gelenkregion (Konverter) dar. (zur Verfügung gestellt von J.P. Schmitt)

### 1.7. Hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie

Herzerkrankungen führen zu strukturellen Umbauprozessen (*remodeling*) im Herzen. Abhängig von der jeweiligen Krankheitsursache können die resultierenden histologischen und makroskopischen Merkmale des Herzens sehr unterschiedlich sein. Außerdem ist die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression sehr variabel, so dass die Ausbildung des Phänotyps,

sowie klinische Symptome schon im Kindesalter oder erstmals im fortgeschrittenen Erwachsenenalter beobachtet werden (Morita et al., 2005).

### 1.7.1. Hypertrophe Kardiomyopathie

Die gefürchtetste Komplikation der HCM ist der plötzliche Herztod. Insgesamt tritt er zwar nur mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 1 % auf, es gibt jedoch auch HCM-Mutationen, die in deutlich höherer Frequenz zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. HCM ist eine Erkrankung der Sarkomere, da sie durch Mutationen in Proteinen des kontraktile Apparats hervorgerufen wird, hier jedoch nahezu jedes Sarkomerprotein betreffen kann.

Am häufigsten sind neben Mutationen im MYH7-Gen Mutationen im kardialen Myosin-Bindungsprotein C (MYBPC) und im Troponin T (TNNT). Zusammen sind Varianten in diesen drei Genen für rund 90 % aller HCM-Erkrankungen verantwortlich (Ho and Seidman, 2006). Funktionell sind HCM-Hezen durch eine gesteigerte kontraktile Funktion und beeinträchtigte Relaxation charakterisiert (Debold et al., 2007).

#### 1.7.1.1. Makroskopische und Mikroskopische Veränderungen der HCM

Grundsätzlich ist zu sagen, dass sich bei HCM wie bei DCM-, die Herzmuskelzellen vergrößern. Die HCM bildet eine konzentrische Hypertrophie aus, die in ca. 70 % der Fälle-, asymmetrisch das interventrikuläre Septum betont und zu einer teilweisen Verlegung des linksventrikulären Ausflusstrakts führen kann. Bei 8-10 % der Fälle entsteht eine uniforme, konzentrische Hypertrophie am linken und/oder rechten Ventrikel. Es kommt bei einem geringen Teil der Erkrankten zu einer milden lokalisierten Hypertrophie. Eine begleitende Hypertrophie des rechten Ventrikels ist bei ca. 30 % der erkrankten Patienten zu beobachten. In ca. 2 % kann die Hypertrophie nahezu ausschließlich auf die Herzspitze (Apex) begrenzt sein (Bonne et al., 1998; Mewis C., „Kardiologie compact“, 2006; Maron et al., 2002).

Die echokardiographisch bestimmte Wandstärke ist für die Diagnosestellung

einer HCM ausschlaggebend. Im Normalfall ist die Septumstärke beim Mensch unter 12 mm. Werte über 13 mm (Extremfälle: 30-60 mm), gelten bei Fehlen anderer Ursachen wie arterielle Hypertonie, Aortenklappenstenose etc. als pathologisch und Indiz für das Vorliegen einer HCM (Maron et al., 1997). Neben der morphologischen Bildgebung erlaubt die Echokardiographie auch dynamische Untersuchungen und Flussmessungen (Maron et al., 1997 und 2002; Mewis C., „Kardiologie compact“, 2006). Die Zunahme der Muskelmasse des Herzens aufgrund der Vergrößerung der Herzmuskelzellen geht mit einer Steigerung des Herzgewichts einher. Die Gesamtzahl der Myozyten bleibt dabei konstant (Seidmans et al., 2001).

Histologisch auffällig sind eine charakteristische Myozytenunordnung (*myocyte disarray*) und eine kardiale interstitielle Fibrose. (Georgakopoulos et al., 1999). Physiologischer Weise beträgt der Anteil des Myokards mit einer Myozytenunordnung weniger als 1 %, bei betroffenen Patienten mit einer HCM steigt er auf bis zu 10 %. Dabei korreliert das Herzgewicht mit der kardialen Fibrose, jedoch nicht mit der Myozytenunordnung. Sie ist als eine direkte Antwort auf funktionelle und strukturelle Pathologien mutierter Proteine des Sarkomers zu sehen (Varnava et al., 2000).

### 1.7.1.2. Pathophysiologische Veränderungen und Klinik der HCM

Funktionell kommt es im HCM Herzen zu einer diastolischen Dysfunktion des Myokards (*Compliance*-Störung), insbesondere im linken Ventrikel, mit konsekutiv reduzierter Ventrikelfüllung und einer kennzeichnenden diastolischen Relaxationsstörung (*diastolic stiffness*). Diese diastolischen sowie systolischen kinetischen Störungen des Myokards, verursachen eine verzögerte maximale Füllung des Ventrikels und sind insbesondere im Rahmen dynamischer Untersuchungen wie der Echokardiographie gut sichtbar zu machen (Maron et al., 1997; Morita et al., 2005; Georgakopoulos et al., 1999). Die Folge ist eine Reduktion des Schlagvolumens und des Herzzeitvolumens. Die Myozytenunordnung könnte für arrhythmogene Korrelate prädisponieren und dadurch die Prognose des Patienten bestimmen (Maron et al., 2002). Neben

den myokardialen Veränderungen sind Malformationen der Mitralklappe und der Papillarmuskel, sowie anormale intramurale Koronararterien mit beeinträchtigter koronarer Vasodilatation und erhöhter Ischämiegefahr beschrieben worden (Maron et al., 1997). Nicht zuletzt durch die Hypertrophie des Myokards kommt es in einem HCM Herzen zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch.

Bei obstruktiven Formen der Hypertrophie (HOCM) durch eine übermäßige Hypertrophie des Septums, heute als idiopathische subaortale Stenose (IHSS) bezeichnet, klinisch häufig noch abgegrenzt (historisch) von der nicht obstruktiven hypertrophen Kardiomyopathie (NOHCM), kommt es durch die Verlegung des linksventrikulären Ausflusstraktes zu einer Nachlasterhöhung. Der dadurch verursachte Druckanstieg im linken Ventrikel verstärkt zusätzlich die Entwicklung einer Hypertrophie (Mewis C., „Kardiologie compact“, 2006; AWMF, 2005). Diese und weitere natürliche Anpassungen des Myokards an veränderte hämodynamische Bedingungen wie z.B. infolge arterieller Hypertonie, Klappenstenosen oder sportliche Belastung (etc.) müssen bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden (Maron et al., 2002).

Die klinische Erscheinung der HCM ist sehr heterogen und kann von asymptomatischen Verläufen über milde Symptome wie Schwindel, Synkopen, Tachykardien, Dyspnoe, Angina pectoris bis zur Herzinsuffizienz und höhergradig ventrikuläre Arrhythmien/Vorhofflimmern, sowie den plötzlichen Herztod alle Symptome in unterschiedlichem Ausprägungsgrad und zeitlicher Penetranz zeigen. Am gefürchtetsten sind maligne Herzrhythmusstörungen, insbesondere spontane ventrikuläre Tachykardien, die Ursache des plötzlichen Herztodes sein können. Sie sind im jungen Erwachsenenalter unter 35 Jahren mit 36 % die häufigste kardiale Todesursache (Maron et al., 1997; Ahmad et al., 2005).

### 1.7.1.3. Genetik der HCM

Bis dato wurden über 400 Mutationen in mindestens 11 Proteinen des Sarkomers entdeckt, die in Verbindung mit der Entwicklung einer HCM stehen

(Richard et al., 2006). Somit wird die HCM auch als „Erkrankung des Sarkomers“ bezeichnet. Jedoch wurde festgestellt, dass die Sarkomer-Gene für nur ca. 50-70 % der Erkrankungen verantwortlich sind (Elliot et al., 2004; Maron et al., 2006; Fatkin et al., 2002; Morimoto et al., 2008; Seidman et al., 2001). Die übrigen Patienten haben keine „klassische“ HCM, so dass der Grund ihrer linksventrikulären Hypertrophie oftmals unbekannt bleibt. Vor wenigen Jahren wurde eine unabhängige Form der kardialen Hypertrophie beschrieben, die metabolische Kardiomyopathie, die für einen Teil der Fälle verantwortlich ist. Die ursächlichen Defekte der metabolischen Kardiomyopathien liegen auf einem von mindestens zwei Genen, der  $\gamma$ 2-Untereinheit der AMP-abhängigen Proteinkinase (PRKAG2) oder dem Lysosomen-assoziiertem-Membranprotein 2 (LAMP2). Beide sind in den Glykogenstoffwechsel involviert und führen zu einer massiven Einlagerung von Glykogen bzw. dessen Stoffwechselprodukten in die Kardiomyozyten. Folge sind myokardiale Hypertrophie, exzessive interstitielle Fibrose und häufig Veränderungen der Erregungsleitung, insbesondere das Wolff-Parkinson-White Syndrom (WPW) (Arad M. et al., 2005).

Da auch innerhalb derselben Familie der Phänotyp stark variieren kann, ist davon auszugehen, dass neben den Genmutationen weitere Einflussfaktoren intrinsischer (Modifizierungsgene, unbekannte Gene) und extrinsischer Art (Umweltfaktoren) von Bedeutung (s. 1.7.1.2.) sind (Maron et al., 1995, 1997, 2002). Manche phänotypische Veränderungen sind dabei nicht direkt auf Veränderungen in den Sarkomerproteinen zurückzuführen, sondern als Folge von Mitralklappenveränderungen, Papillarmuskeleinrissen und der Bildung interstitiellen Kollagens anzusehen.

Die meisten HCM-Mutationen sind *missense*-Mutationen, d.h. der heterozygote Austausch einer einzelnen Aminosäure. Der kleinere Teil sind Verschiebungen des Leserahmens, sogenannte *Frameshift*-Mutationen, d.h. Insertion, Deletion aber auch Punktmutationen sind möglich.

Bis heute sind die genauen Pathomechanismen, die zwischen Mutation und Phänotyp einer HCM vermitteln, nicht bekannt. Gesichert ist, dass mutierten Proteine stabil in der Gesamtstruktur der Sarkomere eingebunden werden und einen dominant negativen Effekt auf die Funktion bzw. Struktur des Sarkomers

ausüben. Dies führt zu einer Fehlfunktion der gesamten kontraktile Funktion (*poison peptide*-Hypothese).

Bei den selteneren Genmutationen, aufgrund derer trunkierte Proteine entstehen die nur schwach oder gar nicht in Kardiomyozyten angereichert werden, kommt es zu einem inaktiviertem Allel (Null-Allel). Diese mutationsbedingte Inaktivierung führt zu einer verminderten Expression des betroffenen Proteins, Haploinsuffizienz genannt. Die verminderte Expression führt zu einem Ungleichgewicht im Sarkomer mit konsekutiver Fehlfunktion (Fatkin et al., 2002; Seidman et al., 2001).

### 1.7.2. Dilatative Kardiomyopathie

#### 1.7.2.1. Makroskopische und Mikroskopische Veränderungen der DCM

Die WHO definiert die DCM als eine kardiale Erkrankung mit einer Vergrößerung des linken und/oder rechten Ventrikels, einhergehend mit einer Reduktion der systolischen Pumpfunktion. Makroskopisch findet sich meist eine Dilatation aller vier Herzhöhlen unter Betonung des linken Ventrikels und ein erhöhtes Herzgewicht. Die Koronargefäße und Herzklappen sind in der Regel unverändert. Gelegentlich sind in fortgeschrittenen Stadien sekundäre AV-Klappeninsuffizienzen nachweisbar. In Biopsien sind unspezifische Veränderungen wie Myozytenhypertrophie, Zellnekrosen, Kernanomalien, Myozytenatrophien mit Myofilamentverlust und interstitielle Fibrose zu finden. Das Ausmaß dieser Veränderungen ist sehr variabel (Fatkin et al., 2002; Mewis C., „Kardiologie compact“, 2006).

#### 1.7.2.2. Pathophysiologische Veränderungen und Klinik der DCM

In Herzen mit einer DCM sind das enddiastolische und endsystolische Volumen erhöht und das Herzminutenvolumen progredient rückläufig. Die klinisch resultierende Herzinsuffizienz zeigt sich durch eine Dyspnoe, periphere und zentrale Venenstauung und Zyanose. Aufgrund der Ventrikeldilatation mit konsekutiver Klappeninsuffizienz (Mitral- und Trikuspidalregurgitationen sind in

der Echokardiographie hinweisgebend) und möglicher Herzrhythmusstörungen kann es zu arteriellen und pulmonalen Embolien kommen. Daher ist bei diesen Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium eine systemische Antikoagulation indiziert. Die Prognose der DCM korreliert mit dem Grad der Ejektionsfraktion, aber auch mit dem familiären Genotyp, und ist also von der Ätiologie der Erkrankung abhängig (Fatkin et al., 2002; Felker et al., 2000). Die mittlere Überlebensdauer bei symptomatischen Patienten liegt bei etwa fünf Jahren (Dec et al., 1994).

### 1.7.2.3. Genetik der DCM

Die DCM tritt zu 30-40 % familiär auf und wird vorwiegend autosomal dominant vererbt (Schönberger et al., 2004; Mestroni et al., 1999; Schmitt et al., 2006). Ein kleinerer Teil wird autosomal rezessiv (16- %) vererbt, wie zum Beispiel Mutationen auf Genen der Fettsäureoxidation. Aber auch X-chromosomal rezessive Erbgänge sind bekannt (10%) (Mestroni et al., 1999). Seltener sind mitochondriale Vererbungsmodi, die Defekte in der Atmungskette übertragen, oder sporadische Mutationen (Kelly et al., 1994; Mestroni et al., 1999; Towbin et al., 2002).

Im Gegensatz zur HCM sind Mutationen in sarkomeren Proteinen (d.h. im Myosin, Aktin, Troponin, Myosin-Bindungsprotein C, Tropomyosin, LIMP, Titin etc.) nur für einen Teil der erblichen dilatativen Kardiomyopathien verantwortlich. Neben Mutationen im kontraktilen Apparat, sind Mutationen im zytoskelettalen System in großer Anzahl vorhanden. Dazu gehören Mutationen im Adhäsion-Typ Komplex (Vinculin, Talin, Tensin, Paxillin, Zyxin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrinen), Spektrin-basierenden Komplex (Aktin, Ankyrin, Desmin) und Dystrophin-assoziiertem Komplex ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglycan,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sarcoglycan, Destrobrevin, Syntrophinam) (Richard et al., 2006; Ahmad et al., 2005). Seltener sind Mutationen in Phospholamban, EYA4, Lamin A/C, Dystrophin (DMD), Tafazzin (TAZ), kardialem Aktin (ACTC), Desmin (DES) oder Sarcoglycan (SGCD) (Osterziel et al., 2001; Towbin et al., 2002).

Ursächlich lassen sich die Mutationen in Defekte einteilen die eine Veränderung

der Kraftübertragung (Desmin,  $\alpha$ -Aktin, Dystrophin, Plakoglobin, Desmoplakin, LIM-Protein), der Krafterzeugung ( $\beta$ -MHC, Troponin T,  $\alpha$ -Tropomyosin, Phospholamban) oder ein Energiedefizit (mitochondrale tRNA, Carnitin Transferase) hervorrufen und in einer primären DCM münden (Schönberger et al., 2004).

Das Auftreten der DCM ist möglich in Begleitung von Erregungsbildungs- und Leitungsstörungen, mit sensineuralem Hörverlust oder einer Skelettmypopathie (mit und ohne Reizbildungs- und Leitungsstörungen). Die x-chromosomal vererbte Form der DCM kann zu ca. 65 % die Skelettmuskulatur mit einbeziehen, in Form von Muskeldystrophien (Typ Duchenne und Becker) (Fatkin et al., 2002).

Es sind fünf Gene identifiziert, die für Sarkomer-Proteine kodieren und Mutationen zur DCM und zur HCM führen können ( $\beta$ -MHC, MYBPC3, TTN, TPM1, TNNT2) (Fatkin et al., 2002). Die erste Mutation wurde im Jahr 2000 im  $\beta$ -MHC beschrieben (Ser532Pro und Phe764Leu) (Kamisago et al., 2000). Man geht davon aus, dass 10 % der Erkrankungen auf Mutationen im Sarkomer zurückzuführen sind (Kamisago et al., 2000).

Für die Diagnostik wird ein System aus 2 Hauptkriterien (mindestens ein weiteres betroffenes Familienmitglied, Verwandter mit einem dokumentierten plötzlichen Herztod unter dem 35. Lebensjahr) und 6 Nebenkriterien (ventrikuläre oder supraventrikuläre Arrhythmien vor dem 50. Lebensjahr ohne andere Ursachen, linksventrikuläre Dysfunktion mit einer Ejektionsfraktion unter 50 %, kardiale Reizleitungsstörung, plötzlicher Herztod ohne andere Ursache, segmentale Wandbewegungsstörungen) vorgeschlagen (Mestroni et al., 1999; Ahmad et al., 2005).

## 1. EINLEITUNG

	Genlokalisierung	Symbol	Gen	Zellokalisation
1	1p1-q21	LMNA	Lamin A/C	Kernmembran
2	1q32	TNNT2	Troponin T2	Sarkomer
3	2q14-q22		Unbekannt	
4	2q31	TTN	Titin	Sarkomer
5	2q35	DES	Desmin	Zellulär
6	3p22-p25		unbekannt	
7	5q33	SGCD	δ-Sacroglykan	Zellulär
8	6p23-p4	DSP	Desmoplakin	Zellulär
9	6q12-q16		Unbekannt	
10	6q22.1	PLN	Phospholamban	Kalzium
11	6q23-q24		EYA4	
12	9q13-q22		Unbekannt	
13	9q22-q31		unbekannt	
14	10q22-q23	MVCL	Metavinculin	Zellulär
15	10q22.3-q23.2	LDB3	Cypher/ZASP	Zellulär
16	11p11.2	MYBPC3	Myosinbindungsprotein C	Sarkomer
17	11p15.1	CLP	Kardiales Muskel LIM Protein	Sarkomer
18	12p12.1	ABCC9	ATP-sensitiver K Kanal	
19	14q12	MYH7	Myosin	Sarkomer
20	15q14	ACTC	Aktin	Sarkomer
21	15q22	TPM 1	α-Tropomyosin	Sarkomer
22	16p11	CTF1	Cardiotrophin 1	
23	19q13.2		Unbekannt	
24	Xp21	DMD	Dystrophin	Zellulär
25	Xp28	TAZ	Tafazzin	Zellulär

Abb. 9: Chromosomen Lokalisation und entsprechende Mutationen der Gene die zu einer DCM führen (Ahmad et al., 2005).

### 1.8. Therapeutische Optionen der HCM und DCM

Die Therapie der Kardiomyopathie richtet sich nach dem klinischen Untersuchungsbefund und den Symptomen der Patienten. Bei HCM-Patienten droht die größte Gefahr einer plötzlich einsetzenden Herzrhythmusstörung. Der

Nutzen einer medikamentösen Prophylaxe von Arrhythmien ist umstritten und in großen Studien bis dato nur für Amiodaron und nach Myokardinfarkt für Antagonisten adrenerger  $\beta$ -Rezeptoren gezeigt. Patienten mit hohem Risiko für lebensbedrohliche Arrhythmien (z.B. nach überlebtem plötzlichem Herztod) wird als wirkungsvollste Präventionsmaßnahme zur Implantation eines ICD (*implantable cardioverter defibrillator*) geraten. Ventrikuläre Tachykardien werden von diesem Gerät erkannt und durch einen Elektroschock des Herzens zu terminieren versucht. Bei ausgeprägter septaler Hypertrophie mit Obstruktion des Ausflustraktes kann ferner eine operative oder interventionelle Myektomie indiziert sein.

Bei DCM steht die Behandlung der Herzinsuffizienz im Vordergrund. Die medikamentöse Therapie erfolgt mit ACE Hemmer, in fortgeschrittenen Stadien zusätzlich mit  $\beta$ -Adrenorezeptor-Antagonisten und bei notwendiger Flüssigkeitsretention durch Diuretika. (Dickstein et al., 2008). Dadurch kann die Progression der Erkrankung oft wirkungsvoll aufgehalten werden. Eine dauerhafte Verbesserung der Symptomatik ist jedoch Einzelfällen vorbehalten, so dass häufig die Indikation zur Herztransplantation als ultima ratio bei terminaler Herzinsuffizienz gestellt werden muss. Bei ausgeprägter Dilatation der Herzkammer oder malignen Herzrhythmusstörungen der HCM bzw. DCM kann eine systemische Antikoagulation notwendig werden (Maron et al., 2002).

### 1.9. Tiergenetik und molekulare Methoden - Transgene Tiermodelle

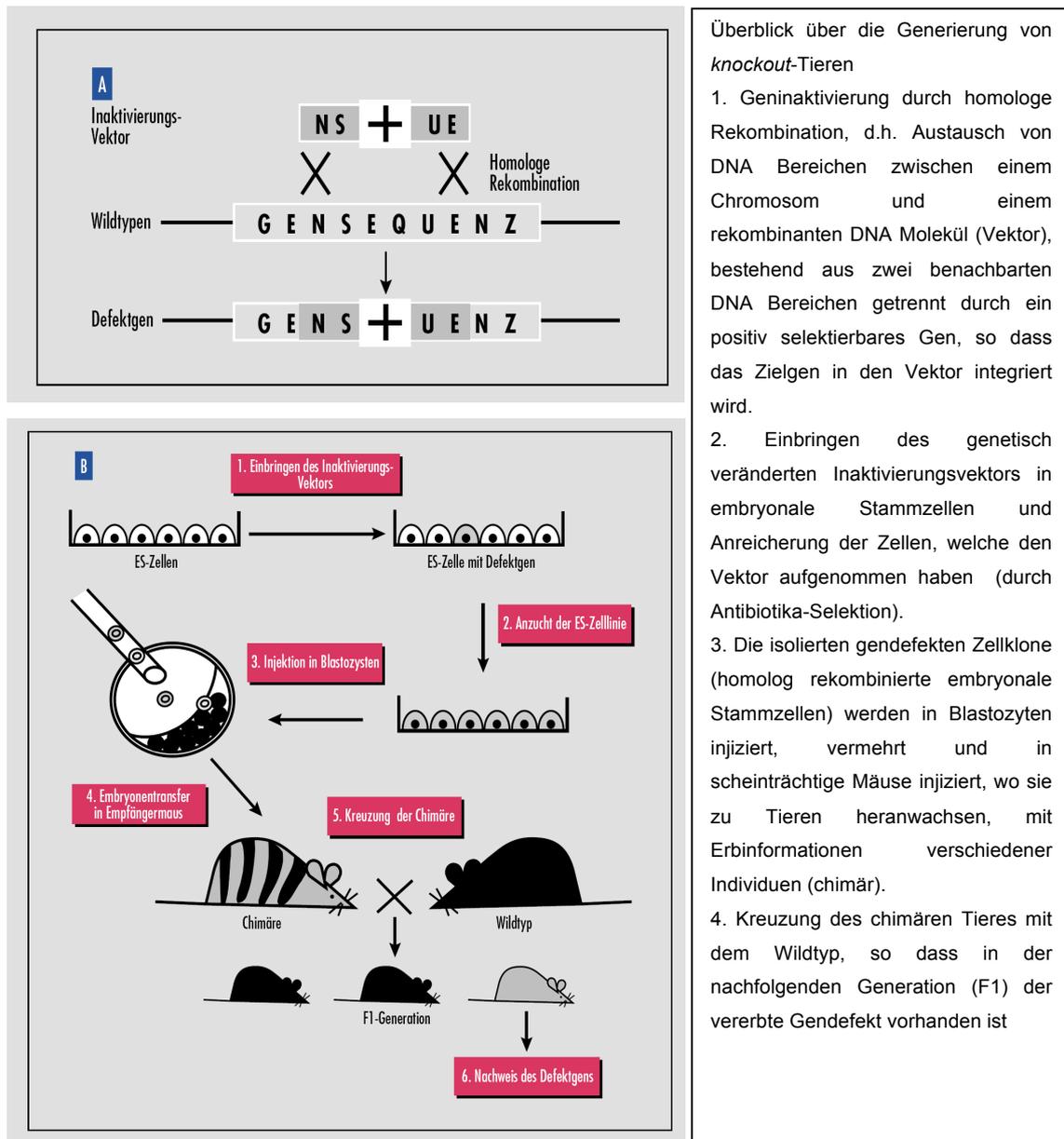
Zur Untersuchung komplexer physiologischer Zusammenhänge sind genetisch veränderte Tiere heutzutage unerlässlich. Als ideales Untersuchungsobjekt für genetische Tiermodelle humaner Erkrankungen bietet sich aufgrund ihrer geringen Größe, hohen Reproduktivität und vor allem dem Wissen um die genetische Manipulation ihrer embryonalen Stammzellen die Maus an. Um wissenschaftlich relevante Mauslinien bereitzuhalten wurde das Europäische Mausarchiv (EMMA) gegründet. Durch die Manipulation des Mausgenoms mittels transgener Techniken ist eine Vielzahl humaner Pathologien auf das Mausmodell übertragbar und innerhalb ethischer Grenzen durchführbar. So

können unterschiedlichste Krankheitsbilder des Menschen physiologisch und molekular untersucht werden. Ferner können neuartige Therapiestrategien erprobt werden, die so am Menschen nicht durchgeführt werden könnten. (Simm et al., 2007; Herold, „Innere Medizin“, 2005; Schenkel, „Transgene Tiere“, Springer Verlag 2006)

Durch Transgenese ist es möglich, fremde genetische Informationen dauerhaft in ein Genom des Wirtsorganismus zu integrieren. Die Erzeugung solcher Organismen wird über verschiedene Methoden wie die Transfektion, Transduktion über Mikroinjektion, Veränderung embryonaler Stammzellen oder mittels Retrovirusvektoren ermöglicht. Durch diese transgenen Techniken ist es realisierbar, dem Genom genetische Informationen hinzuzufügen oder zu entfernen, so dass die Tiere definierte Mutationen stabil exprimieren (Braun et al., 1996; Schenkel, „Transgene Tiere“, Schenkel Verlag, 2006).

Bei *knockout*-Tieren wird durch spezifische Ausschaltung von Gensequenzen über Alleltransfer (*gene targeting – homologe Rekombination*), eine Gen funktionsuntüchtig. Das Pendant hierzu sind *knockin*-Tiere, bei denen eine genetische Veränderung gezielt in das Genom eingebracht wird. (Ganten D., „Grundlagen der Molekulare Medizin“, Springer Verlag, 2005) Die Veränderungen am Genom werden durch homologe Rekombination im Rahmen embryonaler Stammzelltechnologie eingeführt. Mit dieser Technik können beispielsweise Mäuse generiert werden, die den gleichen genetischen Defekt tragen, der im Menschen bestimmte Erbkrankheiten hervorruft. Solche Tiere erlauben longitudinale Studien der molekularen und phänotypischen Folgen dieser genetischen Defekte in einem intakten Organismus unabhängig von Umweltfaktoren und Varianten im genetischen Hintergrund.

## 1. EINLEITUNG



Überblick über die Generierung von *knockout*-Tieren

1. Geninaktivierung durch homologe Rekombination, d.h. Austausch von DNA Bereichen zwischen einem Chromosom und einem rekombinanten DNA Molekül (Vektor), bestehend aus zwei benachbarten DNA Bereichen getrennt durch ein positiv selektierbares Gen, so dass das Zielgen in den Vektor integriert wird.

2. Einbringen des genetisch veränderten Inaktivierungsvektors in embryonale Stammzellen und Anreicherung der Zellen, welche den Vektor aufgenommen haben (durch Antibiotika-Selektion).

3. Die isolierten gendefekten Zellklone (homolog rekombinierte embryonale Stammzellen) werden in Blastozysten injiziert, vermehrt und in scheinträchtige Mäuse injiziert, wo sie zu Tieren heranwachsen, mit Erbinformationen verschiedener Individuen (chimär).

4. Kreuzung des chimären Tieres mit dem Wildtyp, so dass in der nachfolgenden Generation (F1) der vererbte Gendefekt vorhanden ist

Abb. 10: Schematische Darstellung der Generierung von knockout-Tieren (Braun et al., 1996; Schenkel, „Transgene Tiere“, Springer Verlag 2006)

### 1.10. Untersuchte Myosin Mutationen

In der vorliegenden Arbeit werden *knockin*-Mäuse mit bestimmten Mutationen im kardialen Myosin untersucht. Die Wahl dieses Sarkomerproteins liegt darin begründet, dass Mutationen im Myosin die häufigste Ursache der HCM beim Menschen darstellen und verschiedene Myosin Mutationen völlig unterschiedliche Phänotypen hervorrufen können. Alle verwendeten Tiere

waren fortpflanzungsfähig und wurden älter als ein Jahr. Alle Mäuse wurden im Inzucht-Stamm 129/SvEv gezüchtet. Damit unterscheiden sie sich genetisch voneinander ausschließlich durch die jeweilige Punktmutation im kardialen Myosin. Da in adulten Mausherzen, im Gegensatz zum Menschen, nicht die  $\beta$ -, sondern die  $\alpha$ -Isoform des kardialen Myosins überwiegend exprimiert wird, wurden alle nachfolgend besprochenen Myosin-Mutationen in MYH6 der Maus eingeführt.

### 1.10.1. Übersicht über die untersuchten Gene der $\beta$ -Myosin Mutationen

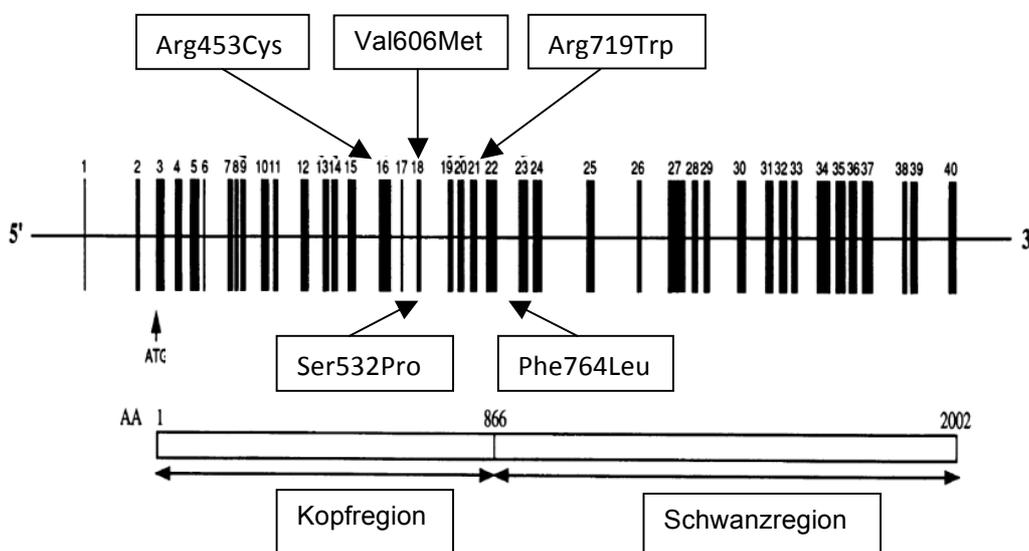


Abb. 11: Schematische Übersicht über die in dieser Arbeit besprochenen Mutationen im humanen MYH7 Gen, die eine Hypertrophe Kardiomyopathie (Arg453Cys, Val606Met und Arg719Trp) bzw. eine DCM (Ser532Pro und Phe764Leu) verursachen. Entsprechend ist die Lokalisation der Mutationen im Kopf- oder Hals-Bereich dargestellt.

### 1.10.2. DCM

#### 1.10.2.1. Mutation S532P (Serin 532 Prolin)

Diese Mutation ist eine heterozygote Punktmutation, die eine bis ins höhere Alter langsam fortschreitende dilatative Kardiomyopathie verursacht. Diese Mutation ist in der Aktin-Bindungs Domäne lokalisiert, welche eine Größe von 50 kDa besitzt. Im Exon 16 kommt es zu einem Nukleotid Wechsel T>C (Cardio Genomics Harvard Universität Boston, J.P. Schmitt et al., 2006).

Eine Vergrößerung des linken Ventrikels wurde echokardiographisch bei den Tieren etwa ab der 20. Lebenswoche nachgewiesen, wobei homozygote Tiere etwas früher und stärker dilatierten als heterozygote.

*In vitro* Untersuchungen an isolierten Myosinmolekülen von homozygoten Tieren zeigten, dass diese gegenüber dem Wildtyp eine 40 % geringere Geschwindigkeit der Aktinverschiebung aufwiesen. Histologische Analysen zeigten das Bild einer DCM mit verlängerten Myozyten und ohne interstitielle Fibrose oder ungeordnet liegende Myozyten. Isolierten Kardiomyozyten zeigen schon im Alter von 8 Wochen, also vor Ausprägung eines kardialen Phänotyps, eine reduzierte Kontraktilität (Schmitt et al., 2006).

Die Mutation führt zu einer reduzierten Aktin-aktivierten ATPase Aktivität, mit konsekutiv erniedrigter Kraftgenerierung im Myosin und Veränderungen des chemomechanischen Bewegungsablaufes. Interessanterweise ist die Schrittgröße, um die Aktin mit jeder Aktin-Myosin-Interaktion verschoben wird, im S532P-Myosin reduziert. Die kardiale Umstrukturierung (*remodeling*) ist wahrscheinlich auf der reduzierten mechanischen Funktion des kardialen Myosin begründet (Schmitt et al., 2006).

### 1.10.2.2. Mutation F764L (Phenylalanin 764 Leucin)

Diese heterozygote Punktmutation ist in der beweglichen Gelenkregion des Myosinkopfes (Converter-Region) lokalisiert. Sie befindet sich zwischen dem Myosinkopf und dessen Hals (Fatkin et al., 2000).

Dabei kommt es im Exon 21 lokalisiert zu einem Nukleotidtausch von C>G (Cardio Genomics Havard Universität Boston, Kamisago et al., (2000)). Im Vergleich zur oben genannten Mutation S532P kommt es in *knockin*-Mäusen mit F764L-Mutation hier zu einem früheren Beginn des phänotypischen Erscheinungsbildes einer DCM. Dieses entspricht dem klinischen Erscheinungsbild mit einem Krankheitsbeginn im Kindesalter und einem verzögerten Fortschreiten in der Adoleszenz (Schmitt et al., 2006).

Eine Vergrößerung des linken Ventrikels wurde echokardiographisch bei Tieren ab der 12. Lebenswoche beobachtet, wobei die homozygoten Tiere etwas

früher und stärker dilatierten als heterozygote. Diese Mutation zeigte in der homozygoten Form eine erheblich größere kardiale Dysfunktion und eine deutlichere Dilatation in einem jüngeren Alter als in heterozygoten Tieren.

Isolierte kardiale Myozyten zeigten schon vor Ausprägung eines kardialen Phänotyps eine deutlich reduzierte Kontraktilität, die letztlich zu einer ventrikulären Dilatation mit einer reduzierten Ejektionsfraktion führte. *In vitro* Untersuchungen an isolierten Myosinmolekülen homozygoter Tiere zeigte gegenüber dem Wildtyp eine 20 % geringere Geschwindigkeit der Aktinverschiebung (Schmitt et al., 2006). Weiter zeigte sich eine reduzierte Aktin aktivierte ATPase Aktivität, eine erniedrigte Kraftgenerierung im Myosin und Veränderungen in der Kinetik des chemomechanischen Bewegungsablaufs. Es ist zu vermuten, dass eine reduzierte molekulare Funktion des kardialen Myosins die kardiale Umstrukturierung (*remodeling*) begründet. Histologische Analysen zeigten verlängerte Kardiomyozyten ohne *myocyte disarray* und ohne interstitieller Fibrose.

Weiterhin auffällig ist eine geringere Verkürzungen elektrisch stimulierter Myozyten; vermutlich ursächlich als Teil der geänderten molekularen Motorfunktion.

### 1.10.3. HCM

#### 1.10.3.1. Mutation R453C (Arginin 453 Cystein)

Myozyten mit dieser heterozygoten Punktmutation können eine höhere Kontraktionskraft generieren als vergleichbare Wildtyp-Myozyten. Der relativ zeitige Erkrankungsbeginn beim Menschen mit 100 % iger Penetranz einer linksventrikulären Hypertrophie und ihre hohen Inzidenz für den plötzlichen Herztod lässt sie mit einer verkürzten Lebenserwartung (im Middle etwa 40 bis 45 Jahre) zu den malignen Herz-Mutationen zählen (Morimoto et al., 2008; Hullin et al., 2003; Palmer et al., 2004). Die Mutation ist außerhalb der Aktin-Bindungstasche und der ATP Bindungsregion im Gerüst des Myosinkopfes lokalisiert. Im Exon 14 kommt es zu einem Nukleotidtausch C>T. (Cardio Genomics Havard Universität Boston)

### 2.10.3.2. Mutation R719W (Arginin 719 Tryptonin)

Diese Mutation ist im Exon 19 und in der Nähe der Converter-Domäne des Myosinkopfes lokalisiert. Sie besitzt beim Menschen eine hohe Inzidenz für den plötzlichen Herztod aufgrund ventrikulärer Arrhythmien (Anan et al., 1994). Sie führt zu einer deutlichen linksventrikulären Hypertrophie und Reduktion der Lebenserwartung um 50 % und zählt somit zu den malignen Kardiomyopathien. (Hullin et al., 2003; M. Ackermann et al., 2002) Hier konnte ebenso eine reduzierte Filament Beweglichkeit nachgewiesen werden. Die Aktin aktivierte Myosin ATPase ist in ihrer Funktion gemindert (Redwood et al., 1999). Charakteristischer Weise führt diese Mutation zu einer starken Fibrosebildung im Myokard und einer deutlichen Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion die in Einzelfällen eine Herztransplantation nötig macht (J.P. Schmitt, persönliche Meinung).

### 2.10.3.3. Mutation V606M (Valin 606 Methionin)

Diese heterozygote Punktmutation ist auf dem Exon 16 lokalisiert. Sie liegt außerhalb funktioneller Areale des Myosinkopfes und hat im Gegensatz zu den Mutationen R453C und R719W einen günstigeren Verlauf mit nahezu normaler Lebenserwartung (Hullin et al., 2003). Die Filament Bewegung ist reduziert (Redwood et al., 1999).

### 1.10.4. Phospholamban

Vergleichend wurde den Myosin-Mutanten eine transgene Maus gegenübergestellt, die nicht durch eine Sarkomer-Mutation, sondern aufgrund einer Störung im myokardialen Kalziumhaushalt eine DCM entwickelt.

Phospholamban (PLN) ist ein integrales Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) der Myozyten und besteht aus nur 52 Aminosäuren. Die C-terminalen 20 Aminosäuren bilden die

Transmembranregion während der N-Terminus zytosolisch ist. Das SR dient in Kardiomyozyten als Kalziumspeicher. Während der Systole entleert das SR Kalzium in das Zytosol. In der Diastole des Herzens erfolgt dann der aktive Rücktransport des zytosolischen Kalziums in das SR über die SR Kalzium-Adenosintriphosphatase-SERCA2a. In humanen Zellen bestimmt die SERCA2a über 70 % des Kalzium-Abtransports aus dem Zytosol und damit den zytosolischen Kalziumspiegel, der wiederum entscheidend die Relaxaktionsrate determiniert und indirekt Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens besitzt. (Karim et al., 2004 ; Brittsan et al, 2000).

Diese Kalzium Pumpe wird in ihrer Aktivität von PLN gehemmt. In phosphoryliertem Zustand dagegen ist die inhibitorische Wirkung des PLN reduziert, mit der Folge eines beschleunigten sarkoplasmatischen Kalzium Transports durch SERCA2a. Die Phosphorylierung des PLN an Serin 16 erfolgt durch die cAMP abhängige Proteinkinase-A (PKA), an Serin 10 durch die Proteinkinase-C und an Threonin 17 durch die Kalzium/Calmodolin abhängige Protein Kinase. Folge der PLN-Phosphorylierung ist eine gesteigerte Relaxation (positiv lusitrop) des Myozyten aufgrund des beschleunigten Kalzium-Rücktransports. Heterozygote Menschen mit einer  $PLN^{R9C}$ -Mutation versterben ohne Transplantation im Mittel mit 28 Jahren an terminaler Herzinsuffizienz auf dem Boden einer DCM. Untersuchungen an transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression der  $PLN^{R9C}$ -Mutation zeigten, dass die Mutation durch eine verstärkte Inhibition von SERCA2 den Kalzium-Transport in das SR verlangsamt. Diese Tiere entwickeln eine rasch progrediente DCM und versterben vorzeitig an terminaler Herzinsuffizienz. Die verstärkte PLN-Aktivität der  $PLN^{R9C}$ -Mutante resultiert aus einem dominant wirkenden Defekt der PKA abhängigen PLN-Phosphorylierung an Serin 16. Dieser dominante Phosphorylierungsdefekt und der daraus resultierende verzögerte Kalzium-Transport ist entscheidend an der Pathogenese der  $PLN^{R9C}$  Mutation beteiligt (Gramolini et al., 2008 ; Schmitt et al., 2003 und 2009).

### Zielstellung

Zur pathogenetischen Einordnung von Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene ist eine wichtige Voraussetzung, zunächst genaue Kenntnisse über Zeitpunkt und Ausprägungsgrad phänotypischer Auswirkungen der verschiedenen Mutationen zu haben.

Das Ziel dieser Dissertation war daher die vergleichende makroskopische und mikroskopische Phänotypisierung von *knockin*-Mäusen mit den Mutationen S532P, F764L, V606M, R719W und R453C im kardialen Myosin. Diese heterozygoten Punktmutationen rufen im Menschen HCM (V606M, R719W, R453C) bzw. DCM (S532P, F764L) hervor. In dieser Arbeit sollen ausschließlich die strukturellen Veränderungen der hypertrophen bzw. dilatativen Phänotypen im Verlauf beurteilt werden, unter Berücksichtigung der unter 1.10. beschriebenen mutationsspezifischen Charakteristika. Weiterhin ist das Ziel, möglichst effektive Parameter zur verlässlichen und frühzeitigen Bestimmung des kardialen Phänotyps zu finden.

Der erste Teil der Vorarbeiten bestand in der Etablierung und Standardisierung der *wheat-germ-agglutinin* Färbetechnik (WGA) mit Propidium-Jodid an histologischen Herzquerschnitten von Mäusen. Durch selektive Anfärbung von Zellmembranen erlaubt sie eine exakte Vermessung der individuellen Myozytengrößen. Weiterhin sollten anhand von Hämalaun/Eosin gefärbten Transversalschnitten die Querschnittsfläche der Ventrikel vermessen werden. Eine Voraussetzung für die genannten Arbeiten war die Etablierung einer validen Methode zur standardisierten Fixierung der Mausherzen in enddiastolischem Zustand mittels Kardioplegie.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine morphologische Charakterisierung der verschiedenen Myosin-Mutanten an isolierten Kardiomyozyten erfolgen.

Es war geplant, alle Untersuchungen an Mäusen durchzuführen, die in heterozygotem Zustand eine DCM (S532P und F764L) bzw. HCM (V606M, R719W und R453C) ausbilden sollten. Zusätzlich wurden Tiere mit diesen Mutationen in homozygotem Zustand untersucht (S532P, F764L, V606M), die nicht zum vorzeitigen Tod der Mäuse führten (Schmitt et al., 2006). Diese

Gruppen wurden mit Wildtyp-Tieren verglichen. Als Positiv-Kontrolle für kardiale Hypertrophie dienten einerseits etwa 20 Wochen alte Mäuse drei Monate nach operativ induzierter Aortenstenose. Transgene Mäuse mit der unter 1.10.4. beschriebenen PLN<sup>R9C</sup>-Mutation wurden als Positiv-Kontrolle für die Entwicklung linksventrikulärer Dilatation eingesetzt.

Um die unterschiedlichen Verlaufsformen der einzelnen Kardiomyopathien besser beurteilen zu können, wurden die heterozygoten Tiere mit der WGA-Färbung in zwei verschiedenen Altersgruppen untersucht (ca. 30 und 70 Wochen). Bei homozygoten Tieren dagegen entwickelte sich der kardiale Phänotyp früher, so dass die morphometrischen Untersuchungen an Herzschnitten zusätzlich im Alter von schon 10 Wochen durchgeführt wurden. Isolierte Kardiomyozyten wurden in allen Fällen ausschließlich in einem Alter von rund einem Jahr vermessen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1.1. Herzexplantationverfahren für *wheat germ agglutinin* Färbung (WGA Färbung), Hämalaun / Eosin Färbung (HE Färbung)

Jeder Maus wurden 15 Minuten vor der Herzentnahme 400 E Heparin (ratiopharm, Ulm, D) intraperitoneal injiziert. Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde der Brustkorb zügig eröffnet, das Herz freipräpariert, an der Herzbasis von den Gefäßen getrennt und zum Säubern für etwa 30 Sekunden in eine Petrischale (Nunc, Wiesbaden, D) mit vorgewärmter (37°C) Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS siehe Abb. 12) gelegt. Danach wurde das schlagende Herz in eine weitere Petrischale mit vorgewärmter (37°C) Bretschneider Lösung (siehe Abb. 13) überführt, um eine diastolische Kardioplegie zu erreichen. Anschließend wurden die Herzen für 5 Tage in 4 % Paraformaldehyd (Applichem, Darmstadt, D) fixiert. Zur späteren möglichen Kontroll-Genotypisierung wurde eine etwa 1cm lange Schwanzbiopsie der Maus in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D) bei -20°C eingefroren. Zur späteren Normierung der Messwerte wurden für jedes Tier die Parameter Körpergewicht, Herzgewicht, Nierengewicht (Waage: PG4002-S Delta Change, Mettler Toledo, Greifensee, CH) und Tibialänge mittels Messschieber (FST, Heidelberg, D) bestimmt.

NaCl	136,9 mmol	(Applichem, Darmstadt, D)
KCl	2,682 mmol	(Applichem, Darmstadt, D)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,291 mmol	(Applichem, Darmstadt, D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mmol	(Applichem, Darmstadt, D)
DdH <sub>2</sub> O	1000 ml	

Abb.12: Zusammensetzung PBS Lösung (Phosphat gepufferte Salzlösung - *phosphate buffered saline*)

### 2.1.2. Kardioplegie

Als Kardioplegie versteht man einen künstlich induzierten reversiblen Herzstillstand. Die gebräuchlichste und in diesen Versuchen verwendete Kardioplegielösung ist die modifizierte Bretschneider-Lösung (1972). (Zusammensetzung der Bretschneider Lösung siehe Abb. 13) Aufgrund der Zusammensetzung der Ionen wird sie auch als intrazelluläre Kardioplegielösung bezeichnet (Burgmann et al., (1996)). Sie führt zu einer Erniedrigung des extrazellulären Natriums (1/10 des Normwertes) und Kalziums (1/100 des Normwertes) auf intrazelluläres Niveau und somit zur Fixierung des Ruhepotenzials der Zellmembran im polarisierten bis gering depolarisierten Zustand. Die Folge ist eine elektromechanischen Inaktivität und somit der diastolische Herzstillstand. Custodiol ist dabei die einzige organische Pufferlösung (Fa. Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, D).

NaCl	15 µmol
KCl	9 µmol
Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat	1,0 µmol
MgCl x 6 H <sub>2</sub> O	4,0 µmol
Histidin	180 µmol
Histidin HCl	18 µmol
Tryptophan	2 µmol
Mannitol	30 µmol
CaCl	0,15 µmol
Cl	50 mmol
In H <sub>2</sub> O pH 7,02 – 7,2 Osmolarität 310 mosmol/kg	

Abb. 13: Bretschneider Lösung: (Custodiol<sup>®</sup>, Fa. Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, D)

### 2.2. Histologie

#### 2.2.1. Einbettung und Anfertigung der Herzquerschnitte

Zur Entwässerung der Präparate wurden diese zweimal für eineinhalb Stunden in Formalin-Lösung (5 %) eingelegt. Folgend wurden die Präparate in einer steigenden Konzentration von Ethanol (Riedel de Häen, Hannover, D), beginnend mit 80 %, für zweimal eine halbe Stunde und im Anschluss in 100 % Ethanol für viermal eine Stunde entwässert. Im nächsten Schritt wurden zur Permeabilisierung des Gewebes die Präparate für zweimal eine Stunde in Xylol 100 % (Applichem, Darmstadt, D) inkubiert und danach viermal eine Stunde in Paraffin eingelegt (Gewebsentwässerungsautomat: Tissue Tek, VIP, Ramsey, Minnesota, USA). Diese Arbeiten wurden freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg übernommen.

Die fixierten Herzen wurden nun vor der Einbettung in Paraffinblöcke senkrecht zur Herzachse halbiert. Die Herzbasis sowie Herzspitze wurden separat eingebettet. Dabei wurde das Gewebe so positioniert, dass die Schnittfläche parallel auf den Boden des Blocks zu liegen kam. (siehe Abb. 14)

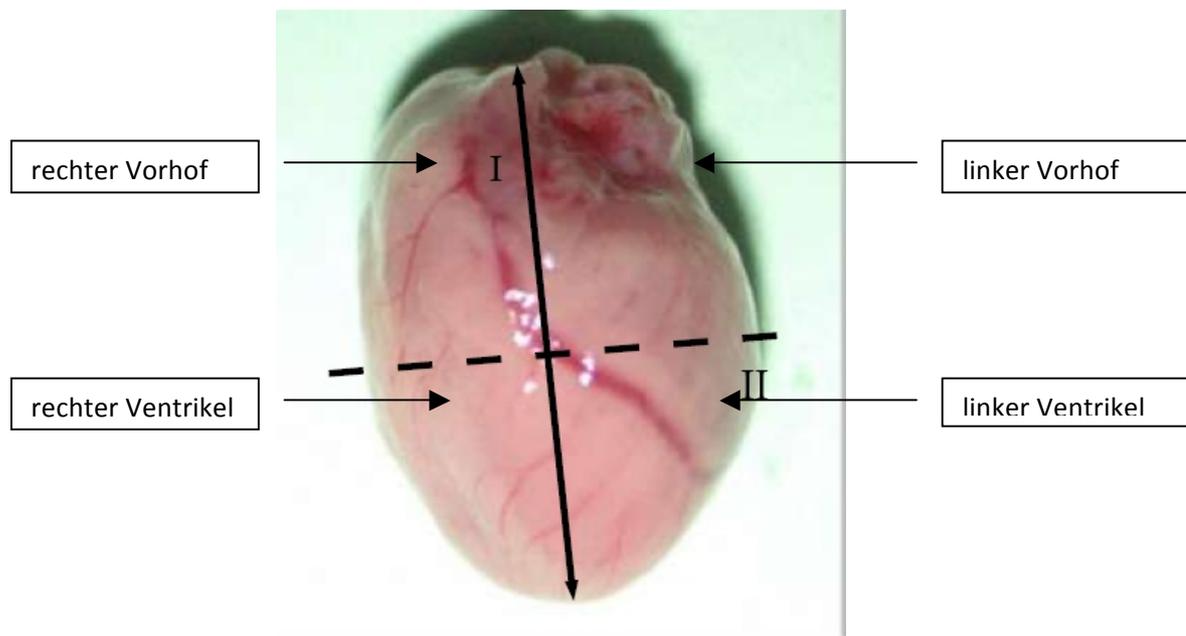


Abb.14: Photographische Darstellung eines Mauserzens (Wildtyp): ( I ) Herzachse von der Herzbasis zur Spitze; ( II ) Schnittebene zur Halbierung des Herzens vor der Einbettung in Paraffin

Zur Anfertigung histologischer Schnitte wurden aus den Paraffinblöcken in Höhe der Papillarmuskeln 4 µm dicke Querschnitte mit dem Mikrotom (Leica RM 2165 und Leica EG 1140 C Kälteplatte, Wetzlar, D) abgehobelt. Im Anschluss wurden die Schnitte in ein 37°C warmes Wasserbad (Medax, Rendsburg, D) gelegt. Drei bis vier Herzquerschnitte wurden jeweils auf einem Objektträger (Super Frost® bzw. Super Frost Plus® Menzel, Braunschweig, D) fixiert. Diese wurden für circa eine halbe Stunde auf einer Wärmeplatte (IKAMAG RCT, Janke&K. Staufen, D) angetrocknet und anschließend für 24 Stunden bei 52°C im Wärmeschrank (Memmert, Schwarzbach, D) belassen. Anschließend konnten die Herzquerschnitte gefärbt werden. Die Anfertigung der histologischen Präparate wurde überwiegend von Frau Marianne Babel (MTA, Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg) übernommen.

### 2.2.2. Hämalan / Eosin Färbung (HE Färbung) der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die Objektträger für dreimal vier Minuten in Xylol (100 %) entparaffinisiert und danach in einer absteigenden Ethanolreihe (viermal zwei Minuten 100 % Ethanol und einmal zwei Minuten in 70 % Ethanol) rehydriert. Nach einem kurzen Waschschrift mit destilliertem Wasser (zweimal eine Minute) wurden die Herzquerschnitte für 10 Minuten in 0,5 % Hämalan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) belassen. Nach 10 minütigem Spülen mit Leitungswasser wurden sie 40 Sekunden in Eosin Lösung (Merck, Darmstadt, D), welche mit 20-50 µl Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) versetzt war, gegengefärbt. Anschließend wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült (zweimal eine Minute). Vor dem Eindecken wurden die Schnitte wieder in einer aufsteigenden Ethanolreihe (einmal eine Minute in 70 % Ethanol und viermal zwei Minuten in 100 % Ethanol) rehydriert und nach kurzem Spülen mit 100 % Xylol, mit Eukitt® fixiert.

### 2.2.3. WGA Färbung der Paraffinschnitte und isolierter Zellen

Für die *wheat germ agglutinin* - Färbung (WGA) wurden die Herzschnitte zur besseren Anhaftung auf Objektträgern in der Ausführung Super Frost Plus® eingebettet. Nach zweimaliger Inkubation für je vier Minuten in Xylol (100 %) zum Entparaffinisieren wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (viermal zwei Minuten 100 % Ethanol und einmal zwei Minuten in 70 % Ethanol) rehydriert und zuletzt zweimal eine Minute in PBS gespült. Danach wurden sie für 20 Minuten bei 37°C in Proteinase K-Lösung (10 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris / HCl, pH 7,4-8) (Sigma, Steinheim, D) permeabilisiert. Nach anschließenden zweimaligen Spülen mit PBS wurden auf die Herzquerschnitte RNase (Roche, Mannheim, D) in einer Konzentration von 5 µg/ml aufgetropft. Diese wurden zum Verdunstungsschutz mit Parafilm M® (Laboratory Film, American National Can, Chicago, USA) bedeckt und für 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Objektträger fünfmal mit PBS gewaschen. Bei der anschließenden Zellmembranfärbung wurden je Schnitt etwa 50 µl WGA-Lösung (20 µl WGA in 980 µl PBS) (Molekular Probes, Alexa Flour 488, USA) aufgetropft. Nach erneuter Inkubation der Objektträger für 30 Minuten bei 37°C und zweimaligen kurzen Waschen in PBS wurde die Kernfärbung mit 150 µl Propidiumjodid Lösung (1 mg/ml) (Sigma, Steinheim, D) in 250 ml PBS durchgeführt. Diese Küvette wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten im Dunkeln belassen, um den Fluoreszenzfarbstoff der WGA-Lösung vor dem Ausbleichen zu schützen. Zum Schluss wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen und mit Vectashield® H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingebettet. Die Präparate wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Die Ansicht und digitalisierte Aufnahme der gefärbten Myozyten wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops der Firma Leica (CTR MIC / DM/IRE2 und TCS SP 2, Wetzlar, D) innerhalb von 6 Stunden nach der Färbung durchgeführt.

### 2.3. Operative Stenosierung des Aortenbogens

Zur Induktion einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzens durch

Erhöhung der linksventrikulären Nachlast, wurde das Modell der operativen Aortenstenosierung herangezogen. Dieses Verfahren hat einen festen Stellenwert bei der Untersuchung von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Wildtyp-Tiere wurden nach Narkoseeinleitung mit Pentobarbital (intraperitoneal) intubiert und mit einem Beatmungsgerät für Mäuse (Minivent, Harvard, Apparatur, Holliston, MA, USA) beatmet. Die Operation erfolgte unter einem Operationsmikroskop auf einem beheizbaren Operationsplatz (Medax, Rendsburg, D). Der Thorax wurde durch eine linksseitige Thorakotomie eröffnet und der Aortenbogen frei präpariert. Zur Induktion einer definierten Stenose wurde an die Aorta transversa eine 27 G Nadel angelegt. Zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und dem Abgang der linken Arteria carotis communis wurde die Nadel und Aorta mit einem 7-0 Seidenfaden umschlungen. Nach Fixation der Fadenschlinge wurde die Nadel sofort entfernt, so dass ein definierter Stenosegrad der Aorta transversa zurückblieb. Der Wundverschluss des Thorax und der Haut erfolgte durch resorbierbares Nahtmaterial. Nach Eintreten der Spontanatmung wurde die Maus extubiert und bis zum vollständigen Erwachen gewärmt und überwacht. Diese Arbeiten wurden freundlicher Weise durch den Betreuer meiner Promotionsarbeit, Dr. med. J. P. Schmitt, (Pharmakologisches Institut, Universitätsklinikum Würzburg, (D)) vorgenommen. 15 Wochen nach der Operation wurden diese Mäuse für die in 2.1., 2.2 und 2.4. beschriebenen Untersuchungen geopfert. Alle Tierversuche waren von der Regierung Unterfranken genehmigt worden. (Aktenzeichen: 38/04)

### 2.4. Myozytenisolierung

Mit histologischen Untersuchungen von Gewebequerschnitten ist es schwer möglich, die Myozyten in der Länge, Breite und Fläche isoliert zu betrachten, zu untersuchen und zu vermessen. Daher wurden zusätzlich vereinzelte Myozyten, die aus den Mäuseherzen isoliert wurden, vermessen. Die Analyse isolierter Myozyten dient weiterhin als vergleichende Methode zu den histologischen Untersuchungen von Gewebepreparaten. Zur Myozytenisolierung wurde

## 2. MATERIAL UND METHODEN

folgende Versuchsanordnung entwickelt und etabliert:

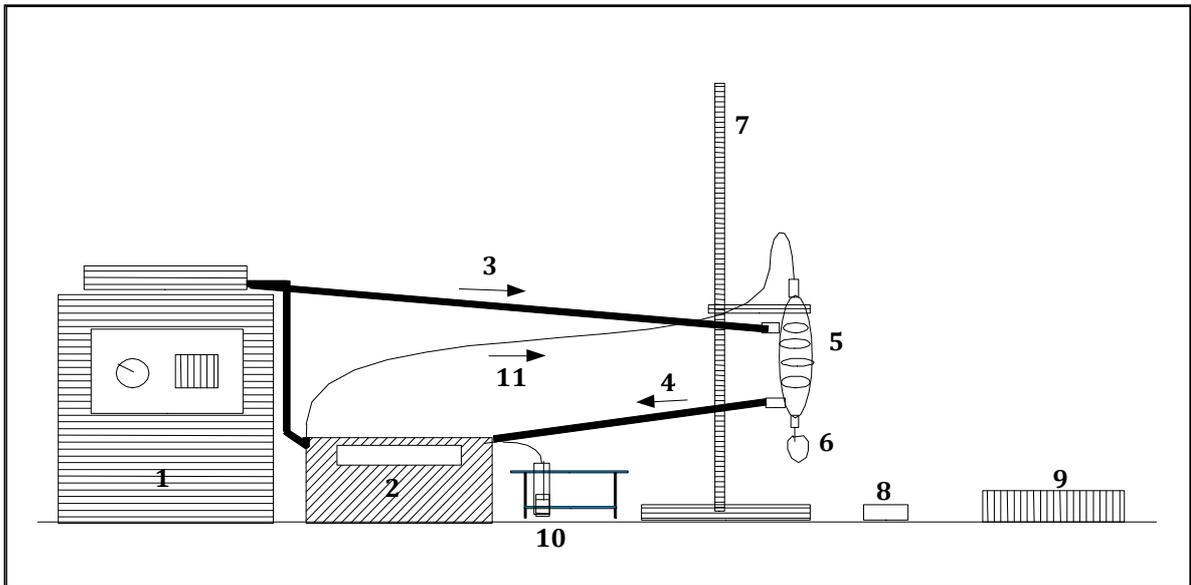


Abb.15: Aufbau der Versuchsanordnung zur Myozytenisolierung (s.o.) und Beschreibung der Komponenten sowie Hersteller (s.u.). Die Perfusion des Systems erfolgt mittels Pumpe (2) die den Wärmetauscher (5), mit entsprechend temperiertem Wasser aus dem Wasserbad (1) über die Zuleitung (3) perfundiert und über die Ableitung (4) wieder in das Wasserbad (1) abtransportiert. Über einen weitere, deutlich kleinere Perfusionsleitung (11) der Pumpe (2) wird die Perfusionslösung aus dem Reagenz (10) über die Zuleitung (11) zum Wärmetauscher (5) gebracht, durchläuft den Wärmetauscher (5), um mit der entsprechenden Temperatur das Herz (6) zu perfundieren.

1	Wasserbad	(GFL, hilab.de, Düsseldorf, D)
2	Pumpe	(Imatec IPC Glattbrugg, Zürich, CH)
3	Zuleitung für Wärmetauscher	
4	Ableitung für Wärmetauscher	
5	Wärmetauscher	(Langendorff, FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, D)
6	abgestumpfte Nadel mit Herz	(Sterican, Braun Medical AG, D)
7	Ständer	
8	Petrischale	
9	Mauspräparationsplatz	
10	Perfusionslösung	(Becton Dickson, Labware Franklin Lakes, NJ, USA)
11	Zuleitung für die Perfusionslösung	
12	Thermometer	

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### Puffer 1:

NaCl	126 mM	(Applichem, Darmstadt, D)
KCl	4,4 mM	(Merck, Darmstadt, D)
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,0 mM	(Applichem, Darmstadt, D)
DdH <sub>2</sub> O		

### Puffer 2:

NaHCO <sub>3</sub>	4,0 mM	(Applichem, Darmstadt, D)
HEPES	10 mM	(Applichem, Darmstadt, D)
BDM (Butan - edionmonoxim)	30 mM	(Sigma, Steinheim, D)
Glucose	11 mM	(Merck, Darmstadt, D)
Puffer 1		
DdH <sub>2</sub> O		pH 7,3-7,35 Filter 0,2 µm

### Enzyme Lösung:

Kollagenase1 150 U 17 mg	0,9 mg / ml	(Worthington, Lakewood, NJ, USA)
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	25 µM	(Applichem, Darmstadt, D)
Puffer 2	BDM 30 mM	

### Wasch Puffer 1

BSA Fraktion 5	20 mg/ml = 2 %	(Applichem, Darmstadt, D)
1 M CaCl <sub>2</sub>	100 µM	(Applichem, Darmstadt, D)
Puffer 2	BDM 30 mM	

Abb. 16: Bestandteile der Spül- und Waschlösungen für die Myozytenisolierung, sowie deren Hersteller (Puffer 1, Puffer 2, Enzymlösung, Wasch Puffer)

15 Minuten vor Beginn der Myozytenisolierung wurden der Maus 400 E Heparin intraperitoneal injiziert. Weiterhin wurde das Wasserbad auf 42° C vorgeheizt, um im Herzen eine Perfusionstemperatur von 36-36,5° C zu erreichen. Die Enzym Lösungen wurden vor Arbeitsbeginn frisch angesetzt (siehe oben). Zur Reinigung des Systems floss für fünf Minuten Ethanol (70 %) und im Anschluss

für fünf Minuten destilliertes Wasser durch das System. Nun konnte der Puffer 2 luftblasenfrei zirkulieren. Die Durchflussrate wurde auf 2,2-2,4 ml/min justiert. Zur Vorbereitung gehörte weiterhin die Bereitstellung von zwei Petrischalen mit 37° C warmer NaCl 0,9 % Lösung zur Präparation der Herzen.

Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde der Brustkorb eröffnet, das Herz frei präpariert, tief an den abgehenden großen Gefäßen vom Körper getrennt und in eine der vorbereiteten Petrischalen gelegt. Hier wurde das umgebende Gewebe entfernt und der Aortenstumpf identifiziert. Mittels Pinzette wurde die Aorta vorsichtig an die Perfusionsnadel herangeführt und diese in die Aorta eingeführt. Das Herz wurde mit einer Fadenschlinge knapp oberhalb des Nadelendes an der Aorta fixiert. Von der Tötung der Maus bis zur Reperfusion des Herzens sollten nicht länger als 10 Minuten vergehen. Das Herz wurde zunächst zwei Minuten lang mit Puffer 2 perfundiert und anschließend für fünf Minuten (+/-15 Sekunden je nach Herzgewicht) mit der Enzym-Lösung perfundiert. Danach wurden die Herzkammern von den Vorhöfen mit einer Schere abgetrennt, zur Herzspitze hin dreimal sternförmig eingeschnitten und in vorgewärmtem Wasch-Puffer 1 (37°C) inkubiert. Während dessen wurde das System mit destilliertem Wasser gespült. Nach der Inkubation wurde das Präparat entnommen, in einer Petrischale mit Puffer 2 in mehrere kleine Stücke geschnitten und vorsichtig bis zur Zersetzung wiederholt durch eine Pasteur-Pipette gespült. Anschließend wurde das Herzlysat durch ein Nylon-Netz (Maschenabstand 150 µm) (Hartenstein, Würzburg, D) geschwemmt. Nachdem sich die Myozyten am Boden des Falcons abgesetzt hatten, wurde der Überstand abpipettiert und zu dem Lysat 4 µl WGA-Lösung (100 %) zugegeben und angefärbt. Nach dem Auftropfen auf einen Objektträger und Abdeckung durch ein Deckgläschen konnten die Myozyten durch das konfokale Mikroskop betrachtet, gescannt und digital gespeichert werden. Die Untersuchung erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Gewinnung der isolierten Kardiomyozyten. Sämtliche Experimente wurden ohne Kenntnis des Genotyps durchgeführt. Die Zuordnung geschah nach Auswertung der Ergebnisse anhand von Ohrmarkierungen der Versuchstiere.

### 2.5. Planimetrie

#### 2.5.1 Vermessen der Herzquerschnitte nach HE Färbung

Nach der Digitalisierung der Präparate wurden diese mit der Software „Adobe Photoshop“ vermessen. Dieses geschah wie alle anderen Auswertungen ohne Kenntnis des Genotyps. Zur numerischen Erfassung und späteren Identifikation wurden die Käfignummer und die Tiermarkierung notiert. Im Anschluss konnte so eine exakte Zuordnung der Messwerte zum Genotyp erfolgen. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließendem Restriktionsverdau anhand der DNA aus Schwanzbiopsie der untersuchten Tiere. Diese Arbeiten wurden dankenswerterweise von der pharmazeutisch technischen Assistentin, Birgit Thur, durchgeführt.

Die Grundlage der genauen Auswertung war die Identifizierung der anatomischen Strukturen des Herzquerschnitts, die klar zu erkennen sein sollte (siehe Abb. 17). Besonderer Wert wurde auf die Darstellung des Papillarmuskels gelegt, zur Überprüfung der Schnittebene durch die Herzkammern nahe der Atrioventrikularklappen. Zur Erhebung repräsentativer Messwerte wurden in unterschiedlichen Schnitthöhen an jedem Herz drei bis vier Messungen durchgeführt. Im Einzelnen wurden nachfolgende Parameter gemessen (siehe Abb. 17).

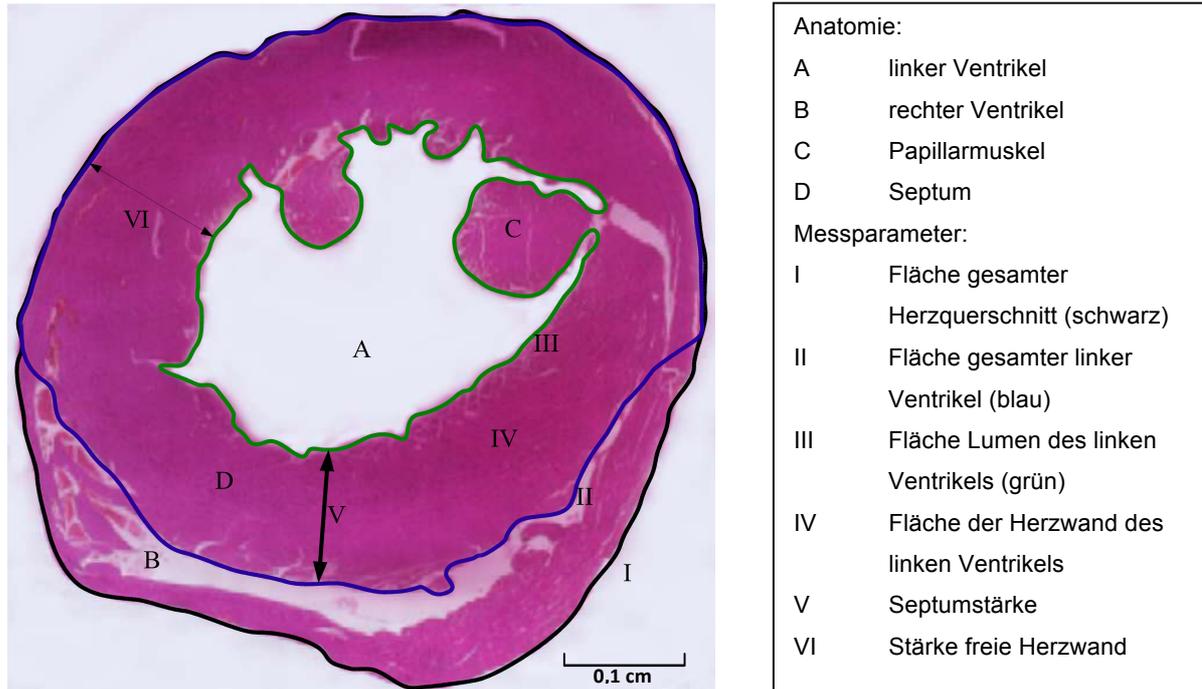
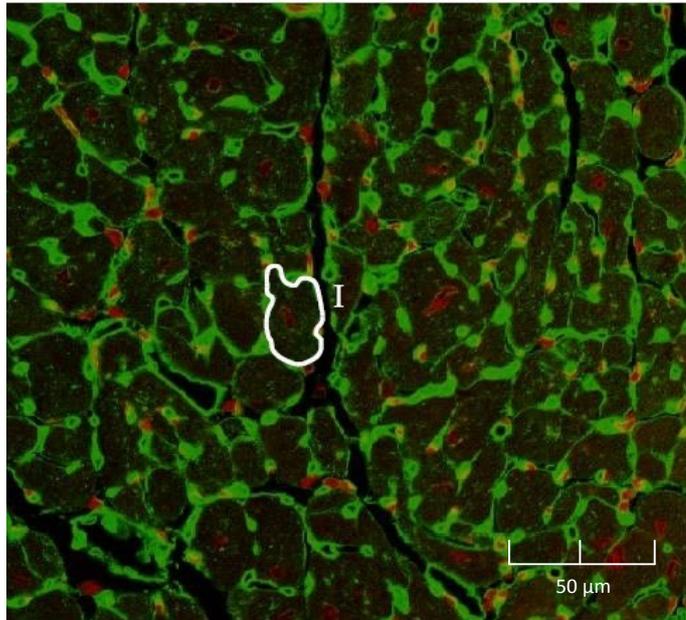


Abb.17: medianer Herzquerschnitt in HE Färbung mit Darstellung der Anatomie und erhobenen Messparameter (Scanner: Plustek Optic Slim 2400, Norderstedt, D, Auflösung 1200 x 2400 dpi)

### 2.5.2. Vermessen der Myozyten im Querschnitt nach WGA-Färbung

WGA gefärbte Präparate wurden mit einem konfokalen Mikroskop (s.o.) dargestellt. Jedes Gesichtsfeld wurde zweimal fotografiert, einmal bei einer Laserwellenlänge von 488 nm zur Darstellung der grünen Fluoreszenz des WGA Farbstoffes angeregt und ein zweites Mal zur Darstellung der roten Kernfärbung mit Propidium-Jodid bei 585 nm. Nach Fusion beider Bilder konnten so diejenigen Zellen identifiziert werden, in denen der Zellkern zur Darstellung kam, als Hinweis darauf, dass die Zellen ungefähr mittig angeschnitten wurden. Es wurden ausschließlich Myozyten mit angeschnittenem Zellkern vermessen (siehe Abb. 18). Ausgenommen von der Messung waren ferner Herzbereiche, die sich im Septum oder dessen Übergang zum Ventrikel (*cellular disarry*) befanden, den rechten Vorhof abgrenzten, die äußere Schicht des Ventrikels bildeten oder die sich im Papillarmuskelschnitt befanden. Bei der Auswahl der auszumessenden Myozyten wurde auf eine sichere Erkennbarkeit aller Zellumrisse geachtet. Die Vermessungen fanden geblindet statt.



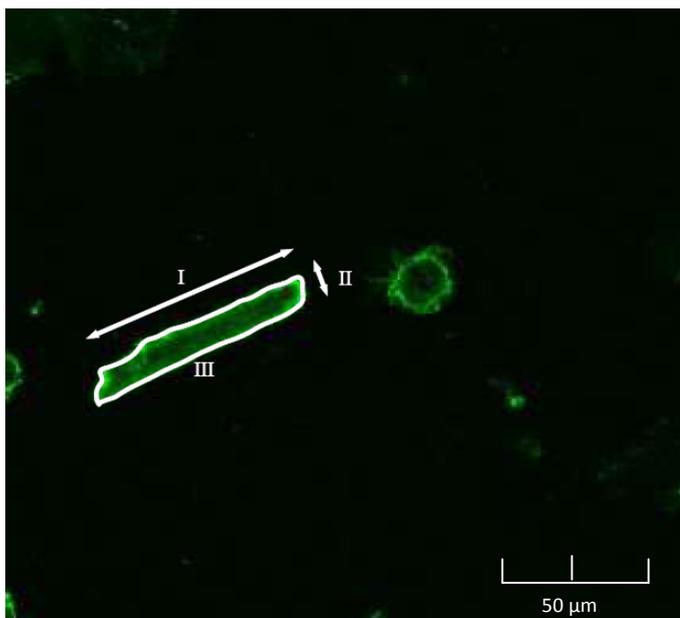
Messparameter:

I Myozytenfläche

Abb. 18: medianer Herzquerschnitt in *wheat germ agglutinin* Färbung und Darstellung von Myozyten im Querschnitt

### 2.5.3. Vermessen isolierter Myozyten nach WGA-Färbung

Bei der Messung isolierter Myozyten wurde ebenso Wert auf eine sichere Abgrenzung gegenüber umliegenden Strukturen gelegt. Der Myozyt sollte in einer strukturell unveränderten Form vorliegen, ohne intermittierende Kontraktionen und in einer horizontalen Ebene zum Objektträger. Die Messung wurde wie bei allen Untersuchungen geblindet vorgenommen, und die Länge, Breite und Fläche der Myozyten bestimmt. (siehe Abb.: 19)



Messparameter:

I Myozytenlänge

II Myozytenbreite

III Myozytenfläche

Abb. 19: Darstellung eines isolierten Myozyten in *wheat germ agglutinin* Färbung und der erhobenen Messwerte

### 2.6. Auswertung und Darstellung der Präparate

Sämtliche Herzquerschnitte und isolierte Kardiomyozyten, die mittels *wheat germ agglutinin* gefärbt wurden, wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (s.o.) aufgenommen, digitalisiert und als TIFF-Datei gespeichert. Die HE gefärbten Herzquerschnitte wurden mittels Flachbrettscanner (Plustek Optic Slim 2400, Norderstedt, D) bei maximaler Auflösung (1200 x 2400 dpi) gescannt, digitalisiert und als TIFF-Datei auf einem Datenträger gespeichert.

Die Zusammenstellung der Bilder erfolgte über Photostudio 2000, die Vermessung mit Photoshop (Adobe). Da alle Bilder bei gleicher Vergrößerung und Auflösung aufgenommen wurden und die Messwerte als Anzahl der Pixel dokumentiert wurden, waren alle Messungen direkt miteinander vergleichbar. Die Messwerte wurden in Excel (Microsoft) übertragen. Erst jetzt wurde die Zuordnung der einzelnen Tiere zu den Genotyp-Gruppen mitgeteilt um die Tiere zu sortieren und für alle Gruppen Mittelwerte errechnen zu können. Die graphische Darstellung und weitere statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Prism 4.0 (Graph Pad) durchgeführt.

### 2.7. Umrechnung der Messwerte von Pixel in Mikrometer

Zur Untersuchung der Kardiomyozytenfläche im Querschnitt wurden Herzen bei denen die mediane Fläche des Herzquerschnitts in HE-Färbung vermessen wurde, außerdem nach dem *wheat germ agglutinin*-Protokoll gefärbt. Dazu wurden solche Areale der freien Herzwand aufgesucht, in denen Myozyten quer angeschnitten waren. Zur Angabe der Messwerte in Mikrometer beziehungsweise in Quadratmikrometer wurden sie folgendermaßen umgerechnet: Das aufgenommene Bild hat eine Gesamtfläche von 262144 (512x512) Pixel. Dies entspricht, nach Angaben des Programms des konfokalen Mikroskops, je nach Auflösung, einer Bildfläche von 238x238 µm. Somit ergibt das über den Dreisatz für die Fläche einer gemessenen Zelle:

$$\text{Fläche je Zelle } (\mu\text{m}^2) = \frac{\text{Fläche je Bild } (\mu\text{m}^2) \times \text{Pixel je Zelle}}{\text{Pixel je Bild}}$$

Analog wurde dieser Dreisatz auf die Messwerte an isolierten Myozyten und HE - gefärbten Herzquerschnitten angewendet.

### 2.8. Statistik

Aus den erhobenen Messdaten wurden in den einzelnen Gruppen die arithmetischen Mittel gebildet und die Standardfehler in den entsprechenden Gruppen dargestellt. Als Vergleichsgruppe wurden altersgleiche Wildtyp-Tiere herangezogen. Für die statistische Signifikanz wurde stets  $p \leq 0,05$  angenommen. In den Diagrammen ist dies entsprechend an den Gruppen gekennzeichnet. Es wurden stets drei bis vier Schnittebenen mit HE gefärbt und vermessen. Bei den WGA gefärbten Querschnitten wurden circa 60-100 Zellen je Fläche eines Herzquerschnitts ausgemessen. Für jede Mutation und für jede Altersgruppe wurden mindestens fünf Mausherzen analysiert und für den Wildtyp mindestens zehn.

Äquivalent zu den Messdaten der HE- und WGA- gefärbten Präparate wurden bei der Myozytenisolierung je Altersgruppe mindestens vier Tiere jeder Mutante und mindestens acht Wildtyp-Tiere untersucht. Pro Herz wurden 40-80 isolierte Zellen vermessen. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben

### 2.9. Maushaltung

Die Aufzucht und Haltung der Mäuse erfolgte unter SPF Bedingungen (SPF – spezifiziert pathogenfrei) im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg. Alle untersuchten Myosin-Mutanten befanden sich im genetischen Inzucht-Hintergrund 129/SvEv, die transgenen PLN-Mäuse im FVB-Hintergrund. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Maus- und Herzgewicht

Das Maus-, Herz-, Nierengewicht und die Tibiallänge wurden für jeden Genotyp in 10 Wochen alten Tieren erhoben, sowie im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren. Als Positivkontrollen für Hypertrophie bzw. Dilatation des Herzens wurden Wildtyp-Mäuse nach operativer Aortenstenosierung für mindestens 3 Monate bzw. transgene  $PLN^{R9C}$ -Mäuse im Alter von etwa 20 Wochen untersucht.

##### 3.1.1. Mausgewicht

Das Körpergewicht der Mäuse des Wildtyps im Alter von rund 10 Wochen ( $\pm 1,3$  Wochen (Wo),  $n=5$ ) betrug im Mittel  $23 \pm 1,6$  g. Dieses steigerte sich auf  $32 \pm 4,5$  g ( $n=10$ ) im Alter von 0,5 Jahren ( $\pm 3,2$  Wo) und  $38 \pm 7,2$  g ( $n=17$ ) bei Tieren mit circa 1,5 Lebensjahren ( $\pm 10,1$  Wo). In der Kontrollgruppe wogen nur die Tiere des  $PLN^{R9C}$ -Genotyps signifikant weniger  $26,1 \pm 1,5$  g ( $p<0,05$ ) als altersgleiche Wildtyp-Tiere. Bei den heterozygoten Tieren waren in beiden Altersstufen lediglich 0,5 Jahre alte  $SP/+$ -Mäuse mit  $38,6 \pm 6,2$  g ( $p<0,05$ ) schwerer, sowie 1,5 Jahre alte  $VM/+$ -Mäuse mit  $30,5 \pm 3,9$  g ( $p<0,05$ ) leichter als altersentsprechende Wildtypen. Erst ab der 0,5 Jahre alten Gruppe waren die homozygoten Tiere unterschiedlich, das heißt der Genotyp  $FL/FL$  war mit  $37 \pm 2,9$  g ( $p<0,05$ ) schwerer und mit 1,5 Jahren hatten die Tiere des Genotyps  $SP/SP$  ein leichteres Körpergewicht  $31,8 \pm 2,6$  g ( $p<0,001$ ) als der Wildtyp.

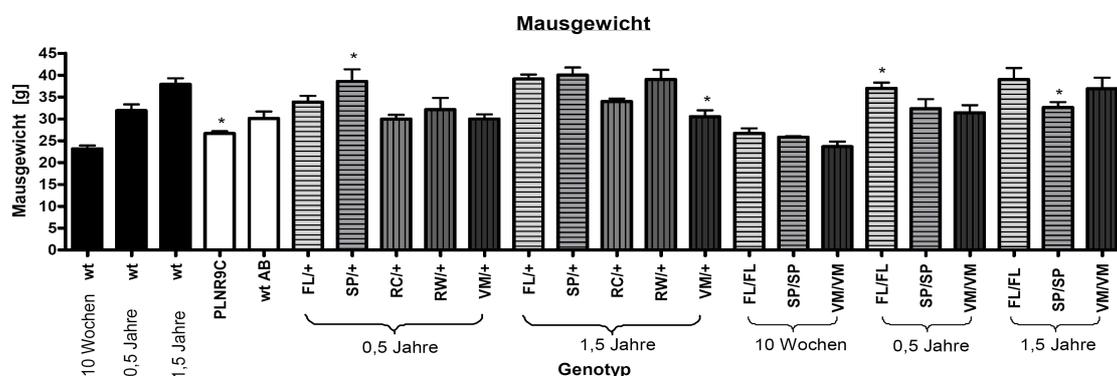


Abb. 20: Messwerte des Mausgewichts der Wildtyp-Mäuse im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere ( $PLN^{R9C}$  und Wildtyp-Mäusen 8 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von 20 Wochen, heterozygoter Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation ( $FL/+$ ,  $SP/+$ ) sowie einer HCM verursachenden Mutation ( $RC/+$ ,  $RW/+$ ,  $VM/+$ ) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM ( $FL/FL$ ,  $SP/SP$ ) bzw. HCM verursachender Mutation ( $VM/VM$ ) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren ( $n=5-17$ , t-Test  $*=p<0,05$ )

#### 3.1.2. Herzgewicht

Das Herzgewicht der Wildtyp-Mäuse erhöhte sich von  $0,12 \pm 0,1$  g (n=5) mit rund 10 Wochen über  $0,2 \pm 0,03$  g (n=10) nach 0,5 Jahren auf  $0,23 \pm 0,03$  g (n=11) nach 1,5 Jahren.

Nach künstlich induzierter Aortenstenose war das Herzgewicht mit  $0,25 \pm 0,07$  g ( $p < 0,05$ ) höher als bei 0,5 Jahre alten Wildtypen. Für Mäuse des PLN<sup>R9C</sup>-Genotyps bestanden keine Unterschiede.

Erst in der Altersgruppe mit 1,5 Jahren waren signifikante Unterschiede der heterozygoten Mäuse nachweisbar. Hier hatten die Herzen des Genotyps SP/+ mit  $0,26 \pm 0,01$  g ein höheres Gewicht ( $p < 0,05$ ) und für den Genotyp RC/+ mit  $0,19 \pm 0,02$  g war ein niedrigeres Herzgewicht ( $p < 0,05$ ) gegenüber altersgleichen Wildtypen nachweisbar.

In den drei untersuchten Altersgruppen war das Herzgewicht der Tiere mit den homozygoten Mutationen, die eine DCM verursachen, signifikant höher als das Herzgewicht der altersgleichen Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Eine Ausnahme ist der Genotyp SP/SP der 1,5 Jahre alten Tiere, die keine Unterschiede aufzeigten. Der homozygote Genotyp VM/VM zeigte in jeder der drei untersuchten Altersstufen von  $0,13 \pm 0,01$  g ( $p < 0,05$ ) bei 10 Wochen alten Tieren über  $0,15 \pm 0,02$  g ( $p < 0,05$ ) mit 0,5 Jahren bis  $0,17 \pm 0,02$  g ( $p < 0,001$ ) mit 1,5 Jahren ein signifikant niedrigeres Herzgewicht im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

#### 3.1.3. Herzgewicht zu Mausgewicht

Die Normierung des Herzgewichts auf das Mausgewicht veränderte sich bei Tieren des Wildtyps von  $5,2 \pm 0,2$  mg/g KG (Körpergewicht) mit 10 Wochen über  $6,3 \pm 0,9$  mg/g KG im Alter von 0,5 Jahren bis  $5,9 \pm 0,7$  mg/g KG bei 1,5 Jahre alten Tieren. Die Wildtyp-Tiere mit einer operativ induzierten Aortenstenose zeigten mit  $9,1 \pm 0,7$  mg/g KG einen größeren Quotienten als nicht-operierte-Kontrolltiere ( $p < 0,001$ ). Für Mäuse des PLN<sup>R9C</sup>-Genotyps bestanden keine Unterschiede zu Wildtyp-Tieren.

Bei den heterozygoten FL/+-Mäusen war das Herz- zu Mausgewicht im Alter von 1,5 Jahren mit  $6,8 \pm 0,9$  mg/g KG höher als bei altersgleichen Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

Bei den homozygoten DCM-Mutationen waren bei allen drei untersuchten Altersgruppen des Genotyps FL/FL und SP/SP die Quotienten aus Herz- zu Mausgewicht signifikant höher als die altersgleicher Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Homozygote Mäuse, die eine benigne Herzmutation tragen (VM/VM), zeigten im Alter von 0,5 Jahren mit  $4,9 \pm 0,5$  mg/g KG und 1,5 Jahren mit  $4,8 \pm 0,6$  mg/g KG einen kleineren Quotient aus Herz- zu Mausgewicht als altersgleiche Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

#### 3.1.4. Herzgewicht zu Nierengewicht

Die Normierung des Herzgewichts auf das Nierengewicht beträgt bei Wildtyp-Tieren im Alter von 10 Wochen  $0,85 \pm 0,04$  g/g NG (Nierengewicht) mit 0,5 Jahren  $0,89 \pm 0,21$  g/g NG und im Alter von 1,5 Jahren  $0,82 \pm 0,10$  g/g NG.

Die Tiere mit operativ induzierter Aortenstenose zeigten wie die PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tiere mit  $1,22 \pm 0,30$  g/g NG bzw. für die PLN<sup>R9C</sup> Tiere mit  $1,39 \pm 0,19$  g/g NG ein signifikant höheres Herz- zu Nierengewicht als altersentsprechende Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ).

Der heterozygote Genotyp FL/+ zeigte im Alter von 1,5 Jahren mit  $0,96 \pm 0,13$  g/g NG ebenso wie SP/+-Mäuse mit  $0,97 \pm 0,07$  g/g NG einen höheren Quotienten als altersgleiche Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

Die homozygoten Tiere im Alter von 10 Wochen zeigten für den Genotyp FL/FL mit  $1,34 \pm 0,09$  g/g NG und für SP/SP-Mäuse mit  $1,22 \pm 0,1$  g/g NG ein höheres Herz- zu Nierengewicht als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,001$ ). Dieser Parameter war auch bei 0,5 Jahre alten Tieren der Genotypen FL/FL ( $1,4 \pm 0,19$  g/g NG) und SP/SP ( $1,34 \pm 0,29$  g/g NG) erhöht ( $p < 0,05$ ). Des Weiteren zeigte das Herz- zu Nierengewicht der 1,5 Jahre alten Tieren des Genotyps FL/FL mit  $1,13 \pm 0,11$  g/g NG ( $p < 0,001$ ) und SP/SP mit  $1,0 \pm 0,07$  g/g NG höhere Werte als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ). Nur VM/VM-Mäuse hatten in dieser Altersgruppe ein signifikant erniedrigtes Herz- zu Nierengewicht ( $0,64 \pm 0,06$  g/g NG,  $p < 0,001$ ).

### 3. ERGEBNISSE

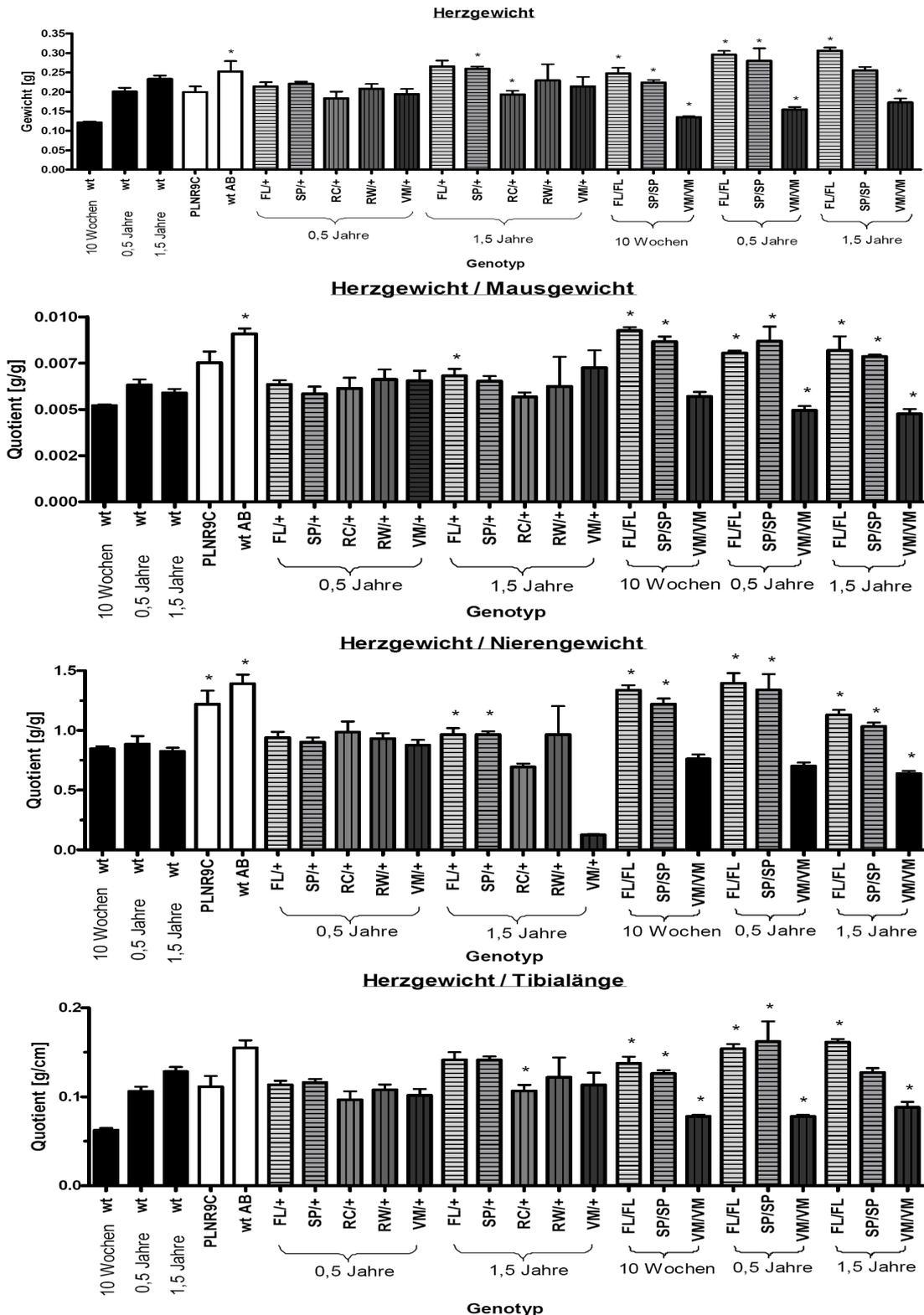


Abb. 21: Zusammenfassung der Messwerte des Herzgewichts und der Quotienten mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup> und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

#### 3.1.5. Herzgewicht zu Tibiallänge

Die Werte der Normierung des Herzgewichts auf die Tibiallänge betragen im Alter von 10 Wochen für Wildtyp-Tiere  $0,06 \pm 0,01$  g/cm TL (Tibiallänge) und stiegen mit zunehmendem Alter an ( $0,11 \pm 0,02$  g/cm TL mit 0,5 Jahren und  $0,13 \pm 0,02$  g/cm TL im Alter von 1,5 Jahren).

Die Kontrollgruppen für HCM und DCM mit operativ induzierter Aortenstenose bzw. PLN<sup>R9C</sup>-Mutation zeigten für diesen Parameter keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Tieren. Nur heterozygote RC/+ -Mäuse im Alter von 1,5 Jahren waren die Werte mit  $0,11 \pm 0,01$  g/cm TL kleiner als bei altersgleichen Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

Der Genotyp FL/FL zeigte im Alter von 10 Wochen nach Normierung Werte von  $0,14 \pm 0,02$  g/cm TL und die SP/SP-Mäuse Werte von  $0,12 \pm 0,01$  g/cm TL, die somit größer als bei altersgleichen Wildtypen waren ( $p < 0,001$ ). Die im gleichen Alter befindlichen VM/VM-Mäuse hatten ein signifikant kleineres Herzgewicht zur Tibiallänge ( $0,08 \pm 0,0$  g/cm TL) als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,001$ ).

Im Alter von 0,5 Jahren zeigten FL/FL-Mäuse mit  $0,15 \pm 0,01$  g/cm TL ( $p < 0,001$ ) und ebenso die SP/SP-Mäuse mit  $0,16 \pm 0,05$  g/cm TL ( $p < 0,05$ ) signifikant größere Quotienten. Der Genotyp VM/VM war, wie zuvor mit  $0,08 \pm 0,0$  g/cm TL ( $p < 0,05$ ) kleiner als altersgleiche Wildtyp-Tiere.

Mit  $0,16 \pm 0,01$  g/cm TL war das Herzgewicht zur Tibiallänge bei FL/FL-Mäusen im Alter von 1,5 Jahren größer als bei altersgleichen Wildtypen ( $p < 0,001$ ). Der Genotyp VM/VM zeigte in dieser Altersstufe kleinere Werte ( $0,09 \pm 0,01$  g/cm TL) als der altersentsprechende Wildtyp ( $p < 0,001$ ).

#### 3.2. Ergebnisse der Hämalaun Eosin Färbung

##### 3.2.1. Herzfläche im medianen Querschnitt

Die gesamte Herzfläche im Querschnitt bei Wildtyp-Tieren betrug in 10 Wochen alten Tieren  $19,0 \pm 2,0$  mm<sup>2</sup> (n=5), wuchs in der Gruppe der 0,5 Jahre alten Tiere auf  $23,6 \pm 3,3$  mm<sup>2</sup> (n=10) und erreichte mit 1,5 Jahre eine Herzfläche von  $26,3 \pm 3,3$  mm<sup>2</sup> (n= 10). Die Quotienten aus dem Rohwert der Herzfläche

der Wildtyp-Tiere und dem Mausgewicht verringerten sich bei Wildtyp-Tieren dagegen im zeitlichen Verlauf von  $0,82 \pm 0,0 \text{ mm}^2/\text{g KG}$  auf  $0,64 \pm 0,12 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ , sowie bezogen auf das Nierengewicht von  $133,0 \pm 9,2 \text{ mm}^2/\text{g NG}$  auf  $94,0 \pm 17,4 \text{ mm}^2/\text{g NG}$ . Eine altersabhängige Zunahme fand sich bei der Normierung der Herzfläche auf die Tibiallänge von  $10,0 \pm 1,0 \text{ mm}^2 / \text{cm TL}$  auf  $14,0 \pm 2,0 \text{ mm}^2/\text{cm TL}$ .

In den Kontrollgruppen zeigte lediglich der Genotyp mit dem  $\text{PLN}^{\text{R9C}}$ -Transgen mit  $19,2 \pm 2,9 \text{ mm}^2$  (n=7) eine signifikant kleinere Herzfläche ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu 0,5 Jahren alten Wildtypen. Nach Normierung der Herzfläche auf das Körpergewicht, Nierengewicht oder die Tibiallänge bestand dieser Unterschied jedoch nicht mehr.

Die Tiere mit dem heterozygoten Genotyp RC/+ hatten im Alter von 0,5 Jahren mit  $18,4 \pm 1,9 \text{ mm}^2$  (n=6) eine signifikant kleinere Herzfläche ( $p < 0,05$ ) als der vergleichbare Wildtyp. Nach Normierung auf das Mausgewicht und die Tibiallänge war die Herzfläche weiterhin signifikant kleiner ( $p < 0,05$ ) als die entsprechenden Werte des Wildtyps. Ferner zeigte der Quotient aus Herzfläche zu Mausgewicht für den Genotyp SP/+ im Alter von 0,5 Jahren mit  $0,58 \pm 0,09 \text{ mm}^2/\text{g KG}$  einen signifikant kleineren Wert als bei Wildtypen ( $p < 0,05$ ).

Die Herzfläche aller homozygoten Mäuse mit einer DCM-Mutation, mit Ausnahme der 1,5 Jahre alten FL/FL-Mäuse, war in den Rohwerten sowie nach Normierung auf die Tibiallänge in allen Altersgruppen signifikant größer als altersentsprechende Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Bei der Normierung auf das Mausgewicht zeigte nur der Genotyp SP/SP in jeder Altersstufe einen signifikant größeren Quotienten ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). In Bezug auf das Nierengewicht war die Herzfläche in 0,5 Jahre alten FL/FL- und SP/SP-Mäusen, sowie die 1,5 Jahre alten SP/SP-Mäusen signifikant größer ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ) als der Vergleichswert des Wildtyps.

### 3. ERGEBNISSE

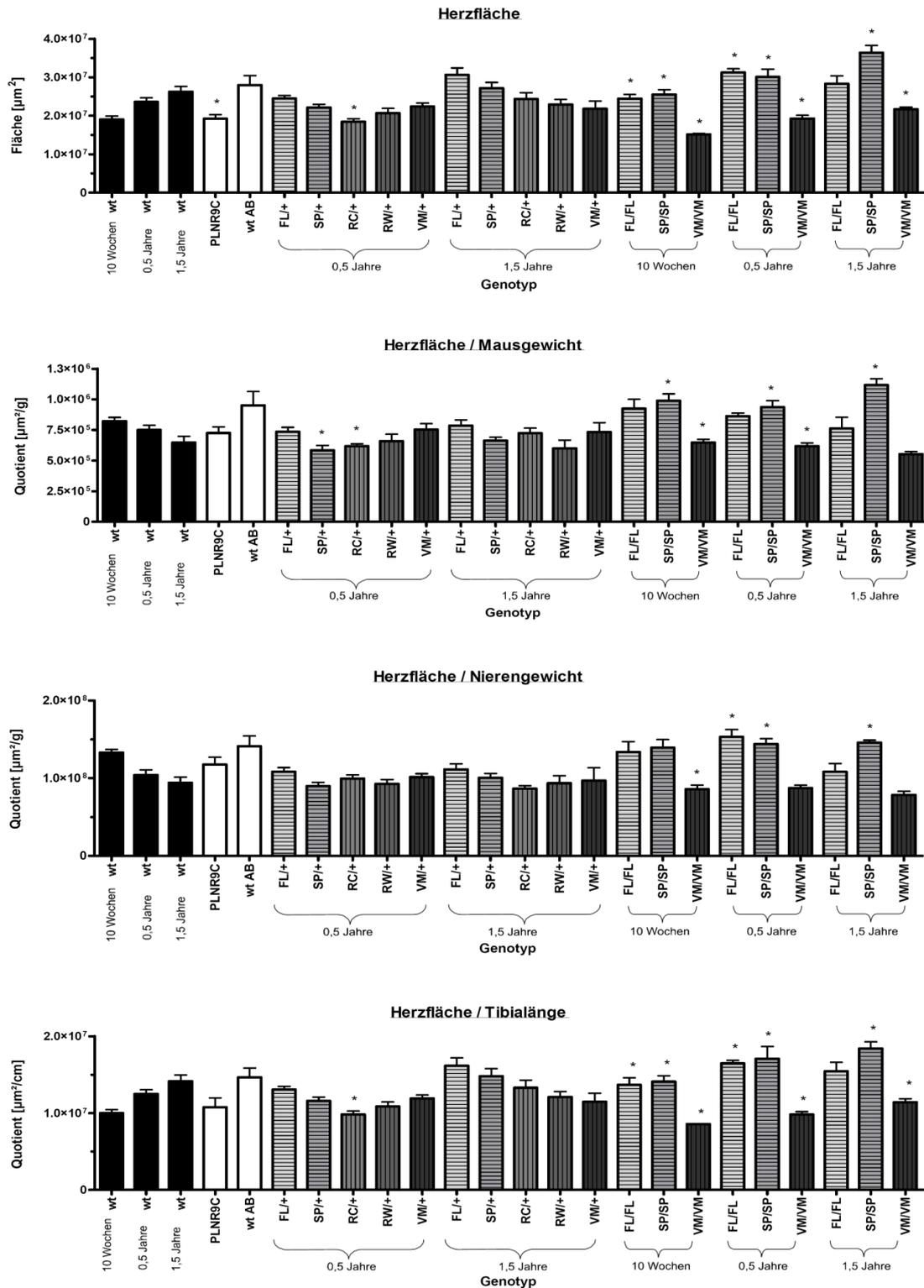


Abb. 22: Zusammenfassung der Messwerte der Herzfläche im medianen Querschnitt und der Quotient mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup> und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

Die Tiere des Genotyps VM/VM hatten bei der Herzfläche in jeder Altersgruppe einen signifikant kleineren Rohwert ( $p < 0,05$ ) als der Wildtyp. Das gleiche Ergebnis fand sich bei der Abgleichung der Herzfläche mit der Tibiallänge. Bei der Normierung mit dem Mausgewicht war der Quotient bei 10 Wochen ( $0,65 \pm 0,06 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ) und 0,5 Jahre ( $0,62 \pm 0,06 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ) alten VM/VM Tieren deutlich kleiner als der des Wildtyps ( $p < 0,05$ ). Bei dem Quotienten aus der Herzfläche und Nierengewicht war dies ebenso mit  $86 \pm 11,4 \text{ mm}^2/\text{g NG}$  bei 10 Wochen alten Tieren der Fall ( $p < 0,001$ ).

#### 3.2.2. Fläche des linken Ventrikels im medianen Herzquerschnitt

Für die Fläche des linken Ventrikels im medianen Querschnitt der Wildtyp-Mäuse ergab sich eine Vergrößerung der Ventrikelfläche von  $14,9 \pm 1,5 \text{ mm}^2$  ( $n=5$ ) in 10 Wochen alten Tieren über  $18,4 \pm 1,6 \text{ mm}^2$  ( $n=7$ ) bei der Gruppe mit 0,5 Jahren auf  $20,8 \pm 2,9 \text{ mm}^2$  ( $n=10$ ) in 1,5 Jahre alten Tieren. Die Normierungswerte des Rohwertes der Wildtyp-Tiere mit dem Maus- (von  $0,64 \pm 0,07 \text{ mm}^2$  auf  $0,48 \pm 0,1 \text{ mm}^2/\text{gx}10^6$ ) und Nierengewicht (von  $105 \pm 7,7 \text{ mm}^2$  auf  $73 \pm 15,1 \text{ mm}^2$ ) waren mit steigendem Alter rückläufig, während die Quotienten aus Ventrikelfläche und Tibiallänge, von  $7,9 \pm 0,8 \text{ mm}^2$  auf  $11,2 \pm 1,6 \text{ mm}^2$  anstiegen.

Die  $\text{PLN}^{\text{R9C}}$ - transgenen Mäuse zeigten als Jungtiere mit  $14,9 \pm 1,5 \text{ mm}^2$  ( $n=7$ ) eine kleinere linksventrikuläre Gesamtfläche als der altersgleiche Wildtyp ( $p < 0,001$ ). Mäuse mit künstlicher Aortenstenose zeigten gegenüber den Wildtyp-Tieren mit  $117,8 \pm 34,6 \text{ mm}^2/\text{g NG}$  nur bei der Normierung der Fläche des linken Ventrikels auf das Nierengewicht einen signifikant größeren Quotienten ( $p < 0,05$ ). Von den Gruppen heterozygoter Tiere im Alter von 0,5 Jahren hatten die Tiere mit dem Genotyp RC/+ mit  $14,8 \pm 1,5 \text{ mm}^2$  eine signifikant kleinere gesamte linksventrikuläre Fläche als Wildtypen ( $p < 0,05$ ).

### 3. ERGEBNISSE

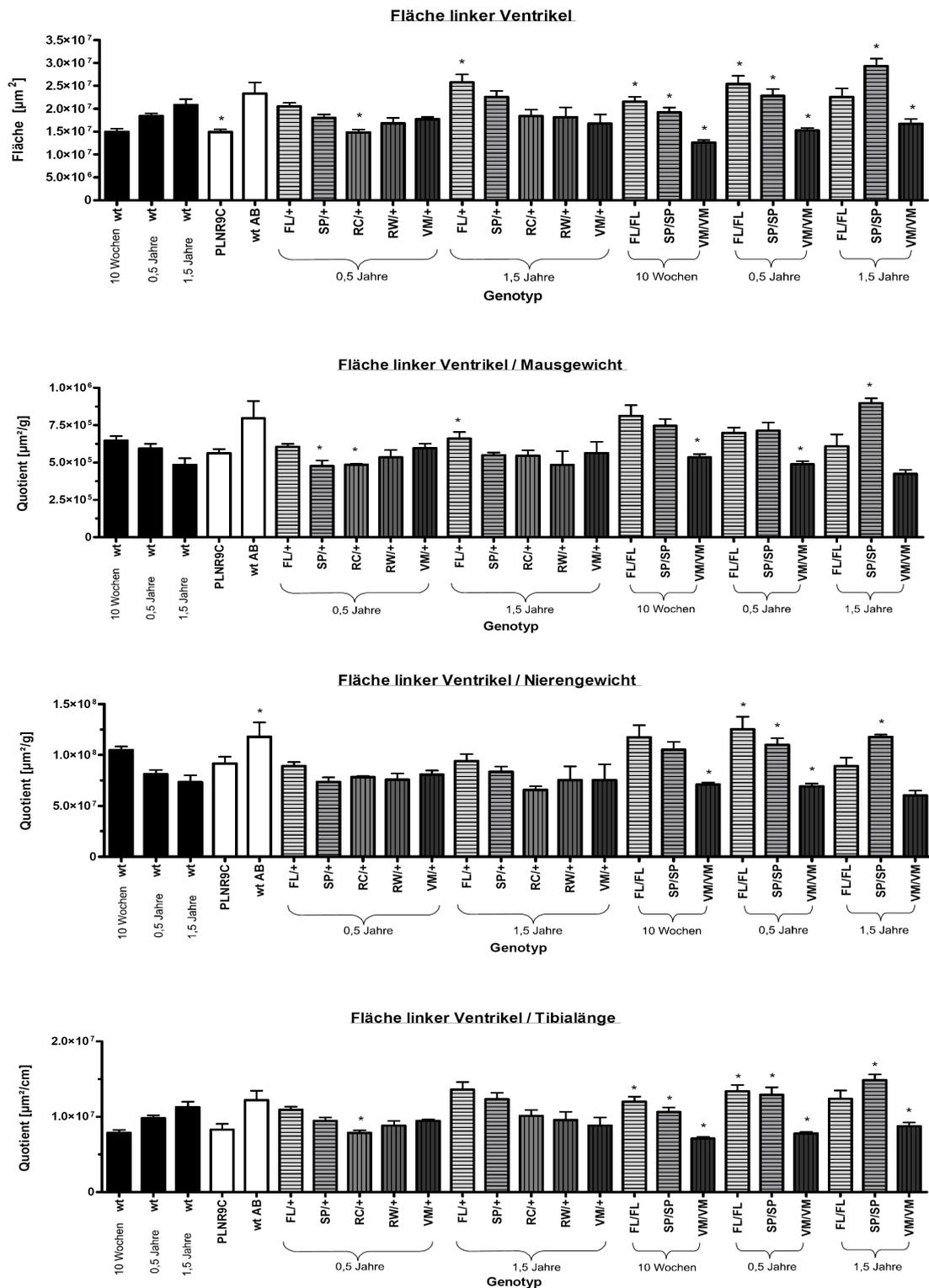


Abb. 23: Zusammenfassung der Messwerte des linken Ventrikels und der Quotienten mit dem Mausegewicht, Nierengewicht bzw. Tibiallänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>RO</sup>C und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

Entsprechende Ergebnisse zeigten sich nach Normierung der Ventrikelfläche auf das Mausgewicht mit  $0,49 \pm 0,01 \text{ mm}^2/\text{g KG}$  bzw. auf die Tibiallänge mit  $7,9 \pm 0,8 \text{ mm}^2/\text{cm TL}$  (jeweils  $p < 0,05$ ). Für den Genotyp SP/+ stellte sich ein signifikant kleinerer Quotient  $0,48 \pm 0,08 \text{ mm}^2$  bei der Normierung auf das Mausgewicht dar ( $p < 0,05$ ). In der Gruppe der 1,5 Jahre alten heterozygoten FL/+Mäuse war die Ventrikelfläche mit  $25,8 \pm 4,3 \text{ mm}^2$  größer, wie auch nach Normierung auf das Mausgewicht ( $0,66 \pm 0,11 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ) zu altersgleichen Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

Die linksventrikuläre Gesamtfläche der untersuchten homozygoten Tiere mit DCM-Mutation war in allen Altersgruppen (mit Ausnahme 1,5 Jahre alter FL/FL-Tiere) signifikant größer als bei altersentsprechenden Wildtypen ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Gleiches galt nach Normierung der Ergebnisse auf die Tibiallänge. Bei der Normierung der Ventrikelfläche 1,5 Jahre alter SP/SP-Mäuse auf das Mausgewicht ergab sich ein signifikant größerer Quotient mit  $0,9 \pm 0,07 \text{ mm}^2/\text{g KG}$  als bei altersgleichen Wildtyp-Tieren ( $p < 0,001$ ). Nach Normierung auf das Nierengewicht ergaben sich in den 0,5 Jahre alten Gruppen der Genotypen FL/FL ( $125 \pm 24,6 \text{ mm}^2/\text{g NG}$ ) und SP/SP ( $109,8 \pm 15 \text{ mm}^2/\text{g NG}$ ) signifikant größere Quotienten als in altersgleichen Wildtypen ( $p < 0,05$ ).

Eine signifikant kleinere Herzfläche als in Wildtypen fand sich in allen Altersstufen der Gruppe mit dem Genotyp VM/VM sowohl im Rohwert als auch bei den normierten Werten ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Alleinige Ausnahme waren 1,5 Jahre alte VM/VM-Tiere nach Normierung auf das Maus- bzw. Nierengewicht, wo kein Unterschied der Werte nachweisbar war.

#### 3.2.3. Fläche linksventrikuläres Lumen im medianen Herzquerschnitt

Die Fläche des Lumens des linken Ventrikels im Querschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln betrug bei 10 Wochen alten Wildtyp-Tieren  $2,6 \pm 1,1 \text{ mm}^2$  ( $n=5$ ) und stieg auf  $3,1 \pm 0,8 \text{ mm}^2$  im Alter von 0,5 auf  $4,2 \pm 1,3 \text{ mm}^2$  ( $n=10$ ) im Alter von 1,5 Jahren.

Das linksventrikuläre Lumen der Tiere mit künstlicher Aortenstenose maß  $5,7 \pm 4,0 \text{ mm}^2$  ( $p < 0,05$ ) und nach Normierung auf das Nierengewicht  $24,7 \pm 4,8$

mm<sup>2</sup>/g NG bzw. die Tibialänge 3,0 ± 2,0 mm<sup>2</sup>/cm TL. Die Werte waren allesamt größer als bei nicht-operierten Wildtyp-Tieren (p<0,05). Bei PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Mäusen war das linksventrikuläre Lumen lediglich nach Normierung auf das Nierengewicht mit 22,8 ± 9,1 mm<sup>2</sup>/g NG erhöht (p<0,05).

Bei den heterozygoten Tieren war der Quotient aus linksventrikulärem Lumen und Tibialänge bei 0,5 Jahre alten RW/+Mäusen reduziert (1,4 ± 0,66 mm<sup>2</sup>, p<0,001). Das gleiche galt für 1,5 Jahre alte SP/+Mäuse, die sowohl im Rohwert des linksventrikulären Lumens (2,5 ± 1,4 mm<sup>2</sup>) als auch nach Normierung auf das Maus- (0,57 ± 0,24 mm<sup>2</sup>/g KG) bzw. Nierengewicht (9,3 ± 4,5 mm<sup>2</sup>/g NG) reduzierte Werte zeigten (jeweils p<0,05). 1,5 Jahre alte VM/+Tiere zeigten ein reduziertes linksventrikuläres Lumen für die Rohwerte (2,3 ± 1,0 mm<sup>2</sup>, p<0,05) sowie nach Normierung auf die Tibialänge (1,2 ± 0,5 mm<sup>2</sup>/cm TL).

Außer beim Genotyp SP/SP der 1,5 Jahre alten Tiere waren sämtliche Rohwerte für die Fläche des linksventrikulären Lumen in allen drei Altersstufen bei FL/FL- und SP/SP-Mäusen größer (p<0,05 und p<0,001) als beim Wildtyp. Nach der Normierung dieser Werte auf das Mausgewicht waren die resultierenden Quotienten für 10 Wochen alte SP/SP-Tiere und 0,5 Jahre alte FL/FL-Tiere größer als bei Wildtyp-Tieren (p<0,05 und p<0,001). In der Gruppe der 1,5 Jahre alten Tiere war das linksventrikuläre Lumen von SP/SP- und FL/FL-Mäusen erhöht (p<0,05). Bei Normierung auf das Nierengewicht zeigten beide Gruppen mit homozygoten DCM Mutation im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren höhere Werte als Wildtyp-Tiere (p<0,05 und p<0,001). Bei der Normierung auf die Tibialänge waren die linksventrikulären Lumina 10 Wochen alter SP/SP-Tiere sowie 0,5 Jahre alter SP/SP- und FL/FL-Tiere und 1,5 Jahre alte FL/FL-Tiere größer als bei Wildtyp-Tieren (p<0,05 und p<0,001). 10 Wochen und 1,5 Jahre alte VM/VM-Mäuse zeigten reduzierte linksventrikuläre Lumina im Rohwert und bei den normierten Werten (p<0,05 und p<0,001). Im Alter von 0,5 Jahren bestanden keine Unterschiede.

### 3. ERGEBNISSE

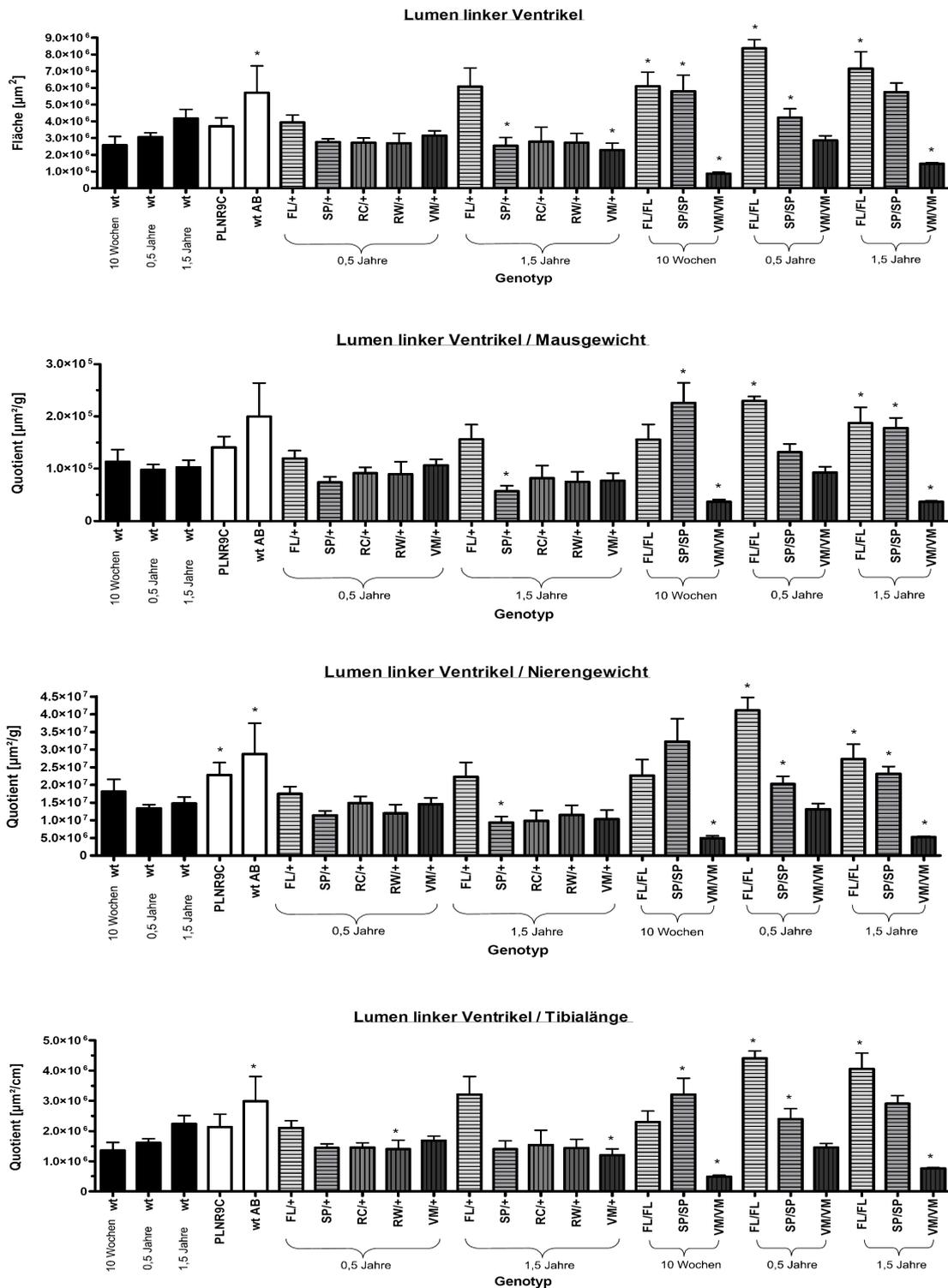


Abb.24: Zusammenfassung der Messwerte des Lumen linken Ventrikels im medianen Querschnitt und der Quotienten mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibiallänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahre, Kontrolltiere (PLN<sup>9C</sup> und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahre und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahre (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

#### 3.2.4. Herzwandfläche des linken Ventrikels im medianen Querschnitt

Die linksventrikuläre Herzwandfläche wurde aus der Differenz der entsprechenden Messwerte für die linksventrikuläre Fläche und dem linksventrikulären Lumen bestimmt. Die Messungen der Herzwandfläche des linken Ventrikels zeigten bei Wildtyp-Tieren eine Zunahme der Fläche mit steigendem Alter, beginnend bei den Tieren im Alter von 10 Wochen mit  $12,4 \pm 1,6 \text{ mm}^2$  (n=5) über  $15,7 \pm 1,7 \text{ mm}^2$  (n=7) bei 0,5 Jahren bis zu den 1,5 Jahre alten Tieren mit einer Fläche von  $16,6 \pm 2,5 \text{ mm}^2$  (n=5).

Die Tiere mit operativ induzierter Aortenstenose wiesen in den Rohwerten  $17,3 \pm 0,36 \text{ mm}^2$  und nach Normierung mit dem Nierengewicht  $87,9 \pm 12 \text{ mm}^2/\text{g NG}$  eine signifikant größere Herzwandfläche auf ( $p < 0,05$ ). Die Absolutwerte PLN<sup>R9C</sup>-transgener Mäuse waren signifikant kleiner ( $11,2 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ ) als die des Wildtyps ( $p < 0,001$ ). Im Verhältnis zum Mausgewicht ( $0,42 \pm 0,05 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ,  $p < 0,05$ ) und zur Tibiallänge ( $6,2 \pm 1,0 \text{ mm}^2/\text{cm TL}$ ,  $p < 0,001$ ) war die Herzwandfläche der PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Mäuse signifikant kleiner als beim Wildtyp.

Bei den heterozygoten Tieren war die Herzwandfläche der RC/+ -Mäuse im Alter von 0,5 Jahren mit  $12,3 \pm 1,4 \text{ mm}^2$  signifikant kleiner als die altersgleicher Wildtypen, sowohl im Rohwert ( $p < 0,05$ ) als auch für die auf das Mausgewicht ( $6,5 \pm 0,7 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ) bzw. die Tibiallänge ( $6,5 \pm 0,7 \text{ mm}^2/\text{cm TL}$ ) normierten Werte ( $p < 0,05$ ). Der auf das Mausgewicht normierte Wert war auch bei 0,5 Jahre alten SP/+ -Mäusen reduziert ( $0,4 \pm 0,06 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ,  $p < 0,05$ ). Unter den 1,5 Jahre alten heterozygoten Tieren hatten SP/+ - und FL/+ -Mäuse signifikant größere Herzwandflächen des linken Ventrikels, sowohl in den Rohwerten wie nach Normierung auf das Mausgewicht bzw. das Nierengewicht (nur SP/+) ( $p < 0,05$ ). 0,5 und 1,5 Jahre alte SP/SP-Tiere hatten mit  $18,6 \pm 2,3 \text{ mm}^2$  bzw.  $23,3 \pm 2,5 \text{ mm}^2$  eine größere linksventrikuläre Herzwandfläche als altersgleiche Wildtypen ( $p < 0,05$ ). Die Normierung auf das Mausgewicht ergab für 1,5 Jahre alte SP/SP-Tiere ( $0,72 \pm 0,06 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ,  $p < 0,05$ ) wie für 10 Wochen alte FL/FL-Tiere ( $0,65 \pm 0,10 \text{ mm}^2/\text{g KG}$ ,  $p < 0,001$ ) einen signifikant größeren Quotienten als für Wildtyp-Tiere.

### 3. ERGEBNISSE

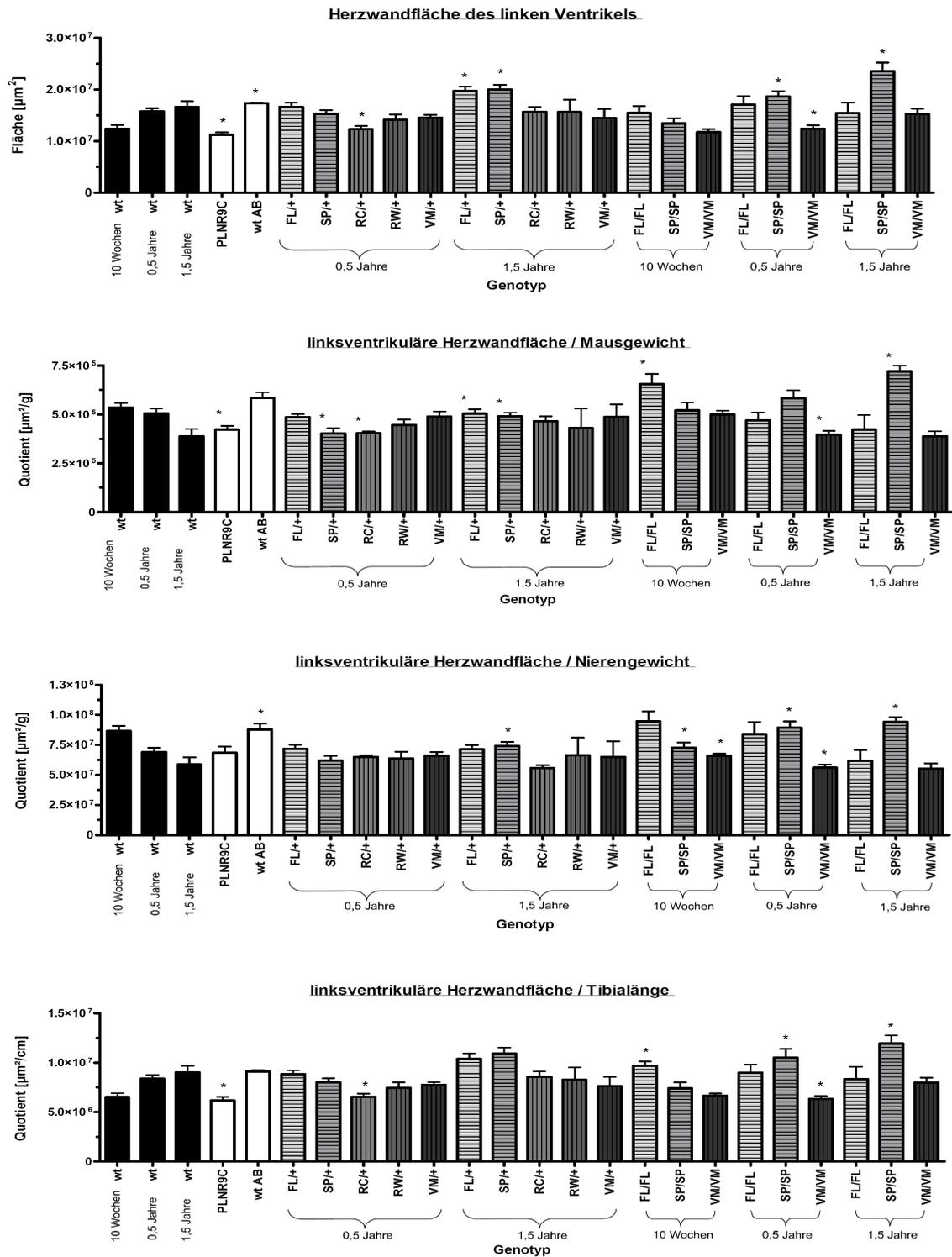


Abb. 25: Zusammenfassung der Messwerte der Herzwandfläche des linken Ventrikels im medianen Querschnitt und der Quotienten mit dem Mausegewicht, Nierengewicht bzw. Tibiallänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup>) und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

Der Quotient aus Rohwert und Nierengewicht war für den Genotyp SP/SP in allen untersuchten Altersstufen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Die Normierung auf die Tibiallänge zeigte bei Mäusen mit dem Genotyp FL/FL im Alter von 10 Wochen und für den Genotyp SP/SP im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren einen signifikant größeren Quotient als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ).

In der Gruppe der 10 Wochen alter VM/VM-Tiere war der Quotient aus Rohwert und Nierengewicht signifikant kleiner  $66 \pm 4,2 \text{ mm}^2/\text{g NG}$  als beim Wildtyp ( $p < 0,05$ ). Zudem war bei 0,5 Jahre alten Mäusen des Genotyps VM/VM die linksventrikuläre Herzwandfläche sowohl als Rohwert  $12,4 \pm 1,4 \text{ mm}^2$  ( $p < 0,05$ ), als auch nach sämtlichen Normierungen stets kleiner als bei altersgleichen Wildtypen ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Im Alter von 1,5 Jahren waren keine Unterschiede mehr nachweisbar.

#### 3.2.5. Septumstärke

Die Wildtyp-Tiere hatten im Alter von 10 Wochen eine Septumstärke von  $0,11 \pm 0,016 \text{ cm}$ ,  $0,15 \pm 0,019 \text{ cm}$  im Alter von 0,5 Jahren und  $0,14 \pm 0,024 \text{ cm}$  mit circa 1,5 Jahren.

PLN<sup>R9C</sup> transgene Tiere zeigten lediglich bei der Normierung auf das Nierengewicht einen signifikant größeren Quotient ( $0,83 \pm 0,11 \text{ cm/g NG}$ ) als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ). Weitere Unterschiede waren in den Kontrollgruppen nicht nachweisbar.

Die Untersuchung der heterozygoten Tiere beider Altersstufen zeigte nur für 1,5 Jahre alte SP/+ Mäuse eine höhere Septumstärke im Rohwert ( $0,17 \pm 0,018 \text{ cm}$ ,  $p < 0,05$ ) sowie nach dessen Normierung auf das Nierengewicht ( $0,65 \pm 0,08 \text{ cm/g NG}$ ,  $p < 0,05$ ) bzw. die Tibiallänge ( $0,095 \pm 0,008 \text{ cm/cm TL}$ ,  $p < 0,05$ ).

Unter den homozygoten Tieren mit einer DCM-Mutation hatten 0,5 Jahre alte FL/FL-Tiere eine größere Septumstärke  $0,12 \pm 0,013 \text{ cm}$  als Wildtypen ( $p < 0,05$ ). Normiert auf das Mausgewicht ( $0,0033 \pm 0,0002 \text{ cm/g KG}$ ) zeigte diese Gruppe, ebenso wie 10 Wochen alte SP/SP-Tiere ( $0,0035 \pm 0,0008 \text{ cm/g KG}$ ), einen signifikant kleineren Quotient als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

### 3. ERGEBNISSE

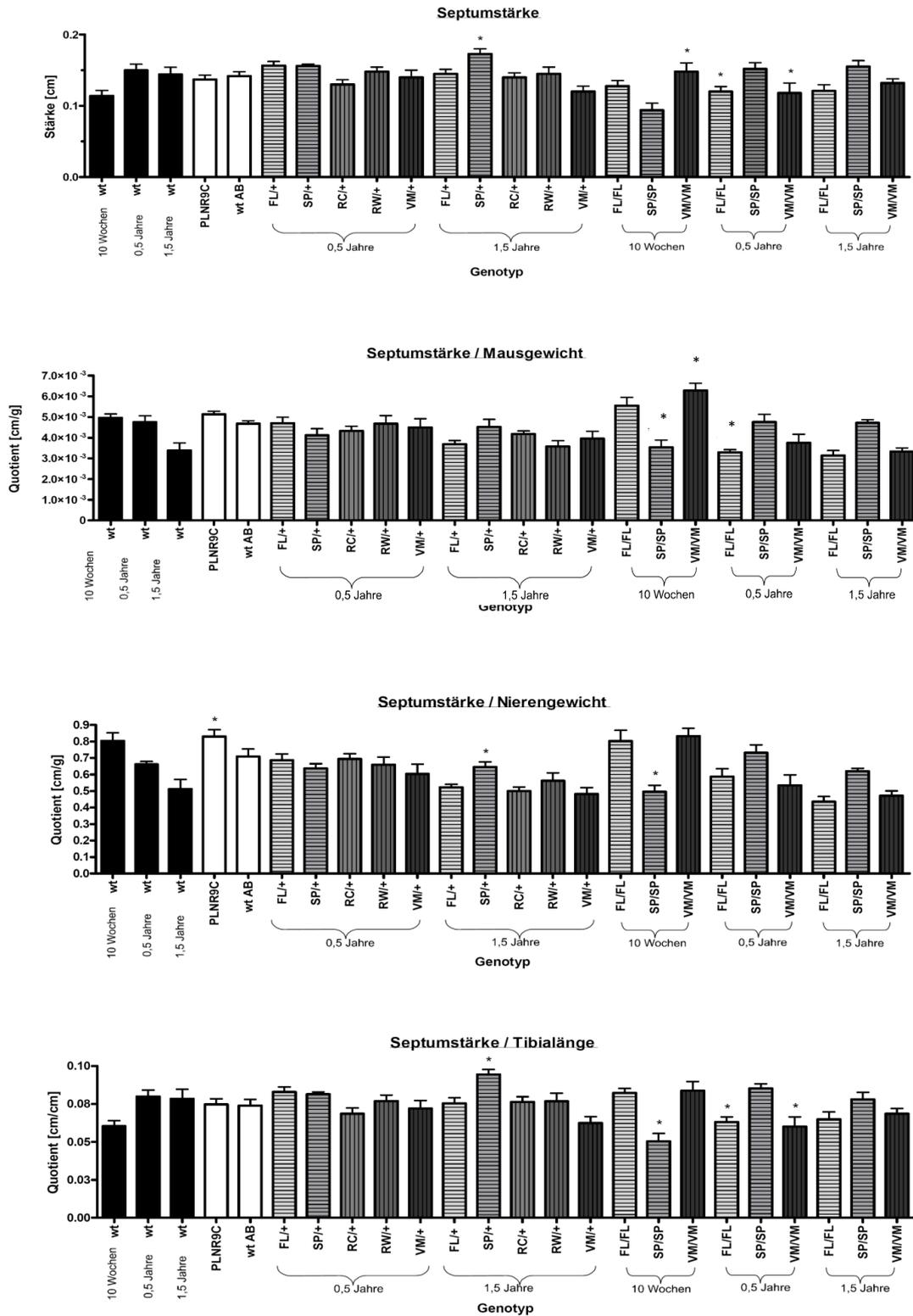


Abb. 26: Zusammenfassung der Messwerte der Septumstärke des linken Ventrikels im medianen Querschnitt und der Quotienten mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup> und Wildtyp Mäusen und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenose der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

Bei 10 Wochen alten SP/SP-Mäusen war die Septumstärke auch nach Normierung der Werte auf das Nierengewicht ( $0,49 \pm 0,92$  cm/g NG) reduziert ( $p < 0,001$ ). Der Quotient aus Messwert und Tibiallänge 10 Wochen alter SP/SP-Tiere ( $0,05 \pm 0,012$  cm/cm TL) und 0,5 Jahre alter FL/FL-Tiere ( $0,063 \pm 0,007$  cm/cm TL) war ebenfalls kleiner als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

Der Rohwert der Septumstärke war bei VM/VM-Tieren im Alter von 10 Wochen größer ( $0,15 \pm 0,027$  cm,  $p < 0,05$ ), ebenso der auf das Mausgewicht normierte Wert  $0,0063 \pm 0,0008$  cm/g KG,  $p < 0,05$ ). Jedoch war bei 0,5 Jahre alten Tiere, nach Normierung auf die Tibiallänge dieser Wert kleiner  $0,06 \pm 0,015$  cm/cm TL als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

#### 3.2.6 Stärke der linksventrikulären freien Herzwand

Die freie Herzwand des linken Ventrikels hatte bei Wildtyp-Tieren im Alter von rund 10 Wochen eine Stärke von  $0,11 \pm 0,019$  cm, mit 0,5 Jahren  $0,15 \pm 0,032$  cm und im Alter von etwa 1,5 Jahren eine Stärke von  $0,14 \pm 0,021$  cm.

PLN<sup>R9C</sup>- transgene Tiere zeigten im Rohwert einen signifikant kleineren Wert ( $0,10 \pm 0,012$  cm) gegenüber dem Wildtyp ( $p < 0,05$ ). Bei Tieren nach Aortenbanding war kein Unterschied zu Wildtyp-Tieren feststellbar.

Unter den heterozygoten Tieren hatten 1,5 Jahre alte SP/+Mäuse im Rohwert mit  $0,18 \pm 0,026$  cm, sowie nach Normierung eine höhere Stärke der linksventrikulären freien Wand als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

Von den homozygoten Tieren mit einer DCM-Mutation war bei 10 Wochen alten SP/SP-Tieren der Quotient aus der Stärke der freien Herzwand und dem Nierengewicht signifikant kleiner ( $0,60 \pm 0,09$  cm/g NG) als beim Wildtyp ( $p < 0,05$ ). 10 Wochen alte VM/VM-Tiere zeigten im Rohwert mit  $0,15 \pm 0,026$  cm sowie nach Normierung auf das Mausgewicht ( $0,0064 \pm 0,0015$  cm/g KG) bzw. die Tibiallänge ( $0,084 \pm 0,015$  cm/cm TL) eine größere Stärke der linksventrikulären freien Wand als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

### 3. ERGEBNISSE

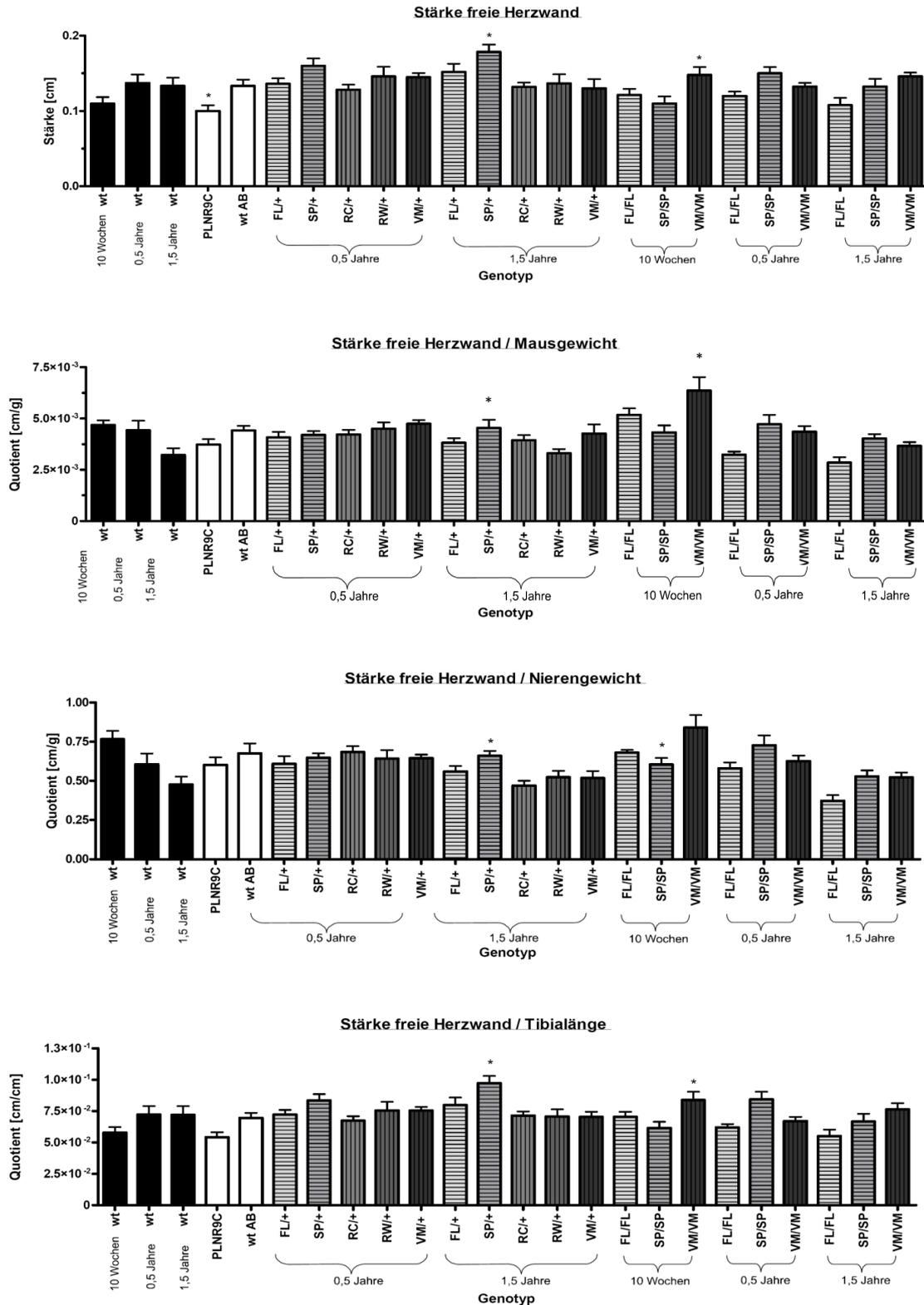


Abb. 27: Zusammenfassung der Messwerte der Stärke der linksventrikulären freien Herzwand und der Quotienten mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>9C</sup> und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

#### 3.3. Ergebnisse der WGA-Färbung

Mit der WGA-Färbung wurden auf histologischen Querschnittspräparaten des Herzens die Zellmembranen der Myozyten dargestellt. Die mit dem konfokalen Mikroskop dokumentierten Fluoreszenzaufnahmen erlaubten die präzise Markierung der Zellränder und daraus die Berechnung der Zellfläche (s. Methodenteil). Es wurden nur solche Zellen ausgemessen, in denen der Zellkern angeschnitten war.

##### 3.3.1. Zellfläche

Die Messwerte für die Fläche der Myozyten im Querschnitt nahm bei Wildtyp-Tieren mit steigendem Alter von 10 Wochen mit  $240 \pm 38 \mu\text{m}^2$  über  $355 \pm 82 \mu\text{m}^2$  bei 0,5 Jahre alten Tieren auf  $375 \pm 120 \mu\text{m}^2$  im Alter von 1,5 Jahren zu.

Die Zellfläche der Tiere mit operativ induzierter Aortenstenose hatten sowohl in den Rohwerten mit  $463,3 \pm 71,2 \mu\text{m}^2$  als auch nach Normierung mit dem Maus-, Nierengewicht und der Tibiallänge eine signifikant größere Zellflächen als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Zu entsprechenden Ergebnissen kam die Untersuchung der PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tiere, die im Rohwert mit  $566,8 \pm 58 \mu\text{m}^2$ , wie in sämtlichen Normierungen mit dem Maus-, Nierengewicht und der Tibiallänge eine signifikant größere Zellfläche aufwiesen ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Bei den heterozygoten Tieren zeigten lediglich 0,5 Jahre alte SP/+ -Tiere einen signifikant kleineren Quotienten aus Zellfläche und Mausgewicht  $7,9 \pm 1,1 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$  als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ). Für homozygote SP/SP-Mäuse waren die gemessenen Zellflächen mit 10 Wochen  $300,5 \pm 36 \mu\text{m}^2$ , mit 0,5 Jahren  $505,4 \pm 77 \mu\text{m}^2$ , mit 1,5 Jahren  $572,4 \pm 55 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$ ). Diese Werte lagen jeweils über denen der altersgleichen Wildtyp-Tiere. Dies galt ebenso nach Normierung der Messwerte auf die Tibiallänge für 0,5 und 1,5 Jahre alte Tiere wie für die Normierung auf das Körper- bzw. Nierengewicht. FL/FL-Mäuse hatten im Alter von 10 Wochen ( $1231 \pm 267 \mu\text{m}^2/\text{g NG}$ ) einen kleineren und im Alter von 0,5 Jahren ( $2212 \pm 437 \mu\text{m}^2/\text{g NG}$ ) einen größeren Quotient der Zellfläche zum Nierengewicht im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

### 3. ERGEBNISSE

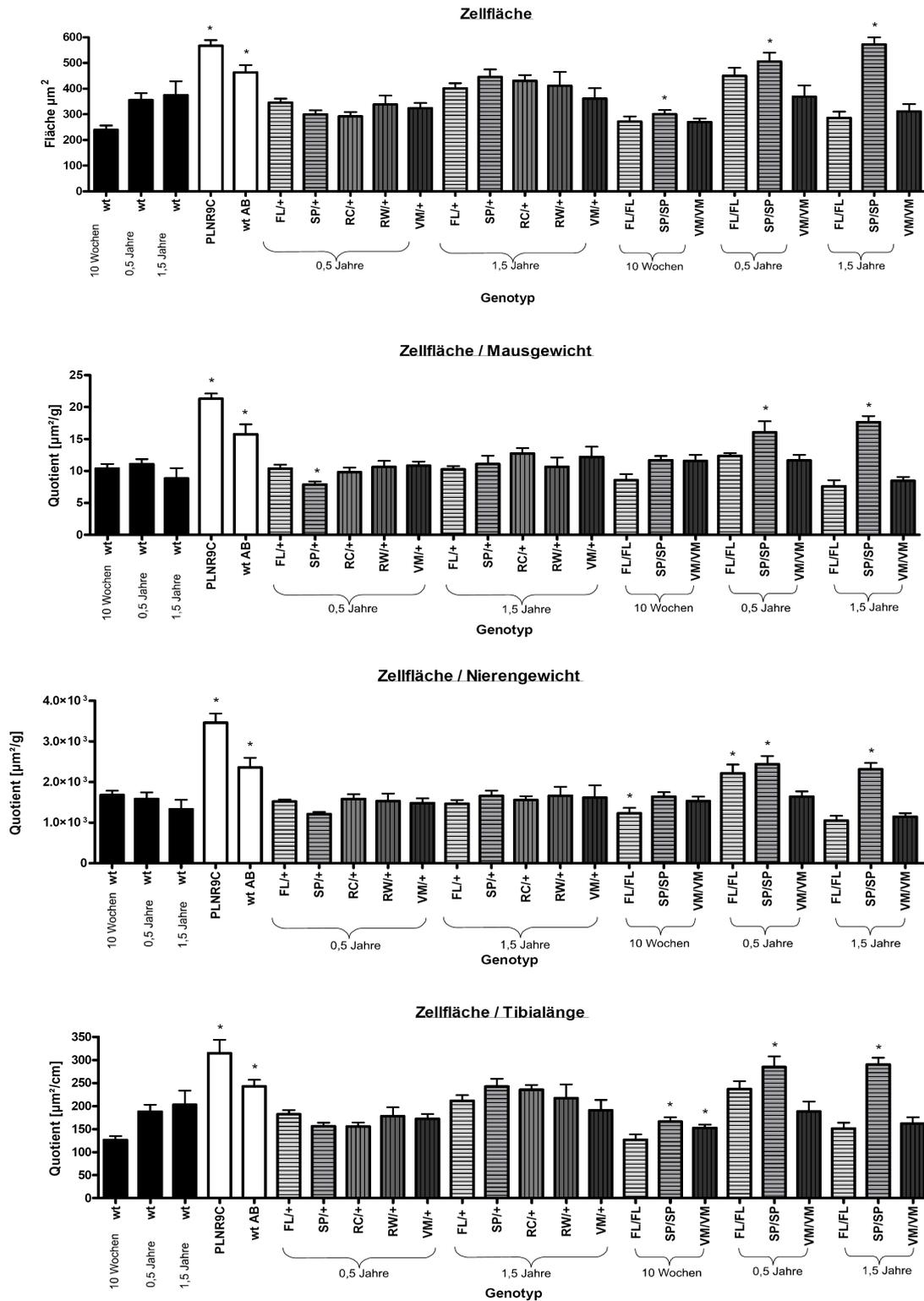


Abb. 28: Zusammenfassung der Messwerte der Zellfläche im Querschnitt und deren Quotienten mit dem Mausgewicht, Nierengewicht bzw. Tibiallänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von circa 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup>) und Wildtyp Mäusen circa 3 Monate nach Stenosierung der Aorta im Alter von circa 20 Wochen, heterozygote Tiere mit einer DCM verursachenden Mutation (FL/+, SP/+) sowie einer HCM verursachenden Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) im Alter von 0,5 und 1,5 Jahren und Tiere mit einer homozygoten DCM verursachenden Mutation DCM (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM verursachender Mutation (VM/VM) im Alter von 10 Wochen, 0,5 und 1,5 Jahren (n=5-17, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

Bei VM/VM-Tieren war der Quotient aus Messwert und Tibiallänge der 10 Wochen alten Tiere signifikant kleiner ( $153 \pm 17 \mu\text{m}^2/\text{cm TL}$ ) als in altersgleichen Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4. Ergebnisse der Myozytenisolierung

Die Technik der Myozytenisolierung wurde im Abschnitt Material und Methoden (2.4.) beschrieben. Die Temperatur und Durchflussrate der Kollagenaselösung während der Myokardperfusion wurde in Testreihen optimiert. Weiterhin wurde die Enzymcharge und Enzymmenge sowie deren optimale Perfusionszeit variiert mit dem Ziel, die Qualität der Myozytenisolierung zu erhöhen und möglichst viele vitale Myozyten zu erhalten. Die Untersuchungen der Kontrollgruppe (PLN<sup>R9C</sup>-transgener Tiere und Tiere 3 Monate nach Stenosierung der Aorta) wurden im Alter von circa 20 Wochen durchgeführt und die Wildtyp-Tiere sowie die heterozygoten und homozygoten Tiere im Alter von 1,0 Jahren untersucht.

##### 3.4.1. Myozytenfläche

Herzen ein Jahr alter Wildtyp-Mäuse hatten eine Myozytenfläche von  $290 \pm 91 \mu\text{m}^2$ .

Die Normierung der Myozytenfläche der circa 20 Wochen alten PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tiere auf das Körpergewicht betrug  $13,8 \pm 1,55 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$  und zu dem Nierengewicht  $2116 \pm 273 \mu\text{m}^2/\text{g NG}$ . Diese Werte waren signifikant größer als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,001$ ). Nach operativer Induktion einer Aortenstenose bei 8 Wochen alten Wildtyp Mäusen war nach 3 Monaten die Myozytenfläche bezogen auf das Körpergewicht mit  $10,5 \pm 1,55 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$  signifikant größer als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,001$ ).

Von den heterozygoten Gruppen zeigten FL/+-Mäuse bei Normierung auf das Mausgewicht mit  $10,8 \pm 1,4 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$  bzw. der Tibiallänge mit  $190 \pm 22,6 \mu\text{m}^2/\text{cm TL}$  eine größere Myozytenfläche als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$ ).

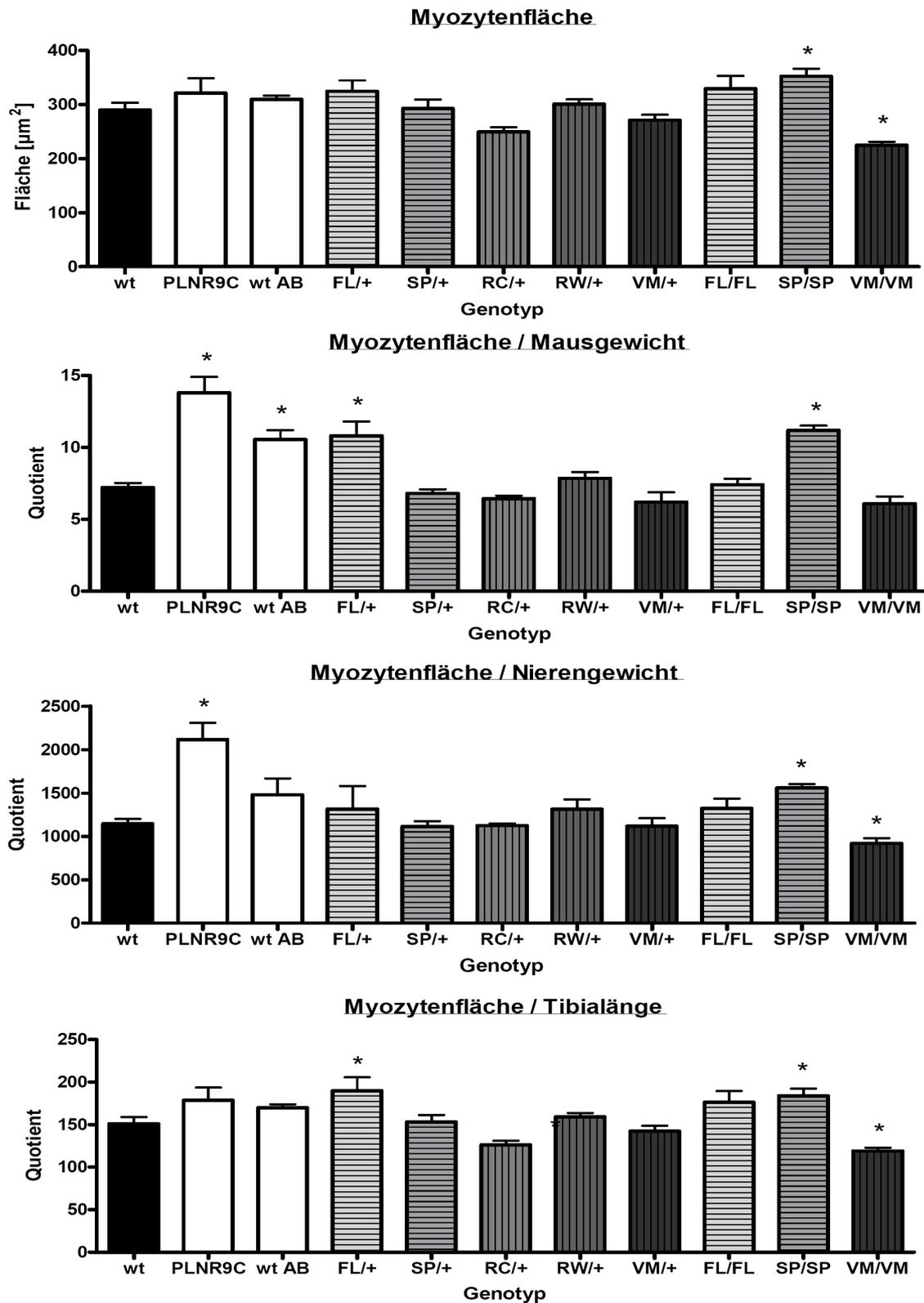


Abb. 29: Fläche isolierter Myozyten in  $\mu\text{m}^2$  und Normierung der Rohwerte mit dem Maus-, Nierengewicht und Tibiallänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von einem Jahr, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere und Wildtyp Tiere nach operativer Aortenstenosierung im Alter) von etwa 20 Wochen, Tiere mit heterozygoter DCM-Mutation verursachender DCM (FL/+, SP/+) bzw. HCM verursachender Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) sowie Tieren mit einer homozygoter DCM-Mutation (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM-Mutation (VM/VM) (n=4-12, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

RC/+ -Tiere zeigten dagegen einen gegenüber Wildtyp-Tieren verringerten Quotienten aus Myozytenfläche und Tibiallänge  $126 \pm 9,7 \mu\text{m}^2/\text{cm TL}$  ( $p < 0,05$ ). Die Myozytenfläche homozygoter SP/SP-Tiere war im Rohwert mit  $353 \pm 112 \mu\text{m}^2$  und in allen normierten Werten signifikant größer als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Bei VM/VM-Tieren dagegen war die Myozytenfläche als Rohwert mit  $225 \pm 67 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,001$ ) und nach Normierung auf das Nierengewicht ( $919 \pm 152 \mu\text{m}^2/\text{g NG}$ ) bzw. die Tibiallänge ( $119 \pm 9 \mu\text{m}^2/\text{cm TL}$ ) kleiner als bei Wildtyp-Tieren ( $p < 0,05$ ). Für den homozygoten Genotyp der FL/FL-Tiere waren keine Unterschiede zum Wildtyp nachweisbar.

#### 3.4.2. Myozytenbreite

Die Myozytenbreite betrug bei den Tieren des Wildtyps circa  $7,8 \pm 2 \mu\text{m}$ .

PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere zeigten nach Normierung auf das Maus- ( $0,38 \pm 0,03 \mu\text{m/g KG}$ ) bzw. Nierengewicht ( $58,5 \pm 5,5 \mu\text{m/g NG}$ ) bzw. die Tibiallänge ( $4,9 \pm 0,4 \mu\text{m/cm TL}$ ) signifikant breitere Myozyten als Wildtyp-Tiere ( $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ ). Die Tiere mit operativ induzierter Aortenstenose und konsekutiv chronischer Druckbelastung des linken Ventrikels zeigten bei Normierung auf das Körpergewicht mit  $0,28 \pm 0,037 \mu\text{m/g KG}$  verbreiterte Myozyten gegenüber Wildtyp-Tieren ( $p < 0,001$ ).

Bei den heterozygoten Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Myozytenbreite im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Signifikant breiter als Wildtyp-Zellen ( $p < 0,05$ ) waren lediglich FL/+ -Myozyten nach Normierung auf das Körpergewicht ( $0,26 \pm 0,024 \mu\text{m/g KG}$ ;  $p < 0,05$ ) und RC/+ -Myozyten nach Normierung auf das Nierengewicht ( $35 \pm 2,7 \mu\text{m/g NG}$ ;  $p < 0,05$ ).

Unter den homozygoten Tieren zeigten SP/SP-Mäuse nach Normierung auf das Maus- ( $0,26 \pm 0,01 \mu\text{m/g KG}$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. Nierengewicht ( $36,8 \pm 2,5 \mu\text{m/g NG}$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Wildtyp verbreiterte Myozyten. VM/VM-Tiere wiesen signifikant schmalere Myozyten auf als der Wildtypen im Rohwert ( $6,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ) und nach Normierung auf das Nierengewicht ( $25,2 \pm 5,8 \mu\text{m/g NG}$ ,  $p < 0,05$ ) bzw. die Tibiallänge ( $3,2 \pm 0,3 \mu\text{m/cm TL}$ ;  $p < 0,05$ ).

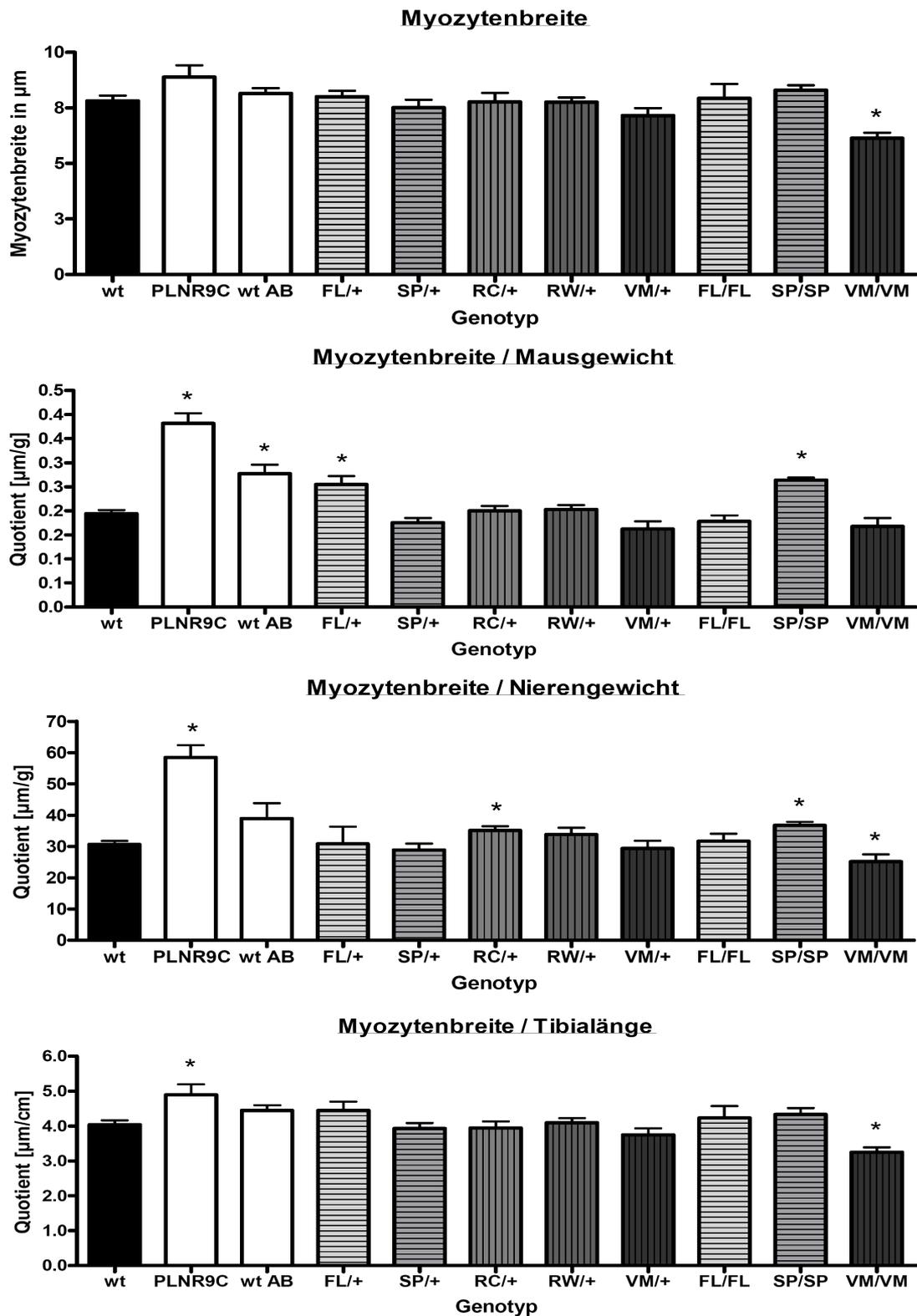


Abb. 30: Breite isolierter Myozyten in  $\mu\text{m}$  und Normierung der Rohwerte mit dem Maus-, Nierengewicht und Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von einem Jahr, Kontrolltiere (PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere und Wildtyp Tiere nach operativer Aortenstenosierung im Alter) von etwa 20 Wochen, Tiere mit heterozygoter DCM-Mutation verursachender DCM (FL/+, SP/+) bzw. HCM verursachender Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) sowie Tieren mit einer homozygoter DCM-Mutation (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM-Mutation (VM/VM) (n=4-12, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

#### 3.4.3. Myozytenlänge

Der Mittelwert der Myozytenlänge für Wildtyp-Tiere betrug  $41,1 \mu\text{m}$  ( $\pm 7,8 \mu\text{m}$ ). Die  $\text{PLN}^{\text{R9C}}$ -transgenen Tiere wiesen mit  $1,7 \pm 0,04 \mu\text{m/g KG}$  und die Gruppe mit einer künstlichen induzierten Aortenstenose mit  $1,4 \pm 0,1 \mu\text{m/g KG}$  einen signifikant größeren Quotienten bei der Normierung mit dem Mausgewicht auf ( $p < 0,001$ ). Weiterhin hatten die  $\text{PLN}^{\text{R9C}}$ -transgenen Tiere signifikant größere Werte  $255 \pm 1,2 \mu\text{m/g NG}$  bei der Normierung mit dem Nierengewicht ( $p < 0,001$ ).

Bei den heterozygoten Tieren war der Rohwert der RC/+ Zellen mit  $34,5 \pm 6,9 \mu\text{m}$  signifikant kleiner ( $p < 0,05$ ) als von Wildtyp-Myozyten. Das gleiche galt nach Normierung des Rohwertes auf das Mausgewicht ( $0,9 \pm 0,15 \mu\text{m/g KG}$ ;  $p < 0,05$ ) bzw. die Tibialänge ( $17,5 \pm 1,6 \mu\text{m/cm TL}$ ;  $p < 0,001$ ). FL/+ Myozyten waren dagegen nach der Normierung der Werte auf das Mausgewicht ( $1,4 \pm 0,08 \mu\text{m/g KG}$ ) bzw. der Tibialänge ( $25,2 \pm 1,1 \mu\text{m/cm TL}$ ) signifikant länger als Wildtyp-Zellen ( $p < 0,001$ ).

Die homozygoten SP/SP-Mutation waren mit  $47,5 \pm 9,1 \mu\text{m}$  ( $p < 0,001$ ) und FL/FL mit  $46,3 \pm 11 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ) länger als Wildtyp-Myozyten. Für FL/FL-Zellen galt dies ebenso auf die Tibialänge normierten Werte  $24,8 \pm 1,9 \mu\text{m/cm TL}$  ( $p < 0,05$ ) und für SP/SP-Zellen zusätzlich nach Normierung auf das Körpergewicht ( $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m/g KG}$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. das Nierengewicht ( $210 \pm 9,4 \mu\text{m/g NG}$ ;  $p < 0,001$ ) und die Tibialänge ( $25 \pm 1,1 \mu\text{m/cm TL}$ ;  $p < 0,05$ ). Die homozygoten VM/VM-Tiere waren weder in den Rohwerten noch den normierten Werten unterschiedlich zum Wildtyp.

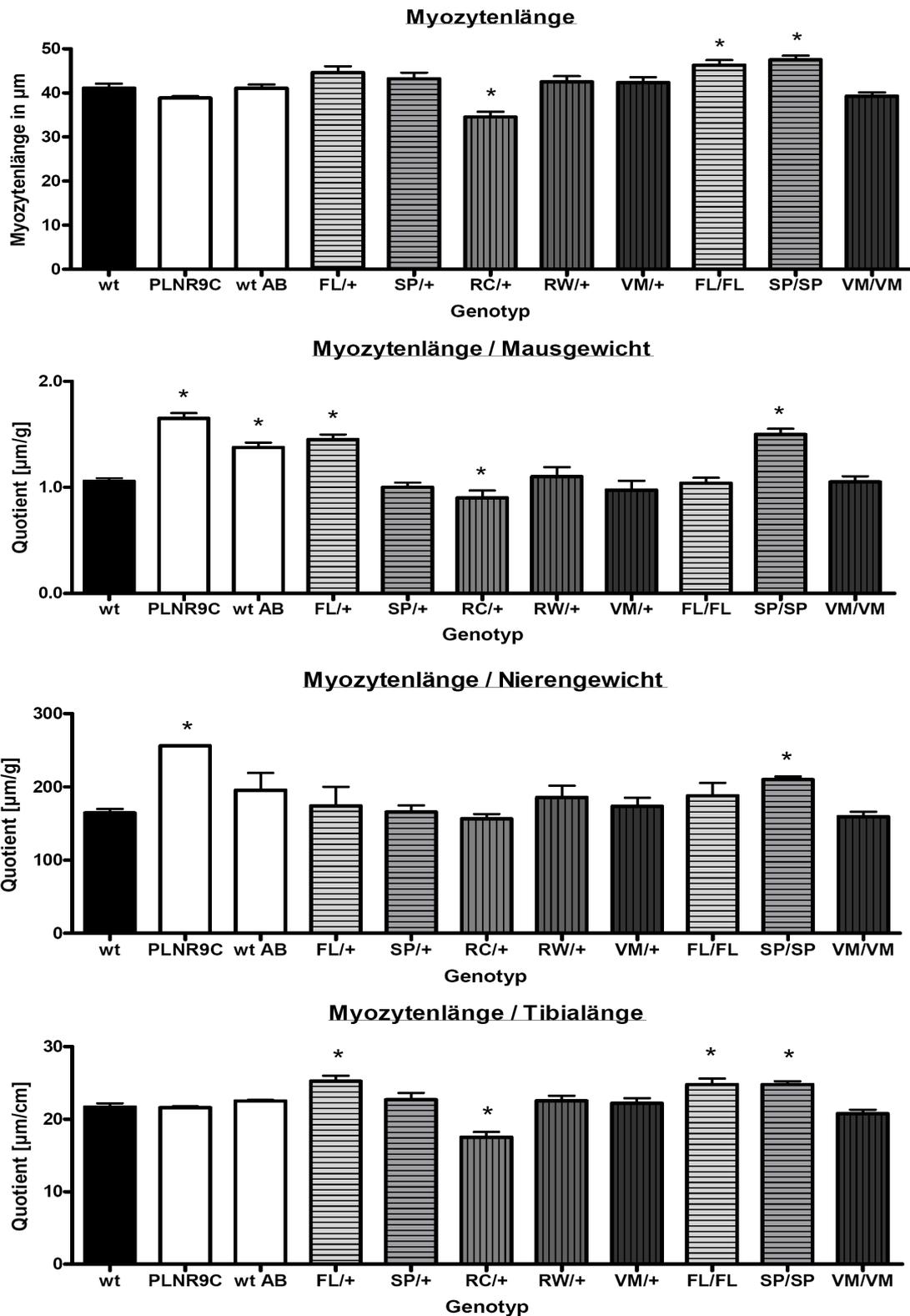


Abb. 31: Länge isolierter Myozyten in  $\mu\text{m}$  und Normierung der Rohwerte mit dem Maus-, Nierengewicht und Tibialänge. Gezeigt sind die Messwerte für Wildtyp-Tiere im Alter von einem Jahr, Kontrolltiere (PLN<sup>RC</sup>-transgene Tiere und Wildtyp Tiere nach operativer Aortenstenosierung im Alter) von etwa 20 Wochen, Tiere mit heterozygoter DCM-Mutation verursachender DCM (FL/+, SP/+) bzw. HCM verursachender Mutation (RC/+, RW/+, VM/+) sowie Tieren mit einer homozygoter DCM-Mutation (FL/FL, SP/SP) bzw. HCM-Mutation (VM/VM) (n=4-12, t-Test gegen Wildtyp \* p<0,05)

### 4. Diskussion

#### 4.1. Aufgabenstellung

Mutationen in den schweren Ketten des kardialen Myosins stellen die häufigste Ursache genetisch verursachter Kardiomyopathien dar. Es sind bereits weit über einhundert verschiedene Gendefekte bekannt. Dabei handelt es bei allen um Punktmutationen, die überwiegend im Myosinkopf lokalisiert sind und in einem autosomal dominanten Erbgang an die nachfolgenden Generationen vererbt werden. Die resultierenden strukturellen Veränderungen des Herzens können vielschichtig sein. Es werden hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien unterschieden, die in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad des Phänotyps, der Komplikationshäufigkeit und der mittleren Lebenserwartung betroffener Familienmitglieder benignen und malignen Verlaufsformen zugeordnet werden.

Die Ursachen für die unterschiedlichen Krankheitsverläufe durch Punktmutationen in ein und demselben Protein sind weitgehend unklar. Da die krankheitsverursachenden Mutationen über den gesamten Myosinkopf verstreut sind und inner- wie außerhalb funktionell wichtiger Proteindomänen lokalisiert sind, erscheint es nicht möglich, anhand der Lokalisation der Mutation die Folgen für die Kontraktilität oder gar den resultierenden Phänotyp vorherzusagen (Morimoto et al., 2008). Eine wichtige Rolle bei der Initiierung der unterschiedlichen Umbauprozesse im Herzen scheint dagegen der Frage zuzukommen, wie die jeweilige Mutation die mechanischen Funktionen des Myosinkopfes beeinflusst. Während HCM verursachende Myosin-Mutationen die Kontraktilität der Sarkomere eher erhöhen (Tyska et al., 2000), zeigten sich in Untersuchungen an isolierten Myosinmolekülen aus Herzen mit DCM-Mutationen verlangsamte Aktin-Myosin-Translokationen und reduzierte ATPase-Aktivitäten des Myosinkopfes (Schmitt et al., 2006; Debold et al., 2007). Es wurde daher vermutet, dass sich aus den funktionellen Konsequenzen verschiedener Myosin-Mutationen der jeweilige strukturelle Phänotyp des Herzens (Hypertrophie oder Dilatation) vorhersagen lassen kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten fünf Punktmutationen stehen stellvertretend für die phänotypische Vielfalt humaner Myosinvarianten. Die strukturellen Veränderungen, die im erwachsenen Organismus allmählich zur Ausprägung kommen, wurden anhand von *knockin*-Mausmodellen für diese fünf Mutationen vergleichend untersucht. Die longitudinalen Analysen sollten insbesondere klären, welche Messparameter sich am ehesten eignen, mit hoher Sensitivität und Spezifität möglichst frühzeitig eine hypertrophe bzw. dilatative Entwicklung des Herzens zu erkennen.

Neben der Bestimmung des Herzgewichts wurden an Querschnitten der Mäuseherzen die Fläche des gesamten Herzens und des linken Ventrikels, das linksventrikuläre Lumen sowie die Fläche und Stärke der Herzwände vermessen. Auf zellulärer Ebene wurden ferner die Querschnittsfläche der Myozyten ermittelt und an isolierten Myozyten Länge, Breite und Fläche der Zellen analysiert. Da diese Parameter mit der Größe der Tiere korrelieren, wurde zur Standardisierung für alle Werte der Quotient mit dem Körpergewicht, dem Nierengewicht bzw. der Tibialänge gebildet. Als Vergleichsgruppe wurden gleichaltrige, gleichgeschlechtliche Wildtyp-Tiere im gleichen genetischen Hintergrund (Inzucht Stamm 129/SvEv) verwendet. Alle Werte wurden zudem parallel in Kontrolltieren für kardiale Hypertrophie bzw. Dilatation erhoben. Als Referenz für Hypertrophie dienten Wildtyp-Mäuse mindestens drei Monate nach operativer Aortenstenosierung und konsekutiv chronischer Druckbelastung des linken Ventrikels. Ein etabliertes Modell für kardiale Dilatation sind Mäuse mit einer R9C-Punktmutation im Phospholamban, einem Regulatorprotein des myozytären Kalziumtransports. Diese Tiere versterben im Alter von etwa 20 Wochen an terminaler Herzinsuffizienz auf dem Boden einer progredienten dilatativen Kardiomyopathie (Schmitt et al., 2003).

Alle Untersuchungen wurden zum Ausschluss subjektiver Einflüsse geblindet durchgeführt. Die Genotypen wurden dem Untersucher erst nach Abschluss der strukturellen Analysen und Messungen mitgeteilt. Da zwischen den verschiedenen Gruppen, insbesondere in Jungtieren, allenfalls geringe strukturelle Unterschiede zu erwarten waren, wurde auf eine präzise und

standardisierte Ausführung aller Untersuchungsabläufe geachtet und in jeder Gruppe wurden mindestens fünf Tiere analysiert.

### 4.2.1. Phänotypisierung des Wildtyps

Das Körpergewicht erwachsener Mäuse steigt zwischen einem Lebensalter von 8 Wochen und 1,5 Jahren um circa 40 %. Ebenso nahmen Herz- und Nierengewicht um circa 40-50 % zu und dieses bei einer nahezu gleichbleibenden Länge der Tibia. Das Größenwachstum des Herzens war mit zunehmendem Alter im Vergleich zur Gewichtszunahme des Herzens geringer ausgeprägt. Die Herzfläche der Tiere im medianen Querschnitt vergrößerte sich im Untersuchungszeitraum um nur 25 %. Sieht man die Messwerte im Verhältnis zum Herz- bzw. Nierengewicht reduziert sich dieser Quotient um circa 15 %. Die gesamte linksventrikuläre Fläche und die Fläche des Herzquerschnitts vergrößerten sich ebenso im untersuchten Zeitraum um circa 25 %. Eine verhältnismäßig stärkere Zunahme fand sich beim linksventrikulären Lumen, welches sich im Vergleich der 8 Wochen und 1,5 Jahre alten Mäuse um circa 40 % vergrößerte. Die Herzwandfläche erhöhte sich dazu nur um etwa 25 %. Das interventrikuläre Septum zeigte wie die linksventrikuläre freie Wand nur im ersten halben Lebensjahr eine Stärkenzunahme und blieb danach konstant. Diese Entwicklung korrelierte mit der Zellfläche die im ersten halben Jahr um circa 35 % zunahm. Gemäß der Altersentwicklung der Bezugsparameter stiegen die genannten Parameter nur als Rohwert und bezogen auf die Tibialänge, nicht aber bei Normierung auf das Körpergewicht bzw. Nierengewicht, wo sich der Trend zum Teil sogar umkehrte. Interessanterweise gab es damit bei Wildtyp-Mäusen unter den gemessenen Parametern (Herzfläche, linksventrikuläre Fläche, Lumen etc.) keinen Wert, der bezogen auf das Körper- und Nierengewicht mit zunehmendem Alter anstieg. Vielmehr blieben die Messwerte bei Normierung auf das Körper- oder Nierengewicht für Wildtyp-Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum unverändert oder zeigten sogar eine leichte Abnahme.

### 4.2.2. Phänotypisierung der Mäuse mit dem PLN<sup>R9C</sup>-Transgen

Als Modell-Organismen für linksventrikuläre Dilatation waren 20 Wochen alte PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere untersucht worden. Sie zeigten gegenüber dem Wildtyp ein deutlich kleineres Maus- bzw. Nierengewicht, was am ehesten auf die unterschiedlichen genetischen Stämme dieser beiden Linien zurückzuführen ist. Während PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere FVB Mäuse waren, war der genetische Hintergrund aller anderen in dieser Arbeit verwendeten Mäuse 129/SvEv. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass PLN<sup>R9C</sup>-transgene Mäuse zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits herzinsuffizient waren und das niedrige Körpergewicht sich als Folge einer kardialen Kachexie der Tiere entwickelt hat. Das Herzgewicht war nahezu unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Die Herzfläche und die gesamte linksventrikuläre Fläche waren deutlich kleiner als beim Wildtyp. Demgegenüber zeigte das linksventrikuläre Lumen eine geringfügige Vergrößerung. Da die aus den Messwerten errechnete Herzwandfläche kleiner als beim Wildtyp war, scheint die Dilatation des PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Ventrikels mit einer Abnahme der Wandfläche einherzugehen. Dies könnte auf eine fortschreitende Dekompensation durch eine mutationsbedingte Funktionseinschränkung der Myozyten hinweisen oder auf der Basis eines zunehmenden Zelluntergangs bzw. Apoptose beruhen. Die Dilatation entwickelt sich bei diesen Tieren also ohne hypertrophe Komponente, was das gegenüber Wildtypen nahezu unveränderte Herzgewicht trotz Dilatation erklärt. Die relativ geringe Dilatation des linken Ventrikels beruht am ehesten darauf, dass PLN<sup>R9C</sup>-transgene Tiere erst im Lauf ihrer letzten Lebenswochen bei rasch progredienter Herzinsuffizienz eine massive Erweiterung ihrer Herzkammern entwickeln. Sie scheint somit am ehesten im kardialen Phänotyp begründet oder Folge des etwas geringeren Untersuchungsalters als die Wildtyp-Vergleichstiere zu sein.

In den Studien zur Größenentwicklung der Ventrikelmyozyten im Querschnitt der freien linken Ventrikelwand (Messung mit WGA-Färbung) war eine Vergrößerung der Zellfläche nachweisbar. Dies spiegelt sich jedoch nicht in einer Hypertrophie des ventrikulären Myokards etwa im Sinne einer

Septumverdickung wieder. Auch das Herzgewicht war nicht höher als in Wildtyp-Tieren. Es ist somit am ehesten anzunehmen, dass sich die Anzahl an Myozyten reduziert, beispielsweise aufgrund eines vermehrten apoptotischen Zelltodes im Rahmen der DCM.

An isolierten Myozyten bestätigte sich die Vergrößerung der Zellen PLN<sup>R9C</sup>-transgener Tiere. Bei Normierung der Werte auf das Körper- bzw. Nierengewicht nahm die Zellfläche gegenüber Wildtyp-Tieren auf fast das Doppelte zu. Die Myozyten waren dabei sowohl deutlich breiter und länger als entsprechende Wildtyp-Zellen. Folglich kann von einer kompletten Hypertrophie der Myozyten ausgegangen werden, die sich nicht nur in einer Richtung, d.h. in Länge oder Breite, bewegt sondern die Zellen in alle Richtungen wachsen (hypertrophieren) lässt. Insgesamt stellte sich die myozytäre Hypertrophie als markantester Marker PLN<sup>R9C</sup>-transgener Tiere heraus, die jedoch phänotypische eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln.

#### 4.2.3. Phänotypisierung der Mäuse mit operativer Aortenstenosierung

Mäuse 12 Wochen nach Stenosierung der transversen Aorta im Alter von 8 Wochen dienten als Referenz für Hypertrophie des Herzens. Sie zeigten keinen Unterschied im Mausgewicht verglichen mit nicht-operierten Wildtyp-Tieren. Dies weist darauf hin, dass die Tiere die linksventrikuläre Druckbelastung gut kompensierten und keine Herzinsuffizienz mit konsekutiver Gewichtsabnahme im Sinn einer kardialen Kachexie entwickelten. Zwischen dem zweiten postoperativen Tag und der Untersuchung verstarben keine Mäuse. Das Herzgewicht der operierten Tiere war etwa 50 % höher als das nicht-operierter Tiere. Erwähnung sollte in dem Zusammenhang die Tatsache finden, dass die Gruppe mit dem Wildtyp im mittleren Alter (0,5 Jahre) verglichen wurde, diese jedoch ein wenig älter war als die untersuchte Gruppe der Tiere mit Aortenstenosierung (20 Wochen). Somit werden die Zunahme des Herzgewichts und die Veränderungen der untersuchten morphometrischen Parameter in diesem Vergleich sogar noch unterschätzt.

Erstaunlicherweise waren die Messwerte für die gesamte Herzfläche nicht

erhöht. Nur bei Normierung auf das Nierengewicht war eine Vergrößerung der linksventrikulären Fläche angedeutet. Auffällig war dagegen ein vergrößertes linksventrikuläres Lumen. Die Herzwandfläche war ebenfalls vergrößert. Die Stärke des Ventrikelseptums und die der freien Herzwand waren nicht unterschiedlich. Es ist aufgrund der konstanten Gesamtfläche des Herzens im Querschnitt zu vermuten, dass die Vergrößerung des linksventrikulären Lumens und der Fläche der Herzwände mit dem diskreten Hinweis der Vergrößerung des gesamten linken Ventrikels auf Kosten des rechten Ventrikels geht, aufgrund einer kardialen Hypertrophie mit leicht dilatativer Komponente. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich das Herz in der Längsachse vergrößert, da sich die Zellen in der Breite und Länge vergrößerten. Dieser Parameter war jedoch nicht Bestandteil der Untersuchungen.

Weiterhin zeigten Mäuse 12 Wochen nach Aortenstenosierung eine deutliche Vergrößerung der myozytären Zellfläche sowohl im quergeschnittenen linken Ventrikel, als auch an isolierten Myozyten. Auch nach der Normierung der Myozytenbreite fiel eine signifikante Vergrößerung gegenüber dem Wildtyp auf. Die Myozytenlänge war ebenfalls deutlich größer als beim Wildtyp. Dies lässt auf eine Hypertrophie der Zellen schließen, um die durch Aortenstenosierung bedingte Druckerhöhung zu kompensieren.

Die zelluläre Hypertrophie war von einer mäßigen Dilatation des linken Ventrikels begleitet. Im Gegensatz zu den PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Mäusen stieg das Herzgewicht nach Aortenbanding deutlich an, was darauf schließen lässt, dass die linksventrikuläre Druckbelastung zu einem geringen oder keinem Zellverlust im Herzen führte. Auf zellulärer Ebene waren Myozyten mit DCM verursachender PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Mutation von Zellen aus chronisch druckbelasteten Herzen nicht zu unterscheiden. In beiden Fällen vergrößerten sich sowohl die Länge als auch die Breite der Zellen. So ist daraus zu schließen, dass eine Morphometrie der Myozyten, beispielsweise nach einer myokardialen Biopsie, nur mit einer geringen Sensitivität einhergeht, um Herzen mit einer DCM von einer HCM auf zellulärer Ebene zu unterscheiden und nur ein weiterer Baustein in der Diagnosefindung sein kann. Die Dilatation der Herzen bei fehlender Zunahme der Herzwandstärke lässt ferner vermuten, dass

sich die Herzen 12 Wochen nach Induktion einer linksventrikulären Druckbelastung bereits in einem Übergangsstadium zwischen kompensierter linksventrikulärer Hypertrophie und beginnender Dekompensation mit Dilatation und Herzinsuffizienz befinden. Diese Entwicklung würde dem in der Literatur beschriebenen Langzeitverlauf nach operativer Aortenstenosierung entsprechen. (Molkentin et al., 2000). In diesem Fall wäre ein früherer Untersuchungszeitpunkt nach der Operation zur Generierung einer Referenzgruppe für reine Hypertrophie geeigneter gewesen.

#### 4.2.4. Phänotypisierung heterozygoter FL/+ und SP/+ Mäuse

Die zusammenhängende Betrachtung zeigt für den Genotyp FL/+ erst an 26 Wochen alten Tieren ein signifikant erhöhtes Herzgewicht. Dies ist unter den untersuchten Parametern der früheste und erste Hinweis auf eine pathologische Veränderung. Weiter war eine mäßige Dilatation vorhanden, die jedoch nur die linksventrikuläre Fläche betraf ohne Vergrößerung der Herzfläche. Dies lässt auf eine Vergrößerung des ventrikulären Lumens schließen, welches hier jedoch trotz deutlich erhöhter Werte wegen großer interindividueller Schwankungen der Messwerte nicht signifikant gewesen war. Für einen dilatativen Phänotyp spricht weiterhin, dass sich die Septumstärke und Herzwandstärke nicht veränderten. Die Dilatation war kombiniert mit einer Vergrößerung der Herzwandfläche, welche ebenso erst in einem höheren Alter auftrat. Wie die Ergebnisse der Myozytenisolierung anhand einer Vergrößerung der Myozytenflächen zeigten, scheint die Herzwandvergrößerung durch eine Hypertrophie der Zellen mit verursacht zu sein. Die Myozyten waren sowohl in der Breite als auch der Länge vergrößert. Da bei homozygoten Tieren mit einer DCM Mutation ebenso eine deutliche Vergrößerung der Herzwandfläche vorhanden war, könnte dies für dilatative Phänotypen pathognomonisch sein. Die morphologischen Veränderungen anhand des Genotyps FL/+ waren im heterozygoten Herzen deutlich schwächer ausgeprägt. Dies zeigte sich sowohl in einer schwächeren Ausprägung als auch an einem späteren Auftreten des

Phänotyps. Jedoch ist auch hier eine Zellhypertrophie bei dilatativen Phänotyp auffällig.

Bei dem Genotyp SP/+ war das Herzgewicht im Alter von 1,5 Jahren signifikant erhöht. Morphologisch waren die phänotypischen Veränderungen sehr diskret. Nur eine geringfügige Abnahme der Herzfläche und der linksventrikulären Fläche sowie ein verkleinertes linksventrikuläres Lumen waren im Alter von 0,5 Jahren feststellbar. Da extrinsische Faktoren durch standardisierte und hygienisch einwandfreie Zucht und Haltung der Mäuse unter SPF-Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden können, ist die schwache phänotypische Ausprägung am ehesten durch die Heterozygotie der SP-Mutation verursacht. Da auch die Stärke des Ventrikelseptums und der freien Herzwand bei alten Tieren erhöht war, scheinen SP/+-Tiere eine hypertrophe Komponente in ihrem Phänotyp aufzuweisen. Mikroskopische Betrachtungen zeigten nur in der Altersstufe von 0,5 Jahren Hinweise für eine Abnahme der Zellgröße, die aber in den Messungen an isolierten Myozyten nicht verifizierbar waren. Der Phänotyp heterozygoter Tiere mit SP/+-Mutation scheint damit sehr schwach ausgeprägt zu sein und eher Hinweis auf eine konzentrische Hypertrophie als auf eine Dilatation zu geben. Auch die schwache phänotypische Ausprägung des Herzens spiegelt sich in der nahezu unveränderten Zellgröße wider.

Der Genotyp FL/+ führt somit zu deutlich ausgeprägteren Veränderungen der Zellstruktur und des gesamten Phänotyps im Sinne einer DCM als der Genotyp SP/+.

#### 4.2.5. Phänotypisierung homozygoter FL/FL- und SP/SP-Mäuse

Homozygote FL/FL-Mäuse waren im Alter von 0,5 Jahren signifikant schwerer als altersgleiche Wildtypen. Anders als bei heterozygoten Tieren war in allen Altersstufen das Herzgewicht erhöht. Dies konnte in sämtlichen Normierungen bestätigt werden. Über alle Altersstufen waren ferner die Herzfläche, die linksventrikuläre Fläche und das ventrikuläre Lumen vergrößert. Die

Herzwandfläche zeigte dagegen keinen Unterschied zum Wildtyp und die Septumstärke war bei jüngeren Tieren etwas kleiner als beim Wildtyp. FL/FL-Mäuse scheinen also eine früh einsetzende reine Dilatation ohne hypertrophe Komponente zu entwickeln. Überraschenderweise war die an Herzquerschnitten ausgemessene Zellgröße der Tiere in der jungen und mittleren Altersstufe kleiner als bei Wildtypen. Bei isolierten Myozyten war die Myozytenfläche jedoch leicht erhöht. Die Myozyten waren zwar nicht breiter, aber signifikant länger als die der Wildtypen. Die fehlende Verbreiterung erklärt zugleich die unveränderte Zellfläche quergeschnittener Myozyten in der WGA-Färbung. So ist zu vermuten, dass das Zellwachstum primär in der Längsachse stattfindet, so dass die Zellen im Querschnitt kleinere Flächen anzeigen, bei einer vergrößerten Fläche in der Längsachse. So scheint hier die Myozytenisolierung bzw. andere Techniken zur Darstellung der Zellen in der Länge und Breite unentbehrlich zu sein, um die morphologischen Veränderungen auf Zellebene nachzuweisen.

Die Myozytenfläche nimmt nur in der Längsansicht zu, durch eine Verlängerung der Myozyten bei konstantem Querschnitt. So scheint es erklärbar, dass es bei dem Genotyp FL/FL zu einer Dilatation des Ventrikels bei konstanter Herzwandfläche kam, weil sich die Myozyten vorzugsweise verlängerten und nicht verbreiterten. Während sich die zellulären Veränderungen der homozygoten Tiere geringer darstellten als bei FL/+-Mäusen, zeigte die Vermessung der Herzquerschnitte bei FL/FL-Tieren einen ausgeprägteren Phänotyp als bei der heterozygoten Mutante. Das erhöhte Herzgewicht war vermutlich nicht nur der reinen muskulären Masse geschuldet, sondern auch den größeren intraatrialen und intraventrikulären Flüssigkeitseinschlüssen. Jedoch besteht eine Vergleichbarkeit der Messwerte der verschiedenen Mutationen untereinander bei stets gleichem Untersuchungsprotokoll.

Wie bei dem Genotyp FL/FL, war bei dem Genotyp SP/SP das Herzgewicht in allen untersuchten Altersstufen signifikant erhöht. In nahezu allen Altersstufen, ähnlich dem Genotyp FL/FL, war nicht nur eine Vergrößerung der Herzfläche, sondern ebenso der linksventrikulären Herzfläche und des linksventrikulären

Lumens ersichtlich. Dies sind deutliche Hinweise auf eine kardiale Dilatation. Weiterhin war im Vergleich zum Wildtyp eine Vergrößerung der Herzwandfläche ab der Altersstufe von 0,5 Jahren erkennbar. Die Septumstärke sowie die Herzwandstärke waren in den ersten beiden Altersstufen eher kleiner und wiesen im Alter von 1,5 Jahren keinen Unterschied mehr auf. Das erniedrigte Herzgewicht in 1,5 Jahre alten SP/SP-Tieren korrelierte mit einer Abnahme des Körpergewichts, möglicherweise im Rahmen einer beginnenden kardialen Dekompensation. Da bei der Organentnahme keine Pleuraergüsse im Sinne einer Lungenstauung infolge Herzinsuffizienz beobachtet wurden, war kaum mit einer Gewichtszunahme durch generalisierte Ödeme zu rechnen. Die beobachtete Körpergewichtsreduktion könnte viel mehr Folge einer reduzierten Perfusion des Körpers im Sinne einer kardialen Kachexie sein. Da SP/SP-Mäuse eine normale Lebenserwartung (ca. 2 Jahre) haben, kann der Herzinsuffizienz-Phänotyp dieser Tiere jedoch allenfalls schwach ausgeprägt sein.

Im Gegensatz zu heterozygoten SP/+ Mäusen deuten bei SP/SP-Mäusen alle Ergebnisse in der WGA-Färbung und bei der Myozytenisolierung auf eine Vergrößerung der Myozyten in der Breite und Länge sowie der Fläche quer und längs vermessener Zellen hin. Dies spiegelt sich, im Gegensatz zum Genotyp SP/+, auch in der Vergrößerung der Herzwandfläche wider. Insgesamt zeigten SP/SP-Tiere eine deutliche Dilatation des Herzens, während sich in heterozygoten Tieren nahezu kein Phänotyp mit den eingesetzten Mitteln nachweisen ließ.

Obwohl die Genotypen FL/FL und SP/SP beide eine kardiale Dilatation hervorrufen, ist die morphologische Entwicklung des Phänotyps im Detail unterschiedlich. Seine präzise Beurteilung erfordert deshalb die Untersuchung einer Vielzahl von Parametern. Nur so erhält man ein umfassendes Bild der kardialen Veränderungen, das eine phänotypische Einordnung in eine Systematik, DCM bzw. HCM, ermöglicht.

### 4.2.6. Phänotypisierung heterozygoter Mäuse mit den Mutationen RC/+, RW/+ bzw. VM/+

Das Herzgewicht 1,5 Jahre alter heterozygoter RC/+ -Mäuse war signifikant geringer als bei altersgleichen Wildtyp-Mäusen. Bei den Untersuchungen der Herzquerschnitte ergaben sich bei diesen Tieren eine klare Tendenz und in 0,5 Jahre alten Mäusen auch deutlich kleinere Werte bezüglich der Herzfläche und der linksventrikulären Ventrikelfläche. Die relative Gewichtsabnahme dieser Herzen mit zunehmendem Alter ist daher am ehesten auf konzentrische Umbauprozesse des Myokards zurückzuführen. Die Myozytenisolierung zeigte signifikant breitere Myozyten, die in der Länge verkürzt waren. Die gesamte Zellfläche blieb dabei unverändert. Jedoch gab es in der Gruppe der 1,5 Jahre alten Tiere einen Trend, aber keine signifikante Zunahme der Querschnittsfläche im Vergleich zum Wildtyp. Dies ist ein Hinweis dafür, dass sich Veränderungen der Myozytenbreite in isolierten Myozyten wiederholt mit höherer Sensitivität erfassen lassen als in kompletten Herzen - trotz kardioplegischen Herzstillstands in der Diastole. Von allen heterozygoten Tieren, die Myosin-Mutationen für hypertrophe Kardiomyopathie tragen, zeigten RC/+ -Mäuse am eindeutigsten morphologischen Veränderungen, wie sie bei Hypertrophie erwartet worden wären. Diese Veränderungen treten in höherem Alter auf und mit geringer morphologischer Ausprägung.

RW/+ -Tiere zeigten hinsichtlich der gemessenen Größenparameter wenig Veränderungen. Lediglich im Alter von 1,5 Jahren war die Fläche des linksventrikulären Lumens nach Normierung auf das Nierengewicht signifikant kleiner als einziger Hinweis auf die Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie des Herzens. Auch die Untersuchungen zur Größenentwicklung der Kardiomyozyten ergaben keine signifikant unterschiedlichen Messwerte. Möglicherweise steht bei dieser HCM-Mutation die Fibrose des Myokards im Vordergrund, die beim Menschen in fortgeschrittenen Stadien vermutlich zu der charakteristischen Einschränkung der kontraktilen und v.a. der diastolischen Herzfunktion beiträgt und auch in den Mausmodellen zu beobachten war. So

wären hier sensitivere Messmethoden notwendig wie z. B. die Echokardiographie, um kleinere Veränderungen zu detektieren oder weiterführende Untersuchungen wie z. B. histologische Fibrosedarstellungen, um andere morphologische Veränderungen durch diese Mutation zu detektieren. Eine eindeutige Eingliederung in eine Kardiomyopathieform ist allein aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. Jedoch ist festzustellen, dass die morphologischen Veränderungen durch eine heterozygote RW/+ -Mutation – zumindest im Mausmodell - nur mit erhöhtem Aufwand nachweisbar sind. Somit kann diese Mutation klinisch lange unentdeckt bleiben kann.

Bei heterozygoten VM/+-Mäusen bestanden selbst im Alter von 1,5 Jahren keine, mit den eingesetzten Methoden messbare, morphologische Auffälligkeiten. Auch beim Menschen ruft die heterozygote VM/+-Mutation eine im Vergleich zur R453C- und R719W-Mutation benigne Form der HCM mit nahezu normaler Lebenserwartung hervor. Bei VM/+-Mutanten war es noch schwieriger als bei Mäusen mit den Mutationen RW/+ oder RC/+ ohne Kenntnis des Genotyp anhand der gemessenen Parameter ein Diagnose zu stellen. So können diese Erkrankungen auch beim Menschen lange asymptomatisch und unentdeckt bleiben, da trotz möglicher Herzrhythmusstörungen insbesondere im jüngeren Alter kaum makroskopische Veränderungen vorhanden sind, die auf eine ernsthafte Erkrankung hinweisen. Bei Nachweis dieser Mutationen sollte daher allen Familienmitgliedern eine Genotypisierung dringend angeraten werden, um einer möglichen Gefährdung durch eine HCM präventiv begegnen zu können.

##### 4.2.7. Phänotypisierung homozygoter VM/VM-Mäuse

Homozygote VM/VM-Mäuse zeigten bei einem zum Wildtyp äquivalenten Mausgewicht in allen Altersstufen ein niedrigeres Herzgewicht. Die Herzfläche und die gesamte linksventrikuläre Fläche waren in allen untersuchten Altersstufen kleiner. Das linksventrikuläre Lumen war sowohl in 10 Wochen als

auch in 1,5 Jahre alten Tieren signifikant kleiner. Die Herzwandfläche des linken Ventrikels war nur in jungen Tieren kleiner. Die morphologischen Veränderungen in VM/VM-Hezen richten sich offenbar überwiegend nach innen. Möglicherweise ist auch eine reduzierte Relaxationsfähigkeit bei möglicher progredienter kardialer Fibrosierung, wie sie bei HCM häufig zu beobachten ist, an der Reduktion der kardialen Dimensionen beteiligt. Die Septumstärke und die freie Herzwandstärke waren in der Gruppe der 10 Wochen alten Tiere signifikant größer als in Wildtyp-Hezen. Dies war bei älteren Tieren jedoch nicht mehr zu beobachten und ist daher am ehesten auf die eingeschränkte diastolische Relaxation infolge der homozygoten Mutation zurückzuführen oder mutationsbedingt im Rahmen der phänotypischen Entwicklung. Zu überlegen wäre ob dieses Merkmal als früher Marker einer VM/VM-Mutation in Frage kommen würde. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

Während das kleinere linksventrikuläre Lumen und die hohe Wandstärke als charakteristisch für eine konzentrische Hypertrophie im Rahmen einer HCM gewertet werden können, waren die Befunde an VM/VM-Hezen auf Zellebene nicht bei einer HCM zu erwarten. So zeigten Herzquerschnitte junger homozygoter VM/VM-Mäuse überraschenderweise eine kleinere Zellfläche als bei Wildtypen. Die Messergebnisse an isolierten Myozyten in 1 Jahr alten Tieren bestätigten die kleinere Myozytenfläche. Die Myozyten waren dabei signifikant schmaler als beim Wildtyp bei konstanter Myozytenlänge. Eine zelluläre Hypertrophie fand in VM/VM Hezen offenbar nicht statt. Dies erklärt das Fehlen morphologischer Veränderungen auf zellulärer Ebene in Herzquerschnitten mittels WGA-Färbung.

Insgesamt waren die Auswirkungen der homozygoten VM/VM-Mutation jedoch deutlich ausgeprägter als bei heterozygoten Tieren, wo nahezu keine morphologischen Veränderungen bis ins hohe Alter nachweisbar waren. Die geringen anatomischen Veränderungen passen zu den Beobachtungen, dass Mäuse mit VM-Mutation als einzige der untersuchten HCM-Mutation auch im homozygoten Zustand als adulte Tiere lebensfähig sind und die Mutation auch im Menschen einen deutlich benigneren Phänotyp hervorruft.

### 4.3. Vergleich der Methodik für die Morphometrie an isolierten Myozyten und an Herzquerschnitten

Die Myozytenisolierung ist hinsichtlich des methodischen Aufwands deutlich umfangreicher als die Präparation histologischer Schnitte. So ist die HE-Färbung ein Standardverfahren zur optischen Darstellung histologischer Präparate. Sie ist allgemein etabliert, kostengünstig und nach histologischer Aufarbeitung des Gewebes zügig durchführbar. Dagegen muss das Verfahren der Myozytenisolierung aus Mausherzen auch bei Vorliegen eines bewährten Protokolls immer wieder optimiert werden, was durch das Austesten verschiedener Enzymchargen, Verdauzeiten und -temperaturen zeitintensiv ist. Diese Parameter müssen mit jeder neuen Enzymcharge angepasst werden. Nach der Etablierung der Methode ist zudem der Zeitaufwand für die Durchführung deutlich höher als bei der Anlage und Färbung histologischer Schnitte. Die isolierten Myozyten waren sehr sensibel, starben zu etwa der Hälfte bereits während der Präparation und konnten nur innerhalb weniger Stunden (< 2 h) betrachtet, fotografiert und dokumentiert werden, um realistische Messwerte zu gewährleisten. Andernfalls würden Veränderungen in der Struktur der Myozyten auftreten, die eine exakte Vermessung unmöglich machen und zur Verfälschung der Ergebnisse führen würden. Der große technische Aufwand und die Vielzahl der genannten Einflussfaktoren lassen diese Methode als Routineuntersuchung zur Phänotypisierung ungeeignet erscheinen. Ein bedeutender Vorteil gegenüber Herzquerschnitten ist jedoch, dass die einzelnen Myozyten unabhängig vom kardialen Kontraktionszyklus hinsichtlich ihrer Fläche (in der Längsansicht), Länge und Breite vermessen werden können. Sie stellt somit für spezifische Fragestellung eine interessante Alternative dar. Insbesondere ist zu betonen, dass bei einigen DCM und HCM-Mutationen (z.B. Genotyp VM/VM und FL/FL) auf zellulärer Ebene Veränderungen messbar waren, die bei der Vermessung der Herzquerschnitte nicht zutage traten.

Die an Herzquerschnitten eingesetzte WGA-Färbung eignet sich zur

spezifischen Anfärbung zellulärer Membranen. Das Protein *wheat-germ-agglutinin* ist mit einem nahezu frei wählbaren Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt kommerziell erhältlich. Diese Färbemethode ist in den meisten Labors nicht etabliert, aber mit geringem technischem und finanziellem Aufwand durchführbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nur in der Zusammenschau aller hier durchgeführten Experimente zur Beurteilung morphologischer Veränderungen im Herzen eine zuverlässige Phänotypisierung möglich ist. Dies ist vor allem bei den heterozygoten Tieren von Bedeutung, da insbesondere der Phänotyp in Tieren mit VM, RW und SP Mutation nur gering ausgeprägt ist und teilweise nur im zeitlichen Verlauf identifizierbar ist bzw. weitere Testmethoden notwendig gewesen wären um eine Zuordnung zu ermöglichen. Bei homozygoten Tieren war dagegen der Phänotyp vor allem bei Tieren mit DCM-Mutation deutlich ausgeprägt und bereits im Alter von 10 Wochen eindeutig vom Wildtyp abzugrenzen, weshalb in solchen Fällen eine weniger aufwendige Methodik (z.B. an Herzquerschnitten) zur morphologischen Phänotypisierung ausreichend wäre.

### 4.4. Detektion geeigneter Parameter zur Differenzierung hypertropher und dilatativer kardialer Morphologie

#### 4.4.1. Diagnostische und morphologische Grundlagen der HCM und DCM

Zur kardialen Diagnostik am Menschen steht eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Verfügung. Neben EKG, Röntgen-Thorax, Laboruntersuchungen, MRT, CT, Herzkatheteruntersuchung (Rechtsherzkatheter, Koronarangiographie, myokardiale Biopsie) und nuklearmedizinische Untersuchungen ist insbesondere die Echokardiographie zu erwähnen. Zur Diagnostik und Differentialdiagnostik der Kardiomyopathie wird die Echokardiographie als Goldstandard verwendet, da sie nicht invasiv ist und sowohl die Morphologie darstellt als auch eine funktionelle Beurteilung des Herzens erlaubt. Unter anderem sind eine statische und dynamische Volumendiagnostik möglich,

geometrische Bestimmungen, Massenanalysen, Diagnostik von Wandbewegungsstörung und Herzklappenuntersuchungen (Dickstein et al., 2008). Die Echokardiographie, wie auch nahezu alle eingangs erwähnten Methoden sind mit mehr und minder hohem Aufwand auch an der Maus durchführbar. Jedoch liegt in der vorliegenden Arbeit die Präferenz auf einer Beurteilung der Herzmorphologie anhand histologischer Schnitte sowie isolierter Myozyten und zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung stand eine Echokardiographie für Mäuse im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg noch nicht zur Verfügung.

Pathologische Kriterien, die für eine Diagnosestellung einer DCM notwendig sind, sind eine ausgeprägte Dilatation des linken Ventrikels bei normaler Kammerwandstärke, leichte bis mittelgradige interstitielle Fibrose und Myozyten mit Kaliberschwankungen und Hypertrophie ohne *myocyte disarray*. (Böcker W., „Pathologie“, 2001)

Funktionell lassen sich echokardiographisch eine reduzierte Auswurffraktion (beim Menschen weniger als 45 %) und eine reduzierte Verkürzungsfraktion (beim Menschen weniger als 25 %) erfassen.

Für die Diagnosestellung der HCM muss eine Hypertrophie des Myokards nachgewiesen sein. Die Hypertrophie kann das ventrikuläre Septum, z.B. als subvalvulärer Muskelwulst, die Apex nahe Kammermuskulatur und/ oder die freie Wand des linken Ventrikels betreffen. Eine linksventrikuläre Dilatation und/ oder systemische kardiale Erkrankungen sind dabei auszuschließen. Histologisch findet sich eine Texturstörung (*myocyte disarray*) und interstitielle Fibrose. (Böcker W., „Pathologie“, 2001; Maron et al., 2006)

Viele dieser morphologischen Veränderungen waren in den vorliegenden Untersuchungen an knockin-Mäusen für familiäre Formen der HCM und DCM nur bei Tieren mit einem stark ausgeprägten Phänotyp bzw. im fortgeschrittenen Alter detektierbar. Tiere mit milden Veränderungen oder in einem dekompensierten Stadium sind schwer einzuordnen (z.B. DCM bzw. HCM). Hier sind möglicherweise weitere Methoden geeigneter (z.B. Echokardiographie), um möglichst früh die richtige Diagnose zu stellen.

In dieser Arbeit wurden zur anatomischen Differenzierung von HCM und DCM

die mutierten Herzen histologisch aufgearbeitet und die Herzfläche im medianen Querschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln bestimmt. Ferner wurde aus dieser Ebene die Fläche des linken Ventrikels und dessen Lumen gemessen und daraus die Herzwandfläche berechnet. Zudem ist die Septumstärke und freie Herzwandstärke bestimmt worden. Zur weiteren Charakterisierung wurde die Zellfläche im Querschnitt sowie die Breite, Länge und Fläche isolierter Myozyten bestimmt. Die Eignung dieser Parameter zur Differenzierung dilatativer und hypertropher Phänotypen soll nachfolgend einzeln diskutiert werden.

### 4.4.2. Herzgewicht

Das Herzgewicht kann einen ersten wichtigen Hinweis zur Differenzierung zwischen der HCM und DCM geben. Die Herzen homozygoter Tiere mit einer DCM-Mutation (FL/FL und SP/SP) waren nahezu in allen Altersgruppen signifikant schwerer als Wildtyp-Hezen. Nur Herzen mit der homozygoten HCM-Mutation VM/VM waren in jeder Altersstufe leichter als Wildtyp-Hezen. So ergibt sich bei den Tieren mit homozygoten Herzen eine deutliche Diskrepanz zwischen denen mit einer DCM, die schwerer sind und HCM, die signifikant leichter sind. Diese Aussage kann allerdings nicht verallgemeinert werden, da unter den HCM-Mutationen ausschließlich Tiere mit der VM/VM-Mutation über einen längeren Zeitraum lebensfähig blieben und diese Mutation als besonders gutartig einzuordnen ist.

Heterozygote Tiere mit einer DCM-Mutation (FL/+, SP/+) wiesen erst im Alter von 1,5 Jahren ein höheres Herzgewicht auf als Wildtyp-Tiere. Bei Tieren mit heterozygoter HCM-Mutation zeigten die Messwerte eine höhere Streuung und waren tendentiell niedriger als die altersgleicher DCM-Mutanten. Das Herzgewicht hat somit einen prädiktiven Wert nur im homozygoten Genotyp der hier untersuchten Gruppen (VM/VM, FL/FL und SP/SP), während es in heterozygoten Tieren eher ein Spätsymptom darstellt. Bei den Kontrolltieren sind neben den Herzen der PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tieren auch die der Wildtyp-Tiere mit operativ induzierter Aortenstenose deutlich schwerer. Dies kann - wie

unter 4.2.3. beschrieben - auf eine beginnende kardiale Dekompensation zurückzuführen sein. Eine unerwartete vorzeitige Dekompensation kann ebenso die Ergebnisse der Mutationen der Genotypen HCM und DCM beeinflussen und so zu falschen Ergebnissen führen. Weiter ist zu beachten, dass es bei den Messungen zu differenten Flüssigkeitsmengen in den intraatrialen und intraventrikulären Räumen kommen kann, die trotz standardisiertem Untersuchungsprotokoll und hoher Fallzahlen die Messwerte einseitig beeinflussen können.

Zusammenfassend ist anzunehmen das Herzen mit DCM-Mutationen im Mittel schwerer als Wildtypen und als HCM-Herzen sind, letztere im Falle der VM/VM-Mutation sogar mit einer Gewichtsabnahme einhergehen können. Herzen in einem dekompensiertem Zustand sind von dieser Aussage ausgeschlossen.

### 4.4.3. Herzfläche und linke Ventrikelfläche im medianen Herzquerschnitt

Die Zunahme bzw. Abnahme der Messwerte für die Herzfläche und die linksventrikuläre Fläche im medianen Herzquerschnitt verhalten sich weitgehend synchron, so dass die Diskussion dieser Parameter zusammengefasst werden kann. Deutlich ist zu sehen, dass gerade die homozygoten Tiere, die eine DCM entwickeln (FL/FL und SP/SP), deutlich größere Herz- und linksventrikuläre Flächen aufweisen, was dem Charakteristikum der DCM entspricht. Der homozygote Genotyp VM/VM zeigte entsprechend dem zu erwartenden Bild einer konzentrischen Hypertrophie im Rahmen einer HCM eine kleinere Herz- und Ventrikelfläche. Bei den heterozygoten Tieren mit einer DCM war erst im Alter von 1,5 Jahren (FL/+) an Schnitten eine Dilatation zu beobachten. Da der dilatative Herz-Phänotyp dieser Tiere echokardiographisch bereits viel früher und deutlicher objektivierbar wird (Schmitt et al., (2006)), muss davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Kardioplegie bzw. histologischen Aufarbeitung der Herzen kein ideales Abbild der enddiastolischen Situation in vivo geben. Auch das Fehlen signifikanter Veränderungen der Herzfläche und

des linken Ventrikels bei heterozygoten HCM-Herzen durch eine entsprechende Sensitivität der Messmethode lässt diese Parameter zur Differenzierung von HCM und DCM ungeeignet erscheinen. Jedoch waren die Ergebnisse mit den zu erwarteten Veränderungen der HCM bzw. DCM vereinbar, die bei homozygoten Tieren eine deutlichere und frühere Ausprägung fanden als bei heterozygoten Tieren.

### 4.4.4. Linksventrikuläres Lumen im medianen Herzquerschnitt

Entsprechend den o.g. diagnostischen Kriterien zur Differenzierung einer HCM und DCM sind die homozygoten DCM-Herzen (FL/FL und SP/SP) durch deutlich größere Lumina gekennzeichnet. Dies ist schon ab der 10. Lebenswoche nachweisbar. Deutlich sichtbar ist eine Verkleinerung der Herzlumina bei homozygoten Tieren mit dem Genotyp VM/VM, was einem Charakteristikum der HCM entspricht. Bei den heterozygoten Tieren konnten dagegen in nahezu allen Altersstufen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, war das Ventrikellumen in der Kontrollgruppe für HCM-Herzen (Wildtyp-Tiere mit operativer Aortenstenosierung) eher vergrößert als mögliches Zeichen einer kardialen Dekompensation. Bei den PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tieren zeigte sich erwartungsgemäß ebenfalls eine Zunahme des Ventrikellumens. Dieser Parameter scheint zur Identifikation ausgeprägter dilatativer oder hypertropher Phänotypen geeignet zu sein, jedoch nicht für die Beurteilung heterozygoter Tiere mit geringen morphologischen Veränderungen, da diese für die angewandte Technik unter der Nachweisgrenze liegen. Durch die Erfassung der Fläche des linksventrikulären Lumens ergibt sich ergänzend zu den in 4.4.3. erfassten Werten gerade für die DCM-Mutanten jedoch ein deutlich umfassenderes Bild des kardialen Phänotyps und ist so ein wertvoller Parameter.

### 4.4.5. Herzwandfläche im medianen Herzquerschnitt

Die Herzwandfläche des gesamten linken Ventrikels, also die Differenz aus Herzfläche und Lumen, war bei Tieren mit einer homozygoten DCM-Mutation (SP/SP und FL/FL), mit zunehmendem Alter größer als bei altersgleichen Wildtypen. Der Genotyp VM/VM, der eine HCM ausbildet, hatte lediglich im mittleren Alter (0,5 Jahre) eine geringere Herzwandfläche als der Wildtyp. Weiterhin wurde deutlich, dass ebenso heterozygote Tiere mit DCM Mutation (FL/+ und SP/+) eine vergrößerte Herzwandfläche aufweisen, allerdings erst im fortgeschrittenen Alter von 1,5 Jahren. Auffallend war weiterhin, dass in 0,5 Jahre alten Tieren des Genotyps RC/+ die Herzwandfläche kleiner war als in entsprechenden Wildtyp-Hezen. Entsprechend der Form der Kardiomyopathie besitzen die PLN<sup>R9C</sup>-transgenen Tiere eine kleinere Herzwandfläche und die Wildtyp-Tiere mit operativer Aortenstenosierung eine größere Fläche.

Dieser Parameter scheint seinen Wert ähnlich dem linksventrikulären Lumen u.a. bei der Beurteilung von dilatativen Herz-Phänotypen zu haben. Im Gegensatz zum Parameter „linksventrikuläres Lumen“ ist die Herzwandfläche bei alten DCM Mutanten auch in heterozygotem Zustand erhöht. Die erhöhten Messwerte sind dabei auf die Dilatation der Herzen und nicht auf eine Zunahme der Wandstärke zurückzuführen. Zur Beurteilung hypertropher Phänotypen erscheint eine Messung der Herzwandfläche jedoch ungeeignet. Bei HCM-Hezen fand sich im untersuchten Kollektiv keine Veränderung, im Einzelfall sogar eine dezente Verkleinerung, obwohl der Name „Hypertrophe Kardiomyopathie“ vielmehr das Gegenteil vermuten lässt. Das Lumen und die Fläche des linken Ventrikels sowie dessen Herzwandfläche sollten im Zusammenhang betrachtet werden, um ein genaues Bild des Phänotyps zu erhalten.

### 4.4.6. Interventrikuläre Septumstärke und freie Herzwandstärke

Auffällig war, dass 10 Wochen und 0,5 Jahre alte Tieren des Genotyps VM/VM sowohl ein deutlich stärkeres Septum als auch eine höhere freie

Herzwandstärke aufwiesen, die jedoch mit 1,5 Jahren nicht mehr nachweisbar waren. Da diese Befunde nur auf homozygote VM/VM-Hezen zutrafen, jedoch in heterozygoten Tieren mit einer HCM-Hezen weder in der freien Herzwandstärke noch in der Septumstärke nachzuweisen waren, können sie nur als frühzeitiges Diagnosekriterium für VM/VM Hezen gelten bzw. als Marker um zwischen dem heterozygoten und homozygoten Genotyp zu differenzieren. So scheint es erst in höhergradig veränderten Hezen zu einer pathologischen Septumstärke und freien Herzwandstärke zu kommen, so dass in heterozygoten Tieren keine signifikanten Veränderungen der HCM-Hezen vorhanden waren.

In der Gruppe der Tiere mit DCM-Hezen war beim Genotyp FL/FL mit 0,5 Jahren eine verkleinerte Septumstärke vorhanden. Der homozygote Genotyp SP/SP zeigte lediglich eine Verkleinerung der Septumstärke der 10 Wochen alten Tiere. Auffällig war eine Erhöhung der Septumstärke und freien Herzwandstärke bei 1,5 Jahre alten Tieren des heterozygoten Genotyps. Aufgrund dieser Diskrepanz innerhalb der DCM-Tiere sind Messungen der Wandstärke für diese Gruppe nicht aussagefähig. Auch für HCM-Mutanten erwies sich die Messung der Wandstärke an histologischen Hezschnitten in der morphologischen Beschreibung als wenig hilfreich und ließ keine prädiktiven Aussagen zu.

#### 4.4.7. Zellfläche im Querschnitt

Die Beurteilung einzelner Zellen anhand WGA-gefärbter Schnitte ist durch die Färbung und das Vermessen einer Vielzahl von Myozyten mit höherem Aufwand verbunden als die Vermessung ganzer Hezquerschnitte. Unterschiede der Zellfläche ergaben sich lediglich bei homozygoten Tieren, nicht aber bei heterozygoten Mäusen mit HCM- oder DCM-Mutation. Tiere mit einer homozygoten SP/SP-Mutation zeigten in allen Altersstufen eine deutliche Zunahme der Zellfläche. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen der Myozytenisolierung. Der Genotyp FL/FL zeigte nur im Alter von 0,5 Jahren einen Hinweis zu einer vergrößerten Zellfläche. Selbst bei homozygoten Tieren

mit einer HCM-Mutation (VM/VM) war keine Veränderung der Zellgröße nachweisbar. Die Sensitivität dieser Untersuchung erscheint daher gering. Möglich ist, dass die Methode zur diastolischen Kardioplegie suboptimal und/oder die histologischen Methoden für die genauere Zelluntersuchung nicht sensitiv genug waren und nur höhergradig morphologische Veränderungen am Herzen ersichtlich wurden. Die Schneidevorgänge am Mikrotom der in Paraffin eingebetteten Herzen sind vielleicht ebenso mögliche Fehlerquellen. Die Myozytenisolierung bot im Vergleich zu den an histologischen Querschnitten vermessenen Myozytenflächen deutlichere Unterschiede bei der Bestimmung der Zellgröße. Jedoch bleibt zu betonen, dass diese Methode im Vergleich aufwendiger war. Da in beiden Kontrollgruppen, für Hypertrophie (Aortenstenosierung) und Dilatation (PLN<sup>R9C</sup>-Mutation), die Zellfläche deutlich zunahm, bietet sich die Bestimmung der Zellfläche anhand von Herzschnitten auch nicht zur Differenzierung hypertropher und dilatativer Phänotypen an.

#### 4.4.8. Zellfläche (längs) nach Myozytenisolierung

Wie unter 4.3. beschrieben, sind isolierte Myozyten nur mit hohem technischen Aufwand zu charakterisieren. Hier zeigte sich ebenso, dass Tiere mit gering ausgeprägtem Phänotyp bei dieser Methode kaum Veränderungen aufwiesen. Allerdings zeigten nicht nur homozygote DCM-Mutanten vergrößerte Zellen, sondern auch bei Tieren mit heterozygotem Genotyp FL/+ war eine Myozytenvergrößerung nachweisbar. Die Messwerte der Myozytenfläche scheinen also ein sensiblerer Parameter für die Detektion zellulären *remodellings* zu sein als Messungen an histologischen Herzschnitten. Homozygote Tiere mit VM/VM-Mutation zeigten dagegen eine Verkleinerung der Zellfläche. Dies entspricht den Messungen des Herzgewichts und an Schnitten und würde der Lehrmeinung widersprechen, dass HCM-Mutationen grundsätzlich mit einer zellulären Hypertrophie einhergehen müssen. Da beide Kontrollgruppen (PLN<sup>R9C</sup>-transgenen und aortenstenosierte Tiere) Hinweise für eine Zellvergrößerung zeigten, kann allein aufgrund der Zellfläche nicht zwischen hypertrophen und dilatativen Phänotypen unterschieden werden.

### 4.4.9. Myozytenbreite und Myozytenlänge nach Myozytenisolierung

In den Kontrollgruppen zeigte sich, dass die Vergrößerung der Zellfläche bei beiden Formen (HCM sowie DCM) sowohl auf eine Verlängerung als auch eine Verbreiterung der Myozyten zurückzuführen ist. Auch bei Zellen mit dem Genotyp SP/SP beruhte die Vergrößerung sowohl auf einer Verlängerung als auch auf einer Verbreiterung der Myozyten, während bei dem Genotyp FL/FL es bei konstanter Zellbreite nur zu einer leichten Verlängerung der Myozyten kam. Bei dem heterozygoten Genotyp FL/+ beruht die Zellflächenvergrößerung auf einer dezenten Verbreiterung mit vorwiegender Verlängerung der Myozyten. Myozyten des Genotyps RC/+ zeigten eine Verkürzung und eine dezente Zunahme der Breite.

Bei der Myozytenisolierung ist die Differenzierung der Zellveränderung noch genauer möglich. Es wäre interessant an einer größeren Population und mit einem größeren Spektrum an Mutationen zu untersuchen, ob Tiere mit einer DCM-Mutation grundsätzlich stärkere zelluläre Hypertrophie aufweisen als Tiere mit einer HCM-Mutation. Es ist davon auszugehen, dass nur aufgrund der Betrachtung von Zellen nicht auf den Phänotyp geschlossen werden kann, da HCM- wie DCM-Mutationen offenbar ein Größenwachstum der Zellen sowohl in der Breite als auch in der Länge stimulieren. Grundsätzlich scheint aber das Längenwachstum der Zellen bei DCM etwas ausgeprägter zu sein als bei HCM.

### 4.5. Parameter zur frühzeitigen Identifikation myokardialer Hypertrophie und Dilatation

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation morphologischer Messparameter, die eine möglichst frühzeitige Diagnose hypertropher bzw. dilatativer Phänotypen erlauben. Auf diese Weise kann der Zeitraum eingegrenzt werden, in den für die Krankheitsentstehung entscheidende Veränderungen im Herzen stattfinden. Dieses Zeitfenster wäre am erfolgversprechendsten für weiterführende biochemische Analysen zur Identifikation pathologischer zellulärer Signale und zudem geeignet für eine

frühzeitige medikamentöse oder genetische Intervention zur Prävention des Krankheitsbildes. Die Untersuchung zeigt, dass es unter den untersuchten Parametern keinen gibt, der verlässlich den Phänotyp vorhersagen kann bzw. den Beginn morphologischer Veränderungen kennzeichnet. Eine hohe Aussagekraft hat das Herzgewicht. Insbesondere der homozygote Genotyp FL/FL und SP/SP mit einem dilatativen Phänotyp zeigte ein erhöhtes Herzgewicht, während der hypertrophe Genotyp VM/VM ein geringeres Herzgewicht aufweist. Die heterozygoten Genotypen FL/+ und SP/+ zeigen erst in hohem Alter eine Herzgewichtszunahme. In ihrer Aussagekraft vergleichbar sind die Werte für die gesamte Fläche des linken Ventrikels und das Lumen des linken Ventrikels. Hier sind eindeutige Merkmale der dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathie vorhanden, d.h. eine vergrößerte linksventrikuläre Fläche bei gleichzeitig vergrößertem Lumen für den Genotyp SP/SP und FL/FL, sowie für den hypertrophen Phänotyp einhergehend mit einem verkleinerten linken Ventrikel und Lumen für VM/VM. Die hohe Spezifität war leider mit geringer Sensitivität verbunden, denn für die heterozygoten Tiere waren diese Veränderungen kaum reproduzierbar. Lediglich der Genotyp FL/+ zeigte eine Vergrößerung der linksventrikulären Fläche in der alten Gruppe und der heterozygote Genotyp für VM/+ ein verkleinertes Lumen in der alten Gruppe. Wider erwarten zeigte sich bei Tieren mit HCM-Mutationen keine Vergrößerung der Herzwandfläche des linken Ventrikel, jedoch dafür bei den Tieren mit einer DCM insbesondere für SP/SP ab 0,5 Jahren und für FL/+ und SP/+ ab 1,5 Jahren. Auffällig war für den Genotyp VM/VM eine deutlich erhöhte Septumstärke und freie Herzwandstärke ab einem Alter von 10 Wochen und mit 0,5 Jahren (Frühzeichen HCM für VM/VM). Die Zellfläche könnte lediglich für den Genotyp SP/SP prädiktiv sein. Sie war in allen Altersstufen der homozygoten Tiere deutlich erhöht. Im Rahmen der Myozytenisolierung wurde ersichtlich, dass die Tiere mit einer HCM-Mutation gegenüber dem Wildtyp kaum Veränderungen aufweisen, während Tiere mit einer DCM mindestens in einer Richtung, v.a. in der Länge, eine myozytäre Vergrößerungen aufweisen. Diese Veränderungen betrafen in den Untersuchungen den heterozygoten Genotyp FL/+ und RC/+ und die homozygoten Tiere des Genotyps FL/FL und

SP/SP. Bei VM/VM-Mutanten wiesen überraschenderweise nahezu alle gemessenen Parametern auf eine Zellverkleinerung hin.

Bei individuellen Vor- und Nachteilen hinsichtlich des methodischen Aufwands, der Spezifität und der Sensitivität, konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen kein Parameter identifiziert werden, der bei heterozygoten Mutanten eine frühzeitige Diagnosestellung vorzunehmen und eine Einordnung zu einer Kardiomyopathieform gestatten würde. Neben den Limitationen der eingesetzten Methoden, ist eine Ursache dafür sicherlich die sehr heterogene, mutationsspezifische Ausprägung des jeweiligen kardialen Phänotyps.

#### 4.6. Entwicklung des Phänotyps im zeitlichen Verlauf

Mit steigendem Lebensalter war bei nahezu allen untersuchten Mutanten eine Zunahme der pathologischen Veränderungen ersichtlich. Dabei war bei dem heterozygotem Genotyp VM/+ fast keine Veränderung nachzuweisen und bei den Genotypen RC/+ und RW/+ nur eine milde Veränderung der phänotypischen Ausprägung. Typisch war zudem, dass mit zunehmendem Alter der Tiere die Summe der Veränderungen und die Stärke der Ausprägung zunahmen.

In den Untersuchungen war, im Gegensatz zu homozygoten Tieren, bei heterozygoten Tieren ein deutlich milderer Verlauf der pathologischen kardialen und systemischen Entwicklung zu verzeichnen. Dieses war bei dem Genotyp VM/+ vs. VM/VM, SP/+ vs. SP/SP und FL/+ vs. FL/FL gut ersichtlich. Hier verhalten sich Tiere mit einer HCM oder DCM völlig äquivalent zueinander, wobei die Ausprägung vorwiegend vom Genotyp abhängt. Auffällig ist weiterhin, dass Tiere mit dem heterozygoten Genotyp deutlich später und in abgeschwächter Form ihren Herz-Phänotyp entwickeln. Im Gegensatz dazu ist der homozygote Genotyp durch einen frühen Beginn der Erkrankung gekennzeichnet. Die Art des Phänotyps ist bei heterozygoter und homozygoter Mutation jedoch stets die gleiche.

Letztlich muss festgestellt werden, dass die Mutation den Phänotyp progredient lebenslang weiter vorantreibt, und je nach Mutation ein benigner oder maligner

#### 4. DISKUSSION

---

Verlauf vorhanden ist. Weiterhin scheint die Ausprägung der phänotypischen Veränderungen bei Mäusen nicht mit erhöhter Mortalität einherzugehen.

### 5. Zusammenfassung

Die Herz-/Kreislaufkrankungen stehen in Deutschland, wie auch in allen anderen Industrienationen, weiterhin an erster Stelle der Mortalitätsstatistiken. Es ist zu vermuten, dass sie trotz weiterer wissenschaftlicher Erkenntnisse und der demographischen Entwicklung nicht an Prägnanz verlieren werden. Herz-/Kreislaufkrankungen führen zu charakteristischen Umbauprozessen des Myokards, die sich makroskopisch in der Regel entweder als Hypertrophie oder Dilatation des Herzens äußern. In dieser Arbeit wurde die Morphologie dieser krankhaften Veränderungen anhand von Mausmodellen für hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien (HCM und DCM) untersucht.

Die Tiere trugen verschiedene Mutationen in den schweren Ketten des kardialen Myosins, das die häufigste Ursache genetischer Kardiomyopathien darstellt. Mausmodelle für HCM trugen die Punktmutation V606M, R719W bzw. R453C und solche für DCM die Punktmutation S532P bzw. F764L. Sowohl die Morphologie des gesamten Herzens als auch der einzelnen Myozyten wurde anhand von Herzquerschnitten und isolierten Zellen analysiert. Es sollten Parameter identifiziert werden, die für verschiedene Formen myokardialen remodellings charakteristisch sind und eine möglichst frühzeitige Abgrenzung von Wildtyp-Herzen sowie eine Differenzierung zwischen HCM und DCM zulassen.

Insgesamt waren Veränderungen von heterozygoten Herzen deutlich schwieriger abzugrenzen als bei homozygoten Tieren. Sofern Veränderungen beobachtet wurden, waren diese erst im höheren Lebensalter detektierbar. Außerdem war festzustellen, dass nur die Zusammenschau verschiedener Parameter (Herzfläche, linksventrikuläre Fläche und Lumen, Herzwandstärke, etc.) ein genaues Bild des Phänotyps und eine Zuordnung zu hypertrophen und dilatativen Veränderungen ermöglicht. Zur groben Charakterisierung erschien es ausreichend, neben dem Herzgewicht die Herzfläche, linksventrikuläre Fläche wie auch das linksventrikuläre Lumen zu vermessen. Zur genaueren Diagnostik erwiesen sich zusätzlich die Parameter Septumstärke, freie Herzwandstärke und Zellfläche als hilfreich.

Die Untersuchungen an isolierten Myozyten konnten genauere Informationen über die zelluläre Veränderung geben und das makroskopische Bild ergänzen. Aufgrund des hohen technischen Aufwands der Zellisolierung ist diese Methode aber nicht als Routineuntersuchung geeignet.

Das Bild einer HCM ging in diesen Versuchen mit einem im Vergleich zu den DCM-Mutanten reduzierten Herzgewicht und verkleinerten linksventrikulären Lumen einher bei einer vergrößerten linksventrikulären Herzwandfläche. Für die DCM waren die charakteristischen Werte, wie auch in der Literatur beschrieben, eine Zunahme der Herzfläche, der linksventrikulären Fläche und des Lumens bei erhöhtem Herzgewicht. In heterozygoten Tieren konnten dabei nur einzelne der genannten Parameter verändert sein, während bei homozygoten Tieren das Vollbild einer DCM bzw. HCM zu sehen war. Veränderungen auf zellulärer Ebene an Herzschnitten erwiesen sich als sensitiver zur frühen Abgrenzung von Wildtyp-Herzen, zeigten jedoch eine geringe Spezifität hinsichtlich einer Differenzierung von HCM- und DCM-Phänotypen. DCM-Mutationen äußerten sich durch eine zelluläre Hypertrophie, wobei die Zellen in der Fläche vergrößert waren, die sowohl auf einer Verbreiterung als auch eine Verlängerung der Zellen beruhte. Zellen mit HCM-Mutation waren in ihrer Fläche nahezu unverändert. Dies lag am ehesten in der recht schwachen Ausprägung der HCM-Phänotypen der untersuchten Mäuse. Insgesamt zeigte sich aber, dass DCM- wie auch HCM-induzierende Myosin-Mutationen sowohl zu einer Verbreiterung, als auch zu einer Verlängerung der Myozyten führen können. Bei den DCM-Mutanten schien dabei gerade die Längenzunahme stärker ausgeprägt zu sein.

### 6.1. Literaturverzeichnis

- WHO/ISFC classification. (1980) "Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies." Br Heart J 44(6): 672-3.
- Ackerman, M. J., S. L. VanDriest, et al. (2002). "Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective." J Am Coll Cardiol 39(12): 2042-8.
- Ahmad, F., J. G. Seidman, et al. (2005). "The genetic basis for cardiac remodeling." Annu Rev Genomics Hum Genet 6: 185-216.
- Anan, R., G. Greve, et al. (1994). "Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy." J Clin Invest 93(1): 280-5.
- Arad, M., B. J. Maron, et al. (2005). "Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy." N Engl J Med 352(4): 362-72.
- Bagger, J. P., U. Baandrup, et al. (1984). "Cardiomyopathy in western Denmark." Br Heart J 52(3): 327-31.
- Böcker W., Denk H., Heitz Ph. U., "Pathologie", 2. Auflage, Urban und Fischer Verlag München / Jena, 2001
- Bonne, G., L. Carrier, et al. (1998). "Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects." Circ Res 83(6): 580-93.
- Braun JR, Willnow TE, (1996) Die „Knockout“ – Maus als Krankheitsmodell – Prinzipien und klinische Relevanz, Deutsches Ärzteblatt, 26:1765-1769

- Brittsan, A. G. and E. G. Kranias (2000). "Phospholamban and cardiac contractile function." *J Mol Cell Cardiol* 32(12): 2131-9.
- Burgmann H., Reckendorfer H., Sperlich H., Sperlich M., Spieckermann PG., (1996). "Comparison of Bretschneider's HTK- and Euro-Collins solution using an in vitro small bowl perfusion model." *Transplant.Proc.* 28(5):2636
- Cappello, G., P. Pierobon, et al. (2007). "Myosin V stepping mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15328-33.
- Codd, M. B., D. D. Sogut, et al. (1989). "Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984." *Circulation* 80(3): 564-72.
- Cohn, J. N., M. R. Bristow, et al. (1997). "Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research." *Circulation* 95(4): 766-70.
- Coughlin, S. S., Labenberg J. R., Tefft M. C. et. al (1993) " Black-white differences in idiopathic dilated cardiomyopathy: the Washington, DC, Dilated Cardiomyopathy Study. *Epidemiology* 1993;4:165-172
- Debold, E. P., J. P. Schmitt, et al. (2007). "Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse alpha-cardiac myosin in the laser trap assay." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H284-91.
- Dec, G. W. and V. Fuster (1994). "Idiopathic dilated cardiomyopathy." *N Engl J Med* 331(23): 1564-75.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "[ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008]." *Rev Esp Cardiol* 61(12): 1329 e1-70.

- Elliott, P. and W. J. McKenna (2004). "Hypertrophic cardiomyopathy." *Lancet* 363(9424): 1881-91.
- Fatkin, D. and R. M. Graham (2002). "Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies." *Physiol Rev* 82(4): 945-80.
- Fatkin, D., B. K. McConnell, et al. (2000). "An abnormal Ca(2+) response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy." *J Clin Invest* 106(11): 1351-9.
- Felker, G. M., J. P. Boehmer, et al. (2000). "Echocardiographic findings in fulminant and acute myocarditis." *J Am Coll Cardiol* 36(1): 227-32.
- Foth, B. J., M. C. Goedecke, et al. (2006). "New insights into myosin evolution and classification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3681-6.
- Ganten D., Ruckpaul K., *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005
- Geisterfer-Lowrance, A. A., S. Kass, et al. (1990). "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation." *Cell* 62(5): 999-1006.
- Georgakopoulos, D., M. E. Christe, et al. (1999). "The pathogenesis of familial hypertrophic cardiomyopathy: early and evolving effects from an alpha-cardiac myosin heavy chain missense mutation." *Nat Med* 5(3): 327-30.
- Gillum R. F. (1986). "Idiopathic cardiomyopathy in the United States." *Am Heart J* 111:752-5
- Gramolini, A. O., T. Kislinger, et al. (2008). "Comparative proteomics profiling of a phospholamban mutant mouse model of dilated cardiomyopathy reveals progressive intracellular stress responses." *Mol Cell Proteomics* 7(3): 519-33.

- Herold G. und Mitarbeiter. Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln 2005
- Ho, C. Y. and C. E. Seidman (2006). "A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy." *Circulation* 113(24): e858-62.
- Hodge, T. and M. J. Cope (2000). "A myosin family tree." *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3353-4.
- <http://www.angis.org.au/pbin/Databases/Heart/> (URL) Royal Prince Alfred Hospital Sydney, Australien: FHC mutation database (Stand: 2005)
- <http://www.berlin-institut.org> – Berlin Institut für Bevölkerung und Entwicklung (Stand: 2008)
- <http://www.destatis.de> - Statistisches Bundesamt Deutschland (Stand: 2008)
- <http://www.flexikon.doccheck.com> (Stand: 2008)
- <http://www.gbe-bund.de> - Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Pressemitteilung Nr. 288 06.07.2004)
- <http://www.genetics.med.harvard.edu/seidman/cg3/index.html> - Cardio Genomics Program for Genomic Applications Project 3 Boston, USA; Mutation database (Stand: 24. April 2006)
- <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/023-029.htm> - Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (Stand: 2005)
- Karp G, Molekulare Zellbiologie, Springer Verlag Berlin 2005

- <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> - The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff
- Hullin R, Mohacsi PJ, Hess OM, (2003) Familiäre Formen der nicht-ischämischen Kardiomyopathie, Curriculum Schweiz Med. Forum, 13:310-318
- Huxley, A. F. (1957). "Muscle structure and theories of contraction." Prog Biophys Biophys Chem 7: 255-318.
- J.Auber / Photo Researchers aus Molekulare Zellbiologie, Springer Verlag Berlin 2005
- Kamisago, M., S. D. Sharma, et al. (2000). "Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy." N Engl J Med 343(23): 1688-96.
- Karim, C. B., T. L. Kirby, et al. (2004). "Phospholamban structural dynamics in lipid bilayers probed by a spin label rigidly coupled to the peptide backbone." Proc Natl Acad Sci U S A 101(40): 14437-42.
- Kelly, D. P. and A. W. Strauss (1994). "Inherited cardiomyopathies." N Engl J Med 330(13): 913-9.
- Maron, B. J. (1997). "Hypertrophic cardiomyopathy." Lancet 350(9071): 127-33.
- Maron, B. J. (2002). "Cardiology patient pages. Hypertrophic cardiomyopathy." Circulation 106(19): 2419-21.
- Maron, B. J. (2002). "Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review." Jama 287(10): 1308-20.
- Maron, B. J., J. M. Gardin, et al. (1995). "Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic

analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults." *Circulation* 92(4): 785-9.

- Maron, B. J., J. A. Towbin, et al. (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." *Circulation* 113(14): 1807-16.
- Matsuoka, R., M. C. Yoshida, et al. (1989). "Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2---q13." *Am J Med Genet* 32(2): 279-84.
- McLachlan, A. D. and J. Karn (1982). "Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle." *Nature* 299(5880): 226-31.
- Mestroni, L., B. Maisch, et al. (1999). "Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy." *Eur Heart J* 20(2): 93-102.
- Mewis C, Riessen R, Spyridopoulos L, *Kardiologie Compact*, Georg 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- Morimoto, S. (2008). "Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies." *Cardiovasc Res* 77(4): 659-66.
- Morita, H., J. Seidman, et al. (2005). "Genetic causes of human heart failure." *J Clin Invest* 115(3): 518-26.

- Osterziel, K. J., T. Scheffold, et al. (2001). "[Genetics of dilated cardiomyopathy]." *Z Kardiol* 90(7): 461-9.
- Palmer, B. M., D. E. Fishbaugher, et al. (2004). "Differential cross-bridge kinetics of FHC myosin mutations R403Q and R453C in heterozygous mouse myocardium." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(1): H91-9.
- Priewe J, Tümmers D, (2007) *Das Erste*, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007
- Purcell, T. J., H. L. Sweeney, et al. (2005). "A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13873-8.
- Redwood, C. S., J. C. Moolman-Smook, et al. (1999). "Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy." *Cardiovasc Res* 44(1): 20-36.
- Richard P., Villard E., Charron P., Isnard R., et al. (2006). "The genetic basis of cardiomyopathies" *Journal of the American College of Cardiology* 48(9):79-89
- Richardson, P., W. McKenna, et al. (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." *Circulation* 93(5): 841-2.
- Rosamond, W., K. Flegal, et al. (2007). "Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 115(5): e69-171.
- Saez, L. J., K. M. Gianola, et al. (1987). "Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome." *Nucleic Acids Res* 15(13): 5443-59.
- Schenkel J, *Transgene Tiere*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2006

- Schmitt, J. P., F. Ahmad, et al. (2009). "Alterations of phospholamban function can exhibit cardiotoxic effects independent of excessive sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibition." *Circulation* 119(3): 436-44.
- Schmitt, J. P., E. P. Debold, et al. (2006). "Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39): 14525-30.
- Schmitt, J. P., M. Kamisago, et al. (2003). "Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban." *Science* 299(5611): 1410-3.
- Schönberger J, Zimmer M, Ertl G, (2004) Genetik der dilatativen Kardiomyopathie, *Dtsch Arztebl*, 101:1099–1105
- Seidman, J. G. and C. Seidman (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." *Cell* 104(4): 557-67.
- Silbernagel S, Despopoulos A, Taschenatlas Physiologie, 5. Auflage, Thieme Verlag, 2001
- Simm M, (2007) Genomforschung in Deutschland: Von Mäusen und Menschen, *Dtsch Arztebl*, 104: A-3084 / B-2713 / C-2620
- Thom, T., N. Haase, et al. (2006). "Heart disease and stroke statistics - 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 113(6): e85-151.
- Towbin, J. A. and N. E. Bowles (2002). "The failing heart." *Nature* 415(6868): 227-33.
- Tyska, M. J., E. Hayes, et al. (2000). "Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy." *Circ Res* 86(7): 737-44.

- Varnava, A. M., P. M. Elliott, et al. (2000). "Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease." *Heart* 84(5): 476-82.
- Wick, M. (1999). "Filament assembly properties of the sarcomeric myosin heavy chain." *Poult Sci* 78(5): 735-42.

### 6.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTC	kardiales Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	<i>American Heart Association</i>
ARVCM	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLF	kardiales Muskel MLP Protein
CTF	Cardiotrophin1
D.	Deutschland
d.h.	dass heißt
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DES	Desmin
DMD	Dystrophin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Desmoplakin
ELC	essentiellen Myosinleichtkette
EMMA	Europäisches Mausarchiv
etc.	et cetera
F764L	Phenylalanin 764 Leucin (FL/+; FL/FL)
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
HE	Hämalaun/ Eosin
HMM	schweres Meromyosin
HOCM	hypertrophische obstruktive Kardiomyopathie
ICD	<i>implantable cardioverter defibrillator</i>
IHSS	idiopathische subaortale Stenose

KG	Körpergewicht
LAMP2	Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2
LDB3	Cypher/ZASP
LMM	leichtes Meromyosin
LMNA	Lamin A/C
MHC	schwere Myosinkette
MLC	leichte Myosinkette
MVCL	Metavinculin
MYBPC3	Myosin Bindungsprotein C
MYH 2, 3	Gen der leichten Myosinkette
MYH 6, 7	Gen der schweren Myosinkette ( $\alpha$ und $\beta$ -Isoform)
NG	Nierengewicht
NKCM	nicht klassifizierbare Kardiomyopathie
NHOCM	nicht hypertrophische obstruktive Kardiomyopathie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
R453C	Arginin 453 Cystein (RC/+)
RCM	restriktive Kardiomyopathie
Pi	Phosphatrest
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PLN <sup>R9C</sup>	Phospholamban mit Arginin 9 Cystein-Mutation
TgPLN <sup>R9C</sup>	PLN <sup>R9C</sup> -Transgen
RLC	regulatorischen Myosinleichtkette
(t)RNA	(transfer-) Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleasen
PRKAG2	$\gamma$ 2-Untereinheit der AMP-abhängigen Proteinkinase
R719W	Arginin 719 Tryptophan (RW/+)
SF	Subfragment
SERCA2a	Kalzium-Adenosintriphosphatase des sarkoplasmatischen Retikulums
SGCD	partial-Sarcoglycan

s.o.	siehe oben
S532P	Serin 532 Prolin (SP/+; SP/SP)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAZ	Tafazzin
TL	Tibiallänge
TNNC	Troponin C
TNNI3	Troponin I
TNNT2	Troponin T
TPM1	$\alpha$ -Tropomyosin
V606M	Valin 606 Methionin (VM/+; VM/VM)
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WHO	Welt Gesundheits-Organisation
Wo.	Wochen
WPW	Wolff-Parkinson-White Syndrom
WT	Wildtyp

## 6.3. Abbildungsverzeichnis

	Seite
1 Übersicht der primären Kardiomyopathien	3
2 Übersicht der sekundären Kardiomyopathien	3
3 Darstellung der sarkomeren Filamentstruktur	6
4 Proteinbestandteile der Sarkomere	6
5 Darstellung des Sarkomer	7
6 Darstellung der Proteinfamilie des Myosinstammbaum	9
7 Darstellung der Struktur des Myosin	9
8 Darstellung des molekularen Aufbaus des Myosin mit den untersuchten Mutationen	11
9 Übersicht der chromosomalen Lokalisationen und Mutationen der DCM	19
10 Darstellung des Procedere zur Generierung transgener Tiere	22
11 Übersicht der Mutationen im kardialen $\beta$ -MHC-Gen	23
12 Zusammensetzung PBS	30
13 Zusammensetzung Bretschneider Lösung (Custodiol®)	31
14 Photographische Darstellung eines Mausherzens	32
15 Aufbau der Versuchsanordnung zur Myozytenisolierung	36
16 Bestandteile der Spül- und Waschlösungen für die Myozytenisolierung	37
17 medianer Herzquerschnitt in HE Färbung mit Darstellung der Anatomie und Messwerte	40
18 medianer Herzquerschnitt in <i>wheat germ agglutinin</i> -Färbung und Darstellung von Myozyten im Querschnitt	41
19 Darstellung eines isolierten Myozyten in <i>wheat germ agglutinin</i> -Färbung und der erhobenen Messwerte	41
20 Messwerte des Mausgewicht der WGA, HE und WGA gefärbten Tiere	44
21 Zusammenfassung des Herzgewichts zum Maus-, Nierengewicht und Tibialänge	47

22	Zusammenfassung der Messwerte der Herzfläche im medianen Herzquerschnitt	50
23	Zusammenfassung der Messwerte der Fläche des linken Ventrikels im medianen Herzquerschnitt	52
24	Zusammenfassung der Messwerte der Fläche des linksventrikulären Lumens im medianen Querschnitt	55
25	Zusammenfassung der Messwerte der Herzwandfläche des linken Ventrikels im medianen Herzquerschnitt	57
26	Zusammenfassung der Messwerte der Septumstärke	59
27	Zusammenfassung der Messwerte der Stärke der linksventrikulären freien Herzwand	61
28	Zusammenfassung der Messwerte der Zellfläche	63
29	Zusammenfassung der Fläche isolierter Myozyten	65
30	Zusammenfassung der Breite isolierter Myozyten	67
31	Zusammenfassung der Länge isolierter Myozyten	69

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Martin Lohse danken, dass ich meine Promotionsarbeit bei ihm anfertigen konnte.

Insbesondere danke ich meinen Betreuer und Doktorvater Dr. med. Joachim P. Schmitt für seine unendliche Geduld und Mühe. Er hatte stets ein offenes Ohr für theoretische und praktische Probleme, deren Lösungen und Diskussionen.

Ein weiteres Dankeschön gilt Frau M. Babel die mich beim Start der praktischen Tätigkeiten und Einarbeitung voll unterstützte.

Des weiteren möchte ich meiner Familie danken, meiner Oma und dieses Jahr verstorbenen Opas, Mutter und Vater, die stets an mich glaubten und mich in jeglicher Art unterstützten, mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und somit die Möglichkeit der Promotion boten.

.