

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Zentrum für Experimentelle Medizin**

**Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie**

Prof. Dr. H. Ehmke

## **Unterschiede in der physiologischen Herzfrequenzregulation und in der Induzierbarkeit von Herzrhythmusstörungen bei verschiedenen Mauslinien**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Charlotte Wallach**

aus Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
13.07.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Alexander P. Schwoerer**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Meyer**

Für meine Großeltern



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Herzfrequenz.....	1
1.1.1	Entstehung der Herzfrequenz.....	1
1.1.2	$\beta$ -adrenerge Herzfrequenz-Modulation.....	4
1.1.3	Tag-/Nacht-Rhythmik der Herzfrequenz.....	8
1.2	Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien).....	8
1.3	Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM).....	11
1.3.1	Krankheitsbild.....	11
1.3.2	Ein transgenes Mausmodell zur HCM.....	12
1.4	Genotypabhängigkeit.....	13
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Zeitschema.....	17
2.2	Versuchstiere.....	18
2.3	Telemetrische EKG- und Aktivitäts-Messung.....	19
2.3.1	Implantation der Telemetriesender.....	19
2.3.2	Abbruchkriterien nach Sender-Implantation.....	22
2.3.3	Messung.....	23
2.3.4	Auswertung der telemetrischen Daten.....	24
2.4	$\beta$ -adrenerge Stimulation im kardialen Stresstest.....	25
2.4.1	Versuchsdurchführung.....	25
2.4.2	Auswertung des EKGs.....	26
2.5	$\beta$ -adrenerge Blockade mittels Metoprolol.....	30

2.6	Echokardiographie .....	30
2.7	Re-Genotypisierung .....	32
2.8	Organentnahmen .....	33
2.9	Statistik.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Beschreibung der Wildtyp-Tiere .....	35
3.1.1	Gewichtsverlauf der Tiere .....	36
3.1.2	Morphologie der Tiere.....	37
3.1.3	Echokardiographie.....	37
3.2	Telemetrische Messungen unter Kontrollbedingungen .....	40
3.2.1	Herzfrequenz .....	40
3.2.2	Aktivität .....	42
3.2.3	Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität .....	43
3.3	Telemetrische Messungen unter Metoprolol-Gabe .....	44
3.3.1	Herzfrequenz .....	44
3.3.2	Aktivität .....	47
3.3.3	Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol ..	48
3.4	$\beta$ -adrenerge Stimulation im kardialen Stresstest.....	49
3.4.1	Herzfrequenz-Verlauf während des kardialen Stresstests .....	49
3.4.2	Auftreten von Arrhythmien während des kardialen Stresstests ....	52
3.5	Regelbereich der Herzfrequenz .....	54
3.6	HCM-Mäuse .....	56
3.6.1	Beschreibung der Tiere .....	56
3.6.2	Telemetrische Messungen unter Kontrollbedingungen.....	61
3.6.3	Telemetrische Messungen unter Metoprolol-Gabe.....	65

3.6.4	$\beta$ -adrenerge Stimulation im kardialen Stresstest .....	69
3.6.5	Regelbereich der Herzfrequenz .....	73
4	Diskussion .....	75
4.1	Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien .....	78
4.1.1	Genotypabhängigkeit der basalen Herzfrequenz und Ansprechbarkeit auf $\beta$ -adrenerge Blockade.....	78
4.1.2	Genotypabhängigkeit der physischen Aktivität und der Aktivitätsabhängigkeit ihrer Herzfrequenz.....	81
4.1.3	Genotypabhängigkeit der Arrhythmieeigung unter $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	82
4.2	Übertragung genotypabhängiger Unterschiede auf ein etabliertes transgenes Modell der hypertrophen Kardiomyopathie.....	84
4.2.1	Funktionelle Unterschiede im transgenen Modell .....	86
4.3	Wesentliche Aspekte der Arbeit .....	89
4.4	Limitationen der Arbeit .....	90
4.5	Ausblick.....	93
5	Zusammenfassung .....	95
6	Abkürzungsverzeichnis.....	97
7	Literaturverzeichnis .....	100
8	Abbildungsverzeichnis.....	109
9	Tabellenverzeichnis.....	110
10	Danksagung .....	111
11	Lebenslauf.....	112
12	Eidesstattliche Erklärung .....	113

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzfrequenz

### 1.1.1 Entstehung der Herzfrequenz

Das Herz eines erwachsenen Menschen schlägt in Ruhe etwa 70 mal pro Minute (Mangoni & Nargeot, 2008). Dabei folgt es einem geordneten Ablauf, der die Herzmuskulatur rhythmisch kontrahieren lässt. Verantwortlich für die Entstehung einer Kontraktion ist die spontane Aktivität spezieller Muskelzellen, der sogenannten Schrittmacherzellen im Sinusknoten, die autonom eine Erregung auslösen können und so für den Eigenrhythmus des Herzens sorgen. Neuronale und humorale Einflüsse wirken sich modulierend auf diesen aus, sind aber nicht für die Initialisierung notwendig.

Bei dem Sinusknoten handelt es sich um ein etwa  $3 \times 10$  mm großes Areal an oben genannten spezialisierten Herzmuskelzellen, welches sich im rechten Vorhof nahe der Einmündung der Vena cava superior befindet (Abb. 2). Da diesen Zellen die stabilisierende Kaliumleitfähigkeit und damit ein konstantes Ruhemembranpotential fehlt, kommt es im Anschluss an die Repolarisation zu einer erneuten Spontandepolarisation. Durch die Hyperpolarisation der Zelle öffnen sich HCN-Kanäle (Hyperpolarisations-Cyclonukleotid-gesteuerte nicht-selektive Kanäle) und leiten einen Schrittmacherstrom ( $I_f$ ), einen nicht-selektiven Einstrom von Kationen, der zur Zunahme des Membranpotentials führt (Abb. 1). Wird das Membranpotential positiver als  $-55$  mV, ist die Schwelle erreicht und ein langsamer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom ( $I_{\text{Ca}}$ ) führt zu einem neuen Aktionspotential. Zur gleichen Zeit öffnen sich  $\text{K}^+$ -Kanäle, die durch einen Auswärtsstrom von Kalium ( $I_{\text{K}}$ ) zur Repolarisation der Zelle beitragen.

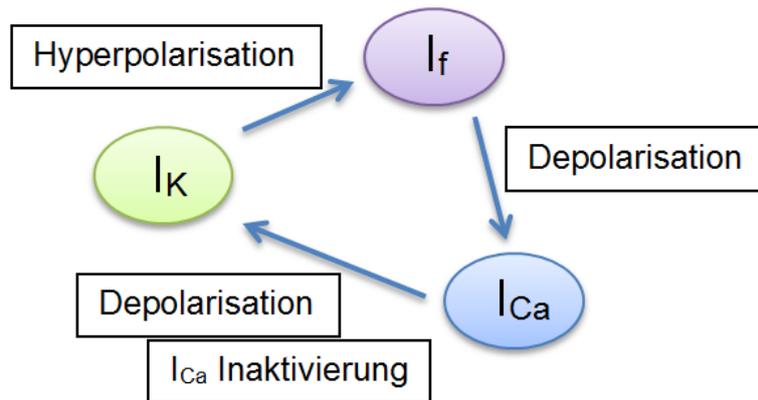


Abbildung 1 – Elektrischer Zyklus einer Herzschriftmazerzelle

Mit dieser Eigenschaft steht der Sinusknoten als primärer Schrittmacher (sog. nomotopes Automatiezentrum) an oberster Stelle eines hierarchisch gegliederten Erregungsbildungs- und -leitungssystems im Herzen (Abb. 2). Zwar sind auch die nachfolgenden Strukturen zur spontanen Impulsbildung fähig, jedoch liegt ihre Eigenfrequenz unter der des Sinusknotens, weshalb sie von diesem erregt werden, bevor sie selbst spontan depolarisieren. Fällt der Sinusknoten aus, kann zum Beispiel der AV-Knoten (Atrioventrikularknoten) mit einer Frequenz von 40-50 Schlägen pro Minute oder die Tawara-Schenkel mit 25-40 Schlägen pro Minute als sekundäres bzw. tertiäres Zentrum die Schrittmacherfunktion übernehmen.

Ein im Sinusknoten generiertes Aktionspotential erregt zunächst die Vorhöfe, die durch eine bindegewebige Ventilebene elektrisch von den Ventrikeln (Herzkammern) isoliert sind. Die Erregungsweiterleitung passiert ausschließlich über den AV-Knoten, der diese Ventilebene durchzieht. Dabei fungiert er als Frequenzsieb, indem er nur langsam leitet und so vor dem Übergreifen eines möglichen Vorhofflatterns oder -flimmerns auf den Ventrikel schützt.

## Einleitung

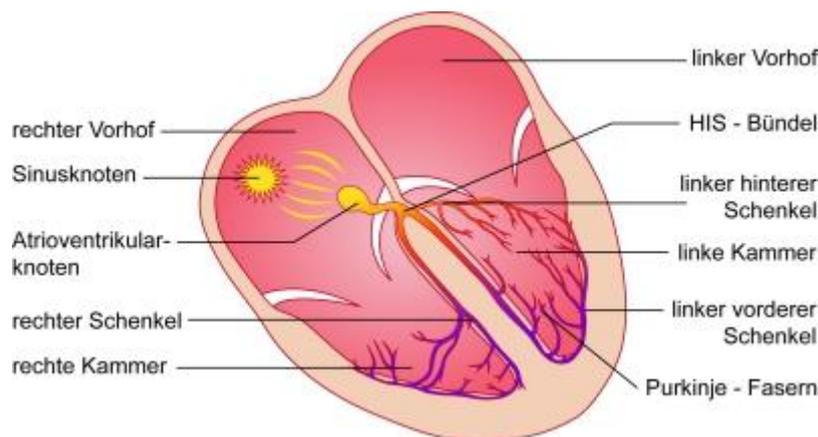
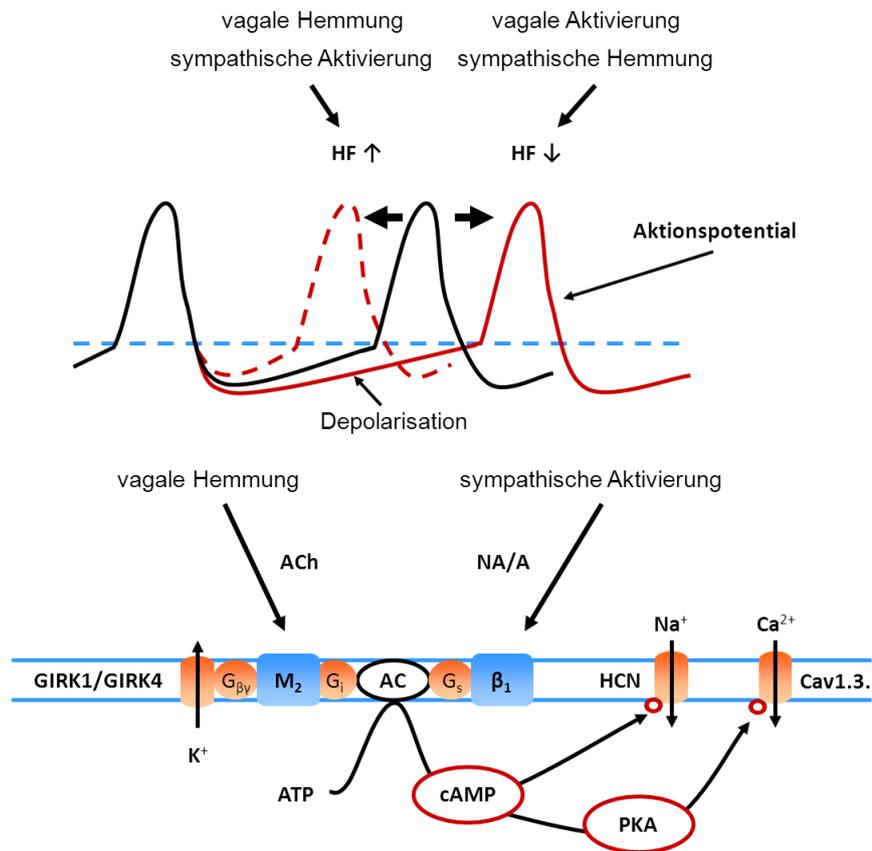


Abbildung 2 – Das Erregungsbildungs- und Leitungssystem des menschlichen Herzens. ©Thinkstock; Shutterstock

Am AV-Knoten entspringt ein dünner Strang weiterer spezialisierter Herzmuskelzellen, das His-Bündel, welches in Richtung Herzspitze läuft, wo es sich in einen rechten und einen linken Tawara-Schenkel teilt (Abb. 2). Der linke Schenkel verzweigt sich weiter in ein vorderes und ein hinteres Hauptbündel. Die sog. Purkinje-Fasern, netzartige Ausläufer von den jeweiligen Verzweigungen des Erregungsleitungssystems, breiten die Erregung dann auf das gesamte Arbeitsmyokard aus. Da die Herzmuskelzellen über Gap junctions (Zell-Zell-Kanäle, elektrische Synapsen) verbunden sind, breitet sich die Erregung schnell über den gesamten Ventrikel aus, weshalb das gesamte Myokard als ein funktionelles Synzytium gelten kann.

Beeinflusst wird der Herzrhythmus durch sympathische und parasympathische (vagale) Fasern, die das Herz erreichen (Abb. 3). Der Sympathikus moduliert mittels seines Überträgerstoffes Noradrenalin (NA) zu gleichen Teilen sowohl Vorhöfe als auch die Ventrikel, während die vagalen Nerven cholinerg (Überträgerstoff Acetylcholin, ACh) vor allem den Sinus- und AV-Knoten sowie die Vorhöfe erreichen. Folglich kann das vegetative Nervensystem (Sympathikus/ Parasympathikus) die Herzfrequenz (HF) im Sinusknoten der jeweiligen Bedarfssituation anpassen. Dabei führt sympathische Aktivierung zu einer Steigerung, vagale Aktivierung hingegen zu einer Senkung der Herzfrequenz.

## Einleitung



**Abbildung 3 – Beeinflussung des Herzrhythmus durch das vegetative Nervensystem.** ACh, Acetylcholin; NA, Noradrenalin; A, Adrenalin; GIRK1/ GIRK4, G-Protein gekoppelter *inward rectifying*  $K^+$  Kanal;  $G_{\beta\gamma}$ ,  $\beta\gamma$ -Untereinheit eines G-Proteins;  $M_2$ , muskarinischer Acetylcholinrezeptor;  $G_i$ , hemmendes G-Protein; AC, Adenylatcyclase;  $G_s$ , stimulierendes G-Protein;  $\beta_1$ ,  $\beta_1$ -Adrenozeptor; HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated non selective cation channel*; Cav1.3., spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$  Kanal, L-Typ; cAMP, cyclisches AMP; PKA, Proteinkinase A. Modifiziert nach Ehmke (2009).

### 1.1.2 $\beta$ -adrenerge Herzfrequenz-Modulation

#### 1.1.2.1 Die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade

Die Wirkung des Sympathikus erfolgt über Stimulation sogenannter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die nach folgendem Prinzip funktionieren: Der Ligand bindet extrazellulär an den transmembranären Rezeptor (Abb. 3). Durch Konformationsänderung wird eine hochaffine Bindungsstelle für das heterotrimere G-Protein, bestehend aus  $G_{\alpha\beta\gamma}$ -Untereinheiten, gebildet. Die  $G_{\alpha}$ -Untereinheit hat im inaktiven Zustand GDP gebunden, welches sich durch Aktivierung löst und durch

## Einleitung

GTP ersetzt wird (Weiss *et al.*, 2013). In diesem aktiven Zustand löst sich die  $G_{\alpha}$ -Untereinheit von Rezeptor und  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und bewegt sich frei in der Membran. Nun kann sie mit dem Effektormolekül, der Adenylatcyclase (AC) interagieren, die in einen aktiven Zustand versetzt wird und nun ATP durch Abspaltung von Pyrophosphat in cAMP umwandelt.

Der Second Messenger cAMP wirkt auf verschiedenen Wegen. Zum einen aktiviert er direkt cAMP-regulierte Ionenkanäle und erhöht somit zum Beispiel die Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle, die für die Entstehung der Herzfrequenz entscheidend sind (Mangoni & Nargeot, 2008). Außerdem bewirkt cAMP eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die wiederum durch Phosphorylierung die Aktivität anderer Schlüsselenzyme und Ionenkanäle beeinflusst. Eine Phosphorylierung von L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanälen am Herzen führt zu erhöhter Offenwahrscheinlichkeit und beeinflusst durch den erhöhten  $Ca^{2+}$ -Einstrom die Schlagkraft des Herzens (Weiss *et al.*, 2013).

### 1.1.2.2 Isoprenalin

Isoprenalin (Isoproterenol) ist der erste selektive  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist und wurde 1940 entwickelt (Morgan, 1990). Strukturell weist es einen Catechol-Ring auf, der für die Potenz entscheidend ist, sowie eine Seitenkette, die Unterschiede in der Selektivität ausmacht.

Die Absorption unterscheidet sich je nach Art der Applikation stark. Oral verabreichtes Isoprenalin wird gut absorbiert und ist dennoch nur gering bioverfügbar. Dies lässt sich durch einen starken First-Pass-Effekt erklären: Nach Absorption im Darm passiert der Wirkstoff zunächst die Leber, wo er von der Phenol-Sulphotransferase mit Sulfat konjugiert wird. Ein zweiter wichtiger Weg der Metabolisierung von oral verabreichtem Isoprenalin ist die Methylierung durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Auch inhalativ appliziert wird das Substrat absorbiert und zum Teil noch in der Lunge konjugiert. Der größte Teil wird demnach

## Einleitung

biotransformiert und in Form von Sulfat-Konjugaten renal ausgeschieden, der Anteil an unverändertem Wirkstoff im Urin ist sehr gering.

Bei parenteraler Gabe werden hingegen deutlich geringere Dosen benötigt, die Bioverfügbarkeit ist gut und die Wirkung setzt direkt ein (Up-To-Date, 2013). Die Halbwertszeit ist mit circa fünf Minuten jedoch sehr kurz. Das Isoprenalin wird nach parenteraler Applikation vermehrt unverändert renal eliminiert, indem es aktiv in den Tubulus sezerniert wird (Morgan, 1990). Der  $\beta$ -Agonist folgt der klassischen Pharmakokinetik, die Plasmakonzentration steht in linearem Zusammenhang zur Dosis.

Isoprenalin bewirkt am Herzen über  $\beta$ -, vor allem die  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, einen Anstieg von cAMP und somit die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, welche wiederum durch Phosphorylierung zur Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen führt (Abb. 3). Durch den positiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird die Depolarisation beschleunigt, es resultiert eine gesteigerte Sinusknotenfrequenz (positiv chronotrop). Des Weiteren kommt es durch die Aktivierung der  $\beta$ -Adrenozeptoren zu positiv inotropen (Steigerung der Kontraktionskraft von Vorhof und Ventrikel), dromotropen (Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit im AV-Knoten) und lusitropen (gesteigerte Relaxationsgeschwindigkeit von Vorhof und Ventrikel) Effekten (Weiss *et al.*, 2013). Da jedoch auch die Automatie (Möglichkeit der Erregungsbildung) im gesamten Erregungsleitungssystem gesteigert wird, können durch Erregungsbildung außerhalb des Sinusknotens (heterotop) Herzrhythmusstörungen provoziert werden. Diese reichen von einzelnen Extrasystolen bis zum Kammerflimmern.

Als nicht-selektiver  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist stimuliert Isoprenalin neben den vorwiegend im Herzen angesiedelten  $\beta_1$ -Adrenozeptoren auch  $\beta_2$ -Adrenozeptoren, die in glatter Muskulatur dominieren und bewirkt somit eine Relaxation der Bronchien, des Gastrointestinaltraktes und des Uterus sowie eine Vasodilatation peripherer Blutgefäße.

### 1.1.2.3 Metoprolol

Bei Metoprolol handelt es sich um einen  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, der vor allem selektiv den Rezeptor-Subtyp  $\beta_1$  blockiert (Lopez-Sendon *et al.*, 2004). Da sich die  $\beta_1$ -Rezeptoren insbesondere im Herzen befinden, bewirkt ihre Blockade, dass die ebenso über diesen Rezeptor vermittelte sympathische Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf das Herz verhindert wird. Folglich wirken  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten negativ chronotrop, dromotrop, inotrop und lusitrop. Die Automatie des Herzens wird unterdrückt.

Mit zunehmend hoher Dosierung nimmt die Rezeptor-Selektivität ab, so dass auch die über  $\beta_2$ -Rezeptoren vermittelte Vaso- sowie Bronchokonstriktion und eine Hemmung der Glycogenolyse erreicht wird.

Da es sich bei Metoprolol um eine lipophile Substanz handelt, wird es oral appliziert fast vollständig aus dem Darm resorbiert, trotzdem liegt die Bioverfügbarkeit bei nur 10-30%. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Pharmakon einem starken First-Pass-Effekt unterliegt und nach Resorption aus dem Darm zunächst teilweise von Hepatozyten (Leberzellen) metabolisiert wird. Aufgrund seiner Lipophilie geschieht die Elimination des Wirkstoffes hauptsächlich durch Metabolisierung in der Leber, nur ca. 5% werden unverändert renal ausgeschieden (McEvoy GK, 2003). Die Plasmahalbwertszeit beträgt circa drei bis vier Stunden.

Als chirale Substanz liegt Metoprolol in zwei Formen vor, wobei die (S)-Form das aktivere Enantiomer (Eutomer) ist, welche aber zusammen mit der inaktiveren (R)-Form (Distomer) als Racemat (1:1-Mischung) vorliegt (DrugBank, 2013; Knox *et al.*, 2011).

In der Klinik findet Metoprolol seine Anwendung in der Therapie des akuten Myokardinfarkts (AMI), bei Herzinsuffizienz, Angina pectoris, arterieller Hypertonie sowie bei tachykarden Herzrhythmusstörungen (Lopez-Sendon *et al.*, 2004).

### 1.1.3 Tag-/Nacht-Rhythmik der Herzfrequenz

Viele Funktionen des menschlichen Körpers unterliegen einer strengen circadianen Rhythmik. So schwanken Parameter wie zum Beispiel Temperatur, Hormonspiegel, Blutdruck und Herzfrequenz im Tagesverlauf. Bekannt ist auch, dass die Herzfrequenz, gesteuert durch das autonome Nervensystem, unter anderem aktivitätsabhängig reguliert wird, um die Herzleistung dem jeweiligen Aktivitätszustand und dem Energiebedarf des Körpers anzupassen.

Dementsprechend findet sich in der Nacht beim Menschen häufig ein Absinken von Blutdruck und Herzfrequenz, die parasympathische Wirkung überwiegt. In den Morgenstunden, wenn der Sympathikus an Aktivität zunimmt, zeigt sich immer wieder das gehäufte Auftreten verschiedener kardiovaskulärer Ereignisse, wie zum Beispiel des akuten Myokardinfarkt, was sich bei Patienten unter  $\beta$ -adrenerger Blockade vor dem Infarkt nicht zeigen ließ (Willich *et al.*, 1989). Das erhöhte Risiko kardiovaskulärer Ereignisse am Morgen könnte also auf die Regulation des Herzkreislaufsystems in einer circadianen Rhythmik schließen lassen (Boudreau *et al.*, 2011).

Auch bei Mäusen findet sich ein ausgeprägter circadianer Rhythmus mit höherer Herzfrequenz und gesteigertem Blutdruck bei erhöhter Aktivität in der Nacht, und minimalen Werten während der Ruhephase am Tag (Li *et al.*, 1999). Mit zunehmender spontaner körperlicher Aktivität im Heimatkäfig erhöht sich die Herzfrequenz (Alig *et al.*, 2009).

## 1.2 Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien)

Kommt es in dem geordneten Ablauf der Herzaktion zu Unregelmäßigkeiten, spricht man von Herzrhythmusstörungen oder Arrhythmien.

Als rein physiologisch ist die respiratorische Arrhythmie zu betrachten. Bei dieser Form kommt es während der Inspiration zu einer Erhöhung, während der Expiration

## Einleitung

zu einer Abnahme der Herzfrequenz. Erklären lässt sich dies über die wechselnden Druckverhältnisse im Thorax. Der bei Inspiration entstehende Unterdruck führt über die Sogwirkung in den großen thorakalen Venen zu erhöhtem venösen Rückstrom und über einen kardialen Reflex zur gesteigerten Herzfrequenz. Umgekehrt nimmt bei Expiration der venöse Rückstrom und somit auch die Herzfrequenz wieder ab.

Davon zu unterscheiden sind nicht-physiologische Herzrhythmusstörungen, bei denen Schläge außerhalb der rhythmischen Herzaktion auftreten. Die Einteilung kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen (Curtis *et al.*, 2013). Abhängig von der Ursache der Störung unterscheidet man Reizbildungs- von Reizleitungsstörungen, je nach Ort der Entstehung supraventrikuläre von ventrikulären und je nach vorherrschender Herzfrequenz Brady- (zu langsame) von Tachyarrhythmien (zu schnelle Herzrhythmusstörungen).

Dabei gibt es verschiedene Schweregrade. Einzelne ventrikuläre Extrasystolen, d.h. zusätzliche Herzschläge mit Ursprung im Ventrikel, können auch bei jedem gesunden Menschen mehrmals am Tag auftreten, ohne bemerkt zu werden oder jegliche Bedeutung zu haben (Zipes *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu steht das lebensgefährliche Kammerflimmern, welches einem hämodynamischen Herzstillstand mit Verlust der mechanischen Pumpfunktion gleichkommt und zum Tod führen kann.

Ursächlich für Herzrhythmusstörungen kommen kardiale Erkrankungen, zum Beispiel ein akuter oder abgelaufener Infarkt (Infarktnarbe), primäre Herzmuskelerkrankungen (hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie, HOCM; dilatative Kardiomyopathie, DCM; arrhythmogene RV-Dysplasie), sowie angeborene, funktionelle oder genetische Veränderungen der Myokardstruktur in Betracht. Die Ursache kann aber auch außerhalb des Herzens liegen. Mögliche Ursachen wären dann endokrine Störungen (z.B. Schilddrüsenerkrankungen), die Wirkung von toxischen Agenzien (z.B. Alkohol), Infektionskrankheiten oder rheumatische Erkrankungen, Sarkoidose, Amyloidose oder Elektrolytstörungen. Auch die Einnahme von Medikamenten, insbesondere von Antiarrhythmika, kann Herzrhythmusstörungen verursachen.

## Einleitung

Darüber hinaus wird dem Sympathikus eine arrhythmogene Wirkung zugeschrieben. Diese Annahme begründet sich in vielfältigen Studien. Eine Arbeit von Zhou *et al.* zeigt, dass der Mehrzahl der ventrikulären Arrhythmien eine erhöhte Aktivität des linken Ganglion stellatum (LSG), einem Teil des sympathischen Systems, entweder in Form von *low-amplitude burst discharge activity* (LABDA) oder *high-amplitude spike discharge activity* (HASDA), vorausgeht (Zhou *et al.*, 2008).

Dahinter wird die Rolle von Calcium vermutet. Frühe sowie späte Nachdepolarisationen können zu Nachkontraktionen führen und scheinen somit eine Rolle in der Entstehung von ventrikulären Arrhythmien zu spielen (Tweedie *et al.*, 2000). Mehrfach wurde bereits ein Zusammenhang zwischen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) beschrieben. Ein stärker gefülltes SR ist demnach anfälliger für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Ein durch  $\beta$ -Adrenozeptor-Stimulation verstärktes diastolisches Leck des SR wird auch in anderen Arbeiten vermutet (Curran *et al.*, 2007; Desantiago *et al.*, 2008). Durch den Anstieg des intrazellulären Calciums tritt über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) Natrium in die Zelle, was zu einer Nachdepolarisation führen kann (Pogwizd *et al.*, 2001; Faggioni *et al.*, 2013).

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz macht eine veränderte Calcium-Regulation das Herz anfällig gegenüber Arrhythmien, weshalb deutlich wird, dass Betablocker, die über eine antiarrhythmische Wirkung verfügen, für diese Patienten von besonderer Bedeutung sind (Lohse *et al.*, 2003). Die kardiovaskuläre Sterblichkeit von Patienten mit klinisch manifester Herzerkrankung inklusive des plötzlichen Herztodes lässt sich durch die Gabe von Betablockern am effektivsten reduzieren (Rubart & Zipes, 2005). Und auch auf das Überleben von Patienten nach Herzinfarkt wirkt sich die Gabe von Betablockern günstig aus, was ebenfalls eine wichtige Rolle des autonomen Nervensystems vermuten lässt (Gottlieb *et al.*, 1998).

Als ein unabhängiger Prädiktor für Arrhythmien hat sich in Studien im Menschen auch myokardiale Fibrose erwiesen (Karagueuzian, 2011). Vermehrtes interstitielles Kollagen sorgt für eine Veränderung der kardialen Erregungsweiterleitung und führt zu Reentry-Mechanismen. Bei zusätzlich gesteigerter Automatie und frühen

Nachdepolarisationen ist das Herz vermehrter ektopter Aktivität ausgesetzt und es kann zu letalen Herzrhythmusstörungen kommen.

### 1.3 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

#### 1.3.1 Krankheitsbild

Bei der hypertrophen Kardiomyopathie handelt es sich um eine primäre Erkrankung des Myokards mit charakteristischer asymmetrischer Hypertrophie des linken Ventrikels, insbesondere des Ventrikelseptums (Schlossarek *et al.*, 2011). Sie trifft 0,2% der normalen Bevölkerung. Im histopathologischen Bild findet sich ein desorganisiertes Myofibrillenmuster, sowie interstitielle Fibrosierungen.

Die Ausprägung der Symptome reicht von vollkommener Beschwerdefreiheit bis zu schwerer diastolischer Dysfunktion mit Herzversagen. Der Patient leidet unter Brustschmerzen (Angina pectoris), Atemnot (Dyspnoe) sowie Synkopen (Kreislaufkollapsen) oder Palpitationen (Herzunruhen) (Schlossarek *et al.*, 2011; Fraysse *et al.*, 2012). Durch Entstehung von Arrhythmien ist die HCM eine der wichtigsten Ursachen für den plötzlichen Herztod junger Sportler. Die Mortalität symptomatischer Patienten liegt bei 1-6% jährlich (Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie & AWMF online, 2013).

In den meisten Fällen ist die HCM erblich bedingt und wird in autosomal-dominantem Erbgang mit unvollständiger Penetranz vererbt. Es sind über 500 Mutationen auf 19 Genen für Proteine des Sarkomers bekannt, die zu einer HCM führen können (Schlossarek *et al.*, 2011; Vignier *et al.*, 2009). Da die Ausprägung selbst bei gleicher Mutation eine sehr hohe Variabilität besitzt, und ungefähr ein Viertel der Mutationsträger keine phänotypische Ausprägung zeigt, scheinen neben dem Genotyp auch andere Faktoren wie z.B. Polymorphismen, microRNAs, Epigenetik, posttranslationale Modifikation und Umwelteinflüsse eine Rolle zu spielen. Eines der beiden häufigsten mutierten Gene (MYBPC3) kodiert für das kardiale Myosin-

## Einleitung

bindende Protein C (cMyBP-C), welches im dicken Filament des Sarkomers vorkommt. Dort hält es die Myosin-Köpfchen nahe am Filament, um in der Diastole die Interaktionswahrscheinlichkeit mit Aktin zu vermindern (Schlossarek *et al.*, 2011).

Therapeutisches Ziel ist es, Symptome zu bessern und den plötzlichen Herztod zu verhindern (Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie & AWMF online, 2013). Dafür ist es zunächst wichtig, dass Patienten Leistungssport, und vor allem anstrengende isometrische Muskelarbeit vermeiden. Medikamentös kommen vor allem lipophile Betablocker wie zum Beispiel Propanolol, Metoprolol oder Bisoprolol zum Einsatz. Calciumantagonisten (z.B. Verapamil) sind bei Säuglingen sowie bei hochgradiger generalisierter Hypertrophie kontraindiziert, da sie das Risiko für den herzinsuffizienz-induzierten Tod erhöhen. Auch das Antiarrhythmikum Amiodaron bringt keinen Vorteil in der Prävention von plötzlichem Herztod. Zuverlässig lässt dieser sich nur durch ICD-Implantation verhindern.

Mit Betablockern und Calciumantagonisten lässt sich die Steifheit des hypertrophierten Herzen etwas reduzieren, die Hypertrophie an sich ist jedoch irreversibel (Schlossarek *et al.*, 2011).

Ist die Obstruktion der linken Ausflussbahn höhergradig und die Symptomatik therapieresistent, kann eine Myotomie bzw. Myektomie zur Erweiterung indiziert sein (Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie & AWMF online, 2013). Eine Septumablation mit Alkohol kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Im Endstadium der HCM bleibt die Herztransplantation die letzte aller Möglichkeiten.

### 1.3.2 Ein transgenes Mausmodell zur HCM

Im Rahmen dieser Arbeit werden homozygote Mybpc3-Knock-in (KI)-Mäuse als HCM-Mausmodell untersucht und mit entsprechenden Wildtypen (WT) verglichen. Dieses HCM-Mausmodell trägt eine humane Mybpc3-Punktmutation (G>A Transition am letzten Nukleotid vor Exon 6), welche durch homologe Rekombination gezielt in das Genom eingebracht wurde und in HCM-Patienten mit einem schwerwiegenden

## Einleitung

Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Schlossarek *et al.*, 2011; Schlossarek *et al.*, 2012; Vignier *et al.*, 2009).

Die KI-Mäuse weisen nur geringe Mengen an mutiertem cMyBP-C auf, was auf die Beteiligung sowohl des Nonsense-vermittelten-mRNA-Abbaus als auch des Ubiquitin-Proteasom-Systems zurückzuführen ist. Als molekularer Mechanismus der HCM wird auch in Studien am Menschen die Haploinsuffizienz des cMyBP-C gesehen (Gedicke-Hornung *et al.*, 2013).

*In Vivo*-Charakterisierung der Mybpc3-KI-Tiere wurden mittels Ultraschall durchgeführt. Bereits einen bis zwei Tage nach der Geburt weisen die KI-Tiere die kardiale Dysfunktion auf (Mearini *et al.*, 2013). Diese zeigt sich anhand einer Abnahme der linksventrikulären Verkürzungsfraction (FAS). Die linksventrikuläre Hypertrophie kann ab Tag drei bis vier nach der Geburt nachgewiesen werden.

## 1.4 Genotypabhängigkeit

Im vergangenen Jahrzehnt ist viel Aufwand betrieben worden um die genetische Vielfalt häufig genutzter Mauslinien zu verstehen (Adams *et al.*, 2015).

Vielfach wird in der Literatur die Abhängigkeit verschiedener Parameter von der Wahl des Genotyps beschrieben. Diese betrifft beispielsweise die Aktivität im offenen Feld, die Lern- und Gedächtnisleistung, die Reaktion auf akustische Reize, das Sexual- und Parentalverhalten sowie das Verhalten unter verschiedenen Medikamenten (Crawley *et al.*, 1997).

Weiterhin postulieren Brooks *et al.* deutliche genotypabhängige Unterschiede in der Motorik der Tiere (Brooks *et al.*, 2004). Diese ließen sich unter anderem in der Reaktion und Habituation auf akustische Reize, sowie im Schwimm-Test zeigen.

Auch in kognitiven Tests werden Unterschiede beschrieben (Brooks *et al.*, 2005). Diese beziehen sich zum Beispiel auf das explorative Verhalten der Tiere, von dem auf die Ängstlichkeit geschlossen wird. In einem Elevated-Plus-Maze-Test (EPM,

## Einleitung

Modell zur Bestimmung von Angst bei Nagern) erwiesen sich die C3H/He-Mäuse als am wenigsten ängstlich, während sich die 129S2/Sv-Tiere wenig explorativ zeigten und die meiste Zeit im geschlossenen Arm des Modells verbrachten. Betrachtet man das Lernverhalten, zeigten Tiere vom C3H/He-Genotyp keinen Lerneffekt. CBA/Ca, DBA/2 und C57BL/6j lernten hingegen zu einem gewissen Grad hinzu.

Genotypabhängigkeit ist demnach bereits gut im Bereich der Kognitionswissenschaften etabliert. Im kardiovaskulären Forschungsgebiet gibt es bisher wenige Arbeiten. So berichten Hoit *et al.* neben homöostatischen und Verhaltensunterschieden auch von kardiovaskulären Unterschieden zwischen Tieren verschiedener genetischer Hintergründe (Hoit *et al.*, 2002). Ebenso finden sich solche Unterschiede im mittleren arteriellen Druck sowie im Phänotypen beim Einbringen von Mutationen (Sachse *et al.*, 2014).

Weitere Studien beschreiben Unterschiede in der kardialen Physiologie in weit verbreiteten Mauslinien (Moreth *et al.*, 2014; Auerbach *et al.*, 2010; Vaillant *et al.*, 2014; Barnabei *et al.*, 2010). Shah *et al.* zeigen in ihrer Arbeit mit murinen Herzen neben dem funktionellen Aspekt auch Unterschiede in der Calcium-Regulation, und somit auf zellulärer Ebene die Bedeutung der Rolle des genetischen Hintergrunds (Shah *et al.*, 2010).

Eine genotypabhängige Antwort wurde auch in einem Modell zum arteriellen Remodelling in durch Inzucht erzeugten Linien beobachtet (Harmon *et al.*, 2000). Nach Ligatur der linken Arteria carotis communis (ACC) reagierten die verschiedenen Mauslinien mit großer quantitativer sowie qualitativer Varianz. Alle Tiere hatten ein reduziertes Lumen. Während dies bei den meisten Linien auf ein negatives Remodelling, das heißt eine Reduktion des Gefäß-Durchmessers zurückzuführen war, zeigten die FVB/NJ eine sehr stark ausgeprägte Neointima-Bildung. Dies lässt darauf schließen, dass der Prozess des vaskulären Remodellings genetisch determiniert ist.

Unterschiede zeigen sich in der Sensibilität verschiedener Genotypen gegenüber glomerulärer Schäden nach 5/6-Nephrektomie. Während FVB/N-Mäuse einen

## Einleitung

ausgeprägten Nierenschaden aufwiesen, zeigten sich die C57BL/6-Tiere resistent gegenüber renaler Schädigung (Fraune *et al.*, 2012; Kirchhoff *et al.*, 2008).

Für die Mauslinie spezifische Antworten auf Pathologien werden zudem in der Wundheilung nach Myokardinfarkt beobachtet (van den Borne *et al.*, 2009). Auch in der Infarktgröße scheint der genetische Hintergrund neben anderen Faktoren Einfluss zu haben (Guo *et al.*, 2012).

In ihrer Arbeit zum kardiovaskulären Antwortverhalten auf beta-adrenerge Blockade oder Aktivierung in 23 durch Inzucht erzeugte Mauslinien zeigten Berthonneche *et al.* eine inter-individuelle Varianz (Berthonneche *et al.*, 2009). Charakterisiert wurde der kardiovaskuläre Phänotyp unter anderem durch Bestimmung der Herzfrequenz, des systolischen Blutdrucks sowie später Parameter der entnommenen Herzen. Das Ergebnis präsentierte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen genetischen Hintergründen. Diese Arbeit bietet Anhalt zur Annahme genotypabhängiger Unterschiede verschiedener Mauslinien. Neben methodischen Schwächen ist diese Arbeit jedoch durch fehlende funktionelle Konsequenzen der Herzfrequenz-Unterschiede limitiert. Auch auf Frequenzabhängigkeiten der Ergebnisse wird nicht weiter eingegangen. Da das Tier zum Zeitpunkt der Messung nicht frei beweglich ist, können aktivitätsabhängige Unterschiede nicht erfasst werden (Brooks *et al.*, 1996).

Die in den Kognitionswissenschaften gezeigten Genotypabhängigkeiten stehen unter anderem unter dem Einfluss adrenerger Stimulation. Sie legen somit nahe, dass es auch im kardiovaskulären Raum Unterschiede gibt, was zu weiteren Untersuchungen anregt.

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Genotypabhängigkeiten ergibt sich nun die Frage nach der Übertragbarkeit auf weitere kardiovaskuläre Grundeigenschaften, sich daraus ergebende funktionelle Konsequenzen und das Antwortverhalten auf eine medikamentöse Beeinflussung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade.

Die Maus stellt ein weit verbreitetes Modell in der Untersuchung von Arrhythmien dar. Bei vielfach gezeigten Genotypabhängigkeiten ist nun die Frage, ob sich diese auch in der Neigung, Herzrhythmusstörungen unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu entwickeln, widerspiegelt.

Des Weiteren werden Mausmodelle häufig in der Grundlagenforschung menschlicher Erkrankungen genutzt. Da die hypertrophe Kardiomyopathie eine strukturelle Herzerkrankung ist, die mit Herzrhythmusstörungen einhergeht, werden die Überlegungen im Folgenden auf dieses pathophysiologische Modell übertragen.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Fragen:

- Gibt es Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich
  - ihrer Herzfrequenz und somit ihrer basalen sympathischen Aktivierung und in der Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Blockade?
  - ihrer physischen Aktivität und der Aktivitätsabhängigkeit ihrer Herzfrequenz?
  - ihrer Arrhythmieneigung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation?
- Lassen sich eventuelle Unterschiede auf ein etabliertes transgenes Modell zur hypertrophen Kardiomyopathie übertragen?

Um diese Fragen zu klären werden ein Mausmodell, Telemetrie und medikamentöse Beeinflussung durch Isoprenalin bzw. Metoprolol gewählt. Verwendet werden häufig eingesetzte Mauslinien, die bereits in anderen Studien eine große Streubreite der Ergebnisse aufgezeigt haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zeitschema

Die gesamten Messungen wurden nach dem in Abbildung 4 dargestellten Schema durchgeführt. Es handelt sich um gepaarte Versuche, bei denen jedes Tier alle Einzelmessungen durchläuft.

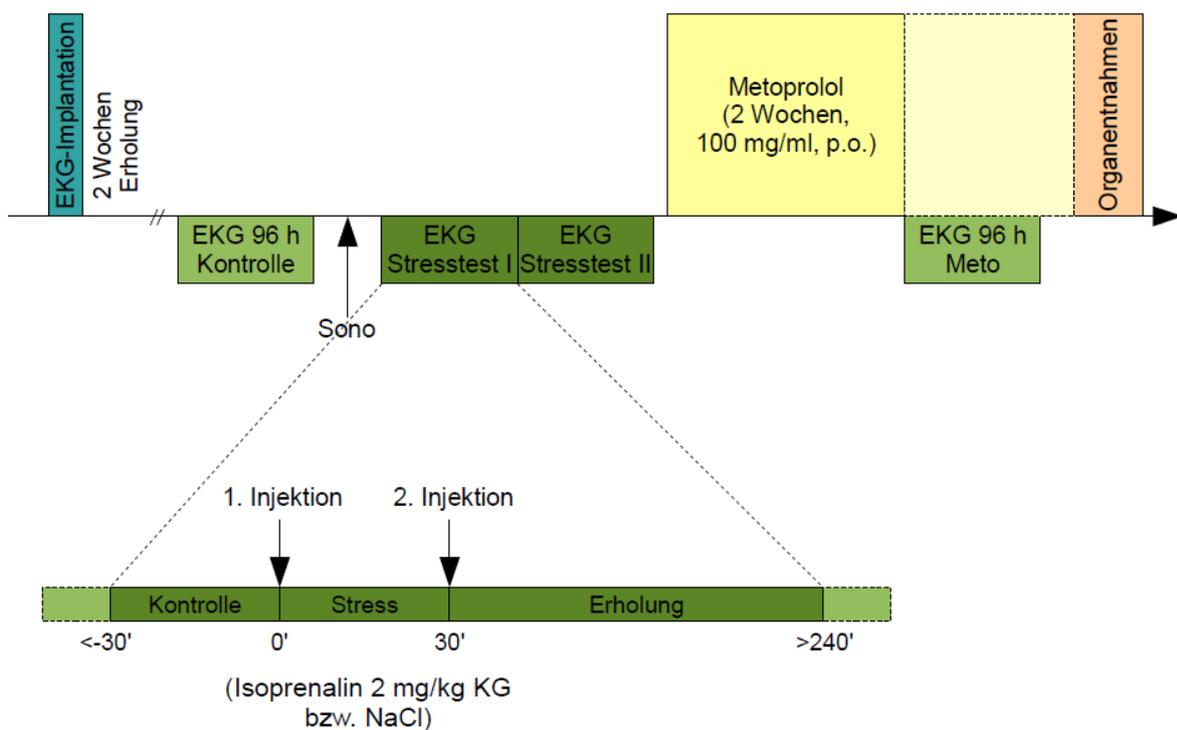


Abbildung 4 – Übersicht des Versuchsablaufs

Im Alter zwischen sieben und zehn Wochen wird den Tieren ein radiotelemetrischer Sender zur Aufnahme von EKG und Aktivität implantiert. Nach einer Erholungszeit von vierzehn Tagen wird eine Kontroll-EKG-Messung unter Normalbedingungen gestartet. Des Weiteren erhält jede Maus eine transthorakale Echokardiographie (Sono). Anschließend wird jedes Tier einem kardialen Stressstest nach dem Crossover-Design unterzogen. Das bedeutet, dass jedes Tier zeitlich konsekutiv

sowohl mit Isoprenalin (Wirkstoff) als auch mit NaCl-Lösung (Kontrolle) behandelt wird und somit als seine eigene Kontrolle dient. Um einen Überhang-Effekt zu vermeiden liegt eine Woche zwischen den beiden Versuchen. Die Verabreichung erfolgt in randomisierter Reihenfolge. Nach der  $\beta$ -adrenergen Stimulation beginnt eine Aufsättigung mit dem Medikament Metoprolol über zwei Wochen, nach der eine zweite EKG-Messung vorgenommen wird. Die Tiere werden bis zur Organentnahme mit Metoprolol behandelt.

### 2.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um Männchen im Alter von sieben bis zehn Wochen zu Beginn der Versuchsreihe.

Die Tiere werden individuell in Standardkäfigen Typ II Long (Grundfläche ca. 540 cm<sup>2</sup>) gehalten. Die telemetrischen Messungen machen die Einzelhaltung erforderlich. In Form von Kosmetiktüchern (Clou, WEPA Professional) wird ihnen Nestbaumaterial zur Verfügung gestellt, zur Einstreu dient Holzgranulat. Ein Käfigwechsel erfolgt einmal wöchentlich, dabei wird das Tiergewicht mit einer Präzisionswaage (Excellence plus, Mettler Toledo, Gießen) gemessen und dokumentiert.

Um den biologischen Rhythmus der Tiere aufrechtzuerhalten, unterliegt der Tierraum einem strikten 12h-Tag-/Nacht-Rhythmus. Dabei entspricht der Zeitraum von 7 bis 19 Uhr dem Tag und von 19 bis 7 Uhr der Nacht. Die Temperatur liegt zwischen 20 und 23 °C, die Luftfeuchtigkeit bei 60±10 %.

Die Tiere haben jederzeit freien Zugang zu Futter (LASQCdiet<sup>®</sup> Rod16-R, LASvendi) und Wasser bzw. Wasser und Metoprolol. Der Gesundheitszustand wird anhand der Parameter Gewicht, Aktivität und Habitus über den gesamten Versuchszeitraum regelmäßig kontrolliert.

Unsere Versuche wurden unter dem Aktenzeichen 103/11 von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die vier folgenden Mausstämme verglichen: Black Swiss (BS), C57/Black6 (C57), Balb/C und FVB/N. In einem zweiten Schritt wurde eine Knock-In-Mutation (Mybpc3) in die Hintergründe BS und C57 eingebracht und mit dem jeweiligen Wildtypen verglichen. Dabei hatte jede Versuchstiergruppe eine Größe von sechs Mäusen (Abb. 5).

Messreihe	BS		C57/B6		Balb/C	FVB/N
	Mybpc3-BS-KI	Mybpc3-BS-WT	Mybpc3-C57-KI	Mybpc3-C57-WT		
1				2	2	
2	2		2			2
3	2		2	2		
4	2		2		2	
5		3				1
6		3		2		
7					2	3
<b>Gesamt</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
						

Abbildung 5 – Übersicht der Versuchstiere. Bilder ©2013 Charles River Laboratories International, Inc.

## 2.3 Telemetrische EKG- und Aktivitäts-Messung

### 2.3.1 Implantation der Telemetriesender

Um die Herzfrequenz, die körperliche Aktivität und die eventuelle Entstehung von Arrhythmien am wachen Tier kontrollieren und aufnehmen zu können, wird jedem Tier ein telemetrischer EKG-Sender (Data Sciences International; TA11ETA-F10) implantiert.

Bei dem EKG-Sender handelt es sich um ein circa 1,6 g schweres, drahtloses Implantat, welches über einen kleinen Magneten ein- und ausgeschaltet werden kann. Befindet sich der eingeschaltete Sender über der Telemetrieplatte (Data Sciences International, PhysioTel<sup>®</sup> Receivers – RPC-1), empfängt diese ein Signal.

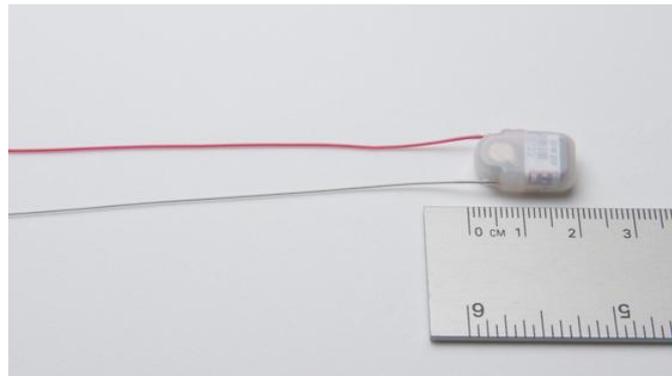


Abbildung 6 – DSI's PhysioTel® ETA-F10 Sender zur radiotelemetrischen EKG-Messung für Mäuse. ©2012 Data Sciences International

Die Maus wird mittels 3-5%igem Sevofluran (Sevorane®, ABBOTT) und medizinischem Sauerstoff (99,5%ig, Technische und Medizinische Gas GmbH) inhalativ narkotisiert und auf einer Wärmeplatte fixiert, um eine Auskühlung während der Operation zu vermeiden. Nach initialer Anflutung in einer Narkosekammer (Eigenbau der Arbeitsgruppe) wird die Narkose über eine Atemmaske (Eigenbau der Arbeitsgruppe) weitergeführt. Der Brustbereich wird desinfiziert (Octenisept®, Schülke&Mayr GmbH) und enthaart (Veet® Enthaarungs-Mousse, Reckitt Benckiser). Die Maus erhält Rimadyl® (Carprofen; 5 mg/kg KG, s.c.) gegen die Schmerzen sowie Baytril® (Enrofloxacin; 5 mg/kg KG, s.c.) als Infektionsprophylaxe. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, werden diese mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe® (Dexpanthenol, Bayer) bedeckt.

Ist die Narkose ausreichend tief, wird ein circa 2 cm langer, leicht schräg von oben rechts nach unten links verlaufender Hautschnitt über dem Brustbein gesetzt. Von dort aus wird vorsichtig nach rechts dorsal das subkutane Unterhautgewebe gelöst, so dass ein Tunnel entsteht, über den der EKG-Sender auf dem Rücken der Maus positioniert wird. Anschließend werden die Elektroden nach der Einthoven-Ableitung II (RA - LF) auf den Muskeln platziert und festgenäht (Instrumenteller Knoten: der längere Faden wird doppelt um den Nadelhalter gewickelt, Fassen des kürzeren Fadens und Zuziehen; Fixieren durch zwei einfache gegenläufige Knoten). Dabei wird die negative (weiße) Elektrode über dem rechten Musculus pectoralis gesetzt,

## Material und Methoden

und die positive (rote) links, etwas unterhalb des Processus xiphoideus fixiert. Es kann nun eine bipolare Extremitäten-Ableitung erfolgen. Sitzt der Sender, wird die Haut mittels resorbierenden Nahtmaterials (Excel 5-0, Ethicon) und U-Haft-Technik wieder zugenäht. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, die Naht im Anschluss zusätzlich zu klammern (Reflex-Klammern, FST 7 mm) und mit Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>, B.BRAUN) zu stabilisieren.

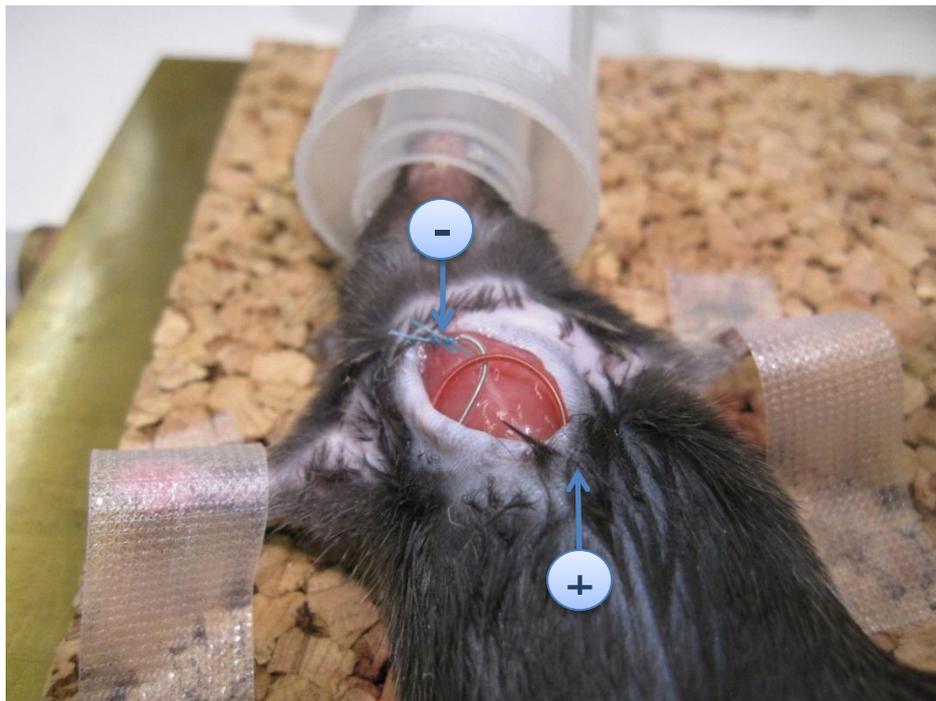


Abbildung 7 – Anordnung der Elektroden des radiotelemetrischen EKG-Senders

Abschließend erhält die Maus eine subkutane Infusion von NaCl (0,5 ml; 0,9%; B.BRAUN) und Glucose (0,5 ml; 5%; B.BRAUN). Durch die Inhalationsnarkose erwacht die Maus innerhalb weniger Minuten. Es erfolgt eine 5-tägige post-operative Beobachtung, wobei Naht und Habitus der Maus regelmäßig kontrolliert werden. Die Messungen beginnen frühestens 14 Tage nach Operation, wenn die Wundnaht abgeheilt ist.

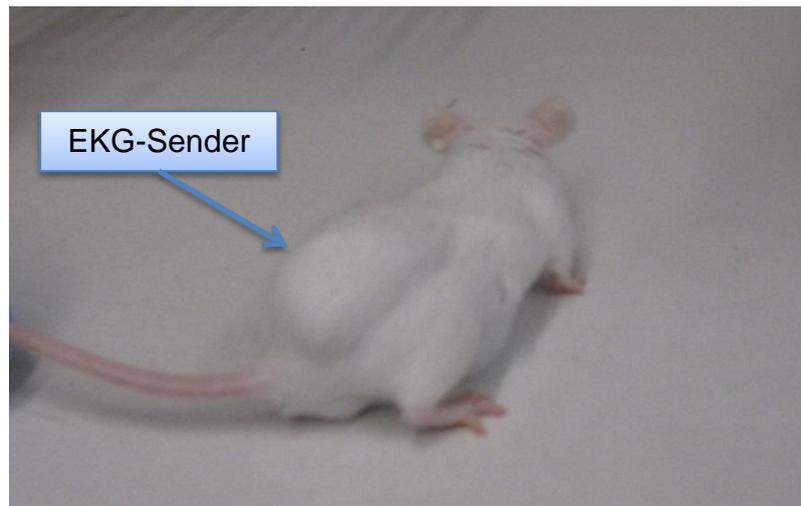


Abbildung 8 – Maus mit implantiertem EKG-Sender

### 2.3.2 Abbruchkriterien nach Sender-Implantation

Tabelle 1 – Abbruchkriterien nach Sender-Implantation

Beobachtung	Punktebewertung
<b>I Körpergewicht</b> (bezogen auf Ausgangsgewicht)	
Unbeeinflusst oder Anstieg	0
Reduktion >10%	10
Reduktion >20%	20
<b>II Allgemeinzustand</b>	
Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber	0
Fell stumpf, gestäubt; Augen trüb	5
Verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung; hoher Muskeltonus; Dehydratation	10
Krämpfe; Lähmungen; Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an	20
<b>III Spontanverhalten</b>	
Normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier)	0
Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
Isolation; Schmerzäußerung; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypien; Koordinationsstörungen	10
Automutilation	20

---

### IV Versuchsspezifische Kriterien

Wundheilungsstörungen (z.B. Rötungen, Schwellungen)	10
Schwere Wundheilungsstörungen um den telemetrischen Sender oder die Ableitkabel (z.B. Nekrosen, klaffende Wunde, über Tage nicht heilende Wunden); Kabelbruch der telemetrischen Sender; vollständiger Funktionsausfall der Sender; Druckstellen mit Gefahr des Durchbruchs an der Stelle des Senders	20

### Bewertung / Maßnahmen

Keine Belastung	0
Geringe Belastung: sorgfältig beobachten (1x tägl.), evtl. unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter)	5-9
Mittelgradige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiose)	10-19
Hochgradige Belastung (>72 h): Tierschutzbeauftragten konsultieren, tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern	≥20

Ab einer Gesamtpunktzahl von mehr als 20 erfolgt die vorzeitige Tötung des Tieres.

Wegen stark eingeschränkten Allgemeinzustandes (20 Pkt.) und gestörten Spontanverhaltens (10 Pkt.) musste von einer hochgradigen Belastung (>20 Pkt.) eines der FVB/N-Tiere ausgegangen werden, weshalb das Tier vorzeitig getötet wurde. Die N-Zahl der FVB/N-Tiere reduziert sich somit auf fünf.

### 2.3.3 Messung

Ist die Wundnaht regelhaft abgeheilt, wird zwei Wochen nach Sender-Implantation eine Baseline-Messung gestartet. Hierzu wird der Käfig auf den Receiver gestellt und der Sender mittels eines kleinen Magneten eingeschaltet. Von den Telemetrieplatten, die über eine Matrix (Data Exchange Matrix, Data Sciences International) mit dem Computer verbunden sind, werden die Daten auf der Festplatte abgespeichert. Die Aufnahme erfolgt nun über 96 Stunden intermittierend, das heißt alle fünf Minuten über jeweils eine Minute. Aufgezeichnet werden EKG, die daraus ermittelte

Herzfrequenz und die körperliche Aktivität des Tiers. Das Tier ist während der gesamten Messzeit frei im Heimatkäfig beweglich, unterliegt somit seinem natürlichen Tag-/ Nacht-Rhythmus und hat uneingeschränkten Zugang zu Futter und Trinken.

### 2.3.4 Auswertung der telemetrischen Daten

Für die Auswertung werden folgende Programme benötigt: Dataquest A.R.T.<sup>TM</sup> Analysis v4.0 (Data Sciences International), Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 (Microsoft, Redmond, USA), und Graph Pad Prism<sup>®</sup> v5.02 (La Jolla, CA - USA).

Die mit Dataquest A.R.T.<sup>TM</sup> Acquisition (DSI) aufgezeichneten Daten werden zunächst in Dataquest A.R.T.<sup>TM</sup> Analysis geladen und ausgewählt. Dann werden sie nach Excel<sup>®</sup> 2010 (Microsoft) exportiert, wo sie mit einer Excel<sup>®</sup>-Erweiterung (Autor: N.Tschech, UK Hamburg-Eppendorf), weiter aufbereitet und ausgewertet werden können. Ausgegeben werden von dieser Erweiterung folgende Werte:

- Aufbereitete Rohwerte: gemittelt über eine gemessene Minute, alle fünf Minuten wird für je eine Minute ein EKG geschrieben, die Herzfrequenz ermittelt und die physische Aktivität erfasst („scheduled“).
- Virtueller 24-Stunden-Rhythmus: alle Versuchstage werden zu einem virtuellen Versuchstag gemittelt; alle für die jeweilige Tageszeit verfügbaren Werte werden mit einbezogen.
- Tag-/Nacht-Mittelwerte: Der Tag ist definiert für den Zeitraum 7<sup>00</sup>-19<sup>00</sup> Uhr, die Nacht von 19<sup>00</sup>-7<sup>00</sup> Uhr.
- Klassierung: Darstellung in Klassen, zur Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität. Unabhängiger Parameter ist die Aktivität, abhängig davon die Herzfrequenz. Klasseneinteilung wie folgt (Abb. 9), die Werte innerhalb einer Klasse werden gemittelt.

Die Ergebnisse dieser verschiedenen Auswertungen werden in einzelnen neuen Datenblättern ausgegeben und können nun zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung nach GraphPad Prism® v5.02 kopiert werden.

Activity			
Klassenanzahl	Klassengrenzen		
7	Klasse	Von	Bis
		0	0
		1	5
		2	10
		3	15
		4	20
		5	25
		6	30
		7	300

Abbildung 9 – Angabe der Klassengrenzen zur Klassierung in der Excel®-Erweiterung

## 2.4 $\beta$ -adrenerge Stimulation im kardialen Stresstest

### 2.4.1 Versuchsdurchführung

#### 2.4.1.1 Ablauf des kardialen Stresstests

Um herauszufinden, ob die verschiedenen Genotypen Unterschiede in der Induzierbarkeit von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien) aufzeigen, müssen potentielle Unregelmäßigkeiten in der Herzaktion provoziert werden. Hierzu dient ein etablierter kardialer Stresstest (Wittkopper *et al.*, 2010), der auf medikamentöser  $\beta$ -adrenerger Stimulation basiert. Verwendet wird der nicht-selektive  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist Isoprenalin (( $\pm$ )-Isoproterenol, SIGMA, Bestell-Nr. I5627). Mindestens 30 Minuten vor Gabe des Pharmakons wird eine kontinuierliche EKG-Messung (Aufnahme mittels emka, iox2) gestartet, dann erfolgt die zweimalige intraperitoneale Injektion von Isoprenalin (2 mg/kg KG, gelöst in 150  $\mu$ l NaCl) im Abstand von 30 Minuten, womit eine maximale Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Kaskade erreicht wird.

## Material und Methoden

Die EKG-Aufzeichnung wird über mindestens 12 Stunden fortgeführt, um die gesamte Erholungszeit mit zu erfassen.

Um den Stress herausrechnen zu können, der allein durch das Handling während der Injektion entsteht, erfolgt eine Woche zuvor oder danach eine Kontrolle mit entsprechender Menge NaCl (0,9%, B.BRAUN) nach oben beschriebenem Ablauf.

### 2.4.1.2 Aufnahme des EKGs

Zur Aufnahme des EKGs während des Stresstests wird die Software iox2 (emka TECHNOLOGIES S.A., Paris, Frankreich) verwendet. Es findet eine über den Versuchszeitraum kontinuierliche Messung statt, während der EKG-Kurve und der aus den RR-Abständen errechnete Herzfrequenz-Verlauf jedes Tieres aufgezeichnet sowie in Echtzeit auf dem Bildschirm verfolgt werden können. Die beiden Injektionszeitpunkte werden manuell in der Aufnahme markiert.

## 2.4.2 Auswertung des EKGs

### 2.4.2.1 ecgAUTO

Anschließend wird das EKG mit ecgAuto v2.5.1.35 (emka TECHNOLOGIES S.A., Paris, Frankreich) ausgewertet. Dabei analysiert das Programm die Aufnahme über fünf Stunden ab Beginn der Kontrollmessung nach vorgegeben Kriterien. In einem ersten Schritt werden alle nicht als QRS-Komplex erkannten Schläge in einer Liste aufgeführt und manuell daraufhin überprüft, ob es sich um Arrhythmien, z.B. Ventrikuläre Extrasystolen (VES), handelt.

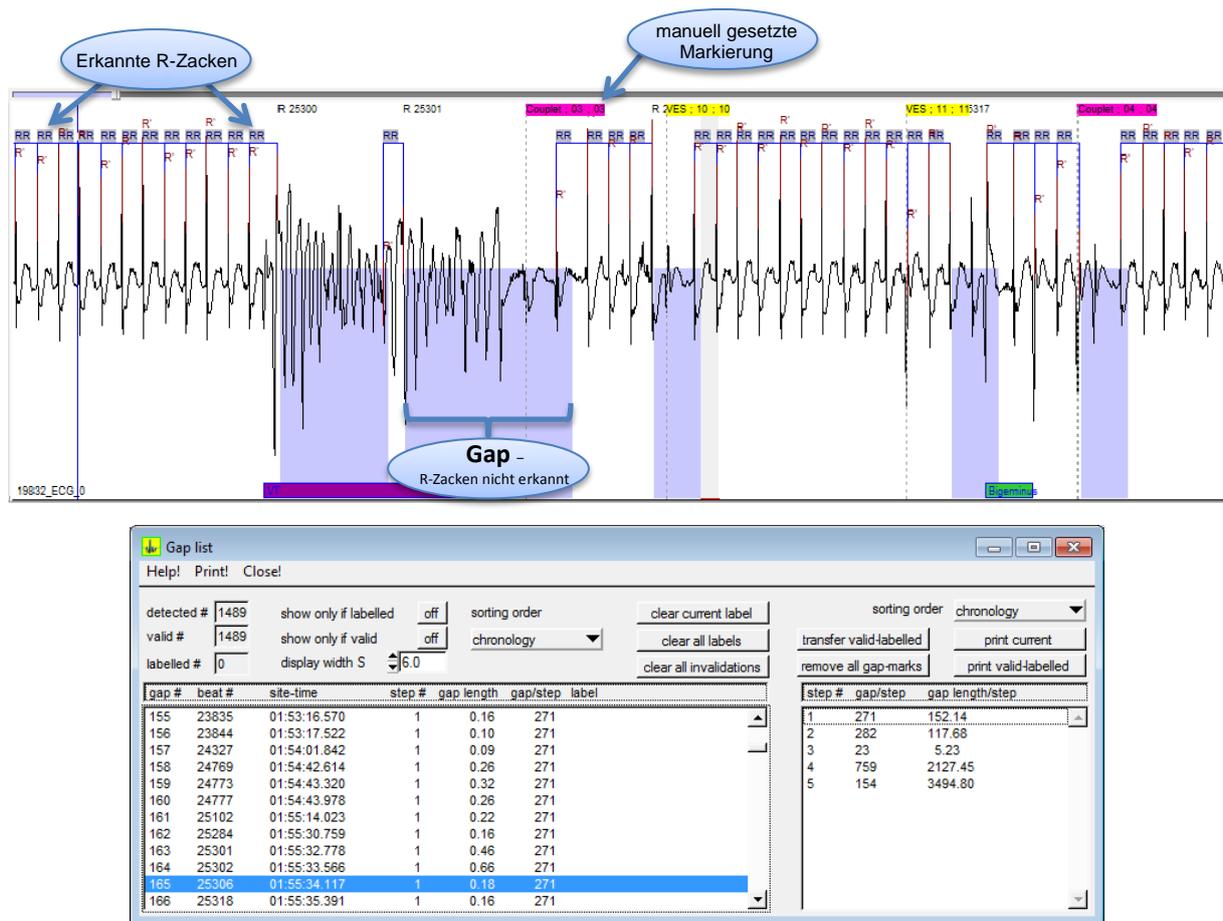


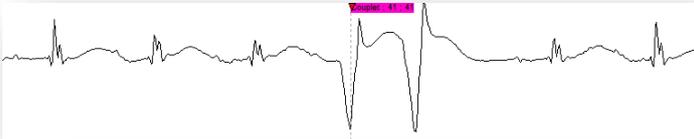
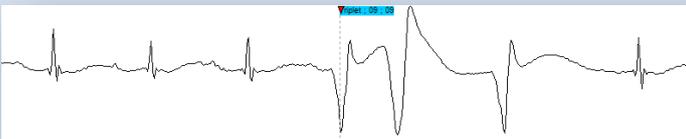
Abbildung 10 – Gap-Analyse in ecgAuto v2.5. Oben: Nicht erkannte Bereiche (Gaps, violett hinterlegt). Unten: Auflistung aller nicht erkannten Bereiche (Gap list)

Des Weiteren wird das EKG anhand der RR-Abstände nach Unregelmäßigkeiten durchsucht. Das Programm listet dabei alle Schläge auf, die außerhalb eines definierten Bereichs von 0,7 bis 99,3% liegen.

Arrhythmien lassen sich in supraventrikuläre und ventrikuläre Rhythmusstörungen unterteilen, wobei bei dieser Arbeit ein spezielles Augenmerk auf ventrikuläre Ereignisse gerichtet wird. Diese haben in der Regel fatalere Folgen und sind enger mit linksventrikulärer Hypertrophie verknüpft. Alle erkannten Unregelmäßigkeiten werden manuell markiert und wie folgt benannt (Tab. 2). Die Einteilung der Ereignisse basiert auf den Lambeth Conventions (Walker *et al.*, 1988).

Bei mit Artefakten belasteten EKG-Ausschnitten, etwa durch übermäßige Aktivität des Tieres wie zum Beispiel beim Kratzen hinter dem Ohr, ist die eindeutige Zuordnung zu arrhythmischem Ereignis oder Artefakt nur schwer möglich, so dass die Einteilung nach bestem Wissen, im Zweifel gegen eine Arrhythmie, erfolgt. Bei der geringen Anzahl kritischer Schläge wird eine zweite Meinung eingeholt und die Zuordnung nach dem Konsens vorgenommen. Eine genotypabhängige Häufung ist hierbei nicht festzustellen. Die technische Limitation, die ein Ein-Kanal-EKG mit sich bringt, ist in dieser Arbeit zu vernachlässigen, da sich diese vor allem auf die Auswertung supraventrikulärer Ereignisse bezieht.

Tabelle 2 – Einteilung der Arrhythmien

Form	Definition/ Abbildung
<b>Ventrikuläre Extrasystolen (VES)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• einzelner verfrüht einfallender Schlag</li><li>• AV-Kopplung: zu kurzes/nicht nachweisbares PQ-Intervall</li><li>• kompensatorische Pause</li><li>• evtl. deformierter QRS-Komplex, häufig verbreitert</li><li>• ...NNN <b>V</b> NN...</li></ul> 
<b>Couplet</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• zwei aufeinander folgende VES</li><li>• ...NNN <b>VV</b> NN...</li></ul> 
<b>Triplet</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• drei aufeinander folgende VES</li><li>• ...NN <b>VVV</b> NN...</li></ul> 

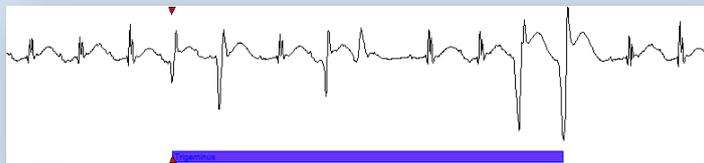
### Bigeminus

- 1:1 Kopplung von normalem Schlag und VES
- Umfang: mindestens 2x folgenden Ablauf:
- ...NN **V N V** NN...



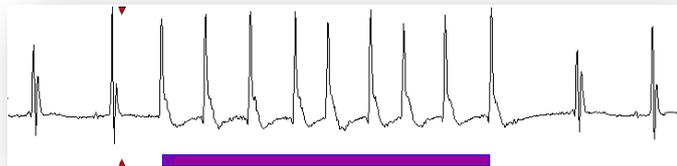
### Trigeminus

- 1:2 Kopplung von normalem Schlag und VES
- Umfang: mindestens 2x folgenden Ablauf:
- ...NN **VV N VV N VV** NN...



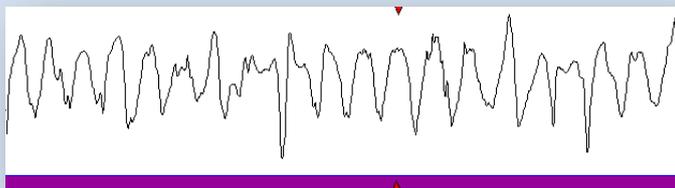
### Ventrikuläre Tachykardien (VT)

- ≥4 gekoppelte VES
- AV Dissoziation
- kein konstantes PQ-Intervall
- ...NNN **VVVV(...)** NN...



### Torsade-de-Pointes-Tachykardie (TdP)

- typisches spindelförmiges Aussehen
- um die isoelektrische Line oszillierende, unförmige Kammerkomplexe



N= Normaler Schlag, V= Ventrikuläre Extrasystole, VES

Neben der Arrhythmie-Entstehung wird auch der Herzfrequenzverlauf während des Stresstests ausgewertet. Hierfür werden die fünf Stunden ab Beginn der Baseline-Messung in „Steps“ à 60 Sekunden eingeteilt und die Herzfrequenz für jedes dieser Ein-Minuten-Intervalle gemittelt. Die Werte werden nach GraphPad Prism<sup>®</sup> v5.02 kopiert und dort graphisch dargestellt.

### 2.5 $\beta$ -adrenerge Blockade mittels Metoprolol

Blocker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade werden auch in der Humanmedizin verwendet. Um zu untersuchen, wie diese sich auf die Herzfrequenz, deren Regulation und die Herz-Kreislaufmorphologie in den unterschiedlichen Tiergruppen auswirken, werden die Tiere mit dem  $\beta_1$ -Adrenozeptorblocker Metoprolol (Metoprolol tartrate, Fa. SIGMA, Bestell-Nr. M5391) behandelt (Becher *et al.*, 2012). Die Gabe einer Dosis von 100 mg/kg/Tag erfolgt oral über das Trinkwasser. Das pulverförmige Metoprolol wird hierzu in Leitungswasser gelöst und in lichtundurchlässige Trinkflaschen gefüllt. Die Dosis wird aufgrund einer in der Arbeitsgruppe vorhergegangenen Dosisfindungs-Vorstudie für eine geschätzte Trinkmenge von 3,5 ml/Tier/Tag angesetzt. Nach einer Aufsättigungsphase von 14 Tagen wird dann erneut über 96 Stunden intermittierend eine EKG-Messung durchgeführt.

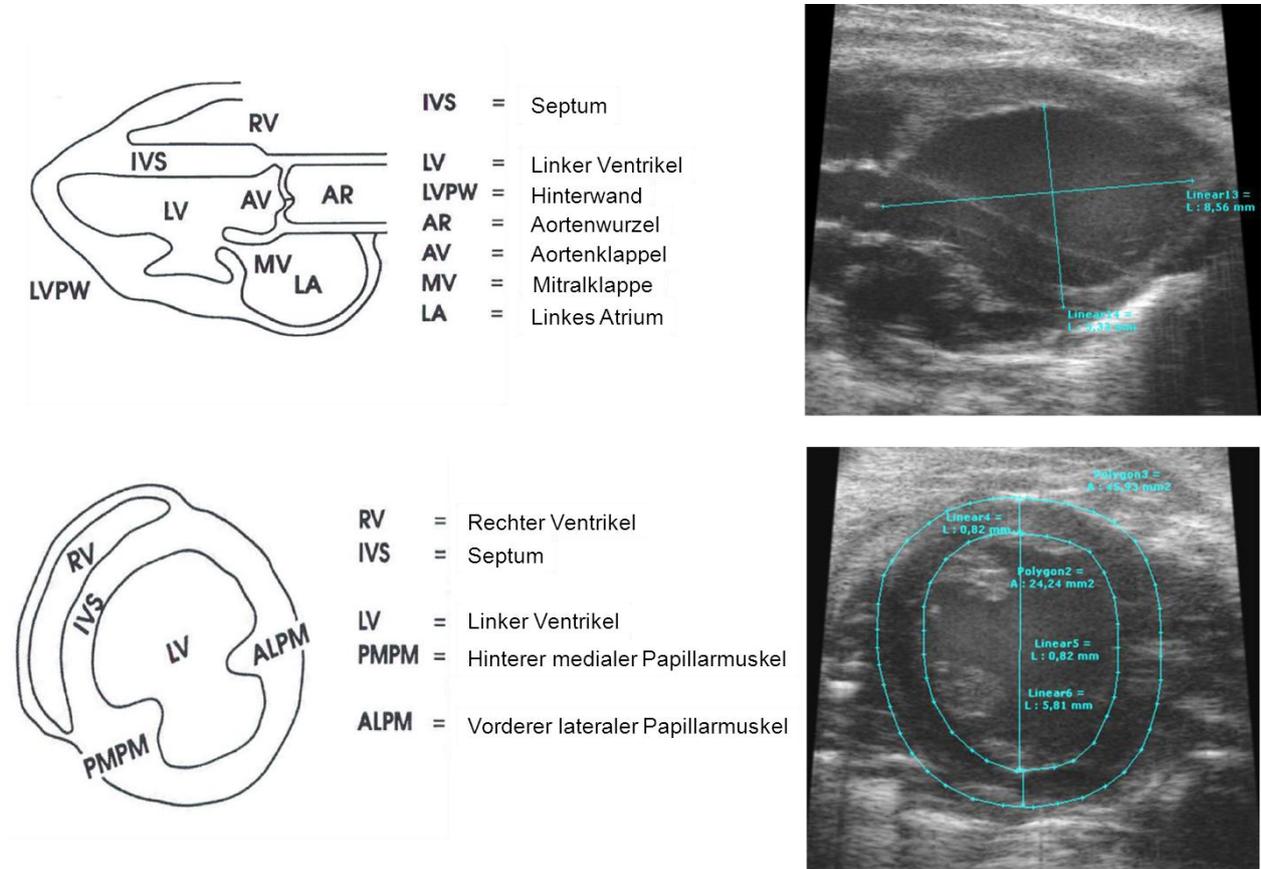
Die Auswertung der Daten erfolgt entsprechend der Baseline-Messung (Vgl. 2.3.4).

### 2.6 Echokardiographie

Bei allen Versuchstieren wird eine transthorakale kardiale Sonographie durchgeführt (Sono). Durchführung mit dem Vevo 2100 System (Visual Sonics Inc., Toronto, Canada) und Auswertung erfolgen durch Herrn Thomas Schulze (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE Hamburg).

## Material und Methoden

Zur Untersuchung werden die Mäuse mit Isofluran (1,3-3% Forene<sup>®</sup> 100%, ABBOTT) narkotisiert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert.



**Abbildung 11 – Schematische Darstellung der Ultraschallparameter.** Links: Skizze des Herzens im Echokardiogramm. Rechts: Messung der Ultraschallparameter. Modifiziert nach Florian Weinberger (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE Hamburg).

Folgende Parameter werden sowohl in der Diastole (d) als auch in der Systole (s) über das Vevo 2100 Messprogramm erfasst:

**Tabelle 3 – Sonographisch erfasste Parameter**

<b>Kurze Achse</b>	Linksventrikuläre enddiastolische bzw. AWT <sub>hd</sub> /s	bzw. bzw.	<b>AWT<sub>hd</sub>/s</b>	<b>bzw.</b>
	-systolische Vorderwand- bzw. PW <sub>hd</sub> /s		<b>PW<sub>hd</sub>/s</b>	
	Hinterwandstärke			
	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. LVID <sub>d</sub> /s	bzw. bzw.	<b>LVID<sub>d</sub>/s</b>	
	-systolischer Innendurchmesser			
	Innere/ äußere linksventrikuläre Fläche		<b>Area endo/epi</b>	

<b>Lange Achse</b>	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. <b>long diam d/s</b> -systolischer Längendurchmesser
	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. <b>short diam d/s</b> -systolischer Querdurchmesser
<b>EKG</b>	Herzfrequenz <b>HF</b>
	Atemfrequenz <b>AF</b>
<b>Errechnete Parameter</b>	Linksventrikuläre <b>FAS (%)</b> Flächenverkürzungsfraktion $(= (\text{Area endo d} - \text{Area endo s}) / \text{Area endo d} \times 100)$
	Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. <b>LVEDV/LVESV</b> -systolisches Volumen $(= 5/6 \times \text{long diam d/s} \times \text{Area endo d/s})$
	Ejektionsfraktion $(= (\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV} \times 100)$ <b>EF</b>
	Linksventrikuläre Masse (in mg) $(= 1,05 \times (5/6 \times \text{Area epi d} \times (\text{long diam d} + t)) - (5/6 \times \text{Area endo d} \times \text{long diam d}))$ . Hierbei stellt 1,05 das spezifische Gewicht des Muskels dar, t steht für die repräsentative myokardiale Wanddicke, gebildet aus dem Mittelwert der linksventrikulären enddiastolischen Vorderwand- und Hinterwandstärke. <b>LVM</b>
	Linksventrikuläre Masse (in mg) in der Diastole ( <i>siehe LVM</i> ) pro g Körpergewicht. <b>LVMd/KG</b>

## 2.7 Re-Genotypisierung

Zur Bestätigung des Genotyps (WT oder KI) werden vor Beginn der Versuchsreihe Ohrbiopsien zur Re-Genotypisierung genommen. Bis zur DNA-Extraktion werden diese bei -20 °C gelagert.

Der Arbeitsschritt der Re-Genotypisierung wird von der Experimentellen Pharmakologie (AG Carrier) nach dem laboreigenen Protokoll durchgeführt. Für die DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation wird das REExtract-N-Amp™ Tissue\_PCR Kit (Sigma-Aldrich, Product Code: XNAT) verwendet.

## 2.8 Organentnahmen

Die Tiere werden gewogen und der zu Beginn der Versuchsreihe implantierte Mikrochip wird ausgelesen, um eine Verwechslung der Tiere auszuschließen.

Zur Organentnahme werden die Tiere mittels Isofluran (Forene<sup>®</sup>100%, ABBOTT) in Narkose versetzt. Sobald die Maus schläft, erfolgt eine retrobulbäre Blutentnahme mit direkt angeschlossener Blutgasanalyse. Das restliche abgenommene Blut wird in einer mit K<sup>+</sup>-EDTA versetzten Microvette (Microvette<sup>®</sup> 500 K3E, SARSTEDT) aufgefangen, zehn Minuten bei 4 °C und 2000 rcf zentrifugiert, das Plasma wird abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

Anschließend werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Es folgt die Entnahme des Herzens, der Aorta thoracica, und jeweils einer Niere.

Die entnommenen Herzen werden mit gekühltem NaCl (0,9%, B.BRAUN) gespült und gewogen, nach Abtrennung der Vorhöfe wird auch das jeweilige Gewicht von Ventrikel und Vorhof nochmals dokumentiert. Zur Fixierung von einem Teil des linken Ventrikels und der Aorta wird Formalin (Histofix<sup>®</sup>, 4%; ROTH) verwendet, nach 24 Stunden findet die Umbettung in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit zugesetztem Natriumazid statt, dann erfolgt der Transport in die Mauspathologische Abteilung, wo die Proben getrocknet, in Paraffin eingebettet und geschnitten werden.

Nieren, Vorhöfe und der andere Teil der Ventrikel werden des Weiteren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für spätere proteinbiochemische Untersuchungen gelagert.

Zusätzlich wird die Tibiallänge gemessen und dokumentiert, zur Re-Genotypisierung wird eine Ohrbiopsie genommen.

### 2.9 Statistik

Zur statistischen Analyse der Daten wird der für den jeweiligen Datensatz passende Test verwendet. Beim Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen kommen je nach Anzahl der variablen Faktoren Varianzanalysen zur Anwendung, bei einer Einflussvariablen (One-Way-ANOVA) mit anschließendem Newman-Keuls-Post-Test, bei zweifaktorieller Analyse (Two-Way-ANOVA) mit anschließendem post-hoc Bonferroni-Test. Zur Regressionsanalyse wird die lineare Regression verwendet.

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Als statistisch signifikant wird ein p-Wert  $< 0,05$  angesehen (z.B. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 3 Ergebnisse

Es werden zunächst die Ergebnisse der Charakterisierung der vier verschiedenen Mausstämme FVB/N, BS, C57 und Balb/C beschrieben. Anschließend erfolgt der Vergleich der HCM-Tiere und ihrer Wildtypen (Mybpc3-Tiere).

#### 3.1 Beschreibung der Wildtyp-Tiere

Bei Bildung der Versuchsgruppen wurde ein spezielles Augenmerk auf die Durchmischung der einzelnen Versuchsreihen gelegt. Ziel war es, eine Gruppengröße von sechs Tieren mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund zu erstellen, um einer Bias durch eventuelle Temperaturschwankungen, Jahreszeiten oder andere äußere Störfaktoren vorzubeugen. Die zeitgleiche Messung verschiedener Tiere erfolgte unter Inkaufnahme geringer Altersunterschiede zu Beginn der Versuchsreihe. Das Alter bei Start der Telemetriemessung streut somit in einem Bereich von neun bis dreizehn Wochen.

Auch die Organentnahmen fanden zu zwei Zeitpunkten gesammelt statt. Da zur geplanten Organentnahme eine Besetzung von mindestens sechs Mitarbeitern nötig ist, sollte so der organisatorische und personelle Aufwand minimiert werden. Die Tiere waren zu dem Zeitpunkt zwischen 20 und 29 Wochen alt.

Die Interpretation einiger Parameter, zum Beispiel des Gewichts, ist durch die Altersabhängigkeit nur bedingt möglich.

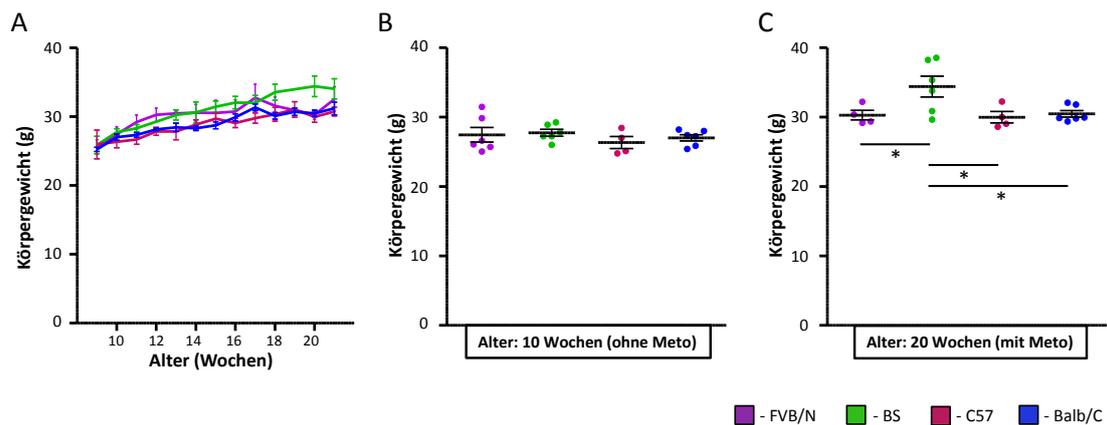
## Ergebnisse

### 3.1.1 Gewichtsverlauf der Tiere

Die Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum einmal wöchentlich auf ihren Gesundheitszustand hin kontrolliert. Dazu wurde unter anderem das Gewicht dokumentiert.

In Abbildung 12.A sieht man die kontinuierliche Gewichtszunahme mit steigendem Alter, angegeben in Wochen, in allen vier Versuchsgruppen. Im Alter von neun Wochen haben die Tiere im Durchschnitt ein Gewicht von circa 25 g. Bei den BS ist die Zunahme am größten.

Die Tiere sollten während der Telemetriemessung nicht gestört werden, weshalb vereinzelt Wochenwerte, wiederum zu unterschiedlichen Zeitpunkten, fehlen. Sprünge im Kurvenverlauf und die schlechtere Anwendbarkeit statistischer Verfahren sind außerdem auf das unterschiedliche Alter der Tiere bei Tötung zurückzuführen. Deshalb zeigt Abbildung 12.B den punktuellen Gewichtsvergleich der Tiere im Alter von 10 Wochen. Die Tiere sind zu diesem Zeitpunkt alle gleich schwer. Im Alter von 20 Wochen (Abb. 12.C) zeigt sich ein signifikant höheres Körpergewicht der BS-Tiere im Vergleich zu FVB/N, C57 und Balb/C. Die Tiere befinden sich hier unter dem Einfluss von Metoprolol.



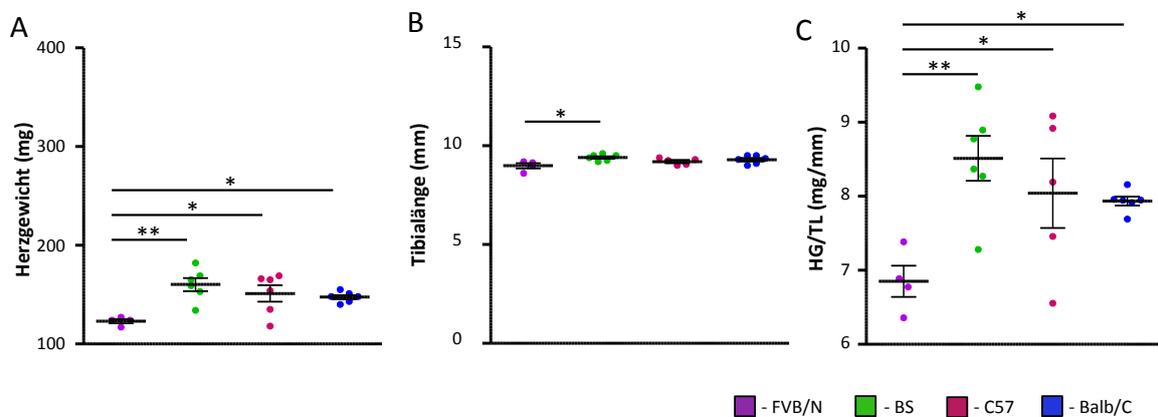
**Abbildung 12 – Gewichtsverlauf der WT-Tiere.** A: Entwicklung des Körpergewichts von Woche 9 bis 21,  $MW \pm SEM$  für jeden Genotypen; B: Körpergewicht der Tiere im Alter von 10 Wochen (keine Metoprolol-Gabe),  $N=6,6,4,6$ ; C: Körpergewicht der Tiere im Alter von 20 Wochen unter Metoprolol,  $N=4,6,4,5$ . Signifikanz berechnet mit einer One-Way ANOVA (B und C) \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Die altersabhängige Gewichtszunahme der Tiere liegt im Vergleich mit Wachstumskurven der großen amerikanischen Forschungsanstalt Jackson Laboratory in der Norm und lässt auf ein gutes Wohlbefinden der Tiere während des Versuchszeitraums schließen (The Jackson Laboratory ©2013, 2013).

### 3.1.2 Morphologie der Tiere

Vom äußeren Erscheinungsbild her zeigen die Tiere keine Unterschiede. Im Vergleich zeigen die FVB/N-Tiere ein signifikant niedrigeres absolutes Herzgewicht (Abb. 13.A), dieser Unterschied spiegelt sich auch im Verhältnis des Herzgewichts zur Tibiallänge (HG/TL, Abb. 13.C) wider. Ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Tibiallänge findet sich zwischen den FVB/N- und den BS-Mäusen (Abb. 13.B).



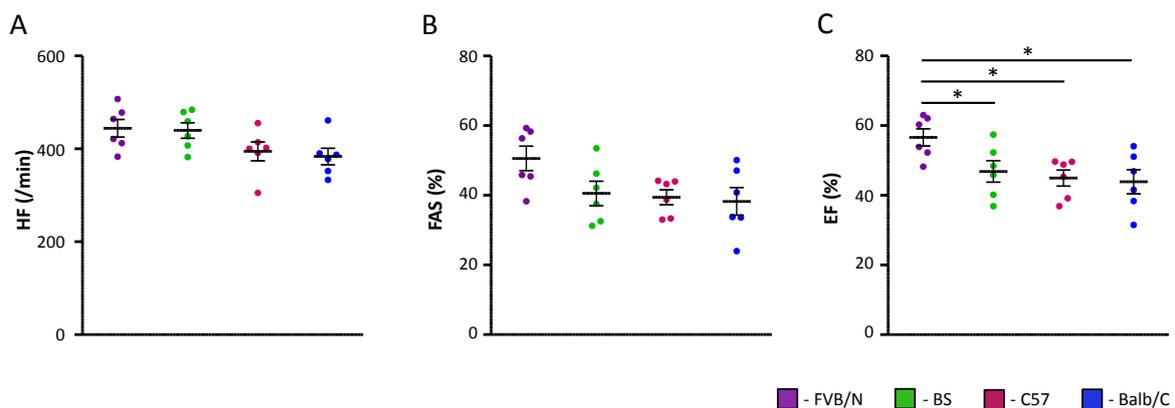
**Abbildung 13 – Herzgewicht der WT-Tiere.** A: absolutes Herzgewicht in Milligramm (mg); B: absolute Tibialänge in Millimetern (mm); C: Verhältnis Herzgewicht/Tibiallänge (HG/TL). N= 4,6,6,6; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

### 3.1.3 Echokardiographie

Der Abbildung 14.A-C sind die sonographisch erfassten Parameter Herzfrequenz, linksventrikuläre Verkürzungsfraktion und Ejektionsfraktion der WT-Tiere zu

## Ergebnisse

entnehmen. In Narkose liegt die Atemfrequenz bei allen Tieren unabhängig vom Genotyp im Bereich von 90 bis 170, im Mittel bei etwa 125 Atemzügen pro Minute. Dies legt eine sehr vergleichbare Narkosetiefe bei den Tieren nahe, was für die Beurteilung der folgenden Ergebnisse von zentraler Bedeutung ist. Unter diesen Bedingungen weist die Herzfrequenz der Tiere keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 14.A), obwohl die FVB/N- und BS-Mäuse eine tendenziell höhere Frequenz haben ( $P=0,07$ ). Auf die Unterschiede in der Herzfrequenz wird in dem Abschnitt der telemetrischen Messung näher eingegangen, da die Interpretation von Messungen in Narkose nur eingeschränkt möglich ist. In Abbildung 14.B präsentiert sich eine scheinbar höhere linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FAS, in Prozent) der FVB/N-Mäuse im Gegensatz zu den übrigen Versuchsgruppen, dieses Ergebnis trägt jedoch keine statistische Signifikanz. Entsprechend findet sich eine signifikant erhöhte Ejektionsfraction (EF; Abb. 14.C) bei den FVB/N-Mäusen.

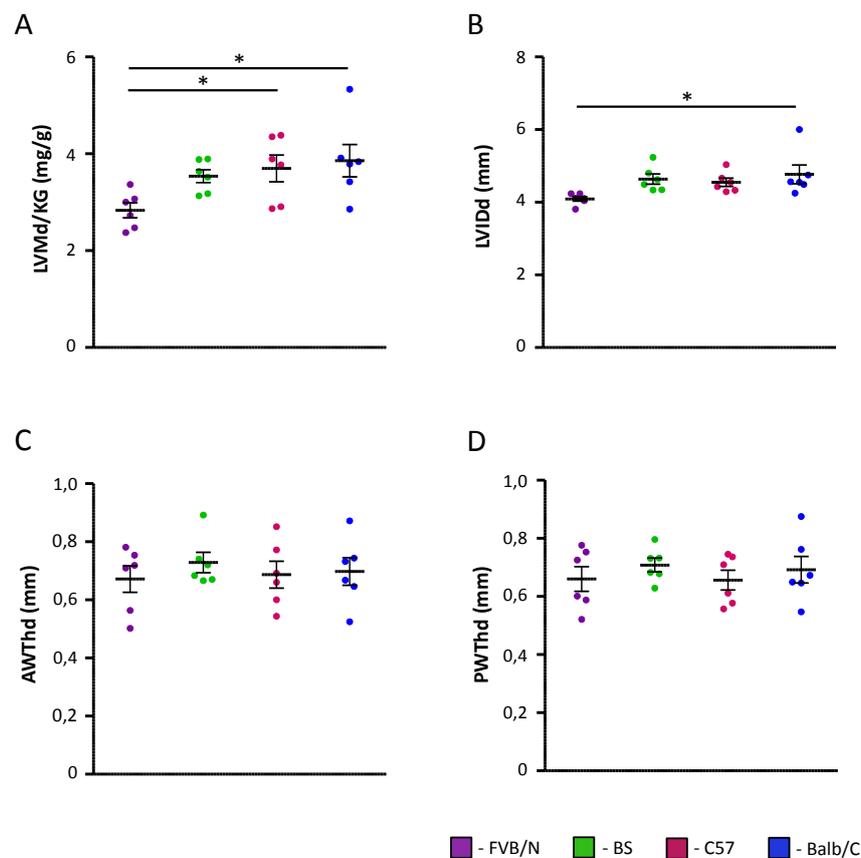


**Abbildung 14 – Echokardiographische Ergebnisse der WT-Tiere.** A: Herzfrequenz (HF, in Schlägen pro Minute) der Tiere unter Narkose (Isofluran) während des Ultraschalls; B: Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (*Fractional Area Shortening* – FAS, in Prozent); C: Ejektionsfraction (EF, in Prozent). N=6; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*,  $p < 0,001$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*,  $p < 0,05$ .

In den Abbildungen 15.A-D werden die zur Beurteilung des linken Ventrikels herangezogenen Parameter aus der Herzechokardiographie deutlich. Die aus sonographisch gemessenen Parametern errechnete Masse des linken Ventrikels in der Diastole pro Gramm Körpergewicht (LVMd/KG) der FVB/N-Mäuse ist signifikant niedriger als die der C57- und Balb/C (Abb. 15.A). Dies spiegelt die Messungen bei

## Ergebnisse

Organentnahme wider (Vgl. Abb. 13) und lässt sich nicht auf ein unterschiedliches Körpergewicht der Tiere zurückführen. Im Vergleich des diastolischen linksventrikulären Innendurchmessers findet sich eine statistische Signifikanz nur zwischen FVB/N- und Balb/C-Tieren (Abb. 15.B). Die Vorder- sowie die Hinterwanddicken unterscheiden sich nicht zwischen den verschiedenen Genotypen (15.C-D).



**Abbildung 15 – Beurteilung des linken Ventrikels der Wildtypen in der Herzechokardiographie.** A: diastolische linksventrikuläre Masse im Verhältnis zum Körpergewicht (LVMd/KG, errechnet); B: linksventrikulärer Innendurchmesser, diastolisch (LVIDd, gemessen); C: anteriore Wanddicke in der Diastole (AWTThd, gemessen); D: posteriore Wanddicke in der Diastole (PWTThd, gemessen). N=6; Signifikanz berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Abbildung 16 zeigt exemplarisch für jeden Genotyp das Herz in der Echokardiographie. Sie gibt nur eine Momentaufnahme der linken Ventrikel in der Längsachse wieder.

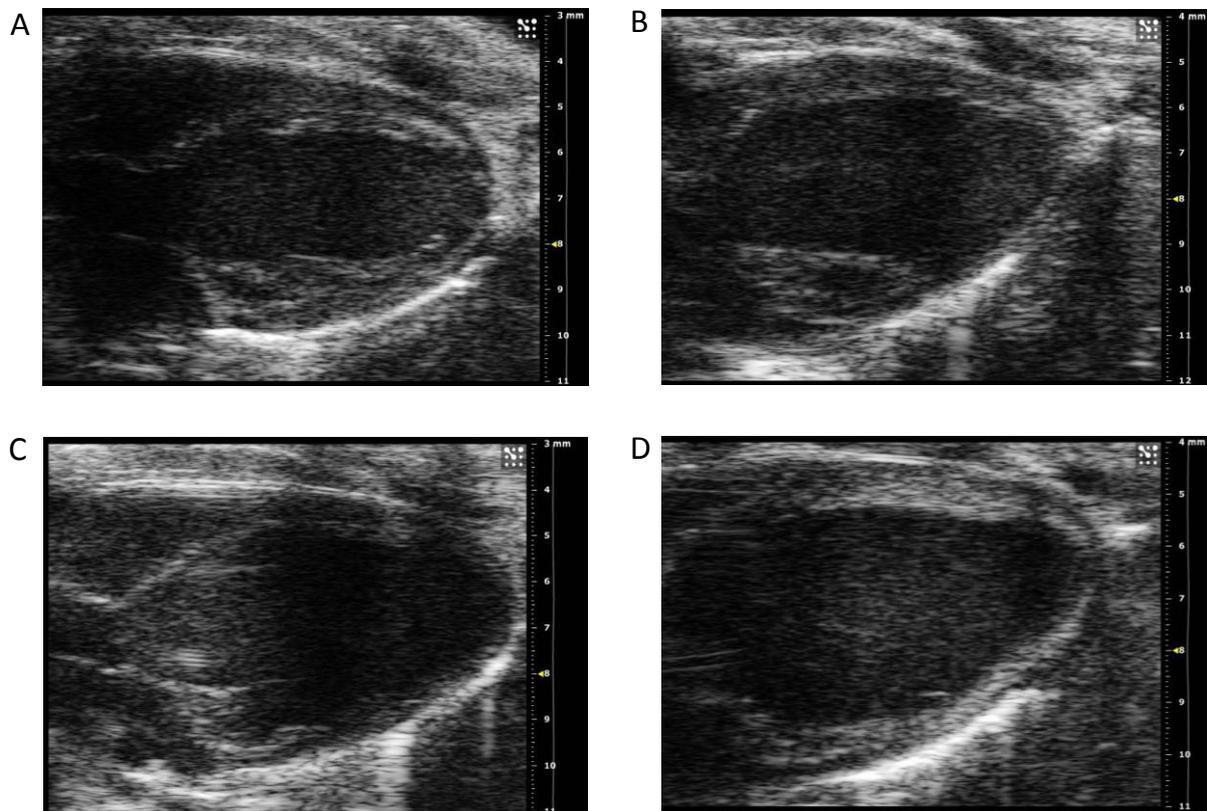


Abbildung 16 – Die WT-Hezen in der Echokardiographie. Exemplarisch für jeden Genotypen, Aufnahme in der Längsachse; A: FVB/N; B: BS; C: C57; D: Balb/C.

## 3.2 Telemetrische Messungen unter Kontrollbedingungen

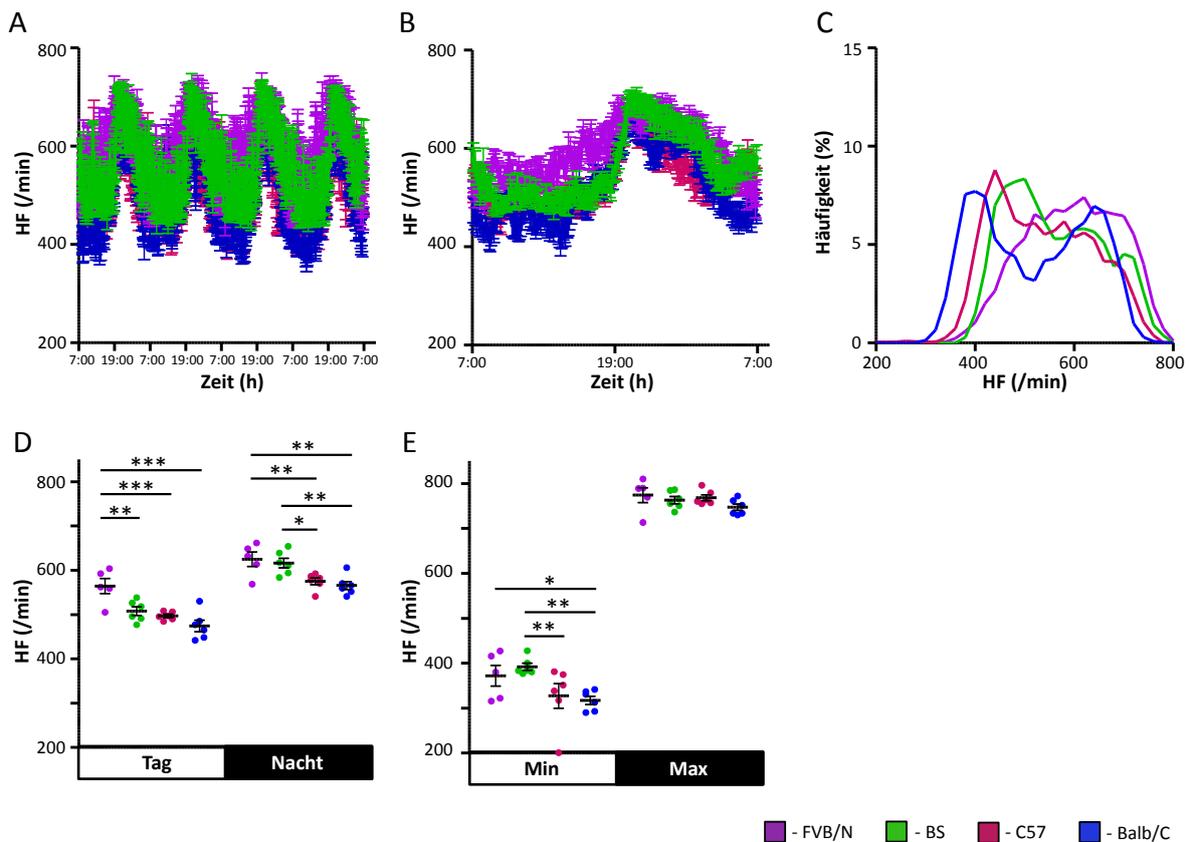
### 3.2.1 Herzfrequenz

Die Baseline-Messung über 96 Stunden, dargestellt als Mittel mit dem Standardfehler, zeigt einen deutlichen Tag-Nacht-Rhythmus (Abb. 17.A) in allen Versuchsgruppen, mit Herzfrequenzanstieg zu Beginn der Nacht, gefolgt von einer stetigen Abnahme mit minimalen Werten am Tag. Dabei liegen die Werte etwa zwischen 400 und 700 Schlägen pro Minute.

Abbildung 17.B zeigt einen virtuellen 24-Stunden-Rhythmus, bei dem lediglich die FVB/N-Mäuse am Tag leicht über den anderen Gruppen zu liegen scheinen. Auch

## Ergebnisse

die Häufigkeitsverteilung der Herzfrequenzen (Abb. 17.C) legt nahe, dass die FVB/N-Mäuse mit einem Gipfel bei circa 650 Schlägen pro Minute vermehrt höhere Herzfrequenzen erreichen. Die Balb/C-Mäuse hingegen weisen einen deutlich zweigipfligen Kurvenverlauf, mit einem ersten Maximum bei ungefähr 400 Schlägen pro Minute und einem zweiten bei etwa 650 Schlägen pro Minute, auf. Die Kurve ist insgesamt weiter nach links verschoben.



**Abbildung 17 – Herzfrequenz der WT-Tiere unter Kontrollbedingungen.** A: HF-Verlauf über 96 h; B: HF über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der HF (96 h); D: mittlere HF am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale HF. N=5,6,6,6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Die mittlere Herzfrequenz am Tag ist in allen Gruppen niedriger als in der Nacht, bei den FVB/N-Tieren ist der Tag-/Nacht-Unterschied kleiner, die mittleren Werte am Tag liegen signifikant über denen der anderen Genotypen (Abb. 17.D). In der Nacht steigt auch die Herzfrequenz der BS-Tiere auf ein ähnlich hohes Frequenzniveau wie das

## Ergebnisse

der FVB/N-Mäuse an, so dass ein signifikanter Unterschied zu den C57- und Balb/C-Tieren vorliegt.

Alle Tiere erreichen eine ähnliche maximale Frequenz von circa 760 Schlägen pro Minute, die minimalen Werte der BS-Tiere liegen jedoch grenzwertig über denen der FVB/N, signifikant über denen der C57 und der Balb/C, die mit im Mittel um die 315 Schläge pro Minute die niedrigsten Herzfrequenzen erreichen. Auch der Unterschied zwischen FVB/N und Balb/C ist signifikant (Abb. 17.E).

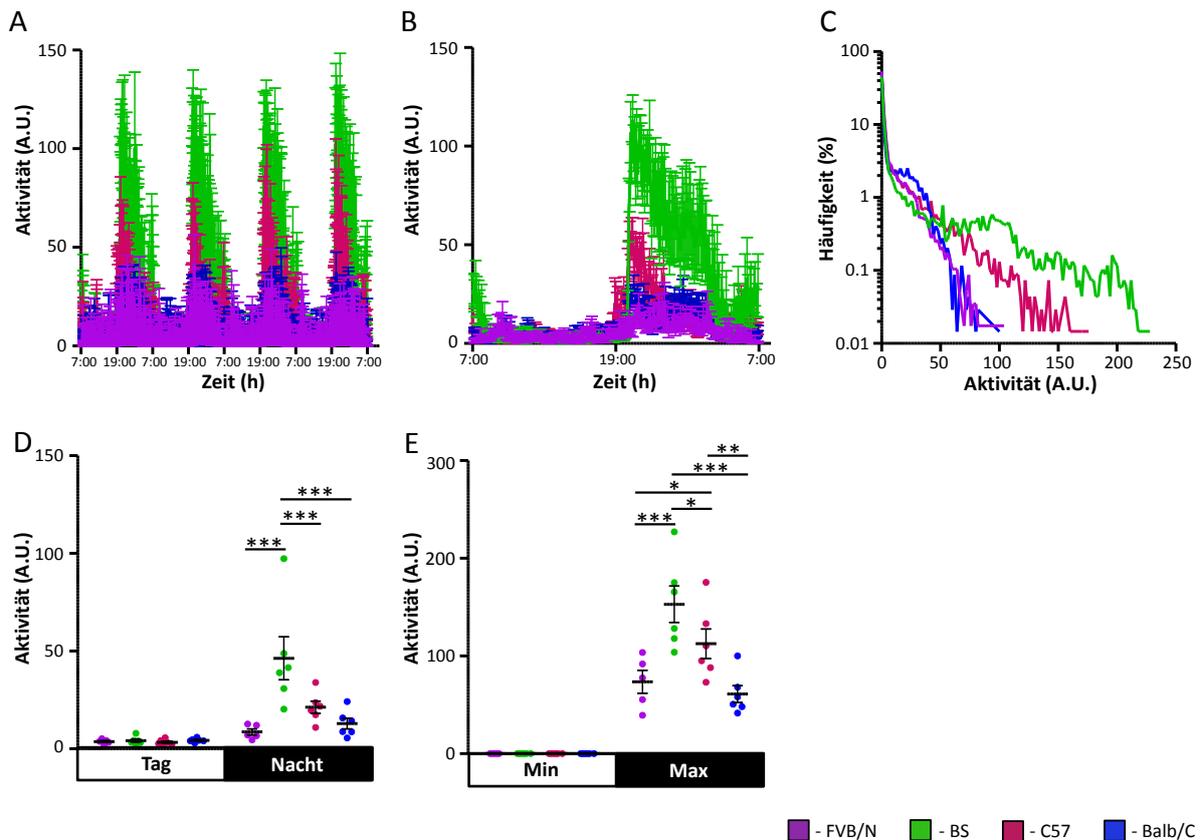
### 3.2.2 Aktivität

Der Aktivitätsverlauf über 96 Stunden zeigt ebenfalls einen Tag-Nacht-Rhythmus mit Spitzen zu Beginn der Nacht und stetigem Abfall bis zum Beginn des Tages (Abb. 18.A). Hier weisen die BS-Tiere in der Nacht eine deutlich höhere Aktivität auf, während Balb/C und FVB/N sich nur wenig bewegen. Dieser Unterschied zeigt sich auch im virtuellen 24-Stunden-Rhythmus in Abbildung 18.B und der Häufigkeitsverteilung in Abbildung 18.C.

Am Tag befinden sich alle Versuchsgruppen auf demselben niedrigen Aktivitätsniveau. In der Nacht bewegen sich die BS-Tiere am stärksten, mit Abstand gefolgt von den C57-Wildtypen, gefolgt von den Balb/C-Tieren und mit der geringsten Aktivität den FVB/N-Tiere, deren Aktivität im Vergleich zum Tag kaum zunimmt (Abb. 18.D). Die Aktivität der BS-Versuchstiere ist signifikant höher als die der anderen Genotypen.

Die Analyse der maximal erreichten Aktivität zeigt eine ähnlich Rangordnung, abgesehen von den FVB/N-Tieren, die durchaus auf höhere Werte als die Balb/C-Tiere kommen (Abb. 18.E). Wieder liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den BS-Tieren und den anderen Genotypen, sowie auch zwischen den C57- und den FVB/N- bzw. Balb/C-Mäusen vor.

## Ergebnisse

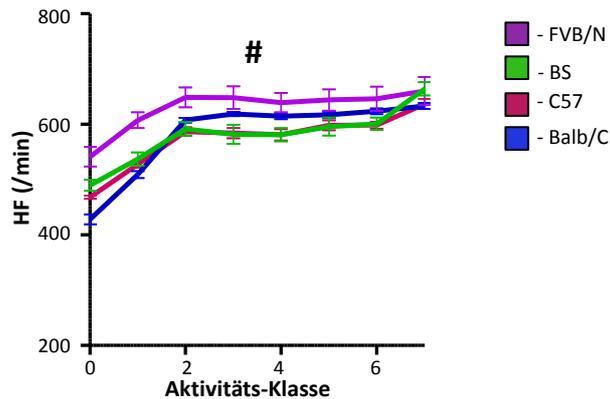


**Abbildung 18 – Aktivität der WT-Tiere unter Kontrollbedingungen.** A: Aktivität über 96 h; B: Aktivität über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der Aktivität (96 h); D: mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale Aktivität. N=5,6,6,6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*: p<0,001, \*\*: p<0,01, \*: p<0,05.

### 3.2.3 Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität

Die normierte Herzfrequenz zeigt, dass mit zunehmender Aktivität auch die Herzfrequenz steigt. Balb/C-, C57- und BS-Tiere liegen dabei auf demselben Niveau, die FVB/N-Tiere haben bei gleicher Aktivität eine höhere Herzfrequenz (Abb. 19). Auffällig ist außerdem, dass die Kurvenverläufe ab Aktivitäts-Klasse 2 ein Plateau erreichen, welches erst bei deutlich verstärkter Aktivität (Aktivitäts-Klasse 7) wieder verlassen wird.

## Ergebnisse



**Abbildung 19 – Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität.** Die Herzfrequenz-Werte innerhalb einer Klasse werden gemittelt. N=5,6,6,6; Klassengrenzen: 0= 0 A.U., 1= 0-5 A.U., 2= 5-10 A.U., 3= 10-15 A.U., 4= 15-20 A.U., 5= 20-25 A.U., 6= 25-30 A.U., 7= 30-300 A.U.; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ , #: Signifikanzen siehe Tab. 4.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Two-Way-ANOVA-Analyse im Überblick. Signifikante Unterschiede finden sich zwischen FVB/N und BS (Aktivitäts-Klasse 0-4), FVB/N und C57 (Aktivitäts-Klasse 0-4), FVB/N und Balb/C (Aktivitäts-Klasse 0-1), sowie BS und Balb/C (Aktivitäts-Klasse 0).

**Tabelle 4 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität“ unter Kontrollbedingungen**

	FVB/N							BS							C57							Balb/C										
FVB/N	-	-	-	-	-	-	-	*	***	*	**	**	ns	ns	ns	***	***	**	**	**	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns		
BS	*	***	*	**	**	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
C57	***	***	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
Balb/C	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-		
Klasse	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7

### 3.3 Telemetrische Messungen unter Metoprolol-Gabe

#### 3.3.1 Herzfrequenz

Im weiteren Verlauf wurden alle Tiere mit dem  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten Metoprolol behandelt. Nach einer Aufsättigungsphase von zwei Wochen wurde ein erneutes EKG aufgezeichnet und die Aktivität bestimmt. Auch unter Metoprolol zeigen alle Gruppen, wie in den Abbildungen 20.A und B zu sehen, einen Tag-Nacht-

## Ergebnisse

Rhythmus, bei den FVB/N-Mäusen wiederum weniger stark ausgeprägt als bei den übrigen Genotypen. Das Frequenzniveau ist jedoch allgemein reduziert. Im Vergleich zu der Häufigkeitsverteilung unter Kontrollbedingungen ist bei Metoprolol-Gabe eine Linksverschiebung der Kurven gut zu erkennen (Abb. 20.C).

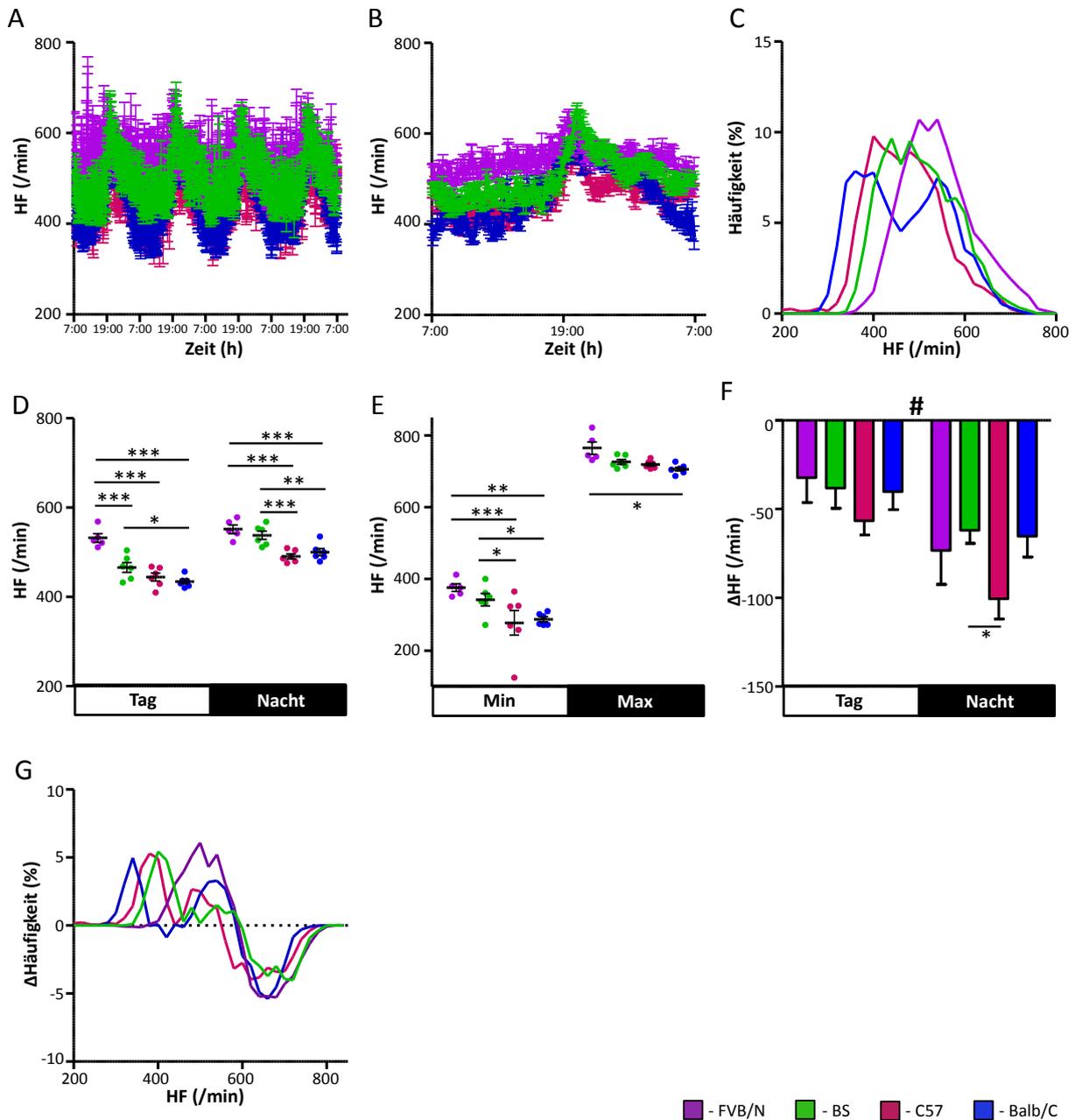
Die Abbildung 20.D beinhaltet die für Tag und Nacht gemittelten Herzfrequenzen. Hier finden sich signifikante Unterschiede zwischen FVB/N und BS am Tag, FVB/N und C57 sowie Balb/C am Tag und in der Nacht, BS und C57 in der Nacht, sowie BS und Balb/C am Tag und in der Nacht.

Minimal und maximal erreichte Werte zeigt Abbildung 20.E. Signifikante Unterschiede gibt es zwischen FVB/N und C57 bzw. Balb/C (Min), BS und C57 bzw. Balb/C (Min), sowie FVB/N und Balb/C (Max).

Die Reduktion der Herzfrequenz, die durch die medikamentöse Betablockade erreicht wird, ist der Abbildung 20.F zu entnehmen. Zu erkennen ist, dass der Effekt in der Nacht signifikant stärker ausgeprägt ist als am Tag. Aufgetragen sind die für die jeweiligen Gruppen gemittelten Abnahmen an Schlägen pro Minute. Ein signifikanter Unterschied findet sich in der Herzfrequenzreduktion in der Nacht zwischen den C57- und BS-Mäusen.

Die hohen Frequenzen (über 600 Schläge pro Minute) nehmen in ihrer Häufigkeit ab, die niedrigeren (unter 600 Schläge pro Minute) dafür zu (Abb. 20.G).

# Ergebnisse



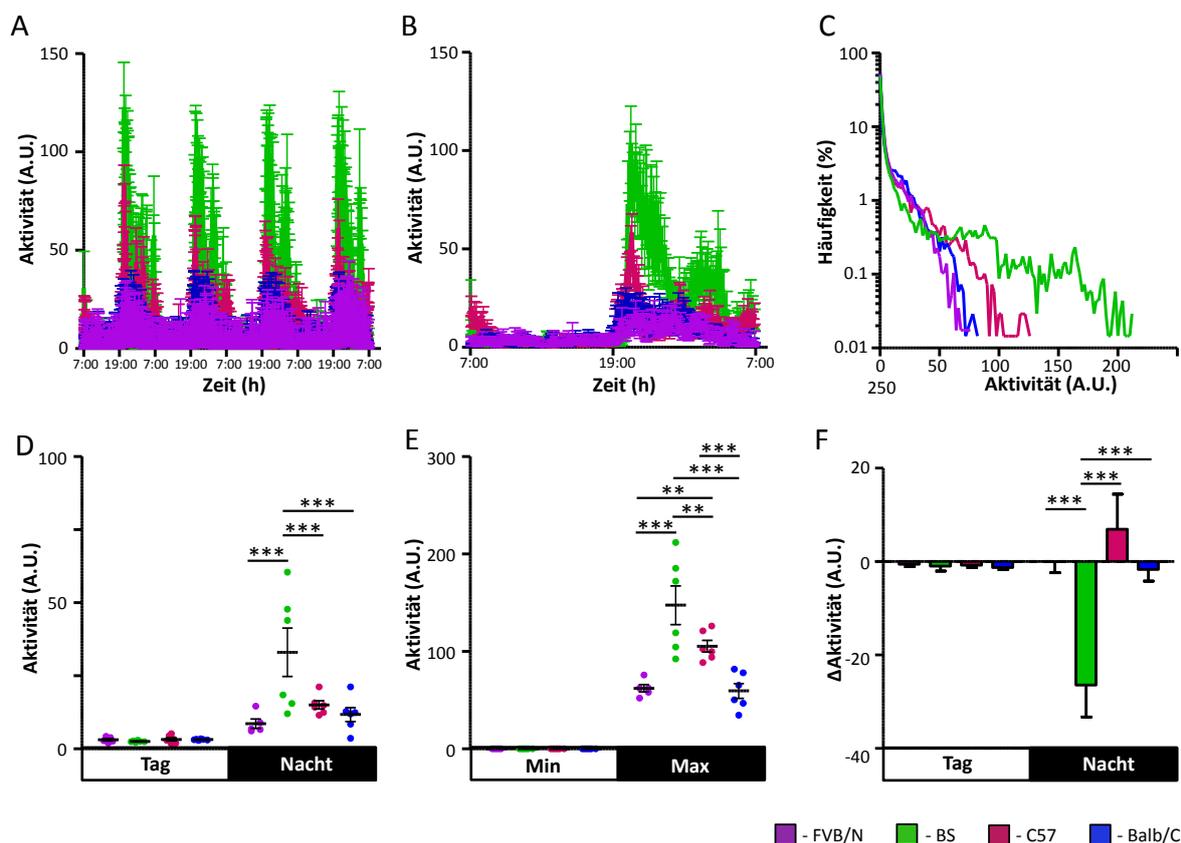
**Abbildung 20 – Herzfrequenz der WT-Tiere unter Metoprolol-Gabe.** A: HF-Verlauf über 96 h; B: HF über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der HF (96 h); D: mittlere HF am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale HF; F: Effekt von Metoprolol auf die mittlere HF am Tag und in der Nacht; G: Effekt von Metoprolol auf die Häufigkeitsverteilung der HF. N=5,6,6,6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*, \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ; #: Tag gegen Nacht hochsignifikant (\*\*\*),  $p < 0,001$ .

## Ergebnisse

### 3.3.2 Aktivität

Unter Metoprolol-Gabe präsentiert sich ein ähnliches Aktivitätsprofil wie unter Kontrollbedingungen. Der Aktivitätsverlauf über 96 Stunden zeigt ebenfalls einen charakteristischen Tag-Nacht-Rhythmus mit stärkster Aktivität bei den BS-Tieren sowie kaum Bewegung unter den FVB/N- und Balb/C-Mäusen (Abb. 21.A-C).

Am Tag befinden sich alle Versuchsgruppen auf demselben niedrigen Aktivitätsniveau, es gibt keine Unterschiede. In der Nacht liegen sowohl die gemittelten, als auch die maximal erreichten Aktivitätswerte der BS-Tiere signifikant über denen der anderen Gruppen, bei den Maximalwerten heben sich auch die C57-Mäuse signifikant von den Balb/C- und FVB/N-Tieren ab (Abb. 21.D und E).



**Abbildung 21 – Aktivität der WT-Tiere unter Metoprolol-Gabe.** A: Aktivitäts-Verlauf über 96 h; B: Aktivität über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der Aktivität (96 h); D: mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale Aktivität; F: Effekt von Metoprolol auf die mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht. N=5,6,6,6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

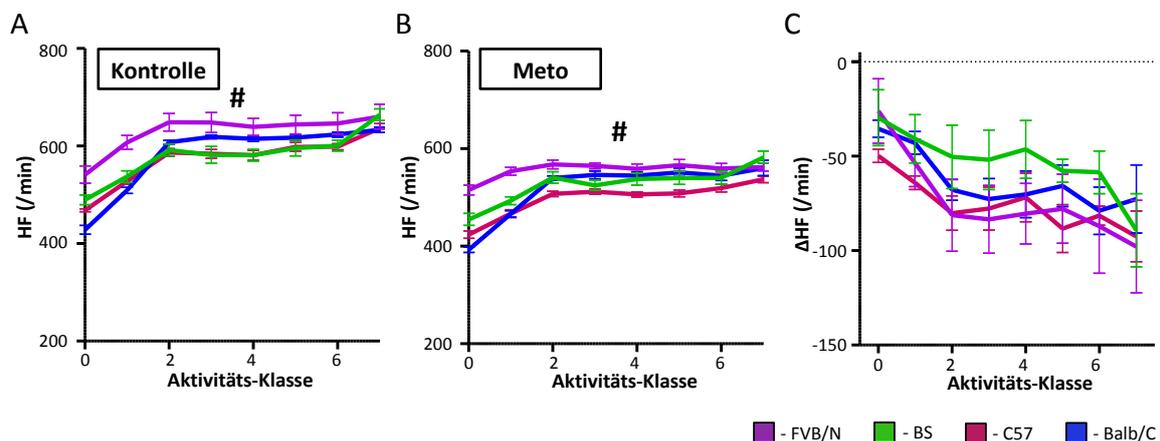
## Ergebnisse

Der Effekt des  $\beta_1$ - Adrenozeptor-Antagonisten auf die Aktivität ist in Abbildung 21.F dargestellt. Am Tag zeigt sich in allen vier Gruppen kaum eine Reduktion der physischen Aktivität. In der Nacht ist die Reaktion der Gruppen sehr unterschiedlich. Während die BS- Tiere im Mittel über 20 A.U. an Aktivität verlieren, nimmt die Aktivität der C57-Wildtypen um etwa 10 A.U. zu, die FVB/N und Balb/C bleiben weitestgehend unbeeinflusst.

Damit unterscheiden sich die BS-Tiere signifikant von den drei anderen Versuchsgruppen FVB/N, C57 und Balb/C.

### 3.3.3 Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol

Der Effekt auf die aktivitätsnormierte Herzfrequenz zeigt sich ebenfalls durch die Absenkung des Frequenzniveaus in allen Aktivitäts-Klassen. Das Reduktionspotential scheint mit zunehmender körperlicher Aktivität zuzunehmen: so beträgt die Abnahme in der Klasse 0 nur zwischen circa 25 und 50, in der höchsten Aktivitätsstufe 7 ungefähr zwischen 75 und 100 Schlägen pro Minute (Abb. 22.C).



**Abbildung 22 – Effekt von Metoprolol auf die normierte Herzfrequenz.** A: normierte HF unter Kontrollbedingungen; B: normierte HF unter Metoprolol-Gabe; C: Reduktion der HF durch Metoprolol; N=5,6,6,6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ; #: Signifikanzen siehe Tab. 4 und 5.

## Ergebnisse

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Two-Way-ANOVA-Analyse im Überblick. Signifikante Unterschiede finden sich zwischen FVB/N und BS (Aktivitäts-Klasse 0-1 und 3), FVB/N und C57 (Aktivitäts-Klasse 0-6), FVB/N und Balb/C (Aktivitäts-Klasse 0-1), BS und Balb/C (Aktivitäts-Klasse 0), BS und C57 (Aktivitäts-Klasse 7), sowie C57 und Balb/C (Aktivitäts-Klasse 4-5).

**Tabelle 5 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol“**

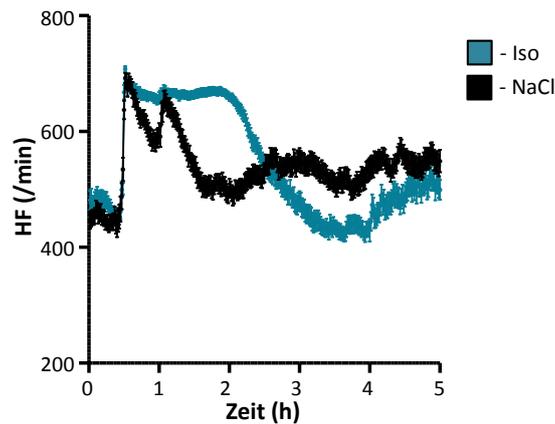
	FVB/N							BS							C57							Balb/C										
FVB/N	-	-	-	-	-	-	-	***	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	***	***	***	**	**	***	*	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
BS	***	***	ns	*	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
C57	***	***	***	**	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	ns
Balb/C	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klasse	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7

### 3.4 $\beta$ -adrenerge Stimulation im kardialen Stresstest

#### 3.4.1 Herzfrequenz-Verlauf während des kardialen Stresstests

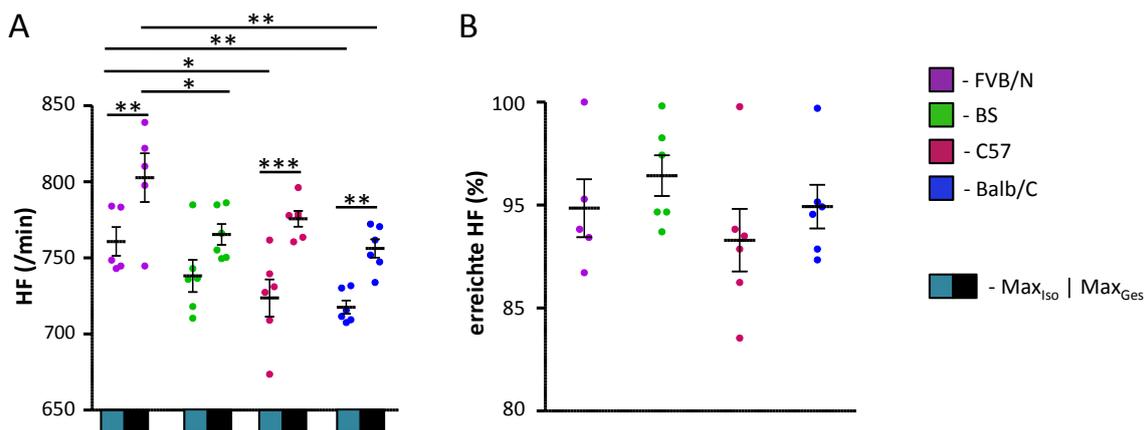
In Abbildung 23 ist der Herzfrequenz-Verlauf aller Tiere während des kardialen Stresstests gezeigt. Alle Tiere starten unter Kontrollbedingungen mit einer basalen Herzfrequenz von circa 450 bis 500 Schlägen pro Minute. Mit der ersten Injektion nach dreißig Minuten steigt die Herzfrequenz schlagartig, sowohl unter NaCl als auch unter Isoprenalin, auf circa 700 Schläge pro Minute an, fällt bei der Kontrollmessung sehr schnell wieder ab und erreicht bei der zweiten Injektion nach weiteren dreißig Minuten ein zweites Maximum mit wiederum anschließender Herzfrequenzreduktion. Unter der Gabe von Isoprenalin erreichen die Tiere nach der ersten Injektion ein Maximum, dem eine Plateauphase angeschlossen ist. Rund zweieinhalb Stunden nach der ersten Isoprenalin-Injektion haben sie ihre basale Herzfrequenz wieder erreicht.

## Ergebnisse



**Abbildung 23 – Herzfrequenz-Verlauf während des kardialen Stresstests.** Türkis: Stresstest, Gabe von Isoprenalin (2 mg/kg KG i.p.); Schwarz: Kontrollmessung mit einem Placebo (NaCl).

In Abbildung 24.A ist der Vergleich der absoluten Maximal-Werte unter Isoprenalin und über den gesamten Versuchslauf dargestellt. Bei den Linien FVB/N, C57 und Balb/C liegt ein signifikanter Unterschied zwischen der unter Isoprenalin ( $Max_{Iso}$ ) und der gesamt erreichten Herzfrequenz ( $Max_{Ges}$ ) vor. Genotypabhängige Unterschiede sind signifikant zu beobachten zwischen FVB/N und BS ( $Max_{Ges}$ ), FVB/N und BS ( $Max_{Iso}$ ) sowie FVB/N und Balb/C ( $Max_{Iso}$  und  $Max_{Ges}$ ).



**Abbildung 24 – Herzfrequenzanstieg der WT-Tiere unter Isoprenalin.** A: maximale HF unter Isoprenalin-Gabe im Vergleich zur maximal erreichten HF der Tiere; B: relative maximal erreichte HF unter Isoprenalin ( $Max_{Iso}$  /  $Max_{Ges}$ ). N=5,6,6,6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA (A) bzw. einer One-Way ANOVA (B), \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Der durch Isoprenalin erreichte Herzfrequenzanstieg liegt im Mittel bei 95% der maximal erreichten Werte und unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 24.B). Der Maximalwert wurde in der Regel nicht unter Isoprenalin erreicht (Vgl. 3.2.1).

In den folgenden Abbildungen 25.A und B sind die Herzfrequenz-Kurvenverläufe noch einmal als Mittelwerte für die einzelnen Genotypen dargestellt. Die FVB/N-Mäuse weisen, wie bereits in den Kontrollmessungen beobachtet, eine höhere basale Herzfrequenz auf. Alle Tiere kommen jedoch aus der Ruhe und erreichen mit der ersten Injektion ähnlich hohe Werte.

Unter NaCl fallen die Kurven aller Gruppen schnell wieder ab und erreichen ein zweites Maximum mit wiederum sofortigem Herzfrequenzabfall. Danach zeigen sie je nach folgendem Aktivitätszustand ein relativ ungeordnetes Bild, die Herzfrequenz unterliegt starken Schwankungen (Abb. 25.A).

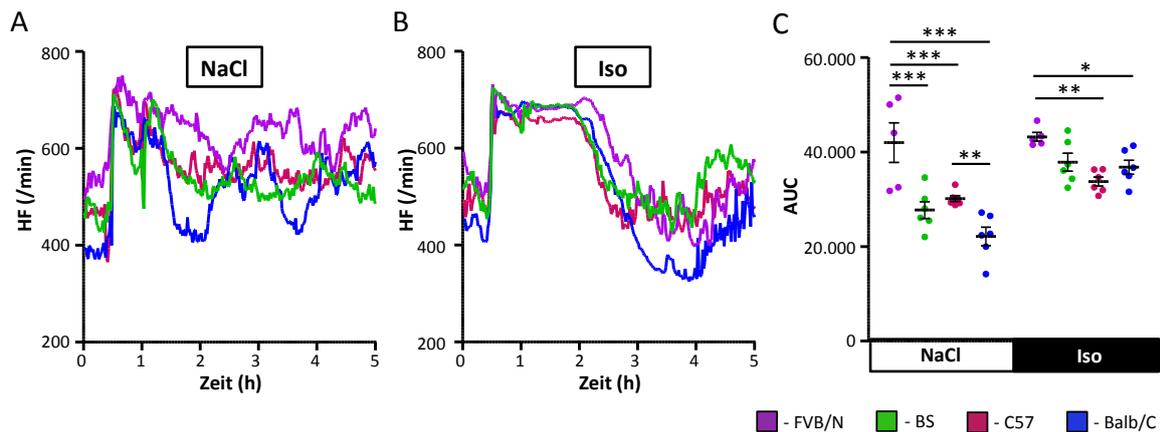
Im Vergleich dazu präsentieren die Tiere nach Isoprenalin-Injektion eine Plateauphase, die Herzfrequenz hält sich lange auf einem Niveau und fällt dann relativ synchron in allen Gruppen wieder ab. Lediglich bei den FVB/N-Tieren scheint die Wirkung etwas länger anzudauern. Etwa drei Stunden nach Beginn der Messung hat der  $\beta$ -Agonist in allen Tieren an Wirkung verloren und die Streuung der Werte nimmt wieder zu (Abb. 25.B).

Ausgehend von den Abbildungen 25.A und B ist in Abbildung 25.C der Versuch gezeigt, die Isoprenalin-Wirkung auf den Herzfrequenz-Verlauf zu quantifizieren. Eine naheliegende Methode ist hierfür die Berechnung der Fläche unter der Kurve (*Area Under Curve*, AUC). Abbildung 25.C zeigt die AUC unter NaCl im Vergleich zu Isoprenalin über drei Stunden, wo der Effekt von Isoprenalin wieder nachlässt. Signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen FVB/N und BS (NaCl), FVB/N und Balb/C (NaCl und Iso), FVB/N und C57 (NaCl und Iso), sowie C57 und Balb/C (NaCl).

Die Tendenz dessen, was man in den Abbildungen 25.A und B sieht, spiegelt sich in der berechneten AUC wider. Die Fläche ist zum Beispiel bei den Balb/C unter

## Ergebnisse

Isoprenalin deutlich größer als unter NaCl. Dennoch besteht das Problem, dass die Tiere auch nach der NaCl-Injektion erweckt sind und durch unterschiedlich starke Aktivierung noch mehrmals Herzfrequenzanstiege aufweisen. Der Effekt, der bei Betrachtung der Abbildungen also deutlich erscheint, lässt sich in der AUC nur schwer erfassen.



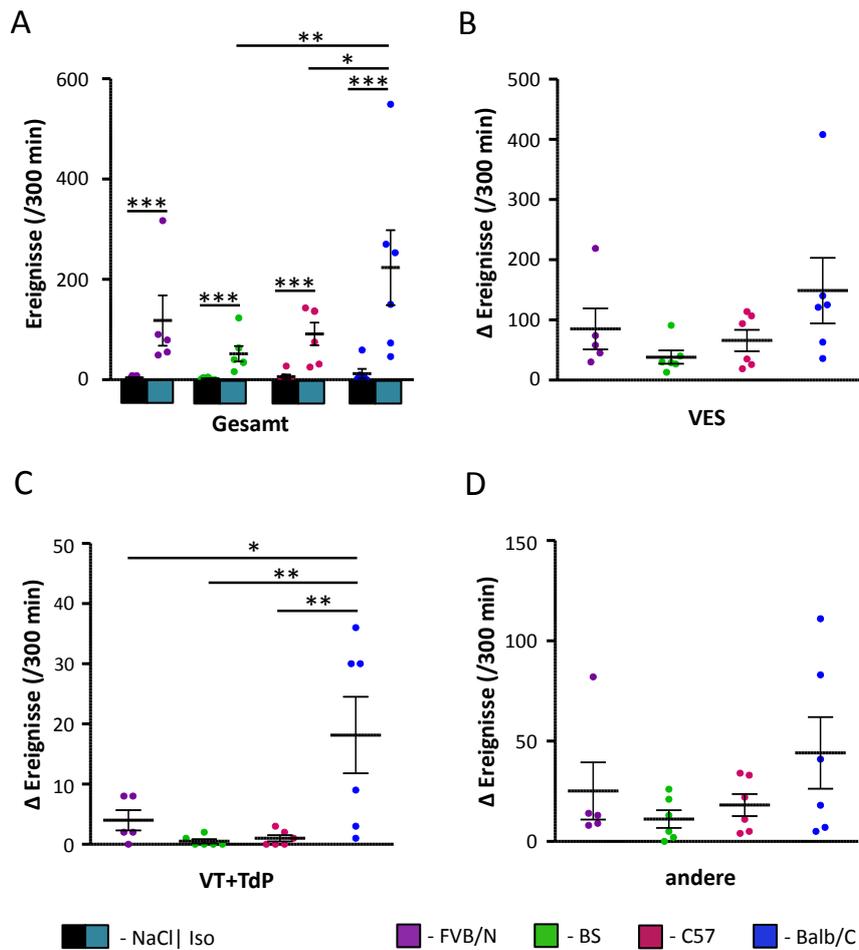
**Abbildung 25 – Herzfrequenz-Verlauf der WT-Tiere.** A: gemittelte HF im kardialen Stresstest unter Gabe von Isoprenalin (2 mg/kg KG i.p.); B: gemittelte HF während der Kontrollmessung (NaCl i.p.); C: AUC - Area Under Curve über die ersten 3 h. N=5,6,6,6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

### 3.4.2 Auftreten von Arrhythmien während des kardialen Stresstests

Abbildung 26.A zeigt die Anzahl der aufgetretenen arrhythmischen Ereignisse, ausgewertet über einen Zeitraum von 300 Minuten unter NaCl bzw. Isoprenalin. Die Tiere weisen unter NaCl kaum ventrikuläre Herzrhythmusstörungen auf. Unter Isoprenalin treten bei allen vier Gruppen signifikant mehr Ereignisse auf, die Balb/C-Mäuse scheinen besonders häufig zu reagieren. Sie weisen unter Isoprenalin signifikant mehr arrhythmische Ereignisse auf als BS und C57.

Die in der Differenz zu NaCl aufgetretenen Ereignisse unter Isoprenalin, aufgeteilt in die drei Subgruppen, sind den Abbildungen 26.B-D zu entnehmen. Es zeigt sich ein ähnliches Bild, signifikant vermehrt treten lediglich die ventrikulären Tachykardien und Torsade-de-Pointes-Tachykardien bei den Balb/C auf (Abb. 26.C).

## Ergebnisse



**Abbildung 26 – Arrhythmien der WT-Tiere.** A: Anzahl der Arrhythmien unter NaCl (schwarz) und Iso (türkis); B-D: Subgruppenanalyse der Ereignisse unter Isoprenalin-Gabe: B: VES – Ventrikuläre Extrasystolen; C: VT – Ventrikuläre Tachykardien, TdP – Torsade de Pointes-Tachykardien; D: andere – Couplets, Triplets, Bigemini und Trigemini. N=5,6,6,6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA (A) bzw. einer One-Way ANOVA (B-D); \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Ausgehend von der Frage, ob die Stärke des Herzfrequenzanstiegs im Zusammenhang mit einer stärkeren Suszeptibilität gegenüber Arrhythmien steht, wird die Anzahl der Ereignisse gegen die Herzfrequenzzunahme aufgetragen (Abb. 27.A). Man könnte davon ausgehen, dass eine stärkere Herzfrequenzzunahme mit dem vermehrten Auftreten von arrhythmischen Ereignissen einherginge.

## Ergebnisse

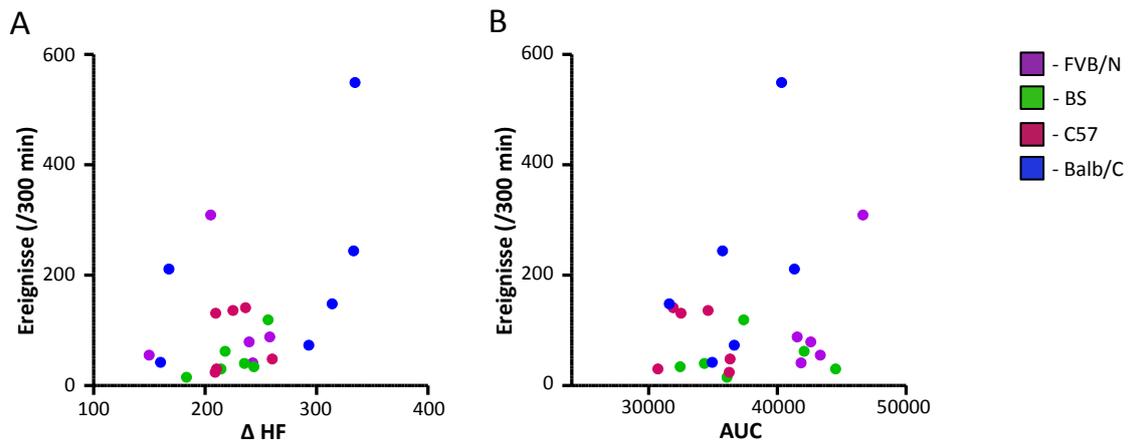


Abbildung 27 – Normierung der Anzahl der Ereignisse. A: Normierung auf den Herzfrequenzanstieg unter Isoprenalin ( $\Delta$  HF); B: Normierung auf die AUC unter Isoprenalin (AUC); N=5,6,6,6; Regressionsanalyse.

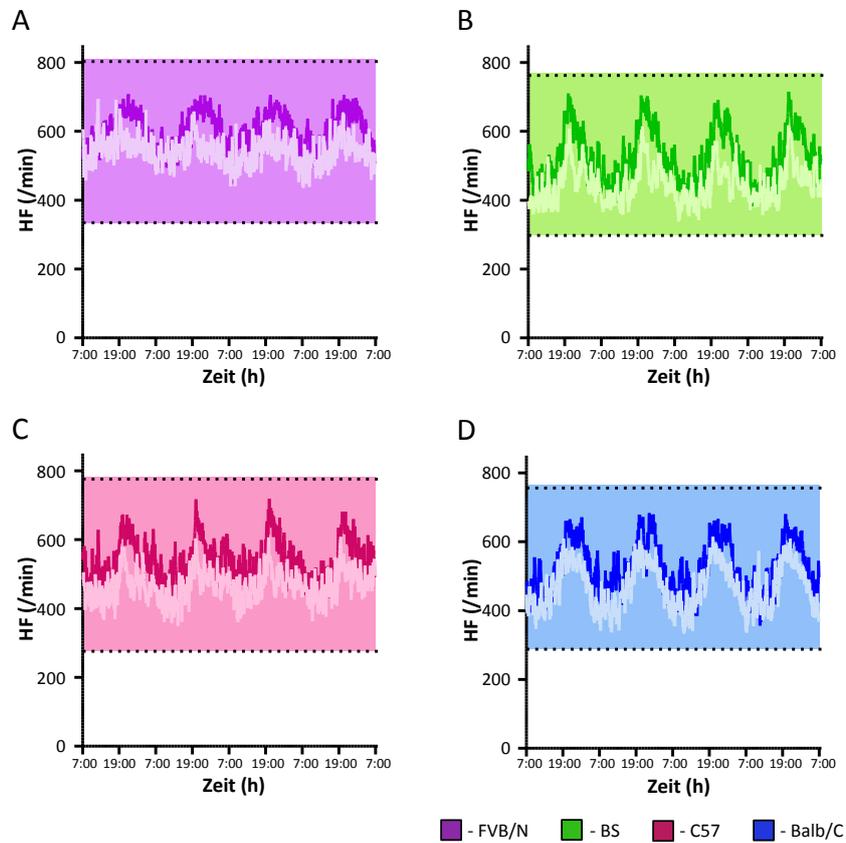
Es findet sich jedoch keine klare Korrelation zwischen Herzfrequenzanstieg und Arrhythmien. Um der Überlegung nachzugehen, ob nicht die quantitative Zunahme der Herzschläge pro Minute, sondern die Dauer der erhöhten Herzfrequenz ausschlaggebend für eine stärkere Arrhythmogenese ist, wird die Anzahl der Ereignisse gegen die AUC aufgetragen (Abb. 27.B). Auch hier bieten weder die Abbildung noch durchgeführte Regressionsanalysen einen Anhalt für eine Abhängigkeit dieser beiden Faktoren.

### 3.5 Regelbereich der Herzfrequenz

In Abbildung 28 wird die Breite des Regelbereichs der Herzfrequenz von Mäusen deutlich. Sie zeigt zum einen die für die jeweilige Gruppe gemittelte maximal von den Tieren erreichte Herzfrequenz und zum anderen die mittlere minimale Herzfrequenz unter Metoprolol. Zudem sind in der Abbildung die Kurvenverläufe der Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen sowie unter Metoprolol zu sehen. Die normalen Schwankungen füllen den möglichen Spielraum von circa 500 Schlägen nicht aus. Zu sehen ist jedoch, dass die Tiere in der Lage sind, ihre Herzfrequenz bei Bedarf zu

## Ergebnisse

verdoppeln. Es gibt nur geringfügige Unterschiede in der Regelbreite zwischen den verschiedenen Genotypen.



**Abbildung 28 – Regelbereich der Herzfrequenz von WT-Tieren.** A: FVB/N; B: BS; C: C57; D: Balb/C; gefüllter Bereich reicht von der minimalen HF (gemittelt, unter Metoprolol) bis zur maximalen HF (gemittelt) der jeweiligen Gruppe; der dunklere/obere Kurvenverlauf stellt den HF-Verlauf unter Kontrollbedingungen, der hellere/untere Kurvenverlauf den unter Metoprolol-Gabe dar. N=5,6,6,6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h.

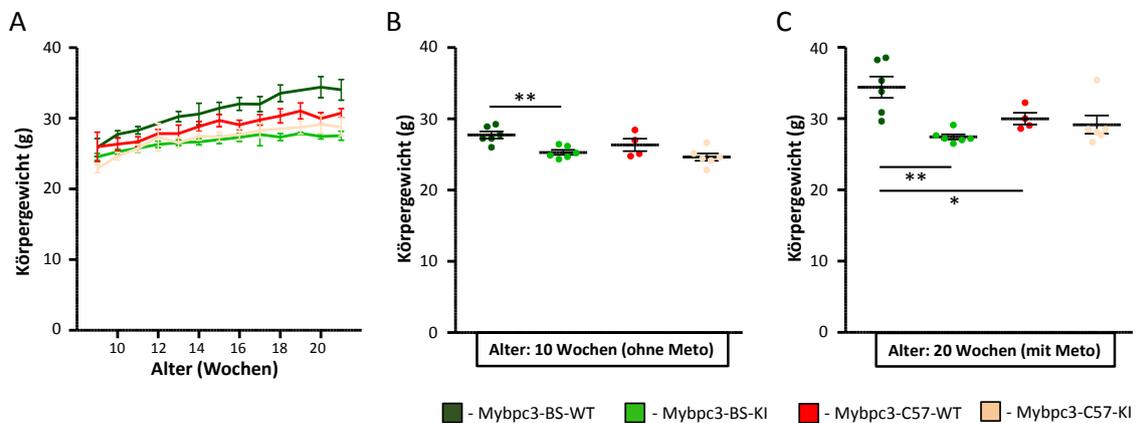
## 3.6 HCM-Mäuse

### 3.6.1 Beschreibung der Tiere

#### 3.6.1.1 Gewichtsverlauf der Tiere

In diesem Abschnitt werden die Mybpc3-KI-Mäuse, eingekreuzt in BS und C57, mit ihren Wildtypen verglichen.

Abbildung 29.A zeigt die kontinuierliche Gewichtszunahme mit steigendem Alter (angegeben in Wochen) in den vier Versuchsgruppen. Im Alter von neun Wochen weisen die WT-Tiere mit circa 26 g ein höheres Gewicht auf als die entsprechenden KI-Tiere mit etwa 24 g. Während sich die Mybpc3-C57-Tiere im Laufe der Wochen einander angleichen, unterscheiden sich WT und KI in der Mybpc3-BS-Gruppe deutlich. Die Mybpc3-BS-WT nehmen etwa doppelt so viel an Gewicht zu wie die entsprechenden KI-Tiere.



**Abbildung 29 – Gewichtsverlauf der Mybpc3-Tiere.** A: Entwicklung des Körpergewichts von Woche 9 bis 21,  $MW \pm SEM$  für jeden Genotypen; B: Körpergewicht der Tiere im Alter von 10 Wochen (ohne Metoprolol-Gabe),  $N=6,6,4,6$ ; C: Körpergewicht der Tiere im Alter von 20 Wochen, unter Metoprolol.  $N=6,6,4,6$ ; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA (B und C) \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Da der Messzeitraum und die Messzeitpunkte der einzelnen Tiere nicht identisch sind, ergeben sich Schwankungen der Kurven und eine geringere statistische

## Ergebnisse

Aussagekraft (Vgl. 3.1.1). Die Abbildungen 29.B und C versuchen deshalb, den Genotypen-Vergleich zu dem festgelegten Zeitpunkt im Alter von 10 bzw. 20 Wochen, an dem von nahezu allen Tieren Daten vorhanden sind, darzustellen. Es ergeben sich nach statistischer Analyse im Alter von 10 Wochen signifikante Unterschiede der Mybpc3-BS-WT gegenüber den KI-Tieren, mit 20 Wochen gegenüber allen drei anderen Versuchsgruppen. Am ersten Vergleichspunkt erhalten die Tiere noch kein Metoprolol, im Alter von 20 Wochen hat die Aufsättigung mit dem Betablocker bereits stattgefunden.

### 3.6.1.2 Morphologie der Tiere und ihrer Organe

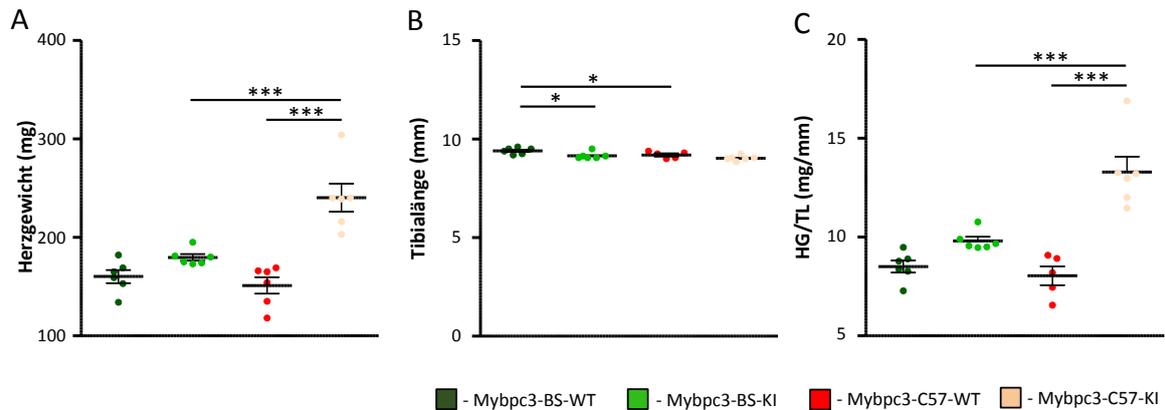
Vom äußeren Erscheinungsbild her zeigen die KI-Tiere keine Abweichungen im Vergleich zu ihren Wildtypen. Auch bei Vignier *et al.* wurden die KI-Tiere als äußerlich dem Wildtypen entsprechend beschrieben (Vignier *et al.*, 2009). Bei den Organentnahmen fallen jedoch folgende Unterschiede auf:

1. Die Herzen der KI-Tiere sind wesentlich größer, und zeigen eine kugelige Morphologie.
2. Die Nieren sind im Vergleich zu den WT-Nieren verkleinert.

Im Vergleich des absoluten Herzgewichts unterscheiden sich die Mybpc3-C57-KI signifikant von den anderen drei Versuchsgruppen (Abb. 30.A). Um das Ausmaß der vermuteten linksventrikulären Hypertrophie zu quantifizieren, wird das Herzgewicht (HG) ins Verhältnis zum Körpergewicht (KG) oder der Tibialänge (TL) gesetzt. Da auch hier wieder von einer altersabhängigen Entwicklung des Gewichts auszugehen ist, und die Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahmen unterschiedlich alt waren, wird die Ratio aus Herzgewicht und Tibialänge zur Beurteilung herangezogen.

Im Vergleich der absoluten Tibialänge heben sich die Mybpc3-BS-Wildtypen statistisch signifikant von den anderen Versuchsgruppen ab (Abb. 30.B).

## Ergebnisse



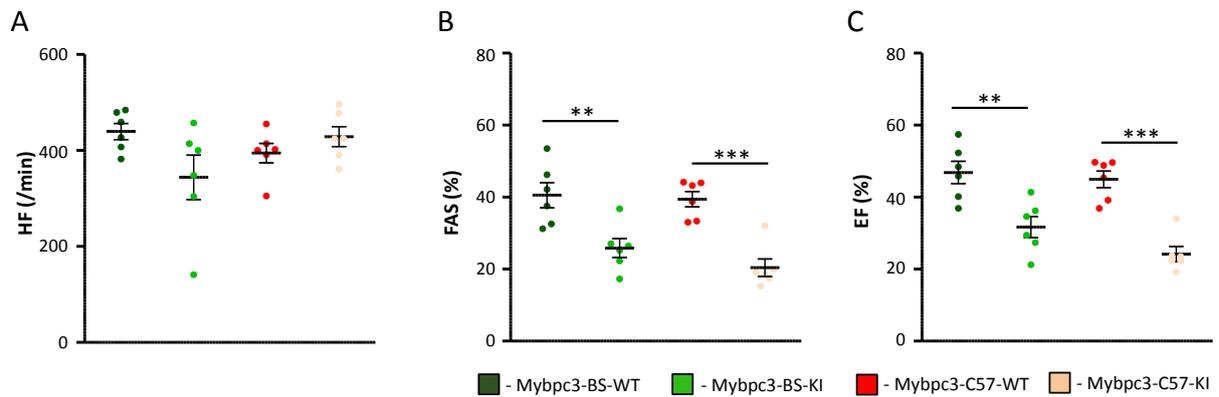
**Abbildung 30 – Quantifizierung der LV-Hypertrophie der Mybpc3-Tiere.** A: absolutes Herzgewicht in Milligramm (mg); B: absolute Tibialänge in Millimetern (mm); C: Verhältnis Herzgewicht/Tibialänge (HG/TL). N=6; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*: p<0,001, \*\*: p<0,01, \*: p<0,05.

Abbildung 30.C zeigt die Normierung des Herzgewichts auf die Tibialänge (HG/TL). Hier zeigt sich wie im Vergleich der absoluten Herzgewichte ein signifikanter Unterschied der Mybpc3-C57-KI gegenüber Mybpc3-C57-WT und den Mybpc3-BS-KI.

### 3.6.1.3 Echokardiographie

Die nicht zwischen den Gruppen alternierende Atemfrequenz, die gemittelt in einem Bereich von 115 bis 130 Atemzügen pro Minute liegt, lässt auf eine vergleichbare Narkosetiefe der Tiere schließen. Die Herzfrequenzen der Tiere unter der Isofluran-Narkose sind in Abbildung 31.A zu sehen und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. In Abbildung 31.B präsentiert sich als Maß für die systolische Funktionsleistung des Herzens eine signifikant niedrigere linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (FAS) der KI-Mäuse gegenüber den Wildtypen. Eine signifikant erhöhte Ejektionsfraction (EF; Abb. 31.C) weisen beide KI-Linien im Gegensatz zu den Wildtypen auf.

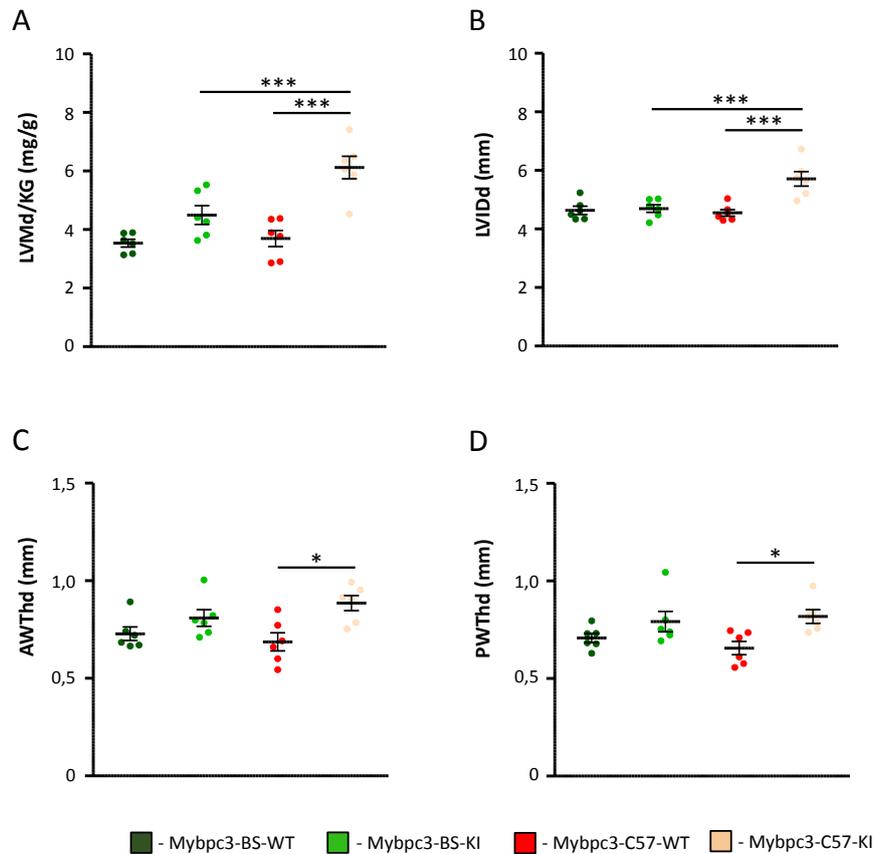
## Ergebnisse



**Abbildung 31 – Echokardiographische Ergebnisse der Mybpc3-Tiere.** A: Herzfrequenz (HF, in Schlägen pro Minute) der Tiere unter Narkose (Isofluran) während des Ultraschalls; B: linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (*Fractional Area Shortening* – FAS, in Prozent); C: Ejektionsfraction (EF, in Prozent). N=6; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Um das Ausmaß der oben beschriebenen Hypertrophie der Herzen der transgenen Tiere weitergehend zu beurteilen, werden die Wanddicken (anterior = AWTh, posterior = PWTh), der innere linksventrikuläre Durchmesser (LViD) in der Diastole (d) sowie die daraus berechnete Masse des linken Ventrikels bezogen auf das Körpergewicht betrachtet. Die diastolische linksventrikuläre Masse pro Gramm Körpergewicht (LVMd/KG) ist in der Mybpc3-C57-KI-Linie signifikant höher als in den anderen Versuchsgruppen (Abb. 32.A). Dieses Ergebnis entspricht den in der Organentnahme gewonnenen Daten (Vgl. 3.6.1.2). Die Tendenz der LVMd/KG-Zunahme in den Mybpc3-BS-KI ist in der Graphik zu erkennen, jedoch nicht statistisch signifikant. Entsprechend verhält es sich auch in Abbildung 32.B, wo ein signifikanter Unterschied des diastolischen linksventrikulären Innendurchmessers der Mybpc3-C57-KI-Tiere ersichtlich ist. Die Vorderwand der Mybpc3-C57-KI-Mäuse ist dicker als die der beiden Wildtyp-Linien (Abb. 32.C). Im Vergleich der Hinterwanddicke erzielen die Mybpc3-C57-KI höhere Werte als die Mybpc3-C57-WT (Abb. 32.D).

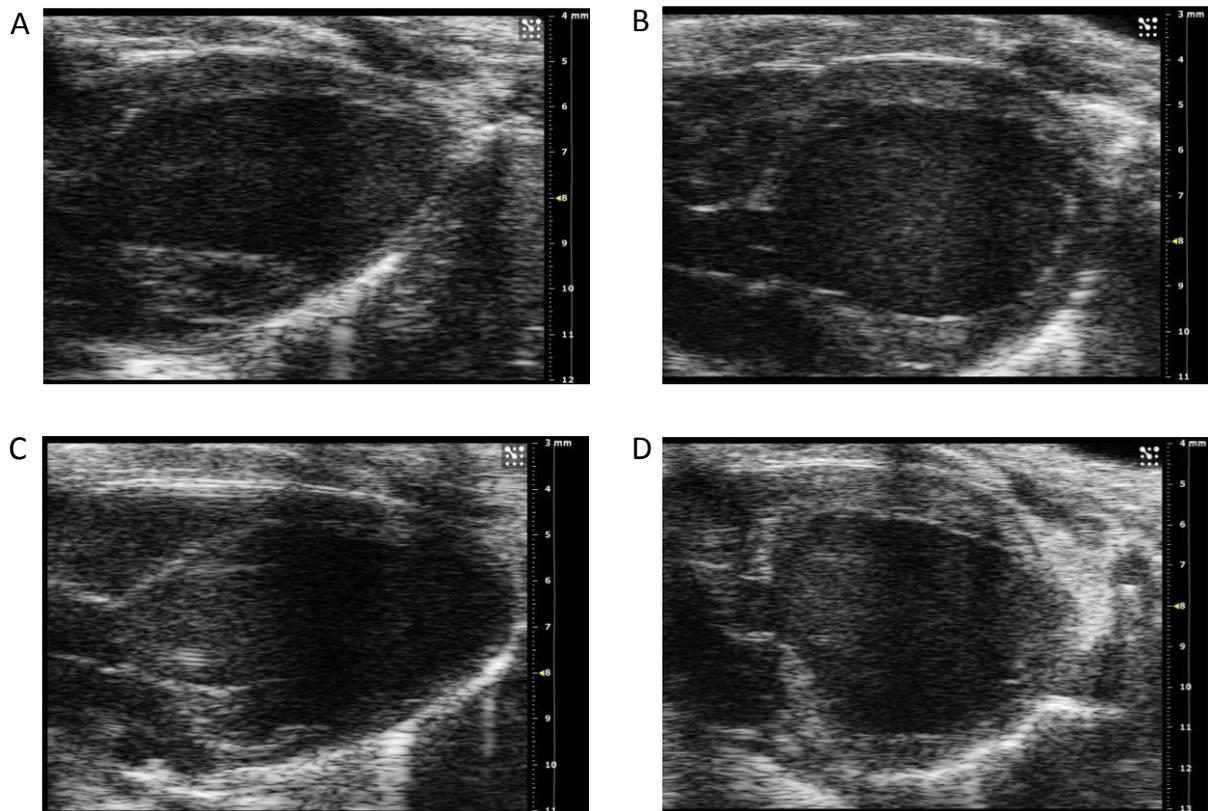
## Ergebnisse



**Abbildung 32 – Beurteilung der Hypertrophie der Mybpc3-Tiere in der Echokardiographie.** A: diastolische linksventrikuläre Masse im Verhältnis zum Körpergewicht (LVMD/KG, errechnet); B: linksventrikulärer Innendurchmesser, diastolisch (LVIDd, gemessen); C: anteriore Wanddicke in der Diastole (AWThd, gemessen); D: posteriore Wanddicke in der Diastole (PWTThd, gemessen). N=6; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

In den Abbildungen 33. A-D ist exemplarisch die Dysmorphie und Hypertrophie der KI-Linien im Vergleich zu den Wildtypen abgebildet. Gezeigt sind die Herzen in der langen Achse. Die Bilder präsentieren eine Momentaufnahme des linken Ventrikels. Die bei Ansicht der gesamten Aufnahmen beobachtete eingeschränkte Wandbeweglichkeit, die sich bei den KI-Tieren präsentierte, ist diesen Beispiel-Bildern nicht zu entnehmen.

## Ergebnisse



**Abbildung 33 – Herzen der Mybpc3-Tiere in der Echokardiographie.** Exemplarisch für jeden Genotypen, Aufnahme in der Längsachse; A: Mybpc3-BS-WT; B: Mybpc3-BS-KI; C: Mybpc3-C57-WT; D: Mybpc3-C57-KI.

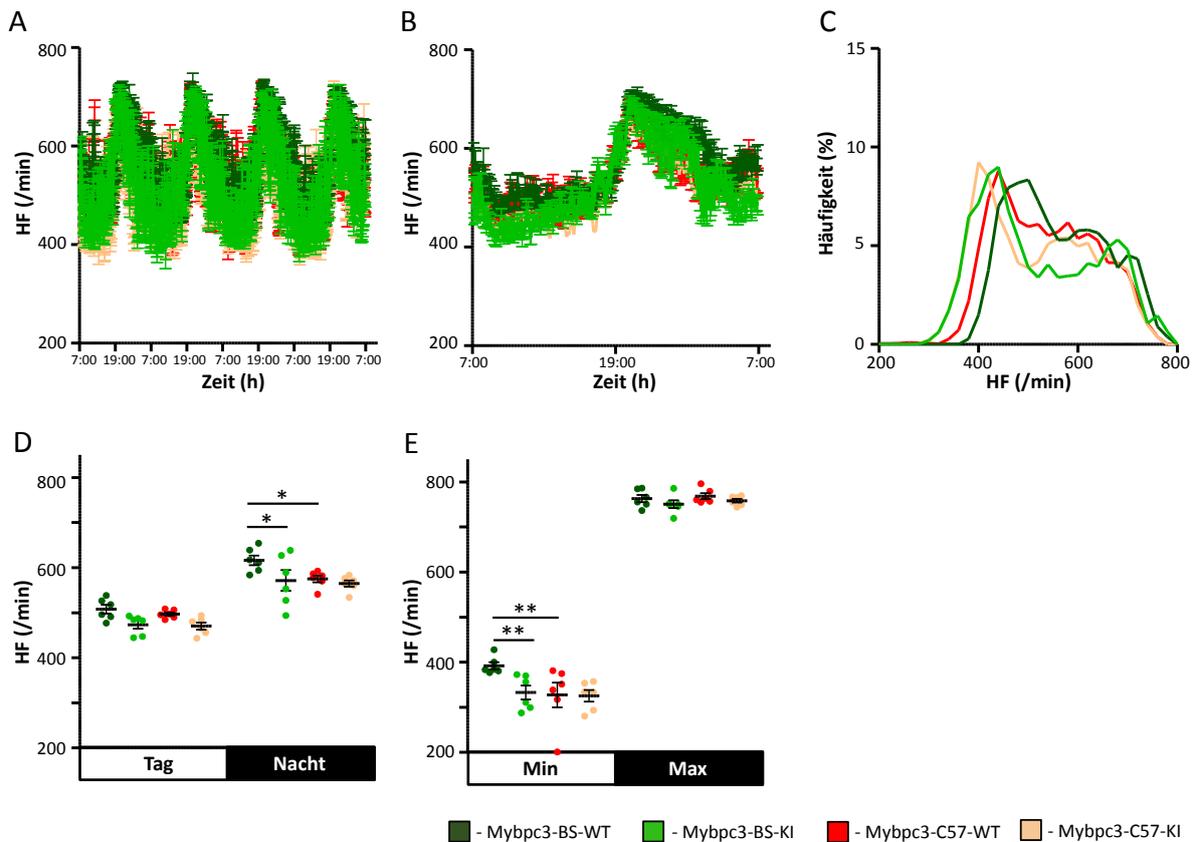
### 3.6.2 Telemetrische Messungen unter Kontrollbedingungen

#### 3.6.2.1 Herzfrequenz

Betrachtet man den Herzfrequenzverlauf über 96 bzw. virtuelle 24 Stunden, so zeigen auch die KI-Tiere die circadiane Rhythmik. Mit Beginn der Dunkelheit nimmt die Herzfrequenz stark zu, und sinkt dann zum Morgen hin wieder ab (Abb. 34.A und B).

Die Kurven zur Häufigkeitsverteilung der Herzfrequenz sind in Abbildung 34.C dargestellt. Hiernach scheinen die KI-Tiere etwas häufiger bei niedrigerer Frequenz zu liegen.

## Ergebnisse



**Abbildung 34 – Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen.** A: HF-Verlauf über 96 h; B: HF über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der HF (96 h); D: mittlere HF am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale HF. N=6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

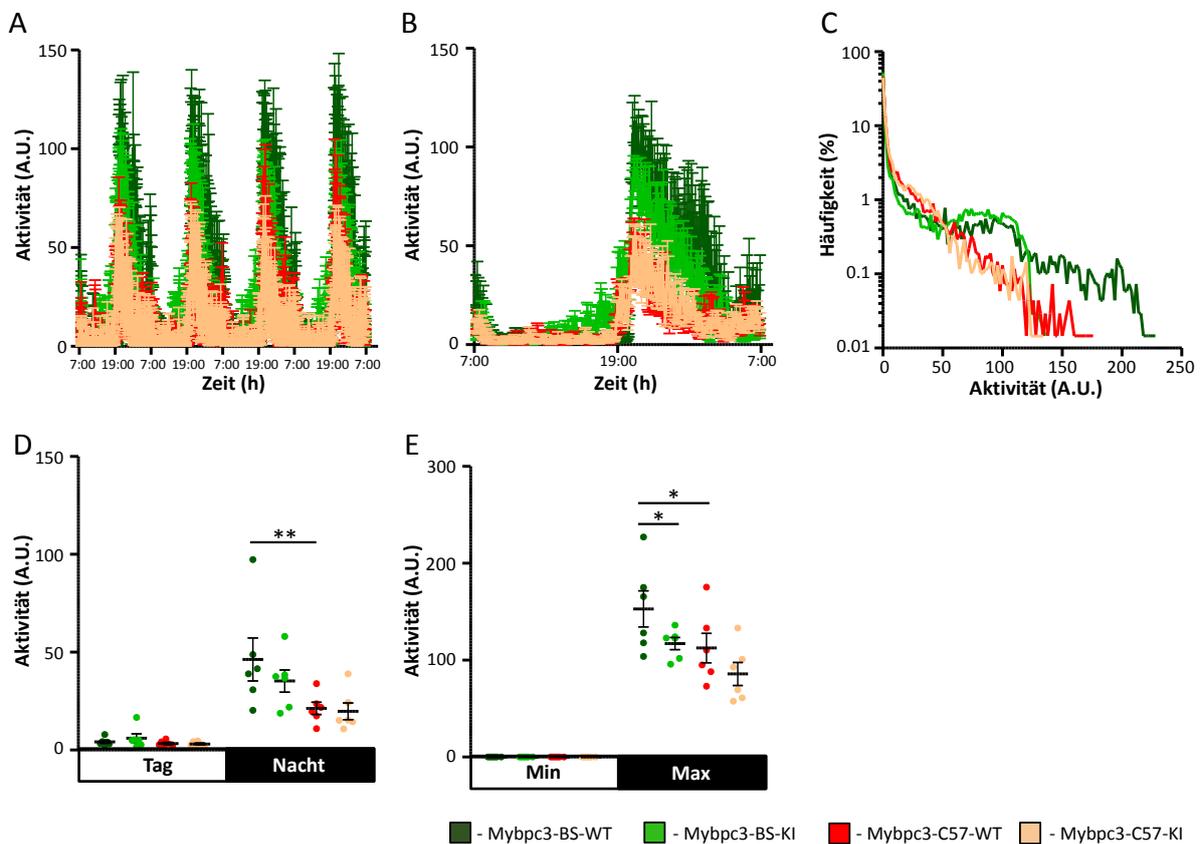
Betrachtet man die gemittelte Herzfrequenz für Tag und Nacht, lässt sich bei allen Gruppen ein deutlicher Tag-Nacht-Unterschied mit einer Differenz von ungefähr 100 Schlägen pro Minute erkennen. Die Mybpc3-BS-WT haben im Mittel eine höhere Herzfrequenz als die Mybpc3-C57-WT sowie die KI-Linien. In der Nacht ist dieser Unterschied signifikant zu allen anderen Versuchsgruppen (Abb. 34.D).

Alle Tiere erreichen eine ähnliche maximale Frequenz von circa 760 Schlägen pro Minute. Ein signifikanter Unterschied findet sich im Vergleich der minimalen Werte, bei denen die Mybpc3-BS-WT höhere Werte aufweisen als die übrigen Gruppen (Abb. 34.E).

## Ergebnisse

### 3.6.2.2 Aktivität

Die Nachtaktivität der Mäuse zeichnet sich wieder in dem Verlauf über die vier Tage der Kontrollmessung sowie in einem virtuellen 24 Stunden-Rhythmus ab (Abb. 35.A und B). In Abbildung 35.C lässt die Häufigkeitsverteilung erkennen, dass die KI-Tiere nur eine gewisse Aktivität erreichen und die Kurve dann abrupt abbricht. Am Tag zeigen sich keine Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen Genotypen, in der Nacht sind die Mybpc3-BS-WT-Tiere etwas aktiver als die Mybpc3-BS-KI-Mäuse. Statistisch signifikant ist das Ergebnis jedoch nicht (Abb. 35.D). Die gesteigerte Aktivität der Mybpc3-BS-WT in der Nacht zeigt sich in allen fünf Abbildungen 35.A-E.



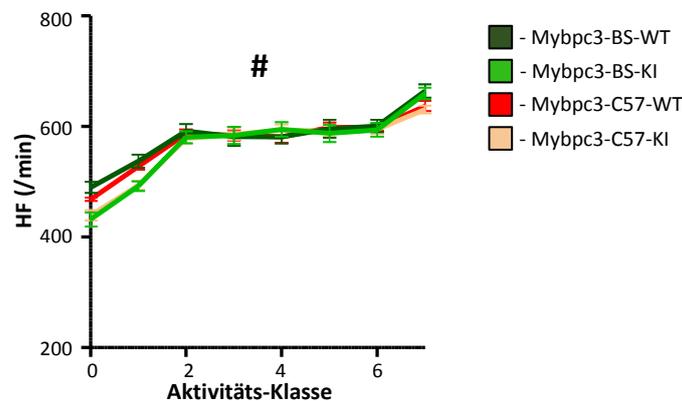
**Abbildung 35 – Aktivität der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen.** A: Aktivität über 96 h; B: Aktivität über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der Aktivität (96 h); D: mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale Aktivität. N=6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Auch die maximale Aktivität liegt bei den Mybpc3-BS-WT im Mittel bei 150 A.U. und damit signifikant höher als bei den Mybpc3-BS-KI und Mybpc3-C57-WT mit gemittelten 115 A.U. maximal (Abb. 35.E). Zwischen Wildtypen und KI-Tieren der Mybpc3-C57-Linie ergibt sich keine statistische Signifikanz.

### 3.6.2.3 Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität

Die normierte Herzfrequenz zeigt, dass mit zunehmender Aktivität auch die Herzfrequenz steigt. In den Aktivitäts-Klassen 0 und 1 liegen die beiden KI-Linien noch leicht unter ihren zugehörigen Wildtypen (Abb. 36). Die Kurvenverläufe erreichen ab Aktivitäts-Klasse 2 ein Plateau, erst bei deutlich verstärkter Aktivität (Aktivitäts-Klasse 7) steigt die Herzfrequenz weiter. Der größte Herzfrequenzanstieg erfolgt bei beginnender, leichter Aktivität (Aktivitäts-Klasse 0 bis 2).



**Abbildung 36 – Normierung der Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere.** Die Herzfrequenz-Werte innerhalb einer Klasse werden gemittelt. Klassengrenzen: 0= 0 A.U., 1= 0-5 A.U., 2= 5-10 A.U., 3= 10-15 A.U., 4= 15-20 A.U., 5= 20-25 A.U., 6= 25-30 A.U., 7= 30-300 A.U.. N=6; Signifikanz berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ; #: Signifikanz siehe Tab. 6.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Two-Way-ANOVA-Analyse im Überblick. Signifikante Unterschiede finden sich zwischen Mybpc3-BS-WT und Mybpc3-BS-KI (Aktivitäts-Klasse 0-1).

## Ergebnisse

**Tabelle 6 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität“ der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen**

	Mybpc3-BS-WT								Mybpc3-BS-KI								Mybpc3-C57-WT								Mybpc3-C57-KI													
<b>Mybpc3-BS-WT</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
<b>Mybpc3-BS-KI</b>	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns										
<b>Mybpc3-C57-WT</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<b>Mybpc3-C57-KI</b>	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns											
<b>Klasse</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7						

### 3.6.3 Telemetrische Messungen unter Metoprolol-Gabe

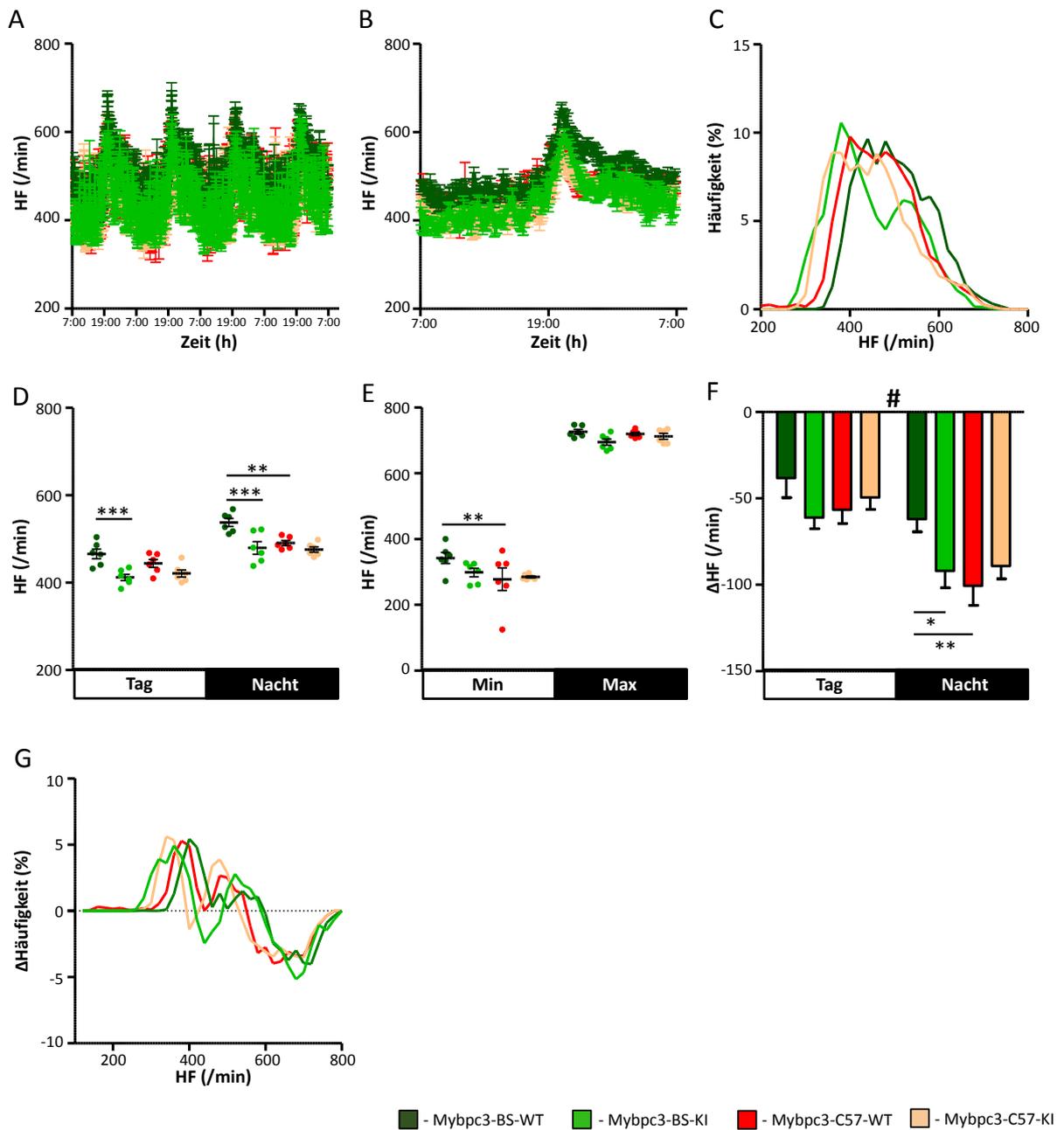
#### 3.6.3.1 Herzfrequenz

In der Messung des EKGs unter Metoprolol zeigen die Gruppen, wie in Abbildung 37.A und B zu sehen, weiterhin alle einen Tag-Nacht-Rhythmus, der sich auf einem allgemein reduzierten Frequenzniveau befindet. Im Vergleich zu der Häufigkeitsverteilung unter Kontrollbedingungen ist bei Metoprolol-Gabe eine Linksverschiebung der Kurven gut zu erkennen (Abb. 37.C).

Die Mybpc3-BS-WT weisen die höchste Herzfrequenz auf, die gemittelten Werte unterscheiden sich in der Nacht signifikant von denen der anderen Versuchstiergruppen. Am Tag unterscheiden sich die Mybpc3-BS-WT signifikant von den beiden KI-Gruppen (Abb. 37.D). Während die Gruppen alle ein ähnliches Maximum der Herzfrequenz erreichen, ist das Minimum der Mybpc3-BS-WT signifikant höher als das der Mybpc3-C57-Tiere (Abb. 37.E).

Die Reduktion der Herzfrequenz, die durch die medikamentöse Betablockade erreicht wird, ist der Abbildung 37.F zu entnehmen. Der Effekt ist in der Nacht signifikant stärker ausgeprägt als am Tag. Aufgetragen sind die für die jeweiligen Gruppen gemittelten Abnahmen an Schlägen pro Minute. Am geringsten lässt sich die Wirkung des Metoprolols bei den Mybpc3-BS-WT-Tieren erkennen. Ein signifikanter Unterschied findet sich in der Herzfrequenz-Reduktion in der Nacht zwischen den Wildtypen der beiden verschiedenen Mybpc3-Hintergründe, sowie zwischen den Mybpc3-BS-WT-Mäusen und ihren KI-Tieren. Insgesamt nehmen unter Metoprolol die hohen Frequenzen (über 550 Schläge pro Minute) in ihrer Häufigkeit ab, die niedrigeren (unter 550 Schläge pro Minute) dafür zu (Abb. 37.G).

# Ergebnisse

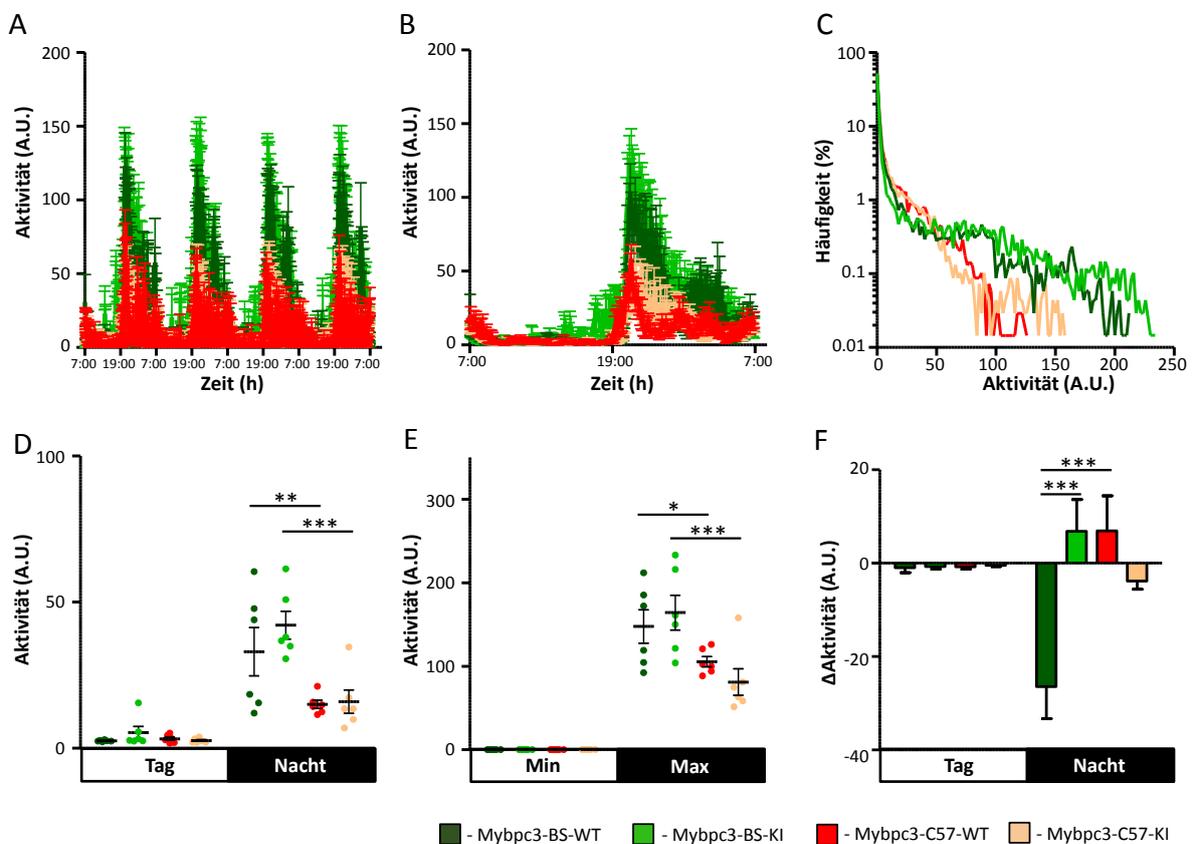


**Abbildung 37 – Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere unter Metoprolol-Gabe.** A: HF-Verlauf über 96 h; B: HF über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der HF (96 h); D: mittlere HF am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale HF; F: Effekt von Metoprolol auf die mittlere HF am Tag und in der Nacht; G: Effekt von Metoprolol auf die Häufigkeitsverteilung der HF. N=6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ; #: Tag gegen Nacht hochsignifikant (\*\*),  $p < 0,001$ .

## Ergebnisse

### 3.6.3.2 Aktivität

Unter Metoprolol-Gabe präsentiert sich auch bei den Mybpc3-Tieren ein ähnliches Aktivitätsprofil wie unter Kontrollbedingungen. Der Aktivitätsverlauf über 96 Stunden zeigt ebenfalls einen charakteristischen Tag-Nacht-Rhythmus mit stärkster Aktivität bei den Mybpc3-BS-Tieren und geringerer Aktivität der Mybpc3-C57-Mäuse (Abb. 38.A-C). Dabei erreichen die KI-Tiere unter Metoprolol häufiger höhere Aktivitätslevel als ihre zugehörigen Wildtypen (Abb. 38.C).



**Abbildung 38 – Aktivität der Mybpc3-Tiere unter Metoprolol-Gabe.** A: Aktivitäts-Verlauf über 96 h; B: Aktivität über einen virtuellen 24 h-Rhythmus; C: Häufigkeitsverteilung der Aktivität (96 h); D: mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht; E: minimale und maximale Aktivität; F: Effekt von Metoprolol auf die mittlere Aktivität am Tag und in der Nacht. N=6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Es gibt keine Unterschiede zwischen den Gruppen in der täglichen Aktivität. In der Nacht liegen sowohl die gemittelten als auch die maximal erreichten Aktivitätswerte

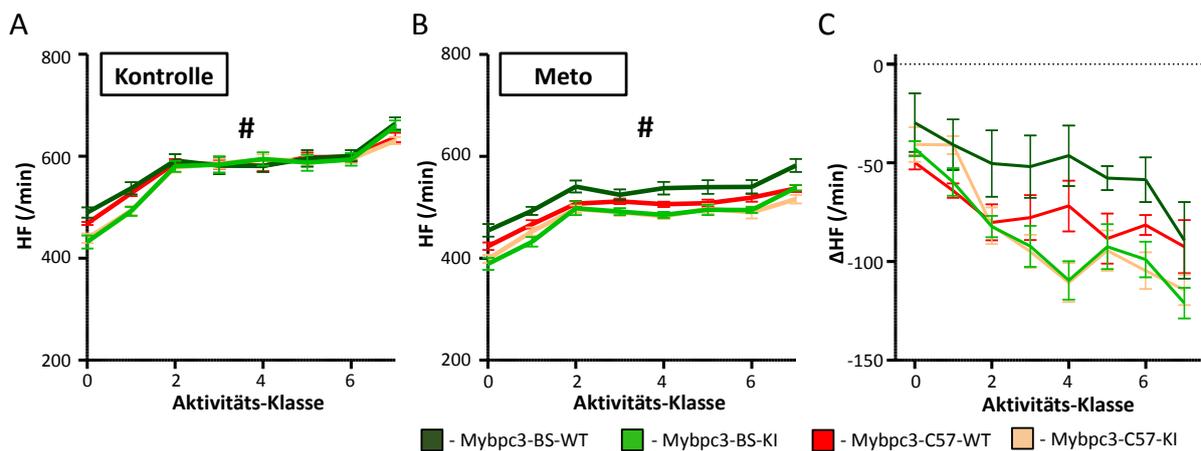
## Ergebnisse

der Mybpc3-BS-Tiere signifikant über denen des anderen genetischen Hintergrunds (Abb. 38.D-E).

Der Effekt des  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten auf die physische Aktivität ist in Abbildung 38.F dargestellt. Die Wirkung am Tag ist in allen vier Gruppen gering. In der Nacht ist die Reaktion der Gruppen sehr unterschiedlich. Während die Mybpc3-BS-WT-Tiere im Mittel um die 25 A.U. an Aktivität verlieren, steigern Mybpc3-BS-KI und Mybpc3-C57-WT ihre Aktivität um etwa 10 A.U., was einen signifikanten Unterschied der Mybpc3-BS-WT-Tiere zu den anderen Gruppen ergibt.

### 3.6.3.3 Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol

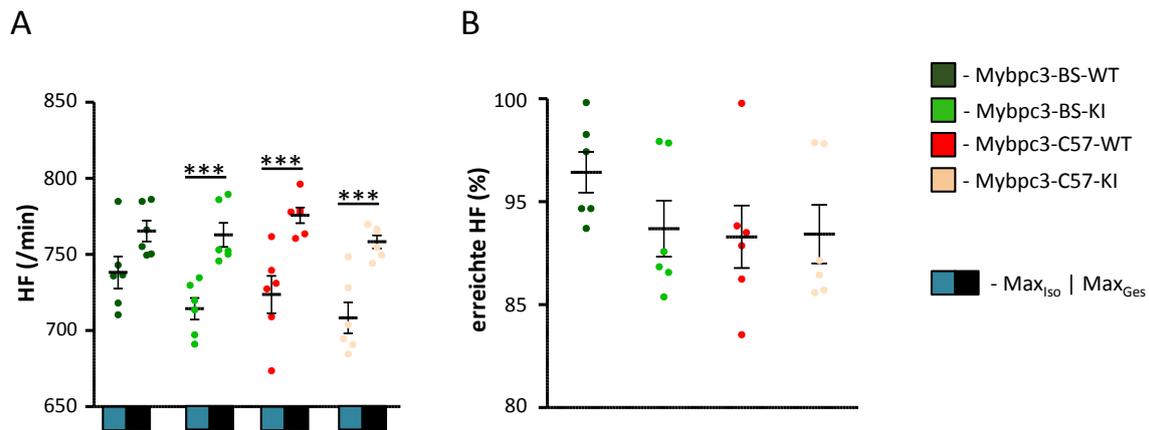
Die aktivitätsnormierte Herzfrequenz zeigt unter Metoprolol-Gabe im Vergleich zur Kontrollmessung ebenfalls eine Absenkung des Frequenzniveaus in allen Aktivitäts-Klassen (Abb. 39.A und B). Es ist eine Zunahme des Reduktionspotentials mit zunehmender körperlicher Aktivität zu erkennen: So beträgt die Abnahme in der Aktivitäts-Klasse 7 mit ungefähr 75 bis 125 Schlägen fast doppelt so viel wie auf der Aktivitätsstufe 0 (Abb. 39.C).



**Abbildung 39 – Effekt von Metoprolol auf die normierte Herzfrequenz von Mybpc3-Tieren.** A: normierte HF unter Kontrollbedingungen; B: normierte HF unter Metoprolol-Gabe; C: Reduktion der HF durch Metoprolol. N=6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ ; #: Signifikanzen siehe Tab. 6 und 7.

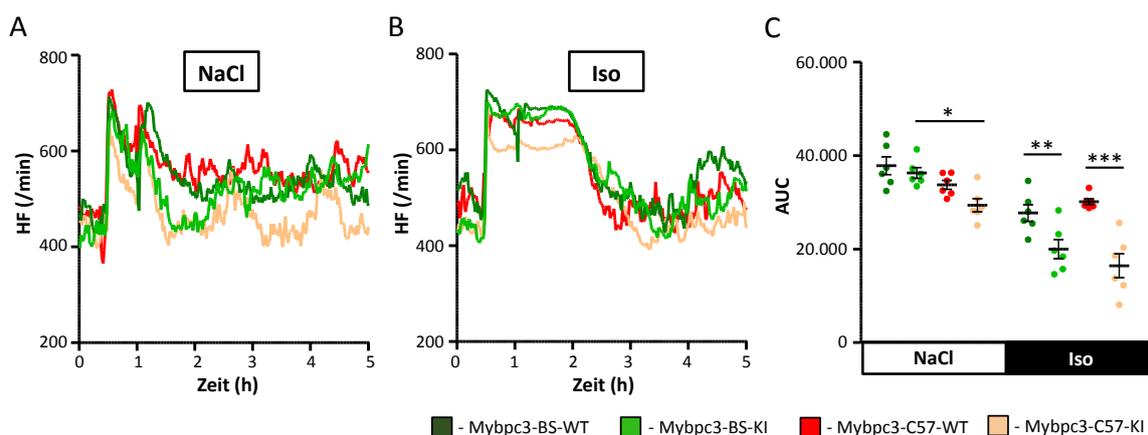


## Ergebnisse



**Abbildung 40 – Herzfrequenzanstieg der Mybpc3-Tiere unter Isoprenalin.** A: maximale HF unter Isoprenalin-Gabe im Vergleich zur maximal erreichten HF der Tiere; B: relative maximal erreichte HF unter Isoprenalin ( $Max_{Iso} / Max_{Ges}$ ). N=6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA (A) bzw. einer One-Way-ANOVA (B), \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Im Folgenden sind die Kurvenverläufe der Herzfrequenz in Kontroll- und Stresstest aufgetragen. Ausgang nehmen die Kurven wie oben beschrieben bei einer Herzfrequenz zwischen 400 und 500 Schlägen pro Minute, der Anstieg bei Injektion ist steil. Während die Herzfrequenz nach der NaCl-Injektion jeweils nur kurz zunimmt, um dann schnell wieder abzufallen, erreicht sie bei Isoprenalin-Gabe ein Plateau, welches ungefähr 90 bis 120 Minuten anhält (Abb. 41.A und B).



**Abbildung 41 – Herzfrequenz-Verlauf der Mybpc3-Tiere.** A: gemittelte HF während der Kontrollmessung (NaCl i.p.); B: gemittelte HF im kardialen Stresstest unter Gabe von Isoprenalin (2 mg/kg KG i.p.); C: AUC - Area Under Curve über die ersten 3 h. N=6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

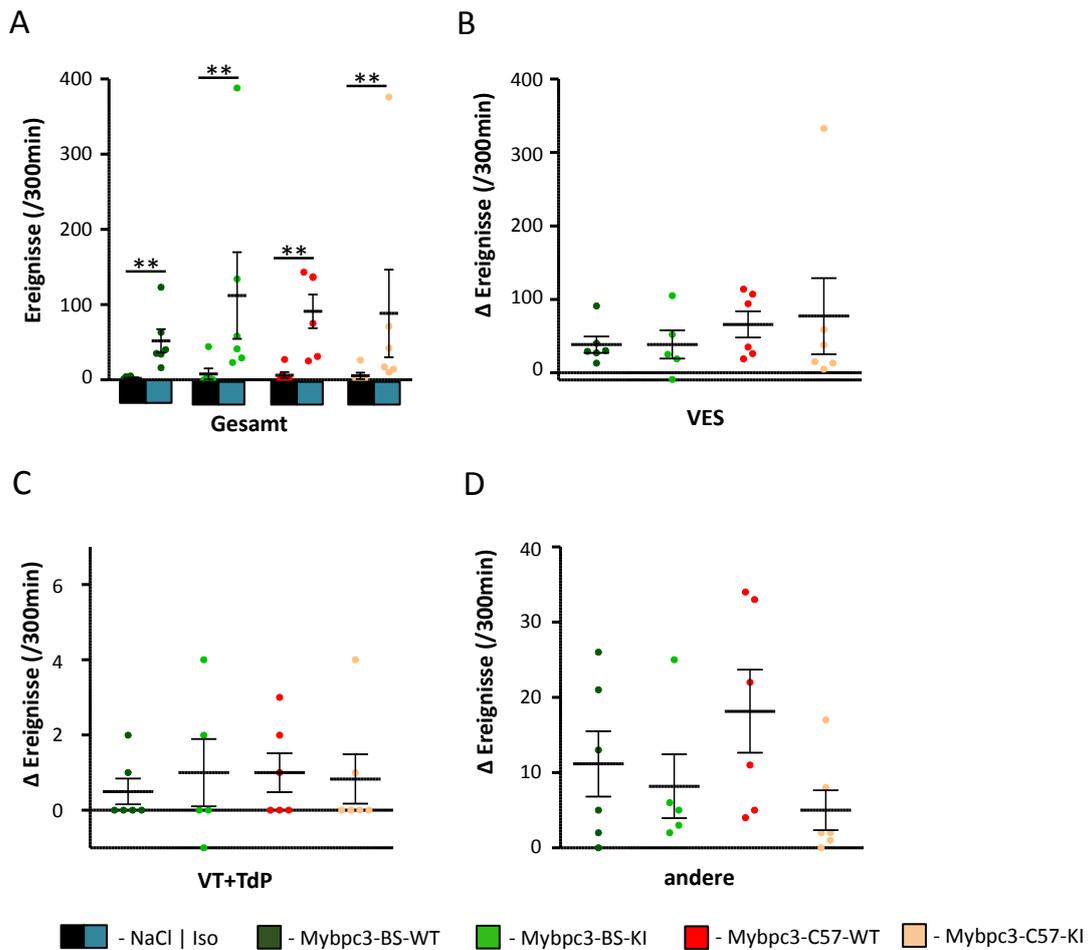
## Ergebnisse

Abbildung 41.C zeigt die *Area under Curve* (AUC) unter NaCl im Vergleich zu Isoprenalin über drei Stunden, wo der Effekt von Isoprenalin wieder nachlässt. Signifikante Unterschiede sind unter NaCl festzustellen zwischen Mybpc3-C57-KI und den Mybpc3-BS-KI-Mäusen, und unter Isoprenalin zwischen Mybpc3-BS-WT und Mybpc3-BS-KI, sowie zwischen Mybpc3-C57-WT und Mybpc3-C57-KI.

### 3.6.4.2 Auftreten von Arrhythmien während des kardialen Stresstests

In Abbildung 42.A ist die Anzahl der Ereignisse unter Kontrollbedingungen gegenüber der unter Isoprenalin aufgetragen. Arrhythmien treten unter NaCl über den fünfstündigen Auswertungs-Zeitraum kaum auf. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation finden sich signifikant mehr Ereignisse in allen Gruppen. Die Mybpc3-C57-Tiere scheinen auf den ersten Blick häufiger Arrhythmien zu entwickeln, es liegt jedoch kein signifikanter Unterschied vor. Die Subgruppenanalyse ergibt ein entsprechendes Bild (Abb. 42.B-D).

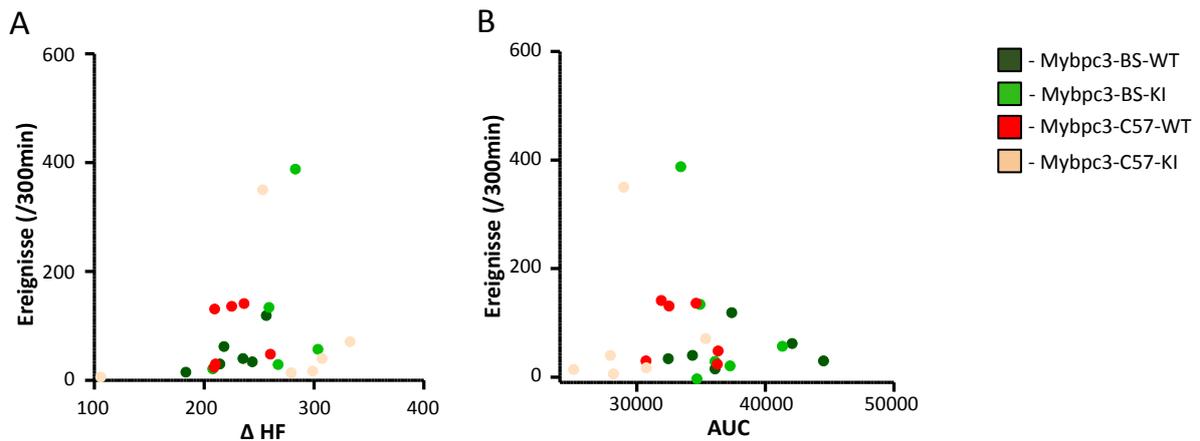
## Ergebnisse



**Abbildung 42 – Arrhythmien der Mybpc3-Tiere.** A: Anzahl der Arrhythmien unter NaCl (schwarz) und Isoprenalin (türkis); B-D: Subgruppenanalyse der Ereignisse unter Isoprenalin-Gabe: B: VES – Ventrikuläre Extrasystolen; C: VT – Ventrikuläre Tachykardien, TdP – Torsade de Pointes-Tachykardien; D: andere – Couplets, Triplets, Bigemini und Trigemini. N=6; Signifikanzen berechnet mit einer Two-Way ANOVA (A) bzw. einer One-Way ANOVA (B-D); \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

Abbildung 43.A zeigt die Anzahl der arrhythmischen Ereignisse aufgetragen gegen die jeweilige durch Isoprenalin erreichte Herzfrequenzzunahme ( $\Delta$  HF), um einen Zusammenhang der Induzierbarkeit von Herzrhythmusstörungen und dem Herzfrequenzanstieg zu eruieren. Ausgangspunkt ist die Überlegung, ob eine stärkere Herzfrequenzzunahme mit dem vermehrten Auftreten von Arrhythmien einhergeht. Die Abbildung und durchgeführte Regressionsanalysen bieten jedoch keinen Anhalt für eine Abhängigkeit dieser beiden Faktoren.

## Ergebnisse



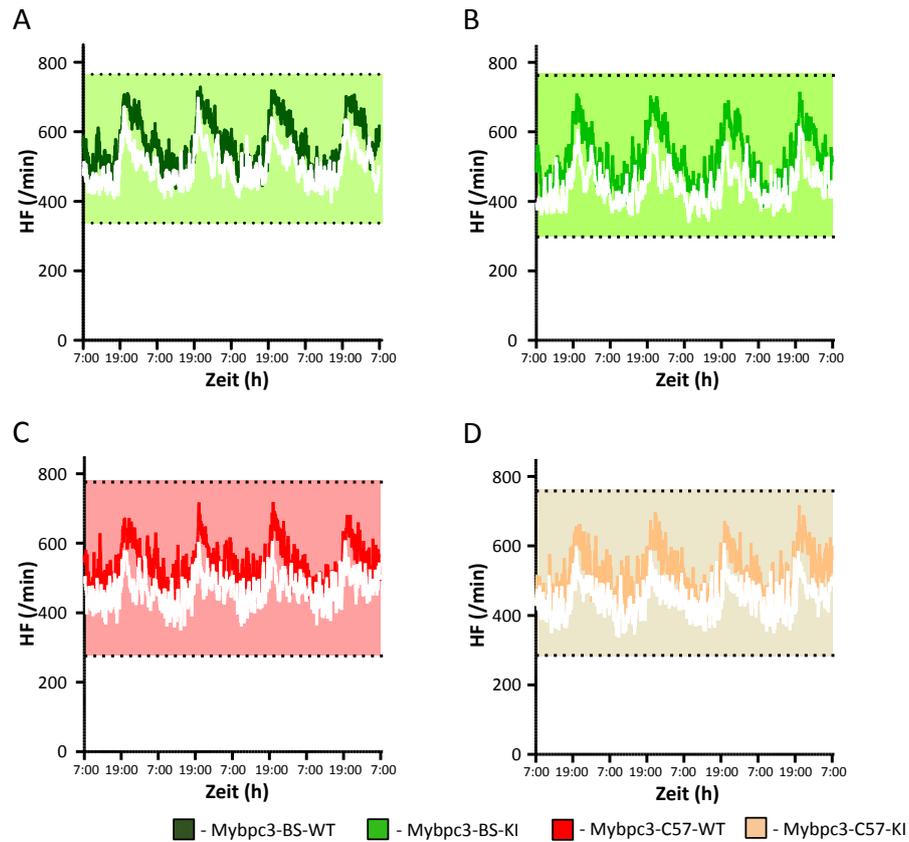
**Abbildung 43 – Normierung der Anzahl der Ereignisse.** A: Normierung auf den Herzfrequenzanstieg unter Isoprenalin ( $\Delta HF$ ); B: Normierung auf die AUC unter Isoprenalin (AUC); N=5,6,6,6; Regressionsanalyse.

Abbildung 43.B macht deutlich, dass auch zwischen Dauer der Herzfrequenzzunahme (gemessen an der AUC) und der Arrhythmieeigung keine signifikante lineare Relation zu finden ist.

### 3.6.5 Regelbereich der Herzfrequenz

Der Regelbereich der Herzfrequenz von Mäusen wird in Abbildung 44 deutlich. Gezeigt ist der Bereich zwischen der für die jeweilige Gruppe gemittelten maximalen Herzfrequenz und der mittleren minimal erreichten Herzfrequenz unter Metoprolol. In diesem liegen die Herzfrequenz-Kurvenverläufe der 96 h-Messung unter Kontrollbedingungen sowie unter Metoprolol. Die normalen Schwankungen füllen den möglichen Spielraum von circa 500 Schlägen nicht aus und genotypische Unterschiede sind nur geringfügig ausgeprägt. Die Tiere sind bei Bedarf in der Lage, ihre Herzfrequenz zu verdoppeln.

## Ergebnisse



**Abbildung 44 – Regelbereich der Herzfrequenz von Mybpc3-Tieren.** A: Mybpc3-BS-WT; B: Mybpc3-BS-KI; C: Mybpc3-C57-WT; D: Mybpc3-C57-KI; gefüllter Bereich reicht von der minimalen HF (gemittelt, unter Metoprolol) bis zur maximalen HF (gemittelt) der jeweiligen Gruppe; der dunklere/obere Kurvenverlauf stellt den HF-Verlauf unter Kontrollbedingungen, der hellere/untere Kurvenverlauf den unter Metoprolol-Gabe dar. N=6; Tag: 7-19 h, Nacht: 19-7 h.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mäuse verschiedener Genotypen kardiovaskulär zu charakterisieren und eventuelle Unterschiede zwischen den genetischen Hintergründen darzulegen. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass es genotypabhängige Unterschiede zwischen den verwendeten Mäusen gibt. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Gibt es Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich ihrer Herzfrequenz und somit ihrer basalen sympathischen Aktivierung sowie in der Ansprechbarkeit auf  $\beta$ -adrenerge Blockade? Unterscheiden sie sich in ihrer physischen Aktivität, der Aktivitätsabhängigkeit ihrer Herzfrequenz oder ihrer Arrhythmieeigung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation? Und lassen sich eventuelle Unterschiede auf ein etabliertes transgenes Modell der hypertrophen Kardiomyopathie übertragen?

Da in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Ergebnissen gewonnen und präsentiert wurde, sollen im Folgenden nur die wichtigsten zentralen Punkte aufgegriffen und diskutiert werden.

Die Tiere zeigten im Ultraschall morphologisch gesehen im Großen und Ganzen ein einheitliches Bild. Lediglich die FVB/N-Mäuse fielen durch eine geringere relative linksventrikuläre Masse sowie eine höhere Ejektionsfraktion auf (Vgl. 3.1.3, Abb. 14 und 15).

Alle Tiere zeigten eine circadiane Rhythmik der gemessenen Parameter. Genotypische Unterschiede fanden sich in der Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen und in der körperlichen Aktivität. Bei allen Genotypen war ein Effekt der  $\beta$ -adrenergen Blockade durch Metoprolol zu erkennen, der in der Nacht eine signifikant stärkere Ausprägung zeigte als am Tag. Eine Genotypabhängigkeit in der Herzfrequenzreduktion unter Metoprolol zeigte sich lediglich in der Nacht, wo die Herzfrequenz der C57-Mäuse am stärksten gesenkt wurde. Die Beeinflussung der Aktivität zeigte ein recht heterogenes Bild, es war kein klarer Effekt zu erkennen.

Während die Tiere bei der Herzfrequenzzunahme unter Isoprenalin ein ähnliches Bild lieferten, fand sich in der Arrhythmieneigung ein signifikanter Unterschied der Balb/C-Linie zu den BS- und C57-Tieren.

Um die basale sympathische Aktivierung am wachen, unbeeinflussten Tier zu erfassen, wurde in dieser Arbeit eine telemetrische EKG-Aufzeichnung über vier Tage vorgenommen. Diese Methode entspricht dem modernen Standard in der Langzeit-Überwachung physiologischer Parameter wacher Mäuse (McCauley & Wehrens, 2010). In der aktuellen Literatur ist vielfach die circadiane Rhythmik des kardiovaskulären Systems, pathophysiologischer Ereignisse und des Verhaltens beschrieben (Lemmer, 2007). Diese findet sich nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Mäusen und anderen Nagern (Li *et al.*, 1999). Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit spiegelt sich ein ausgeprägter Tag-/Nacht-Rhythmus wider. Dieser ist sowohl anhand der Herzfrequenz als auch in der physischen Aktivität der Tiere zu erkennen (Vgl. 3.2, Abb. 17 und 18).

Das Aktivitätslevel nimmt großen Einfluss auf den Verlauf der Herzfrequenz. Bei Beginn körperlicher Aktivität führt eine sofortige Abnahme des vagalen Tonus zu initialer Herzfrequenzzunahme. Anschließend nimmt der parasympathische Einfluss sukzessive ab, die Sympathikusaktivität dagegen zu und die maximale Herzfrequenz wird erreicht (Coote, 2010). Limitiert ist die Herzfrequenzsteigerung dennoch durch arterielle Barorezeptoren, deren Reflex unter körperlicher Aktivität auf ein höheres Level verschoben ist (Raven *et al.*, 2006; Coote, 2010). Um die Abhängigkeit der Herzfrequenz von der physischen Aktivität zu berücksichtigen, wurde in einem weiteren Arbeitsschritt die Herzfrequenz auf die Aktivität normiert. Dazu wurde im Rahmen der telemetrischen EKG-Messung die physische Aktivität aufgezeichnet und ausgewertet. Indem man die Herzfrequenz als abhängige Variable auf die Aktivität bezieht, erhält man eine aktivitätsnormierte Herzfrequenz. Diese nahm mit dem Grad der körperlichen Aktivität zu. Dabei war besonders beim Übergang aus der Ruhe in den aktiven Zustand sowie bei starker körperlicher Aktivität eine Herzfrequenzsteigerung zu erkennen. Im mittleren Aktivitätsbereich blieb die

## Diskussion

Herzfrequenz relativ stabil, was sich wiederum durch die Drosselung der möglichen Herzfrequenzsteigerung durch die Barorezeptoren erklären lässt.

Eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit war das Ansprechen auf  $\beta$ -adrenerge Modulation. Die Herzfrequenz aller Tiere wurde durch Gabe des Betablockers Metoprolol gesenkt (Vgl. 3.3.1, Abb. 20). Die circadiane Rhythmik blieb erhalten, der Unterschied zwischen Tag und Nacht war jedoch nicht mehr ganz so stark ausgeprägt. Die stärkste Reduktion der Herzfrequenz fand sich in der Nacht bei körperlicher Aktivität, wo das  $\beta$ -adrenerge System aktiver ist, und der Angriffspunkt vulnerabler für eine Blockade wurde. Eine Reduktion der Herzfrequenz war aber auch am Tag zu sehen, was auf eine Aktivität des Sympathikus auch bei ruhenden, inaktiven Mäusen hindeutet. Nur wenn die  $\beta$ -Adrenozeptoren durch adrenerge Substanzen aktiviert werden, lassen sie sich medikamentös blockieren (Lopez-Sendon *et al.*, 2004).

Um neben  $\beta$ -adrenerger Blockade auch den stimulierenden Einfluss zu untersuchen, wurde an den Versuchstieren ein zweimaliger kardialer Stresstest mit Isoprenalin bzw. NaCl-Lösung als Kontrolle durchgeführt. Neben dem erwarteten Herzfrequenzanstieg (Park *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2013), wurde ein spezielles Augenmerk auf die Entstehung von Herzrhythmusstörungen gelegt. Bei der Arrhythmogenese wird dem sympathischen Nervensystem eine wichtige Rolle beigemessen (Vaseghi *et al.*, 2012). So wurden in Patienten mit postischämischer Kardiomyopathie durch sympathische Stimulation induzierte Unterschiede in der Repolarisation gefunden. Auch Qin *et al.* fanden eine vermehrte Entstehung ventrikulärer Tachyarrhythmien bei chronischer Isoprenalin-Gabe, die sie auf breitere Streuung der Aktionspotentialdauer zurückführten (Qin *et al.*, 2013).

Alle Tiere zeigten einen deutlichen Anstieg der Herzfrequenz nach intraperitonealer Injektion der Lösung. Der durch das Handling des Tieres verursachte Stress und damit die beschleunigte Herzfrequenz in der Kontrollmessung mit NaCl hielt nur wenige Minuten an. Die Herzfrequenz normalisierte sich sehr schnell wieder. Nach Gabe des  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin blieb die Herzfrequenz für circa eine Stunde konstant hoch, um danach langsam wieder abzufallen (Vgl. 3.4.1, Abb. 23).

Isoprenalin bewirkte in allen Tieren eine verstärkte Arrhythmogenese (Vgl. 3.4.2, Abb. 26.A). Damit entspricht dieses Ergebnis denen anderer Arbeiten mit kardialen Stresstest (Nebel *et al.*, 2013). Das gehäufte Auftreten von Arrhythmien lässt sich durch die Wirkung von Isoprenalin auf  $\beta$ -Adrenozeptoren und den damit verbundenen Anstieg des intrazellulären Calciums erklären (Vgl. 1.2) (Qin *et al.*, 2013).

### 4.1 Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien

#### 4.1.1 Genotypabhängigkeit der basalen Herzfrequenz und Ansprechbarkeit auf $\beta$ -adrenerge Blockade

Die vorliegende Arbeit zeigte bei den FVB/N-Tieren am Tag eine signifikant höhere Herzfrequenz. In der Nacht lag die Herzfrequenz von FVB/N- und BS-Tieren im Mittel über C57 und Balb/C. Dabei waren die Tiere jedoch durchaus in der Lage, im Mittel ähnlich hohe Werte zu erreichen. Bei Betrachtung der auf die körperliche Aktivität normierten Herzfrequenz zeigten die FVB/N-Tiere bei geringer Aktivität höhere Werte in der Herzfrequenz als die zu vergleichenden Gruppen.

In Studien zur Charakterisierung kardiovaskulärer Phänotypen sind bereits einige Unterschiede zwischen verschiedenen Mauslinien beschrieben. 2009 wurde an isolierten Langendorff-perfundierten Wildtyp-Herzen verschiedener Mauslinien eine Genotypabhängigkeit verschiedener Repolarisationsparameter gezeigt (Waldeyer *et al.*, 2009). Da sich die Herzen jedoch *ex vivo* nicht mehr unter physiologischen Verhältnissen, also neurohumoralen Einflüssen befinden, ist die Aussagekraft für Herzen im Tierkörper limitiert.

Berthonneche *et al.* charakterisierten die kardiovaskulären Phänotypen verschiedenen genetischen Hintergrunds und zeigten, dass die Balb/C-Linie in Kontrollmessungen eine geringere Herzfrequenz als C57/B6 aufwies (Berthonneche *et al.*, 2009). Diese wiederum lag mit der Anzahl an Schlägen noch unter der

FVB/NJ-Linie. Daraus lässt sich auf einen unterschiedlich starken basalen Sympathikotonus schließen. Dieser ist demnach bei FVB/NJ höher als bei den Balb/C. Damit entsprechen die Ergebnisse der Arbeit von Berthonneche *et al.* nur teilweise denen in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen. Der Unterschied zwischen Balb/C und FVB/N findet sich in beiden Arbeiten, die C57/B6 unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht von den Balb/C- oder BS-Tieren.

Die Arbeit von Berthonneche *et al.* bildet eine erste systematische Untersuchung, die *in vivo* prinzipielle Unterschiede des Sympathikotonus verschiedener Mauslinien zeigt. Jedoch ist anzumerken, dass nur punktuelle Messungen durchgeführt wurden. Über die Tag-/Nacht-Rhythmik der kardiovaskulären Parameter lässt sich somit keine Aussage treffen. Auch ist die angewandte Methodik zur Beantwortung der Frage genotypspezifischer Unterschiede in der Herzfrequenz nur bedingt geeignet. Verwendet wurde zum einen die Tail-Cuff-Methode am wachen Tier. Diese misst die Herzfrequenz plethysmographisch, ist aber durch nötige Fixierung des Tieres unzuverlässig und fehlerhaft (Brooks *et al.*, 1996). Zum anderen wurde die Herzfrequenz mittels EKG am narkotisierten Tier erfasst, was durch Einfluss der Anästhesie wiederum zur Verfälschung der Parameter führen kann. Auch ist das Tier zu dieser Zeit nicht frei beweglich, aktivitätsabhängige Unterschiede können nicht erfasst werden.

Ebenso wurden Unterschiede in Herzfrequenz, PR-Intervall und QRS-Dauer zwischen verschiedenen Genotypen gezeigt (Xing *et al.*, 2009). Aber auch diese Daten wurden in wachen, aber nicht freilaufenden Tieren über einen Zeitraum von zweieinhalb Stunden gemessen und haben aufgrund oben beschriebener methodischer Problematik eine möglicherweise eingeschränkte Aussagekraft.

Im Ansprechen auf  $\beta$ -adrenerge Blockade zeigten sich in der vorliegenden Arbeit nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Alle wiesen eine Reduktion der Herzfrequenz am Tag und in der Nacht auf. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen BS- und C57-Tieren in der Nacht.

2002 veröffentlichten Shusterman *et al.* eine Studie zu genotypspezifischen Mustern der Aktivität des autonomen Nervensystems und Herzinsuffizienz-Anfälligkeit in Mäusen, in der gezeigt wurde, dass FVB-Tiere eine höhere Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen aufzeigten als die C57Black6/SV129-Mäuse (Shusterman *et al.*, 2002). Damit verbunden war ein unterschiedliches Ansprechen auf pharmakologische Modulation des autonomen Nervensystems. Die FVBs mit der schnelleren Herzfrequenz reagierten auf Gabe von Betablockern mit einer Abnahme der Herzfrequenz, zeigten jedoch keinen Effekt nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. Bei den C57Black6/SV129-Mäusen, die unter Kontrollbedingungen auf einem niedrigeren Frequenz-Niveau lagen, verhielt es sich entsprechend umgekehrt: Betablocker zeigten keinen Effekt, während die Herzfrequenz unter sympathomimetischen (Isoprenalin) beziehungsweise parasympholytischen (Atropin) Medikamenten anstieg. Es wurde eine starke Verknüpfung von mittlerer Herzfrequenz in Ruhe und der pharmakologischen Antwort des kardialen Rhythmus postuliert. Während die Unterschiede in der basalen Herzfrequenz mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen, verhielten sich die Tiere in der Arbeit von Shusterman *et al.* unter  $\beta$ -adrenerger Modulation anders als in den oben beschriebenen Ergebnissen. Die Herzfrequenz beider Mauslinien ließ sich sowohl unter  $\beta$ -adrenerger Blockade als auch Stimulation modulieren.

Im pathophysiologischen Modell wurden unter anderem Unterschiede in der Wundheilung nach Myokardinfarkt postuliert (van den Borne *et al.*, 2009). Demnach erlitten nach Infarzierung vor allem 129S6- sowie C57Black6-Mäuse eine Infarktruptur, während Balb/C- und BS-Mäuse die schlechteste kardiale Funktion nach Myokardinfarkt aufwiesen und sich vor allem die BS durch die größte kardiale Dilatation bemerkbar machten. Weitere Einflussnahme des genetischen Hintergrundes auf die Infarktgröße beschrieben Guo *et al.* (Guo *et al.*, 2012). Dabei erwiesen sich die FVB/N-Mäuse als deutlich weniger sensitiv gegenüber myokardialer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (I/R). Ihre Infarktgröße war signifikant kleiner als die der zu vergleichenden Gruppen. Die C57BL/6/J hingegen wiesen deutlich größere Infarktgrößen als die Kontrolltiere auf.

Zusammenfassend bestätigt sich die Hypothese dieser Arbeit, dass die basale Herzfrequenz unter anderem durch den genetischen Hintergrund determiniert ist und phänotypische Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien vorliegen. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Hoit *et al.*, die B6 und A/J verwendeten (Hoit *et al.*, 2002), sowie Berthonneche *et al.*. Dennoch finden sich Unterschiede zu den Ergebnissen von Berthonneche *et al.*, deren Erkenntnisse aufgrund der oben aufgeführten technischen Limitationen eine reduzierte Aussagekraft besitzen.

### 4.1.2 Genotypabhängigkeit der physischen Aktivität und der Aktivitätsabhängigkeit ihrer Herzfrequenz

Die BS-Tiere zeigten sich in der vorliegenden Arbeit als besonders aktiv, Balb/C und FVB/N bewegten sich im Vergleich deutlich weniger. Die mittels telemetrischer Messung erworbenen Daten entsprachen dem subjektiv gewonnenen Eindruck beim Handling und bei der Beobachtung der Mäuse während Gewichtskontrollen, Käfigwechsel, im Stresstest und beim Betreten der Tierräume.

Entsprechend dieser Daten fanden auch andere Arbeitsgruppen im Bereich der Kognitionswissenschaften genotypische Unterschiede in der Motorik. Diese konnten im Schwimmtest oder bezüglich der Reaktion und Habituation auf akustische Reize gezeigt werden (Brooks *et al.*, 2004).

Zu beachten ist bei vergleichender Betrachtung der Herzfrequenz verschiedener Genotypen zum einen, ob sich gegebene Unterschiede durch die körperliche Aktivität der Tiere erklären lassen. Zum anderen stellt sich die Frage, ob sich Unterschiede in der Aktivitätsabhängigkeit der Tiere finden, ob die Mauslinien also unterschiedlich stark mit Herzfrequenzzunahme auf gesteigerte körperliche Aktivität reagieren. Bei Betrachtung der auf die körperliche Aktivität normierten Herzfrequenz zeigten die FVB/N-Tiere bei geringer Aktivität höhere Werte in der Herzfrequenz als die zu vergleichenden Gruppen.

Bei Metoprolol handelt es sich um einen lipophilen  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten. Aufgrund dieser Eigenschaft kann er die Blut-Hirn-Schranke passieren und  $\beta$ -Adrenozeptoren direkt im Gehirn blockieren (Kendall, 1997; Gourine *et al.*, 2008). Damit senkt er die von zentral ausgehende sympathische Wirkung auf das Herz. Auch andere zentrale Effekte des  $\beta_1$ -selektiven Adrenozeptorblockers sind bekannt. Beschrieben werden unter anderem Ermüdungserscheinungen, Schlafstörungen, Insomnie, Albträume und Depressionen (Lopez-Sendon *et al.*, 2004). Als zentrale Wirkung sind also auch Auswirkungen auf die körperliche Aktivität denkbar. Schon 1987 zeigten Lemmer *et al.* einen zentral dämpfenden Effekt lipophiler Betablocker auf die motorische Aktivität von Ratten in der Nacht (Lemmer & Neumann, 1987). Vergleicht man die Effekte der  $\beta$ -adrenergen Blockade in den untersuchten Mauslinien dieser Arbeit, so sind diese sehr unterschiedlich und teils kontrovers. Während FVB/N und Balb/C hinsichtlich ihrer physischen Aktivität kaum bis gar nicht auf die Metoprolol-Gabe reagierten, nahm die Aktivität der BS-Tiere stark ab, die der C57-Mäuse jedoch zu. Es ist also angesichts dieser Ergebnisse nicht auf einen eindeutigen Einfluss des Betablockers auf die physische Aktivität zu schließen.

### 4.1.3 Genotypabhängigkeit der Arrhythmieneigung unter $\beta$ -adrenerger Stimulation

Ausgehend von der Annahme, die Tiere verfügen über Unterschiede in der basalen Sympathikusaktivierung und ihrer Herzfrequenzregulation, und der Rolle, die dem Sympathikus in der Entstehung von Herzrhythmusstörungen beigemessen wird (Volders, 2010), ergibt sich die Frage, ob die Suszeptibilität gegenüber Arrhythmien durch basale Herzfrequenzunterschiede zu erklären ist. Hierbei lassen sich potentiell zwei Hypothesen bilden.

Eine Hypothese ist, Tiere mit erhöhter Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen verfügen über einen stärker ausgeprägten Sympathikotonus und sind damit auch anfälliger, unter zusätzlicher  $\beta$ -adrenerger Stimulation Arrhythmien zu entwickeln. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz, deren Körper unter

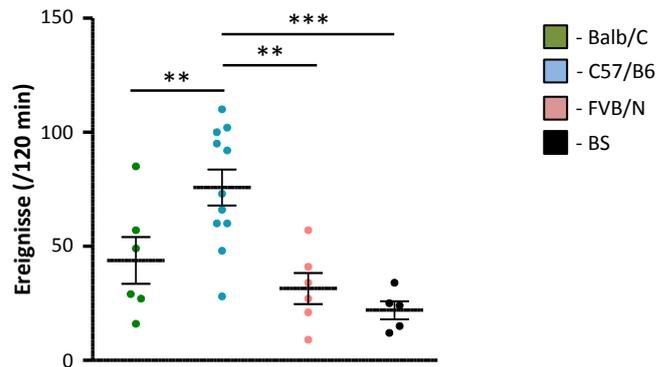
chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation steht, kann es zu elektrophysiologischen Störungen und somit zu Tachyarrhythmien und plötzlichem Herztod kommen (Stockigt *et al.*, 2012). Diese Hypothese lässt sich aber in dieser Arbeit nicht bestätigen. Die FVB/N-Tiere, die unter Kontrollbedingungen die höchste Herzfrequenz aufwiesen, zeigten unter Isoprenalin-Injektion keine vermehrten arrhythmischen Ereignisse im Vergleich zu den Wildtypen anderer Mauslinien.

Andererseits könnte sich eine höhere Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen protektiv auf das Tier auswirken. Es wurde sowohl im Menschen als auch in der Maus gezeigt, dass ein erhöhter Sinusrhythmus catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT), eine vererbte arrhythmogene Störung ausgelöst durch Stress oder starke körperliche Aktivität, verhindern kann (Faggioni *et al.*, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass eine erhöhte supraventrikuläre Schrittmacheraktivität die Diastolendauer verkürzt und so das Risiko für Nachdepolarisationen und getriggerte Aktivität reduziert. Auch in Patienten mit Brugada-Syndrom, ebenfalls einer arrhythmogenen Erkrankung, wurde eine Suppression von Kammerflimmern durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation mittels Isoprenalin sowie eine Verstärkung von Kammerflimmern unter dem Betablocker Propranolol festgestellt (Omiya *et al.*, 2012). Auch diese Hypothese kann anhand der Erkenntnisse dieser Arbeit in der Maus nicht bestätigt werden. Prinzipiell scheint es nicht möglich, eine Herzfrequenzzunahme, weder in ihrer Höhe noch in ihrer Dauer, mit der Anzahl arrhythmischer Ereignisse zu korrelieren. Es ist also davon auszugehen, dass Arrhythmien auch über andere Mechanismen als die Steigerung der Herzfrequenz zu erklären sind, die hier jedoch nicht gezeigt werden.

## 4.2 Übertragung genotypabhängiger Unterschiede auf ein etabliertes transgenes Modell der hypertrophen Kardiomyopathie

Als Modell für die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) dienten zwei bereits etablierte transgene Mauslinien mit einer Knock-In-Mutation im kardialen Myosin-bindenden Protein C (cMyBP-C). Diese Mutation wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Lucie Carrier (Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, UK Eppendorf-Hamburg) in zwei viel verwendete genetische Hintergründe, BS und C57/B6, eingekreuzt. Die Auswahl der zu vergleichenden Genotypen Mybpc3-BS und Mybpc3-C57 erfolgte aufgrund von Arbeiten, die Unterschiede in der Sterblichkeit und im kardialen Remodelling in Abhängigkeit des Genotyps zeigten. So verstarben in einem Mybpc3-KO-Modell die C57-Tiere fast alle in einem Alter zwischen 30 und 62 Wochen, während die BS-Tiere keine Einschränkung in der Lebensdauer aufwiesen (Friedrich F & Carrier L *et al.*, unpublished). Die verstorbenen Mybpc3-C57-KO-Mäuse präsentierten sich zudem mit einer enorm gesteigerten HG/KG-Ratio. Ein weiterer Grund für die Wahl der beiden genetischen Hintergründe begründet sich auf vorläufigen Ergebnissen einer anderen Promotion innerhalb der Arbeitsgruppe. Die bisher unpublizierten Daten von AC Limbrock zeigen Unterschiede in der Induzierbarkeit von Herzrhythmusstörungen unter Isoprenalin zwischen den verschiedenen genetischen Hintergründen. Dabei weisen die C57-Tiere signifikant mehr Arrhythmien auf, die wenigsten Ereignisse finden sich in der Gruppe der BS-Tiere (Abb. 45). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Genotypen C57 und BS als Hintergrund des KI-Modells ausgewählt. Anhand der beiden ausgewählten transgenen Mauslinien sollte die Übertragbarkeit genotypabhängiger Unterschiede auf ein pathophysiologisches Tiermodell untersucht werden, weshalb die Wildtypen der Genotypen mit den größten Unterschieden in der Induzierbarkeit von Arrhythmien in diesem Teil der Arbeit miteinander verglichen werden sollten. Weiterhin von Vorteil war die Verfügbarkeit dieser beiden Genotypen mit eingekreuzter Mutation.

## Diskussion



**Abbildung 45 – Arrhythmische Ereignisse unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Arbeit von AC Limbrock.** Anzahl der Arrhythmien unter Isoprenalin; N=6,11,6,5; Signifikanzen berechnet mit einer One-Way-ANOVA, \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

In Arbeiten von Vignier *et al.* und Schlossarek *et al.* wurde bereits die phänotypische Ausprägung der Merkmale der HCM in dem transgenen Mausmodell beschrieben (Vignier *et al.*, 2009; Schlossarek *et al.*, 2012). Diese umfassen ein nach außen hin unauffälliges Erscheinungsbild der Tiere: Die Tiere zeigten einen normalen Habitus und eine kontinuierliche Gewichtszunahme. Die Herzen der KI-Tiere erwiesen sich als deutlich linksventrikulär hypertrophiert und interstitiell fibrosiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmten mit diesen phänotypischen Ausprägungen überein, bei der Organentnahme fielen deutlich dysmorphe Herzen mit kugeliger Gestalt auf. Beide Mauslinien zeigten also ein klares Krankheitsbild, aber sowohl anatomisch als auch strukturell ließ sich keine Genotypabhängigkeit feststellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Modell prinzipiell funktioniert hat. Dennoch ist damit noch nicht geklärt, ob diese anatomischen Gegebenheiten funktionelle Auswirkungen auf die Tiere haben.

### 4.2.1 Funktionelle Unterschiede im transgenen Modell

Sowohl körperliche Aktivität als auch Herzfrequenz unterlagen der normalen circadianen Rhythmik. Damit war bei den KI-Tieren ein physiologischer Regelbereich der Herzfrequenz gegeben. Die KI-Tiere schienen durch die Erkrankung demnach nicht übermäßig gestresst, der Sympathikus nicht dauerhaft überaktiv zu sein.

Die Herzfrequenz der Mybpc3-BS-WT lag unter Kontrollbedingungen etwas höher als bei Mybpc3-BS-KI, Mybpc3-C57-WT und Mybpc3-C57-KI. Jedoch zeigten sich die Mybpc3-BS-WT-Tiere auch wesentlich aktiver als die zu vergleichenden Gruppen. Betrachtet man also die aktivitätsnormierte Herzfrequenz, gab es keine Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und ihrem zugehörigen Wildtyp. Es ist zunächst überraschend, bei den KI-Tieren keine Verschiebung der Herzfrequenz zu höheren Werten zu sehen. Sie scheinen demnach nicht im erwarteten Zustand einer Herzinsuffizienz zu sein. Da Vorarbeiten ebenfalls im jungen Alter der Tiere stattfanden, war dies vorab nicht bekannt. Der funktionelle Teil der hypertrophen Kardiomyopathie spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit nur teilweise wider. Während mechanische (Kontraktilität, FAS) und geometrische Einschränkungen in den KI-Tieren zum Ausdruck kamen (Vgl. 3.6.1.3), gab es kein Korrelat für die elektrischen funktionellen Einschränkungen in Form von Herzrhythmusstörungen. Dabei ist unklar, ob im Alter oder in der Wahl des Modells eine Ursache dafür zu sehen ist. In Abbildung 35.C ist die Häufigkeitsverteilung der Aktivitätseinheiten aufgetragen. Bei den beiden KI-Linien ließ sich im Gegensatz zu den Wildtypen ein abrupter Abfall der Häufigkeit bei circa 125 A.U. erkennen. Hier stellt sich die Frage, ob die Tiere durch ihren genetischen Defekt eine funktionelle Einschränkung erfuhren.

Auf die Metoprolol-Gabe reagierten die Mybpc3-BS-WT-Mäuse mit geringerer Ausprägung der Herzfrequenzreduktion als die drei anderen Versuchstiergruppen. Ihre körperliche Aktivität wurde hingegen stark reduziert, während Mybpc3-BS-KI und Mybpc3-C57-WT sich sogar aktiver zeigten als in der Kontrollmessung. Klare zentrale Effekte des lipophilen Betablockers lassen sich aufgrund der sehr unterschiedlichen Beeinflussung der Aktivität nicht ableiten (Vgl. 4.1.2).

## Diskussion

Interessanterweise schienen die KI-Tiere unter Metoprolol eine höhere Aktivität zu erreichen (Vgl. Abb. 38.C). Dies könnte auf eine Verbesserung der Symptome hindeuten oder sogar als Therapieerfolg verstanden werden. Ob die Mäuse durch die Betablocker aber über eine verbesserte kardiovaskuläre Leistungsfähigkeit verfügten, bleibt unklar und bedürfte weiterer Untersuchungen. Eine Verbesserung der Ejektionsfraktion unter Metoprolol war sonographisch jedoch nicht zu verzeichnen.

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist unter jungen Menschen der häufigste Grund für den plötzlichen Herztod (Maron *et al.*, 2013). Grund hierfür ist die Entstehung von lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen. Demnach könnte von mehr Arrhythmien unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei transgenen Tieren im HCM-Modell ausgegangen werden. Während anatomische und strukturelle Merkmale der KI-Tiere wiederholt dem pathologischen Bild der hypertrophen Kardiomyopathie entsprechen (Vgl. 4.2), ist über funktionelle Auswirkungen der Mutation auf elektrophysiologischer Ebene im Tiermodell wenig in der Literatur zu finden. Es ist demnach a priori nicht ausreichend geklärt, ob Arrhythmien auch im Mausmodell ein Problem darstellen.

In dieser Arbeit zeigten die Mybpc3-KI-Tiere keine spontan auftretenden Herzrhythmusstörungen. Auch fand sich weder unter dem Stress durch alleiniges Handling (NaCl-Kontrolle) noch unter dem  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin ein signifikanter Unterschied der KI-Tiere zu ihrem Wildtyp in der Induzierbarkeit von Arrhythmien.

Es stellt sich die Frage, wie die gesteigerte Arrhythmieneigung mit der hypertrophen Kardiomyopathie zusammenhängt. Vielfach wird die Arrhythmogenese mit kardialem Remodelling und interstitieller Fibrose in Zusammenhang gebracht. Rechtsventrikuläres Remodelling einhergehend mit interstitieller Fibrose zeigte eine verstärkte Arrhythmogenese in einem Rattenmodell zur pulmonalen Hypertonie (Tanaka *et al.*, 2013). Dabei scheint unter anderem Connexin-43, ein Gap-junction-Protein, eine Rolle zu spielen, welches sowohl im Menschen als auch im Tiermodell in verschiedenen Herzerkrankungen wie zum Beispiel ischämischer oder hypertropher Kardiomyopathie durch veränderte Expression oder Phosphorylierung

zu einer gestörten Reizleitung und ventrikulären Arrhythmien führt. Ursache dafür ist die Störung der Zell-zu-Zell-Verbindungen (Sato *et al.*, 2008). Aber auch Kollagen-Anlagerung nach Myokardinfarkt oder Myokarditis scheint als arrhythmogenes Substrat zu wirken (Tanaka *et al.*, 2013). Zudem gilt myokardiale Fibrose als unabhängiger Prädiktor für Arrhythmien, da die Automatie gesteigert ist und frühe Nachdepolarisationen Aktivität triggern (Karagueuzian, 2011). Obwohl in der vorliegenden Arbeit Hypertrophie und interstitielle Fibrose gegeben waren, wiesen die Tiere keine vermehrten arrhythmischen Ereignisse auf. Somit bleibt offen, was im Einzelnen die Herzrhythmusstörungen auslöst und nicht in der von uns gewählten Mauslinie gegeben war.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die beiden genetischen Hintergründe, die im KO-Modell Unterschiede im kardialen morphologischen Phänotyp und Versterben gezeigt haben, im KI-Modell auf den unterschiedlichen Ebenen nicht parallel verlaufen. Während sich strukturelle und morphologische Unterschiede bestätigen lassen, gibt es keine Abhängigkeit des elektrisch funktionellen Aspekts in Form von Arrhythmien. Wenn es also Unterschiede im Zeitpunkt des Versterbens zwischen den beiden Mauslinien geben sollte, lassen sich diese nicht auf die Neigung zu Herzrhythmusstörungen zurückführen. Damit erweist sich auch die Frage, ob strukturelle Gegebenheiten als ursächlich für die Suszeptibilität gegenüber arrhythmischen Ereignissen zu sehen sind, als hinfällig. Eine solche Abhängigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Was bei anderen Pathologien, wie zum Beispiel dem Myokardinfarkt an genotypabhängigen Unterschieden zu finden ist (Guo *et al.*, 2012; van den Borne *et al.*, 2009), lässt sich nicht auf die hier verwendeten Modelle und den Parameter der Arrhythmie neigung übertragen.

### 4.3 Wesentliche Aspekte der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Charakterisierung kardiovaskulärer Eigenschaften wie die Herzfrequenz und das Ansprechen auf  $\beta$ -adrenerge Modulation verschiedener Mauslinien. Mittels eines technisch aufwändigen Verfahrens wurden unter gesunden Bedingungen der Tiere und einem physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus eine Reihe objektiver Ergebnisse gewonnen. In der basalen Herzfrequenzregulation zeigten alle Mauslinien einen angemessenen Regelbereich der Herzfrequenz, wobei die Herzfrequenz der FVB/N-Tiere signifikant höher lag als die der BS, C57 und Balb/C. Dieser Unterschied blieb auch bei Normierung auf die körperliche Aktivität bestehen. Besonders aktiv zeigten sich die BS-Mäuse. Bei allen Tieren wurde unter Metoprolol eine Betablockade mit daraus resultierender Herzfrequenzabnahme beobachtet, die signifikant stärker in der Nacht ausgeprägt war. Genotypabhängige Unterschiede waren nur nachts zwischen BS und C57 zu sehen. Im gut etablierten kardialen Stresstest mit Isoprenalin zeigten sich die Balb/C signifikant anfälliger für die Entstehung ventrikulärer Herzrhythmusstörungen. Zuletzt erfolgte die Übertragung der Fragestellung auf die hypertrophe Kardiomyopathie als pathophysiologisches Modell. Dafür wurde eine etablierte transgene Linie mit KI-Mutation im Gen für das kardiale Myosin-bindende Protein C (Mybpc3) eingesetzt. Eine funktionelle Einschränkung lässt sich bei den KI-Tieren daran ablesen, dass weniger hohe Aktivitätslevel erreicht wurden. Zudem ließen sie in der Echokardiographie einen pathologischen Phänotyp erkennen. Es waren hingegen keine eindeutigen Unterschiede in der aktivitätsnormierten Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen und in dem Antwortverhalten auf Metoprolol oder Isoprenalin in den KI-Tieren zu erkennen, und damit auch keine genotypabhängigen Unterschiede. Obwohl bei dieser Erkrankung ein zentrales Merkmal die Neigung zu Herzrhythmusstörungen ist, konnten keine vermehrten Ereignisse bei den KI-Tieren festgestellt werden.

Im Vergleich zu all den sonstigen oben beschriebenen Unterschieden, die sich zwischen verschiedenen Genotypen finden, ist die Genotypabhängigkeit, die sich in dieser Arbeit abzeichnet, als moderat zu bewerten.

#### 4.4 Limitationen der Arbeit

Viele vitale Parameter der Versuchstiere sind altersabhängig. Dies betrifft neben EKG-Zeitintervallen und der Herzfrequenz (Xing *et al.*, 2009) unter anderem auch das Körpergewicht, welches mit zunehmendem Alter kontinuierlich steigt (Cong *et al.*, 2013). Das Bestreben, jede Messreihe mit verschiedenen Genotypen zu besetzen, diente der Gleichverteilung äußerer, schlecht identifizierbarer Einflussfaktoren auf die Tiere und Messbedingungen. Dabei musste in der Planung die Verfügbarkeit der entsprechenden Genotypen berücksichtigt werden, da nicht zu jeder Zeit alle Genotypen im exakt übereinstimmenden Alter bereitstanden. Um die verschiedenen Genotypen zeitgleich messen zu können, mussten gewisse Altersunterschiede der Mäuse in Kauf genommen werden. Zu Beginn der Messungen lagen die Tiere bei einem Alter zwischen neun und dreizehn Wochen, bei der Organentnahme waren sie zwischen 20 und 29 Wochen alt. Dies ist bei Betrachtung einiger Parameter zu berücksichtigen. So ist zum Beispiel die Aussagekraft des absoluten Herzgewichts bei Organentnahme eingeschränkt. Zur Hypertrophie-Bewertung wurde deshalb das Verhältnis zur Tibialänge herangezogen. Da sich unsere Tiere aber insgesamt mit maximal gut sieben Monaten in einem noch relativ jungen Alter befanden und die meisten Untersuchungen zur Altersabhängigkeit in höherem Tieralter erfolgten (in der oben zitierten Arbeit von Xing *et al.* im Alter von sechs Monaten bis zu zwei Jahren), ist die Ausprägung von Altersunterschieden eher als mäßig einzuschätzen.

Ein weiteres methodisches Bias findet sich in der Reihenfolge der Messungen. Alle Tiere durchliefen den gleichen Zeitplan. Begonnen wurde mit der Kontrollmessung, es folgte der kardiale Stresstest und zum Schluss wurden alle Tiere mit dem Betablocker Metoprolol behandelt. Die Mäuse waren also zum Zeitpunkt der EKG-Aufnahme unter Metoprolol circa fünf Wochen älter als bei der Kontrollmessung. Besser wäre eine zeitlich konsekutive Verabreichung in randomisierter Reihenfolge gewesen, was die Versuchsdauer jedoch stark verlängert hätte. Bei der gewählten Vorgehensweise war ein Ziel, den Mess-Zeitraum allein wegen des Telemetrierfahrens aus methodischen Gründen zu begrenzen. Mit zunehmender

Dauer kann nicht mit Sicherheit von technisch einwandfreien Messergebnissen ausgegangen werden, da nicht bekannt ist, ob Elektroden verwachsen, brechen oder sich mit der Zeit verschieben können. Da die zeitlich vorgezogene Metoprolol-Messung mit einer längeren Ruhephase zwecks Auswaschung des Medikaments verbunden gewesen wäre, wurde auf diese Randomisierung verzichtet. Ein weiterer Grund für die zeitliche Begrenzung des Versuchszeitraums waren Hinweise in unpublizierten Daten auf ein früheres Versterben der HCM-Tiere, weshalb wir diese in jungem Alter untersuchen wollten.

Obwohl die Neigung zu Herzrhythmusstörungen ein zentrales Merkmal der hypertrophen Kardiomyopathie ist, ließen sich in dieser Arbeit keine vermehrten arrhythmischen Ereignisse in den KI-Tieren nachweisen. Es ist zunächst verwunderlich, in einem Modell, welches im Menschen deutlich mit einer erhöhten Neigung zu Arrhythmien einhergeht, keine vermehrte Arrhythmogenese wiederzufinden. Es gibt bisher keine Arbeiten, die sich mit Unterschieden in der Arrhythmie-neigung bei eingebrachter *Mybpc3*-Mutation befassen. Die Ursache dafür, dass in dem Modell keine Effekte zu sehen sind, ist unklar. Bekannt ist, dass das Modell prinzipiell funktioniert hat. Strukturelle Merkmale wie Herzhypertrophie und interstitielle Fibrose waren gegeben. Es ist möglich, dass das Alter ein wichtiger Faktor in der Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber Arrhythmien ist und die telemetrischen Messungen dieser Arbeit an zu jungen Tieren stattfanden, deren Alter zwischen zehn und sechzehn Wochen lag. In der Arbeit von Vignier *et al.* werden die Mäuse jedoch bis zu zwei Jahren als normal überlebensfähig eingeschätzt (Vignier *et al.*, 2009), was gegen das Auftreten späterer letaler Arrhythmien spricht.

Ein anderer möglicher Grund für das Fehlen von Unterschieden in der Neigung zu Herzrhythmusstörungen könnte in der Wahl des Mausmodells liegen. Obwohl die *Mybpc3*-KI-Tiere anatomisch und strukturell ein gutes Korrelat zur HCM im Menschen bilden, scheint die Neigung zu Herzrhythmusstörungen als funktionelles pathophysiologisches Merkmal nicht durch diese Mutation hervorgerufen zu werden. In einer vergleichenden Studie verschiedener Mausmodelle zur familiären hypertrophen Kardiomyopathie untersuchten McConnel *et al.* heterozygote Tiere mit

einem Transgen im  $\alpha$ -kardialen Myosin-Heavy-Chain ( $\alpha$ MHC)- bzw. kardialen Myosin-bindenden Protein C (MyBPC)-Gen (McConnell *et al.*, 2001). Die MyBPC-transgenen Mäuse weisen eine linksventrikuläre Hypertrophie auf, entsprechende molekulare Marker sind erst im hohen Alter der Tiere nachweisbar. Die kardiale Funktion ist nicht eingeschränkt und es finden sich zu keinem Zeitpunkt elektrophysiologische Abweichungen vom Wildtyp. Die Mutation im  $\alpha$ MHC führt in heterozygoten Mäusen hingegen zu einer stärkeren LV-Hypertrophie, einem deutlichen Anstieg molekularer Marker und zur Induzierbarkeit ventrikulärer Arrhythmien. Diese Ergebnisse weisen auf Unterschiede in der Ausprägung des Krankheitsgrades je nach zugrundeliegender Mutation der HCM hin. Möglicherweise ist die in dieser Arbeit gewählte Mutation zur Untersuchung von Unterschieden in der elektrischen Funktion nicht ausreichend. Da die funktionellen Auswirkungen des gewählten Modells zum Zeitpunkt der Arbeit nicht bekannt waren, ist dieses Ergebnis als Erkenntnisgewinn zu verstehen, welcher der weiteren Vervollständigung der Charakteristik des Modells dient. Zudem ist nach Betrachtung der Kontrollmessung von Herzfrequenz und Aktivität in dieser Arbeit die Auswahl der genetischen Hintergründe, in die die Mutation eingebracht wurde, zu hinterfragen, die anhand nicht deckungsgleicher Ergebnisse einer anderen Promotionsarbeit der Arbeitsgruppe getroffen wurde.

Eine Studie von Berul *et al.* zur Vulnerabilität in homo- wie heterozygoten Mäusen mit einer ebenfalls im Mybpc3-Gen eingeführten Mutation zeigte in der Norm liegende EKG-Intervalle und Herzfrequenzvariabilität (Berul *et al.*, 2001). Erregungsleitung und Refraktärzeit stellten sich ebenfalls normal dar, obwohl ein eindeutiges histopathologisches Korrelat und eine ventrikuläre Dysfunktion vorlagen. Die Vulnerabilität gegenüber Arrhythmien war in den transgenen Tieren zu finden. Trotz der genetischen Homogenität zeigte dennoch nur ein Teil der Versuchstiere ventrikuläre Tachykardien. Der Autor erklärt dies mit möglichen umweltbedingten oder somatischen Einflussfaktoren. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Messung in einem Alter von 30 bis 55 Wochen, was wieder zu der Frage zurückführt, ob die Messungen der vorliegenden Arbeit zu einem zu frühen Zeitpunkt stattfanden.

Limitationen sind des Weiteren in der Auswertung des kardialen Stresstests und den darin aufgetretenen Arrhythmien zu sehen. Bei der EKG-Auswertung handelt es sich um ein technisch aufwändiges Verfahren, bei dem sich die Definierung der arrhythmischen Ereignisse und deren Anwendung als schwierig gestalten. Es können keine Rückschlüsse auf die Entstehung und Ursache der Herzrhythmusstörungen gezogen werden, es handelt sich um eine rein oberflächliche Beschreibung des EKGs. Des Weiteren gibt es wenige Publikationen mit einer objektiven Auswertung arrhythmischer Ereignisse bei Mäusen. Die Definition des „Kammerflimmerns“ beim Menschen, die sich unter anderem durch eine stark erhöhte Kammerfrequenz (>300/min) auszeichnet (Zipes *et al.*, 2006), ist bei einer normalen Herzfrequenz der Mäuse um circa 600 Schläge pro Minute nicht einfach zu übertragen. Es gibt bisher keine *Consensus Guidelines* zur Objektivierbarkeit der Herzrhythmusstörungen im Mausmodell. Die Auswertung bleibt also trotz großer Bemühungen der objektiven Beurteilung (Vgl. Definitionen, Tab. 2 – Einteilung der Arrhythmien) zuletzt unter dem subjektiven Eindruck der auswertenden Person. Aus diesem Grund wurde bei der geringen Anzahl kritischer EKG-Auffälligkeiten eine Zweitmeinung eingeholt.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Fragestellungen untersucht. Im ersten Teil wurden Hinweise auf eine Genotypabhängigkeit in Herzfrequenzregulation, körperlicher Aktivität und im pharmakologischen Antwortverhalten und der Arrhythmieeigung der Mäuse gezeigt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen und Ergebnissen weiterer Arbeiten zur Genotypabhängigkeit bleibt die Frage der Bedeutung des genetischen Hintergrunds für andere kardiovaskuläre Parameter, wie zum Beispiel des Blutdrucks, offen. Auch ist bisher nicht ausreichend geklärt, ob gezeigte Unterschiede in der Herzfrequenz einen Effekt auf das Überleben haben und somit eine funktionelle Relevanz besitzen. Für die weitere Vertiefung der kardiovaskulären Charakterisierung vielverwendeter Mauslinien wäre zudem interessant, ob

## Diskussion

Herzfrequenz-Unterschiede konsistent über Geschlecht und Alter nachzuweisen sind.

Bei Verwendung der von uns gewählten Mäuse sowie dem gewählten Modell ließen sich keine genotypabhängigen Effekte zeigen. Dies bedeutet nicht, dass es generell keine Unterschiede in der Arrhythmie neigung zwischen verschiedenen Genotypen gibt.

Dabei stellt sich zunächst einmal die Frage, ob es an der Wahl des Modells lag. Um Unterschiede in der Arrhythmie neigung transgener Tiere zu sehen, wären Modelle mit Erkrankungen, die auch im Tiermodell eindeutig mit Arrhythmien einhergehen, in Betracht zu ziehen. So kämen zum Beispiel Modelle zum Brugada-Syndrom, bei dem SCN5-defiziente Mäuse spontan und unter Flecainid vermehrt ventrikuläre Tachykardien aufzeigten (Martin *et al.*, 2011), zur catecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT) oder zu Ionenkanalerkrankungen in Frage. Auch eine sekundäre Arrhythmie neigung nach Ischämie könnte als Modell herangezogen werden.

Eine zweite Möglichkeit wäre, wie bereits unter Punkt 4.4 besprochen, eine Verlagerung des Untersuchungszeitraums auf ein höheres Alter der Tiere. Selbst ein eventuell früheres Versterben hätte dann eine Aussagekraft, wenn diese auf eine verstärkte Arrhythmie neigung der KI-Tiere zurückzuführen wäre.

Der Vergleich der Wildtypen in ihrer Suszeptibilität gegenüber Arrhythmien hat in dieser Arbeit ein vermehrtes Auftreten arrhythmischer Ereignisse in der Linie der Balb/C-Mäuse gezeigt. Damit wird jedoch zunächst nur deutlich, dass es genotypspezifische Unterschiede gibt. Welche Ursache dieser erhöhten Neigung zu Arrhythmien zugrunde liegt, ist damit immer noch unklar. Der Mechanismus, der hinter dieser Erkenntnis steckt, wäre in fortführenden Arbeiten zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die Herzfrequenz unterliegt *in vivo* einer ständigen Beeinflussung durch das autonome Nervensystem, welches eine circadiane Rhythmik zeigt und die Herzleistung dem Bedarfzustand des Körpers anpasst. Unregelmäßigkeiten in der Herzaktion sind unter anderem ein zentrales Merkmal in Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM). Die Mybpc3-KI-Mutation stellt im transgenen Mausmodell ein gutes anatomisches wie strukturelles Korrelat zur HCM dar. In dieser Arbeit sollte eine kardiovaskuläre Charakterisierung häufig verwendeter Mausstämmen in Bezug auf ihre Herzfrequenzregulation, ihr Antwortverhalten auf  $\beta$ -adrenerge Modulation und die Induzierbarkeit von Arrhythmien, sowie die Prüfung der Übertragbarkeit auf ein pathophysiologisches Modell zur HCM erfolgen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen diente ein Mausmodell mit gepaarten Versuchen. Dafür wurden in FVB/N, BS, C57BL/6 und Balb/C mittels telemetrischer EKG-Messung Herzfrequenz sowie körperliche Aktivität aufgezeichnet. Metoprolol wurde zur medikamentösen Blockade, Isoprenalin zur Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Systems eingesetzt. Die basale aktivitätsnormierte Herzfrequenz der FVB/N-Tiere lag über der der anderen Genotypen, die sich auf dem gleichen Niveau befanden. Besonders körperlich aktiv waren die BS-Mäuse. Bei allen Tieren wurde die Herzfrequenz sowohl am Tag als auch in der Nacht unter Metoprolol gesenkt. Isoprenalin erhöhte die Arrhythmogenese in den vier Mausstämmen, signifikant mehr arrhythmische Ereignisse traten in der Balb/C-Linie auf. In den HCM-Tieren war eine leichte Einschränkung der maximalen körperlichen Aktivität zu verzeichnen, die sich unter Metoprolol aufhob.

Wie aus anderen Studien zur Genotypabhängigkeit des Verhaltens, der Motorik oder im kardiovaskulären Bereich bekannt, finden sich auch im Vergleich des basalen Sympathikotonus, gemessen an der aktivitätsnormierten Herzfrequenz, linienabhängige Unterschiede. Ein Zusammenhang des Ansprechens auf  $\beta$ -adrenerge Blockade mit der basalen Herzfrequenz ist jedoch nicht festzustellen.

## Zusammenfassung

Funktionell zeigt sich keine Relation zwischen Anzahl der aufgetretenen Arrhythmien unter Isoprenalin und der basalen Herzfrequenz. Es wird kein Zusammenhang zwischen Arrhythmien und dem Grundtonus des Sympathikus erkennbar. Obwohl die KI-Mutation im Mybpc3-Gen prinzipiell als HCM-Modell in Frage kommt, geht neben dem Genotyp auch die Mutation nicht mit einer leichteren Induzierbarkeit von Arrhythmien einher.

Genotypabhängige Unterschiede der elektrophysiologischen kardialen Grundeigenschaften sind vorhanden. Sie sind jedoch im Kontext anderer nachgewiesener Genotypabhängigkeiten als gering einzuschätzen. Unterschiede in genotypspezifischen Reaktionen auf Pathologien lassen sich nicht ausreichend erklären.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adrenalin
<b>A.U.</b>	<i>Activity units</i> , relative Aktivitätseinheit
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ACC</b>	Arteria carotis communis
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>AF</b>	Atemfrequenz
<b>AUC</b>	<i>Area under Curve</i> , Fläche unter der Kurve
<b>AV-Knoten</b>	Atrioventrikularknoten
<b>AWThd</b>	<i>Anterior wall thickness in diastole</i> , Vorderwanddicke in der Diastole
<b>BS</b>	Black Swiss
<b>C57</b>	C57/Black6
<b>Cav1.3</b>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L-type</i> ; spannungsgesteuerter Calcium-Kanal, L-Typ
<b>COMT</b>	Catechol O-Methyltransferase
<b>d</b>	Diastole
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>EPM</b>	<i>Elevated Plus Maze</i> , Modell zur Bestimmung von Angst bei Nagern
<b>FAS</b>	<i>Fractional area shortening</i> , linksventrikuläre Verkürzungsfraction
<b>FHC</b>	Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie
<b>GIRK</b>	G-protein gekoppelter <i>inward rectifying</i> K <sup>+</sup> -Kanal
<b>HCM</b>	Hypertrophe Kardiomyopathie
<b>HCN-Kanal</b>	<i>Hyperpolarization-cyclonucleotid-activated non-selective channel</i> , Hyperpolarisations-Cyclonukleotid-gesteuerter nicht-selektiver Ionenkanal

## Abkürzungsverzeichnis

<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HG</b>	Herzgewicht
<b>i.p.</b>	<i>intra peritoneal</i> , in die Bauchhöhle
<b>I<sub>Ca</sub></b>	Ca <sup>2+</sup> -Strom
<b>ICD</b>	Implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
<b>I<sub>f</sub></b>	“ <i>funny current</i> ”, ‘Schrittmacher-Strom’
<b>I<sub>K</sub></b>	K <sup>+</sup> -Strom
<b>Iso</b>	Isoproterenol = Isoprenalin
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KI</b>	<i>Knock-in</i>
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LSG</b>	<i>Left stellate ganglion</i> , linkes Ganglion Stellatum
<b>LV</b>	Linker Ventrikel
<b>LVEDV</b>	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
<b>LVESV</b>	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
<b>LVIDd</b>	Linksventrikulärer Innendurchmesser in der Diastole
<b>LVMd</b>	Linksventrikuläre Masse in der Diastole
<b>Meto</b>	Metoprolol
<b>MYBPC</b>	Kardiales Myosin-bindendes Protein C
<b>Mybpc3</b>	Mutation im kardialen Myosin-bindenden Protein C in der Maus
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NCX</b>	Natrium-Calcium-Austauscher
<b>p.o.</b>	<i>per os</i> , peroral, Verabreichung über den Mund
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PWThd</b>	<i>Posterior wall thickness in diastole</i> , Hinterwanddicke in der Diastole
<b>R<sup>2</sup></b>	<i>R square</i> , Korrelationskoeffizient

## Abkürzungsverzeichnis

<b>RA - LF</b>	<i>Right arm to left foot</i> , II. Ableitung nach Einthoven
<b>rcf</b>	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
<b>s</b>	Systole
<b>s.c.</b>	<i>subcutan</i> , unter die Haut
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
<b>SV</b>	Schlagvolumen
<b>TdP</b>	<i>Torsade-de-Pointes</i> -Tachykardie
<b>TL</b>	Tibiallänge
<b>VES</b>	Ventrikuläre Extrasystole
<b>VT</b>	Ventrikuläre Tachykardie
<b>WT</b>	Wildtyp
<b><math>\alpha</math>MHC</b>	$\alpha$ -kardiale Myosin-Heavy-Chain

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams DJ, Doran AG, Lilue J, & Keane TM (2015). The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mamm Genome* 26, 403-412.
- Alig J, Marger L, Mesirca P, Ehmke H, Mangoni ME, & Isbrandt D (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12189-12194.
- Auerbach SS, Thomas R, Shah R, Xu H, Vallant MK, Nyska A, & Dunnick JK (2010). Comparative phenotypic assessment of cardiac pathology, physiology, and gene expression in C3H/HeJ, C57BL/6J, and B6C3F1/J mice. *Toxicol Pathol* 38, 923-942.
- Barnabei MS, Palpant NJ, & Metzger JM (2010). Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol Genomics* 42A, 103-113.
- Becher PM, Lindner D, Miteva K, Savvatis K, Zietsch C, Schmack B, Van LS, Westermann D, Schultheiss HP, & Tschope C (2012). Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and beta-receptor blockade. *Hypertension* 59, 949-957.
- Berthonneche C, Peter B, Schupfer F, Hayoz P, Kutalik Z, Abriel H, Pedrazzini T, Beckmann JS, Bergmann S, & Maurer F (2009). Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PLoS One* 4, e6610.
- Berul CI, McConnell BK, Wakimoto H, Moskowitz IP, Maguire CT, Semsarian C, Vargas MM, Gehrman J, Seidman CE, & Seidman JG (2001). Ventricular arrhythmia vulnerability in cardiomyopathic mice with homozygous mutant Myosin-binding protein C gene. *Circulation* 104, 2734-2739.
- Boudreau P, Dumont G, Kin NM, Walker CD, & Boivin DB (2011). Correlation of heart rate variability and circadian markers in humans. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2011, 681-682.
- Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Waddell TK, Render CL, & Phillipson EA (1996). Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure. *J Appl Physiol* (1985) 81, 1012-1018.

## Literaturverzeichnis

- Brooks SP, Pask T, Jones L, & Dunnett SB (2004). Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. I: motor tests. *Genes Brain Behav* 3, 206-215.
- Brooks SP, Pask T, Jones L, & Dunnett SB (2005). Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. *Genes Brain Behav* 4, 307-317.
- Cong WN, Wang R, Cai H, Daimon CM, Scheibye-Knudsen M, Bohr VA, Turkin R, Wood WH, III, Becker KG, Moaddel R, Maudsley S, & Martin B (2013). Long-term artificial sweetener acesulfame potassium treatment alters neurometabolic functions in C57BL/6J mice. *PLoS One* 8, e70257.
- Coote JH (2010). Recovery of heart rate following intense dynamic exercise. *Exp Physiol* 95, 431-440.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, & Paylor R (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132, 107-124.
- Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, & Shannon TR (2007). Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 100, 391-398.
- Curtis MJ, Hancox JC, Farkas A, Wainwright CL, Stables CL, Saint DA, Clements-Jewery H, Lambiase PD, Billman GE, Janse MJ, Pugsley MK, Ng GA, Roden DM, Camm AJ, & Walker MJ (2013). The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 139, 213-248.
- Desantiago J, Ai X, Islam M, Acuna G, Ziolo MT, Bers DM, & Pogwizd SM (2008). Arrhythmogenic effects of beta2-adrenergic stimulation in the failing heart are attributable to enhanced sarcoplasmic reticulum Ca load. *Circ Res* 102, 1389-1397.
- Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie & AWMF online. Leitlinie "Primäre Kardiomyopathien". <http://www.awmf.org> . 2013. 13-11-2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- DrugBank. DrugBank - Metoprolol. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00264> . 2013. 21-11-2012.  
Ref Type: Electronic Citation

- Faggioni M, Hwang HS, van der WC, Nederend I, Kannankeril PJ, Wilde AA, & Knollmann BC (2013). Accelerated sinus rhythm prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and in patients. *Circ Res* 112, 689-697.
- Fraune C, Lange S, Krebs C, Holzel A, Baucke J, Divac N, Schwedhelm E, Streichert T, Velden J, Garrelds IM, Danser AH, Frenay AR, van GH, Jankowski V, Stahl R, Nguyen G, & Wenzel UO (2012). AT1 antagonism and renin inhibition in mice: pivotal role of targeting angiotensin II in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 303, F1037-F1048.
- Frayssé B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, Starbatty J, Kramer E, Coirault C, Eschenhagen T, Kentish JC, Avkiran M, & Carrier L (2012). Increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1299-1307.
- Gedicke-Hornung C, Behrens-Gawlik V, Reischmann S, Geertz B, Stimpel D, Weinberger F, Schlossarek S, Precigout G, Braren I, Eschenhagen T, Mearini G, Lorain S, Voit T, Dreyfus PA, Garcia L, & Carrier L (2013). Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice. *EMBO Mol Med* 5, 1060-1077.
- Gottlieb SS, McCarter RJ, & Vogel RA (1998). Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med* 339, 489-497.
- Gourine A, Bondar SI, Spyer KM, & Gourine AV (2008). Beneficial effect of the central nervous system beta-adrenoceptor blockade on the failing heart. *Circ Res* 102, 633-636.
- Guo Y, Flaherty MP, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Li Q, & Bolli R (2012). Genetic background, gender, age, body temperature, and arterial blood pH have a major impact on myocardial infarct size in the mouse and need to be carefully measured and/or taken into account: results of a comprehensive analysis of determinants of infarct size in 1,074 mice. *Basic Res Cardiol* 107, 288.
- Harmon KJ, Couper LL, & Lindner V (2000). Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice. *Am J Pathol* 156, 1741-1748.
- Hoit BD, Kiatchosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Olszens K, Shao H, Pao YH, & Nadeau JH (2002). Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred mouse strains. *Genomics* 79, 679-685.

## Literaturverzeichnis

- Karagueuzian HS (2011). Targeting cardiac fibrosis: a new frontier in antiarrhythmic therapy? *Am J Cardiovasc Dis* 1, 101-109.
- Kendall MJ (1997). Clinical relevance of pharmacokinetic differences between beta blockers. *Am J Cardiol* 80, 15J-19J.
- Kirchhoff F, Krebs C, Abdulhag UN, Meyer-Schwesinger C, Maas R, Helmchen U, Hilgers KF, Wolf G, Stahl RA, & Wenzel U (2008). Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int* 73, 643-650.
- Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, & Wishart DS (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res* 39, D1035-D1041.
- Lemmer B (2007). Circadian rhythm regulations of the cardiovascular system. Studies in rats and mice. *IEEE Eng Med Biol Mag* 26, 30-32.
- Lemmer B & Neumann G (1987). Circadian phase dependency of the effects of different beta-receptor blocking drugs on motor activity of rats. Importance of drug lipophilicity. *Arzneimittelforschung* 37, 321-325.
- Li P, Sur SH, Mistlberger RE, & Morris M (1999). Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *Am J Physiol* 276, R500-R504.
- Lohse MJ, Engelhardt S, & Eschenhagen T (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93, 896-906.
- Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, & Torp-Pedersen C (2004). Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J* 25, 1341-1362.
- Mangoni ME & Nargeot J (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88, 919-982.
- Maron BJ, Spirito P, Ackerman MJ, Casey SA, Semsarian C, Estes NA, III, Shannon KM, Ashley EA, Day SM, Pacileo G, Formisano F, Devoto E, Anastasakis A, Bos JM, Woo A, Autore C, Pass RH, Boriani G, Garberich RF, Almquist AK, Russell MW, Boni L, Berger S, Maron MS, & Link MS (2013). Prevention of sudden cardiac death with implantable cardioverter-defibrillators in children and adolescents with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 61, 1527-1535.

## Literaturverzeichnis

- Martin CA, Guzadur L, Grace AA, Lei M, & Huang CL (2011). Mapping of reentrant spontaneous polymorphic ventricular tachycardia in a Scn5a<sup>+/-</sup> mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1853-H1862.
- McCauley MD & Wehrens XH (2010). Ambulatory ECG recording in mice. *J Vis Exp*.
- McConnell BK, Fatkin D, Semsarian C, Jones KA, Georgakopoulos D, Maguire CT, Healey MJ, Mudd JO, Moskowitz IP, Conner DA, Giewat M, Wakimoto H, Berul CI, Schoen FJ, Kass DA, Seidman CE, & Seidman JG (2001). Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 88, 383-389.
- McEvoy GK (2003). *AHFS Drug Information 2003*, pp. 1770. American Hospital Formulary Service.
- Mearini G, Stimpel D, Kramer E, Geertz B, Braren I, Gedicke-Hornung C, Precigout G, Muller OJ, Katus HA, Eschenhagen T, Voit T, Garcia L, Lorain S, & Carrier L (2013). Repair of Mybpc3 mRNA by 5'-trans-splicing in a Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e102.
- Moreth K, Fischer R, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wurst W, Katus HA, Bekeredjian R, & Hrabe de AM (2014). High-throughput phenotypic assessment of cardiac physiology in four commonly used inbred mouse strains. *J Comp Physiol B* 184, 763-775.
- Morgan DJ (1990). Clinical pharmacokinetics of beta-agonists. *Clin Pharmacokinet* 18, 270-294.
- Nebel M, Schwoerer AP, Warszta D, Siebrands CC, Limbrock AC, Swarbrick JM, Fliegert R, Weber K, Bruhn S, Hohenegger M, Geisler A, Herich L, Schlegel S, Carrier L, Eschenhagen T, Potter BV, Ehmke H, & Guse AH (2013). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling and arrhythmias in the heart evoked by beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 288, 16017-16030.
- Omiya T, Shimizu A, Ueyama T, Yoshiga Y, Doi M, Hiratsuka A, Fukuda M, Yoshida M, & Matsuzaki M (2012). Effects of isoproterenol and propranolol on the inducibility and frequency of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *J Cardiol* 60, 47-54.
- Park S, Park H, Hwang HJ, Shim J, Sung JH, Kim JY, Pak HN, Lee MH, & Joung B (2011). Heart Rate Acceleration of a Subsidiary Pacemaker by beta-Adrenergic Stimulation. *Korean Circ J* 41, 658-665.

## Literaturverzeichnis

- Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, & Bers DM (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88, 1159-1167.
- Qin M, Liu T, Hu H, Wang T, Yu S, & Huang C (2013). Effect of isoprenaline chronic stimulation on APD restitution and ventricular arrhythmogenesis. *J Cardiol* 61, 162-168.
- Raven PB, Fadel PJ, & Ogoh S (2006). Arterial baroreflex resetting during exercise: a current perspective. *Exp Physiol* 91, 37-49.
- Rubart M & Zipes DP (2005). Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 115, 2305-2315.
- Sachse G, Faulhaber J, Seniuk A, Ehmke H, & Pongs O (2014). Smooth muscle BK channel activity influences blood pressure independent of vascular tone in mice. *J Physiol* 592, 2563-2574.
- Sato T, Ohkusa T, Honjo H, Suzuki S, Yoshida MA, Ishiguro YS, Nakagawa H, Yamazaki M, Yano M, Kodama I, & Matsuzaki M (2008). Altered expression of connexin43 contributes to the arrhythmogenic substrate during the development of heart failure in cardiomyopathic hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1164-H1173.
- Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T, & Carrier L (2012). Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 107, 235.
- Schlossarek S, Mearini G, & Carrier L (2011). Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 50, 613-620.
- Shah AP, Siedlecka U, Gandhi A, Navaratnarajah M, Al-Saud SA, Yacoub MH, & Terracciano CM (2010). Genetic background affects function and intracellular calcium regulation of mouse hearts. *Cardiovasc Res* 87, 683-693.
- Shusterman V, Usiene I, Harrigal C, Lee JS, Kubota T, Feldman AM, & London B (2002). Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H2076-H2083.

## Literaturverzeichnis

Stockigt F, Brixius K, Lickfett L, Andrie R, Linhart M, Nickenig G, & Schrickel JW (2012). Total beta-adrenoceptor knockout slows conduction and reduces inducible arrhythmias in the mouse heart. *PLoS One* 7, e49203.

Tanaka Y, Takase B, Yao T, & Ishihara M (2013). Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 426-436.

The Jackson Laboratory ©2013. Weight charts for select JAX® Mice strains. <http://jaxmice.jax.org/support/weight/index.html> . 2013. 11-11-2013.  
Ref Type: Electronic Citation

Tweedie D, Harding SE, & MacLeod KT (2000). Sarcoplasmic reticulum Ca content, sarcolemmal Ca influx and the genesis of arrhythmias in isolated guinea-pig cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32, 261-272.

Up-To-Date CCL. Isoproterenol: Drug Information. <http://www.uptodate.com/contents/isoproterenol-drug-information> . 2013. 28-3-2013.  
Ref Type: Electronic Citation

Vaillant F, Lauzier B, Poirier I, Gelinas R, Rivard ME, Robillard F, I, Thorin E, & Des RC (2014). Mouse strain differences in metabolic fluxes and function of ex vivo working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H78-H87.

van den Borne SW, van dS, V, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Janssen BJ, & Blankesteyn WM (2009). Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 84, 273-282.

Vaseghi M, Lux RL, Mahajan A, & Shivkumar K (2012). Sympathetic stimulation increases dispersion of repolarization in humans with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H1838-H1846.

Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Kramer E, Pointu H, Mougnot N, Guiard J, Reimer R, Hohenberg H, Schwartz K, Vernet M, Eschenhagen T, & Carrier L (2009). Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circ Res* 105, 239-248.

Volders PG (2010). Novel insights into the role of the sympathetic nervous system in cardiac arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 7, 1900-1906.

- Waldeyer C, Fabritz L, Fortmueller L, Gerss J, Damke D, Blana A, Laakmann S, Kreienkamp N, Volkery D, Breithardt G, & Kirchhof P (2009). Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 Langendorff-perfused mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 104, 523-533.
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, & . (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22, 447-455.
- Weiss S, Oz S, Benmocha A, & Dascal N (2013). Regulation of cardiac L-type Ca(2)(+) channel CaV1.2 via the beta-adrenergic-cAMP-protein kinase A pathway: old dogmas, advances, and new uncertainties. *Circ Res* 113, 617-631.
- Willich SN, Linderer T, Wegscheider K, Leizorovicz A, Alamercury I, & Schroder R (1989). Increased morning incidence of myocardial infarction in the ISAM Study: absence with prior beta-adrenergic blockade. ISAM Study Group. *Circulation* 80, 853-858.
- Wittkopper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsold B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T, & El-Armouche A (2010). Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 120, 617-626.
- Xing S, Tsaih SW, Yuan R, Svenson KL, Jorgenson LM, So M, Paigen BJ, & Korstanje R (2009). Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1907-H1913.
- Zhou S, Jung BC, Tan AY, Trang VQ, Gholmieh G, Han SW, Lin SF, Fishbein MC, Chen PS, & Chen LS (2008). Spontaneous stellate ganglion nerve activity and ventricular arrhythmia in a canine model of sudden death. *Heart Rhythm* 5, 131-139.
- Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Antman EM, Anderson JL, Hunt SA, Halperin JL, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, & Zamorano JL (2006). ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the

## Literaturverzeichnis

European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *J Am Coll Cardiol* 48, e247-e346.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Elektrischer Zyklus einer Herzschrittmacherzelle .....	2
Abbildung 2 – Das Erregungsbildungs- und Leitungssystem des menschlichen Herzens. ....	3
Abbildung 3 – Beeinflussung des Herzrhythmus durch das vegetative Nervensystem. ....	4
Abbildung 4 – Übersicht des Versuchsablaufs .....	17
Abbildung 5 – Übersicht der Versuchstiere. ....	19
Abbildung 6 – DSI's PhysioTel <sup>®</sup> ETA-F10 Sender zur radiotelemetrischen EKG-Messung für Mäuse. ....	20
Abbildung 7 – Anordnung der Elektroden des radiotelemetrischen EKG-Senders. ....	21
Abbildung 8 – Maus mit implantiertem EKG-Sender. ....	22
Abbildung 9 – Angabe der Klassengrenzen zur Klassierung in der Excel <sup>®</sup> -Erweiterung. ....	25
Abbildung 10 – Gap-Analyse in ecgAuto v2.5. ....	27
Abbildung 11 – Schematische Darstellung der Ultraschallparameter. ....	31
Abbildung 12 – Gewichtsverlauf der WT-Tiere. ....	36
Abbildung 13 – Herzgewicht der WT-Tiere. ....	37
Abbildung 14 – Echokardiographische Ergebnisse der WT-Tiere. ....	38
Abbildung 15 – Beurteilung des linken Ventrikels der Wildtypen in der Herzechokardiographie. ....	39
Abbildung 16 – Die WT-Hezen in der Echokardiographie. ....	40
Abbildung 17 – Herzfrequenz der WT-Tiere unter Kontrollbedingungen. ....	41
Abbildung 18 – Aktivität der WT-Tiere unter Kontrollbedingungen. ....	43
Abbildung 19 – Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität. ....	44
Abbildung 20 – Herzfrequenz der WT-Tiere unter Metoprolol-Gabe. ....	46
Abbildung 21 – Aktivität der WT-Tiere unter Metoprolol-Gabe. ....	47
Abbildung 22 – Effekt von Metoprolol auf die normierte Herzfrequenz. ....	48
Abbildung 23 – Herzfrequenz-Verlauf während des kardialen Stresstests. ....	50
Abbildung 24 – Herzfrequenzanstieg der WT-Tiere unter Isoprenalin. ....	50
Abbildung 25 – Herzfrequenz-Verlauf der WT-Tiere. ....	52
Abbildung 26 – Arrhythmien der WT-Tiere. ....	53
Abbildung 27 – Normierung der Anzahl der Ereignisse. ....	54
Abbildung 28 – Regelbereich der Herzfrequenz von WT-Tieren. ....	55
Abbildung 29 – Gewichtsverlauf der Mybpc3-Tiere. ....	56
Abbildung 30 – Quantifizierung der LV-Hypertrophie der Mybpc3-Tiere. ....	58
Abbildung 31 – Echokardiographische Ergebnisse der Mybpc3-Tiere. ....	59
Abbildung 32 – Beurteilung der Hypertrophie der Mybpc3-Tiere in der Echokardiographie. ....	60
Abbildung 33 – Herzen der Mybpc3-Tiere in der Echokardiographie. ....	61
Abbildung 34 – Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen. ....	62

## Tabellenverzeichnis

Abbildung 35 – Aktivität der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen. ....	63
Abbildung 36 – Normierung der Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere. ....	64
Abbildung 37 – Herzfrequenz der Mybpc3-Tiere unter Metoprolol-Gabe. ....	66
Abbildung 38 – Aktivität der Mybpc3-Tiere unter Metoprolol-Gabe. ....	67
Abbildung 39 – Effekt von Metoprolol auf die normierte Herzfrequenz von Mybpc3-Tieren.....	68
Abbildung 40 – Herzfrequenzanstieg der Mybpc3-Tiere unter Isoprenalin. ....	70
Abbildung 41 – Herzfrequenz-Verlauf der Mybpc3-Tiere. ....	70
Abbildung 42 – Arrhythmien der Mybpc3-Tiere. ....	72
Abbildung 43 – Normierung der Anzahl der Ereignisse. ....	73
Abbildung 44 – Regelbereich der Herzfrequenz von Mybpc3-Tieren. ....	74
Abbildung 45 – Arrhythmische Ereignisse unter $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Arbeit von AC Limbrock.....	85

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Abbruchkriterien nach Sender-Implantation .....	22
Tabelle 2 – Einteilung der Arrhythmien .....	28
Tabelle 3 – Sonographisch erfasste Parameter .....	31
Tabelle 4 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität“ unter Kontrollbedingungen .....	44
Tabelle 5 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol“ .....	49
Tabelle 6 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität“ der Mybpc3-Tiere unter Kontrollbedingungen.....	65
Tabelle 7 – Ergebnisse der Two-Way ANOVA „Normierung der Herzfrequenz auf die Aktivität unter Metoprolol“ der Mybpc3-Tiere.....	69

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern all denen danken, die mich in den letzten Jahren während der Arbeit an meiner Dissertation begleitet und mir durch eine Zeit voller „Auf's“ und „Ab's“ geholfen haben.

Zu allererst danke ich ganz herzlich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Alexander Schwoerer, für die Chance, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe schreiben zu können sowie für die engagierte, unterstützende und immer freundliche Betreuung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Prof. Heimo Ehmke und allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie, bei denen ich mich vom ersten Tag an sehr wohlfühlt habe. Insbesondere Alex, Marisa, Helga, Peter und Anika habe ich eine sehr schöne Zeit in netter Atmosphäre, bei vielen gemeinsamen Mittagessen zu verdanken. Die gute Zusammenarbeit wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Marisa danke ich ganz herzlich für die Durchführung der Maus-OPs, für das „Mit-Rat-und-Tat-zur-Seite-Stehen“ bei der Tierhaltung, bei Fragen bezüglich Prism und RefMan sowie für die vielen schönen Stunden als Büronachbarinnen.

Mein Dank gilt zudem Prof. Lucie Carrier für die Bereitstellung der Mybpc3-Tiere und Frau Dr. Saskia Schlossarek für ihre Hilfe bei Fragen zur Mybpc3-Linie, bei der Tierbestellung und für die Durchführung der Re-Genotypisierungen.

Des Weiteren danke ich Herrn Thomas Schulze für die Durchführung der Echokardiographien und seine Hilfe bei den Organentnahmen.

Ganz besonders dankbar bin ich außerdem meinen Eltern, die mich durchgehend mental sowie finanziell unterstützt haben, an mich geglaubt und mich aufgemuntert haben, wenn es nicht so lief wie geplant. Meinen Großeltern danke ich für ihr großes Interesse an meiner Arbeit sowie für die großzügige Ausstattung mit Büchern.

Lebenslauf

## 11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: ..... (Charlotte Wallach)