

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Auftreten kardialer Arrhythmien bei der Pannexin-1-defizienten Maus

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lisa Kristina Dannenberg

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf (Dekan)

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Birgit Donner

Zweitgutachter: PD Dr. med. Dong-In Shin

Meinen Eltern zum Dank

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Petric ST, Klein S, Dannenberg L, Lahres T, Clasen L, Schmidt KG, Ding Z, Donner BC; Pannexin-1 Deficient Mice Have an Increased Susceptibility for Atrial Fibrillation and Show a QT-Prolongation Phenotype; Cell Physiol Biochem. 2016;38(2):487-501. doi: 10.1159/000438645. Epub 2016 Feb 1.

Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Dissertation ist die Analyse kardialer Arrhythmien im Zuge des Forschungsprojektes zur kardialen Phänotypisierung der Pannexin-1-defizienten Maus (Panx1^{-/-}-Maus). Pannexine sind zelluläre Proteine, die großporige Öffnungen zwischen Intra- und Extrazellularraum darstellen, welche neben Kationen und Anionen auch große Moleküle wie im Besonderen Adenosintriphosphat passieren lassen [1]. Die Familie der Pannexine gliedert sich in drei Untergruppen (Pannexine-1, -2 und -3), wobei die Pannexine-1 ubiquitär und damit auch kardial exprimiert werden [2]. Über ihre Öffnungseigenschaften nehmen Pannexine-1 unter anderem bei der Initiierung und Weiterleitung von Kalziumwellen [3] und über Komplexbildung mit P2X7-Kanälen bei der Einleitung der Apoptose [4] Schlüsselpositionen ein. Bezüglich ihrer kardialen Funktion ist bisweilen wenig bekannt. Am Mauserzen ist eine starke Expression besonders in atrialen Myozyten und hier in der Zellmembran nachgewiesen [5]. Bisher konnte eine Beteiligung an der Entstehung einer Herzfibrose nachgewiesen werden [6], insbesondere nach Hochregulierung der Pannexinexpression bei Ischämie [7]. Unter ischämischen Bedingungen scheinen Pannexine außerdem kardioprotektive Faktoren über den Komplex mit P2X7 freizusetzen [8]. Zudem wurden sie als Korrelat der bekannten *Large conductance channels* dargestellt und ihnen durch eine Ca²⁺-unabhängige Öffnung eine potentiell arrhythmogene Eigenschaft zugeschrieben [5]. Im Gefäßsystem werden Pannexine-1 ebenfalls exprimiert und sind hier an der Regulation des vaskulären Tonus und der Sauerstoffkonzentration beteiligt [9, 10]. Im Zuge dieses Forschungsprojektes wird die kardiale Funktion der Pannexine-1 am Modell der Panx1^{-/-}-Maus umfassend mittels EKG-Analysen, echokardiografischer, histopathologischer und elektrophysiologischer Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Als Kernergebnisse dieser Versuche weisen die Panx1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr AV-Blockierungen, insbesondere bei niedrigeren Herzfrequenzen, eine signifikant längere QTc-Zeit und eine Induzierbarkeit atrialen Flimmerns *in vivo* auf. Als pathophysiologische Grundlage dieser klinischen Manifestationen der Panx1^{-/-}-Maus können Veränderungen des Ionenflusses beim Aktionspotential vorliegen, die die Dauer des Aktionspotentials verlängern. Über die Beteiligung der Pannexine an der Kalziumwelle könnten hier Veränderungen der Kalziumhomöostase eine Rolle spielen. Das *in vivo* induzierbare atriale Flimmern konnte in Versuchen am Langendorff-perfundierten Herzen nicht reproduziert werden, was durch eine übergeordnete Arrhythmogenese durch das autonome Nervensystem oder durch methodenassoziierte Limitationen erklärt werden kann. Bei der Analyse der *Heart rate variability* wiesen die Panx1^{-/-}-Mäuse isoliert eine verminderte *Very low frequency* auf, was bei ansonsten normwertigen Parametern keinen direkten Rückschluss auf eine verminderte Sympathikusaktivität ziehen lässt. Kein Unterschied zeigte sich bezüglich der allgemeinen Körperparameter und der Leistungsfähigkeit der Tiere. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Pannexine eine Funktion bei der Abfolge des kardialen Aktionspotentials aufweisen und ein Fehlen mit einer erhöhten atrialen Vulnerabilität einhergeht. Diese Erkenntnis trägt mit dazu bei, die Funktion der Pannexine am Herzen genauer zu verstehen.

Abkürzungsverzeichnis

AF	Atriales Flimmern
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
AV-Blockierung	Atrio-Ventrikuläre Blockierung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Kalzium
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HF	Herzfrequenz(en)
HRV	Herzfrequenzvariabilität
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
LCC	<i>Large Conductance Channels</i>
LQTS	<i>Long-QT-Syndrom</i>
MAP	Monophasische Aktionspotentiale
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
Max	Maximal
Na ⁺	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
Panx1 ^{-/-} -Maus	Pannexin-1-defiziente Maus
Panx1 ^{+/+} -Maus	Wildtyp
PCR	Polymerasekettenreaktion
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
VLF	<i>Very Low Frequency</i>
LF	<i>Low Frequency</i>
HF	<i>High Frequency</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Relevanz von Ionenkanaldefekten für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen	1
1.2 Pannexine - funktionstüchtige Poren im Blickpunkt der Forschung	2
1.2.1 Die Familie der Pannexine.....	2
1.2.2 Struktur der Pannexine	2
1.2.3 Genetik und Expression der Pannexine im kardiovaskulären System.....	3
1.2.4 Öffnungseigenschaften und Durchlässigkeit der Pannexine.....	4
1.2.5 Komplexbildung der Pannexine mit P2X7-Kanälen.....	7
1.2.6 Inhibition der Pannexine durch Pharmaka oder RNA.....	7
1.2.7 Kardiovaskuläre Funktion der Pannexine.....	8
1.3 Die Maus als Modell für Herzrhythmusstörungen	10
1.3.1 Herstellung transgener Tiere	10
1.3.2 Herstellung der Pannexin-1- <i>Knockout</i> -Maus.....	11
1.3.3 Bisherige Erkenntnisse bezüglich des Phänotyps der Panx1 ^{-/-} -Maus.....	12
1.3.4 Atriales Flimmern in elektrophysiologischen Untersuchungen am Mausmodell	13
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Studiendesign.....	16
2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens	17
2.3 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen	17
2.4 Genotypisierung	18
2.5 Transmittersystem für die telemetrische EKG-Ableitung	22
2.5.1 Aufbau des Transmitters.....	22
2.5.2 Transmitterimplantation	23
2.5.3 Grundprinzip der Ableitung der telemetrischen EKGs.....	26
2.6 Aufzeichnung und Analyse der EKGs	27
2.6.1 Vorgehen bei den Langzeit-EKGs	27
2.6.2 Vorgehen bei den Belastungsversuchen.....	29
2.7 Tötung, Organentnahme und gravimetrische Messungen	31
2.8 Langendorff-Versuche	31
2.9 Statistische Auswertverfahren	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Gravimetrische Parameter.....	38
3.2 Herzfrequenzanalyse.....	38
3.2.1 Durchschnittliche Herzfrequenz in Langzeit-EKGs	38

3.3	Auftreten von Herzrhythmusstörungen im Ruhe-EKG	39
3.3.1	Auftreten von AV-Blockierungen	39
3.3.2	Auftreten von Extrasystolen.....	43
3.4	Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter Belastung	46
3.4.1	AV-Blockierungen und Extrasystolen unter Belastung	46
3.4.2	Vergleich zwischen Häufigkeiten von Herzrhythmusstörungen im Belastungs- und Ruhe-EKG	48
3.5	Auftreten atrialer Arrhythmien unter Stimulation	49
4.	Diskussion	51
4.1	Die Maus als Untersuchungsmodell.....	51
4.1.1	Übertragbarkeit des murinen auf das humane EKG	51
4.1.2	Pannexine bei der Maus und beim Menschen	53
4.1.3	Vorteile des transgenen Mausmodells im Vergleich zur pharmakologischen Inhibition der Pannexine.....	54
4.2	Diskussion der verwendeten Methoden	55
4.2.1	Telemetrische EKG-Aufzeichnung	55
4.2.2	Belastungsversuche	55
4.3	Die funktionelle Relevanz der Pannexine am Herzen	56
4.3.1	Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen keine veränderten Körperindizes auf.....	56
4.3.2	Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen mehr AV-Blockierungen in den Langzeit-EKGs auf.....	57
4.3.3	Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen niedrigere Herzfrequenz während AV-Blockierung auf	60
4.3.4	Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen keine vermehrte Häufigkeit von Extrasystolen auf	62
4.3.5	Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen kein atriales Flimmern unter Stimulation <i>in vitro</i> , wohl aber <i>in vivo</i> auf.....	62
4.4	Ausblick	65
5.	Tabellenverzeichnis	67
6.	Abbildungssverzeichnis.....	69
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Anhang	78
8.1	Übungsschein über die Teilnahme an der Versuchstierkunde.....	78

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

1. Einleitung

1.1 Relevanz von Ionenkanaldefekten für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen beschreiben eine Veränderung der rhythmischen Herztätigkeit durch eine unregelmäßige Erregungsabfolge im Herzen [11]. Eine wichtige Untergruppe dieser übergeordneten Pathologie stellen vererbte syndromale Arrhythmien dar, welche in maximaler Ausprägung eine Ursache für den plötzlichen Herztod besonders bei jungen Patienten sein können [12].

Grundlage dieser Arrhythmien stellt eine Veränderung des Aktionspotentials dar, bei welcher die normalerweise fein aufeinander abgestimmten Ionenflüsse durch defekte Kanäle gestört sind. Diese klinische Manifestation von Ionenkanaldefekten wird als Kanalopathie bezeichnet, wobei hier ursächlich meist angeborene Mutationen und nur selten sekundäre Schädigungen vorliegen [13]. Mit dem Voranschreiten der Identifizierung kardialer Ionenkanaldefekte wächst auch die Gruppe der zugehörigen Erkrankungen. Als wichtige Vertreter sind bisher das *Long-QT-*, das *Short-QT-*, das Brugada-, das *Sick-Sinus-* und das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom sowie das familiäre atriale Flimmern und die Katecholaminerge Polymorphe Ventrikuläre Tachykardie zu nennen [12]. Neben den defekten Ionenkanälen als solches sind in vielen Fällen auch die zugrundeliegenden Genmutationen identifiziert [14], was die Bedeutung einer einzelnen Mutation für die Funktion eines gesamten Organismus unterstreicht.

Im Jahr 2000 wurde erstmalig die Familie der Pannexine beschrieben [15], welche großporige Öffnungen zwischen Intra- und Extrazellularraum darstellen, die durchlässig für zahlreiche Ionen und ATP sind [1, 2, 16, 17]. Von besonderem Interesse ist hier die Untergruppe der Pannexine-1, welche ubiquitär und damit auch kardial exprimiert sind [2]. Die Öffnungseigenschaften dieser Membranporen legen nahe, dass die Pannexine an der Physiologie der Zelle mitbeteiligt sind und bei funktioneller Veränderung das Korrelat kardialer Arrhythmien darstellen können. Grundlage der vorliegenden Arbeit stellt daher die Charakterisierung der phänotypischen Manifestation des Fehlens von Pannexin-1 im Tiermodell dar.

1.2 Pannexine - funktionstüchtige Poren im Blickpunkt der Forschung

1.2.1 Die Familie der Pannexine

Pannexine stellen eine Gruppe von nicht-junktionalen Membrankanälen als Verbindung zwischen Intra- und Extrazellularraum dar. Hierzu gehören die Pannexine-1, welche ubiquitär und damit auch kardial exprimiert sind, die Pannexine-2, welche sich hauptsächlich im ZNS befinden und Pannexine-3, die in der Haut, im Knorpel und im Knochen lokalisiert sind [2, 18].

Erstmalig wurden sie im Jahre 2000 zunächst neben den Connexinen als eine zweite Gruppe von *Gap-Junction*-Proteinen dargestellt, da sie große genomische Ähnlichkeit zu den Connexin-Korrelaten der Wirbellosen, den Innexinen besitzen [15]. Zudem war die Ausbildung von *Gap Junctions* bei Versuchen an manuell gepaarten *Xenopus*-Oozyten festgestellt worden [19].

In verschiedenen Arbeiten wurde mittlerweile jedoch widerlegt, dass die Pannexine als *Gap-Junctions* zwischen zwei Zellen fungieren [1]. Gründe hierfür sind unter anderem das Vorhandensein in Erythrozyten, die keine Verbindungen zu anderen Zellen eingehen [20], die Lokalisation der Pannexine an der apikalen, also der nicht kontakteingehenden Membranseite [21] sowie die Struktur der Pannexine, welche durch eine extrazellulär gelegene Glykosylierung keine Verbindungen zueinander eingehen können.

Die zuvor nachgewiesene Fähigkeit zur Ausbildung von *Gap Junctions* bei den manuell gepaarten Oozyten wurde durch eine fehlerhafte Glykosylierungsfähigkeit der *Xenopus*-Oozyten und einer in den Versuchen besonders langen Zellpaarungszeit erklärt [22]. Die beschriebene genomische Ähnlichkeit zu den Innexinen erklärt sich trotz aller funktionellen Unterschiede durch eine Doppelfunktion der Innexine, welche neben *Gap-Junctions* auch nicht-junktionale Kanäle bilden [23].

1.2.2 Struktur der Pannexine

Strukturell weisen alle drei Gruppen der Pannexine vier transmembrane Regionen mit zwei extrazellulären Schleifen und einer intrazellulären Schleife auf. Sowohl der

N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär [24]. Auf Grundlage dieser Struktur bilden die Pannexine-1 hexametrische Membrankanäle aus [25, 26]. Extrazellulär weisen die Pannexine die bereits oben erwähnte Glykosilierung auf, wodurch die Ausbildung von Zell-Zell-Kanälen verhindert wird. Bei Pannexin-2 und -3 liegt diese an der ersten, bei Pannexin-1 an der zweiten Schleife. Abbildung 1 veranschaulicht den schematischen Aufbau eines Pannexin-1-Kanals.

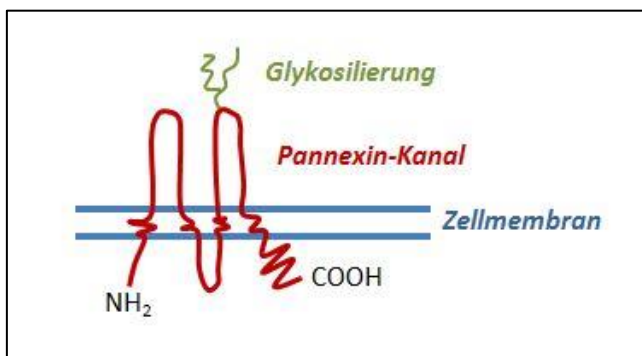


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Pannexin-1-Kanals (angelehnt an die Darstellung von MacVicar et al. (2010) [27])

Je nach Pannexingruppe liegt eine unterschiedliche Glykosilierung vor. Es wird vermutet, dass diese nach der Translation der Pannexin-Proteine einen funktionellen Mechanismus beim Transport an die Zellmembranoberfläche darstellen [28]. Es gibt aber auch Hinweise, dass auch nicht glykosilierte Pannexine ihre zugehörige Zellmembran finden, weshalb zusätzlich andere Mechanismen diskutiert werden. Daneben spielt die Ausprägung der Glykosilierung eine Rolle bei der Interaktion zwischen den Pannexinen untereinander [26].

1.2.3 Genetik und Expression der Pannexine im kardiovaskulären System

Bezüglich der Genetik und der Expression ist die Rolle der Pannexine-1 am besten erforscht. Das codierende Gen ist beim Menschen auf Chromosom 11q14.3 lokalisiert und besitzt fünf Exons. Das fünfte Exon wird hierbei alternativ gespleißt, weshalb zwei Pannexin-1-Proteine mit unterschiedlicher C-Terminus Länge existieren: Panx1a (407 Aminosäuren=AS) und Panx1b (411 AS), welches vier weitere Aminosäuren enthält [24]. Beim Menschen wird lediglich die Panx1b Variante exprimiert. Es

ist hervorzuheben, dass die beiden Pannexin-Varianten das identische elektrophysiologische Profil und gleiche funktionelle Eigenschaften zeigen [29].

Pannexin-1 wird ubiquitär exprimiert [24], wobei hier das Ausmaß der Expression zellspezifisch von Organ zu Organ unterschiedlich und zudem abhängig vom Zustand der Zelle ist [30].

Die genaue Expression der Pannexine am Herzen wurde bisher bei der Maus evaluiert. Immunoreaktiv konnten Pannexine hier sowohl in atrialen als auch in ventrikulären Myozyten an den Plasmamembranen mittels aviärer Pannexin-Antikörper nachgewiesen werden [5]. In isolierten atrialen Myozyten war die normalisierte Pannexin-mRNA-Expression hierbei vergleichbar mit dem Level in Neuronen und dem Gehirn, das Expressionslevel im gesamten Herzen war jedoch signifikant niedriger [5]. Zudem nahm die Pannexinexpression unter ischämischen Bedingungen und im zeitlichen Verlauf in der Zellkultur zu [5, 7].

Im zirkulatorischen System wurden Pannexine-1 in der Membran von Erythrozyten und in den pulmonalen und systemischen Arterien gefunden, wobei das Expressionsmuster hierbei in Abhängigkeit der Gefäßgröße variierte. In kleinen Arterien und Arteriolen sind sie sowohl im Endothel als auch in den glatten Muskelzellen nachzuweisen, in den großen Gefäßen jedoch nur im Endothel und in der A. cerebri media nur in den glatten Muskelzellen [3, 9].

1.2.4 Öffnungseigenschaften und Durchlässigkeit der Pannexine

Pannexine fungieren als große Öffnungen zwischen Intra- und Extrazellularraum [16]. Im Ruhemembranpotential sind die Kanäle geschlossen und werden durch die folgenden Mechanismen binnen 30-70 ms vollständig geöffnet [19]:

- Depolarisation über +20mV [3, 31]
- Mechanischer Stress [32]
- Hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen [16]
- Hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen (sogar unter hyperpolarisierten Membranpotentialen) [33]
- Extrazelluläre ATP-Bindung an purinerge Rezeptoren [3]

- Proteolytische Spaltung des C-Terminus des Pannexinmoleküls durch Caspase 3 oder 7 (grundlegend geöffneter Zustand während Apoptose, s.u.) [34].

Neben der Öffnung der Pannexine existieren auch Faktoren, welche eine Supprimierung der Aktivität bedingen. Hierbei sind eine Ansäuerung des Cytoplasmas [3], ein erhöhtes intrazelluläres Redox-Potential [35], Arachidonsäure [36] sowie die Interaktion mit dem Erythrozytenmembranprotein Stomatin [37] als wichtigste Komponenten zu nennen. Die Trinukleotide ATP, GTP und UTP bewirken neben der bereits erwähnten Aktivierung außerdem bei extrazellulär erhöhter Konzentration auch eine Inhibition der Pannexine [29]. Da sich dies jedoch nicht bei einer intrazellulären Konzentrationserhöhung nachweisen ließ, wird hierbei ein direkter Kanalblock als molekulares Funktionsprinzip vermutet [29].

Im geöffneten Zustand zeigen die Pannexine eine hohe Leitfähigkeit (*Large conductance channels*, >500pS) [38] und ermöglichen den Durchtritt großer Moleküle bis zu 900 Dalton wie ATP, Aminosäuren und DNA-bindende Farbstoffe wie Ethidium, Yo-Pro und To-Pro [1, 39]. Bezüglich der Durchlässigkeit von Anionen konnte hier eine Selektivität mit besonderer Permeabilität für Stickstoffmonoxid und eher schwacher Permeabilität für negativ geladene Aminosäuren nachgewiesen werden [40], wobei diese Selektivität bei der Durchlässigkeit von Kationen nicht beobachtet werden konnte [41].

Die Freisetzung von ATP funktioniert ohne die Beteiligung von Vesikeln. Neben den Pannexinen werden für diese Art der ATP-Freisetzung auch Connexone (*Hemichannels* der Connexine), CFTR-Kanäle und die in Verbindung mit Pannexinen beschriebenen P2X7 Purinrezeptoren (s.u.) diskutiert [42]. Die Pannexine gelten hierbei jedoch als Favoriten, da sie die folgenden Kriterien erfüllen, welche essenziell für die Funktion eines extrazellulär freisetzenen ATP-Kanals sind:

1. Pannexine sind ATP-durchgängig [16]
2. Pannexine sind mechanosensitiv [16]
3. Pannexine öffnen sich auf hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen [3]
4. Pannexine werden über purinerge Rezeptoren durch ATP aktiviert [3].

Diese ATP-Freisetzung steht im Zusammenhang mit dem Aufbau und der Weiterleitung von Kalziumwellen zur Kommunikation zwischen den Zellen. Hierbei ist zu betonen, dass die Punkte 1-3 hier die Initiierung einer Kalziumwelle begründen, wohingegen die Sensitivität auf ATP (Punkt 4) die Weiterleitung dieser Welle möglich macht [4].

Das in den Extrazellularraum freigesetzte ATP wirkt an purinergen Rezeptoren (P2Y) benachbarter Zellen und erhöht über Produktion von Inositoltriphosphat (IP3) in diesen die Kalziumkonzentration, wodurch auch hier ATP freigesetzt wird. Damit wird eine Kaskade der ATP-Freisetzung und somit eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums ausgelöst [42, 43]. Mit diesem Mechanismus stellen die Pannexine wichtige Stellglieder in der Initiierung und Weiterleitung einer Kalziumwelle zur Zellkommunikation dar. Keiner der anderen oben genannten Kanäle erfüllt in diesem Maße diese Kriterien [3].

Unterstützend zu diesem extrazellulären Weg der Weiterleitung der Kalziumwelle wird IP3 zudem direkt über *Gap Junctions* von Zelle zu Zelle geleitet und erhöht so in den angrenzenden Zellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration [3]. Abbildung 2 veranschaulicht schematisch, wie über das ATP und die *Gap Junctions* eine Kaskade der intrazellulären Kalziumkonzentration in angrenzenden und umliegenden Zellen evoziert wird.

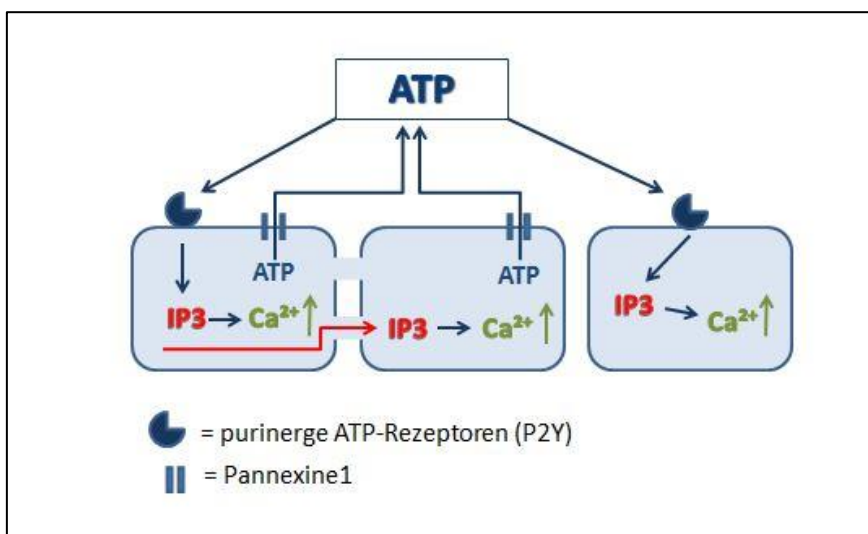


Abbildung 2: Schematische Darstellung der extrazellulären Wirkung von ATP über purinerge Rezeptoren und Pannexine-1. Darstellung angelehnt an Locovei et al. 2006 [3]

1.2.5 Komplexbildung der Pannexine mit P2X7-Kanälen

P2X-Rezeptoren stellen ATP-abhängige membranöse Ionenkanäle dar, die insbesondere durchlässig für Kationen sind. Die Subgruppe der P2X7-Rezeptoren weist hier als Besonderheit die Fähigkeit auf, großporige Formationen mit starker Permeabilitätserhöhung zu bilden [44]. Hinweise darauf, dass hierbei eine Komplexbildung mit Pannexin-1 vorliegt, zeigt eine Inhibition dieser großporigen Funktion der P2X7-Kanäle nach Pannexin-Blockade mittels Carbenoxolon und Pannexin-1-spezifischer *small interference RNA* (siRNA). Die P2X7 Proteinexpression und der Pannexin-1 unabhängige Kationenfluss über die P2X7 Kanäle blieben dabei unberührt [17].

Durch die genannte Komplexbildung werden Zytokine freigesetzt und über Caspase-1 die Apoptose aktiviert [1, 4]. Zudem entsenden apoptotische Zellen mithilfe des durch Pannexine freigesetzten ATPs und GTPs ein sogenanntes „*Find-me*“-Signal für Phagozyten [34]. Neben ATP fungieren auch hohe extrazelluläre Kaliumwerte [33] und Glutamat [45] aus primär geschädigten Zellen als Stimulatoren für die Formationsänderung und damit für die Öffnung der Pannexine. Dadurch spielen die Pannexine-1 eine Rolle bei der Verursachung des sekundären Zelltodes, also bei der konsekutiven Schädigung von Gewebe um oder abseits des primären Schädigungsortes. In Zusammenhang mit Pannexinen bei der Apoptose konnte nachgewiesen werden, dass Pannexin-1,2-defiziente Mäuse ein besseres funktionelles *Outcome* nach zerebraler Ischämie zeigten als die Wildtypkontrolltiere [46] und zudem, dass durch P2X7-Pannexin-1-Komplexe ein Untergang enteraler Neurone bei Colitis evokiert wurde [47].

1.2.6 Inhibition der Pannexine durch Pharmaka oder RNA

Zur Inhibition der Pannexine stehen verschiedene Pharmaka zur Verfügung. In absteigender Potenz konnten hier Mefloquin, Carbenoxolon, Disodium-Diisothiocyanatostilbene-Disulfonat, Probenecid, Flufenamic und Niflumic identifiziert werden, wobei diese zusätzlich *Gap Junctions*, Chlorid-Kanäle oder Anionen-Kanäle blockieren [29, 48].

Einen Ansatz für eine spezifische Inhibition stellt der Einsatz von shRNA (*short hairpin RNA*) und siRNA (*small interference RNA*). Hiermit konnte eine Pannexin-

Reduktion um 57 ± 10 % mittels shRNA, beziehungsweise $69 \pm 0,08$ % mittels siRNA erreicht werden [48, 49].

1.2.7 Kardiovaskuläre Funktion der Pannexine

Bezüglich der kardialen Funktion der Pannexine ist die Datenlage bisher noch recht unvollständig und in Hinblick auf elektrophysiologische Relevanz noch gänzlich unerforscht. Der aktuelle Stand der Forschung liefert jedoch einige Hinweise, dass die Pannexine auch am Herzen wichtig für den Ablauf verschiedener Reaktionen sind.

Pannexine sind das Korrelat der *Large-Conductance-Channels*

Pannexine-1 stellen am Herzen das funktionelle Korrelat der sogenannten *Large Conductance Channels* (LCC) dar [5]. Diese LCC wurden erstmalig 1986 erwähnt [50] und 2008 genauer anhand ihrer Öffnungseigenschaft auf Koffein und Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum beschrieben [51]. Charakteristika der LCC sind ihre geringe Dichte oder Öffnungswahrscheinlichkeit in der Plasmamembran und ihre Eigenschaft als nichtselektive Kationenkanäle. Es konnte gezeigt werden, dass die LCC gleiche pharmakologische Eigenschaften wie die Pannexine-1 (Inhibition durch Carbenoxolon) aufweisen und zudem, dass die nach vier bis fünf Tagen Kultur nicht mehr detektierbaren LCC durch adenoviralen Gentransfer von Pannexin-1 vollständig wieder nachweisbar waren. Bei nicht adenoinfizierten Myozyten waren keinerlei LCC mehr aufzufinden, außerdem zeigte sich ein gleichzeitiger Verlust der Pannexin-1 Immunreaktion. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Pannexine-1 die bisher beschriebenen LCC darstellen. Außerdem zeigte sich in den Experimenten, dass sich einzelne Kanäle spontan bei physiologischen Kalziumkonzentrationen öffneten. Zum einen schließt dies als Nebeneffekt die kalziumabhängigen Connexine als beteiligte Kanäle aus, zum anderen lässt sich dadurch eine potentiell arrhythmogene Eigenschaft der Pannexine am Herzen vermuten [5].

Pannexine induzieren kardiale Fibrosierung

Des Weiteren werden Pannexine im Zusammenhang mit der Entstehung von Herzfibrose erwähnt. Hierbei kommt es besonders durch mechanischen Stress zur Öffnung der Pannexine und zur Freisetzung von ATP und UDP [18]. Diese binden an

purinerge Rezeptoren (P2Y) und aktivieren G-Protein-gekoppelt eine intrazelluläre Signalkaskade, welche die Expression fibrogenetischer Proteine und damit die Kollagenexpression steigert [6]. Die vermutete Mitbeteiligung der Pannexine konnte dadurch untermauert werden, dass die mechanisch induzierte ATP-Freisetzung durch Carbenoxolon vollständig geblockt und bei spezifischer Inhibition durch Pannexin-1 siRNA um 50 % reduziert wurde. In Expressionsanalysen wurde bestätigend das Vorhandensein von Pannexin-1 und auch -2 in Kardiomyozyten nachgewiesen, wobei das Expressionslevel von Pannexin-1 hier unter Druckzunahme anstieg [6]. In weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass das von Pannexin-1 freigesetzte ATP unter kardialen Stressbedingungen eine Fibrose initiiert. Hier wurde gezeigt, dass das Pannexin-1 zunächst innerhalb der Sarkolemm caniner Myozyten liegt und bei Ischämie verstärkt glykosiliert wird und zur Außenseite der Membran gelangt, wo dann ATP freigesetzt wird. Über den MAPK- und p53-Signalweg wird damit eine kardiale Fibrosierung ausgelöst. Damit sind Pannexine-1 an der Entstehung einer Fibrose ausgelöst durch Ischämie beteiligt [7].

Pannexine wirken kardioprotektiv

Zudem gibt es Hinweise bezüglich einer kardioprotektiven Funktion. Pannexine-1 bilden mit den P2X7-Kanälen Komplexe aus, welche hoch permeabel für verschiedenste Moleküle sind [44]. Neben ihrer dadurch bestehenden Funktion in der Aktivierung der Apoptose, konnte in verschiedenen Studien auch eine kardioprotektive Wirkung aufgezeigt werden. Hier kommt es unter ischämischer Prä- und Postkonditionierung ATP-vermittelt zur Formierung der P2X7-Pannexin-Komplexe. Hierüber werden endogene Faktoren, wie zum Beispiel Sphingosin-1-Phosphat und Adenosin freigesetzt, welche G-Protein gekoppelt protektive Signalkaskaden auslösen [8, 52].

Pannexine sind am Gefäßtonus und an der Regulation des Blutdrucks beteiligt

Pannexine sind ein wichtiges Stellglied in der Regulation des lokalen Blutflusses. Bei niedriger Sauerstoffkonzentration oder unter mechanischem Stress wird ATP über Pannexine aus Erythrozyten freigesetzt [20]. Das ATP wirkt an P2X und P2Y-Rezeptoren des Endothels und bewirkt hier über eine Erhöhung der Kalziumkonzentration die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, wodurch die lokale Perfusion gesteigert

wird [20, 53, 54]. Bindet ATP nicht an Rezeptoren des Endothels, sondern an solche der glatten Gefäßmuskulatur wird jedoch eine Konstriktion bewirkt [54]. Über diesen Mechanismus sind Pannexine-1 an der Vasokonstriktion von Widerstandsgefäßen beteiligt. Dies wurde durch eine reduzierte Fähigkeit zur Vasokonstriktion als Reaktion auf Phenylephrin nach Inhibition der Pannexine bestätigt [9]. Phenylephrin ist ein direkter Agonist am α_1D -Adrenorezeptor, mit welchem Pannexin-1 eine funktionelle Einheit bildet, durch welche das ATP freigesetzt wird [55].

Pannexine regulieren die Sauerstoffkonzentration im Blut

Neben der Blutdruckregulation spielen Pannexine auch eine Rolle bei der Regulation der Sauerstoffsättigung des Blutes. So wird Pannexin-1 in den Zellen des *Glomus caroticum* bei der Ratte exprimiert. Kommt es unter Hypoxie zu niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird hier über die Pannexine ATP freigesetzt, welches über P2Y-Aktivierung zu einer erhöhten autonomen Ventilationsrate führt [10].

1.3 Die Maus als Modell für Herzrhythmusstörungen

1.3.1 Herstellung transgener Tiere

Zur Charakterisierung der kardialen Funktion der Pannexine wurden Versuche an der transgenen Panx1^{-/-}-Maus durchgeführt. Transgene Tiere sind durch eine Integration eines Transgens in ihrem Erbgut verändert [56]. Klassischerweise wird die Methode des „Gene-Targeting“ verwendet, bei welcher in embryonalen Stammzellen bekannte Genomabschnitte über homologe Rekombination mit dem Transgen ausgetauscht werden. Hierzu steht ein künstlich hergestellter Target-Vektor zur Verfügung, welcher zwischen außen gelegenen, zum Integrationsort homologen DNA-Sequenzen die künstliche Mutation vorliegen hat. Damit können gezielt einzelne Gene ausgeschaltet werden („Knock-out“) [57, 58]. Die modifizierten embryonalen Stammzellen werden in murine Blastozysten injiziert und diese per Embryonentransfer in den Organismus gebracht. Die Stammzellen können sich zu jeglichen Zelltypen weiterentwickeln, sodass die Mutation auch in die Keimbahn gelangt (Keimbahnchimärismus). Bei Weiterzucht tragen diese Tiere heterozygote Nachkommen aus. Werden diese wiederum

verpaart, treten hieraus nach der Mendel'schen Regel in 25 % homozygote transgene Nachkommen hervor [59].

1.3.2 Herstellung der Pannexin-1-Knockout-Maus

Bei dem Pannexin-1-Knockout-Mausmodell, welches der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, wurde durch homologe Rekombination ein Target-Vektor eingebaut, welcher einen Transkriptionsstopp des Pannexin-1-Gens bedingt. Dieser Vektor beinhaltet das *LacZ*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Da es mit einem Stopp-Codon endet, führt es zu einer Transkriptionsunterbrechung [46, 60]. Zudem enthält der Target-Vektor als Erkennungsmarker für die stattgehabte Rekombination eine Phosphoglycerat-Kinase-Neomycin-Kassette, welche nach ausreichender Anreicherung und Selektion der transgenen Zellen mittels Cre-vermittelter (*cre* = *cyclization recombination*) Rekombination herausgeschnitten wird. Als Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase befindet sich hierbei angrenzend eine sogenannte *loxP*-Sequenz [46]. Das für den Vektor genutzte DNA Fragment stammte von einer 129/SvJ Maus der Stratagene Maus-Datenbank. Daher wurden die Mäuse nach der Entnahme der Neomycinkassette wieder zu C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt [61] (Abbildung 3).

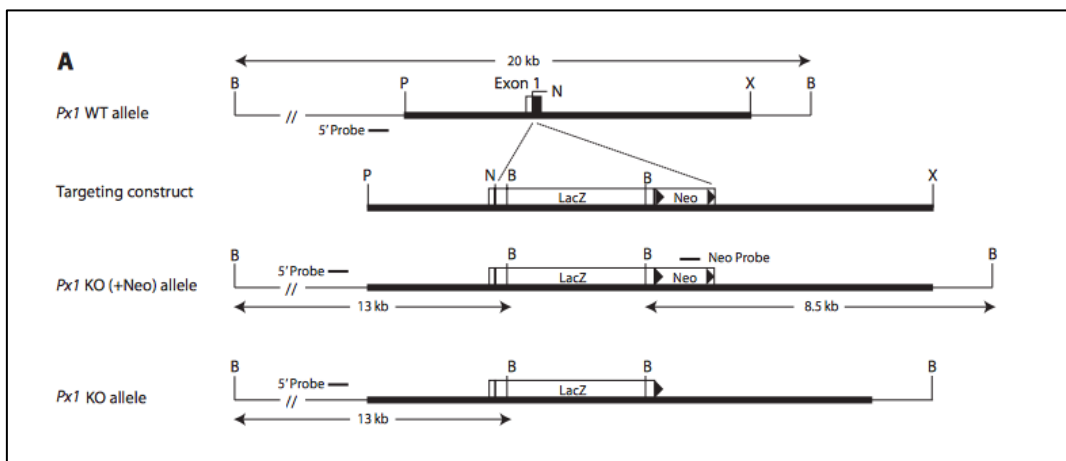


Abbildung 3: Herstellung der Pannexin-1-Knockout Maus. Schematische Darstellung des Pannexin-1-Genlokus der Wildtypen (*Px1* WT allele), des Target-Vektors (*Targeting construct*), des Pannexin-1-Genes der *Knockout*-Mäuse (mit integriertem Vektor, *Px1* KO (+Neo) allele) und selbiges nach Exzision der Neomycinkassette (*Px1* KO allele) (Abbildung aus Bargiotas et al., 2011 [46])

1.3.3 Bisherige Erkenntnisse bezüglich des Phänotyps der $Panx1^{-/-}$ -Maus

In Analogie zu dem wachsenden Interesse an den Pannexin-1-Kanälen etabliert sich auch das Modell der $Panx1^{-/-}$ -Maus zunehmend. Bei allen Forschungsgruppen, welche sich bisher mit der $Panx1^{-/-}$ -Maus beschäftigten, konnten trotz der ubiquitären Expression der Pannexine keine Unterschiede in der Anatomie und der allgemeinen Gesundheit der Tiere nachgewiesen werden [62].

Bezüglich der Relevanz der Pannexine im neurologischen System konnte gezeigt werden, dass $Panx1,2^{-/-}$ -Mäuse ein besseres funktionelles *Outcome* und kleinere Infarktareale nach zerebraler Ischämie als die Wildtypen aufwiesen, sodass unter normaler Pannexinexpression von einer Aktivierung dieser Kanäle unter ischämischen Bedingungen ausgegangen werden muss. Hierbei werden eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration sowie reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid als Aktivatoren diskutiert [46]. In weiteren Studien, welche die Beteiligung von Pannexinen an der Entstehung eines *Status epilepticus* untersuchten, konnten bei der $Panx1^{-/-}$ -Maus verbesserte Resultate nach epileptischen Anfällen festgestellt werden. Pannexine werden hierbei durch das bei einem epileptischen Anfall anfallende Kalium aktiviert und geöffnet, woraufhin ATP austritt und purinerge P2-Rezeptoren aktiviert werden. Diese führen zu neuronaler Hyperaktivität und dadurch zu einer erhöhten Anfallsprogression [63].

Außerdem konnte in Untersuchungen zur synaptischen Plastizität beim Lernprozess eine veränderte postsynaptische Antwort im Hippocampus bei der $Panx1^{-/-}$ -Maus herausgestellt werden. Hier war die Langzeitpotenzierung der $Panx1^{-/-}$ -Maus verstärkt - vermutlich bedingt durch die andauernde extrazelluläre ATP-Substanzminderung. Dies führte zu Verhaltensauffälligkeiten, verstärkter Angst, beeinträchtigter Objekterkennung und räumlicher Orientierung [64]. Die Rolle der Pannexine bei der ATP-Freisetzung wurde auch an Astrozyten der $Panx1^{-/-}$ -Maus untersucht. Hier wiesen die $Panx1^{-/-}$ -Zellen eine niedrigere ATP-Freisetzung als die der Wildtypen und eine veränderte Ausbreitung der Kalziumwelle auf [38].

Des Weiteren wurde die olfaktorische Funktion bei $Panx1^{-/-}$ -Mäusen untersucht. Hier zeigte sich zwar eine Reduktion der ATP-Freisetzung im olfaktorischen Epithel, je-

doch keine signifikante Reduktion olfaktorischer Signaltransduktionsproteine und keine veränderte Geruchswahrnehmung [65]. In Untersuchungen an $Panx1^{-/-}$ -Cochlearzellen wurde nachgewiesen, dass die intrazelluläre ATP-induzierte Kalziumausbreitung unabhängig von den fehlenden Pannexinen kompensatorisch von Connexinen getragen wurde [60]. Weitere sinnesphysiologische Studien befassten sich mit der Rolle von Pannexin-1 in der Retina. Hier zeigten die $Panx1^{-/-}$ -Mäuse in Untersuchungen unter skototopischen Lichtkonditionen ein verändertes Elektoretinogramm im Vergleich zu den Wildtypen, was auf eine Interaktion der Pannexine mit der dunkeladaptierten Retina schließen lässt [61].

Eine weitere Verwendung des $Panx1^{-/-}$ -Mausmodells findet sich in der Untersuchung der Pannexinbeteiligung bei der ATP-Sekretion geschwollener Atemwegsepithelien. Hier konnte gezeigt werden, dass $Panx1^{-/-}$ -Trachea-Epithelien signifikant weniger ATP freisetzen als das Epithel der Wildtypen [66].

Bezüglich der kardialen Funktion lassen sich auf dem aktuellen Stand der Forschung keine Studien am Modell der $Panx1^{-/-}$ -Maus aufzeigen.

1.3.4 Atriales Flimmern in elektrophysiologischen Untersuchungen am Mausmodell

Die grundlegende Methode einer elektrophysiologischen Untersuchung des Mausherzens wurde 1996 erstmalig publiziert, wobei hier kein atriales Flimmern bei der Wildtypmaus ausgelöst werden konnte [67]. Dies wurde mit der besonders kleinen Größe der murinen Vorhöfe begründet, welche lediglich aus drei bis fünf Zellschichten bestehen und damit keine Grundlage für multiple *Reentry*-Erregungen bieten [68]. Bis dato ist lediglich eine Studie bekannt, in welcher atriales Flimmern bei Wildtypmäusen mittels transösophagealer Stimulation reproduziert werden konnte [69].

Verschiedene Studien konnten aber zeigen, dass strukturelle Veränderungen des Vorhofs zu einer Flimmerbereitschaft führen können [70]. Eine erhöhte Induzierbarkeit trat hier zum Beispiel bei transgenen Tieren mit einer Überexpression von TGF- β 1 und dadurch bedingter Fibrosierung des Myokards auf [71]. Ebenso führte eine Dilatation des Vorhofmyokards zu vermehrtem Auftreten von induzierbarem oder sogar spontanem atrialen Flimmern, wobei hier stets unsicher bleibt, ob die Mutation

als solche oder die konsekutive Dilatation als ursächlich zu betrachten ist [68]. Dies war unter anderem zum Beispiel bei einer Überexpression von Junctin [72], des *Angiotensin-Converting-Enzymes* [73] oder von TNF- α [74] nachzuweisen.

Neben einer veränderten Vorhofarchitektur kann auch eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer atriales Flimmern begünstigen [75]. In Studien zur Evaluation von Ionenkanaldefekten wiesen transgene Mäuse mit Mutationen am Kalium-Kanal Kir2.1 durch eine Verkürzung des Aktionspotentials spontanes Vorhofflimmern auf [76]. Daneben kann auch eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer Vorhofflimmern ermöglichen - dies konnte bei Mäusen mit einer Ablation von Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen nachgewiesen werden [77]. Als eine weitere Studie an Tieren mit induzierten Ionenkanaldefekten wurden Mäuse mit Connexin-40-Deletionen untersucht. Diese wiesen eine reduzierte Leitungsgeschwindigkeit im Vorhofmyokard und damit eine erhöhte Vulnerabilität und Stabilität von atrialem Flimmern auf [78].

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wird auf die Frage eingegangen, ob die Pannexin-1-Defizienz die Elektrophysiologie oder die Architektur der Vorhöfe in einem Ausmaß verändert, dass eine erhöhte Vulnerabilität für Vorhofflimmern besteht. Um hier einzig die kardiale Funktion losgelöst von übergeordneter Regulation zu betrachten, wurden die Stimulationsversuche am explantierten Langendorff-perfundierten Herzen durchgeführt.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Familie der Pannexine, und besonders die Untergruppe der Pannexine-1, werden aktuell sehr umfangreich untersucht. Der Aufbau der Kanäle und ihre Funktionsweise auf zellulärer Ebene sind hierbei bereits beschrieben. In vielerlei Hinsicht bestehen jedoch weiterhin Unklarheiten, besonders bezüglich der kardialen Funktion der Pannexine. Wie oben erwähnt, gibt es hier Hinweise, dass Pannexine das Korrelat der *Large Conductance Channels* darstellen, an der Entstehung einer kardialen Fibrose beteiligt sind, kardioprotektive Signalproteine freisetzen und bei der Regulation des Gefäßtonus eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere die Auswirkung auf die Elektrophysiologie des Herzens bleibt bisweilen unerwähnt.

Das Modell der $Panx1^{-/-}$ -Maus hat in den letzten Jahren beachtlichen Einzug in die Forschung an Pannexinen gefunden und es konnten auf der Grundlage dieses Modells bereits neue Erkenntnisse insbesondere bezüglich ihrer funktionellen Beteiligung im Nervensystem herausgestellt werden. Es gibt hierbei jedoch noch keine Studien bezüglich der kardialen Funktion, sodass der kardiale Phänotyp $Panx1^{-/-}$ -Maus anhand dieses Forschungsprojektes erstmalig untersucht wurde. Die Forschungsgruppe befasste sich eingehend mit der kardialen Funktionsanalyse mittels moderner EKG-Techniken *in-vivo* und *in-vitro* sowie echokardiografischer, histopathologischer und expressionsanalytischer Untersuchungsmethoden. Zudem wurden allgemeine Körperparameter verglichen, um eine etwaige Auswirkung auf den morphologischen Phänotyp bei Pannexin-1-Defizienz kenntlich zu machen.

In der Ätiologie von Herzrhythmusstörungen sind besonders bei jüngeren Patienten häufig Ionenkanaldefekte als Ursache zu nennen [12]. Aufgrund ihrer erhöhten Durchlässigkeit für zahlreiche Ionen und auch für ATP sind Pannexine potentielle Kandidaten, bei Defizienz im Sinne einer Kanalopathie das funktionelle Korrelat von Herzrhythmusstörungen darzustellen. Besonderes Augenmerk liegt in der vorliegenden Arbeit daher auf dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter Ruhe- und Belastungsbedingungen sowie unter Katheterstimulation am Langendorff-perfundierten Herzen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Um kardiale Auswirkungen der Pannexin-1-Defizienz zu ermitteln, führte die Forschungsgruppe dieses Forschungsprojektes von Frau Prof. Dr. Donner Versuche zur kardialen Funktion der Versuchstiere durch. Hierzu wurden EKGs aus Oberflächen- und Telemetrieableitungen erhoben und echokardiografische, elektrophysiologische, histopathologische und expressionsanalytische Untersuchungen durchgeführt. Außerdem wurden als generelle Vergleichswerte gravimetrische Parameter, wie Herz- und Körpergewicht sowie die Tibialänge der Mäuse erhoben.

Zunächst wurden die Zuchttiere mithilfe der Genotypisierung der jeweiligen Population ($Panx1^{+/+}$ - oder $Panx1^{-/-}$ -Maus) zugeteilt. Ab einem Alter von acht Wochen wurden sie ins Versuchsprogramm aufgenommen. Insgesamt wurden 37 Transmitter implantiert, wobei acht Tiere während der Operation verstarben. Nach der Einhaltung einer Genesungszeit von zehn Tagen wurden zunächst die telemetrischen Langzeit-EKGs aufgezeichnet, anhand welcher die minimalen, maximalen und durchschnittlichen Herzfrequenzen und die Herzfrequenzvariabilität sowie die Häufigkeit von AV-Blockierungen und Extrasystolen erhoben wurden. Außerdem wurden in diesen EKGs die QT-Zeit und die Morphologie einzelner EKG-Abschnitte bestimmt.

Im weiteren Verlauf wurden mit Erholungsabständen die Belastungsversuche durchgeführt, wobei die Mäuse hier zunächst im Schwimmversuch und mit zeitlichem Abstand noch intensiver in der Laufbandergometrie durch zwei unterschiedliche Protokolle belastet wurden. Ziel dieser Stressversuche war ebenfalls das Auftreten von Herzrhythmusstörungen zu eruieren sowie die Herzfrequenz und die allgemeine Belastbarkeit der Tiere zu untersuchen.

Nach einer erneuten Erholungszeit wurden anschließend Oberflächen-EKGs abgeleitet und die echokardiografische Untersuchung zur funktionellen und strukturellen Analyse durchgeführt. In den Oberflächen-EKGs wurden Analysen zu Zeiten, Depolarisation und Repolarisation sowie zur Hypertrophie durchgeführt.

Im Sinne eines Finalversuches wurden zum Abschluss bei einem Teil der Versuchstiere elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) durchgeführt.

Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und die Herzen und die rechte Tibia entnommen. Anschließend wurden das Körpergewicht, Herzgewicht und die Tibialänge sowie der Herzgewicht/Tibialänge-Quotient und das prozentuale Herzgewicht am Gesamtkörpergewicht verglichen. Ein Teil der Herzen wurde in Formaldehyd asserviert, um sie im weiteren Verlauf histopathologisch prüfen zu lassen. Ein anderer Teil wurde in -70 °C kaltem Stickstoff gekühlt, um sie im Folgenden expressionsanalytisch zu untersuchen.

An einer weiteren Population wurden Stimationsversuche am explantierten Langendorff-perfundierten Herzen durchgeführt, um auch hier wie in der EPU atriales Flimmern durch Katheterstimulation zu provozieren. Insgesamt wurden hier 22 Tiere verwendet.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertationsschrift liegt auf der Erhebung und Quantifizierung von AV-Blockierungen und Extrasystolen in EKG-Aufzeichnungen über 24 Stunden und unter Belastungsbedingungen sowie auf der Provokation atrialen Flimmerns am Langendorff-perfundierten Herzen.

2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A032). Der Nachweis der erfolgreichen Teilnahme am Kurs der „Einführung in die Versuchstierkunde“ befindet sich im Anhang.

2.3 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen

Grundlage unserer Versuche stellt die $Panx1^{-/-}$ -Maus dar, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Monyer (Abteilung klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Einzelne Tiere wurden an uns zum Zuchtaufbau weitergegeben.

Während der Zucht lebten die Tiere in Makrolon Typ II Käfigen (350 cm²) mit entstaubtem Weichholzgranulat als Einstreu. *Ad libitum* erhielten sie das Zuchtfutter M-Zucht der Firma ssniff[®] und ozonisiertes mit HCl angesäuertes (pH=2,6-3) Wasser. Die Raumtemperatur in den Zuchträumen betrug 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %. Im Zuchtalter von acht Wochen wurden die heterozygoten Mäuse verpaart. Bei zeitweilig schlechter Zuchtausbeute wurden auch homozygote Merkmalsträger verpaart und Nicht-Geschwister-C57/Bl6-Mäuse im Sinne einer Auszucht eingekreuzt, wie es auch bereits bei der Heidelberger Arbeitsgruppe durchgeführt wurde.

Die Jungtiere wurden im Alter von 21 Tagen abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und mit vier Wochen die Schwanzspitzenkürzung sowie die Ohrlochung durchgeführt.

Nach der Operation wurde jedes Versuchstier einzeln gehalten, um ein gegenseitiges Ablösen der Nähte zu vermeiden. *Ad libitum* erhielten die Tiere ssniff[®]-Haltungsfutter. Die Räume wurden von 07.00-19.00 Uhr (mitteleuropäische Zeit) beleuchtet. Als Rückzugsraum und zum Nestbau wurde den Tieren autoklavierter Zellstoff in die Käfige gelegt. Die postoperative Versorgung (Gewichts- und Nahtkontrolle, Injektion der Schmerzmedikation und der Glukoselösung) fand in Umsatzstationen mit Luftabzug statt. Bei Kontakt mit den Tieren wurde Schutzkleidung angelegt.

2.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mit DNA, die aus Schwanzspitzen mithilfe des QAGEN[®] DNeasy[®] Blood and Tissue-Kits extrahiert wurde. Anschließend wurde der DNA Gehalt des Eluates mithilfe eines Spectrophotometers ermittelt.

Für die Polymerasekettenreaktion wurden drei Primer verwendet. Der Wtin-Primer (Sequenz 5'-3': GGAAAGTCAACAGAGGTACCC) bindet bei beiden Genotypen im Bereich des ersten Introns, der Wtes-Primer (Sequenz 5'-3':CTTGGCCACGGAGTATGTGTT) bindet ausschließlich bei den Panx1^{+/+}-Mäusen im Bereich des ersten Exons und der lacseq12-Primer (Sequenz 5'-3': GTCCCTCT-CACCACTTTTCTTACC) ausschließlich bei den Panx1^{-/-}-Mäusen im Bereich der transgenen DNA (Abbildung 4).

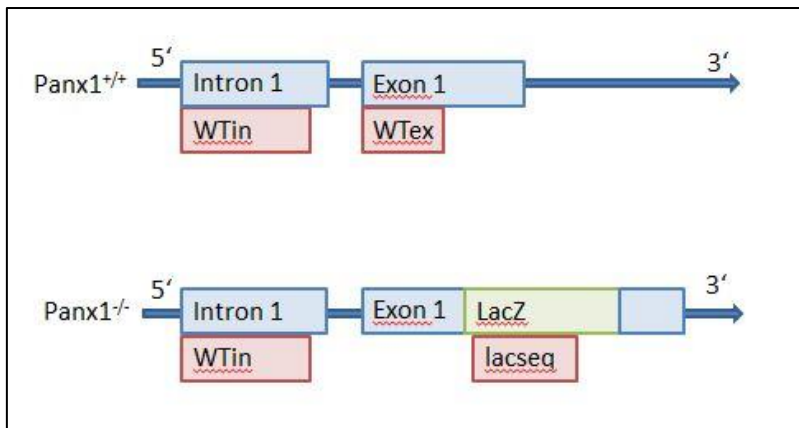


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primeranbindung bei den beiden Genotypen

Für jedes Tier wurden zwei Reaktionsansätze nach der folgenden Zusammensetzung für die PCR angefertigt:

- 20 μ l Taq-Polymerase
- 1 μ l WTin-Primer (Konzentration 1:10)
- DNA-Eluat (Menge nach DNA-Gehalt)
- 1 μ l WTeX Primer (Konzentration 1:10) oder 1 μ l lacseq Primer (Konzentration 1:10)
- *Aqua bidest* auf Gesamtmenge 40 μ l

Die PCR wurde nach Standard-Protokoll mithilfe eines *Thermo-Cyclers* durchgeführt (5 min bei 95 °C, anschließend in 35 Zyklen 15 s bei 95 °C, 20 s bei 55 °C und 30 s bei 72 °C, im Anschluss 5 min bei 72 °C und abschließend Kühlung auf 10 °C bis zur Entnahme). Nach Abschluss der PCR wurden jeweils 15-25 μ l des Amplikons mittels Gelelektrophorese (1 h bei 130 mV) in 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt, die Banden zur Visualisierung mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht abgelesen. Bei den $Panx1^{+/+}$ -Mäusen entstand ein Reaktionsprodukt auf Höhe von 330 Basenpaaren und bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen auf Höhe von 630 Basenpaaren (Abbildung 5). Bei den heterozygoten Tieren entstanden entsprechend der beiden Allele zwei Reaktionsprodukte auf Höhe der jeweiligen Basenpaare.

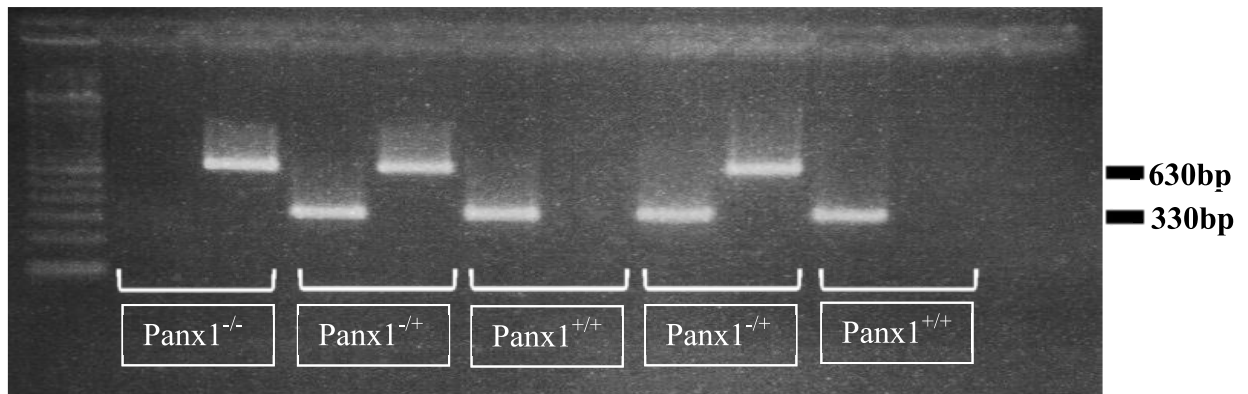


Abbildung 5: Beispiel des Bandenmusters nach Abschluss der Gelelektrophorese mit Zuordnung der Genotypen

Tabelle 1: Verwendete Materialien der Genotypisierung

Geräte	Hersteller
Tiefkühlschrank (Hera freeze) -79 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
DNeasy® Blood & Tissue Kit - DNeasy Mini Spin Column - Collection Tubes	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Inkubator (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne®	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Cenco Instrumenten B.V., Breda, Niederlande
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop® Products, Wilmington, USA
Software ND-1000 Version 3.7.1	Nanodrop® Products, Wilmington, USA
Thermo-Cycler T3	Biometra® Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland

Präzisionswaage	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizplatte mit Magnetrührer RCT Basic	IKA [®] Werke GmbH und Co, Staufen, Deutschland
Gelelektrophorese Kammer Modell B2 mit Kämmen	Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA
Spannungsgenerator Power Pack P25	Biometra [®] Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Geldokumentationssystem <i>BioDoc Analyze</i>	Biometra [®] Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Chemikalien	Hersteller
DNeasy [®] Blood & Tissue Kit <ul style="list-style-type: none"> - Proteinase K - AE Puffer - AL Puffer - ATL Puffer - AW1 Puffer (Wasch Puffer1) - AW2 Puffer (Wasch Puffer2) 	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Ethanol for molecular biology	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
REDTaq [®] ReadyMix [™] PCR Reaction Mix	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Primer Geno Pxn1 (wtin3) Geno Pxn2 (wtex15) Geno Pxn3 (lacseq12)	Eurofins, MWG/Operon, Ebersberg, Deutschland Primersequenzen durch persönliche Mitteilung von Frau Dr. Anne Herb, Heidelberg
Universal Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
100bp DNA Ladder	Invitrogen, life Technologies [™] , Carlsbad, USA

2.5 Transmittersystem für die telemetrische EKG-Ableitung

2.5.1 Aufbau des Transmitters

Zur telemetrischen Ableitung der murinen EKGs wurden PhysioTel[®] Transmitter der Firma DSI[®] verwendet. Diese bestehen aus einem kleinen Übertragungsgerät mit Batterie und den Elektroden. Für die Versuche standen uns zwei Typen zur Verfügung (ETA F10: 1,6 g, subkutane Implantation, ETA F20: 3,9 g, intraperitoneale Implantation). Abbildung 6 zeigt eine Fotografie des subkutanen Transmitters.

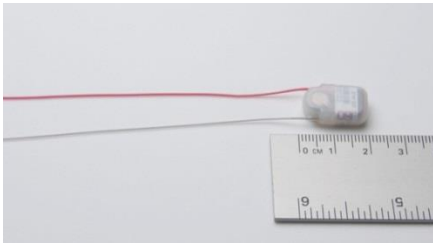


Abbildung 6: Fotografie des Transmittermodells ETA F10 zur subkutanen Implantation. Die Elektroden können nach Bedarf gekürzt werden (Fotografie des Herstellers DSI[®])

Die Transmitter werden sterilisiert geliefert und können direkt implantiert werden. Bei Wiederverwendung wurden die Transmitter nach Explantation zunächst mechanisch und anschließend enzymatisch mit Gigazyme[®] (3 ml in 30 ml H₂O, Einwirkzeit: 5h) gereinigt. Danach wurden sie durch Einlegen in Gigasept[®] Lösung (2 ml in 30 ml H₂O, Dauer: 24 h) sterilisiert.

Tabelle 2: Verwendete Transmittertypen und Detergenzien zur Aufbereitung

Transmitter	Hersteller
ETA F10	DSI [®] , Data Science Minneapolis, USA
ETA F20	DSI [®] , Data Science Minneapolis, USA
Detergenzien	Hersteller
Gigazyme (<i>Enzymatic cleaning agent</i>)	Schülke & Mayr GmbH, Nordersted, Deutschland
Gigasept	Schülke & Mayr GmbH, Nordersted, Deutschland

2.5.2 Transmitterimplantation

Für die telemetrische Ableitung der murinen EKGs wurden den Versuchstieren die oben beschriebenen Transmitter implantiert, welche je nach Typ intraperitoneal oder subkutan platziert wurden. Als Narkose erhielten die Mäuse intraperitoneal injiziert 50 µg/g Körpergewicht Ketamin zur Analgesie und Hypnose sowie 20 µg/g Körpergewicht Xylazin zur Sedation und Muskelrelaxation. Nach Eintreten der Narkose wurden die Versuchstiere auf eine bei 37 °C temperierte Wärmeplatte gelegt und die Extremitäten sowie der Schwanz mit Pflasterband leicht fixiert. Über eine Gesichtsmaske wurde die Narkose mittels Isofluran (0,5-1,5 Vol. %) und Sauerstoff (2,5-3 l) im halboffenen System erhalten. Zum Schutz der Augen vor dem Luftzug der Gasbeatmung wurde vorsorglich Regepithelsalbe[®] in die Lidspalte aufgetragen. Anschließend wurde die Maus am Thorax und am Abdomen rasiert. Die sterilisierten Transmitter wurden in NaCl-Lösung (0,9 %) in einem Wasserbad erwärmt, um ein Auskühlen der Maus bei der späteren Implantation zu vermeiden.

Nun wurde die Bauchdecke mit einem Skalpell entlang einer feinen Inzision eröffnet und die Haut von der Muskulatur abpräpariert. Für die subkutanen Transmitter wurde durch stumpfe Präparation eine Hauttasche rechts lateral der Inzision geschaffen, in welche später der Transmitter platziert wurde. Für die intraperitoneal liegenden Transmitter wurde zusätzlich der *Musculus rectus abdominis* entlang der nicht kapillarisierten *Linea alba* inzidiert. Unter Schonung der Leber und des Urogenitaltraktes wurde der aufgewärmte Transmitter in die Bauchhöhle der Maus gelegt und mit nicht resorbierbaren monofilen Prolene[®]-Fäden der Stärke USP 5-0 am Muskel fixiert. Die Elektroden wurden durch die Muskulatur aus der Bauchhöhle hinausgeführt, welche vorher mit Hilfe einer Mandrin unterhalb des Sternums perforiert wurde. Lageentsprechend wurde der subkutane Transmitter in der präparierten Hauttasche platziert (Abbildung 7.1). Zur Positionierung der Elektroden wurde nun bei beiden Transmittertypen mit Hilfe einer Sonde ein subkutaner Kanal geschaffen, welcher von der Bauchinzision bis zu den geplanten Fixationsstellen der Elektrodenenden verlief. Diese lagen entsprechend einer Ableitung II nach Einthoven. Dazu wurde die durch den Sondenkopf vorgewölbte Haut am Ende des präparierten Kanals inzidiert, sodass hier ein Sichtfeld zur Fixierung der Elektroden entstand (Abbildung 7.2). Durch diesen Kanal wurden die ummantelten Drähte des Transmitters geführt und auf die be-

nötigte Länge gekürzt. Anschließend wurden vorsichtig die letzten 5 mm der Isolation entfernt und eine 2 mm lange Kunststoffschutzkappe am spitzen Ende des Drahtes fixiert, um Verletzungen der Maus zu vermeiden. Damit blieb ein ca. 3 mm langes Stück freien Drahtes, über welchen das EKG registriert wurde. An der apikalen Schutzkappe und an der gebliebenen Isolationsummantelung wurden die Transmitterelektroden am *Musculus pectoralis major* ebenfalls mit Prolene[®]-Nahtmaterial der Stärke USP 5-0 fixiert. Nachdem sowohl Transmitter als auch die zugehörigen Elektroden an der Muskulatur befestigt waren, wurden die Bauch- und Brustinzisionen mit resorbierbaren Vicryl-Fäden der Stärke USP 6-0 vernäht. Um ein Ablösen der Naht durch die Maus zu vermeiden, wurden die Nähte zusätzlich mit Hautklammern (Abbildung 7.3) geklippt und die Wunde mit Aluminiumspray behandelt. Zur postoperativen Versorgung erhielten die Mäuse zur Analgesie 0,5 mg Carprofen (Rimadyl[®]) sowie 0,6 ml Glukoselösung (5 %) und 0,4 ml NaCl (0,9 %).



Abbildung 7: Operationsschritte während der Transmitterimplantation

7.1: Positi-

onierung des subkutanen Transmitters in der zuvor präparierten Hauttasche, 7.2: Zur Positionierung der Elektroden werden subkutan stumpf präparierte Kanäle geschaffen und die Haut an der geplanten Fixationsstelle mit einer Schere eröffnet, 7.3: Nach Abschluss der Implantation sind lediglich die Bauch- und Brustnähte sowie die Hautklammern zu sehen

Nach Abschluss der Operation wurde die Maus auf Zellstoff in den Käfig gelegt und dieser für 1-2 h bei 36 °C einen Brutkasten gestellt, bevor die Mäuse in die Haltungsräume der Tierversuchsanlage gebracht wurden. Dort erholten sich die Tiere postoperativ und erhielten in den ersten vier Tagen nach Implantation täglich Analgesie mittels Rimadyl[®] (0,5 mg/d) sowie 0,6 ml Glukose (5 %) und 0,4 ml NaCl (0,9 %) zur Nahrungsunterstützung. Zur Verlaufsbeurteilung wurde das Gewicht der Tiere dokumentiert und die Wunden auf mögliche Nahtinsuffizienzen untersucht, welche dann unter kurzer Isofluran-Sedierung ausgebessert wurden. In die Versuche wurden die Tiere nach einer Genesungszeit von zehn Tagen postoperativ aufgenommen.

Tabelle 3: Verwendete Materialien bei der operativen Transmitterimplantation

Gerät, Instrument, Nahtmaterial	Hersteller
Beatmungseinheit Sulla 808	Drägerwerk AG&Co, Lübeck, Deutschland
Wärmeplatte HAT 007	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland
Tierrasurgerät Super AGR	Andis Company, Wisconsin, USA
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nahtmaterial Prolene 5-0	Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nahtmaterial Vicryl 4-0, resorbierbar	Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nahtklammern	Perfect Agrafes, Brétigny-sur-Orge, Frankreich
Medikament	Hersteller und Konzentration
Ketamin	Ketanest [®] , Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Rompun [®] , Bayer Healthcare AG, Leverkusen
Isofluran Actavis	Isofluran, Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, Langenfeld, Deutschland
Sauerstoff	Linde AG, Pullach, Deutschland
Carprofen	Rimadyl [®] , Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glukose, 5 % Infusionslösung	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland
NaCl	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland
Aloxon Silberspray	Agrochemica GmbH, Bremen, Deutschland
Regepithelsalbe [®]	Alcon Pharma GmbH, Köln, Deutschland

2.5.3 Grundprinzip der Ableitung der telemetrischen EKGs

Zur telemetrischen EKG-Ableitung wurde die Maus im Käfig auf der DSI[®]-Receiver-Platte (RPC-1 Receiver) platziert und der Transmitter aktiviert. Die Empfängerplatte leitete das über Funk erhaltene EKG-Signal an das *PowerLab*, welches dieses digitalisierte und zum Programm *LabChart*[®] an den Computer sendete (Abbildung 8).

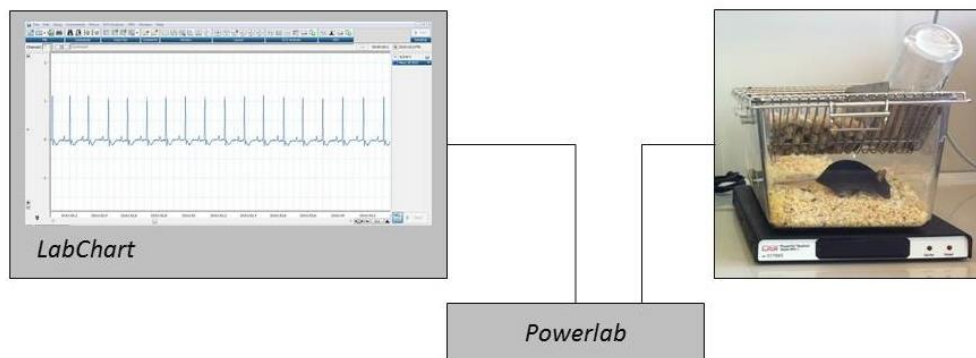


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Aufzeichnung der EKGs. Das *Powerlab* digitalisiert das Signal und sendet es an das Programm *Labchart*[®]

Tabelle 4: Verwendete Materialien bei der Aufzeichnung der telemetrischen EKGs

Gerät	Typ und Hersteller
Magnet zur Aktivierung	Data Science, Minneapolis, USA
Receiver RPC-1	Data Science, Minneapolis, USA
Power-Lab 8/35 (Analog-Digital-Wandler)	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Analyse-Software LabChartPro [®] 7.2.1	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland

2.6 Aufzeichnung und Analyse der EKGs

2.6.1 Vorgehen bei den Langzeit-EKGs

Zur Erfassung zirkadianer Einflüsse wurden die Langzeit-EKGs unter Beachtung der Tag- und Nachtrhythmik in den Räumlichkeiten der Tierversuchsanlage aufgezeichnet.

Für die Herzfrequenzanalyse wurden alle 20 Minuten artefaktfreie EKG-Segmente von 20 Sekunden Länge entnommen. In diesen wurde über die *Lab-Chart* Funktion *ECG-Analysis* die durchschnittliche, minimale und maximale Herzfrequenz aus den Einzelschlägen ermittelt und aus allen Segmenten ein Durchschnittswert für jede Maus in Abhängigkeit von Tages- und Nachtzeit gebildet. Die Werte wurden zwischen den Versuchsgruppen mithilfe des parametrischen t-Tests verglichen. Dieser prüft, ob sich die Mittelwerte der normalverteilten Daten der beiden Stichproben unterscheiden. Als Vortest zum Nachweis einer Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilks-Test angewendet [79].

Die gesamten 24 Stunden des Langzeit-EKGs wurden auf AV-Blockierungen, supra-ventrikuläre und ventrikuläre Extrasystolen geprüft. Im Sinne einer verblindeten Auswertung war der Genotyp der Maus nicht bekannt. Es wurde nach den in Abbildung 9-11 verdeutlichten morphologischen Kriterien vorgegangen:

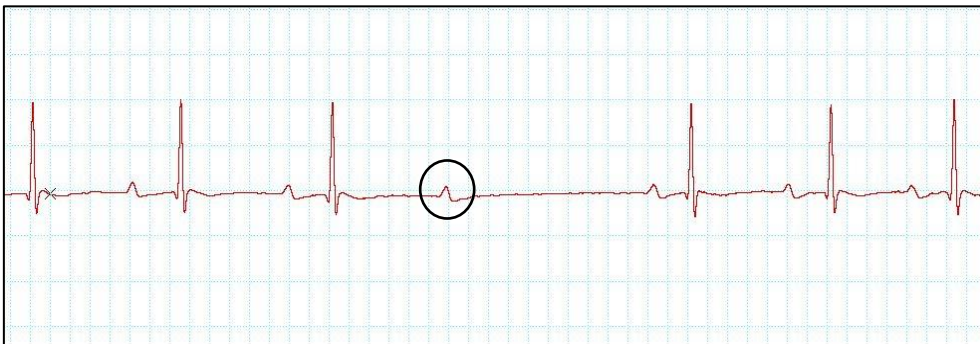


Abbildung 9: AV-Blockierung Typ II b im murinen EKG. Auf eine P-Welle (Markierung) folgt kein QRS-Komplex wie bei den vorherigen und nachfolgenden Erregungen

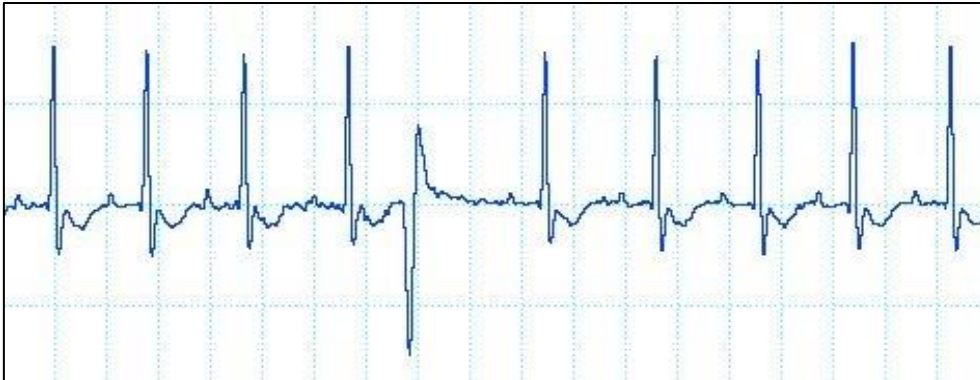


Abbildung 10: Ventrikuläre Extrasystole im murinen EKG. Ohne sichtbare vorangehende P-Welle tritt ein morphologisch verbreiteter QRS-Komplex auf



Abbildung 11: Supraventrikuläre Extrasystole im murinen EKG. Die zu früh auftretende P-Welle (Markierung) löst einen elektrophysiologisch intakten QRS-Komplex aus

Die durchschnittliche Häufigkeit wurde zwischen den Versuchsgruppen mithilfe des U-Tests verglichen. Dieser entspricht dem parametrischen t-Test bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung und vergleicht die Medianwerte der jeweiligen Datenreihe [79].

Im weiteren Verlauf wurde die durchschnittliche Herzfrequenz bei Vorliegen einer AV-Blockierung verglichen. Dazu wurden im EKG Segmente von 20 Sekunden Länge, welche die jeweilige AV-Blockierung in der Mitte einfassten, markiert. Wie auch bei der allgemeinen Herzfrequenzanalyse wurde mit dem Zusatz-Tool *ECG-Analysis* die durchschnittliche Herzfrequenz während der AV-Blockierung ermittelt. Die erhobenen Werte, welche auch die Anzahl von AV-Blockierungen aus den unten erläuterten Belastungsversuchen enthielten, wurden mit dem t-Test verglichen.

Zu jeder AV-Blockierung wurde somit ein Herzfrequenzwert zugeordnet. Um hier die gesamte Spannbreite zu verdeutlichen, wurde die Häufigkeit von AV-Blockierungen Herzfrequenzklassen (beispielhaft 381-400 min⁻¹, 401-420 min⁻¹, 421-440 min⁻¹) zugeordnet. Aus der Häufigkeitsverteilung im Bereich sehr hoher Frequenzen (>680 min⁻¹) wurde eine Vierfeldertafel (Merkmal: Anteil AV-Blockierung innerhalb oder außerhalb dieser Kategorie) gebildet und mithilfe des Fisher-Yates-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen geprüft. Hier wird geprüft, ob sich die Anteile einer Stichprobe mit Merkmal von den Anteilen der Stichprobe ohne Merkmal unterscheiden [80].

2.6.2 Vorgehen bei den Belastungsversuchen

Um das Auftreten belastungsinduzierter Herzrhythmusstörungen zu eruieren, wurden EKGs unter Belastung durch Schwimmen und durch Laufbandergometrie abgeleitet.

Schwimmversuche zur Belastung im submaximalen Bereich

Die Schwimmversuche erfolgten in einem 36 °C temperierten Wasserbad nach einer fünfminütigen Ruhe-EKG-Analyse. Standardisiert schwamm jede Maus fünf Minuten und wurde anschließend wieder in ihren Käfig gesetzt, wobei die folgenden zehn Minuten als Erholungszeit-EKG aufgezeichnet wurden.

Nach Ausschluss von Artefakten und einem signifikanten Belastungsnachweis durch Vergleich der Herzfrequenzen mittels t-Test für verbundene Stichproben wurden die gesamten 20 Minuten des Schwimmversuches auf rhythmologische Auffälligkeiten nach den oben genannten Kriterien untersucht. Die jeweiligen Häufigkeiten von AV-Blockierungen und Extrasystolen wurden mithilfe des U-Tests verglichen.

Zudem wurde geprüft, ob die Versuchstiere innerhalb einer Population mehr Herzrhythmusstörungen in Ruhe oder unter Belastungsbedingungen zeigten. Dazu wurde die durchschnittliche Anzahl von AV-Blockierungen und von Extrasystolen aus dem 24h-EKG auf eine Dauer von 20 Minuten transferiert und mit der jeweiligen Anzahl aus dem Schwimmversuch mithilfe Wilcoxon-Tests verglichen. Dieser ersetzt den t-Test für verbundene Stichproben bei nichtnormalverteilten Datenreihen und unter-

sucht, ob sich diese beiden Stichproben in ihrer zentralen Tendenz bei unterschiedlichen Bedingungen (hier Ruhe und Belastung) unterscheiden [80].

Laufbandergometrie zur maximalen Belastung

Zur maximalen Belastung der Versuchstiere wurde eine Laufbandergometrie durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse zunächst in das Laufband gesetzt und ein Referenzruhe-EKG aufgezeichnet. Dies ist hier besonders wichtig, da das Umsetzen in die ungewohnte Umgebung psychischen Stress für die Tiere bedeutete und daher eine höhere Herzfrequenz im Referenz-EKG zu erwarten war. Nach einer Eingewöhnungszeit von fünf Minuten wurde mit der Belastung in einer Laufbandgeschwindigkeit von 2 m/min gestartet, welche alle zwei Minuten um einen Meter pro Minute erhöht wurde. Bei einer Belastungszeit von 24 Minuten musste die Maus also 15 m/min laufen. Bei Erschöpfung der Maus wurde diese mit leichten Elektrostimulationen zum Weiterlaufen motiviert. Nach fünfmaliger Stimulation innerhalb von 15 Sekunden wurde die Ergometrie beendet. Nach einer mehrtägigen Erholungszeit wurde die Laufbandergometrie mit der Erschwernis einer Steigung erneut aufgezeichnet. Hier wurde die Geschwindigkeit alle zwei Minuten um 1,2 m/min erhöht und zusätzlich alle vier Minuten das Laufband um 5° angehoben. Wie bei dem ersten Versuch wurde die Belastung nach fünfmaliger Elektrostimulation beendet.

In Analogie zu den Schwimmversuchen wurde zunächst mithilfe des t-Tests für verbundene Stichproben untersucht, ob eine signifikante Belastung stattgefunden hat. Anschließend wurden die aufgezeichneten EKGs auf Herzrhythmusstörungen geprüft und die Werte mit dem U-Test verglichen.

Tabelle 5: Verwendete Materialien bei den Belastungsversuchen

Gerät	Typ und Hersteller
Käfige für Schwimmversuche	Makrolon Zuchtkäfig T II (Höhe 14 cm)
Temperaturmessgerät GTH 175/MOP	Greisinger Electronic GmbH, GHM Messtechnik, Regenstauf Deutschland
Laufband mit Rampenfunktion	Simplex II Metabolic Modular Treadmill, Columbus Instruments, Ohio, USA

2.7 Tötung, Organentnahme und gravimetrische Messungen

Nach Abschluss der Versuche wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tiere und der explantierte Transmitter gewogen (unterschiedliche Transmittergewichte durch unterschiedliche Typen und angepasste Länge der Elektrodenkabel). Nun wurde das Herz explantiert und die abgehenden großen Gefäße abgetrennt. Nach Reinigung der Herzen mit NaCl (0,9 %) und Dulbecco's PBS[®] wurden diese gewogen. Ein Teil aller Herzen wurde in Formaldehyd zur histopathologischen Untersuchung fixiert. Abschließend wurde mithilfe einer Schiebellehre die Knochenlänge der freipräparierten Tibia gemessen.

Für unsere Analysen wurden das Körper- und Herzgewicht, die Tibialänge sowie der Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge und der prozentuale Anteil des Herzgewichtes am Körpergewicht mit dem parametrischen t-Test verglichen.

Tabelle 6: Verwendete Materialien bei der Organentnahme und bei den gravimetrischen Messungen

Gerät/Chemikalie	Typ und Hersteller/Konzentration
Operationsbesteck	AESCULAP [®] , B.Braun, Melsungen, Deutschland
Dulbecco's PBS [®]	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Petrischalen zur Reinigung	TPP [®] , Milian [®] , Genf, Schweiz
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Falcon-Röhrchen 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.8 Langendorff-Versuche

Für die Versuche am explantierten Herzen wurde die Langendorff-Perfusions-Anlage IH-SR (*Isolated heart for small rodents*) Typ 844 der Firma Hugo-Sachs Electronics[®]/Harvard-Apparatus[®] verwendet (Abbildung 12). Das explantierte Herz wurde über eine Perfusionskanüle mit Pufferlösung versorgt, die durch ein Schlauch- und

Kanalsystem von einer Umwälzpumpe transportiert wurde. Räumlich umgeben war das Herz von der Herzkammer, bestehend aus zwei Halbzylindern mit integriertem Kanalsystem zur Erwärmung der Anlage. Durch dieses Kanalsystem zirkulierte auf 37 °C erwärmtes Wasser und hielt damit die Umgebungstemperatur in der Herzkammer konstant. Der untere Halbzylinder der Herzkammer konnte nach unten geklappt werden und ermöglichte so das Anbringen des explantierten Herzens. Der ablaufende Puffer wurde in einer Plastikwanne aufgefangen. Zur Elimination elektrischer Störsignale wurde ein Faradaykäfig aus Metall-Loch-Platten um die Langendorff-Anlage positioniert.

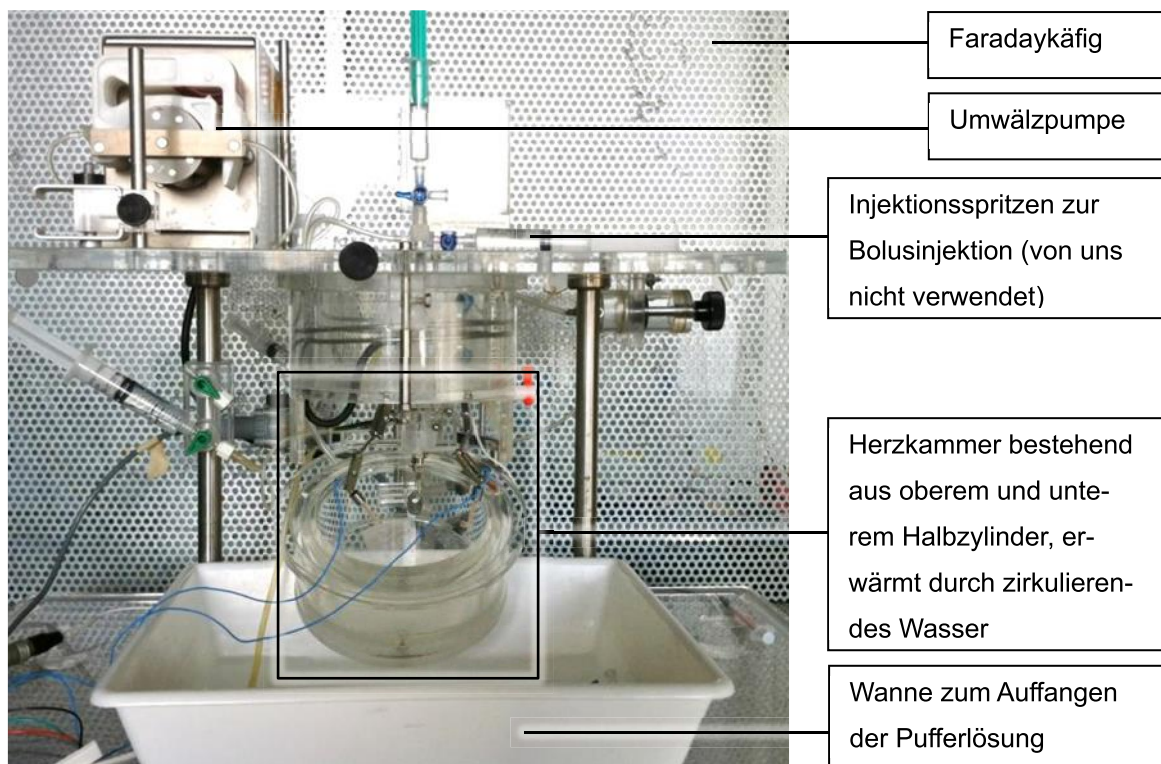


Abbildung 12: Fotografie der Langendorff Apparatur Typ 844 IH-SR der Firma Hugo Sachs®. Im Zentrum steht die Herzkammer, in welcher das explantierte Herz perfundiert wird

Vorbereitung der Anlage

Vor Beginn der Versuche wurde die Apparatur mithilfe des Umwälzthermostates auf eine Umgebungstemperatur von 37 °C aufgewärmt. Parallel wurde die Peristaltikpumpe auf eine konstante Fließrate von 3,5 ml/min eingestellt und hierüber zur Reinigung der Schläuche für eine Dauer von zehn Minuten zunächst bidestilliertes Wasser geleitet. Zur Perfusion des Herzens wurde Krebs-Henseleit-Puffer verwendet,

wovon nach der in Tabelle 7 aufgeführten Mengenzusammensetzung zwei Liter hergestellt wurden. Über eine Glasfritte wurde der Puffer mit Carbogen begast und mit einer Thermoplatte auf eine konstante Temperatur von 38 °C erwärmt und anschließend zur Perfusionskanüle gleitet.

Tabelle 7: Verwendete Materialien bei der Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers

Substanz	Konzentration in mmol/l
NaCl	116
KCl	4,63
MgSo ₄ x 7 H ₂ O	1,1
KH ₂ PO ₄	1,18
NaHCO ₃	24,9
Glucose, wasserfrei	8,32
Pyruvat	2
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,52
Gerät	Hersteller
Delta Range [®] Präzisionswaage PE 3600	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Gas	Hersteller
Carbogen Linde Gas [®] - 5 % CO ₂ - 95 % O ₂	Linde AG, Pullach, Deutschland

Entnahme und Präparation der Herzen

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und auf dem Präparationstisch fixiert. Unmittelbar danach wurde eine Sternotomie durchgeführt, das Zwerchfell eröffnet und das Sternum hochgeklappt. Mit einer Pinzette wurden die beiden Lungen beiseite gezogen und die zu- und abführenden Gefäßstämme des Herzens abgesetzt. Hierbei wurde die Aorta nicht unmittelbar nach Abgang aus dem Herzen durchtrennt, sondern ein Segment bis zum Abgang des *Truncus brachioce-*

phalicus für die spätere Fixierung des Herzens an der Perfusionskanüle erhalten. Für die saubere Präparation wurde das Herz in eine 4 °C gekühlte isotone NaCl-Lösung gelegt, in welcher die Kontraktion des Herzens verlangsamt und arretiert. Dies senkte den Sauerstoffverbrauch im explantierten Herzen und ermöglichte zudem eine einfachere Präparation. Unter dem Operationsmikroskop wurden störende Gewebereste entfernt und der Aortenstamm an der mobilen Perfusionskanüle fixiert. Hierbei war darauf zu achten, die Kanüle nicht zu weit vorzuschieben, um die Koronargefäße nicht zu verlegen.

Nach Befestigung des Herzens an der Perfusionskanüle wurde dieses zügig auf dem Ausgang des Pufferkanals in der Herzkammer der Langendorff-Anlage positioniert, wie es in Abbildung 13 (hier bereits mit Oktapolarkatheter) dargestellt ist. Die Koronarien des Herzens wurden hierüber retrograd mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Durch die Reperfusion und die an Körperbedingungen angepasste Temperatur setzte die Kontraktion des Herzens wieder ein.

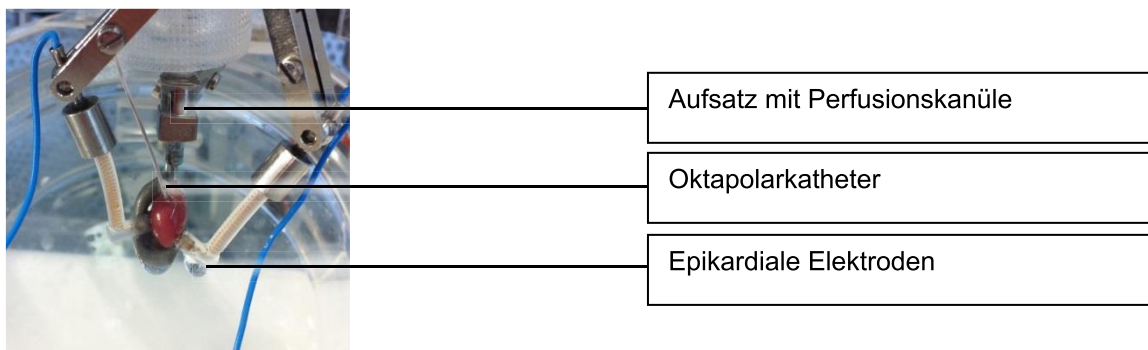


Abbildung 13: Detailaufnahme des fixierten Herzens in der Herzkammer

EKG-Ableitung und Stimulation

Zur Ableitung der EKGs wurde zunächst der intrakardiale Oktapolarkatheter der Firma NuMed[®] in Atrium und Ventrikel platziert. Der Katheter besitzt an seiner Spitze acht voneinander isolierte Elektroden für bipolare Ableitungen und zur Stimulation. Zur Platzierung der Katheterspitze im Herzen wurde mit einer feinen Schere der Vorhof unterhalb des Herzohres eröffnet und der Katheter über die Segelklappe in den Ventrikel geschoben, sodass die distalen Elektroden im Ventrikel und die proximalen Elektroden im Vorhof lagen. Je nach Größe der Herzen und der Lage des Katheters

wurden die zwei optimalen Elektroden zur Ableitung eines intrakardialen EKGs mit gut sichtbarer Vorhof- und Kammeraktion bestimmt. Anschließend wurden die Oberflächenelektroden der Langendorff-Apparatur an das Epikard angelegt und ein Kontroll-EKG abgeleitet. Das Signal der ableitenden Elektroden gelangte zur Signalverstärkung über das *Animal-BioAmp*[®] zum *PowerLab*. Dieses digitalisiert das eingehende analoge Signal und überträgt es zur Software „*LabChart*“.

Sobald sowohl intra- als auch epikardial ein gutes EKG-Signal sichtbar war, wurde mit dem Stimulationsprotokoll begonnen. Das Ziel der Stimulation war das atriale Myokard, daher wurden zum *Pacing* die sich dort befindenden Elektroden gewählt. Zunächst wurde je nach Größe des Herzens und Lage des Katheters die nötige Spannung (in mV) für die atriale *Burststimulation* ermittelt, unter welcher eine Ankopplung der Myozyten (*Capture*) sichtbar war. Eine durchschnittlich benötigte mV-Stärke lag bei unseren Versuchen bei ca. 1500-2000 mV. Anschließend wurde mit der Stimulation nach Protokoll begonnen. Nach diesem wurde für jeweils fünf Sekunden eine atriale *Burststimulation* appliziert, zunächst mit Einzelstimuli im Abstand von 30 ms, dann von 20 ms und schließlich von 10 ms. Hierbei wurde stets die Einstellung als Rechteckimpuls verwendet, die Stromstärke wurde also nicht zu einem Maximum hin aufgebaut wie eine Kurve, sondern zeigte direkt einen rechteckigen Verlauf mit einem steilen Direktanstieg zur benötigten Spannung und einem direkten Abfall auf 0mV zwischen den einzelnen Stimulationen. Nach jeder Stimulation wurde im epi- und endokardialen EKG die Vorhofaktion beobachtet, um eventuelles atriales Flimmern festzustellen. Mithilfe des Fisher-Yates-Tests wurde geprüft, ob hierbei signifikante Unterschiede auftraten.

Tabelle 8: Verwendete Materialien bei den Stimulationsversuchen am Langendorff-perfundierten Herzen

Geräte/Instrumente/Lösungen	Hersteller
Fixierplatte	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Operationsbesteck	AESCULAP [®] , B.Braun, Melsungen, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland

Oktapolarkatheter	CIB'ER Mouse [®] , NuMED, Inc., Hopkinton, NewYork, USA
Katheterstimulator STG 4002	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutigen, Deutschland
Bioamp Modell ML 136	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Power-Lab 8/35 (Analog-Digital-Wandler)	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Analyse-Software LabChartPro [®] 7.2.1	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Langendorff-Apparatur	Hugo Sachs Elektroniks [®] /Harvard Apparatus [®] , March-Hugstetten, Deutschland Typ: 844 (IH-SR, Size I)
Peristaltikpumpe Ismatec Reglo [®]	IDEX Health & Science, Wertheim, Deutschland
Umwälzthermostat M3 Lauda [®]	Lauda GmbH und Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Laborschläuche, PVC	Labmarket GmbH, Mannheim, Deutschland
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA [®] Werke- GmbH und Co, Staufen, Deutschland
Glasfritte zur Pufferbegasung Duran [®]	Schott, Mainz, Deutschland
Temperaturmessgerät GTH 175/MOP	Greisinger Electronic GmbH, GHM Messtechnik, Regenstauf Deutschland
Operationsmikroskop Leica MZ 6	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Operationslicht KL 1500 LCD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

2.9 Statistische Auswertverfahren

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden statistische Tests mithilfe der *Software* GraphPad-Prism[®] durchgeführt. Hier wurde je nach Merkmalsart und Fragestellung der parametrische t-Test für zwei unverbundene oder verbundene Stichproben, der nicht parametrische U-Test, der Wilcoxon-Test oder der Fisher-Yates-Test verwendet. Die Funktionsweise der Tests wird an der jeweiligen Stelle beschrieben (s.o.).

Im Ergebnisteil werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Anzahl von Tieren (n) angegeben. Als signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$, als sehr signifikant ein p-Wert $< 0,01$ und als hochsignifikant ein p-Wert $< 0,001$ angenommen.

Tabelle 9: Verwendete Software zur statistischen Analyse

Software	Hersteller
GraphPad-Prism [®] 5 for Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA

3. Ergebnisse

3.1 Gravimetrische Parameter

Es wurden Körpergewicht, Herzgewicht und Tibialänge sowie der Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge und der prozentuale Anteil des Herzgewichtes am Gesamtgewicht der Maus als Körperindizes erhoben und verglichen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Messwerte der erhobenen Körperparameter

	Panx1^{+/+}	Panx1^{-/-}	Signifikanz
Körpergewicht (g)	28,3 ± 0,9 n=12	29,3 ± 3,0 n=9	n.s.
Herzgewicht (g)	0,2 ± 0,0 n=7	0,2 ± 0,0 n=8	n.s.
Tibialänge (mm)	18,0 ± 0,2 n=9	18,3 ± 0,2 n=9	n.s.
Herzgewicht/Tibialänge (g/mm)	0,01 ± 0,0 n=6	0,01 ± 0,0 n=8	n.s.
Herzgewicht (% von KG)	0,8 ± 0,1 n=7	0,8 ± 0,1 n=8	n.s.

Die Vergleiche der Messwerte mittels t-Test ergaben keine signifikanten Unterschiede bei den genannten Parametern zwischen den Panx1^{-/-}-Mäusen und der Kontrollgruppe.

3.2 Herzfrequenzanalyse

3.2.1 Durchschnittliche Herzfrequenz in Langzeit-EKGs

Als Grundlage für die Auswertung der Häufigkeit von Herzrhythmusstörungen wurde die maximale, durchschnittliche und minimale Herzfrequenz beider Versuchsgruppen aus den 24h-EKGs verglichen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Durchschnittliche Herzfrequenz der Versuchsgruppen unter physiologischen Bedingungen

	Panx1^{+/+} n=12	Panx1^{-/-} n=10	Signifikanz
Über 24h gesamt			
Minimale HF	424 ± 15	457 ± 25	n.s.
Durchschnittliche HF	514 ± 18	558 ± 25	n.s.
Maximale HF	582 ± 16	631 ± 26	n.s.
Nacht			
Minimale HF	448 ± 16	483 ± 24	n.s.
Durchschnittliche HF	535 ± 17	585 ± 25	n.s.
Maximale HF	605 ± 15	661 ± 25	n.s.
Tag			
Minimale HF	399 ± 16	432 ± 28	n.s.
Durchschnittliche HF	492 ± 19	530 ± 27	n.s.
Maximale HF	560 ± 19	602 ± 27	n.s.

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Herzfrequenz, welche bei der Analyse der Herzrhythmusstörungen beachtet werden mussten.

3.3 Auftreten von Herzrhythmusstörungen im Ruhe-EKG

Die unter physiologischen Bedingungen aufgezeichneten 24h-EKGs wurden auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen geprüft.

3.3.1 Auftreten von AV-Blockierungen

Neun von zehn der Panx1^{-/-}-Mäuse und alle Wildtypen zeigten mindestens eine AV-Blockierung. In der Summe zeigten alle Tiere der Untersuchungsgruppe (n=10) 192 und alle Kontrolltiere (n=11) 48 AV-Blockierungen (Tabelle 12), was keinen signifikanten Unterschied ausmacht.

Tabelle 12: Häufigkeiten von AV-Blockierungen in Ruhe und insgesamt

	Panx1 ^{+/+}	Panx1 ^{-/-}
Anteile	11 von 11	9 von 10
Anzahl insg. 24h-EKG	37	189
Anzahl insg. einschl. Belastungsversuche	48	192

Die Einzelwerte einer jeden Maus wurden mithilfe des U-Tests nach Mann und Whitney verglichen:

Über die gesamte Dauer von 24 Stunden zeigten sich bei den Panx1^{+/+}-Mäusen $3,4 \pm 0,8$ (n=11) und bei den Panx1^{-/-}-Mäusen $18,9 \pm 7,9$ (n=10) AV-Blockierungen (p=0,047). Im Folgenden wurde die Gesamtanzahl von AV-Blockierungen in die Nacht- und Tageszeit eingeteilt und damit die jeweiligen Werte in der Aktivitäts- und Ruhephase der Maus verglichen. In der Nacht (Aktivitätsphase) zeigten die Panx1^{+/+}-Mäuse $1,1 \pm 0,3$ (n=11) und die Panx1^{-/-}-Mäuse $8,9 \pm 3,5$ (n=10) AV-Blockierungen. Damit wiesen die Panx1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr AV-Blockierungen auf als die Kontrollgruppe (p=0,0159). In der Tageszeit (Ruhephase) zeigten die Panx1^{+/+}-Mäuse $2,3 \pm 0,6$ (n=11) und die Panx1^{-/-}-Mäuse $10,0 \pm 4,4$ (n=10) AV-Blockierungen (Tabelle 13, Abbildung 14).

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl von AV-Blockierungen II°

	Panx1 ^{+/+} n=11	Panx1 ^{-/-} n=10	Signifikanz
Über 24h gesamt	$3,4 \pm 0,8$	$18,9 \pm 7,8$	*p=0,0474
Nacht	$1,1 \pm 0,3$	$8,9 \pm 3,5$	*p=0,0159
Tag	$2,3 \pm 0,6$	$10 \pm 4,4$	n.s.

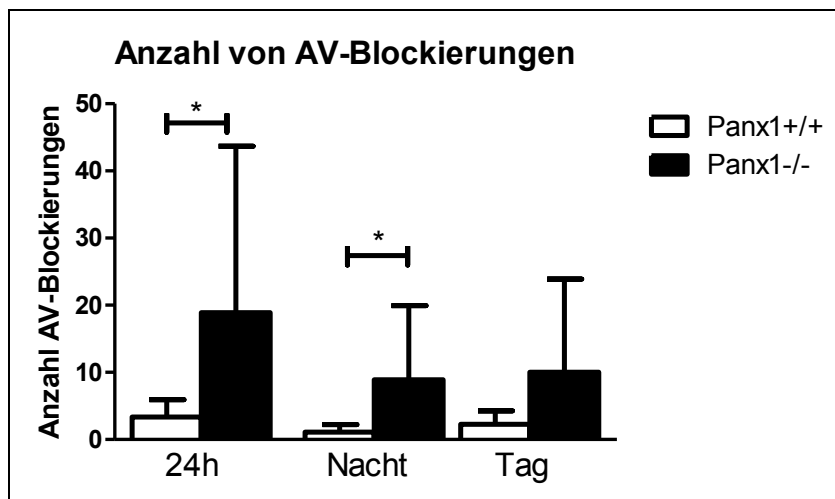


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung von AV-Blockierungen in der Nacht- und Tagesperiode. Die Panx1^{-/-}-Mäuse weisen mehr AV-Blockierungen (*p<0,05) auf

Beide Versuchsgruppen wiesen in der Nacht weniger AV-Blockierungen auf als am Tage. Um zu ermitteln, ob die Tages- oder Nachtzeit die Häufigkeit von AV-Blockierungen beeinflusst, wurden daher innerhalb der Versuchsgruppen die jeweiligen Durchschnittswerte verglichen. Bei beiden Populationen lag kein signifikanter Unterschied vor.

Als Nächstes wurde die HF bei welcher die AV-Blockierung aufgetreten ist, analysiert. Die erhobenen Datenreihen wurden mittels des t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft.

Die durchschnittliche HF während einer AV-Blockierung lag bei den Wildtypen bei $537 \pm 16 \text{ min}^{-1}$ (n=48) und bei den Panx1^{-/-}-Mäusen bei $489 \pm 7 \text{ min}^{-1}$ (n=192). Dieser sehr signifikante Unterschied zeigt, dass bei Panx1^{-/-}-Mäusen AV-Blockierungen bei einer durchschnittlich niedrigeren HF auftreten als bei der Kontrollgruppe (Tabelle 14, Abbildung 15).

Tabelle 14: Durchschnittliche Herzfrequenz beim Vorliegen einer AV-Blockierung

	Panx1 ^{+/+} n=48	Panx1 ^{-/-} n=192	Signifikanz
HF während AV-Blockierung	537 ± 16	489 ± 7	** p=0,0044

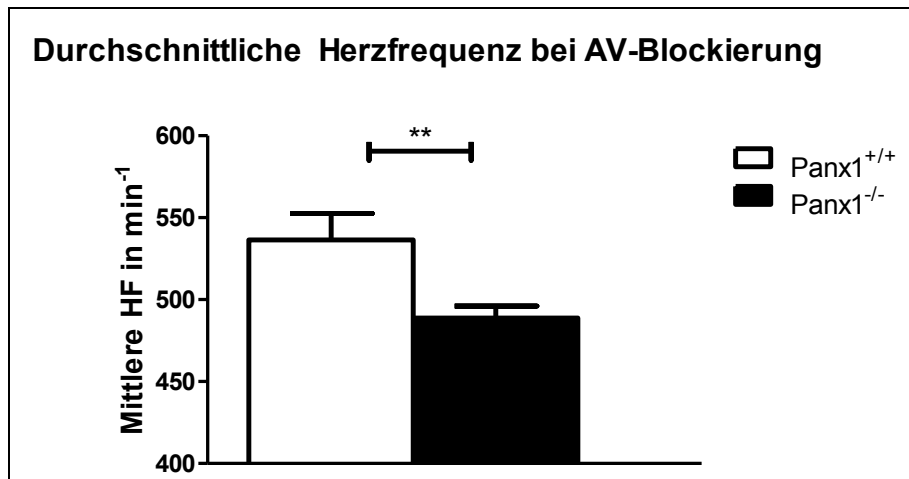


Abbildung 15: Durchschnittliche Herzfrequenz bei Vorliegen einer AV-Blockierung. Die HF ist bei den Panx1^{-/-}-Mäusen niedriger als bei den Wildtypen

Des Weiteren wurde das Herzfrequenzspektrum in Frequenzklassen eingeteilt und eine Häufigkeitsverteilung der AV-Blockierungen erstellt. Dadurch wurde deutlich, dass bei bestimmten Frequenzen eine besonders hohe Wahrscheinlichkeit für eine AV-Blockierung vorliegt.

Anhand dieser Häufigkeitsverteilung (Abbildung 16) ist zu erkennen, dass die Panx1^{-/-}-Mäuse nach einem bestimmten Muster AV-Blockierungen aufwiesen: Bei sehr niedrigen Frequenzen war die Häufigkeit zunächst gering, stieg dann aber auf ein deutliches Maximum von 15 % im Frequenzbereich 401-420 min⁻¹ und fiel anschließend ab. Die größte Wahrscheinlichkeit, dass eine AV-Blockierung entsteht, lag bei der Panx1^{-/-}-Maus also im Bereich von 380-460 min⁻¹. In diesem Bereich liegen insgesamt 34 % aller AV-Blockierungen. Bei der Kontrollgruppe zeigte sich ein anderer Verlauf in der relativen Häufigkeitsverteilung: Hier stieg das Risiko zunächst mit der HF an und fiel dann bei den sehr hohen Frequenzen jedoch wieder auf sehr kleine Risikowerte ab. Das Maximum erreichten die Wildtypen unter Belastung, sodass die meisten AV-Blockierungen im Frequenzbereich von mehr als 680 min⁻¹ auftraten. Diese Verteilung der relativen Häufigkeit spiegelt auch den oben genannten signifikanten Unterschied der durchschnittlichen HF um eine AV-Blockierung wider, bei welcher die Panx1^{-/-}-Mäuse eine niedrigere HF als die Wildtypen zeigten.

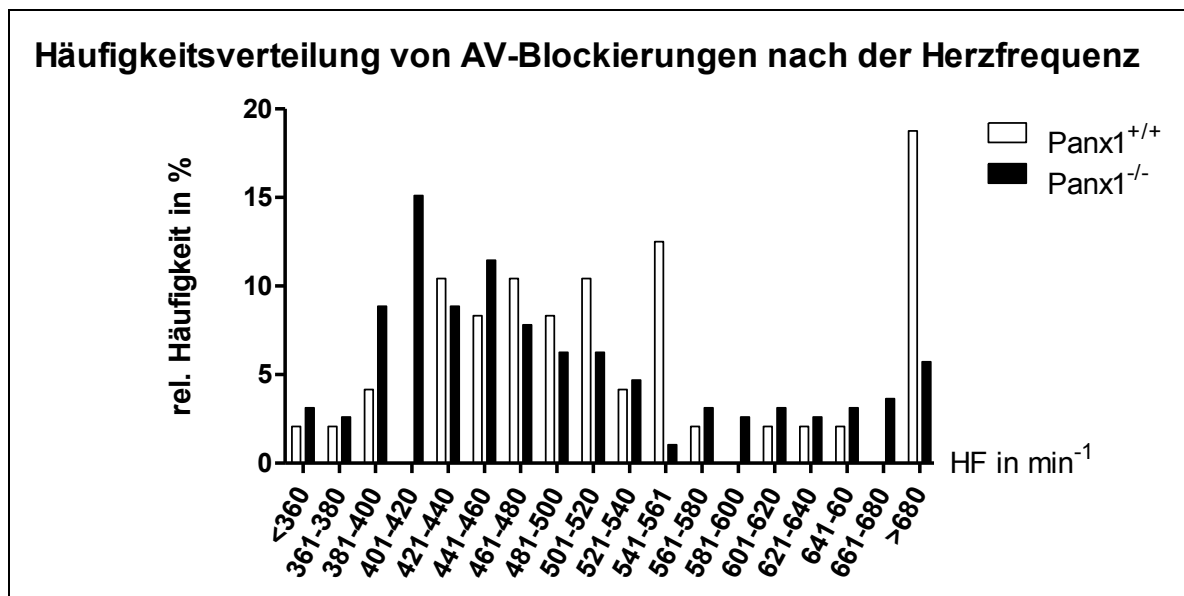


Abbildung 16: Relative Häufigkeit von AV-Blockierungen nach Frequenzklassen. Auf der Y-Achse ist die relative Häufigkeit von AV-Blockierungen als Anteil an allen AV-Blockierungen der Versuchsgruppe aufgezeigt

Bei Betrachtung der Häufigkeitsverteilung fällt auf, dass die Wildtypen 18 % und die Panx1^{-/-}-Mäuse nur 5 % ihrer AV-Blockierungen im Frequenzbereich >680 min⁻¹ zeigen. Nach Aufstellung dieser Daten in einer Vierfeldertafel (Tabelle 15) zeigte sich dieser Unterschied mithilfe des Fisher-Yates-Tests als sehr signifikant (**p=0,0067).

Tabelle 15: Vierfeldertafel der relativen Häufigkeit von AV-Blockierung in der HF-Klasse >680 min⁻¹

	Panx1 ^{+/+}	Panx1 ^{-/-}
Anteil AV-Blockierung HF >680 min⁻¹	18 %	5 %
Anteil AV-Blockierung HF <680 min⁻¹	82 %	95 %
Spaltensummen	100 %	100 %

3.3.2 Auftreten von Extrasystolen

Die Wildtypen wiesen in sieben von elf Fällen mindestens eine Extrasystole auf, insgesamt konnten 15 Extrasystolen in den erhobenen EKGs festgestellt werden. Bei der Untersuchungsgruppe zeigten sieben von zehn Tieren mindestens eine Extrasys-

tole und insgesamt lagen 26 Extrasystolen vor (Tabelle 16), was keinen signifikanten Unterschied darstellte.

Tabelle 16: Häufigkeiten von Extrasystolen ohne Ursprungsdifferenzierung

	Panx1^{+/+}	Panx1^{-/-}
Anteile	7 von 11	6 von 9
Anzahl 24h-EKG	13	24
Anzahl einschließlich Belastungsversuche	15	26

Über den gesamten 24h-Verlauf zeigten die Panx1^{+/+}-Mäuse $1,2 \pm 0,4$ (n=11) und die Panx1^{-/-}-Mäuse $2,7 \pm 1,3$ (n=9) Extrasystolen (ventrikulär und supraventrikulär). In der Nacht waren dies $0,6 \pm 0,2$ (n=11) zu $1,4 \pm 0,7$ (n=9) und am Tage $0,5 \pm 0,2$ (n=11) zu $1,2 \pm 0,7$ (n=9) Extrasystolen. Bei keiner der aufgeführten Häufigkeiten konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Tabelle 17, Abbildung 17).

Tabelle 17: Durchschnittliche Häufigkeit von Extrasystolen

	Panx1^{+/+} n=11	Panx1^{-/-} n=9	Signifikanz
Über 24h gesamt	$1,2 \pm 0,4$	$2,7 \pm 1,3$	n.s.
Nacht	$0,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,7$	n.s.
Tag	$0,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,7$	n.s.

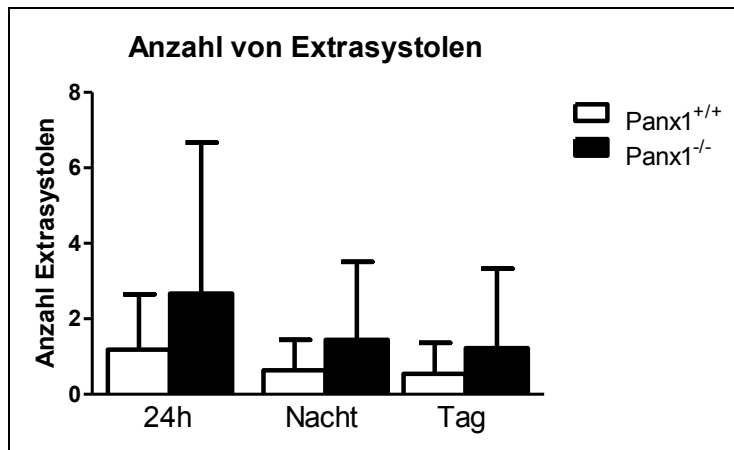


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung von Extrasystolen im 24 Stunden EKG. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachweisbar

Im weiteren Verlauf wurden die Extrasystolen gemäß ihres Ursprungs analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit ventrikulärer Extrasystolen festgestellt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl ventrikulärer Extrasystolen

	Panx1 ^{+/+} n=11	Panx1 ^{-/-} n=9	Signifikanz
Über 24h gesamt	0,5 ± 0,3	1,4 ± 0,7	n.s.
Nacht	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,4	n.s.
Tag	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,4	n.s.

Ebenso wurde die Häufigkeit von Extrasystolen supraventrikulären Ursprungs verglichen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tabelle 19).

Tabelle 19: Durchschnittliche Anzahl supraventrikulärer Extrasystolen

	Panx1 ^{+/+} n=11	Panx1 ^{-/-} n=9	Signifikanz
Über 24h gesamt	0,6 ± 0,4	1,5 ± 0,7	n.s.
Nacht	0,4 ± 0,2 1	0,7 ± 0,4	n.s.
Tag	0,3 ± 0,2 1	0,8 ± 0,4	n.s.

3.4 Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter Belastung

Um das Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter körperlicher Anstrengung zu erheben, wurden Schwimmversuche und Versuche mit Laufbandergometrie durchgeführt. Die hier ermittelten EKGs wurden in die Abschnitte „Vor Belastung“, „Belastung“ und „Erholungsphase“ eingeteilt.

Um zunächst objektiv eine Belastung in den Versuchen nachzuweisen, wurde die durchschnittliche Herzfrequenz vor Belastung mit der maximalen Herzfrequenz unter Belastung verglichen. Bei beiden Versuchsgruppen wurde ein signifikanter Anstieg unter der körperlichen Belastung nachgewiesen (persönliche Mitteilung Tillman Lahres).

3.4.1 AV-Blockierungen und Extrasystolen unter Belastung

Es wurde untersucht, ob unter Belastung Arrhythmien auftreten, indem die Belastungs-EKGs auf Auffälligkeiten geprüft wurden.

In den EKGs der Schwimmversuche trat bei den Wildtypen in fünf von zwölf Fällen mindestens eine AV-Blockierung und bei zwei Mäusen mindestens eine Extrasystole auf. Insgesamt waren dies elf AV-Blockierungen und zwei Extrasystolen. Bei den $Panx1^{-/-}$ -Tieren zeigte im Schwimmversuch eine der sechs Mäuse mindestens eine AV-Blockierung und keines der Tiere eine Extrasystole (Tabelle 20), was keinen signifikanten Unterschied ausmachte.

Tabelle 20: Auftreten von AV-Blockierungen und Extrasystolen im Schwimmversuch

	$Panx1^{+/+}$		$Panx1^{-/-}$	
	AV-Blockierung	Extrasystolen	AV-Blockierung	Extrasystolen
Anteile	5 von 12	2 von 12	1 von 6	0 von 6
Anzahl insgesamt	11	2	2	-

Durchschnittlich zeigte die Kontrollgruppe $0,9 \pm 0,4$ ($n=12$) AV-Blockierungen und $0,2 \pm 0,1$ ($n=12$) Extrasystolen. Die $Panx1^{-/-}$ -Mäuse wiesen $0,2 \pm 0,2$ ($n=6$) AV-

Blockierungen auf. Mithilfe des U-Tests wurden die beiden Populationen verglichen. Hier zeigte sich kein Unterschied im Auftreten der AV-Blockierungen. Die Häufigkeit der Extrasystolen konnte nicht verglichen werden, da die $Panx1^{-/-}$ -Mäuse keinerlei Extrasystolen zeigten und der U-Test bei einer Datenreihe ohne Werte nicht angewendet werden kann (Tabelle 21).

Tabelle 21: Durchschnittliche Anzahl von AV-Blockierungen und Extrasystolen im Schwimmversuch

	$Panx1^{+/+}$ n=12	$Panx1^{-/-}$ n=6	Signifikanz
AV-Blockierung	0,9 ± 0,4	0,2 ± 0,2	n.s.
Extrasystolen	0,2 ± 0,1	-	-

In den EKGs der Laufbandergometrie zeigte keine der $Panx1^{+/+}$ -Mäuse eine AV-Blockierung oder Extrasystole. Bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich in der Laufbandergometrie ohne Steigung bei einem Tier eine AV-Blockierung und bei zwei Tieren jeweils eine Extrasystole. In der Laufbandergometrie mit progressiver Steigung war auch hier keine Arrhythmie zu verzeichnen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Auftreten von AV-Blockierungen und Extrasystolen in der Laufbandergometrie

		$Panx1^{+/+}$		$Panx1^{-/-}$	
		AV-Blockierung	Extrasystolen	AV-Blockierung	Extrasystolen
Gerade	Anteile	0 von 12	0 von 12	1 von 6	2 von 6
	Anzahl gesamt	-	-	1	2
Rampe	Anteile	0 von 12	0 von 12	0 von 6	0 von 6
	Anzahl gesamt	-	-	-	-

Durchschnittlich lagen in der geraden Laufbandergometrie $0,2 \pm 0,2$ (n=6) AV-Blockierungen und $0,2 \pm 0,2$ (n=6) Extrasystolen bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen vor (Tabel-

le 23). Eine Prüfung auf Signifikanz mithilfe des U-Tests war bei Fehlen von Vergleichsdaten nicht möglich.

Tabelle 23: Durchschnittliche Anzahl von AV-Blockierungen und Extrasystolen in der geraden Laufbandergometrie

	Panx1 ^{+/+}	Panx1 ^{-/-} n=6	Signifikanz
AV-Blockierung	-	0,2 ± 0,2	-
Extrasystolen	-	0,3 ± 0,2	-

3.4.2 Vergleich zwischen Häufigkeiten von Herzrhythmusstörungen im Belastungs- und Ruhe-EKG

Um zu prüfen, ob die Versuchstiere unter Ruhebedingungen oder unter Belastung mehr Herzrhythmusstörungen zeigen, wurden die Häufigkeiten von AV-Blockierungen und Extrasystolen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen verglichen. Dazu wurden nur die Werte aus den Schwimmversuchen hinzugenommen, da diese durch ihre standardisierte Länge von 20 Minuten einen objektiven Vergleich ermöglichten. Die Anzahl von AV-Blockierungen und Extrasystolen aus dem Ruhe-EKG wurden durch Division an eine Länge von 20 Minuten angepasst und die Werte mithilfe des Wilcoxon-Tests miteinander verglichen.

AV-Blockierungen

Die Wildtypen zeigen unter Ruhe-Bedingungen $0,05 \pm 0,01$ (n=11) AV-Blockierungen nach Normierung der Anzahl auf 20 Minuten. Unter Belastung sind es $0,9 \pm 0,4$ (n=12), was sich als nicht signifikanter Unterschied erwies. Bei den Panx1^{-/-}-Mäusen waren es unter Ruhe-Bedingungen $0,3 \pm 0,1$ (n=10) AV-Blockierungen und unter Belastung $0,2 \pm 0,2$ (n=6), was ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ausmachte (Tabelle 24).

Tabelle 24: Vergleich der Durchschnittswerte von AV-Blockierungen unter Ruhe- und Belastungsbedingungen normiert auf eine EKG-Länge von 20 Minuten

	Ruhe- Bedingungen	Schwimmversuch	Signifikanz
Panx1^{+/+}	0,05 ± 0,01 n=11	0,9 ± 0,4 n=12	n.s.
Panx1^{-/-}	0,3 ± 0,1 n=10	0,2 ± 0,2 n=6	n.s.

Extrasystolen

In Analogie zu den AV-Blockierungen wurden die gleichen Rechnungen auch mit der Anzahl von Extrasystolen durchgeführt. Bei den Wildtypen traten in 20 Minuten Ruhe durchschnittlich $0,02 \pm 0,01$ (n=11) Extrasystolen und unter Belastung $0,2 \pm 0,1$ (n=12) Extrasystolen auf (n.s.). Bei den Panx1^{-/-}-Mäusen war eine Berechnung nicht möglich, da keine Extrasystolen aus dem Schwimmversuch hervorgingen (Tabelle 25).

Tabelle 25: Vergleich der Durchschnittswerte von Extrasystolen unter Ruhe- und Belastungsbedingungen normiert auf eine EKG-Länge von 20 Minuten

	Ruhe- Bedingungen	Schwimmversuch	Signifikanz
Panx1^{+/+}	0,02 ± 0,01 n=11	0,2 ± 0,1 n=12	n.s.
Panx1^{-/-}	0,04 ± 0,02 n=9	-	-

3.5 Auftreten atrialer Arrhythmien unter Stimulation

Mithilfe eines Oktapolarkatheters wurden atriale *Burststimulationen* an Langendorff-perfundierten Herzen durchgeführt. Im epi- und endokardialen EKG wurde etwaiges atriales Flimmern (AF) nach der Stimulation registriert. Insgesamt wurden 22 Mausherzen für diese Versuche verwendet - bei zwei Herzen waren die EKGs jedoch wegen starker Artefakte nicht verwertbar, sodass diese aus den Analysen ausgeschlossen werden mussten.

Bei den Wildtypen war in einem von acht Fällen ein AF provoziert, bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen in zwei von zwölf Fällen. Mithilfe des Fisher-Yates-Tests wurden die Werte (Tabelle 26) auf Signifikanz geprüft, wobei kein Unterschied nachweisbar war.

Tabelle 26: Absolute Häufigkeiten atrialen Flimmerns nach atrialer Stimulation

	Panx1^{+/+}	Panx1^{-/-}	Zeilensummen
Flimmern	1	2	3
Kein Flimmern	7	10	17
Spaltensummen	n=8	n=12	20

4. Diskussion

Ziel dieses Forschungsprojektes war die Untersuchung der kardialen Funktion der Pannexin-1-Kanäle und im Rahmen der hier vorliegenden Dissertationsschrift schwerpunktmäßig die Analyse ihrer Rolle in Bezug auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen in Holter-EKGs und während Belastungsprotokollen.

4.1 Die Maus als Untersuchungsmodell

4.1.1 Übertragbarkeit des murinen auf das humane EKG

Versuche an Mäusen und insbesondere an *Knock-Out*-Mäusen werden in den letzten Jahren zunehmend als Modelle zum Verständnis kardialer Arrhythmien verwendet [81]. Dadurch stellt sich die Frage, ob die Elektrophysiologie des Mauserzens ausreichend auf die des menschlichen Herzens übertragbar ist.

Prinzipiell weisen das murine und humane Herz den gleichen Aufbau mit vier Kammern und einem identischen Erregungsleitungssystem auf. Des Weiteren sind auch die vorhandenen Ionenkanäle und ihre Ströme beim Aktionspotential (AP) bis auf kleine Unterschiede nahezu gleich [81]. Auch die Erregungsausbreitung ist bei Maus wie bei Mensch vergleichbar und erfolgt von endokardialen zu epikardialen Anteilen des Apex und schließlich zur Herzbasis. Anschließend erfolgt die Repolarisation in umgekehrter Reihenfolge [82].

Im Vergleich zum humanen EKG bestehen beim EKG der Maus aber auch einige Unterschiede, welche bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Zunächst weist das murine Aktionspotential lediglich eine Dauer von weniger als 10 % des APs der humanen Kardiomyozyten auf. Dies liegt im Besonderen an der für die Maus typischen hohen Dichte der schnellen Kaliumkanäle, die eine schnelle Repolarisation bedingen [81]. Diese kurze AP-Dauer ist der Grund für die bei der Maus deutlich höhere Herzfrequenz mit durchschnittlich 350-600 Schlägen pro Minute [83]. Des Weiteren zeigen die murinen EKGs keine deutlich abgrenzbare T-Welle, sondern vielmehr eine „T-Mulde“, welche direkt aus der S-Zacke hervorgeht [84]. Damit existiert keine isoelektrische ST-Strecke, wie man es aus dem humanen EKG kennt.

Der Zeitpunkt des Beginns der Ventrikelrepolarisation wird als J-Punkt angegeben, welcher am Übergang vom QRS-Komplex in das ST-Segment liegt [85]. Bei Mäusen schließt sich an diesen J-Punkt charakteristischerweise eine prominente J-Welle als Ausdruck der schnellen Repolarisation an. Die Zeit vom J-Punkt bis zum Ende der T-Welle kennzeichnet die Dauer der Repolarisation des Ventrikels [86]. Abbildung 18 zeigt die genannten morphologischen Kriterien des Maus-EKGs.

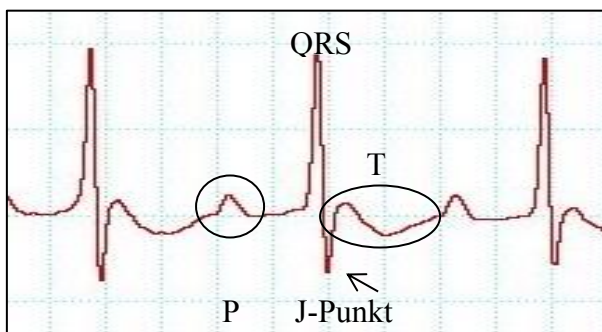


Abbildung 18: Ausschnitt aus einem telemetrischen Maus-EKG (eigene Aufzeichnung). Aus der S-Zacke geht die T-Welle direkt hervor (P=P-Welle, QRS=QRS-Komplex, T=T-Welle)

Als Ursache für den direkten Übergang der T-Welle aus dem QRS-Komplex wird das Fehlen einer vollständigen hohen Plateau-Phase beim Aktionspotential (AP) der Kardiomyozyten der Maus angesehen. Beim atrialen AP zeigt sich hier nach einem steilen Anstieg des Membranpotentials direkt wieder ein steiler Abstieg, beim ventrikulären AP bildet sich nur eine dezente sogenannte Plateau-Schulter aus [87]. Durch das Fehlen der Plateau-Phase repolarisieren einige Zellen bereits, während andere noch depolarisiert werden [82]. Bei Veränderungen des QRS-Komplexes ist es daher nicht eindeutig, ob die Ursache der Veränderung in der Depolarisation oder Repolarisation liegt [81].

In Zusammenschau der übereinstimmenden und der sich unterscheidenden Charakteristika der murinen und der humanen kardialen Elektrophysiologie wird deutlich, dass eine direkte Übertragbarkeit von Maus auf Mensch stets nur mit Bedacht vollzogen werden kann. Für eine gute Übertragbarkeit sprechend existieren jedoch insbesondere bei Versuchen zum Verständnis kardialer Kanalopathien auch Mausmodelle, welche eine nahezu identische Ausprägung des klinischen Phänotyps von humanen Patienten zeigen. So führt zum Beispiel die gezielte Unterbrechung des

KCNQ1-Gens zum klinischen Phänotyp des „Jervell und Lange-Nielsen Syndroms“ mit bilateraler Taubheit und charakteristischen kardialen Manifestationen wie einer veränderten P- und T-Wellen-Morphologie und einer verlängerten QT-Zeit [88, 89]. Des Weiteren ermöglicht der zurückliegende technische Fortschritt eine differenzierte Untersuchung der Funktion des murinen Herzens, sodass hier zahlreiche Parameter der humanen Diagnostik ebenso erhoben werden können und damit der Vergleich erleichtert wird [89].

4.1.2 Pannexine bei der Maus und beim Menschen

Genau wie beim Menschen existieren auch bei der Maus drei Pannexin-Varianten. Das murine Pannexin-1-Gen ist auf Chromosom 9 lokalisiert und genau wie sein humanes Pendant aus fünf Exons und vier Introns aufgebaut. Das kodierte Protein entspricht dem N-terminalen Teil des humanen Pannexin-1-Proteins. Die Pannexin-1 mRNA ist wie auch beim Menschen ubiquitär, wenngleich mit einem disproportionierten Expressionslevel, im Mausgewebe nachweisbar [24]. Bestätigend konnte Pannexin-1 mRNA in weiteren Studien in zahlreichen neuronalen und extraneuronalen Geweben [90] und im Mauserz nachgewiesen werden [5, 6]. Expressionsanalysen unserer Forschungsgruppe bestätigen, dass Pannexin-1 im murinen Herzen exprimiert wird und hier im Besonderen in den atrialen Myozyten. Das Expressionslevel wurde hierbei in Prozent der HPRT (Hypoxanthinphosphoribosyltransferase) angegeben. Hier lag im Vorhof ein Expressionslevel von $72,3 \pm 14 \%$ und im Ventrikel $44,6 \pm 19,5 \%$ ($n=10$) vor (Frau Stella Petric, persönliche Mitteilung).

Bisweilen wurde beim Menschen die Expression von Pannexin in verschiedenen Geweben aufgezeigt [24], eine genaue Expressionsanalyse aus kardialen Biopsien, aus welcher in Analogie zu den Erkenntnissen des Mauserzens die genaue Verteilung der Pannexine hervorgeht, ist bisher jedoch noch nicht erfolgt.

In Studien zum Vergleich der Pannexin-1-Funktionen beim Menschen (hPanx) und bei der Maus (mPanx) konnte nach Transfektion von Säugetierzellen (HEK293-Zellen) mit beiden Pannexin-Varianten gleiche Expressionslevel, Lokalisierungsmuster und funktionelle Eigenschaften in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden [29]. Ein Unterschied war in der Dichte des pannexinabhängigen Flusses, also dem Anteil von Zellen mit Fluss über die Pannexinkanäle, auszumachen – hier zeigte sich

bei den mit mPanx transfizierten Zellen mit 80-85 % ein höherer Anteil mit pannexin-abhängigem Fluss als bei solchen, die mit hPanx transfiziert worden sind (8-35 %) [29].

Sowohl auf genomischer, als auch auf struktureller und funktionaler Ebene weisen die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Pannexine kaum relevante speziesabhängige Unterschiede zwischen Maus und Mensch auf. Um hier noch eine genauere Vergleichbarkeit zu schaffen und auch besonders um die Relevanz der Pannexine bei der kardialen Funktion des Menschen einschätzen zu können, wären Expressionsanalysen der Pannexine aus humanen kardialen Biopsien hilfreich.

4.1.3 Vorteile des transgenen Mausmodells im Vergleich zur pharmakologischen Inhibition der Pannexine

Als pharmakologische Inhibitoren der Pannexine konnten im Besonderen Mefloquin, Carbenoxolon, Probenecid und Flufenamic identifiziert werden [29, 33, 48]. Diese Medikamente hemmen jedoch unspezifisch weitere Kanäle und hier besonders häufig die Connexine. Dadurch können weitere zelluläre Effekte auftreten, die die Ergebnisinterpretation erschweren. Eine spezifischere Wirkung auf die Pannexine ist durch die Inhibition mit shRNA und siRNA zu erreichen [48, 49]. Sowohl die eingesetzten Medikamente, als auch die spezifische Inhibition mittels RNA können jedoch keine vollständige Supprimierung, sondern stets nur eine Reduktion der Pannexinfunktion erreichen. Zudem ist die Dauer der Wirksamkeit dieser Inhibitoren begrenzt, was bei Versuchen berücksichtigt werden muss.

Es wird deutlich, dass eine spezifische und effiziente Blockade der Pannexin-Kanäle durch pharmakologische Intervention *in vivo* nicht praktikabel und bevorzugt *ex vivo* Methoden vorbehalten ist. Mit dem Modell der transgenen Panx1^{-/-}-Maus steht die Möglichkeit zur Verfügung ein absolutes und isoliertes Fehlen des Pannexin-1-Kanals zu untersuchen. Hier muss jedoch stets auch eine mögliche kompensatorische Hochregulierung anderer Proteine bei der Entwicklung bedacht werden. Aus diesem Grund etablieren sich mittlerweile auch verschiedene Ansätze, Gene erst nach Entwicklungsabschluss der Versuchstiere gezielt auszuschalten.

4.2 Diskussion der verwendeten Methoden

4.2.1 Telemetrische EKG-Aufzeichnung

Mit der Methode der telemetrischen EKG-Aufzeichnung können EKGs unter physiologischen Bedingungen, das heißt ohne den Einfluss von psychischem Stress oder einer Sedierung und über einen sehr langen Zeitraum analysiert werden. Daher gilt dies auch als Goldstandard zur Analyse von Herzrhythmusstörungen.

Doch es bestehen selbstverständlich auch Nachteile bei dieser Untersuchungsmethode. Zunächst stellt die Implantationsoperation mit dem damit verbundenen körperlichen und psychischen Stress eine Belastung für die Tiere dar. Postoperative Schmerzen wurden daher ausreichend analgetisch behandelt. Zudem erhielten die Mäuse vorsorglich Glukoseinjektionen, um einen transienten Gewichtsverlust aufzufangen. Die Belastung durch die Operation wirkt sich auch auf die Vitalparameter der Maus aus, sodass hier eine Erholungszeit von zehn Tagen vor Versuchsbeginn empfohlen wird [91]. Daher wurde erst nach Ablauf dieser Zeitspanne mit der Datenermittlung begonnen.

Ein Nachteil bezüglich der Analyse der Telemetrie-EKGs ist das Vorhandensein von Artefakten durch Bewegungen der Maus. Im Gegensatz zu den Oberflächen-EKGs, welche durch die Sedierung und der damit verbundenen Muskelrelaxation nahezu artefaktfrei waren, zeigten die telemetrischen EKGs häufig Artefakte (zum Beispiel wenn sich die Maus putzt), was die Auswertung erschwerte. Je nach Position der Elektroden zeigte sich bei manchen EKGs außerdem ein isoelektrisches Rauschen, wodurch die Bewertung der P-Welle nicht immer eindeutig möglich war. In Ergänzung zu den telemetrischen EKGs wurden in dieser Forschungsgruppe daher Oberflächen-EKGs unter Avertin- und Isofluran- Sedierung aufgezeichnet, in welchen einzelne EKG-Abschnitte wie die P- oder T-Welle genauer beurteilt werden konnten.

4.2.2 Belastungsversuche

Ein großer Vorteil der oben beschriebenen telemetrischen EKG-Aufzeichnung ist die Möglichkeit, EKGs bei der sich frei bewegenden Maus abzuleiten [92]. Dadurch war es uns möglich, die Pannexin-1-Defizienz auch unter Belastungsbedingungen zu un-

tersuchen. Hierbei ist kritisch hervorzuheben, dass manche EKGs durch die starken Bewegungen der Mäuse relativ artefaktreich waren und eine undeutliche Nulllinie aufwiesen. Die genaue Beurteilung einzelner EKG-Abschnitte wie die P- oder T-Welle war daher nicht immer eindeutig. Da sich die R-Zacken jedoch dennoch differenziert abhoben, waren eine Auswertung der Herzfrequenz und auch die Bestimmung von Extrasystolen und AV-Blockierungen jedoch zuverlässig möglich.

4.3 Die funktionelle Relevanz der Pannexine am Herzen

4.3.1 $Panx1^{-/-}$ -Mäuse weisen keine veränderten Körperindizes auf

Um zu untersuchen, ob die Defizienz des Pannexin-1-Kanals zu Veränderungen allgemeiner Parameter wie Körper- und Herzgewicht führt, wurden Herzgewichte, Körpergewichte, Tibialängen und der Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge sowie das prozentuale Herzgewicht am Gesamtkörpergewicht verglichen. Bei keinem der Indizes war ein signifikanter Unterschied nachweisbar. Dies bedeutet, dass das Fehlen des Pannexin-1 Kanals keine Auswirkung auf Größe und Gewicht der Mäuse hat, wie es auch dem Stand der aktuellen Studienlage an Untersuchungen der $Panx1^{-/-}$ -Maus entspricht [30]. Zur funktionellen und strukturellen Beurteilung der Mausherzen wurden im Rahmen dieser Arbeitsgruppe echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Im 2D-Bild konnten keine strukturellen und im M-Mode keine funktionellen Unterschiede festgestellt werden (Stella Petric, persönliche Mitteilung). Zur weiterführenden Beurteilung der Ventrikelstruktur wurden zudem histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Hier wurden die Wanddicken der Herzhohlräume, die Länge der Herzmuskelfasern und der Kerne verglichen und die Schnitte auf Endokard- oder interstitielle Fibrose, Speichersubstanzen oder ein *Disarray* untersucht. Es konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen und ebenfalls kein Nachweis eines *Remodelings* gefunden werden.

Bei transgenen Tieren wird häufig eine geringere Lebenserwartung und Fruchtbarkeit angegeben [93]. Bei den Versuchstieren dieses Forschungsprojektes trat zeitweilig eine schlechte Zuchtausbeute auf, weshalb zur Erhöhung der Versuchstierzahl auch Nicht-Geschwister-Tiere eingekreuzt wurden. Dies wurde auch von der Heidelberger Arbeitsgruppe berichtet, welche die Tiere zur Verfügung gestellt hatte. Bezüglich der

Lebenserwartung der beiden Genotypen ließen sich nach Überprüfung der Zuchtdokumentation keine Auffälligkeiten vermerken.

Zur Quantifizierung der Leistungsfähigkeit beider Genotypen wurden im Zuge dieses Projektes detaillierte Analysen der Belastungsversuche bezüglich Belastbarkeit und Herzfrequenzveränderungen durchgeführt. Hier zeigten die $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäuse eine gleiche körperliche Leistungsfähigkeit wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere.

4.3.2 $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäuse weisen mehr AV-Blockierungen in den Langzeit-EKGs auf

Zur Analyse der Auswirkung der Pannexin-1-Defizienz auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen wurden die telemetrischen EKGs auf Arrhythmien untersucht. Hier zeigten die $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäuse signifikant mehr AV-Blockierungen im gesamten 24h-Stunden-EKG und in der Nachtperiode, also während der Aktivitätsphase der Maus. Es scheint also, dass die Pannexin-1-Defizienz eine negative Auswirkung auf die Reizleitung bedingt.

Ursächlich für das vermehrte Auftreten von AV-Blockierungen bei den $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäusen kommt eine Modifikation des Aktionspotentials im AV-Knoten in Frage. Pannexine nehmen über die Freisetzung von ATP eine Schlüsselposition in der Initiierung und Weiterleitung von Kalziumwellen ein [3]. Durch den Wegfall der Pannexine könnte die Auslösung dieser Kaskade supprimiert und dadurch die Kalziumkonzentration in den Zellen und die Weiterleitung der Kalziumwelle vermindert sein.

Jegliche Veränderung der Kalziumhomöostase kann zu Behinderungen der AV-Überleitung führen [94]. Das Aktionspotential am AV-Knoten wird hauptsächlich durch Kalziumströme evoziert [95], sodass nach pharmakologischer Inhibition [96] oder Deletion der beteiligten Kanäle bei Versuchstieren vermehrt AV-Blockierungen auftreten [97]. Außerdem führt eine geringe intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einem verminderten Fluss und ebenfalls zu vermehrten AV-Blockierungen [94]. Dies könnte daher den Mechanismus der Pannexin-1-Defizienz bei der Begünstigung von AV-Blockierungen darstellen.

Die hier zugrundeliegende Hypothese, dass eine Pannexin-1-Defizienz eine Auswirkung auf die Weiterleitung einer Kalziumwelle zeigt, wurde auch in anderen Studien

an der $Panx1^{-/-}$ -Maus untersucht. Hier konnte in Zellkulturen von $Panx1^{-/-}$ -Cochleazellen jedoch keine Behinderung der Kalziumwelle beobachtet werden [60] und in kultivierten $Panx1^{-/-}$ -Astrozyten war sogar eine Verstärkung der Kalziumwellenausdehnung zu sehen. Als Ursache hierfür nahmen die Forscher eine kompensatorische Hochregulierung von Cx43 an, da die $Panx1^{-/-}$ -Astrozyten eine stärkere „*gap-junctionale*“ Kopplung als die der Wildtyp-Mäuse aufwiesen [38]. Umgekehrt scheint auch bezüglich der Entstehung von AV-Blockierungen eine Supprimierung der Connexine als Ursache eine Rolle zu spielen [94]. Wie einleitend erläutert, sind Pannexine und Connexine gemeinsam an der Weiterleitung der Kalziumwelle beteiligt [3], sodass auch wahrscheinlich ist, dass die Connexine zusammen mit den Pannexinen an der intakten Erregungsweiterleitung im AV-Knoten beteiligt sind. Für zukünftige Projekte wären daher EKG-Analysen bei Mäusen mit pharmakologischer Inhibition oder Deletion beider Kanäle interessant, um eine gegenseitige Kompensation kenntlich zu machen.

Im Gegensatz zur Depolarisation spielen bei der Repolarisation Kaliumströme (durch Kir2.1-Kanäle) eine entscheidende Rolle. In Studien führte eine Supprimierung der Kir2.1 Expression unter anderem zu einer verlängerten Refraktärzeit im His-Bündel, was die Erregungsüberleitung von den Atrien in die Ventrikel verlangsamt und ebenfalls zu einer AV-Blockierung führen kann [94]. Im Normalfall werden Pannexine durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen geöffnet [38] und lassen Kalium entlang des Konzentrationsgradienten nach extrazellulär fließen [30]. Bei fehlenden Pannexinen könnte es also zu einer Verzögerung des Kaliumausstroms bei der Repolarisation kommen und die Überleitung im His-Bündel verlangsamt werden. Im Zuge dieses Forschungsprojektes wurden zur genauen Zeitanalyse detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei traten keinerlei Unterschiede bezüglich der jeweiligen Überleitungszeiten auf (Stella Petric, persönliche Mitteilung).

Um den genauen Einfluss der Pannexin-1-Defizienz auf die Ionenströme beim Aktionspotential der Zellen des AV-Knotens zu quantifizieren, müssten Ionenflussmessungen mittels *Patch-Clamp*-Technik an isolierten Zellen der $Panx1^{-/-}$ -Maus durchgeführt werden. Die Präparation und Isolation der Zellen des Erregungsleitungssystems ist durch die geringe Größe des Mausherzens sehr schwierig, weshalb zunächst auch ventrikuläres Myokard verwendet werden könnte, in welchem eine zum AV-

Knoten identische molekulare Komposition der beteiligten Ionenkanäle gefunden wurde [98].

Übergeordnet wird die Aktivität des AV-Knotens autonom durch das vegetative Nervensystem gesteuert. Pannexin-1 wird ubiquitär exprimiert [2], daher könnte ein Wegfall der Pannexine die Balance zwischen Parasympathikus und Sympathikus verändern. Bei Überwiegen des Parasympathikus wäre zu erwarten, dass nicht nur mehr AV-Blockierungen auftreten, sondern auch allgemein eine niedrigere HF vorliegt, was in der vorliegenden Studie nicht auftrat. Daneben ist die Herzfrequenzvariabilität (HRV) ein Ansatz zur Quantifizierung der autonomen Regulation der Herzaktion, die eine Differenzierung zwischen Sympathikus und Parasympathikus möglich macht [99]. Hier zeigten die $Panx1^{-/-}$ -Mäuse eine signifikant niedrigere *Very Low Frequency* (VLF). Die Bereiche niedriger Frequenzspektren spiegeln den Sympathikus wider. Entsprechend läge hier eine niedrigere Sympathikuswirkung vor, was eine negative Dromotropie bedingen könnte. Da jedoch die anderen Parameter der niedrigen Frequenzintensität keine Unterschiede aufwiesen, ist dieser Rückschluss als fraglich zu betrachten. Um diese Hypothese dahingehend genauer zu untersuchen, wären weitere Analysen bezüglich der Pannexin-1-Expression und -funktion im vegetativen Nervensystem sinnvoll.

Ein weiterer interessanter Punkt bei der Häufigkeit von AV-Blockierungen ist eine größere Heterogenität bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Bei der Auswertung zeigten sich hier stark unterschiedliche Standardabweichungen zwischen den Genotypen. Neben der Beachtung der geringen Stichprobengröße, welche hierfür ursächlich sein kann, könnte sich die Defizienz der Pannexine je nach Konstitution und Alter der Mäuse auch unterschiedlich stark manifestieren. Hinweise hierauf lassen sich auch in der aktuellen Literatur finden [30]: So variiert die Pannexinexpression ja nach Stresslevel, sodass am Herzen eine erhöhte Pannexinexpression und -glykosylierung nach Ischämie beobachtet wurde [7]. Außerdem nimmt die Pannexinexpression zu, wenn man Myozyten in Zellkulturen überführt, wobei diese im zeitlichen Verlauf anschließend auch wieder abnimmt [5]. In Studien zu epileptischen Anfällen bei der $Panx1^{-/-}$ -Maus wiesen ausschließlich junge Tiere ein geringeres Ausmaß der Insulte auf, bei älteren Mäusen war kein Unterschied festzustellen

[63], sodass auch das Alter als Komponente beim Ausmaß der Pannexin-1-Defizienz beachtet werden sollte.

4.3.3 Panx1^{-/-}-Mäuse weisen niedrigere Herzfrequenz während AV-Blockierung auf

Im weiteren Verlauf der Analysen wurde die HF während des Auftretens einer AV-Blockierung ermittelt. Diese war bei den Panx1^{-/-}-Mäusen während einer AV-Blockierung sehr signifikant niedriger und außerdem traten besonders viele der AV-Blockierungen bei niedrigen Frequenzen auf. Die Wildtypen zeigten im Gegensatz dazu besonders bei hohen HF (also während der Belastungsversuche) viele AV-Blockierungen.

Etwas widersprüchlich zu diesem Ergebnis steht, dass während der Tageszeit (Ruhephase der Tiere) kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von AV-Blockierungen vorlag. Dies wäre zu erwarten gewesen, da die Mäuse während ihrer Ruhezeit eine niedrigere HF zeigen als während der Aktivitätszeit. Durchschnittlich zeigten die Wildtypen während des Tages $2,3 \pm 0,6$ (n=11) AV-Blockierungen und die Panx1^{-/-}-Mäuse $10 \pm 4,4$ (n=10). Es wird bei Begutachtung der Werte deutlich, dass auch hier die Panx1^{-/-}-Mäuse mehr AV-Blockierungen zeigen. Bei der Signifikanzprüfung mithilfe des U-Tests ergab sich hier ein p-Wert von 0,0743, was vermuten lässt, dass bei einer höheren Stichprobengröße auch hier ein signifikanter Unterschied herausstellbar wäre.

Aufgrund der Tatsache, dass die Panx1^{-/-}-Mäuse besonders bei niedrigen HF viele AV-Blockierungen zeigen und umgekehrt auch eine niedrigere HF während einer AV-Blockierung aufweisen, könnte das vermehrte Auftreten von AV-Blockierungen im Umkehrschluss auch durch eine dauerhaft niedrigere HF bei den Panx1^{-/-}-Mäusen bedingt sein. Die durchschnittliche HF der Panx1^{-/-}-Mäuse lag jedoch stets etwas über der der Wildtypen. Dies bedeutet, dass die Panx1^{-/-}-Mäuse einen Bereich der HF zeigen, in welcher das Auftreten einer AV-Blockierung eher unwahrscheinlich ist und erst bei niedrigeren Frequenzen ein höheres Risiko für eine AV-Blockierung aufweisen. Für potentielle Patienten mit einer Pannexin-1-Defizienz würde dies bedeuten, dass diese zum Beispiel besonders im Schlaf oder unter frequenzsenkender Medikation ein hohes und unter Belastungssituationen eher ein niedrigeres Risiko für

AV-Blockierungen aufweisen würden. Es wäre für Projekte in der Zukunft interessant, Versuche unter frequenzsenkender Medikation, beispielsweise durch β -Blocker durchzuführen. Dadurch könnte man die durchschnittliche HF der Versuchstiere in den Bereich des hohen Risikos für AV-Blockierungen senken und ebenfalls die Häufigkeit von AV-Blockierungen untersuchen.

Unter Belastung zeigen die $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäuse in Analogie dazu besonders wenige AV-Blockierungen. Das bedeutet, dass die Auswirkung der Pannexin-1-Defizienz auf das Aktionspotential des AV-Knotens bei hohen Frequenzen weniger ins Gewicht fällt als bei niedrigen. Genau wie beim Menschen ist das murine Aktionspotential in seiner Dauer frequenzangepasst [87]. Ursächlich für die Verkürzung bei hohen Herzfrequenzen wird ein vermehrter Kaliumausstrom angesehen, der ein schnelleres Erreichen des Ruhemembranpotentials ermöglicht [100]. Sollte eine Pannexin-1-Defizienz zu veränderten Strömungsverhältnissen des Kaliums führen, wäre es möglich, dass die Hochregulierung des Kaliumausstroms unter hohen Frequenzen dies ausgleicht, sodass der Verlust der Pannexine als Kaliumkanäle nicht mehr manifest wird. Zur Beantwortung dieser Frage wären Ableitungen monophasischer Aktionspotentiale (MAP) in Abhängigkeit von der Herzfrequenz aufschlussreich. Dies wäre zum Beispiel am explantierten Langendorff-perfundierten Herzen möglich, wo ebenfalls eine Frequenzabhängigkeit des Aktionspotentials auf die Herzfrequenz nachgewiesen werden konnte [101]. Die Herzfrequenz könnte hierbei durch Stimulation mittels Katheter vorgegeben werden und die Aktionspotentiale mit ansteigender Frequenz mittels MAP-Elektroden abgeleitet werden.

Umgekehrt zu den $\text{Panx1}^{-/-}$ -Mäusen zeigen die Wildtypen sehr viele ihrer AV-Blockierungen bei sehr hohen Frequenzen. Dies könnte eventuell durch die Induzierbarkeit von AV-Blockierungen durch ATP erklärt werden. Patienten reagierten in Studien nach ATP-Bolus-Injektionen mit paroxysmalen AV-Blockierungen und Synkopen bei ansonsten normalem EKG [102]. Pannexine setzen ATP in den Extrazellularraum frei [3, 16, 20]. Man kann vermuten, dass die bei den Wildtypen voll funktionsfähigen Pannexine unter Stressbedingungen möglicherweise verstärkt ATP freisetzen und dadurch vermehrt die AV-Blockierungen auftreten.

4.3.4 Panx1^{-/-}-Mäuse weisen keine vermehrte Häufigkeit von Extrasystolen auf

Extrasystolen entstehen durch gesteigerte Automatie bei einem positiveren Ruhemembranpotential oder durch getriggerte Aktivität durch frühe oder späte Nachdepolarisationen [103]. Für eine Vielzahl von Ionenkanälen gibt es Hinweise, dass bei Funktionsverlust Nachdepolarisationen begünstigt werden, sodass auch die Pannexin-1-Defizienz hier eine Rolle spielen könnte. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Panx1^{-/-}-Mäuse jedoch nicht mehr Extrasystolen als die Wildtypen. Damit scheint sich die Pannexin-1-Defizienz nicht modifizierend auf die Automatie oder Aktivität bei der Reizentstehung auszuwirken.

4.3.5 Panx1^{-/-}-Mäuse weisen kein atriales Flimmern unter Stimulation *in vitro*, wohl aber *in vivo* auf

In den Versuchen am Langendorff-perfundierten Herzen konnte kein signifikant häufigeres Auftreten atrialen Flimmerns bei Panx1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Versuchen unserer Forschungsgruppe *in vivo*, in welchen bei sieben von acht der Panx1^{-/-}-Mäuse selbstlimitierendes AF nach *Burst-stimulation* auftrat (Stella Petric, persönliche Mitteilung). Im Folgenden wird zunächst grundlegend auf die Frage eingegangen, ob eine Pannexin-1-defizienz ein atriales Flimmern begünstigen könnte und im weiteren Verlauf Gründe für die vorliegende Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsmodellen diskutiert.

4.3.5.1 Kann die Pannexin-1-Defizienz das pathophysiologische Korrelat atrialen Flimmerns darstellen?

Atriales Flimmern wird durch Veränderungen der Vorhofstruktur oder des Aktionspotentials der atrialen Myozyten begünstigt [70, 75]. Die Pannexin-1-Defizienz könnte über verschiedene Mechanismen die Struktur der Vorhöfe verändern. Zunächst zeigen die Panx1^{-/-}-Mäuse signifikant mehr AV-Blockierungen als die Wildtypen, was über die hämodynamische Belastung des Herzens zu einem strukturellen *Remodeling* führen kann. Dieses Phänomen wurde in Studien an Rattenherzen nach evozierter AV-Blockierung kürzlich quantifiziert [104], wobei in unseren Studien verhältnismäßig wenig AV-Blockierungen vorliegen, sodass dieser Punkt eher einen theoretischen

schen Aspekt darstellt. Auch über einen erhöhten Blutdruck kann es zu Umbauprozessen des Myokards kommen. Im Gefäßsystem sind Pannexine-1 an der Tonusregulation beteiligt, sodass bei Defizienz der Pannexine eine kardiale Mehrbelastung möglich wäre, welche eine Fibrosierung bedingt [55]. Über Veränderungen der Leitungseigenschaften des Vorhofmyokards wird bei strukturellen Änderungen der Vorhofarchitektur atriales Flimmern bei der Maus wie beim Menschen begünstigt [68].

Einen möglichen Hinweis auf eine stattgehabte Strukturveränderung der Vorhöfe der $Panx1^{-/-}$ -Mäuse können Veränderungen der P-Welle geben. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurden die genauen Zeiten und Ausmaße einzelner EKG-Abschnitte analysiert. In den telemetrischen EKGs fand sich hier eine signifikant höhere P-Amplitude bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen.

Neben strukturellen Veränderungen könnte die Pannexin-1-Defizienz auch die Dauer des Aktionspotentials verändern, wodurch ebenfalls eine erhöhte Flimmerbereitschaft bestehen kann [77]. Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards der Maus weist zunächst einen durch einen Natriumeinstrom bedingten steilen Anstieg, anschließend eine schnelle Repolarisation durch einen schnellen Kaliumausstrom und schließlich die weitere Repolarisation durch langsame Kaliumströme auf [87]. Beim ventrikulären Myokard ist zudem ein Kalziueinstrom mitbeteiligt [105]. Hinweise, dass das Fehlen des Pannexin-1-Kanals das Aktionspotential verlängert, fanden sich im Rahmen dieses Forschungsprojektes in der QT-Zeit-Analyse in den erhobenen EKGs. Sowohl in den telemetrischen als auch in Oberflächen-EKGs unter Isofluran- und Avertin-Sedierung wurde eine hochsignifikant verlängerte QT- und QT_c -Zeit festgestellt.

4.3.5.2 Ursachen für eine fehlende Induzierbarkeit atrialen Flimmerns *in vitro*

Am explantierten Herzen war die Stimulierbarkeit atrialen Flimmerns, wie es in der EPU aufgetreten war, nicht reproduzierbar. Dies kann zum einen an der übergeordneten Regulation der kardialen Funktion *in vivo* und zum anderen an methodenassoziierten Limitationen liegen.

Das autonome Nervensystem nimmt über eine Vielzahl adrenerger und cholinergere Bahnen eine zentrale Position in der Steuerung der Herzfunktion ein [106]. Pannexin-

1 wird neuronal exprimiert, sodass es möglich ist, dass das atriale Flimmern *in vivo* durch vegetative Übererregung der Vorhofzellen evoziert wurde. Beim Menschen sind neuronale Mechanismen bezüglich der kardialen Arrhythmogenese eine anerkannte Pathogenese und es ist bekannt, dass eine Imbalance zwischen Parasympathikus und Sympathikus durch Hyperinnervation oder bei strukturellen Veränderungen durch verschiedene Erkrankungen Vorhofflimmern begünstigt [106]. Auch bei Mäusen existieren Studien zur Untersuchung des Beitrags des autonomen Nervensystems an der kardialen Arrhythmogenese. So konnten stress-induzierte Arrhythmien, eine verminderte *Heart-Rate-Variability* und insgesamt eine erhöhte Mortalität bei Mäusen mit Deletion des neuronalen Transkriptionsfaktors *Nh1h1* nachgewiesen werden. Bei den Tieren waren keine primär kardialen strukturellen Schäden oder Leitungsanomalien vorliegend, welche anderweitig die Arrhythmien hätten erklären können, sodass von einer direkten Beteiligung des autonomen Nervensystems ausgegangen wurde [107].

Zur Beurteilung der Auswirkung des autonomen Nervensystems auf die kardiale Funktion wurde im Zuge dieses Forschungsprojektes die *Heart-Rate-Variability* bei beiden Genotypen untersucht, wobei isoliert eine geringere *Very Low Frequency* bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen vorlag. Da bei den anderen Parametern dieses Frequenzspektrums jedoch keine Unterschiede auftraten, ist es fraglich, ob dieses Einzelergebnis auf eine niedrigere Sympathikus-Wirkung bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen schließen lässt. Zudem spräche eine niedrigere Sympathikuswirkung eher gegen eine neuronale Genese des Vorhofflimmerns, da hier vermutlich vorrangig eine erniedrigte Parasympathikuswirkung ausschlaggebend wäre, wie es in der Studie an der *Nh1h1*-defizienten Maus herausgearbeitet wurde [107].

Ein anderer Ansatz zur Erklärung der Diskrepanz zwischen den *in vivo* und *in vitro* Versuchen ist die Annahme, dass das Atriale Flimmern doch primär kardial bedingt ist, jedoch durch die Versuchsumstände in der Langendorff-Apparatur nicht reproduzierbar war.

Ein sehr wichtiger Aspekt stellt hier die Perfusion des Herzens mittels Krebs-Henseleit-Puffer dar. Dieser enthält keine Aminosäuren und weist daher einen deutlich niedrigeren onkotischen Druck als das Mausblut auf, wodurch es zu einer öde-

matösen Anschwellung der Myozyten kommt [108]. Zudem ist die Sauerstoffbindungskapazität vermindert [109], sodass es trotz optimaler Vorbereitung der Anlage, schneller Herzpräparation und -fixierung unvermeidbar zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion durch Minderversorgung kommt [110]. Als Zeichen des Versuchs der Gegenregulation ist die Perfusionsrate der kardialen Gefäße im Langendorff-perfundierten Herz stets höher als *in vivo* [111]. Des Weiteren enthält der Puffer eine erhöhte Kalziumkonzentration, die die Kardiomyozyten in einen hyperkontraktilen Zustand versetzt [109]. Sollte also das *in vivo* induzierte atriale Flimmern bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen aufgrund verminderter intrazellulärer Kalziumkonzentrationen zustande gekommen sein, könnte die hohe Kalziumkonzentration im Puffer diesen Effekt also ausgeglichen haben. Umgekehrt könnte dies für potentielle Patienten mit Vorhofflimmern durch Pannexin-1-Defizienz eine Therapierbarkeit des Vorhofflimmerns mit Kalzium darstellen.

Aufgrund dieser Probleme wird deutlich, dass die Methode des Langendorff-perfundierten Herzens auch Nachteile mit sich bringt. Neben den genannten Puffer-assoziierten Problemen ist hierbei außerdem eine größere Entfernung zur klinischen Relevanz zu nennen, da hier das Herz nur isoliert betrachtet wird [110]. Diesbezüglich muss die Induzierbarkeit des Vorhofflimmerns *in vivo* also mit einer höheren Aussagekraft für die funktionelle Auswirkung der Pannexin-1-Defizienz betrachtet werden.

4.4 Ausblick

Ziel dieses Forschungsprojektes stellt die kardiale Phänotypisierung der *Panx1^{-/-}*-Maus und als Schwerpunkt dieser Dissertation die Analyse von Herzrhythmusstörungen dar. Als Kernergebnisse der Arbeitsgruppe konnten eine Induzierbarkeit atrialen Flimmerns *in vivo* und eine verlängerte QT- und QTc-Zeit sowie als Grundlage der vorliegenden Arbeit ein vermehrtes Auftreten von AV-Blockierungen herausgearbeitet werden. Vermutlich liegen diesen Pathologien Veränderungen beim Aktionspotential der Myozyten der *Panx1^{-/-}*-Maus vor.

Für das weitere Verständnis der Auswirkung der Pannexin-1-Defizienz wären Messungen der monophasischen Aktionspotentiale zur genaueren Beurteilung der Depo-

larisations- und Repolarisationsveränderungen erforderlich. Dies wäre zum Beispiel am Langendorff-perfundierten Herzen möglich. Zur Eruiierung des ionalen Flusses beim Aktionspotential der *Panx1*^{-/-}-Mäuse wären zudem *Patch-Clamp*-Untersuchungen an isolierten Myozyten eine optimale Ergänzung. Aufbauend darauf könnten Pannexine eventuell auch als Angriffspunkt für antiarrhythmische Medikamente fungieren.

Die erhobenen AV-Blockierungen traten besonders bei niedrigen Herzfrequenzen auf. Um hier die weitere klinische Relevanz der Pannexin-1-Defizienz zu ermitteln, wären für die Zukunft EKG-Aufzeichnungen unter frequenzsenkender Medikation, beispielsweise durch β -Blocker sinnvoll. Zudem sollte die Funktion der Pannexine im autonomen Nervensystem genauer untersucht werden, was neben den AV-Blockierungen auch für das Auftreten atrialen Flimmerns eine entscheidende Komponente darstellen kann. Um zudem eine bessere Übertragbarkeit von der Maus auf den Menschen zu gewährleisten, wären Analysen der humanen kardialen Expression der Pannexine, zum Beispiel durch bioptisch gewonnenes Material, sehr wichtig.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes tragen zum weiteren Verständnis der Pannexin-Funktion bei und liefern Ansätze für weitere Untersuchungen an diesen Membranproteinen. Bei den mannigfaltigen Beteiligungen der Pannexine an verschiedensten Prozessen und den hierbei mitspielenden Regulations- und Kompensationsmechanismen bleibt es für die Zukunft spannend, welche weiteren Funktionen die Familie der Pannexine im Kontext des Organismus einnimmt.

5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien der Genotypisierung.....	20
Tabelle 2: Verwendete Transmittertypen und Detergenzien zur Aufbereitung	22
Tabelle 3: Verwendete Materialien bei der operativen Transmitterimplantation.....	25
Tabelle 4: Verwendete Materialien bei der Aufzeichnung der telemetrischen EKGs	26
Tabelle 5: Verwendete Materialien bei den Belastungsversuchen.....	30
Tabelle 6: Verwendete Materialien bei der Organentnahme und bei den gravimetrischen Messungen.....	31
Tabelle 7: Verwendete Materialien bei der Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers.....	33
Tabelle 8: Verwendete Materialien bei den Stimulationsversuchen am Langendorff-perfundierten Herzen	35
Tabelle 9: Verwendete Software zur statistischen Analyse	37
Tabelle 10: Messwerte der erhobenen Körperparameter.....	38
Tabelle 11: Durchschnittliche Herzfrequenz der Versuchsgruppen unter physiologischen Bedingungen	39
Tabelle 12: Häufigkeiten von AV-Blockierungen in Ruhe und insgesamt.....	40
Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Häufigkeit von AV-Blockierungen II° ..	40
Tabelle 14: Durchschnittliche Herzfrequenz beim Vorliegen einer AV-Blockierung	41
Tabelle 15: Vierfeldertafel der relativen Häufigkeit von AV-Blockierung in der HF-Klasse $>680 \text{ min}^{-1}$	43
Tabelle 16: Häufigkeiten von Extrasystolen ohne Ursprungsdifferenzierung.....	44
Tabelle 17: Durchschnittliche Häufigkeit von Extrasystolen	44
Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl ventrikulärer Extrasystolen	45
Tabelle 19: Durchschnittliche Anzahl supraventrikulärer Extrasystolen	45
Tabelle 20: Auftreten von AV-Blockierungen und Extrasystolen im Schwimmversuch	46

Tabelle 21: Durchschnittliche Anzahl von AV-Blockierungen und Extrasystolen im Schwimmversuch	47
Tabelle 22: Auftreten von AV-Blockierungen und Extrasystolen in der Laufbandergometrie	47
Tabelle 23: Durchschnittliche Anzahl von AV-Blockierungen und Extrasystolen in der geraden Laufbandergometrie	48
Tabelle 24: Vergleich der Durchschnittswerte von AV-Blockierungen unter Ruhe- und Belastungsbedingungen normiert auf eine EKG-Länge von 20 Minuten.....	49
Tabelle 25: Vergleich der Durchschnittswerte von Extrasystolen unter Ruhe- und Belastungsbedingungen normiert auf eine EKG-Länge von 20 Minuten.....	49
Tabelle 26: Absolute Häufigkeiten atrialen Flimmerns nach atrialer Stimulation	50

6. Abbildungssverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Pannexin-1-Kanals (angelehnt an die Darstellung von MacVicar et al. (2010) [27])	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der extrazellulären Wirkung von ATP über purinerge Rezeptoren und Pannexine-1. Darstellung angelehnt an Locovei et al. 2006 [3].....	6
Abbildung 3: Herstellung der Pannexin-1- <i>Knockout</i> Maus. Schematische Darstellung des Pannexin-1 Genlokus der Wildtypen (<i>Px1 WT allele</i>), des Target-Vektors (<i>Targeting construct</i>), das Pannexin-1-Gen der <i>Knockout</i> -Mäuse (mit integriertem Vektor, <i>Px1 KO (+Neo) allele</i>) und selbiges nach Exzision der Neomycinkassette (<i>Px1 KO allele</i>) (Abbildung aus Bargiotas et al., 2011 [46])	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primeranbindung bei den beiden Genotypen.....	19
Abbildung 5: Beispiel des Bandenmusters nach Abschluss der Gelelektrophorese mit Zuordnung der Genotypen.....	20
Abbildung 6: Fotografie des Transmittermodells ETA F10 zur subkutanen Implantation. Die Elektroden können nach Bedarf gekürzt werden (Fotografie des Herstellers DSI®).....	22
Abbildung 7: Operationsschritte während der Transmitterimplantation. a) Positionierung des subkutanen Transmitters in der zuvor präparierten Hauttasche; b) Zur Positionierung der Elektroden werden subkutan stumpf präparierte Kanäle geschaffen und die Haut an der geplanten Fixationsstelle mit einer Schere eröffnet; c) Nach Abschluss der Implantation sind lediglich die Bauch- und Brustnähte sowie die Hautklammern zu sehen	24
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Aufzeichnung der EKGs. Das <i>Powerlab</i> digitalisiert das Signal und sendet es an das Programm <i>Labchart</i> ®	26
Abbildung 9: AV-Blockierung Typ II b im murinen EKG. Auf eine P-Welle (Markierung) folgt kein QRS-Komplex wie bei den vorherigen und nachfolgenden Erregungen	27
Abbildung 10: Ventrikuläre Extrasystole im murinen EKG. Ohne sichtbare vorangehende P-Welle tritt ein morphologisch verbreiteter QRS-Komplex auf.....	28
Abbildung 11: Supraventrikuläre Extrasystole im murinen EKG. Die zu früh auftretende P-Welle (Markierung) löst einen elektrophysiologisch intakten QRS-Komplex aus	28
Abbildung 12: Fotografie der Langendorff Apparatur Typ 844 IH-SR der Firma Hugo Sachs®. Im Zentrum steht die Herzkammer, in welcher das explantierte Herz perfundiert wird	32

Abbildung 13: Detailaufnahme des fixierten Herzens in der Herzkammer	34
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung von AV-Blockierungen in der Nacht- und Tagesperiode. Die Panx1 ^{-/-} -Mäuse weisen mehr AV-Blockierungen (*p<0,05) auf	41
Abbildung 15: Durchschnittliche Herzfrequenz bei Vorliegen einer AV-Blockierung. Die HF ist bei den Panx1 ^{-/-} -Mäusen niedriger als bei den Wildtypen.....	42
Abbildung 16: Relative Häufigkeit von AV-Blockierungen nach Frequenzklassen. Auf der Y-Achse ist die relative Häufigkeit von AV-Blockierungen als Anteil an allen AV-Blockierungen der Versuchsgruppe aufgezeigt.....	43
Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung von Extrasystolen im 24 Stunden EKG. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachweisbar	45
Abbildung 18: Ausschnitt aus einem telemetrischen Maus-EKG (eigene Aufzeichnung). Aus der S-Zacke geht die T-Welle direkt hervor (P=P-Welle, QRS=QRS-Komplex, T=T-Welle).....	52

7. Literaturverzeichnis

1. Dahl, G. and R.W. Keane, *Pannexin: from discovery to bedside in 11+/-4 years?* Brain Res, **2012**. **1487**: p. 150-9.
2. Sosinsky, G.E., et al., *Pannexin channels are not gap junction hemichannels*. Channels (Austin), **2011**. **5**(3): p. 193-7.
3. Locovei, S., J. Wang, and G. Dahl, *Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium*. FEBS Lett, **2006**. **580**(1): p. 239-44.
4. Locovei, S., et al., *Pannexin-1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex*. FEBS Lett, **2007**. **581**(3): p. 483-8.
5. Kienitz, M.C., et al., *Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes*. J Biol Chem, **2011**. **286**(1): p. 290-8.
6. Nishida, M., et al., *P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis*. EMBO J, **2008**. **27**(23): p. 3104-15.
7. Dolmatova, E., et al., *Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, **2012**. **303**(10): p. H1208-18.
8. Vessey, D.A., L. Li, and M. Kelley, *P2X7 receptor agonists pre- and postcondition the heart against ischemia-reperfusion injury by opening pannexin-1/P2X(7) channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, **2011**. **301**(3): p. H881-7.
9. Billaud, M., et al., *Pannexin-1 regulates alpha1-adrenergic receptor-Mediated vasoconstriction*. Circ Res, 2011. **109**(1): p. 80-5.
10. Zhang, M., et al., *P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP*. J Physiol, **2012**. **590**(Pt 17): p. 4335-50.
11. Psychrembel, *Klinisches Wörterbuch*. Vol. 261. Auflage. **2007**: deGruyter.
12. Sarkozy, A. and P. Brugada, *Sudden cardiac death and inherited arrhythmia syndromes*. J Cardiovasc Electrophysiol, **2005**. **16** Suppl 1: p. S8-20.
13. Kim, J.B., *Channelopathies*. Korean J Pediatr, **2014**. **57**(1): p. 1-18.
14. Amin, A.S., H.L. Tan, and A.A. Wilde, *Cardiac ion channels in health and disease*. Heart Rhythm, **2010**. **7**(1): p. 117-26.
15. Panchin, Y., et al., *A ubiquitous family of putative gap junction molecules*. Curr Biol, **2000**. **10**(13): p. R473-4.
16. Bao, L., S. Locovei, and G. Dahl, *Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP*. FEBS Lett, **2004**. **572**(1-3): p. 65-8.
17. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor*. EMBO J, **2006**. **25**(21): p. 5071-82.

18. Shestopalov, V.I. and Y. Panchin, *Pannexins and gap junction protein diversity*. Cell Mol Life Sci, **2008**. **65**(3): p. 376-94.
19. Bruzzone, R., et al., *Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2003**. **100**(23): p. 13644-9.
20. Locovei, S., L. Bao, and G. Dahl, *Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2006**. **103**(20): p. 7655-9.
21. Ransford, G.A., et al., *Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia*. Am J Respir Cell Mol Biol, **2009**. **41**(5): p. 525-34.
22. Boassa, D., et al., *Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins*. Cell Commun Adhes, **2008**. **15**(1): p. 119-32.
23. Luo, K. and M.W. Turnbull, *Characterization of nonjunctional hemichannels in caterpillar cells*. J Insect Sci, **2011**. **11**: p. 6.
24. Baranova, A., et al., *The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins*. Genomics, **2004**. **83**(4): p. 706-16.
25. Wicki-Stordeur, L.E., et al., *Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation*. Neural Dev, **2012**. **7**: p. 11.
26. Penuela, S., et al., *Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization*. Mol Biol Cell, **2009**. **20**(20): p. 4313-23.
27. MacVicar, B.A. and R.J. Thompson, *Non-junction functions of pannexin-1 channels*. Trends Neurosci, **2010**. **33**(2): p. 93-102.
28. Boassa, D., et al., *Pannexin-1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane*. J Biol Chem, **2007**. **282**(43): p. 31733-43.
29. Ma, W., et al., *Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells*. J Pharmacol Exp Ther, **2009**. **328**(2): p. 409-18.
30. Bond, S.R. and C.C. Naus, *The pannexins: past and present*. Front Physiol, **2014**. **5**: p. 58.
31. Bruzzone, R., et al., *Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes*. J Neurochem, **2005**. **92**(5): p. 1033-43.
32. Penuela, S., et al., *Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins*. J Cell Sci, **2007**. **120**(Pt 21): p. 3772-83.
33. Silverman, W.R., et al., *The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes*. J Biol Chem, **2009**. **284**(27): p. 18143-51.
34. Chekeni, F.B., et al., *Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis*. Nature, **2010**. **467**(7317): p. 863-7.
35. Bunse, S., et al., *The potassium channel subunit Kvbeta3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials*. FEBS J, **2009**. **276**(21): p. 6258-70.
36. Samuels, S.E., et al., *Arachidonic acid closes innexin/pannexin channels and thereby inhibits microglia cell movement to a nerve injury*. Dev Neurobiol, **2013**. **73**(8): p. 621-31.

37. Zhan, H., et al., *Stomatin inhibits pannexin-1-mediated whole-cell currents by interacting with its carboxyl terminal*. PLoS One, **2012**. **7**(6): p. e39489.
38. Suadicani, S.O., et al., *ATP signaling is deficient in cultured Pannexin-1-null mouse astrocytes*. Glia, **2012**. **60**(7): p. 1106-16.
39. Li, W., et al., *Carbenoxolone blocks endotoxin-induced PKR activation and HMGB1 release*. Mol Med, **2013**.
40. Ma, W., et al., *Pannexin 1 forms an anion-selective channel*. Pflugers Arch, **2012**. **463**(4): p. 585-92.
41. Dourado, M., E. Wong, and D.H. Hackos, *Pannexin-1 is blocked by its C-terminus through a delocalized non-specific interaction surface*. PLoS One, **2014**. **9**(6): p. e99596.
42. Dahl, G. and S. Locovei, *Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?* IUBMB Life, **2006**. **58**(7): p. 409-19.
43. Guthrie, P.B., et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. J Neurosci, **1999**. **19**(2): p. 520-8.
44. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, **2002**. **82**(4): p. 1013-67.
45. Thompson, R.J. and B.A. Macvicar, *Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes*. Channels (Austin), **2008**. **2**(2): p. 81-6.
46. Bargiotas, P., et al., *Functional outcome of pannexin-deficient mice after cerebral ischemia*. Channels (Austin), **2012**. **6**(6): p. 453-6.
47. Gulbransen, B.D., et al., *Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis*. Nat Med, **2012**. **18**(4): p. 600-4.
48. Iglesias, R., et al., *P2X7 receptor-Pannexin-1 complex: pharmacology and signaling*. Am J Physiol Cell Physiol, **2008**. **295**(3): p. C752-60.
49. Thompson, R.J., et al., *Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus*. Science, **2008**. **322**(5907): p. 1555-9.
50. Mechmann, S. and L. Pott, *Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes*. Nature, **1986**. **319**(6054): p. 597-9.
51. Zhang, Y.A., et al., *Caffeine-activated large-conductance plasma membrane cation channels in cardiac myocytes: characteristics and significance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, **2007**. **293**(4): p. H2448-61.
52. Vessey, D.A., L. Li, and M. Kelley, *Ischemic preconditioning requires opening of pannexin-1/P2X(7) channels not only during preconditioning but again after index ischemia at full reperfusion*. Mol Cell Biochem, **2011**. **351**(1-2): p. 77-84.
53. Bergfeld, G.R. and T. Forrester, *Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia*. Cardiovasc Res, **1992**. **26**(1): p. 40-7.
54. Burnstock, G., *Control of vascular tone by purines and pyrimidines*. Br J Pharmacol, **2010**. **161**(3): p. 527-9.

-
55. Billaud, M., J.K. Sandilos, and B.E. Isakson, *Pannexin 1 in the regulation of vascular tone*. Trends Cardiovasc Med, **2012**. **22**(3): p. 68-72.
 56. Müller, S., Aigner, *Typen gentechnisch veränderter Tiere*. Fachinformation aus dem Ausschuss für Genetik und Labortierzucht, **2012**.
 57. Capecchi, M.R., *The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting*. Trends Genet, **1989**. **5**(3): p. 70-6.
 58. Gassmann, M. and T. Hennet, *From Genetically Altered Mice to Integrative Physiology*. News Physiol Sci, **1998**. **13**: p. 53-57.
 59. J, S., *Transgene Tiere*. **2006**: Springer Verlag: 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage.
 60. Anselmi, F., et al., *ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2008**. **105**(48): p. 18770-5.
 61. Kranz, K., et al., *Expression of Pannexin-1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knockout*. J Comp Neurol, **2013**. **521**(5): p. 1119-35.
 62. Penuela, S., R. Gehi, and D.W. Laird, *The biochemistry and function of pannexin channels*. Biochim Biophys Acta, **2013**. **1828**(1): p. 15-22.
 63. Santiago, M.F., et al., *Targeting Pannexin-1 improves seizure outcome*. PLoS One, **2011**. **6**(9): p. e25178.
 64. Prochnow, N., et al., *Pannexin-1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning*. PLoS One, **2012**. **7**(12): p. e51767.
 65. Kurtenbach, S., et al., *Investigation of olfactory function in a Panx1 knock out mouse model*. Front Cell Neurosci, **2014**. **8**: p. 266.
 66. Seminario-Vidal, L., et al., *Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia*. J Biol Chem, **2011**. **286**(30): p. 26277-86.
 67. Berul, C.I., et al., *In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse*. Circulation, **1996**. **94**(10): p. 2641-8.
 68. Schotten, U., et al., *Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal*. Physiol Rev, **2011**. **91**(1): p. 265-325.
 69. Schrickel, J.W., et al., *Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing*. Basic Res Cardiol, **2002**. **97**(6): p. 452-60.
 70. Vaidya, D., et al., *Reentry and fibrillation in the mouse heart. A challenge to the critical mass hypothesis*. Circ Res, **1999**. **85**(2): p. 174-81.
 71. Verheule, S., et al., *Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1*. Circ Res, **2004**. **94**(11): p. 1458-65.
 72. Hong, C.S., et al., *Cardiac remodeling and atrial fibrillation in transgenic mice overexpressing junctin*. FASEB J, **2002**. **16**(10): p. 1310-2.

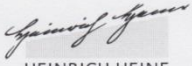
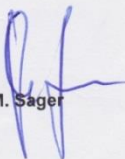
73. Xiao, H.D., et al., *Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death*. *Am J Pathol*, **2004**. **165**(3): p. 1019-32.
74. Saba, S., et al., *Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α* . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2005**. **289**(4): p. H1456-67.
75. Kovoov, P., et al., *Evaluation of the role of I(KACh) in atrial fibrillation using a mouse knockout model*. *J Am Coll Cardiol*, **2001**. **37**(8): p. 2136-43.
76. Li, J., M. McLerie, and A.N. Lopatin, *Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2004**. **287**(6): p. H2790-802.
77. Li, N., et al., *Ablation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation*. *J Physiol*, **2009**. **587**(Pt 5): p. 1087-100.
78. Kirchhoff, S., et al., *Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice*. *Curr Biol*, **1998**. **8**(5): p. 299-302.
79. Weiß, *Basiswissen medizinische Statistik*. Vol. 4. Auflage. **2008**: Springer-Verlag.
80. Bortz, L., *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*. Vol. 3. Auflage. **2008**: Springer.
81. London, B., *Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **2001**. **12**(9): p. 1089-91.
82. Liu, G., et al., *In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave*. *J Physiol*, **2004**. **555**(Pt 1): p. 267-79.
83. Ewringmann, G., *Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus*
2008: Enke-Verlag.
84. Goldberg, A.N., et al., *Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects*. *Cardiovasc Res*, **1968**. **2**(1): p. 93-9.
85. Gussak, I., et al., *ECG phenomenon called the J wave. History, pathophysiology, and clinical significance*. *J Electrocardiol*, **1995**. **28**(1): p. 49-58.
86. Gussak, I., et al., *Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights*. *J Electrocardiol*, **2000**. **33**(2): p. 159-70.
87. Knollmann, B.C., et al., *Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2007**. **292**(1): p. H614-21.
88. Casimiro, M.C., et al., *Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**. **98**(5): p. 2526-31.
89. Charpentier, F., S. Demolombe, and D. Escande, *Cardiac channelopathies: from men to mice*. *Ann Med*, **2004**. **36** Suppl 1: p. 28-34.

90. Ray, A., et al., *Site-specific and developmental expression of Pannexin-1 in the mouse nervous system*. Eur J Neurosci, **2005**. **21**(12): p. 3277-90.
91. Thireau, J., et al., *Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide*. Exp Physiol, **2008**. **93**(1): p. 83-94.
92. Kramer, K., et al., *Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice*. J Pharmacol Toxicol Methods, **1993**. **30**(4): p. 209-15.
93. Löllgen, *Neue Methoden in der kardialen Funktionsdiagnostik – Herzfrequenzvariabilität*. Deutsches Ärzteblatt, **1999**.
94. Zhang, Y., et al., *Overexpression of microRNA-1 causes atrioventricular block in rodents*. Int J Biol Sci, **2013**. **9**(5): p. 455-62.
95. Gilmour, R.F., Jr. and D.P. Zipes, *Slow inward current and cardiac arrhythmias*. Am J Cardiol, **1985**. **55**(3): p. 89B-101B.
96. Mesirca, P., A.G. Torrente, and M.E. Mangoni, *T-type channels in the sino-atrial and atrioventricular pacemaker mechanism*. Pflugers Arch, **2014**. **466**(4): p. 791-9.
97. Zhang, Q., et al., *Expression and roles of Cav1.3 (alpha1D) L-type Ca(2)+ channel in atrioventricular node automaticity*. J Mol Cell Cardiol, **2011**. **50**(1): p. 194-202.
98. Hancox, J.C. and J.S. Mitcheson, *Ion channel and exchange currents in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node*. Can J Cardiol, **1997**. **13**(12): p. 1175-82.
99. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie*. 7. Auflage ed. **2009**: Springer-Verlag.
100. Noble, D., et al., *Improved guinea-pig ventricular cell model incorporating a diadic space, IKr and IKs, and length- and tension-dependent processes*. Can J Cardiol, **1998**. **14**(1): p. 123-34.
101. Fabritz, L., et al., *Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKPQ SCN5A (long QT3) mice*. Cardiovasc Res, **2003**. **57**(4): p. 1085-93.
102. Blanc, J.J. and C. Le Dauphin, *Syncope associated with documented paroxysmal atrioventricular block reproduced by adenosine 5' triphosphate injection*. Europace, 2013.
103. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie*. Vol. 7. Auflage. **2009**: Springer-Verlag.
104. da Cunha, D.N., et al., *Acute and chronic observations of complete atrioventricular block in rats*. Lab Anim, **2014**. **48**(3): p. 237-249.
105. Nerbonne, J.M., et al., *Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here?* Circ Res, **2001**. **89**(11): p. 944-56.
106. Chen, P.S., et al., *Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy*. Circ Res, **2014**. **114**(9): p. 1500-15.
107. Cogliati, T., et al., *Predisposition to arrhythmia and autonomic dysfunction in Nhlh1-deficient mice*. Mol Cell Biol, **2002**. **22**(14): p. 4977-83.
108. Vogel, W.M., A.W. Cerel, and C.S. Apstein, *Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran*. J Mol Cell Cardiol, **1986**. **18**(12): p. 1207-18.

-
109. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2012**. **303**(2): p. H156-67.
 110. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, **2011**. **50**(6): p. 940-50.
 111. Bratkovsky, S., et al., *Measurement of coronary flow reserve in isolated hearts from mice*. *Acta Physiol Scand*, **2004**. **181**(2): p. 167-72.

8. Anhang

8.1 Übungsschein über die Teilnahme an der Versuchstierkunde

<p>Universitätsklinikum Düsseldorf</p>	 HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
<p><u>Übungsschein</u></p>	<p>Tierversuchsanlage</p>
<p>Lisa Girgenrath Kinderkardiologie geb. am: 16.11.1988 in: Köln</p>	<p>Komm. Leiter PD Dr. med. vet. Martin Sager Fachtierarzt für Versuchstierkunde und Chirurgie Tel.: 0211 81 14400 / -60 e-mail: martin.sager@med.uni-duesseldorf.de</p>
<p>hat an der versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes mit Erfolg teilgenommen. Den Teilnehmern werden in 40 Stunden theoretische Kenntnisse und praktische Fähigkeiten auf dem Gebiet der Versuchstierkunde vermittelt.</p>	<p>stellv. Leiter PD Dr. rer.nat. W. Peter M. Benten Tel.: 0211 81 14433 e-mail: peter.benten@med.uni-duesseldorf.de</p>
<p>Allg. Kurseinführung; Entwicklung des Tierschutzgedankens; Tierschutzgesetz, Verordnungen, (Alters-, Geschlechtsbestimmung) Einführung in die Versuchstierkunde (Markierung von Versuchstieren) Gesundheitsüberwachung von Versuchstierhaltungen (Probenentnahme; Gefahrstoffe, Abwasser) Narkose (am Beispiel kleiner Nager); sachgerechter Umgang mit Narkotika Belastung im Tierversuch; Schmerztherapie Statistische Grundbegriffe und Verfahren Vergl. Anatomie und Physiologie ausgewählter Versuchstiere (Skelett und Gelenke, Verdauungssystem, Medikamente) Führung durch die Tierversuchsanlage Ersatz- und Ergänzungsmethoden Antragsverfahren, Meldeverordnung Tierspezifische Übungen: Umgang mit kleinen Nagern (Maus, Ratte) (Zucht und Genetik, Haltung, Fütterung, Verhalten, Handling, Gesundheitszustand; Vaginalabstrich, Applikation und Probenentnahme; Euthanasie) Transgene Tiere Immunisierung; Umgang mit Kaninchen, Meerschweinchen, Hühnern (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitszustand; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie) Umgang mit Hund, Katze, Schwein (theor.) (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitskontrolle; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)</p>	<p>Sekretariat Barbara Theis Petra Boldt Tel.: 0211 81 14400 / -02 Fax: 0211 81 14403 e-mail: tva@uni-duesseldorf.de</p>
<p>Düsseldorf, den 11.02.2011</p>	<p>Dr. M. Sager </p>
	<p>Dozenten: PD Dr. Martin Sager Dr. Eva Engelhardt PD Dr. Peter Benten Dr. Bärbel Peter Dr. Evalotta Sehrig-Lovén Dr. Dieter Halner Prof. Dr. Martin Rosenbruch</p>

Danksagung

Ich möchte meinem Ehemann, meiner Familie und meinen Freunden für jegliche Unterstützung danken, die mir geholfen hat, diese nun fertige Arbeit auch fertig zu stellen. Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Birgit Donner. Durch Ihre so sympathisch herzliche und zugleich zielstrebige Art denke ich sehr gerne an die hinter dieser Arbeit steckende Zeit zurück und bin stolz unter Ihrem Namen promovieren zu dürfen. Ein großer Dank gilt hier ebenfalls unserer gesamten Arbeitsgruppe - Frau Stella Petric, Herrn Tillman Lahres und Frau Carina van Weßel. Mit euch zusammenzuarbeiten hat wirklich Spaß gemacht und hat das Projekt gemeinschaftlich bereichert! Für hilfreiche Unterstützung bei der Umsetzung diverser Versuche danke ich zudem dem gesamten Team der Tierversuchsanlage Düsseldorf und dem kardiologischen Versuchslabor der Kinderklinik Düsseldorf, Herrn Lukas Clasen und Frau Sofia Klein sowie dem Team des Instituts für Physiologie der Universität Düsseldorf.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer fremden Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname