

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

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Kardiale Phänotypisierung der
Pannexin-1-defizienten Knockout-Maus

Dissertation

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

vorgelegt von
Tillman Lahres
2017

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Birgit Donner

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Hisaki Makimoto

Zusammenfassung

Pannexin-1 ist ein neu entdecktes Glykoprotein, das in der Zelle als Membrankanal vielfältige Funktionen erfüllt. Der Kanal wird im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert und ist unselektiv permeabel für Nukleotide wie ATP. Das Protein ist sowohl an zahlreichen physiologischen als auch pathologischen Prozessen beteiligt. Pannexin-1 interagiert in der Zellmembran mit Purinrezeptoren und spielt eine wichtige Rolle bei der parakrinen Kommunikation im Zellverbund. Es ist involviert in wichtige Regulationsprozesse des Körpers wie Vasokonstriktion und Vasodilatation, unspezifischer Immunabwehr und Zelloptose. Im Herz ist der Kanal verantwortlich für eine Aktivierung von Fibroblasten und damit für eine potentiell pathologische Entwicklung einer Herzfibrose.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Pannexin-1-Defizienz auf den kardialen Phänotyp der Maus untersucht. Dazu wurden Pannexin-1-defiziente Knockout-Mäuse gezüchtet und deren Phänotyp mit dem von Wildtypmäusen verglichen. Insgesamt 29 Mäusen wurden in Operationen unter Inhalationsnarkose telemetrische Transmitter in das Abdomen implantiert, die eine Aufzeichnung von Elektrokardiogrammen ermöglichten. Es wurden die Herzfrequenzen, die Herzfrequenzvariabilität und leistungsphysiologische Parameter untersucht. Die Elektrokardiogramme wurden in Ruhe über 24 Stunden und während unterschiedlichen Belastungsversuchen aufgezeichnet.

Um die Auswirkungen einer submaximalen Belastung auf die Elektrophysiologie zu untersuchen, wurde mit den Tieren ein Schwimmversuch durchgeführt. In zwei Laufbandversuchen wurde zudem die maximale Leistungsgrenze der Tiere erreicht und miteinander verglichen.

Bei den Auswertungen zeigten sich bei der Untersuchung der Herzfrequenzen und der Leistungsphysiologie keine signifikanten Unterschiede zwischen Panx1-Knock-Mäusen und Wildtypen. Bei der Herzfrequenzvariabilität ergaben sich signifikante Unterschiede in der *Very Low Frequency*, was für eine Neigung zu Herzrhythmusstörungen und für eine erhöhte kardiale Vulnerabilität sprechen könnte. In weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe konnte die Anfälligkeit für Herzrhythmusstörungen bewiesen werden. Daher kann zusammengefasst festgestellt werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz Auswirkungen auf die Erregungsleitung und Erregungsausbreitung im Herzen der Maus hat und Anomalien des Herzrhythmus in Form von AV-Blockierungen begünstigt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bpm	Beats per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
EKG	Elektrokardiogramm
ES	Embryonale Stammzellen
HCL	Chlorwasserstoff
HF	High Frequency
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Hz	Hertz
IVC	Individually ventilated cage
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
l	Liter
LED	Light emitting diode
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
LF	Low Frequency
min	Minuten
mV	Millivolt
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
Panx	Pannexin
Ps	Pikosiemens
r-MSSD	Root mean square of successive differences
s	Sekunden
SDNN	Standard deviation of NN-intervals
std	Stunden
T	Transmitter
US	United States
USB	Universal serial bus

VLF Very Low Frequency
WT Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Überblick	1
1.2 Die Familie der Pannexine.....	1
1.3 Molekulare Struktur der Pannexine	2
1.4 Expression der Pannexine	3
1.4.1 Pannexin-1	3
1.4.2 Pannexin-2	3
1.4.3 Pannexin-3	4
1.5 Physiologie des Pannexin-1-Kanals	4
1.5.1 Pannexin-1, ein Gap Junction-Protein?.....	4
1.5.2 Permeabilität von Pannexin-1 für ATP.....	5
1.5.3 ATP-induzierte ATP-Freisetzung durch den Purinrezeptor P2Y ..	5
1.5.4 Aktivierung durch zytoplasmatisches Calcium	6
1.5.5 Reaktion auf mechanischen Stress.....	6
1.5.6 Blockade durch Probenecid	6
1.6 Funktionen des Pannexin-1-Kanals	7
1.6.1 Parakrine Signalweiterleitung durch Calciumwellen.....	7
1.6.2 Vasodilatation und Vasokonstriktion.....	8
1.6.3 Apoptose und Immunabwehr	8
1.7 Spezifische Funktionen von Pannexin-1 im Herz	9
1.7.1 Aktivierung von Fibroblasten	9
1.7.2 Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung	9
1.8 Die Knockout-Maus.....	10
1.9 Das Elektrokardiogramm der Maus.....	11
1.10 Die Herzfrequenzvariabilität.....	12
1.10.1 Frequency Domain Analysis.....	13
1.10.2 Time Domain Analysis	15
1.11 Der Belastungsversuch bei der Maus.....	16
1.12 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Panx ^{-/-} Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse	18
2.1.2 Zucht	18
2.1.3 Transmitter	19
2.1.4 Geräte und Instrumente.....	19
2.1.5 Medikamente.....	20

2.1.6	Software	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Implantation des Transmitters.....	21
2.2.2	Operationsnachsorge.....	22
2.2.3	Ableitung des EKG-Signals.....	25
2.2.4	24-Stunden-Elektrokardiogramm-Telemetrie.....	25
2.2.5	Schwimmversuch.....	26
2.2.6	Laufbandversuch.....	26
2.2.7	Auswertung der Elektrokardiogramme.....	28
2.3	Statistik	32
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	Ergebnisse der Analyse der 24-Stunden-EKGs.....	34
3.1.1	Herzfrequenzanalyse.....	34
3.1.2	Herzfrequenzvariabilitätsanalyse.....	35
3.2	Ergebnisse der Analyse der Schwimmversuche.....	37
3.3	Ergebnisse der Analyse der Laufbandversuche.....	41
3.3.1	Laufband ohne Steigung.....	41
3.3.2	Laufband mit Steigung.....	44
3.4	Kontextrelevante Ergebnisse der Arbeitsgruppe.....	46
4.	Diskussion.....	48
4.1	Diskussion der Herzfrequenzanalyse.....	48
4.1.1	Diskussion der Methodik der Herzfrequenzanalyse.....	48
4.1.2	Diskussion der Ergebnisse der Herzfrequenzanalyse.....	49
4.2	Diskussion der Herzfrequenzvariabilität.....	51
4.2.1	Diskussion der Methodik der Herzfrequenzvariabilitätsanalyse.....	52
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Herzfrequenzvariabilitätsanalyse.....	54
4.3	Diskussion der Belastungsversuche.....	55
4.3.1	Diskussion der Methodik der Belastungsversuche.....	56
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse der Belastungsversuche.....	56
4.4	Limitationen und methodische Einschränkungen.....	59
4.4.1	Erholungszeit nach Operation.....	59
4.4.2	Gewicht und Lage des Transmitters.....	60
4.4.3	Schwimmversuch.....	61
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	61

5. Tabellenverzeichnis	62
6. Abbildungsverzeichnis.....	64
7. Literaturverzeichnis	66

1. Einleitung

1.1 Überblick

Transmembranproteine spielen im Herzen des Menschen eine zentrale Rolle. Sie durchspannen die Lipiddoppelschicht der Zellen und haben jeweils spezifische Funktionen sowohl für die Zelle selbst als auch für die Kommunikation im Zellverbund. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Ionenkanälen und Gap Junctions beeinflussen maßgeblich die strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften des Herzens. Ein Funktionsverlust dieser Proteine, beispielsweise durch Mutation, hat oftmals pathologische Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Zahlreiche Krankheiten werden verursacht durch fehlerhafte oder fehlende Transmembranproteine, wie beispielsweise der Komplex der Long-QT-Syndrome oder das Brugada-Syndrom (Kaufenstein et al. 2009).

Über die genaue Funktion des Großteils der Membranproteine ist nur sehr wenig bekannt. Im Gegensatz dazu erzielen jedoch etwa 60 % der rezeptpflichtigen Pharmaka ihre Wirkung direkt oder indirekt über Plasmamembranproteine (Mäntele 2012). Die Untersuchung der Funktionen spezifischer Membranproteine im Tiermodell kann einen Beitrag dazu leisten, ein umfassendes Verständnis der physiologischen sowie biochemischen Prozesse zu erlangen. Diese Kenntnisse sind wiederum die Grundlage für die Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten und eröffnen damit neue Perspektiven und Handlungsspielräume in der Medizin.

1.2 Die Familie der Pannexine

Die Pannexine sind eine Gruppe neu entdeckter Glykoproteine, die strukturelle sowie funktionelle Ähnlichkeiten mit den Connexinen teilen. Über die funktionellen Eigenschaften der Pannexine ist derzeit wenig bekannt (Locovei et al. 2006a; Boassa et al. 2007). Ebenso wie die Connexine haben Pannexine die Fähigkeit, die interzelluläre Kommunikation zu beeinflussen. Pannexine können als Oligomere Membrankanäle durch die Phospholipidmembran der Zellen bilden und erfüllen diverse Funktionen im menschlichen Körper. Die Familie der Pannexine besteht aus drei verschiedenen Unterarten, die mit Panx1, Panx2 und Panx3 bezeichnet werden (Penuela et al. 2013).

Betrachtet man neben der funktionellen auch die genetische Ebene, so weisen die Pannexine keine Homologie mit den Connexinen auf. Stattdessen zeigt ihre DNA-Sequenz große Ähnlichkeit mit den Innexinen, welche Gap Junctions in Invertebraten bilden (Locovei et al. 2006a). Im Genom der Mammalia wurden die Pannexine zuerst im Jahr 2000 erwähnt. Panchin et al. beschrieben zur Jahrtausendwende erstmals eine zweite Proteinfamilie mit junktionalen (verbindenden) Funktionen in der Zelle zusätzlich zu den bereits bekannten Connexinen. Die Arbeitsgruppe suchte im menschlichen Genom nach Abschnitten auf der DNA, die der Sequenz der Innexine in Invertebraten ähnlich waren und entdeckte so die Familie der Pannexine (Panchin et al. 2000). Dem neu entdeckten Membranprotein wurde der Name „*Pannexin*“ gegeben. Der Name setzt sich zusammen aus dem lateinischen Präfix „*pan*“ für „alles, allumfassend“ und dem lateinischen Wort „*nexus*“ für „Verknüpfung“ und wurde gewählt aufgrund des ubiquitären Vorkommens des Proteins in Säugetieren (Panchin et al. 2000).

1.3 Molekulare Struktur der Pannexine

Auf molekularer Ebene durchspannen die Pannexine als Transmembranproteine mit einer Aminosäurenkette die Phospholipidmembran. Die Pannexine bestehen aus vier transmembranösen Helices, zwei extrazellulären und einem intrazellulären Loop. In der Abfolge der Aminosäuren zeigen der Carboxy- sowie der Amino-Terminus in das Zytoplasma der Zelle. Panx1 besteht aus 426 Aminosäuren, Panx2 aus 677 Aminosäuren und Panx3 aus 392 Aminosäuren (D'hondt et al. 2009). Analog zu den Connexinen sind beim Pannexin-1 sechs Untereinheiten nötig, um als Hexamer einen funktionsfähigen Kanal bilden zu können. Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass Pannexin-2 sich nicht als Hexamere sondern als Heptamere oder Octomere verbinden (Ambrosi et al. 2010). Die Anzahl der Monomere im Pannexin-3-Kanal ist noch nicht erforscht. Oligomere von Pannexinen werden einheitlich als Pannexone bezeichnet, analog zu der Nomenklatur der Connexine, welche als Oligomere Connexone genannt werden. Die sechs Untereinheiten von Panx1 bilden zusammen einen nicht-selektiven Membrankanal, der sowohl für positive, als auch für negativ geladene Moleküle mit einer Größe bis zu 1 kDa permeabel ist (Boassa et al. 2007; Bao et al. 2004).

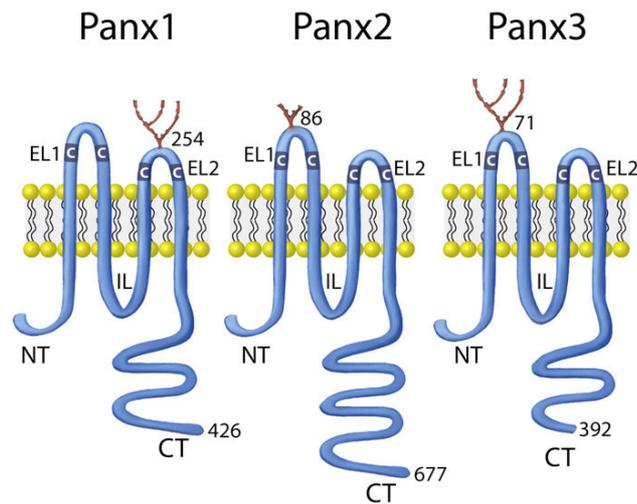


Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Struktur der Pannexine

Die Proteine bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren (Panx1 426, Panx2 677, Panx3 392) und sind eingebettet in die Phospholipidmembran. An einem der extrazellulären Loops (EL) befindet sich jeweils eine Kohlenhydratkette. Der Carboxy-Terminus (CT) und der Amino-Terminus (NT) zeigen in das Zytoplasma der Zelle (aus Penuela et al. 2013).

1.4 Expression der Pannexine

1.4.1 Pannexin-1

Northern Blot-Analysen haben gezeigt, dass Pannexin-1 im menschlichen Gewebe ubiquitär exprimiert wird. Die mRNA des Panx1-Gens wurde in Gewebeproben aus dem zentralen Nervensystem, Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Haut, Hoden, Ovar, Plazenta, Thymus, Prostata, Lunge, Leber, Dünndarm, Pankreas, Milz, Endothel und aus Erythrozyten nachgewiesen (Baranova et al. 2004). Vogt et al. haben gezeigt, dass Pannexin-1 auch im embryonalen Gewebe von Ratten hochexprimiert ist, die Expression in der Entwicklung zum adulten Tier jedoch abnimmt (Vogt et al. 2005).

1.4.2 Pannexin-2

Pannexin-2 ist vor allem in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems exprimiert. Das Transkript des Pannexin-2-Gens wurde gefunden im Cerebellum, im zerebralen Cortex, im Putamen, in der Medulla oblongata sowie im Frontal- und Temporallappen (Penuela et al. 2013). Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass Pannexin-2-mRNA schon im pränatalen Gehirn von Ratten vorhanden ist und die Expression in der postnatalen Entwicklung weiter ansteigt (Vogt et al. 2005).

1.4.3 Pannexin-3

Pannexin-3 ist in Osteoblasten, synovialen Fibroblasten und im Knorpel des Innenohrs vorhanden (Penuela et al. 2013). Außerdem wurde gezeigt, dass Pannexin-3 sowohl die Differenzierung von Keratinozyten in der Haut unterstützt, als auch die Proliferation und anschließende Differenzierung von Keratinozyten im Knorpelgewebe reguliert (Iwamoto et al. 2010; Celetti et al. 2010).

1.5 Physiologie des Pannexin-1-Kanals

Die Physiologie der Pannexin-1-Membrankanäle ist noch weitestgehend unerforscht, jedoch beschäftigt sich aktuell eine Vielzahl von experimentellen Studien mit den spezifischen Eigenschaften des Pannexin-1-Kanals in den unterschiedlichen Geweben.

1.5.1 Pannexin-1, ein Gap Junction-Protein?

Aufgrund der Ähnlichkeit in der Topologie mit den Connexonen war bis 2003 die gängige wissenschaftliche Meinung, dass Pannexone sich an der interzellulären Kommunikation durch Bildung von Gap Junctions beteiligen (Bruzzone et al. 2003). Nach eingehender Untersuchung der Pannexine im letzten Jahrzehnt wird nach derzeitigem Kenntnisstand jedoch angenommen, dass Pannexone überwiegend eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum spielen (Sosinsky et al. 2011). Durch Transport von Molekülen wie ATP über die Membran interagieren sie mit dem Extrazellulärraum. In der gegenwärtigen Literatur ist man sich uneinig, ob und in wie weit Pannexine überhaupt zur Bildung interzellulärer Gap Junctions fähig sind. Viele neuere Forschungsergebnisse sprechen gegen eine Rolle von Pannexin-1 in der direkten interzellulären Kommunikation. So wird Pannexin-1 unter anderem auch in Erythrozyten exprimiert, die keine Gap Junctions ausbilden (Locovei et al. 2006a). Pannexin-1 wurde in polaren Zellen des Respirationsepithels ausschließlich an der apikalen Membran der Zelle gefunden, welche an der direkten interzellulären Kommunikation keinen Anteil hat (Ransford et al. 2009). Des Weiteren sind Pannexine im Gegensatz zu Connexinen Glykoproteine. Es wird angenommen, dass die Kohlenhydratkette die Verbindung zweier Pannexone stereochemisch erschwert und somit die Ausbildung eines funktionsfähigen, interzellulären Kanals, ähnlich dem von gepaarten Connexonen, verhindert. Es gibt bis heute keinen *in vivo* Beweis, dass Pannexin-1 einen interzellulären Kanal analog zu den Connexinen bildet (Penuela et al. 2013; Sosinsky et al. 2011).

1.5.2 Permeabilität von Pannexin-1 für ATP

Der von sechs Pannexinen gebildete Membrankanal gehört zu den größten des menschlichen Körpers. Durch den Pannexin-Kanal können Moleküle mit einer Gesamtgröße bis zu 1 kDa passieren. Unter dem Ruhemembranpotential liegt er im geschlossenen Zustand vor, bei Depolarisation öffnet sich der Kanal. Der Pannexin-1-Kanal hat eine maximale Leitfähigkeit von 500 pS und kann mindestens fünf verschiedene Öffnungsstadien einnehmen. Neben der vollständigen Öffnung können Zustände mit 5%, 25%, 30% und 90% der maximalen Leitfähigkeit unterschieden werden (Bao et al. 2004).

Um die Permeabilität des Kanals für größere Moleküle und Second Messenger zu untersuchen, haben Bao et al. im Jahr 2004 die Durchflussmenge von ATP über dem Pannexin-1-Kanal durch Biolumineszenz gemessen. Dabei wurde in den untersuchten Oozyten eine erhöhte Flussrate von ATP vom Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum während des depolarisierten Zustands der Zelle gefunden (Bao et al. 2004). Diese Erkenntnisse bewiesen erstmals, dass Pannexin-1 permeabel für große Moleküle wie Adenosintriphosphat (ATP) und andere Second Messenger ist. Damit ist eine Rolle der Pannexine bei der Kommunikation und Interaktion im Zellverbund sehr wahrscheinlich.

1.5.3 ATP-induzierte ATP-Freisetzung durch den Purinrezeptor P2Y

P2Y ist eine Gruppe von purinergen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die von Nukleotiden wie ATP, ADP, UTP und UDP stimuliert werden können. Die Aktivierung von Rezeptoren der Gruppe P2Y führt zu der intrazellulären Aktivierung von Phospholipase C. In einer Signalkaskade innerhalb der Zelle kommt es unter anderem zur Freisetzung des Second Messengers Inositol-1,4,5-trisphosphat in das Zytoplasma (Abbraccio et al. 2006). Locovei et al. coexprimierten 2005 den Pannexin-1-Kanal mit dem Purinrezeptor PY2 in Oozytenzellen, um ihre Hypothese zu stützen, dass beide Proteine miteinander interagieren können. Sie stellten fest, dass eine Stimulierung des Purinrezeptors durch Nukleotide wie ATP zu einer Öffnung des Pannexin-1-Kanals in der Membran führt. Der aktivierte Panx1-Kanal kann nun wiederum ATP aus dem Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum transportieren. Das freigesetzte ATP stimuliert jetzt die Purinrezeptoren der Gruppe P2Y. Es findet durch diesen Kreislauf also eine ATP-induzierte ATP-Freisetzung statt (Locovei et al. 2006b).

1.5.4 Aktivierung durch zytoplasmatisches Calcium

Die Aktivierung des Pannexin-1-Kanals durch den Purinrezeptor P2Y geschieht entweder durch Kopplung und Interaktion beider Proteine in der Plasmamembran oder über eine Stimulierung des Pannexin-1-Kanals durch einen Second Messenger wie Ca^{2+} . Durch die Aktivierung des Purinrezeptors P2Y werden infolge der Ausschüttung von Inositol-1,4,5-trisphosphat unter anderem Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Es wird angenommen, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch einen noch unerforschten Mechanismus zu einer Aktivierung des Pannexin-1-Kanals führt. Locovei et al. testeten 2006 mittels Single-Patch-Clamp-Technik die Sensitivität des Panx1-Kanals auf eine Erhöhung des intrazellulären Calciums. Schon eine geringe Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultierte in erhöhten elektrischen Strömen über dem Pannexin-1-Kanal (Locovei et al. 2006b). Eine Erhöhung des Calciums im extrazellulären Medium beeinflusst die Leitfähigkeit des Pannexin-1-Kanals dagegen nicht (Bruzzone et al. 2005).

1.5.5 Reaktion auf mechanischen Stress

Mittels Single-Patch-Clamp-Technik überprüften Bao et al. die Reaktion von Panx1-exprimierenden Zellen auf mechanischen Stress. Dazu applizierten sie einen negativen Sog auf die Patch-Clamp-Pipette und beobachteten die Reaktion des Pannexin-1-Kanals. Über eine Potentialreichweite von -50mV bis +50mV zeigte sich hierbei eine erhöhte Kanalaktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass mechanischer Stress mit einer erhöhten Leitfähigkeit des Pannexin-1-Kanals einhergeht (Bao et al. 2004).

1.5.6 Blockade durch Probenecid

Probenecid wird aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften in der klinischen Therapie der chronischen Gicht verwendet. Silverman et al. haben gezeigt, dass Probenecid jedoch auch zur Blockade von Pannexin-1-Kanälen verwendet werden kann. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen Probenecid und Pannexin-1 ist nicht vollständig erforscht. Es wird vermutet, dass Probenecid durch die Lipiddoppelmembran in den Kanal gelangt und an einer hydrophilen Stelle des Proteins seine Wirkung entfaltet. Die Blockade ist bei Probenecid im Gegensatz zu anderen Kanalblockern wie Carbenoxolon spezifisch für Kanäle, die durch Pannexine geformt werden (Silverman et al. 2008).

1.6 Funktionen des Pannexin-1-Kanals

Neueren Studien zufolge haben Panx1-Kanäle im Organismus vielfältige Aufgaben. Die physiologischen Eigenschaften von Panx1 wie seine Permeabilität für ATP, die Mechanosensitivität, die Interaktion mit Purinrezeptoren sowie die Aktivierung durch intrazelluläre Calcium-Ionen ermöglichen dem Kanal, spezifische Aufgaben im Organismus zu übernehmen.

1.6.1 Parakrine Signalweiterleitung durch Calciumwellen

Es wird vermutet, dass Panx1 eine entscheidende Rolle beim Weiterleiten von elektrischen Signalen von Zelle zu Zelle spielt. In Astrozyten wurden sogenannte Calciumwellen nachgewiesen, die eine parakrine Kommunikation über weite Strecken ermöglichen (Guthrie et al. 1999; Barbe et al. 2006). Dabei werden Pannexin-1-Kanäle zunächst über einen variablen Stimulus wie mechanischen Stress oder Depolarisation aktiviert. Infolgedessen gelangt ATP über Pannexin-1 vom Intrazellulär- in den Extrazellulärraum. An einer Nachbarzelle bindet das ATP an den metabotropen Purinrezeptor P2Y und führt so zu einem Anstieg von Inositol-1,4,5-trisphosphat im Zytoplasma. Dieser Second Messenger setzt nun Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle frei. Das freigesetzte Calcium gelangt zum einen über Connexone in die Nachbarzellen, zum anderen bindet es wiederum an Panx1-Kanäle und erhöht deren Leitfähigkeit, sodass ATP in den Extrazellulärraum diffundiert und das Signal zu einer Nachbarzelle weiterträgt (Locovei et al. 2006b; Barbe et al. 2006).

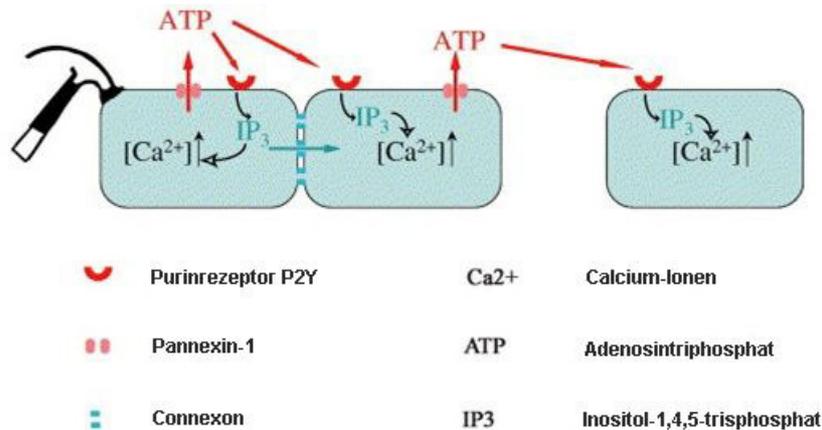


Abbildung 2: Parakrine Weiterleitung von Calciumwellen
(verändert aus Locovei 2006)

1.6.2 Vasodilatation und Vasokonstriktion

Während einer Hypoxie oder wenn sie mechanischem Stress ausgesetzt sind, schütten Erythrozyten ATP aus (Bergfeld und Forrester 1992). Die Freisetzung von ATP wird in Erythrozyten durch Panx1-Kanäle vermittelt, welche so Einfluss auf die Gefäßspannung nehmen können. Das ATP bindet an Purinrezeptoren an den Endothelzellen und führt über eine erhöhte Calciumkonzentration zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid. NO diffundiert in benachbarte glatte Muskelzellen und führt dort zu einer Vasodilatation, die den Blutfluss und die Sauerstoffzufuhr im Gefäß erhöht (Locovei et al. 2006a). Weiterhin haben Billaud et al. im Jahr 2011 festgestellt, dass Pannexin-1 sowohl in der glatten Muskulatur als auch im Endothel von arteriellen Widerstandsgefäßen exprimiert wird. Das Team entdeckte einen Zusammenhang zwischen Pannexin-1-Kanälen und α -Rezeptoren in glatten Muskelzellen. So wird angenommen, dass Pannexin-1 die durch α 1D-Rezeptoren evozierte Vasokonstriktion vermittelt (Billaud et al. 2011). Somit ist eine entscheidende Rolle von Pannexin-1 auf die systemische Blutdruckregulation sehr wahrscheinlich. Die genauen Mechanismen dieser Regulation sind derzeit noch unbekannt und Gegenstand intensiver Forschungen.

1.6.3 Apoptose und Immunabwehr

Apoptotische Zellen schütten in noch intaktem Zustand Nukleotide wie ATP und UTP aus. Diese agieren im Extrazellulärraum als chemotaktisches „find me“ Signal an phagozytischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen (Elliott et

al. 2009). Diese Zellen der unspezifischen Immunabwehr werden von den Nukleotiden angelockt und können die apoptotischen Zellen phagozytieren und abbauen. Chekeni et al. haben 2010 gezeigt, dass Pannexin-1 an der Freisetzung von ATP aus den apoptotischen Zellen involviert ist und somit auch direkt in die unspezifische Immunabwehr eingreift (Chekeni et al. 2010).

Weiterhin wurde in neueren Studien beschrieben, dass Pannexin-1 in Kombination mit dem ionotropen Purinrezeptor P2X an vielfältigen Prozessen im Immunsystem beteiligt ist. Durch Interaktion mit dem Purinrezeptor ist Pannexin-1 an der Freisetzung von dem Zytokin Interleukin-1 β aus Makrophagen, an der T-Zell-Aktivierung sowie an der Regulation von neutrophilen Granulozyten beteiligt (Schenk et al. 2008; Chen et al. 2010; Pelegrin und Surprenant 2006).

1.7 Spezifische Funktionen von Pannexin-1 im Herz

Die spezifischen Funktionen von Pannexin-1 im Herzen sind im Vergleich zu anderen Organsystemen wenig beschrieben. Die Auswirkungen einer Panx1-Defizienz auf die Elektrophysiologie der Maus waren bisher gänzlich unbekannt.

1.7.1 Aktivierung von Fibroblasten

Nach einem Myokardinfarkt setzen Herzmuskelzellen vermehrt ATP über Pannexin-1-Kanäle frei (Dolmatova et al. 2012). Auch die Expression von Panx1 in der Zellmembran steigt unter hypoxischen Bedingungen in Myozyten an (Dolmatova et al. 2012). Das aus den Myozyten freigesetzte ATP kann Fibroblasten am Rande des Ischämieareals stimulieren, sich in Myofibroblasten zu differenzieren. Diese können durch Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix, Zytokinen und Kollagen zu einer Fibrosierung des Herzens führen. Durch diese Fibrosierung werden überlebende Zellen der Herzmuskulatur vom übrigen funktionellen Synzytium getrennt, was zu einer verzögerten elektrischen Weiterleitung und damit potentiell zu Arrhythmien führen kann (Bakker und van Rijen 2007).

1.7.2 Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung

In mehreren Studien wurde beschrieben, dass Pannexin-1 in Interaktion mit dem ionotropen Purinrezeptor P2X im Herz eine wichtige Funktion bei einer ischämischen

Präkonditionierung übernimmt und somit kardioprotektiv wirken kann. Bei einer ischämischen Präkonditionierung kann ein präkonditionierender Reiz in Form einer kurzzeitig induzierten Hypoxie das Herz über einen gewissen Zeitraum vor den Auswirkungen eines Myokardinfarktes schützen (Gross und Gross 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass ein Pannexin-1/P2X-Rezeptor-Komplex an der Ausschüttung verschiedener kardioprotektiv wirkender Faktoren beteiligt ist. Dazu gehören beispielsweise Adenosin, Sphingosin-1-Phosphat, Opioide und Bradykinin, welche ihre kardioprotektive Wirkung durch Bindung an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entfalten (Vessey et al. 2010).

1.8 Die Knockout-Maus

Mit dem Begriff „*Knockout-Maus*“ wird eine Maus bezeichnet, der mithilfe eines gentechnischen Verfahrens das Erbgut gezielt verändert wurde. Durch eine Manipulation an der DNA können bestimmte Gene gezielt deaktiviert werden. Die dazu verwendete Technik heißt *gene-targeting* und verwendet die homologe Rekombination von Gensequenzen (Schenkel 2006). Die US-Amerikaner Mario Capecchi und Oliver Smithies sowie der Brite Martin J. Evans erhielten für Entwicklung des *gene targeting* im Jahr 2007 den Nobelpreis für Medizin.

Bei der Methode werden zunächst Stammzellen aus einem Mäuseembryo im Blastozystenstadium entnommen und vermehrt. Danach wird ein Inaktivierungsvektor hergestellt. Der Inaktivierungsvektor ist eine DNA-Sequenz, die annähernd homolog zu der Sequenz des zu deaktivierenden Gens ist. Wichtige, codierende Abschnitte der Gensequenz des Vektors werden jedoch verändert oder entfernt. Der Inaktivierungsvektor wird nun in eine noch undifferenzierte, pluripotente Stammzelle einer Maus injiziert. Im Zellkern lagern sich der Inaktivierungsvektor und die homologe Gensequenz auf dem Chromosom der Maus dicht aneinander und werden teilweise rekombiniert. Es kommt zu einem Austausch von Gensequenzen zwischen Vektor und Chromosom der Stammzelle (Capecchi 1989). Das vom Vektor integrierte Gen enthält jedoch aufgrund der vorherigen Manipulation eine gezielt fehlerhafte Sequenz der DNA-Basen. Die Transkription in der Zelle ergibt damit eine fehlerhafte mRNA und die genetische Information ist zerstört (Schenkel 2006). Zusätzlich zu dem fehlerhaften Gen wird eine Sequenz für eine Antibiotika-Resistenz in die DNA der Stammzelle eingebracht. So können die transgenen Zellen, welche die Sequenz des Vektors integriert haben, durch gezielten Einsatz des Antibiotikums gefiltert und selektiert werden. Die rekombinante Stammzelle wird nun

wieder in eine Blastozyste injiziert und mittels Embryotransfer in den Uterus einer Maus, die als Leihmutter fungiert, eingebracht. Es entstehen chimäre Nachkommen, die das deaktivierte Gen in einem Teil der Körperzellen tragen. Nur ein Teil der heterozygoten Nachkommen trägt das fehlerhafte Gen auch in der Keimbahn und kann zur Zucht verwendet werden. Die heterozygoten Tiere können im weiteren Verlauf miteinander verpaart werden. In 25% der Nachkommen wird gemäß der Vererbungslehre nach Gregor Mendel das veränderte Gen in seiner homozygoten Form an die Nachkommen weitergegeben. Die so entstandenen Mäuse sind vollständig defizient für das Ziel-Gen und werden nun als Knockout-Mäuse bezeichnet (Braun und Willnow 1996).

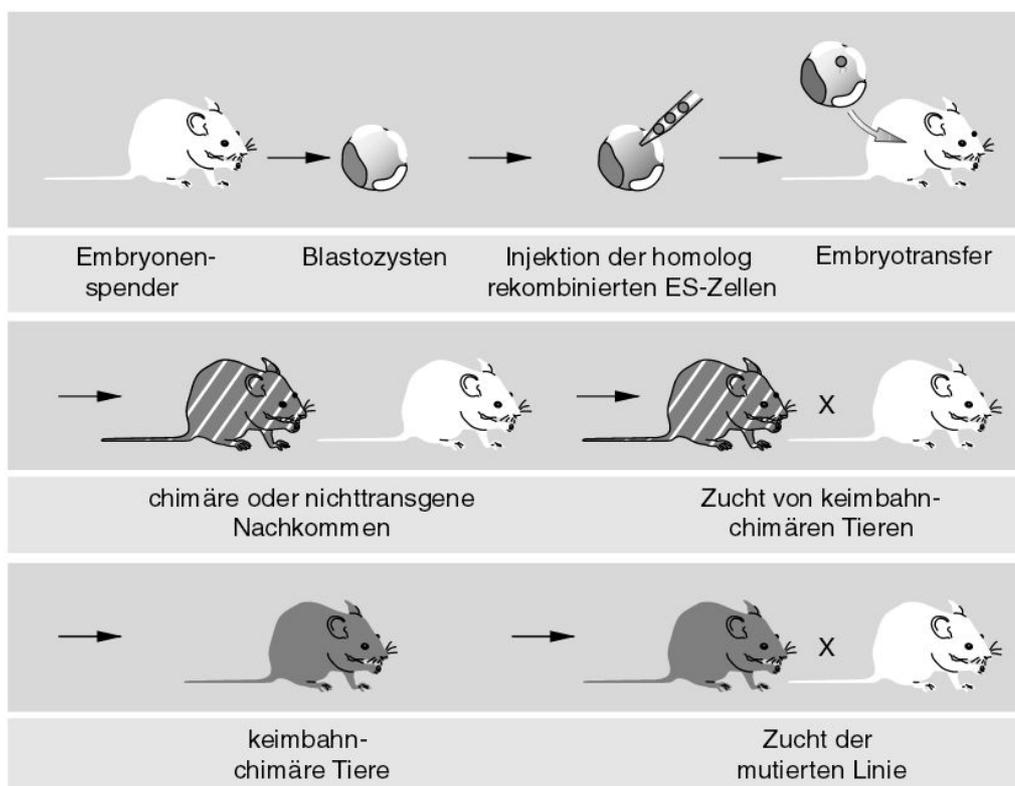


Abbildung 3: Darstellung des Ablaufs der Zucht von Knockout-Mäusen

(aus Schenkel 2006)

1.9 Das Elektrokardiogramm der Maus

Das Elektrokardiogramm der Maus zeigt im Vergleich zum Elektrokardiogramm des Menschen einige Besonderheiten. Ruhende Mäuse mit einem Körpergewicht von 30g zeigen eine Herzfrequenz von etwa 600 min^{-1} und damit eine weit höhere Herzfrequenz als die von menschlichen Herzen (Dobson 2003). Die elektrophysiologischen Korrelate der Potentialdifferenzen sind analog zum Menschen eine P-Welle, eine PQ-Strecke, ein QRS-Komplex und eine T-Welle. Eine spezifische Besonderheit bei Mäusen ist das Fehlen einer

isoelektrischen Linie zwischen dem QRS-Komplex und der T-Welle, begleitet von einem relativ kurzen ST-Intervall. Die T-Welle verschmilzt mit dem letzten Teil des QRS-Komplexes. Die Repolarisation des Mäuseherzens beginnt am J-Punkt, welcher definiert ist als Punkt, in dem der QRS-Komplex abrupt in die T-Welle übergeht. Die Repolarisation endet analog zum Menschen mit dem Ende der T-Welle. Die gesamte Repolarisation findet somit innerhalb des JT-Segments statt (Gussak et al. 2000).

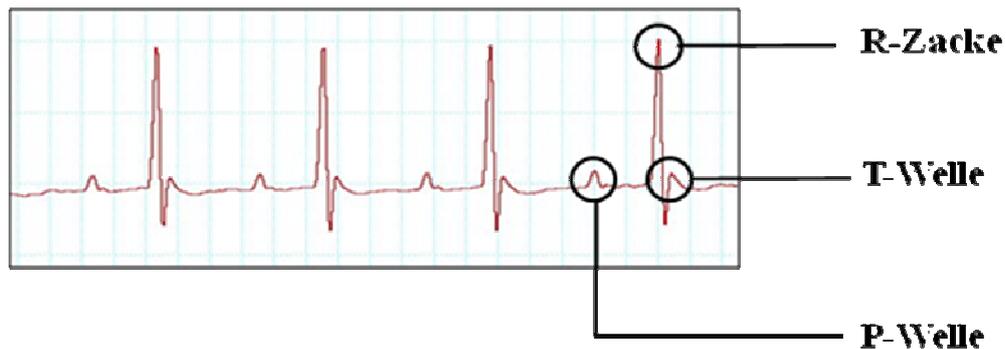


Abbildung 4: Typische EKG-Kurve einer Maus

Zu sehen ist neben der P-Welle auch die aus jedem QRS-Komplex hervorgehende T-Welle.

1.10 Die Herzfrequenzvariabilität

Der Abstand zweier aufeinanderfolgender Herzschläge entspricht der Zeit zwischen zwei Kontraktionen der Herzkammern. Im Elektrokardiogramm stellt sich die Erregung der Kammermuskulatur als QRS-Komplex dar. Die Herzfrequenzvariabilität ist definiert als physiologisch alternierender Abstand zwischen den R-Zacken bei normalem Sinusrhythmus (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Die klinische Relevanz der Herzfrequenzvariabilität wurde bereits im Jahr 1963 festgestellt, als Hon und Lee zeigten, dass einer Hypoxie des menschlichen Fetus im Mutterleib bereits eine verminderte Variabilität der Herzfrequenz vorausgeht. Diese reduzierte Herzfrequenzvariabilität tritt ein, bevor andere quantifizierbare Veränderungen am Herzen zu beobachten sind (Hon und Lee 1963). Neuere Studien haben gezeigt, dass eine verminderte Herzfrequenzvariabilität auch mit kongestiver Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und plötzlichem Herztod assoziiert ist und somit ein Marker für die kardiovaskuläre Mortalität sein kann (Sandercock und Brodie 2006; Chiou und Zipes 1998; Bigger et al. 1992).

Ursächlich für die Alterationen in der Herzfrequenz ist hauptsächlich das autonome Nervensystem mit dem Sympathikus und dem Parasympathikus. Der parasympathische Einfluss auf das Herz wird generiert durch Freisetzung des Transmitters Acetylcholin durch den Vagusnerv. Die Stimulierung der muscarinergen Rezeptoren führt über inhibitorische G-Proteine zu einer Senkung des cAMP-Spiegels und einer nachfolgenden Dephosphorylierung von Membranproteinen in den Vorhöfen, im Sinusknoten und im Atrioventrikularknoten.

Der Parasympathikus übt eine negativ chronotrope, eine negativ inotrope und eine negativ dromotrope Wirkung auf das Herz aus (Klinke et al. 2009). Der Sympathikus dagegen vermittelt seine ergotrophe Wirkung am gesamten Herz über die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin. Diese bewirken über β - und α -Rezeptoren eine Erhöhung des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels und eine Phosphorylierung von Membranproteinen. Der Sympathikus hat eine positiv chronotrope, eine positiv inotrope, eine positiv bathmotrope sowie eine positiv dromotrope Wirkung auf das Herz. In körperlicher Ruhe überwiegt die vagale Stimulation des Sinusknotens auf das Herz (Klinke et al. 2009).

Durch die Verwendung einer *Frequency Domain Analysis* sowie einer *Time Domain Analysis* der Herzfrequenzvariabilität kann eine differenzierte Aussage zum Erregungszustand des Sympathikus und des Parasympathikus getroffen werden. Die Herzfrequenzvariabilität ist daher ein aussagekräftiger Parameter, um den physiologischen Status des autonomen Nervensystems zu eruieren, sowie pathologische Zustände zu erfassen, die mit einer gestörten sympatho-vagalen Balance einhergehen (Bianchi et al. 1990).

1.10.1 Frequency Domain Analysis

Die Frequenz des Herzschlags wird zunächst bestimmt durch unabhängige, spontane und periodische Depolarisationen des Sinusknotens. Das autonome Nervensystem moduliert durch eine Interaktion des Sympathikus mit dem Parasympathikus diese sinuatrialen Schrittmacherpotentiale jedoch erheblich und passt damit die Herzfrequenz den aktuellen Anforderungen des Organismus an (Jong und Randall 2005). Unter Ruhebedingungen dominiert der parasympathische über den sympathischen Tonus bei der Anpassung der Herzfrequenz. Bei Änderungen der Ruhfrequenz haben Aktivitäten in parasympathischen, efferenten Nerven eine sehr schnelle und hochfrequente Modifikation der Herzfrequenz zur Folge, wohingegen sympathische Efferenzen deutlich länger für ihre niederfrequente

Modulation benötigen (Jong und Randall 2005). Der kurze Effekt des Parasympathikus wird unter anderem durch eine Acetylcholinesterase im Sinusknoten verursacht, welche das anfallende Acetylcholin schnell hydrolisiert (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996).

In der *Frequency Domain Analysis* (deutsch: Frequenzspektrumanalyse) wird daraus resultierend angenommen, dass das Integral der Hochfrequenzen (*High Frequency*) die Gesamtaktivität des Parasympathikus abbildet.

Die Interpretation des niedrigfrequenten Spektrums (*Low Frequency*) wird dagegen kontrovers diskutiert. Während einige Autoren das niederfrequente Spektrum allein der Aktivität des Sympathikus zurechnen, postulieren andere Autoren eine Beteiligung des sympathischen und des parasympathischen Nervensystems (Malliani et al. 1991; Akselrod et al. 1981; Pomeranz et al. 1985).

Das physiologische Äquivalent des sehr niedrigen Frequenzspektrums (*Very Low Frequency*) ist derzeit noch ungeklärt. Eine Korrelation mit dem sehr niedrigen Frequenzspektrum ist weder für das sympathische, noch für das parasympathische Nervensystem erwiesen. Es ist fraglich, ob es überhaupt einen physiologischen Prozess gibt, der sich durch Analyse des sehr niedrigen Frequenzspektrums abbilden lässt. Als weitere Parameter reflektieren die *Total Power* die Gesamtvariabilität des autonomen Nervensystems und der Quotient aus *Low Frequency* und *High Frequency* (LF/HF) die sympathovagale Balance (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996).

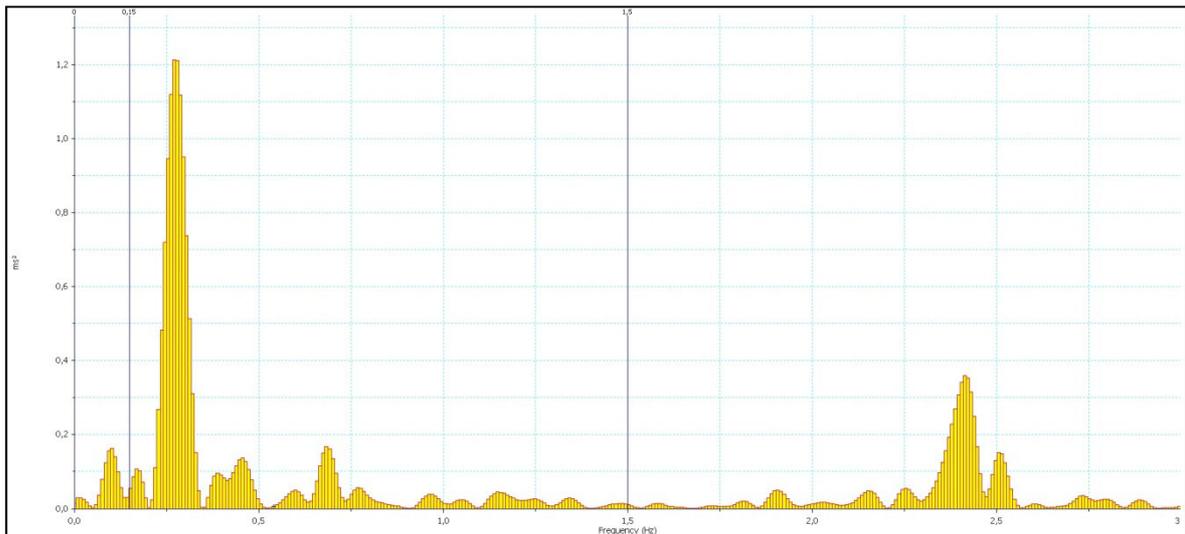


Abbildung 5: Frequency Domain Analysis eines EKG-Segments

Die senkrechten Linien markieren die Grenzen der Frequenzbereiche. Deutlich zu sehen ist ein hoher Ausschlag in der *Low Frequency* (0,15-1,5 Hz) sowie ein kleinerer in der *High Frequency* (1,5-5 Hz). (Knock-Out-Maus 24, EKG-Segment 22, aufgezeichnet am 20.1.2012)

1.10.2 Time Domain Analysis

Mithilfe einer *Time Domain Analysis* (deutsch: Zeitbereichsanalyse) werden die zeitlichen Intervalle zwischen den R-Zacken gemessen. Als Parameter stehen hier SDNN, r-MSSD und pNN6 zur Verfügung.

Der SDNN (englisch: *standard deviation of NN intervals*) misst die Standardabweichung aller RR-Intervalle im Messzeitraum und wird in Millisekunden angegeben. Der SDNN weist eine hohe Korrelation mit der *Total Power* der *Frequency Domain Analysis* auf. In den SDNN gehen sämtliche hochfrequenten sowie niederfrequenten Variationen der Zeitspanne zwischen den RR-Intervallen ein. Der Wert repräsentiert daher die Gesamtvariabilität der Herzfrequenz und ist damit ein Maß für die Gesamtaktivität des autonomen Nervensystems.

Der r-MSSD (englisch: *root mean square of successive differences*) ermittelt hochfrequente Variationen in der Abfolge der RR-Intervalle und wird in Millisekunden angegeben. Im Gegensatz zur SDNN misst der r-MSSD nicht die Differenz zwischen den RR-Intervallen und dem Mittelwert sondern die Abweichung vom darauffolgenden RR-Intervall und somit die Variabilität des einzelnen Herzschlags. Der Wert weist eine hohe positive Korrelation

mit der *High Frequency* der *Frequency Domain Analysis* auf und reflektiert damit den Parasympathikotonus des autonomen Nervensystems.

Der pNN6 gibt den prozentualen Anteil aller RR-Intervalle an, deren zeitliche Differenz über 6 ms liegt. Dieser statistische Wert ist ebenfalls ein Indikator für hochfrequente Abweichungen der Herzfrequenz und korreliert hoch mit dem r-MSSD und der *High Frequency* der *Frequency Domain Analysis* (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Der pNN6 ist abgeleitet vom pNN50, welcher in Herzfrequenzvariabilitätsanalysen beim Menschen verwendet wird. Dort entsprechen 50 ms etwa 10 % des durchschnittlichen RR-Intervalls. Übertragen auf die Maus wurde ein Wert von 6 ms in einer Studie von Thireau et al. als optimal postuliert, um hochfrequente Abweichungen der Frequenz zu detektieren (Thireau et al. 2008).

1.11 Der Belastungsversuch bei der Maus

Bei der Maus wird die Herzfrequenz analog zum menschlichen Organismus durch eine Interaktion zwischen sympathischem und parasympathischem Nervensystem reguliert. Während einer Belastung wird der sympathische Tonus erhöht und der parasympathische Tonus erniedrigt. Aus dieser Anpassung des kardiovaskulären Systems auf die Belastung entsteht eine Tachykardie. Während zu Beginn der Belastung die Herzfrequenz überwiegend durch einen verringerten parasympathischen Tonus steigt, so wird bei ansteigender bis maximaler Belastung insbesondere der sympathische Tonus erhöht und Katecholamine ausgeschüttet, um eine physiologische Anpassung der Frequenz zu gewährleisten (Bernstein 2003). Durch diese Regulationsmechanismen können in der Maus Spitzenfrequenzen bis zu 840/min erreicht werden (Bernstein 2003).

1.12 Ziel der vorliegenden Arbeit

Nach derzeitigem Stand der Forschung sind Pannexine und insbesondere Pannexin-1 in vielfältigen Regulationsprozessen im Körper involviert. Die ubiquitäre Expressierung ermöglicht dem Panx1-Kanal, zahlreiche Funktionen des Organismus zu modulieren. Der Expression von Pannexin-1 in atrialen und ventrikulären Myozyten kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Durch seine unselektive Permeabilität, seine Größe und seine Funktionen bei der Kommunikation im Zellverbund hat Panx1 das Potential, die

Elektrophysiologie im Herz entscheidend zu beeinflussen. Trotz dieses Umstandes gibt es noch keine publizierten Studien, die sich explizit mit den Auswirkungen einer Pannexin-1-Defizienz auf den kardialen Phänotyp *in vivo* beschäftigen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals eine kardiale Phänotypisierung der Knockout-Mäuse mittels elektrophysiologischer Methoden. Es wurden telemetrische Elektrokardiogramme der Panx1-defizienten Mäuse aufgenommen und mit denen der Wildtypen verglichen. Die Elektrokardiogramme wurden sowohl in Ruhe als auch unter Belastung im Schwimmversuch und auf einem Laufband aufgezeichnet. Bei der Auswertung wurden minimale, durchschnittliche und maximale Herzfrequenzen miteinander verglichen. Mithilfe frequenzspezifischer und zeitspezifischer Untersuchungen der Herzfrequenzvariabilität wurde der Zustand des autonomen Nervensystems der Maus evaluiert. Zudem wurden in den Belastungsversuchen die maximale kardiale Leistungsfähigkeit beider Mauspopulationen getestet und miteinander verglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch eine Untersuchung der Herzfrequenzen, den kardialen Phänotyp der Panx1-KO-Maus erstmals zu charakterisieren und den Einfluss von Pannexin-1 auf die Herzfrequenz, die kardiale Belastbarkeit und die Herzfrequenzvariabilität zu eruieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 $Panx^{-/-}$ Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse

Alle Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Düsseldorf (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A032) genehmigt und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Der Autor dieser Dissertation verfügt über einen Fachkundenachweis, welcher ihn nach §8 des Tierschutzgesetzes zur Mitarbeit an Tierversuchsprojekten berechtigt.

Für die Versuche wurden insgesamt 29 Mäuse verwendet, von welchen 21 männlichen Geschlechts und 8 weiblichen Geschlechts waren. Die Tiere wurden in der Versuchstieranlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolonkäfigen Typ II (350 cm²) auf staubfreiem Weichholzgranulat. Zur Fütterung erhielten die Tiere autoklaviertes Pelletfutter „Ssniff M-Zucht“. Es wurde ozoniertes und mit HCL angesäuertes Leitungswasser in Tränkflaschen *ad libitum* angeboten. Die Beleuchtung erfolgte von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr MEZ und wurde automatisch gesteuert, um einen natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus zu simulieren. Die Temperatur betrug konstant 22 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit wurde jederzeit auf einem Wert von $55 \pm 5\%$ gehalten.

2.1.2 Zucht

Die für die Zucht verwendeten heterozygoten Mäuse wurden der Klinik für Kinderkardiologie und Pneumologie der Universität Düsseldorf von der Abteilung für Klinische Neurobiologie der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Für die Versuche und die Zucht wurde der Mäusestamm C57Bl/6 verwendet.

Die Zucht der homozygoten Mäuse gestaltete sich wie folgt: Im Alter von drei Wochen wurden die Zuchttiere abgesetzt. Nach vier Wochen wurden den Mäusen die Schwanzspitzen gekürzt und jede Maus durch eine Ohrlochung markiert. Mit den abgetrennten Schwanzspitzen wurde eine DNA-Analyse zur Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Mäuse im Alter von acht Wochen der Paarung zugeführt. Heterozygote Mäuse wurden miteinander verpaart, um

homozygote, für das Pannexin-1-Gen defiziente Mäuse zu erlangen. Zusätzlich wurde, um die Zahl der Merkmalsträger zu erhöhen, Wildtypen in die Zuchtlinie eingekreuzt. Aufgrund schlechter Ergebnisse in der Zucht wurden zeitweilig auch homozygote Zuchttiere untereinander und homozygote mit heterozygoten Zuchttieren verpaart.

2.1.3 Transmitter

Die Aufzeichnung des Elektrokardiogramms erfolgte telemetrisch mithilfe eines in die Maus implantierten Transmitters aus Silikon-Elastomer. Zur Datenübertragung an ein Empfängermodul wurden Funkwellen verwendet. Es wurden zwei verschiedene Transmitter-Modelle benutzt. Der Transmitter EA-F20 hatte ein Gewicht von 3,9 g und ein Volumen von 1,9 ml. Der zweite in den Versuchen eingesetzte Transmitter ETA-F10 hatte ein Gewicht von 1,6 g und ein Volumen von 1,1 ml. Die Stromversorgung beider Transmitter erfolgte über eine eingebaute Batterie mit einer Laufzeit von 4 Monaten. Am vorderen Ende der Transmitter befanden sich jeweils zwei flexible Elektroden. Diese waren überzogen und markiert mit rotem Silikon für den Pluspol und mit weißem Silikon für den Minuspol. Mithilfe eines Magneten wurden die Transmitter aktiviert und deaktiviert. Alle Transmitter wurden nach dem Exitus der Maus explantiert und für eine Wiederverwendung sterilisiert.



Abbildung 6: Verdeutlichung des Größenverhältnisses zwischen Maus und Transmitter

2.1.4 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Transmitter EA-F20/ETA-F10	Data Sciences, Minneapolis, USA

Receiver RPC-1	Data Sciences, Minneapolis, USA
Analog/Digital-Wandler	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Simplex II Metabolic Modular Treadmill	Columbus Instruments, Ohio, USA
Inhalationsnarkosegerät Sulla 808	Drägerwerk AG & Co, Lübeck, Deutschland
Temperatur-Messgerät GTH 175/PT	GHM Messtechnik GmbH, Regenstauf, Deutschland
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tierrasurgerät Super AGR+	Andis Company, Wisconsin, USA
Heizplatte HT007	Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland
Einmalkanülen, 26G	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland
Nahtklammern	Perfect Agrafes, Brétigny-sur-Orge, Frankreich
Vicryl-Faden, resorbierbar	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland

2.1.5 Medikamente

Bezeichnung	Hersteller
Xylazin	Rompun, Bayer Healthcare AG, Leverkusen, Deutschland
Ketamin	Ketanest, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Carprofen	Rimadyl, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Aloxan Silber-Spray	Agrochemica GmbH, Bremen, Deutschland
Glucose 5% Infusionslösung	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland
Hautantiseptikum Codan	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Sauerstoff	Linde AG, Pullach, Deutschland
Regepithel-Salbe	Alkon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland

2.1.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
LabChart Pro, Version 7.2.1	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Prism, Version 5.04	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA

Citavi, Version 3.4.0	Swiss Academic Software GmbH, Zürich, Schweiz
Word 2007	Microsoft Corporation, Washington, USA
Excel 2007	Microsoft Corporation, Washington, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Implantation des Transmitters

Alle Operationen zur Implantation der Transmitter wurden in den Operationssälen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgeführt. Insgesamt wurden 37 Mäuse operiert, wobei 8 Mäuse während der Operation verstarben. Dementsprechend überlebten 29 Mäuse die Operation und konnten an den nachfolgenden Versuchen teilnehmen.

Zu Beginn der Operation wurde das Tier zunächst manuell fixiert und als Prämedikation ein Bolus aus Ketamin in einer Dosierung von 100 µg/g Körpergewicht und Xylazin in einer Dosierung von 4 µg/g Körpergewicht mit einer Einmalkanüle der Größe 24G intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde während der Anschlagszeit zurück in den Käfig gesetzt. Nach ca. 2-3 Minuten war die Maus ausreichend narkotisiert, um sie auf einer vorgewärmten Heizplatte in Rückenlage zu positionieren. Alle vier Extremitäten sowie der Schwanz wurden mit einem Klebestreifen fixiert. Die geöffneten Augen des Tieres wurden mit einer Epithelsalbe bedeckt, um sie gegen Austrocknung zu schützen. Mit einem für Tiere geeigneten Rasiergerät wurde das Operationsgebiet an der ventralen Thoraxwand der Maus großflächig von Haaren befreit. Zudem wurde durch dreimaliges Desinfizieren der Operationsstelle eine größtmögliche Keimfreiheit gewahrt. Ein Kunststoffschlauch wurde über die Nasenspitze des Tieres gezogen und an das Narkosegerät angeschlossen. Die Erhaltungsnarkose des Tieres erfolgte mit 1,5-2,5% Isofluran Narkosegas gemischt mit 3l Sauerstoffzufuhr pro Minute. Mit einem Skalpell wurde die Haut des Tieres entlang der Linea alba inzidiert und mithilfe stumpfer Präparation eine subkutane Tasche geschaffen.

Bei Verwendung des kleineren Transmitters ETA-F10 wurde dieser in die präparierte subkutane Tasche implantiert und das Peritoneum nicht eröffnet. Beim größeren Transmitter EA-F20 wurde durch einen weiteren Schnitt das Peritoneum mittig durchtrennt. Der Transmitter EA-F20 wurde im Bereich der Darmschlingen platziert und

zwei an den Seiten des Transmitters befindliche Schlaufen mithilfe einer Naht am Peritoneum fixiert. Das Peritoneum wurde darauf durch eine Naht mit resorbierbarem Vicryl-Faden verschlossen. Mithilfe eines Trokars wurde die Haut von der Inzisionsstelle bis zu den Vorderbeinen untertunnelt. Die zwei Elektroden des Transmitters wurden subkutan zum Bereich der Vorderbeine ausgeleitet, um eine Verletzung der intraperitoneal gelegenen Organe durch die Spitzen der Elektroden zu vermeiden. Die Elektrodenspitzen wurden unterhalb der vorderen Extremitäten mit zwei weiteren nicht resorbierbaren Nähten durch einen chirurgischen Knoten an der Muskulatur fixiert, um so eine bipolare Extremitätenableitung I nach Einthoven zu formen. Danach wurde die Haut über der Operationsstelle mit einer Donati-Rückstichnaht verschlossen und zur weiteren Fixierung der Wundränder zusätzlich vier Nahtklammern angebracht. Die Zufuhr des Narkosegases wurde nun gestoppt und die Sauerstoffzufuhr auf 3 Liter pro Minute belassen. Um einen Ausgleich der intraoperativ verlorenen Flüssigkeit zu gewährleisten wurde der Maus ein Gemisch aus 0,6 ml 5% Glucose-Lösung und 0,4 ml isotonischer NaCl-Lösung subkutan verabreicht. Zur postoperativen Analgesie erhielt die Maus zusätzlich 0,2 mg Carbopropfen subkutan. Die Wunde wurde nochmals desinfiziert und zum Schutz vor Kontamination mit einem Silber-Spray großflächig behandelt. Sobald das Tier erste Zeichen einer nachlassenden Narkose zeigte (Zucken der Extremitäten, Schmerzreiz durch Zwicken an den Pfoten auslösbar), wurde es in den Käfig zurückgelegt. Der Makrolonkäfig mit der Maus wurde postoperativ für etwa eine Stunde in einen dafür geeigneten Inkubator gestellt und auf Indifferenztemperatur der Maus erhitzt, um einer eventuellen Hypothermie entgegenzuwirken. Die Gesamtzeit einer Operation betrug inklusive Narkose 70-90 Minuten.

2.2.2 Operationsnachsorge

Um eine interkurrente Infektion der Versuchstiere zu vermeiden, wurden die Tiere nach der Operation in IVC-Käfigen gehalten. In diesen Käfigsystemen wird jeder Käfig eigens mit sterilfiltrierter Luft ventiliert. Dadurch kann eine mikrobiologische Isolation der Tiere erfolgen und die durch Ausscheidungen im Käfig entstehenden Schadstoffe konsequent reduziert werden. Um das Risiko einer Kontamination der Mäuse zu minimieren, wurde der Tierhaltungsraum nur in Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe, Mundschutz, Haube, Schuhüberzug) betreten. Alle Interventionen am offenen Käfig wurden ausschließlich unter speziellen Umsatzstationen vorgenommen, die durch einen vertikalen, laminaren Luftstrom eine mikrobiologische Kontamination der Tiere verhindern.

Nach der Operation wurde die Nahtstelle täglich inspiziert. Falls die Inzisionsstelle nicht ausreichend verschlossen war, wurde die Maus mithilfe einer inhalativen Isofluran-Narkose kurzzeitig sediert und die offene Nahtstelle revidiert. Als Analgetikum bekamen die Mäuse täglich 0,2 mg Carboprofen für eine Zeitdauer von zwei Tagen nach der Operation subkutan injiziert. Falls die Versuchstiere danach noch Schmerzsymptome zeigten, wurde die analgetische Therapie verlängert. Um den Zugang zum Futter zu erleichtern, wurde Pelletfutter auf dem Käfigboden verteilt. Das Gewicht der Mäuse wurde jeden Tag dokumentiert und mit dem Ausgangsgewicht vor der OP verglichen. Mit den telemetrischen Versuchen wurde erst begonnen, wenn die Nahtstelle ausreichend verheilt war, frühestens jedoch acht Tage nach dem Operationsdatum für die Langzeitversuche und zehn Tage für die Belastungsversuche.

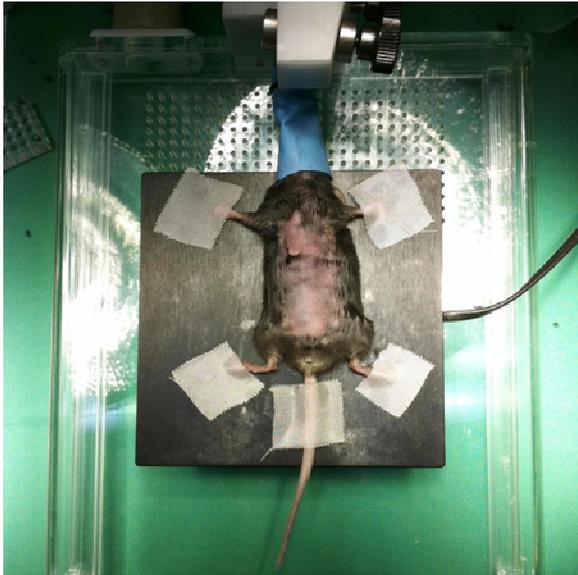


Abbildung 7



Abbildung 8

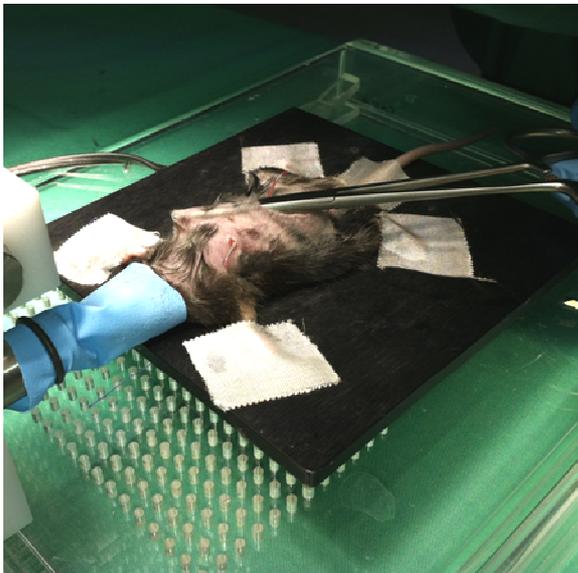


Abbildung 9



Abbildung 10

Abbildung 7: Fixierung aller vier Extremitäten sowie des Schwanzes auf der Wärmeplatte durch Klebeband

Abbildung 8: Positionierung des Transmitters auf den Darmschlingen unterhalb des Peritoneums

Abbildung 9: Präparation einer subkutanen Tasche zur Fixierung der zwei Elektroden im Bereich des Humerus

Abbildung 10: Verschluss der Inzisionsstelle durch eine Donati-Naht und Nahtklammern

2.2.3 Ableitung des EKG-Signals

Die Ableitung der Messwerte erfolgte über eine drahtlose Telemetrie. Zur Ableitung des telemetrischen Signals wurden die Potentialänderungen des Mäuseherzens über zwei implantierte Elektroden registriert und mittels Radiowellen an den Empfänger gesendet. Die Maus konnte sich während der Ableitung frei im gesamten Raum des Käfigs bewegen. Der Empfänger hatte die Form einer Platte und stand bei den Ableitungen der Elektrokardiogramme zu jeder Zeit unter dem Mäusekäfig. Die Empfängerplatte sendete die Messwerte über einen analogen Eingang an einen Analog/Digital-Wandler, welcher die Signale erfasste und vor der Digitalisierung verstärkte. Das digitalisierte Signal wurde anschließend über den USB-Anschluss an einen Computer übertragen. Mithilfe der Software LabChart Pro wurde das Signal auf dem Bildschirm dargestellt. Zur Auswertung wurde stets die Ableitung I nach Einthoven verwendet.

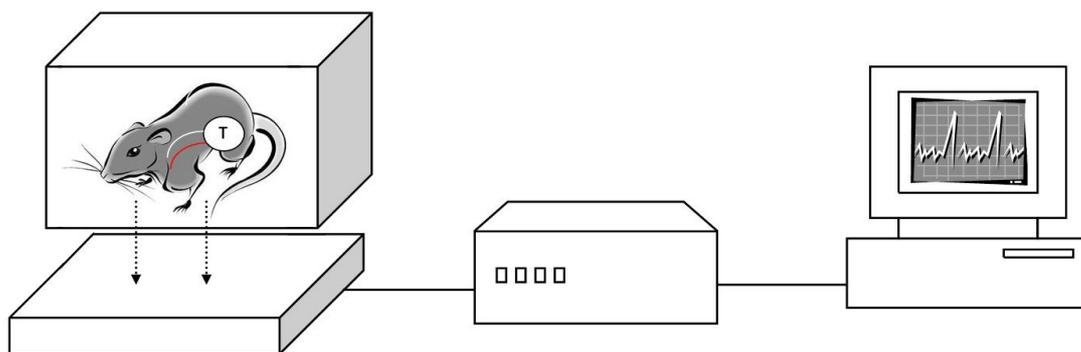


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der telemetrischen Versuche

Maus und Empfängerplatte (links), Analog/Digital-Wandler (Mitte)

Computer mit Auswertungssoftware (rechts)

2.2.4 24-Stunden-Elektrokardiogramm-Telemetrie

Es wurde von allen im Versuch eingeschlossenen Versuchstieren zunächst ein 24-Stunden-EKG angefertigt. Zur Ableitung des EKGs wurden die Mäuse in ihrem Käfig auf eine Empfängerplatte gestellt. Die Radiotransmitter wurden durch einen Magneten aktiviert. Zur Aufzeichnung der 24-Stunden-EKGs wurde sämtliche Hardware in einem Raum der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität aufgebaut, sodass die Tiere jederzeit in ihrer gewohnten Umgebung verbleiben konnten und einen konstanten Tag/Nacht-

Rhythmus durchliefen. Die aufgezeichneten Daten wurden mit der Nummer der Maus versehen und auf einer Festplatte gespeichert.

2.2.5 Schwimmversuch

Als Ausdruck einer submaximalen Belastung wurde mit allen Versuchstieren ein fünfminütiger Schwimmversuch durchgeführt. Alle Schwimmversuche fanden in der Versuchstieranlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Zunächst wurde ein $365 \times 205 \times 140$ mm (Länge \times Breite \times Höhe) großer, durchsichtiger Kunststoffbehälter mit sechs Litern Wasser befüllt. Das Wasser wurde auf 32° Celsius erhitzt, um die Indifferenztemperatur der Maus zu erreichen. Die Temperatur wurde mit einem Wassertemperaturmessgerät kontrolliert. Es erfolgte eine kontinuierliche, telemetrische Aufzeichnung des EKGs beginnend ab 5 Minuten vor dem Schwimmversuch, während des gesamten Schwimmversuchs sowie bis 10 Minuten nach dem Versuch. Die Aufzeichnung wurde über eine Empfängerplatte registriert analog zum Versuchsaufbau der 24-Stunden-EKG-Telemetrie. Die Versuchsmaus wurde zu Beginn des Schwimmversuchs vorsichtig aus dem Käfig in den Schwimmbehälter umgesetzt. Es befanden sich keine Hilfsmittel oder Befestigungen im Becken, an denen sich die Maus festhalten konnte. Die Maus hatte keine Möglichkeit, das Becken zu verlassen. Das Versuchstier wurde für exakt 5 Minuten schwimmen gelassen und danach vorsichtig zurück in den Käfig umgesetzt. Nach dem Schwimmversuch wurden die Tiere vorsichtig mit einem Handtuch abgetrocknet um ein Absinken der Körpertemperatur der Tiere zu verhindern. Die aufgezeichneten Daten wurden mit der Nummer der Maus versehen und gespeichert.

2.2.6 Laufbandversuch

Zur Untersuchung des Einflusses einer maximalen Belastung auf die Physiologie des Versuchstieres wurden mit den Mäusen zwei Laufbandversuche durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass nur Mäuse mit einheitlichem Gewicht der Transmitter verwendet wurden. Die Transmitter aller Mäuse im Laufbandversuch wogen 1,8 g. Zunächst wurden die Tiere in einem Versuch mit zunehmender Geschwindigkeit über die Zeit belastet. Nach einer Erholungsphase erfolgte ein weiterer Laufbandversuch, bei dem neben der Geschwindigkeit auch die Steigung des Laufbandes mit der Zeit zunahm. Das Laufband bestand aus einem sich drehenden Riemen aus Kunststoff, der von der Umgebung durch ein Plastikgehäuse abgetrennt war. Am Ende des Riemens war ein Elektrostimulator angebracht, welcher wahlweise an- und abgeschaltet werden konnte. Vor Beginn des

Versuchs wurden das gesamte Gerät und das Laufband sorgfältig gereinigt, um eine Beeinflussung des Versuchs durch Kot- oder Urinrückstände anderer Tiere zu vermeiden. Das Tier wurde dann vorsichtig aus dem Käfig in das Innere des Laufbandtunnels gesetzt und zur Adaption an die Umgebung für 5 Minuten bei ausgeschaltetem Laufband dort belassen. Der Elektrostimulator wurde in dieser Zeit bereits aktiviert, um dem Tier seine Funktion zu verdeutlichen. Nach der Eingewöhnungszeit wurde das Laufband in Bewegung gesetzt. Die Geschwindigkeit betrug zu Beginn der Versuche 2m/min und der Neigungswinkel 0 Grad.

Beim Laufbandprotokoll ohne Steigung wurde die Geschwindigkeit des Laufbandes alle zwei Minuten um 1 m/min erhöht. Beim Protokoll mit Steigung des Laufbandes erhöhte sich die Geschwindigkeit des Laufbandes um 1,15 m/min und der Neigungswinkel alle 4 Minuten um 5 Grad, bis eine maximale Steigung von 25 Grad erreicht wurde. Falls die Maus aufhörte zu laufen, fiel sie hinter dem Laufband auf einen Elektrostimulator. Hier bekam die Maus einen leichten elektrischen Reiz, um sie zum Weiterlaufen zu animieren. Der Reiz war dabei groß genug, um unangenehm für die Maus zu sein, er führte jedoch zu keiner Zeit zu inneren oder äußeren Verletzungen. Eine LED-Leuchte auf dem Laufband zeigte die Abgabe eines elektrischen Reizes an. Ein Sistieren der Maus auf dem Elektrostimulator (> 5 sec) oder häufiger Kontakt (> 5 Kontakte in 15 sec) wurden als Erreichen der physiologischen Leistungsgrenze des Tieres interpretiert und führte zum Abbruch des Versuches. Das Elektrokardiogramm der Maus wurde 10 Minuten vor dem Versuch, während der Eingewöhnungszeit und während des gesamten Versuchs kontinuierlich aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Daten wurden mit der Nummer der Maus versehen und gespeichert.

Laufbandprotokoll (gerade)

Eingewöhnungszeit: 5 Minuten

Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)
0	2
2	3
4	5
6	6
8	7
10	8
12	9
14	10
16	11
18	12
20	13
22	14
24	15
26	16
28	17
30	18

Tabelle 1: Protokoll des Laufbandversuchs ohne Steigung

Laufbandprotokoll (Rampe)

Eingewöhnungszeit: 5 Minuten

Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)	Steigung (Grad)
0	2	0
2	3	0
4	3,3	5
6	4,5	5
8	5,6	10
10	6,8	10
12	7,9	15
14	9,1	15
16	10,2	20
18	11,4	20
20	12,5	25
22	13,7	25
24	14,8	25
26	15,9	25
28	16,5	25
30	17,7	25

Tabelle 2: Protokoll des Laufbandversuchs mit Steigung durch eine Rampe

2.2.7 Auswertung der Elektrokardiogramme

Die gesamte Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software LabChart Pro. Zusätzlich zur Basisversion wurden die Zusatzmodule *ECG Analysis* zur Messung der Herzfrequenzen und *Heart Rate Variability* zur Analyse der Herzfrequenzvariabilität installiert. Alle Elektrokardiogramme wurden mit einer Sample Rate von 1000 Hz aufgenommen.

2.2.7.1 Herzfrequenzanalyse der 24-Stunden-Elektrokardiogramme

Mäuse sind nachtaktive Tiere. Dem physiologischen Tagesrhythmus der Tiere entsprechend wurde zur Analyse der Langzeit-EKGs das aufgezeichnete Elektrokardiogramm zunächst unterteilt in eine Aktivitätsphase (19:00 Uhr-7:00 Uhr) und eine Ruhephase (7:00 Uhr-19:00 Uhr). Anschließend wurde jedes Elektrokardiogramm manuell auf Artefakte und Herzrhythmusstörungen überprüft. Artefakte wurden von der

Analyse ausgeschlossen und auffällige Herzrhythmusanomalien mit einem Kommentar markiert. Zur Datenerhebung wurde mithilfe der Software LabChart Pro alle 20 Minuten ein Segment von 20 Sekunden ausgewählt und abgespeichert. Pro Maus ergaben sich so 36 Segmente in der Aktivitätsphase und 36 Segmente in der Ruhephase. Es wurde darauf geachtet, dass in den Segmenten keine Artefakte und Herzrhythmusstörungen die Analyse beeinflussen. In jedem Segment wurden mithilfe des Moduls *ECG Analysis* der Software LabChart Pro die maximale, die minimale sowie die durchschnittliche Herzfrequenz ermittelt. Dazu erfasste die Software automatisch alle R-Zacken und visualisierte die Erkennung durch einen grünen Punkt über dem QRS-Komplex. Zur Bestimmung der Frequenzen wurden jeweils 10 Herzschläge gemittelt. Die korrekte Erfassung aller QRS-Komplexe der Maus durch die Software wurde nochmals manuell kontrolliert. Die Werte für die maximale, die durchschnittliche sowie die minimale Herzfrequenz aus allen 36 Segmenten wurden gesammelt und in eine Tabelle übertragen. Es wurde je ein Mittelwert aus den 36 Einzelwerten für die maximale, für die durchschnittliche und für die minimale Herzfrequenz bestimmt.

2.2.7.2 Herzfrequenzvariabilitätsanalyse der 24-Stunden-Elektrokardiogramme

Zur Erfassung der Herzfrequenzvariabilität wurden die Langzeit-Elektrokardiogramme der Ruhephase benutzt (7.00 Uhr-19.00 Uhr), um eine exakte und störungsfreie Analyse zu gewährleisten.

Um ein möglichst vergleichbares und reliables Ergebnis der Messung der Herzfrequenzvariabilität zu erhalten, müssen nach Thireau et al. mehrere Faktoren sichergestellt werden (Thireau et al. 2008).

1. Das für die Analyse verwendete Elektrokardiogramm muss über den gesamten Zeitraum einen stabilen Sinusrhythmus zeigen.
2. Das für die Analyse verwendete Elektrokardiogramm muss absolut frei von Artefakten und Rhythmusstörungen sein.

Da diese Faktoren aufgrund der großen Anzahl von Herzschlägen im 24-Stunden-EKG (bei einer Frequenz von $500^{-1} \text{ min} = 7,2 \times 10^5 \text{ Schläge/24h}$) nicht kontinuierlich gesichert werden können, müssen für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität einzelne Segmente ausgewählt und analysiert werden. Alle 60 min wurde ein störungsfreies Segment von 20

sec ausgewählt und gespeichert. Es wurde darauf geachtet, dass die Segmente möglichst exakt eine Dauer von 20 sec haben. Pro Maus ergaben sich so 12 Segmente in der Ruhephase zur Analyse der Herzfrequenzvariabilität. RR-Intervalle kleiner als 57 ms und größer als 300 ms wurden von der Software als Artefakte klassifiziert. In die Bewertung eingeflossen sind alle RR-Intervalle mit einer Dauer zwischen 70 bis 214 ms. In allen Segmenten sind mindestens 99 % der RR-Intervalle in die Auswertung eingeflossen. Zur Analyse der Herzfrequenzvariabilität wurden zwei verschiedene Messmethoden benutzt. Neben einer *Time Domain Analysis* wurde eine *Frequency Domain Analysis* durchgeführt. Zur Analyse wurde mit dem Modul *Heart Rate Variability* der Software LabChart Pro folgende Parameter erhoben:

	Parameter	Einheit	Definition
<i>Time Domain Analysis</i>	SDNN	ms	Standardabweichung aller RR-Intervalle
	r-MSSD	ms	Quadratwurzel des quadratischen Mittelwertes der Summe aller Differenzen zwischen benachbarten RR-Intervallen
	pNN6	%	Prozentualer Anteil aller RR-Intervalle, die sich um mindestens 6 ms vom vorherigen unterscheiden

Tabelle 3: Parameter der Zeitbereichsanalyse der Herzfrequenzvariabilität (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996)

	Parameter	Einheit	Definition
<i>Frequency Domain Analysis</i>	VLF	ms ²	Leistungsdichtespektrum im sehr niedrigen Frequenzbereich
	LF	ms ²	Leistungsdichtespektrum im niedrigen Frequenzbereich
	HF	ms ²	Leistungsdichtespektrum im hohen Frequenzbereich
	LF/HF	-	Verhältnis des Niedrigfrequenzspektrums zum Hochfrequenzspektrum
	Total Power	ms ²	Quantifizierung der Gesamtleistung über alle Frequenzbänder

Tabelle 4: Parameter der Frequenzanalyse der Herzfrequenzvariabilität (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996)

2.2.7.3 Time Domain Analysis

In der *Time Domain Analysis* wurden die Parameter SDNN, r-MSSD und pNN6 erhoben und ausgewertet. Nach den Empfehlungen von Thireau et al. 2008 wurde beim pNN ein Zeitintervall von 6 ms (pNN6) festgelegt, um hochfrequente Abweichungen der Frequenz zu erfassen.

2.2.7.4 Frequency Domain Analysis

Bei dieser Messmethode wurden mithilfe physikalisch-mathematischer Verfahren Analysen des Frequenzspektrums der Herzfrequenz durchgeführt. Durch eine Fourier-Transformation wandelte die Software mit einem mathematischen Algorithmus die zeitbezogenen Daten (Herzfrequenzabstände) in frequenzbezogene Daten um (Löllgen 1999). Bei der Auswertung dieser Spektren wurden drei Frequenzbereiche unterschieden:

sehr niedrige Frequenzen von 0-0,15 Hz (englisch: VLF für *Very Low Frequency*)

niedrige Frequenzen von 0,15-1,5 Hz (englisch: LF für *Low Frequency*)

hohe Frequenzen von 1,5-5 Hz (englisch: HF für *High Frequency*)

Weiterhin wurde die *Total Power* als Parameter zur Quantifizierung der Gesamtleistung über alle Frequenzbänder bestimmt. Durch die Berechnung des Quotienten aus niedrigem Frequenzband und hohem Frequenzband (LF/HF) kann die relative Gewichtung beider Frequenzanteile untersucht werden.

2.3 Statistik

Sämtliche Auswertungen der Versuchsdaten werden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von einer spezifischen Anzahl an Mäusen. Die Analysen erfolgten bezüglich des Genotyps geblindet. Als Signifikanztests wurden gepaarte und ungepaarte T-Tests verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde dabei als signifikanter Unterschied der Messwerte angesehen. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Messwerten wird in den folgenden Abbildungen durch einen Stern (*) dargestellt, ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) durch zwei Sterne (**) und ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) durch drei Sterne (***). Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software Prism 5 durchgeführt. Weiterhin wurden folgende Verfahren der deskriptiven Statistik angewandt:

Arithmetisches Mittel: Das arithmetische Mittel ist definiert als Summe aller Werte $\sum x$ dividiert durch die Anzahl der Werte (n)

Standardabweichung: Die Standardabweichung ist definiert als die Wurzel der Summe der quadrierten Abweichung aller Messwerte von

ihrem arithmetischen Mittel, dividiert durch die um eins verminderte Anzahl aller Messwerte

3. Ergebnisse

Insgesamt waren 29 unterschiedliche Versuchstiere an den Experimenten beteiligt.

Versuch	Anzahl der Tiere
Herzfrequenzanalyse	22 Mäuse (10 Panx ^{-/-} KO, 12 Panx ^{+/+} WT)
Herzfrequenzvariabilität	22 Mäuse (10 Panx ^{-/-} KO, 12 Panx ^{+/+} WT)
Schwimmversuch	20 Mäuse (7 Panx ^{-/-} KO, 13 Panx ^{+/+} WT)
Laufband ohne Steigung	14 Mäuse (7 Panx ^{-/-} KO, 7 Panx ^{+/+} WT)
Laufband mit Steigung	14 Mäuse (7 Panx ^{-/-} KO, 7 Panx ^{+/+} WT)

Tabelle 5: Anzahl der Mäuse in den einzelnen Versuchsabschnitten

3.1 Ergebnisse der Analyse der 24-Stunden-EKGs

Bei der Analyse der Herzfrequenzen und der Herzfrequenzvariabilität im Langzeit-EKG ergaben sich folgende Ergebnisse: Es wurden 24-Stunden-EKGs von 10 Panx1^{-/-} Mäusen und von 12 Panx1^{+/+} Mäusen analysiert. Die Elektrokardiogramme aller Mäuse konnten ausgewertet werden. Keine Maus starb während der Aufzeichnung oder unmittelbar danach.

3.1.1 Herzfrequenzanalyse

Bei der Analyse der Herzfrequenzen im Langzeit-EKG wurden die Parameter der minimalen, der maximalen sowie der mittleren Herzfrequenzen erhoben. Die minimale Herzfrequenz der Panx1^{+/+} Mäuse (425 ± 59 bpm) unterschied sich nicht signifikant von der minimalen Herzfrequenz der Panx1^{-/-} Mäuse (457 ± 85 bpm) ($p = 0,25$). Ebenso ließ sich bei der mittleren Herzfrequenz kein signifikanter Unterschied zwischen den Panx1^{+/+} Mäusen (514 ± 66 bpm) und den Panx1^{-/-} Mäusen (558 ± 84 bpm) feststellen ($p = 0,16$). Bei der maximalen Herzfrequenz zeigte sich ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen Panx1^{+/+} Mäusen (582 ± 57 bpm) und Panx1^{-/-} Mäusen (631 ± 81 bpm) ($p = 0,11$).

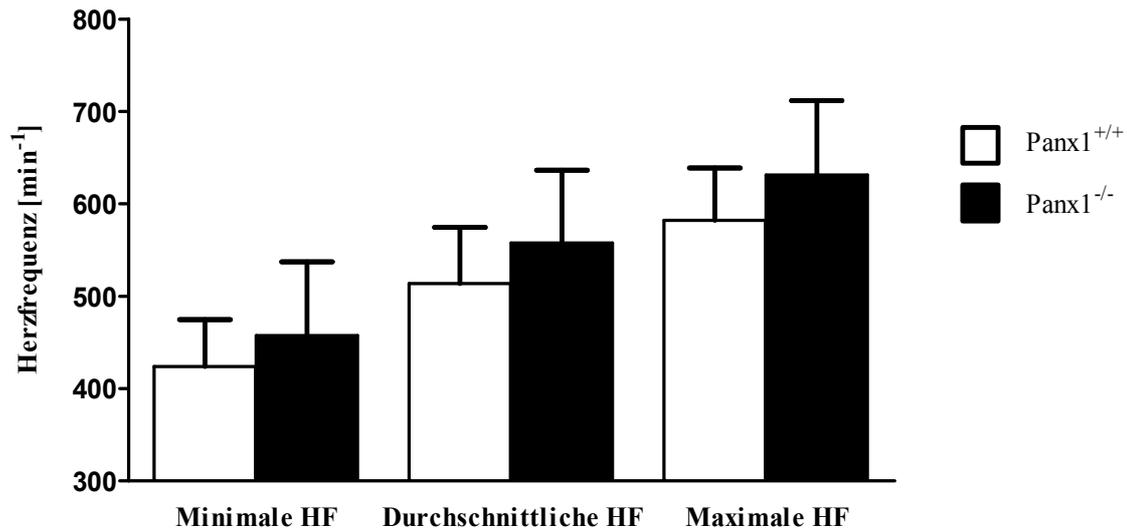


Abbildung 12: Vergleich der Herzfrequenzen im 24-Stunden-EKG

Dargestellt sind die minimale, die durchschnittliche sowie die maximale Herzfrequenz.

3.1.2 Herzfrequenzvariabilitätsanalyse

Bei der Analyse der Herzfrequenzvariabilität wurden die statistischen Parameter SDNN, r-MSSD, pNN6, Total Power, VLF, LF und HF und der Quotient aus LF/HF erhoben und verglichen. Es wurden Herzfrequenzvariabilitätsanalysen von 10 Panx1^{-/-} Mäusen und von 12 Panx1^{+/+} Mäusen erstellt. Das EKG einer Panx1^{+/+} Maus war so artefaktreich, dass es für die Auswertung der Herzfrequenzvariabilität nicht verwendet werden konnte.

Bei der *Time Domain Analysis* gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem SDNN der Panx1^{+/+} Mäuse ($9,69 \pm 2,66 \text{ ms}^2$) im Vergleich zu den Panx1^{-/-} Mäusen ($7,61 \pm 2,78 \text{ ms}^2$) ($p = 0,09$). Auch die Auswertung des r-MSSD ergab bei den Panx1^{+/+} Mäusen ($7,6 \pm 2,88 \text{ ms}^2$) im Vergleich zu den Panx1^{-/-} Mäusen ($6,34 \pm 3,57 \text{ ms}^2$) keine signifikante Differenz ($p = 0,38$). Der pNN6 unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen Panx1^{+/+} Mäusen ($28,68 \pm 14,4 \%$) und Panx1^{-/-} Mäusen ($24,31 \pm 20,53 \%$) ($p = 0,58$).

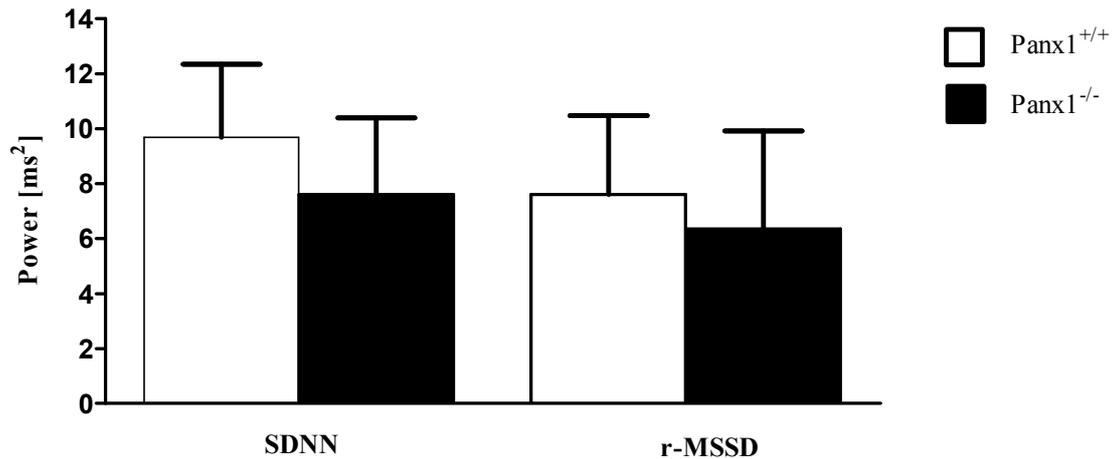


Abbildung 13: Vergleich des SDNN und des r-MSSD der Frequenzanalyse

Bei der Untersuchung der *Frequency Domain Analysis* mit den Parametern VLF, LF und HF ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Power der *Very Low Frequency* war bei den Panx1^{+/+} Mäusen ($33,81 \pm 21,36 \text{ ms}^2$) signifikant größer als bei den Panx1^{-/-} Mäusen ($16,93 \pm 12,24 \text{ ms}^2$) ($p = 0,041$). Der Vergleich der *Low Frequency* bei den Panx1^{-/-} Mäusen ($34,67 \pm 26,47 \text{ ms}^2$) mit den Panx1^{+/+} Mäusen ($59,23 \pm 40,25 \text{ ms}^2$) ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,12$) zwischen beiden Versuchsgruppen. Bei der *High Frequency* stellte sich zwischen den Panx1^{-/-} Mäusen ($19,58 \pm 15,83 \text{ ms}^2$) und den Panx1^{+/+} Mäusen ($26,32 \pm 24,37 \text{ ms}^2$) ebenfalls kein signifikanter Unterschied dar ($p = 0,47$).

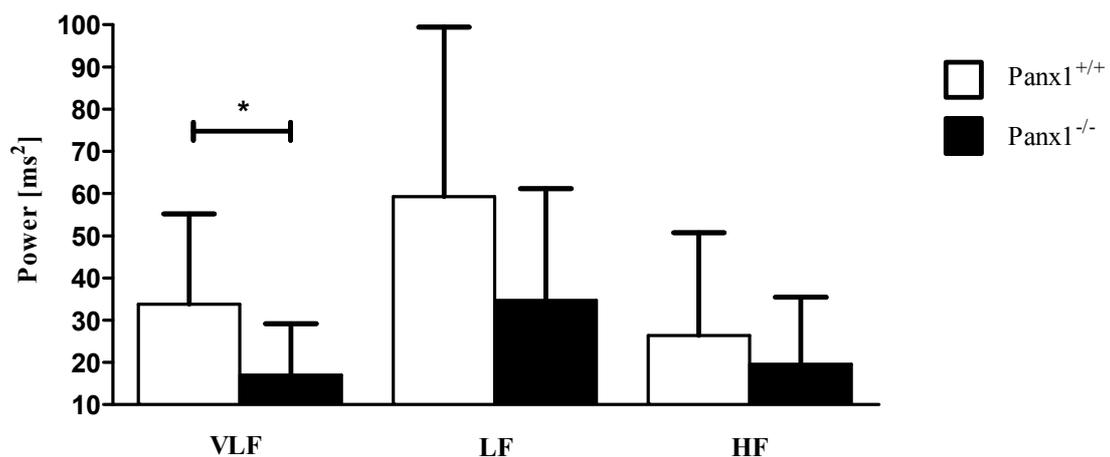


Abbildung 14: Vergleich von VLF, LF und HF der *Frequency Domain Analysis*

(* $p < 0,05$)

Der Quotient aus LF und HF (LF/HF) war bei den $Panx1^{+/+}$ Mäusen ($4,37 \pm 1,71$) nicht signifikant different im Vergleich zu den $Panx1^{-/-}$ Mäusen ($4,15 \pm 1,9$) ($p = 0,78$). Auch bei der *Total Power* stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den $Panx1^{+/+}$ Mäusen ($118,4 \pm 67,22 \text{ ms}^2$) im Vergleich zu den $Panx1^{-/-}$ Mäusen ($71,70 \pm 45,70 \text{ ms}^2$) dar ($p = 0,081$).

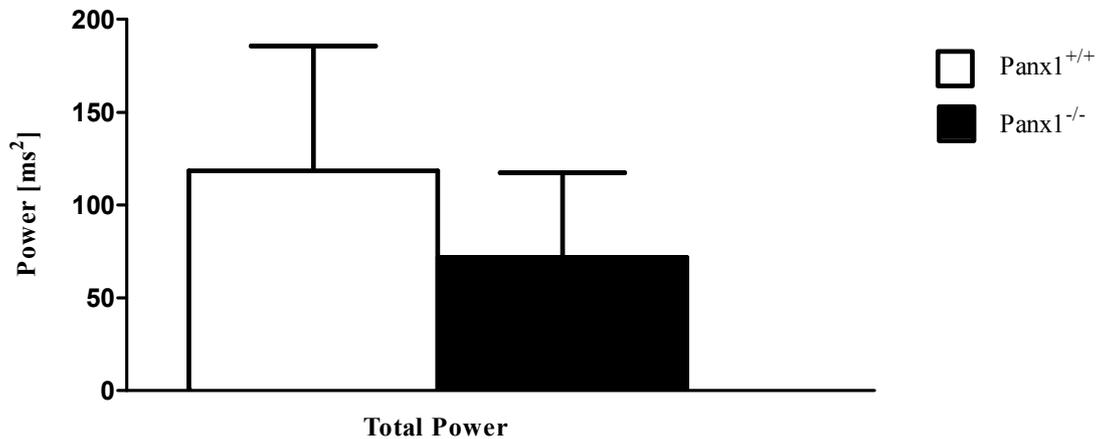


Abbildung 15: Vergleich der Total Power der *Frequency Domain Analysis*

3.2 Ergebnisse der Analyse der Schwimmversuche

Bei den Schwimmversuchen wurde die Herzfrequenz während der fünfminütigen Ruhephase, während des gesamten Schwimmversuchs und in der zehnmütigen Nachbelastungsphase erfasst. Der Schwimmversuch wurde mit 13 $Panx1^{+/+}$ Mäusen und mit 7 $Panx1^{-/-}$ Mäusen durchgeführt, wobei ein Elektrokardiogramm jeder Mauspopulation so artefaktreich war, das es für die Analysen nicht zur Verfügung stand. Keine Maus starb während des Schwimmversuchs oder unmittelbar danach.

Um eine signifikante Mehrbelastung der Tierorganismen zu beweisen, wurde zunächst die Ausgangsherzfrequenz der Tiere vor dem Schwimmversuch mit der maximalen Herzfrequenzen während des Schwimmversuchs verglichen. Hier zeigte sich bei den $Panx1^{-/-}$ Mäusen eine signifikant höhere maximale Herzfrequenz während des Schwimmversuchs ($792 \pm 15 \text{ bpm}$) im Vergleich zu der Ausgangsherzfrequenz vor dem Schwimmversuch ($694 \pm 87 \text{ bpm}$) ($p = 0,013$). Bei den $Panx1^{+/+}$ Mäusen fand sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der maximalen Herzfrequenz während des Schwimmversuchs ($774 \pm 37 \text{ bpm}$) im Vergleich zu der Ausgangsherzfrequenz vor dem Schwimmversuch ($623 \pm 114 \text{ bpm}$) ($p < 0,001$).

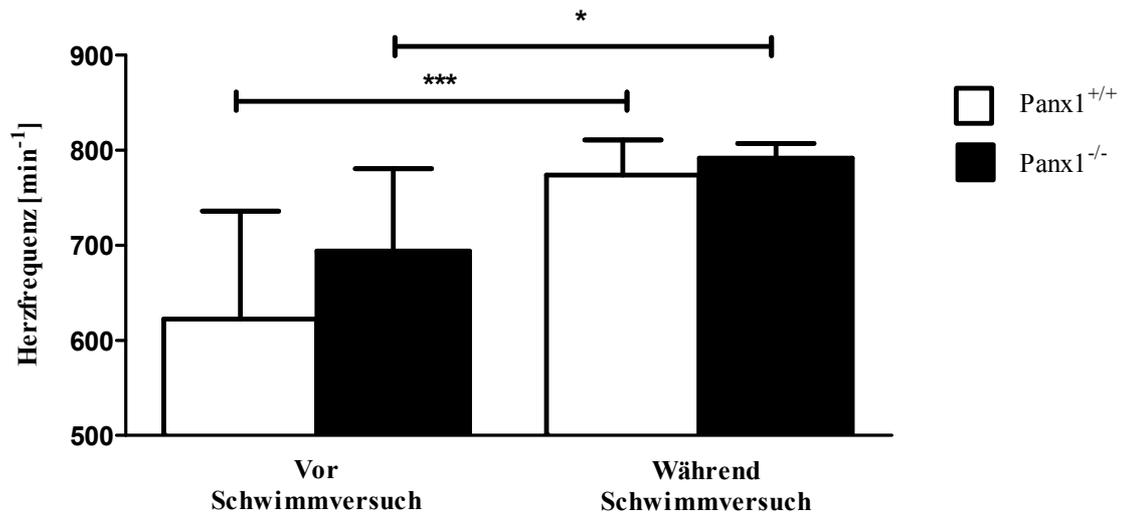


Abbildung 16: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Schwimmversuch

Dargestellt sind die Ausgangsherzfrequenzen beider Mauspopulationen vor dem Schwimmversuch (links) und die maximalen Herzfrequenzen beider Mauspopulationen während des Schwimmversuchs (rechts). (* $p < 0,05$) (** $p < 0,001$)

Die Analyse der Herzfrequenzen im Schwimmversuch ergab keine signifikanten Unterschiede der beiden Mauspopulationen. Die minimale Herzfrequenz der Panx1^{+/+} Mäuse während des Schwimmversuchs (607 ± 79 bpm) war nicht signifikant größer als die minimale Herzfrequenz der Panx1^{-/-} Mäuse (599 ± 71 bpm) ($p = 0,85$). Die mittleren Herzfrequenzen während des Schwimmversuchs waren bei den Panx1^{+/+} Mäusen (728 ± 51 bpm) und den Panx1^{-/-} Mäusen (725 ± 51 bpm) annähernd identisch ($p = 0,91$). Der Vergleich der maximalen Herzfrequenzen während des Schwimmversuchs ergab für die Panx1^{+/+} Mäuse (774 ± 37 bpm) und die Panx1^{-/-} Mäuse (792 ± 15 bpm) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,27$).

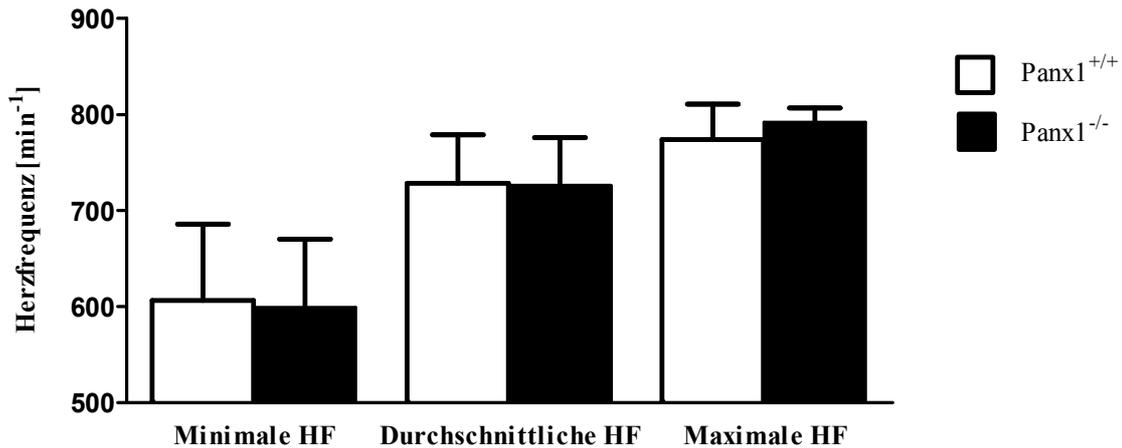


Abbildung 17: Vergleich der Herzfrequenzen im Schwimmversuch

Dargestellt sind die minimale, die durchschnittliche sowie die maximale Herzfrequenz

In der fünfminütigen Ruhephase vor dem Schwimmversuch sowie in der zehnminütigen Phase nach dem Schwimmversuch wurden die Herzfrequenzen der Tiere ebenfalls verglichen.

Die durchschnittliche Frequenz der Panx1^{+/+} Mäuse in der fünfminütigen Ruhephase vor dem Schwimmversuch (632 ± 115 bpm) unterschied sich nicht signifikant von der durchschnittlichen Frequenz der Panx1^{-/-} Mäuse (685 ± 82 bpm) ($p = 0,29$). Während der ersten fünf Minuten nach dem Schwimmversuch waren die durchschnittlichen Frequenzen der Panx1^{+/+} Mäuse (728 ± 24 bpm) nicht signifikant höher als die Frequenzen der Panx1^{-/-} Mäuse (718 ± 34 bpm) ($p = 0,45$). Auch zehn Minuten nach Ende des Schwimmversuchs ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den durchschnittlichen Frequenzen der Panx1^{+/+} Mäuse (729 ± 26 bpm) gegenüber den Panx1^{-/-} Mäusen (711 ± 42 bpm) feststellen ($p = 0,32$).

Zehn Minuten nach Ende des Schwimmversuchs waren die durchschnittlichen Herzfrequenzen der Panx1^{+/+} Mäuse noch signifikant höher (729 ± 26 bpm) im Vergleich zu den durchschnittlichen Herzfrequenzen der fünfminütigen Ruhephase vor dem Schwimmversuch (632 ± 115 bpm) ($p = 0,016$). Bei den Panx1^{-/-} Mäusen stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den durchschnittlichen Herzfrequenzen der fünfminütigen Ruhephase (694 ± 87 bpm) und den durchschnittlichen Herzfrequenzen zehn Minuten nach dem Schwimmversuch (711 ± 42 bpm) dar ($p = 0,065$).

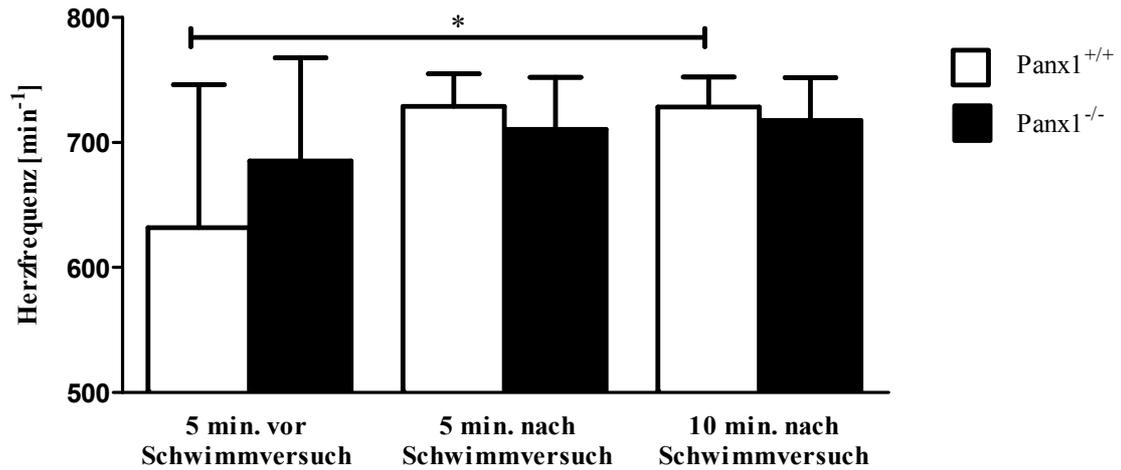


Abbildung 18: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen vor Beginn und nach Ende des Schwimmversuchs

Dargestellt sind die durchschnittlichen Herzfrequenzen 5 Minuten vor dem Schwimmversuch (links), 5 Minuten nach dem Schwimmversuch (Mitte) und 10 Minuten nach dem Schwimmversuch (rechts). (* $p < 0,05$)

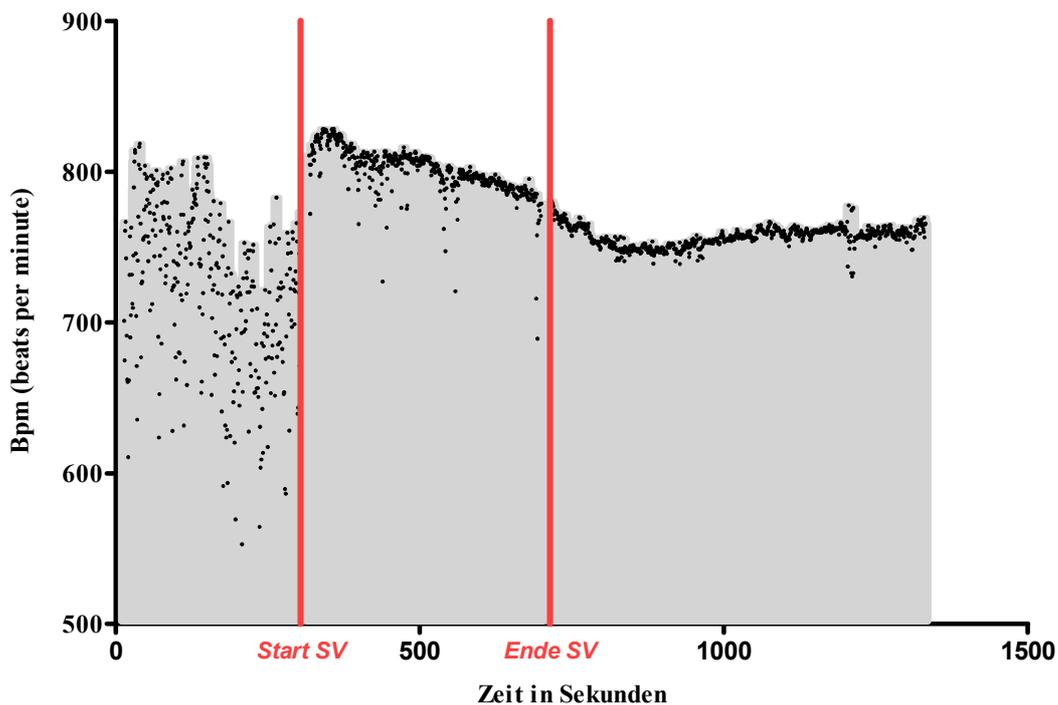


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung des Verlaufs der Herzfrequenz während des Schwimmversuchs

Die roten Linien kennzeichnen den Beginn und das Ende des Schwimmversuchs (SV). Zu sehen ist der abrupte Anstieg der Frequenz nach Beginn der Belastung und das kontinuierliche Abfallen der Frequenz nach dem Versuch.

3.3 Ergebnisse der Analyse der Laufbandversuche

3.3.1 Laufband ohne Steigung

Bei den Laufbandversuchen ohne Steigung wurde die Herzfrequenz während der fünfminütigen Ruhephase vor dem Versuch, während des gesamten Laufbandversuchs und in der zehnminütigen Phase nach der Belastung kontinuierlich erfasst. Der Laufbandversuch ohne Steigung wurde mit 7 $\text{Panx}^{-/-}$ Mäusen und mit 7 $\text{Panx1}^{+/+}$ Mäusen durchgeführt, wobei das EKG einer $\text{Panx}^{-/-}$ Maus aufgrund vieler Bewegungsartefakte nicht ausgewertet werden konnte. Keine Maus starb während des Laufbandversuchs oder unmittelbar danach.

Zunächst wurde bei den Laufbandversuchen ohne Steigung analog zu den Schwimmversuchen geprüft, ob eine signifikante Mehrbelastung des Tierorganismus beim Laufen auf dem Band im Vergleich zum Ruhezustand vorliegt. Dazu wurde die Ausgangsherzfrequenz in der fünfminütigen Ruhezeit vor dem Versuch in Relation zur maximalen Frequenz während des Laufbandversuchs gesetzt. Hier zeigte sich ein sehr signifikanter Unterschied zwischen der Ausgangsherzfrequenz der $\text{Panx1}^{+/+}$ Mäuse vor dem Laufbandversuch (669 ± 90 bpm) im Vergleich zu der maximalen Herzfrequenz während des Laufbandversuchs ohne Steigung (809 ± 12 bpm) ($p = 0,004$). Auch bei den $\text{Panx1}^{-/-}$ Mäusen ergab sich ein sehr signifikanter Unterschied zwischen der Ausgangsherzfrequenz vor dem Laufbandversuch (753 ± 39 bpm) gegenüber der maximalen Herzfrequenz während des Laufbandversuchs ohne Steigung (790 ± 15 bpm) ($p = 0,003$).

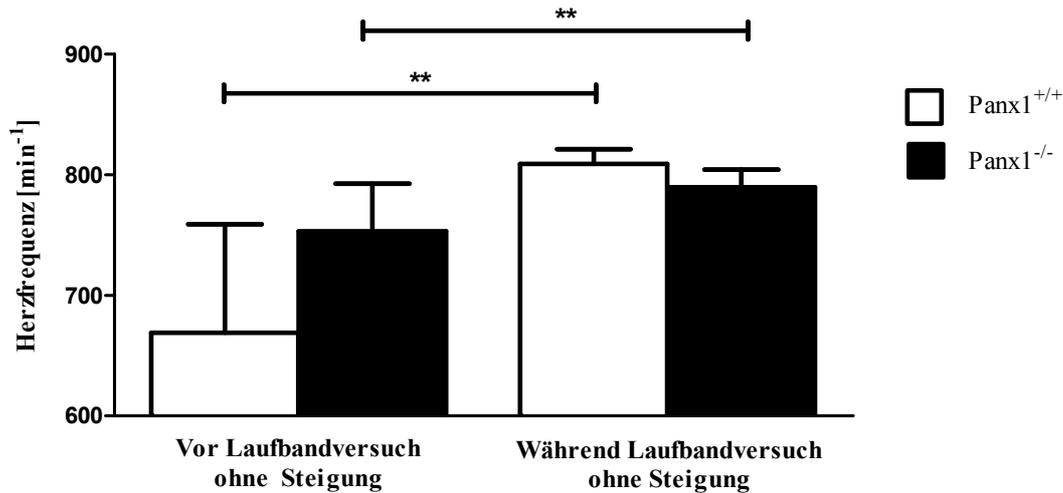


Abbildung 20: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Laufbandversuch ohne Steigung

Dargestellt sind die Ausgangsherzfrequenzen beider Mauspopulationen vor dem Laufbandversuch (links) und die maximalen Herzfrequenzen während des Laufbandversuchs (rechts).

(** p < 0,01)

Weiterhin wurden die Herzfrequenzen der Mäuse im Laufbandversuch ohne Steigung miteinander verglichen. Es wurden jeweils die minimale, die durchschnittliche sowie die maximale Herzfrequenz der Mäuse während des Laufbandversuchs gegenüber gestellt. Hier ergab sich für die minimale Herzfrequenz der Panx^{-/-} Mäuse während des Laufbandversuchs ohne Rampe (759 ± 22 bpm) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der minimalen Herzfrequenz der Panx1^{+/+} Mäuse (711 ± 85 bpm) ($p = 0,21$). Ebenso unterschied sich die durchschnittliche Herzfrequenz der Panx1^{-/-} Mäuse während des Laufbandversuches (776 ± 17 bpm) nicht signifikant von der durchschnittlichen Herzfrequenz der Panx1^{+/+} Mäuse (782 ± 12 bpm) ($p = 0,42$). Die Analyse der maximalen Herzfrequenz während des Laufbandversuchs ergab bei den Panx1^{-/-} Mäusen (790 ± 15 bpm) ebenfalls keine signifikante Differenz im Vergleich zu der maximalen Herzfrequenz der Panx1^{+/+} Mäuse (809 ± 12 bpm) ($p = 0,024$).

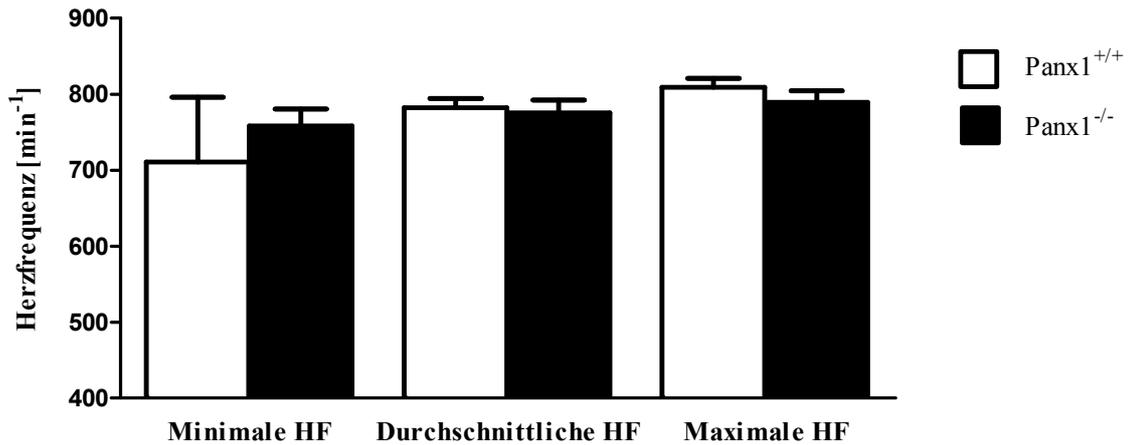


Abbildung 21: Vergleich der Herzfrequenzen im Laufbandversuch ohne Steigung
 Dargestellt sind die minimale, die durchschnittliche sowie die maximale Herzfrequenz.

Im Laufbandversuch ohne Steigung wurde die Geschwindigkeit des Laufbands im zeitlichen Abstand von 2 Minuten nach Angaben des Laufbandprotokolls erhöht. Die Anfangsgeschwindigkeit des Laufbands betrug zu Beginn des Versuchs 2 m/min. Die höchste erreichte Geschwindigkeit betrug bei den Panx^{+/+} Mäusen 22 m/min und bei den Panx^{-/-} Mäusen 20 m/min. Die durchschnittlich erreichte Geschwindigkeit auf dem Laufband unterschied sich bei den Panx1^{-/-} Mäusen ($18,0 \pm 1,5$ m/min) nicht signifikant von der durchschnittlich erreichten Geschwindigkeit der Panx1^{+/+} Mäuse ($18,29 \pm 2,6$ m/min) ($p = 0,81$).

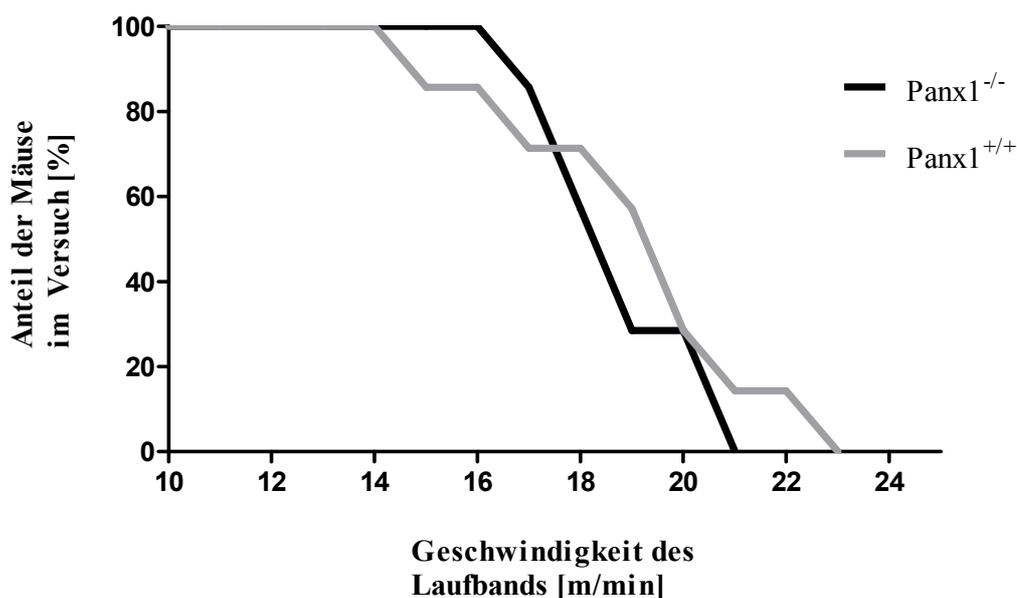


Abbildung 22: Vergleich des prozentualen Anteils der Mäuse auf dem Laufband in Relation zur

Geschwindigkeit des Laufbands

Als leistungsphysiologischer Parameter wurde die zurückgelegte Distanz in Metern auf dem Laufband von allen Mäusen dokumentiert und verglichen. Die durchschnittlich erreichte Distanz der $Panx1^{+/+}$ Mäuse auf dem Laufband (360 ± 97 m) war nicht signifikant größer als die durchschnittlich erreichte Distanz der $Panx1^{-/-}$ Mäuse (377 ± 101 m) ($p = 0,75$).

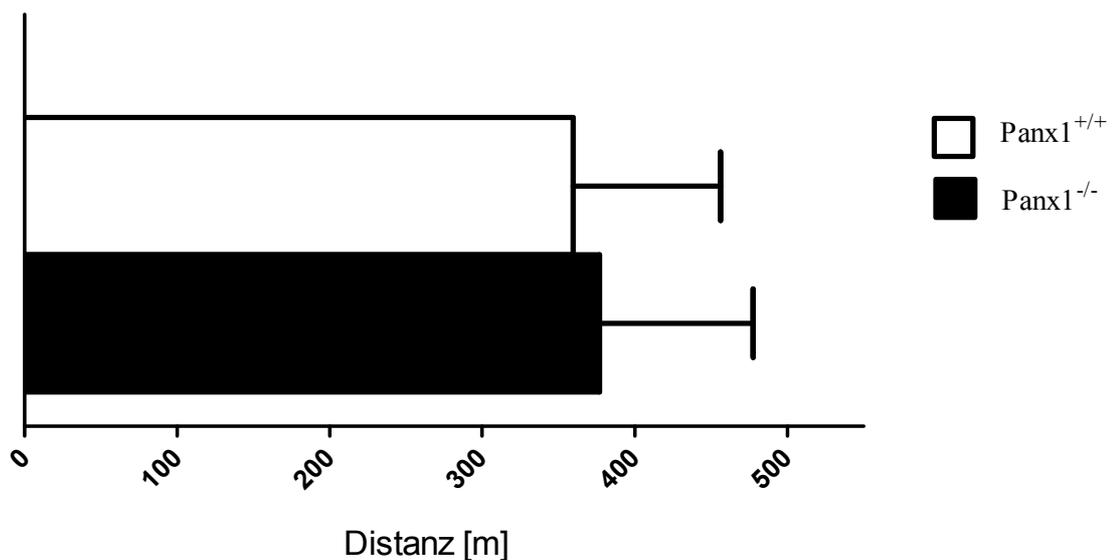


Abbildung 23: Durchschnittlich erreichte Distanz der Mäuse auf dem Laufband in Meter

3.3.2 Laufband mit Steigung

Die Herzfrequenzen bei den Laufbandversuchen mit Steigung wurden während der fünfminütigen Ruhephase vor dem Versuch, während des gesamten Laufbandversuchs und in der zehnminütigen Phase nach der Belastung kontinuierlich erfasst. Der Laufbandversuch mit Steigung wurde mit 7 $Panx1^{-/-}$ Mäusen und mit 7 $Panx1^{+/+}$ Mäusen durchgeführt, wobei das EKG einer $Panx1^{-/-}$ Maus aufgrund vieler Bewegungsartefakte nicht ausgewertet werden konnte. Keine Maus starb während des Laufbandversuchs oder unmittelbar danach.

Zunächst wurde die Ausgangsherzfrequenz vor dem Laufbandversuch mit Steigung in Relation zur maximalen Frequenz beim Laufbandversuch gesetzt, um die körperliche Mehrbelastung während des Laufbandversuchs darzustellen. Es stellte sich heraus, dass bei den $Panx1^{+/+}$ Mäusen zwischen der Ausgangsherzfrequenz vor dem Laufbandversuch (723

± 54 bpm) und der maximalen Herzfrequenz während des Laufbandversuchs (802 ± 16 bpm) ein sehr signifikanter Unterschied besteht ($p = 0,0036$). Bei den $Panx1^{-/-}$ Mäusen besteht beim Vergleich der Ausgangsherzfrequenz vor dem Versuch (758 ± 11 bpm) ein hochsignifikanter Unterschied zu der maximalen Frequenz während des Laufbandversuchs (790 ± 10 bpm) ($p < 0,0001$).

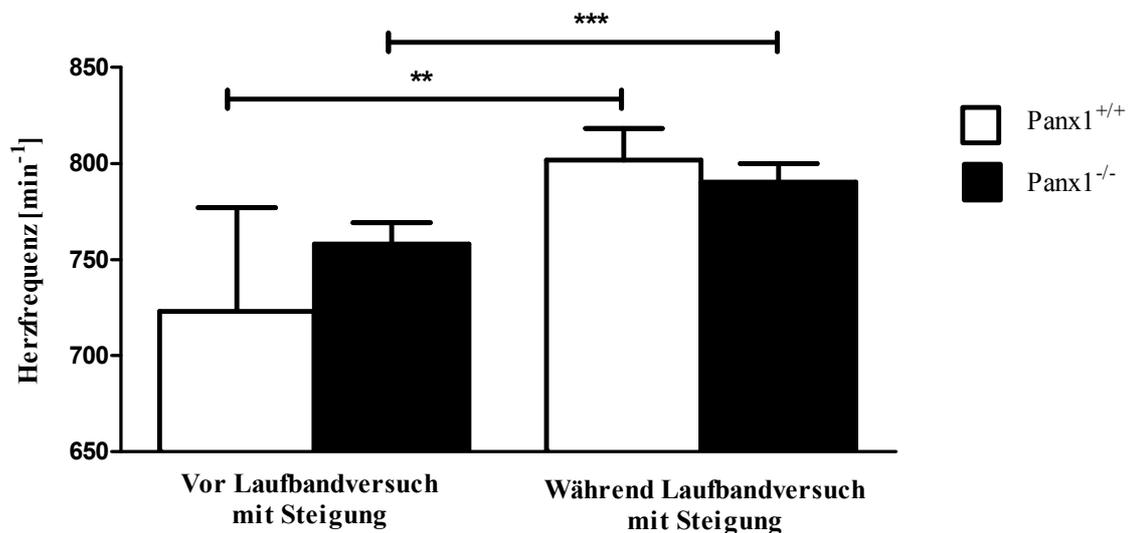


Abbildung 24: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Laufbandversuch mit Steigung

Dargestellt sind die Ausgangsherzfrequenzen beider Mauspopulationen vor Laufbandversuch (links) und die maximalen Herzfrequenzen während des Laufbandversuchs (rechts).

(** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

Beim Vergleich der minimalen, maximalen und durchschnittlich Herzfrequenzen beider Mauspopulationen während des Laufbandversuchs mit Steigung stellten sich folgende Ergebnisse dar: Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der minimalen Herzfrequenz der $Panx1^{+/+}$ Mäuse (723 ± 56 bpm) und der minimalen Herzfrequenz der $Panx1^{-/-}$ Mäuse (734 ± 32 bpm) ($p = 0,66$). Des Weiteren besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der durchschnittlichen Herzfrequenz der $Panx1^{+/+}$ Mäuse beim Laufbandversuch mit Steigung (782 ± 23 bpm) im Vergleich zu der durchschnittlichen Frequenz der $Panx1^{-/-}$ Mäusen Mäuse (777 ± 12 bpm) ($p = 0,60$). Auch bei der maximalen Herzfrequenz stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen $Panx1^{+/+}$ Mäusen (802 ± 16 bpm) und $Panx1^{-/-}$ Mäusen (790 ± 10) heraus ($p = 0,16$).

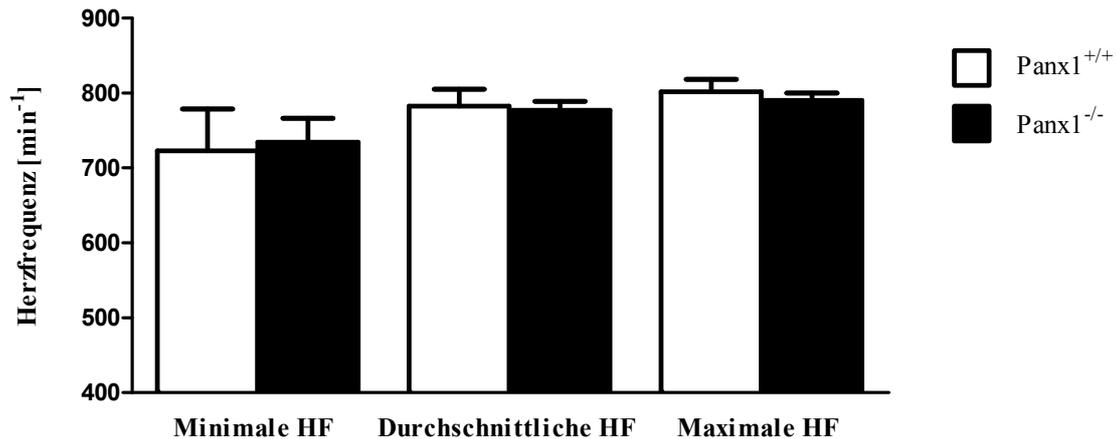


Abbildung 25: Vergleich der Herzfrequenzen im Laufbandversuch mit Steigung
 Dargestellt sind die minimale, die durchschnittliche sowie die maximale Herzfrequenz.

Um die Leistung der Versuchstiere zu quantifizieren wurde die zurückgelegte Distanz auf dem Laufband bis zur Leistungsgrenze miteinander verglichen. Ebenso wie beim Laufbandversuch ohne Steigung fand sich auch beim Laufband mit Steigung kein signifikanter Unterschied in der zurückgelegten Distanz auf dem Laufband. Die Distanz der Panx1^{+/+} Mäuse (259 ± 65 m) war nur geringfügig größer als die Distanz der Panx1^{-/-} Mäuse (252 ± 71 m) ($p = 0,86$).

3.4 Kontextrelevante Ergebnisse der Arbeitsgruppe

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Analyse der Herzfrequenzen, der Herzfrequenzvariabilität und den leistungsphysiologischen Parametern der Panx1-defizienten Maus. Andere Doktoranden im kardiovaskulären Forschungslabor des Bereichs Kinderkardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf haben gleichzeitig, als Teil eines übergeordneten Forschungsteams, andere Fragestellungen in Bezug auf die Panx1-defiziente Maus untersucht. Diese Ergebnisse werden hier kurz vorgestellt und erläutert:

Lisa Girgenrath untersuchte die Elektrokardiogramme beider Mauspopulationen auf rhythmologische Pathologien wie AV-Blöcke, AV-Dissoziationen und Extrasystolen. Sie stellte fest, dass die Pannexin-1-defizienten Mäuse unter Ruhebedingungen signifikant häufiger Rhythmusstörungen in Form von AV-Blockierungen II° aufweisen. In den Schwimm- und Laufbandversuchen zeigte sich selbst unter maximaler körperlicher

Aktivität in keiner der beiden Mauspopulationen eine erhöhte Anzahl von Herzrhythmusstörungen.

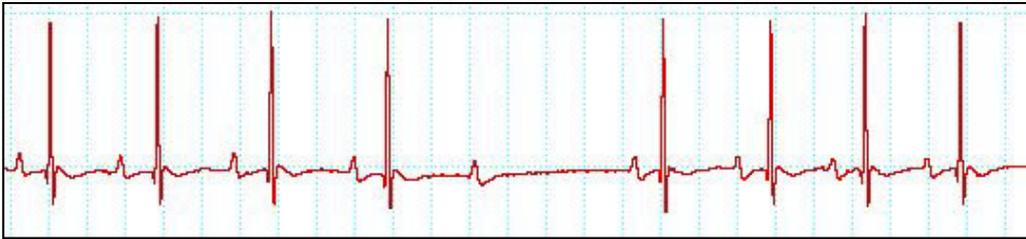


Abbildung 26: Darstellung einer AV-Blockierung im telemetrischen EKG einer Maus

Sofia Klein errechnete die QT-Zeiten in den Elektrokardiogrammen. Sie ermittelte eine signifikant höhere korrigierte QT-Zeit (nach Mitchell et al.) bei den Panx1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen.

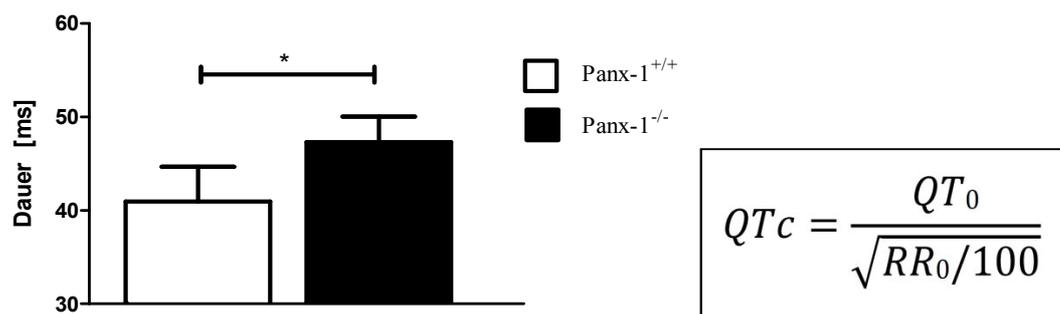


Abbildung 27: Darstellung der korrigierten QT-Zeit (QTc) (nach Mitchell et al.) Panx1 defiziente Mäuse sind durch schwarze Balken, Wildtypen durch weiße Balken repräsentiert.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer Pannexin-1-Defizienz auf den kardialen Phänotyp der Maus zu untersuchen. Dazu wurden telemetrische Elektrokardiogramme von $Panx1^{-/-}$ Mäusen und $Panx1^{+/+}$ Mäuse aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Insbesondere wurden die Herzfrequenzen untereinander verglichen, die Herzfrequenzvariabilität untersucht und die Leistungsphysiologie beurteilt. Es gibt derzeit noch keine veröffentlichte, wissenschaftliche Studie, in der die kardialen elektrischen Aktivitäten von $Panx1^{-/-}$ Mäusen *in vivo* untersucht wurden. Die bisherigen Erkenntnisse über Panx1 resultieren überwiegend aus publizierten Studien, in denen der Kanal *in vitro* mithilfe molekularbiologischer und elektrophysiologischer Methoden untersucht wurde.

4.1 Diskussion der Herzfrequenzanalyse

Die Herzfrequenz kann als Indikator für die Gesundheit und Wohlergehen der Tiere verwendet werden (Broom und Johnson 1993). Da eine erhöhte Herzfrequenz oftmals eine Adaption des Tierorganismus an erhöhte Stresspegel darstellt, ist die Herzfrequenz ein guter Parameter für die Untersuchung des kardialen Phänotyps (Herd 1991; Hau und Schapiro).

4.1.1 Diskussion der Methodik der Herzfrequenzanalyse

Neben Umweltbedingungen, Tageszeit und Aktivitätslevel beeinträchtigt auch die Methodik der Messungen die Herzfrequenz der Mäuse. In dieser Studie wurden implantierbare Transmitter gewählt, sodass sich die Mäuse frei und möglichst natürlich in ihrem Käfig bewegen können. Durch Fixierung, Anästhesie oder Katheterisierung der Mäuse während der Messungen können sich jedoch erhebliche Konfundierungseffekte entwickeln. So stellen sich die durchschnittlichen Herzfrequenzen von C57Bl/6 Wildtypen aus Studien mit telemetrischer Datenerhebung (siehe Tabelle 6) signifikant niedriger als die durchschnittlichen Herzfrequenzen aus Studien mit Katheterisierung oder Fixation während der Messungen dar ($p = 0,0005$).

Mittlere Herzfrequenz	Studie	Möglicher Confounder
-----------------------	--------	----------------------

622 ± 20 bpm	Barbee et al. 1994	Fixierung der Tiere während Messungen
627 ± 21 bpm	Mattson 1998	Manipulation durch arteriellen Katheter
594 ± 9 bpm	Mattson 2001	Manipulation durch arteriellen Katheter
630 ± 69 bpm	Campen et al. 2005	Manipulation durch arteriellen Katheter
478 ± 11.4 bpm	Constantinides et al.	Anästhesie mit 1,5% Isofluran

Tabelle 6: Einfluss möglicher Confounder auf die mittlere Herzfrequenz von C57Bl/6 Wildtypen

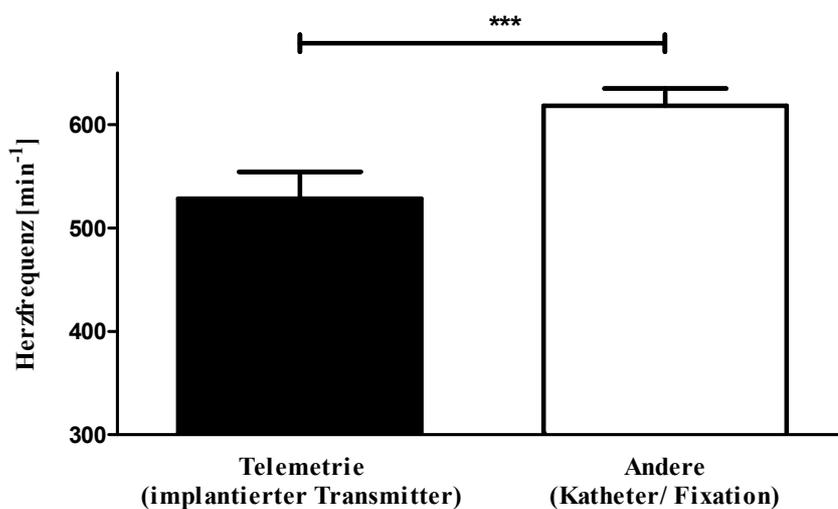


Abbildung 28: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen

Dargestellt sind die durchschnittlichen Herzfrequenzen aus Studien mit Einsatz von Telemetrie (n=5) (links) und Studien mit Einsatz von Katheterisierung oder Fixation während den Messungen (rechts) (n=4). (***) p < 0,001)

Diese Untersuchungen zeigen, dass ein implantierbarer Transmitter mit weniger Stress für die Tiere einhergeht als eine dauerhafte Manipulation durch einen Katheter oder eine Fixierung während der Messungen. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die Verwendung von Transmittern der Goldstandard für die Evaluation von kardiovaskulären Parametern wie Herzfrequenz oder Blutdruck bei kleinen Versuchstieren wie der Maus.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse der Herzfrequenzanalyse

Die durchschnittliche Herzfrequenz der C57Bl/6 Wildtypen in den EKG-Ableitungen stellte sich annähernd identisch mit den Resultaten anderer veröffentlichter Studien mit

vergleichbarer Methodik dar (Desai et al. 1997; Rohrer et al. 1996; Johansson et al. 1999, Uechi et al. 1998). Es gibt derzeit keine Studie, in der die Herzfrequenz von $Panx1^{-/-}$ Mäusen telemetrisch erfasst wurde.

Mittlere Herzfrequenz	Anzahl der Tiere	Studie
$Panx1^{+/+}$ (C57Bl/6)		
514 ± 66 bpm	12	vorliegende Arbeit
501 ± 14 bpm	14	Desai et al. 1997
521 ± 25 bpm	6	Rohrer et al. 1996
538 ± 12 bpm	10	Johansson et al. 1999
568 ± 28 bpm	26	Uechi et al. 1998
$Panx1^{-/-}$ (C57Bl/6)		
558 ± 84 bpm	10	vorliegende Arbeit

Tabelle 7: Vergleich der publizierten mittleren Herzfrequenzen von wachen, sich frei bewegenden Wildtypen und $Panx1^{-/-}$ Mäusen.

In der Literatur wird eine Normfrequenz von 450-550 Schlägen pro Minute unter Ruhebedingungen für den Stamm C57Bl/6 angegeben (Bernstein 2003). Die tatsächliche Herzfrequenz der Maus ist dabei abhängig von Tageszeit, Umweltbedingungen und Aktivitätslevel und unterliegt einer physiologischen Regulationsbreite (Ho et al. 2011). Diese reicht von einer Herzfrequenz von 400-450 Schlägen pro Minute während des Schlafs bis 750-800 Schlägen pro Minute während maximalem Stress (Hau et al. 2013).

Die maximal erreichbare Herzfrequenz der C57Bl/6 Wildtypen wird einheitlich bei 750-800 Schlägen pro Minute gemessen (Kramer et al. 1993; Stiedl et al. 2004; Hau und Schapiro). Diese hohen Frequenzen wurden in Belastungstests, aber auch während maximalem Stress wie Fixierung der Tiere oder Manipulationen am Käfig erreicht (Kramer et al. 1993). Wie Tabelle 8 zu entnehmen, unterscheiden sich die maximalen Frequenzen sowohl der $Panx1^{-/-}$ Mäuse als auch der $Panx1^{+/+}$ Mäuse in keinem der Belastungstests signifikant von den maximalen Frequenzen anderer Untersuchungen, die in der Literatur beschrieben sind.

Maximale Frequenzen	Studie
---------------------	--------

750-800 bpm	Kramer et al. 1993
750-800 bpm	Hau et al. 2013
~ 800 bpm	Stiedl et al. 2004
840 bpm	Bernstein 2003
Panx1^(+/+) (C57Bl/6)	Vorliegende Arbeit
790 ± 15 bpm	Laufband ohne Steigung
790 ± 10 bpm	Laufband mit Steigung
792 ± 15 bpm	Schwimmversuch
Panx1^(-/-) (C57Bl/6)	Vorliegende Arbeit
809 ± 12 bpm	Laufband ohne Steigung
802 ± 16 bpm	Laufband mit Steigung
774 ± 37 bpm	Schwimmversuch

Tabelle 8: Vergleich der publizierten maximalen Herzfrequenzen mit den maximalen Herzfrequenzen in den einzelnen Belastungsversuchen

Zusammengefasst unterschieden sich weder die durchschnittlichen Herzfrequenzen noch die maximalen Herzfrequenzen signifikant von den Herzfrequenzen der C57Bl/6 Wildtypen, die in anderen Studien mit freibeweglichen Mäusen und vergleichbarer Methodik ermittelt wurden (siehe Tabelle 6 und Tabelle 8). Es gibt derzeit noch keine veröffentlichten Messwerte zu durchschnittlichen und maximalen Herzfrequenzen von Panx1^{-/-} Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt kann davon ausgegangen werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Herzfrequenz unter Ruhebedingungen und auf die maximale Herzfrequenz unter Belastung hat.

4.2 Diskussion der Herzfrequenzvariabilität

Die Herzfrequenzvariabilität bietet Hinweise, um einerseits den Zustand des autonomen Nervensystems der Maus zu untersuchen und auf der anderen Seite, die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu eruieren. Da eine herabgesetzte Variabilität der Herzfrequenz nachweislich als unabhängiger Prädiktor für eine Vielzahl von Pathologien wie kongestivem Herzversagen und plötzlichem Herztod fungiert, ist eine Untersuchung der

Herzfrequenzvariabilität nicht nur von akademischem Interesse, sondern auch klinisch relevant (Thireau et al. 2008; Bigger et al. 1992; Sandercock und Brodie 2006; Chiou und Zipes 1998). Beispielsweise wurden in mehreren Untersuchungen bewiesen, dass die Herzfrequenzvariabilität praktisch verwendet werden kann, um die Mortalität nach stattgefundenem Myokardinfarkt einzuschätzen (Bigger et al. 1992; Malik et al. 1989; Kleiger et al. 1987).

4.2.1 Diskussion der Methodik der Herzfrequenzvariabilitätsanalyse

Die quantitative Einordnung der Messwerte der Herzfrequenzvariabilität im Kontext zu anderen Studien ist nur bedingt möglich, da aufgrund ungeeigneter standardisierter Messprotokolle für die Untersuchung der Herzfrequenzvariabilität bei der Maus eine Vergleichbarkeit nur eingeschränkt vorhanden ist.

Während für die Untersuchung der Herzfrequenzvariabilität beim Mensch schon einheitliche Standards herrschen, ist die Studienlage für die Durchführung der Herzfrequenzvariabilität bei der Maus noch unzureichend (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Uneinheitlich sind vor allem die unterschiedliche Länge der Segmente für die Herzfrequenzvariabilitätsanalyse, der Umgang mit Artefakten und Rhythmusanomalien und die unterschiedlichen Einstellungen der Messparameter bei der *Frequency Domain Analysis*.

Mit der Absicht, einen einheitlichen Standard für die Dauer der zu analysierenden Segmente festzulegen, postulierte Thireau et al. eine optimale Länge von 3 Minuten alle 2 Stunden (Thireau et al. 2008). Beim Versuch dieses Protokoll umzusetzen, fanden sich jedoch in dieser Arbeit bei den Mäusen während des dreiminütigen Messintervalls ektope Herzaktionen und Artefakte. Diese führen nachweislich zu Verzerrungen der Messergebnisse und dürfen in der Analyse der Herzfrequenzvariabilität keine Verwendung finden (Lippman et al. 1994). Thireau et al. empfiehlt daher, Ektopien, Artefakte und Rhythmusanomalien aus den Messungen zu exkludieren. Lippman et al. zeigten jedoch, dass der bei diesem Vorgehen entstehende Datenverlust ebenfalls zu einem nachweisbaren *Bias* der Messergebnisse führt (Lippman et al. 1994).

Segmentlänge für HRV-Analyse	Studie
-------------------------------------	---------------

20 Sekunden	vorliegende Arbeit
30 Sekunden	Uechi et al. 1998
120 Sekunden	Gehrmann et al. 2000
120 Sekunden	Tankersley et al. 2004
180 Sekunden	Thireau et al. 2008
120-180 Sekunden	Ishii et al. 1996

Tabelle 9: Vergleich der publizierten Längen der EKG-Segmente für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität

Aufgrund dieser Problematik wurde die von Thireau et al. empfohlene Methodik in der vorliegenden Arbeit nicht übernommen. Die Länge der Segmente wurde stattdessen auf 20 Sekunden reduziert und das Intervall auf 60 Minuten erhöht. Mit diesem Kompromiss konnte gewährleistet werden, dass die Segmente möglichst frei von Ektopien und Artefakten sind, sich keine Rhythmusstörungen finden lassen und die isoelektrische Linie horizontal verläuft.

Auch die Empfehlungen für die optimalen Intervalle der Frequenzspektren in der *Frequency Domain Analysis* unterscheiden sich. Während die *Very Low Frequency* einheitlich im Spektrum zwischen 0-0,15 Hertz und die *Low Frequency* im Spektrum bei >0,15 Hertz gedeutet werden kann, gehen die Meinungen über das optimale Intervall des Spektrums bei der *High Frequency* auseinander. Baudrie et al. empfiehlt bei der *High Frequency* das Spektrum von 2,5-5 Hertz zu verwenden (Baudrie et al. 2007). Im Gegensatz dazu befürwortet Thireau et al. ein erweitertes Intervall von 1,5-5 Hertz, um etwaige Variabilitäten im Spektrum der *High Frequency* abbilden zu können (Thireau et al. 2008). In dieser Arbeit lagen die Höhepunkte der Frequenzspektren der *High Frequency* im Bereich von 2,4 Hertz (siehe Abbildung 5). Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Thireau et al., welche ebenfalls den Höhepunkt der Frequenzspektren der *High Frequency* bei 2,4 Hertz gemessen haben (Thireau et al. 2008). Aufgrund dieser Übereinstimmungen sind die Frequenzempfehlungen von 1,5-5 Hertz für die *High Frequency* von Thireau et al. in der vorliegenden Arbeit übernommen worden. So kann das Frequenzspektrum optimal dargestellt und auch die Variabilität der *High Frequency* abgebildet werden.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Herzfrequenzvariabilitätsanalyse

In der *Time Domain Analysis* wurden die Parameter SDNN, r-MSSD, pNN6 ausgewertet. Es zeigte sich in keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Für die Parameter r-MSSD und pNN6 bedeutet dies, dass sich Panx1^{+/+} Mäuse und Panx1^{-/-} Mäuse in ihrem Parasympathikotonus nicht signifikant unterscheiden. Der Parameter SDNN sagt aus, dass die beiden Genotypen auch in der Gesamtvariabilität des autonomen Nervensystems nicht signifikant voneinander abweichen.

In der *Frequency Domain Analysis* wurden die Parameter *Low Frequency*, *High Frequency*, *Very Low Frequency* und der Quotient aus *Low Frequency* und *High Frequency* (LF/HF) untersucht. Als weiterer Marker für den Parasympathikotonus bestätigt der fehlende signifikante Unterschied in der *High Frequency* die Ergebnisse der Parameter r-MSSD und pNN6 der *Time Domain Analysis*. Ebenso bestätigt das insignifikante Ergebnis der *Total Power* als Indikator für die Gesamtvariabilität des autonomen Nervensystems die Untersuchung der SDNN der *Time Domain Analysis*. Da auch im Quotient LF\HF kein signifikante Differenz gemessen wurde, unterscheiden sich Panx1^{+/+} Mäuse und Panx1^{-/-} Mäuse folglich ebenfalls nicht in der Balance zwischen Parasympathikus und Sympathikus. Somit kann festgestellt werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz weder messbare Auswirkungen auf die parasympathische autonome Herzregulation noch auf Gesamtvariabilität und die sympatho-vagale Balance des autonomen Nervensystems der Maus hat.

Bei der *Low Frequency* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Panx1^{+/+} Mäusen und Panx1^{-/-} Mäusen. Die Interpretation der *Low Frequency* wird in der derzeitigen Literatur kontrovers diskutiert und ist nicht abschließend geklärt. Bis die physiologische Relevanz der *Low Frequency* nicht eindeutig geklärt ist, kann dieses Spektrum nicht interpretiert werden.

Interpretation der Low Frequency	Studie
LF reflektiert sympathische und vagale Aktivität	Houle und Billman 1999
LF reflektiert sympathische und vagale Aktivität	Pomeranz et al. 1985
LF reflektiert sympathische Aktivität	Inoue et al. 1990
LF reflektiert sympathische Aktivität	Malliani et al. 1991

Tabelle 10: Vergleich der Interpretationen der *Low Frequency* in der *Frequency Domain Analysis*

In der *Very Low Frequency* zeigte sich zwischen den beiden Genotypen ein signifikanter Unterschied. $Panx1^{-/-}$ Mäuse zeigten in den Untersuchungen im Vergleich zu $Panx1^{+/+}$ Mäusen eine signifikant reduzierte Power in der *Very Low Frequency*. Eine Bedeutung der *Very Low Frequency* in der autonomen Regulation der Herzfrequenz ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings wurde in mehreren Studien eine Assoziation zwischen einer reduzierten Power der *Very Low Frequency* und der kardialen Mortalität gefunden. Bigger et al. untersuchte die Power der *Very Low Frequency* nach stattgefundenem Myokardinfarkt beim Mensch und stellte eine negative Korrelation zwischen der *Very Low Frequency* und der kardialen Mortalität dar. Eine reduzierte *Very Low Frequency* war in dieser Untersuchung insbesondere assoziiert mit einem erhöhten Risiko für tödliche kardiale Arrhythmien und dem plötzlichen Herztod (Bigger et al. 1993). Des Weiteren konnte beim Mensch gezeigt werden, dass eine erniedrigte Power der *Very Low Frequency* ein unabhängiger Prädiktor für die Morbidität und Mortalität bei Traumatpatienten ist (Ryan et al. 2011).

Diese Erkenntnisse über die erniedrigte Power der *Very Low Frequency* besitzen eine vergleichbare Kausalität wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse der Arbeitsgruppe. Durch die Untersuchungen der $Panx1^{-/-}$ Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz mit einer signifikant höheren Anzahl von Rhythmusstörungen (AV-Blöcke und Vorhofflimmern), aber einer signifikant reduzierten Power der *Very Low Frequency* in der *Frequency Domain Analysis* einhergeht.

Die *Very Low Frequency* kann demnach sowohl im murinen Tiermodell als auch beim Mensch ein Prädiktor für Anomalien des Herzrhythmus dienen. Ob die reduzierte *Very Low Frequency* bei den $Panx1^{-/-}$ Mäusen ebenfalls, wie bei den Untersuchungen am Mensch, mit einer erhöhten Mortalität einhergeht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.3 Diskussion der Belastungsversuche

Die Belastungsversuche bei der Maus dienen dazu, die elektrokardiografische Reaktion des Tierorganismus auf eine Stressbelastung zu untersuchen und die Leistungsphysiologie der Mauspopulationen miteinander zu vergleichen. In dieser Arbeit wurden mit einem Schwimmversuch und zwei unterschiedlichen Laufbandversuchen die etabliertesten

Methoden ausgewählt, um das kardiovaskuläre System der Maus gezielt zu beanspruchen (Hoit und Walsh 2002).

4.3.1 Diskussion der Methodik der Belastungsversuche

Beide in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Belastung des kardiovaskulären Systems der Maus (Laufbandversuch und Schwimmversuch) haben Vorteile und Nachteile. Der Vorteil der Laufbandversuche gegenüber den Schwimmversuchen liegt in der exakten Quantifizierung der Arbeitsbelastungen und somit in einer besseren Vergleichbarkeit der Messdaten (Fox et al. 2007). Des Weiteren kann die Intensität der Belastung kontinuierlich gesteigert und für alle Mäuse standardisiert werden. Durch die Verwendung zweier Laufbandprotokolle konnten sowohl die Belastung in der Ebene als auch die Belastung unter Steigung des Laufbandes gemessen werden. Im Schwimmversuch wird dagegen eine kontinuierliche submaximale Belastung von 60 - 75 % der Leistungsgrenze erreicht, die sich jedoch aufgrund einer Vielzahl von Einflussfaktoren schlecht quantifizieren lässt.

Der Vorteil des Schwimmversuchs gegenüber dem Laufbandversuch liegt zum einen in der einfacheren Durchführbarkeit und den geringeren Materialkosten. Zum anderen kombiniert der Schwimmversuch eine konstante submaximale Belastung mit erheblichem emotionalem Stress und erfordert so eine Anpassung des kardiovaskulären Systems der Maus (American Physiological Society 2006).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass nur durch ein gleichzeitiges Verwenden beider Methodiken ein umfassendes und detailliertes Bild über die Leistungsphysiologie der beiden Mauspopulationen dargestellt werden kann.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Belastungsversuche

Die Belastung auf dem Laufband und im Schwimmversuch ist seit Entwicklung der Radiotelemetrie ein allgemein anerkanntes Instrument, um kontrollierten physiologischen Stress auf das kardiovaskuläre System der Maus auszuüben (Hoit und Walsh 2002). In dieser Arbeit wurden mit den Tieren jeweils zwei Laufbandversuche und ein Schwimmversuch durchgeführt.

	Durchschnittliche Herzfrequenz	
Belastungstest	Panx1 ^{+/+}	Panx1 ^{-/-}

Schwimmversuch	728 ± 51 bpm	725 ± 51 bpm
Laufband mit Steigung	782 ± 23 bpm	777 ± 12 bpm
Laufband ohne Steigung	782 ± 12 bpm	776 ± 17 bpm

Tabelle 11: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen in den Belastungstests

Die durchschnittlichen Frequenzen der Laufbandversuche waren für beide Mauspopulationen identisch. Dies zeigt, dass die Belastungsintensität des Laufbandes ohne Steigung vergleichbar hoch ist wie die Belastungsintensität des Laufbandes mit Steigung. Die Herzfrequenzen sowohl der Panx1^{-/-} Mäuse als auch der Panx1^{+/+} Mäuse waren in beiden Versuchen nahe an der physiologischen Grenze.

Eine maximale anaerobe Ausbelastung im Laufbandversuch bei vergleichbaren Geschwindigkeiten wurde zudem durch Ferreira et al. 2007 mithilfe Untersuchungen der Laktat-Konzentrationen im Blut der Maus während der Belastung belegt. Bei einer Geschwindigkeit von 18 m/min auf dem Laufband überschritten die Mäuse deutlich die anaerobe Schwelle, was zu einer Akkumulation des Laktats im Blut der Maus führte. In der vorliegende Arbeit erreichten die Panx1^{-/-} Mäuse eine maximale Geschwindigkeit von 18,0 ± 1,5 m/min und die Panx1^{+/+} Mäuse von 18,29 ± 2,6 m/min. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass in der vorliegenden Arbeit eine metabolische Ausbelastung sowohl der Panx1^{+/+} Mäuse als auch der Panx1^{-/-} Mäuse erreicht wurde (Ferreira et al. 2007).

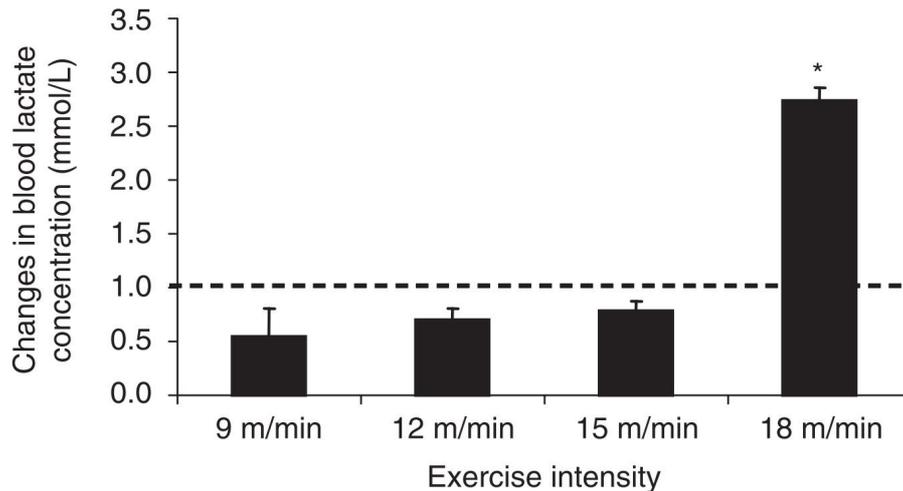


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit des Laufbandes und Laktat-Konzentration im Blut der Maus (aus Ferreira 2007)

Die Herzfrequenzen im Schwimmversuch waren analog zur submaximalen Belastung beim Schwimmen signifikant niedriger als in den Laufbandversuchen. Bei den $Panx1^{-/-}$ Mäuse unterschied sich die durchschnittliche Frequenz um 52 bpm und bei den $Panx1^{+/+}$ Mäuse um 54 bpm.

Als Parameter für den Vergleich der Leistungsgrenze der Mäuse wurde neben der Herzfrequenz auch die zurückgelegte Distanz auf dem Laufband bis zum Abbruch des Experiments gewählt. Die in anderen Studien gemessene Distanz von Wildtypen auf dem Laufband unterschied sich dabei nicht signifikant von den Daten der vorliegenden Arbeit. Die zurückgelegten Distanzen sind jedoch nur eingeschränkt vergleichbar, da die verwendeten Messprotokolle in allen Untersuchungen geringfügig variieren. Es existieren derzeit keine publizierten Studien über leistungsphysiologische Parameter von $Panx1^{-/-}$ Mäusen.

Erreichte Distanzen auf dem Laufband	Studie
Panx1^(+/+) (C57Bl/6)	
360 ± 97 m	Vorliegende Arbeit
273 ± 72 m	Niebauer et al. 1999
409 ± 26 m	Masset und Berk 2005
407 ± 11 m	Ferreira et al. 2007
249 m	Frey et al. 2008
314 m	Sato et al. 2013
Panx1^(-/-) (C57Bl/6)	
377 ± 101 m	Vorliegende Arbeit

Tabelle 12: Vergleich der zurückgelegten Distanzen von Wildtypen auf dem Laufband

Somit kann festgestellt werden, dass sich die Leistungsphysiologie der Panx1^{-/-} Mäuse nicht von Wildtypen aus anderen publizierten Studien unterscheidet. Derzeitig muss deshalb davon ausgegangen werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz keine Auswirkungen auf die Leistungsphysiologie von Mäusen hat.

4.4 Limitationen und methodische Einschränkungen

4.4.1 Erholungszeit nach Operation

Die Implantation des Transmitters hat für einen gewissen Zeitraum deutliche Auswirkungen auf die Herzfrequenz. Der Wechsel der gewohnten Umgebung des Tieres, der Stress durch die Operation und die Narkose beeinflussen die Herzfrequenz und die Herzfrequenzvariabilität unmittelbar nach dem Eingriff (Thireau et al. 2008). In zwei Studien wurden Messdaten der Temperatur und der Herzfrequenz nach Implantation des Transmitters erhoben. Es zeigte sich, dass sich die zirkadiane Rhythmik von Temperatur und Herzfrequenz nach 4 Tagen stabilisiert (Johansson und Thoren 1997; Clement et al. 1989).

Die daraus resultierenden empfohlenen Erholungszeiten variieren von 7 bis 10 Tagen. In dieser Studie wurde als Konsequenz dieser Studienergebnisse eine Erholungszeit von

mindestens 8 Tagen für die Messungen der Ruhe-EKGs und 10 Tagen für die Belastungsuntersuchungen verwendet.

Erholungszeit nach Implantation	Studie
8 Tage	vorliegende Arbeit
3 Tage	Cerrone et al. 2005
3-6 Tage	Uechi et al. 1998
7 Tage	Johansson et al. 1997
7 Tage	Hawkins et al. 2004
7 Tage	Clement et al. 1989
10 Tage	Thireau et al. 2008
10 Tage	Gehrmann et al. 2000

Tabelle 13: Darstellung der Erholungszeiten nach der Implantation der telemetrischen EKG-Transmitter

4.4.2 Gewicht und Lage des Transmitters

Der Einsatz der Radiotelemetrie hat erstmals kontinuierliche Messungen unter physiologischen Bedingungen an Tieren ermöglicht. Durch das Verbleiben der Tiere in ihrer gewohnten Umgebung und ihre freie Beweglichkeit können Konfundierungseffekte auf die Messungen reduziert werden. Trotz dieses immensen Fortschritts wird die Maus durch das Gewicht, das Volumen und die Lage des implantierten Transmitters beeinflusst. Das Gewicht des Transmitters betrug in dieser Studie je nach Bauart 4-9 % des Körpergewichts der Maus. Bernstein et al. untersuchten den Einfluss des Radiotransmitters auf die zurückgelegte Distanz im Laufband. Dazu ließen sie die Mäuse nach Explantation des Transmitters das Experiment auf dem Laufband wiederholen. Es zeigte sich, dass die Mäuse ohne Transmitter eine durchschnittlich um 33 % größere Distanz auf dem Laufband zurücklegten (Bernstein 2003). Eine weitere Reduktion von Gewicht und Größe der Transmitter kann in Zukunft diesen Effekt verringern.

Gehrmann et al. postulierten in ihrer Studie, dass die Lage des implantierten Transmitters Auswirkungen auf die Herzfrequenz und die Leistungsphysiologie der Tiere hat. So wird angenommen, dass ein im Abdomen der Maus implantierter Transmitter durch

mechanische Kompression der Gefäße den venösen Rückstrom zum Herz beeinträchtigen könnte. Des Weiteren ist es möglich, dass der Transmitter im Abdomen die Ausdehnung des Zwerchfells behindert und somit direkten Einfluss auf die Atmungsphysiologie des Tieres hat (Gehrmann et al. 2000).

4.4.3 Schwimmversuch

Auffallend in den Belastungsversuchen ist die hohe Frequenz in der fünfminütigen Ruhephase vor dem Schwimmversuch. So ist die durchschnittliche Frequenz in der fünfminütigen Ruhephase vor dem Schwimmversuch bei den Wildtypen um 18,1% und bei den Panx1^{-/-} Mäusen um 19,7 % höher als die durchschnittliche Frequenz im 24-Stunden-EKG. Es muss angenommen werden, dass diese erhöhte Frequenz vor den Belastungsversuchen aufgrund von Manipulationen am Käfig und an der Maus zustande kommt. Um die Maus auf das Laufband oder in das Schwimmbecken umzusetzen, ist es nötig, den Käfig zu öffnen und die Maus manuell einzufangen. Diese Intervention bedeutet für das Tier einen enormen Stressor, der die Herzfrequenz möglicherweise schon vor Beginn des Versuchs erhöht.

Auch nach Ende des Schwimmversuchs blieben die Frequenzen über einen längeren Zeitraum erhöht. Aufgrund eines Mangels an geeigneten Protokollen für Schwimmversuche über einen kurzen Zeitraum wurde eine Erholungsdauer von 10 Minuten festgelegt. Selbst nach einer zehnminütigen Ruhephase waren die Herzfrequenzen noch signifikant höher im Vergleich zu den Frequenzen der fünfminütigen Ruhephase.

Für zukünftige, kurzzeitige Schwimmversuche muss für ein möglichst exaktes Messergebnis jegliche Manipulation am Tier vor dem Versuch minimiert werden. Weiterhin sollte die Erholungsphase der Tiere ausgedehnt werden, um ein detaillierteres Bild des Verlaufs der Herzfrequenz nach dem Versuch zu erhalten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Herzfrequenz, die kardiale Belastbarkeit und die Herzfrequenzvariabilität von Panx1^{-/-} Mäuse zu untersuchen und mit Wildtyp-Mäusen zu vergleichen.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass sich der kardiale Phänotyp der $Panx1^{-/-}$ Mäuse hinsichtlich Herzfrequenz und autonomer Herzregulation nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheidet. Signifikante Unterschiede in beiden Genotypen zeigten jedoch, dass eine Pannexin-1-Defizienz mit einem signifikant erhöhten Auftreten von AV-Blockierungen II° und einer signifikant erhöhten korrigierten QT-Zeit einhergeht. Des Weiteren zeigten die $Panx1^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den $Panx1^{+/+}$ Mäuse in der *Frequency Domain Analysis* eine signifikant reduziertes Spektrum der *Very Low Frequency* (VLF), was einerseits die Anfälligkeit gegenüber Herzrhythmusstörungen bestätigt und andererseits für eine erhöhte kardiale Vulnerabilität sprechen könnte. Daher kann abschließend festgestellt werden, dass eine Pannexin-1-Defizienz vor allem Auswirkungen auf Parameter hat, die mit einer erhöhten kardialen Vulnerabilität einhergehen. In weiteren Untersuchungen sollte daher zum einen die kardiale Vulnerabilität und Mortalität von $Panx1^{-/-}$ Mäusen detailliert untersucht und zum anderen der Zusammenhang zwischen Herzrhythmusstörungen und reduzierter *Very Low Frequency* spezifiziert werden.

5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll des Laufbandversuchs ohne Steigung.....	28
Tabelle 2: Protokoll des Laufbandversuchs mit Steigung durch eine Rampe.....	28
Tabelle 3: Parameter der Zeitbereichsanalyse der Herzfrequenzvariabilität	31
Tabelle 4: Parameter der Frequenzanalyse der Herzfrequenzvariabilität.....	31

Tabelle 5: Anzahl der Mäuse in den einzelnen Versuchsabschnitten	34
Tabelle 6: Einfluss möglicher Confounder auf die mittlere Herzfrequenz.....	49
Tabelle 7: Vergleich der publizierten mittleren Herzfrequenzen.....	50
Tabelle 8: Vergleich der publizierten maximalen Herzfrequenzen mit den maximalen Herzfrequenzen in den einzelnen Belastungsversuchen.....	51
Tabelle 9: Vergleich der publizierten Längen der EKG-Segmente für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität	53
Tabelle 10: Vergleich der Interpretationen der <i>Low Frequency</i> in der <i>Frequency Domain Analysis</i>	55
Tabelle 11: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen in den Belastungstests.....	57
Tabelle 12: Vergleich der zurückgelegten Distanzen von Wildtypen auf dem Laufband....	59
Tabelle 13: Darstellung der Erholungszeiten nach der Implantation der telemetrischen EKG-Transmitter	60

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Struktur der Pannexine	3
Abbildung 2: Parakrine Weiterleitung von Calciumwellen.....	8
Abbildung 3: Darstellung des Ablaufs der Zucht von Knockout-Mäusen	11
Abbildung 4: Typische EKG-Kurve einer Maus	12
Abbildung 5: <i>Frequency Domain Analysis</i> eines EKG-Segments	15
Abbildung 6: Verdeutlichung des Größenverhältnisses zwischen Maus und Transmitter ..	19
Abbildung 7: Bildliche Darstellung des Operationsablaufs	24
Abbildung 8: Bildliche Darstellung des Operationsablaufs	24
Abbildung 9: Bildliche Darstellung des Operationsablaufs	24
Abbildung 10: Bildliche Darstellung des Operationsablaufs	24
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der telemetrischen Versuche	25
Abbildung 12: Vergleich der Herzfrequenzen im 24-Stunden-EKG.....	35
Abbildung 13: Vergleich des SDNN und des r-MSSD der Frequenzanalyse.....	36
Abbildung 14: Vergleich von VLF, LF und HF der <i>Frequency Domain Analysis</i>	36
Abbildung 15: Vergleich der Total Power der <i>Frequency Domain Analysis</i>	37
Abbildung 16: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Schwimmversuch.....	38
Abbildung 17: Vergleich der Herzfrequenzen im Schwimmversuch	39
Abbildung 18: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen vor Beginn und nach Ende des Schwimmversuchs	40

Abbildung 19: Exemplarische Darstellung des Verlaufs der Herzfrequenz während des Schwimmversuchs	40
Abbildung 20: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Laufbandversuch ohne Steigung	42
Abbildung 21: Vergleich der Herzfrequenzen im Laufbandversuch ohne Steigung	43
Abbildung 22: Vergleich des prozentualen Anteils der Mäuse auf dem Laufband in Relation zur Geschwindigkeit des Laufbands	44
Abbildung 23: Durchschnittlich erreichte Distanz der Mäuse auf dem Laufband in Meter.....	44
Abbildung 24: Nachweis der Mehrbelastung der Tiere im Laufbandversuch mit Steigung	45
Abbildung 25: Vergleich der Herzfrequenzen im Laufbandversuch mit Steigung.....	46
Abbildung 26: Darstellung einer AV-Blockierung im telemetrischen EKG einer Maus.....	47
Abbildung 27: Darstellung der korrigierten QT-Zeit (QTc) (nach Mitchell et al.).....	47
Abbildung 28: Vergleich der durchschnittlichen Herzfrequenzen.....	49
Abbildung 29: Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit des Laufbandes und Laktatkonzentration im Blut der Maus	58

7. Literaturverzeichnis

Abbraccio, Maria P.; Burnstock, Geoffrey; Boeynaems, Jean-Marie; Barnard, Eric A.; Boyer, Jose L.; Kennedy, Charles et al. (2006):

International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. In: *Pharmacol Rev* 58 (3), S. 281–341.

Akselrod, S.; Gordon, D.; Ubel, F. A.; Shannon, D. C.; Berger, A. C.; Cohen, R. J. (1981): Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. In: *Science* 213 (4504), S. 220–222.

Ambrosi, Cinzia; Gassmann, Oliver; Pranskevich, Jennifer N.; Boassa, Daniela; Smock, Amy; Wang, Junjie et al. (2010):

Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. In: *J. Biol. Chem.* 285 (32), S. 24420–24431.

American Physiological Society (2006):

Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols

Bakker, Jacques M. T. de; van Rijen, Harold V. M. (2007):

Electrocardiographic manifestation of anatomical substrates underlying post-myocardial infarction tachycardias. In: *J Electrocardiol* 40 (6 Suppl), S. S21-5.

Bao, Li; Locovei, Silviu; Dahl, Gerhard (2004):

Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. In: *FEBS Lett.* 572 (1-3), S. 65–68.

Baranova, Ancha; Ivanov, Dmitry; Petrash, Nadezda; Pestova, Anya; Skoblov, Mikhail; Kelmanson, Ilya et al. (2004):

The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. In: *Genomics* 83 (4), S. 706–716.

Barbe, Michael T.; Monyer, Hannah; Bruzzone, Roberto (2006):

Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. In: *Physiology* (Bethesda) 21, S. 103–114.

Barbee, R. W.; Perry, B. D.; Re, R. N.; Murgo, J. P.; Field, L. J. (1994):

Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor. In: *Circ Res* 74 (4), S. 747–751.

Baudrie, Veronique; Laude, Dominique; Elghozi, Jean-Luc (2007):

Optimal frequency ranges for extracting information on cardiovascular autonomic control from the blood pressure and pulse interval spectrograms in mice. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 (2), S. R904-12.

Bergfeld, G. R.; Forrester, T. (1992):

Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. In: *Cardiovasc. Res.* 26 (1), S. 40–47.

Bernstein, Daniel (2003):

Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. In: *Physiol Genomics* 13 (3), S. 217–226.

Bianchi, A.; Bontempi, B.; Cerutti, S.; Gianoglio, P.; Comi, G.; Natali Sora, M. G. (1990):

Spectral analysis of heart rate variability signal and respiration in diabetic subjects. In: *Med Biol Eng Comput* 28 (3), S. 205–211.

Bigger, J. T.; Fleiss, J. L.; Steinman, R. C.; Rolnitzky, L. M.; Kleiger, R. E.; Rottman, J. N. (1992):

Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. In: *Circulation* 85 (1), S. 164–171.

Billaud, Marie; Lohman, Alexander W.; Straub, Adam C.; Looft-Wilson, Robin; Johnstone, Scott R.; Araj, Christina A. et al. (2011):

Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. In: *Circ. Res.* 109 (1), S. 80–85.

Boassa, Daniela; Ambrosi, Cinzia; Qiu, Feng; Dahl, Gerhard; Gaietta, Guido; Sosinsky, Gina (2007):

Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. In: *J. Biol. Chem.* 282 (43), S. 31733–31743.

Braun, R.; Willnow, E. (1996):

Die "Knockout"-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz. In: Dtsch Arztebl International 93 (26), S. 1765-. Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=2038>.

Broom, Donald M.; Johnson, K. G. (1993):

Stress and animal welfare. 1. Aufl. London, New York: Chapman & Hall (Chapman & Hall animal behaviour series).

Bruzzone, Roberto; Barbe, Michael T.; Jakob, Nurith J.; Monyer, Hannah (2005):

Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. In: J Neurochem 92 (5), S. 1033–1043.

Bruzzone, Roberto; Hormuzdi, Sheriar G.; Barbe, Michael T.; Herb, Anne; Monyer, Hannah (2003):

Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (23), S. 13644–13649.

Campen, Matthew J.; Tagaito, Yugo; Jenkins, Todd P.; Balbir, Alex; O'Donnell, Christopher P. (2005):

Heart rate variability responses to hypoxic and hypercapnic exposures in different mouse strains. In: J Appl Physiol (1985) 99 (3), S. 807–813.

Capecchi, M. R. (1989):

Altering the genome by homologous recombination. In: Science 244 (4910), S. 1288–1292.

Celetti, Steven J.; Cowan, Kyle N.; Penuela, Silvia; Shao, Qing; Churko, Jared; Laird, Dale W. (2010):

Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. In: J. Cell. Sci. 123 (Pt 8), S. 1363–1372.

Cerrone, Marina; Colombi, Barbara; Santoro, Massimo; Di Barletta, Marina Raffaele; Scelsi, Mario; Villani, Laura et al. (2005):

Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor. In: Circ Res 96 (10), S. e77-82.

Chekeni, Faraaz B.; Elliott, Michael R.; Sandilos, Joanna K.; Walk, Scott F.;

Kinchen, Jason M.; Lazarowski, Eduardo R. et al. (2010):

Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. In: *Nature* 467 (7317), S. 863-867.

Chen, Yu; Yao, Yongli; Sumi, Yuka; Li, Andrew; To, Uyen Kim; Elkhali, Abdallah et al. (2010):

Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. In: *Sci Signal* 3 (125), S. ra45.

Chiou, C. W.; Zipes, D. P. (1998):

Selective vagal denervation of the atria eliminates heart rate variability and baroreflex sensitivity while preserving ventricular innervation. In: *Circulation* 98 (4), S. 360–368.

Clement, J. G.; Mills, P.; Brockway, B. (1989):

Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. In: *J Pharmacol Methods* 21 (2), S. 129–140.

Constantinides, Christakis; Mean, Richard; Janssen, Ben J. (2011):

Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. In: *ILAR J* 52, S. e21-31.

Desai, K. H.; Sato, R.; Schauble, E.; Barsh, G. S.; Kobilka, B. K.; Bernstein, D. (1997):

Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. In: *Am. J. Physiol.* 272 (2 Pt 2), S. H1053-61.

D'hondt, Cathelene; Ponsaerts, Raf; Smedt, Humbert de; Bultynck, Geert;

Himpens, Bernard (2009):

Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? In: *Bioessays* 31 (9), S. 953–974.

Dobson, Geoffrey P. (2003):

On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (8), S. 590–597.

Dolmatova, Elena; Spagnol, Gaele; Boassa, Daniela; Baum, Jennifer R.; Keith, Kimberly; Ambrosi, Cinzia et al. (2012):

Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303 (10), S. H1208-18.

Elliott, Michael R.; Chekeni, Faraaz B.; Trampont, Paul C.; Lazarowski, Eduardo R.; Kadl, Alexandra; Walk, Scott F. et al. (2009):

Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. In: *Nature* 461 (7261), S. 282–286.

Ferreira, Julio C. B.; Rolim, Natale P. L.; Bartholomeu, Jan B.; Gobatto, Claudio A.; Kokubun, Eduardo; Brum, Patricia C. (2007):

Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (8), S. 760–765.

Fox, Barthold Davisson (op. 2007):

The mouse in biomedical research. 2. Aufl. San Diego, Paris: Academic press (American college of laboratory animal medicine series).

Frey, Norbert; Frank, Derk; Lippl, Stefanie; Kuhn, Christian; Kögler, Harald; Barrientos, Tomasa et al. (2008):

Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. In: *The Journal of Clinical Investigation* 118 (11), S. 3598–3608.

Gehrmann, J.; Hammer, P. E.; Maguire, C. T.; Wakimoto, H.; Triedman, J. K.; Berul, C. I. (2000):

Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (2), S. H733-40.

Goodenough, Daniel A.; Paul, David L. (2003):

Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (4), S. 285–294.

Gross, Eric R.; Gross, Garrett J. (2007):

Ischemic Preconditioning And Myocardial Infarction: An Update and Perspective. In: *Drug Discov Today Dis Mech* 4 (3), S. 165–174.

Gussak, I.; Chaitman, B. R.; Kopecky, S. L.; Nerbonne, J. M. (2000):

Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. In: *J Electrocardiol* 33 (2), S. 159–170.

Guthrie, P. B.; Knappenberger, J.; Segal, M.; Bennett, M. V.; Charles, A. C.; Kater, S. B. (1999):

ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. In: *J. Neurosci.* 19 (2), S. 520–528.

Hau, Jann; Schapiro, Steven Jay:

Handbook of laboratory animal science. Third edition.

Hawkins, Penny; Morton, David B.; Bevan, Richard; Heath, Kate; Kirkwood, James; Pearce, Peter et al. (2004):

Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Seventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement, Part B. In: *Lab Anim* 38 (1), S. 1–10.

Herd, J. A. (1991):

Cardiovascular response to stress. In: *Physiol Rev* 71 (1), S. 305–330.

Ho, David; Zhao, Xin; Gao, Shumin; Hong, Chull; Vatner, Dorothy E.; Vatner, Stephen F. (2011):

Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. In: *Curr Protoc Mouse Biol* 1, S. 123–139.

Hoit, Brian D.; Walsh, Richard A. (2002):

Cardiovascular physiology in the genetically engineered mouse. 2. Aufl. Boston: Kluwer Academic Publishers (Developments in cardiovascular medicine, 238).

Hon, E. H. Lee, S. T. (1963):

Electronic evaluation of the fetal heart rate. VIII. patterns preceding fetal death, further observations. In: *Am J Obstet Gynecol* 87, S. 814–826.

Houle, M. S.; Billman, G. E. (1999):

Low-frequency component of the heart rate variability spectrum: a poor marker of sympathetic activity. In: *Am J Physiol* 276 (1 Pt 2), S. H215-23.

Inoue, K.; Miyake, S.; Kumashiro, M.; Ogata, H.; Yoshimura, O. (1990):

Power spectral analysis of heart rate variability in traumatic quadriplegic humans. In: *Am J Physiol* 258 (6 Pt 2), S. H1722-6.

Ishii, K.; Kuwahara, M.; Tsubone, H.; Sugano, S. (1996):

Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. In: *Lab Anim* 30 (4), S. 359–364.

Iwamoto, Tsutomu; Nakamura, Takashi; Doyle, Andrew; Ishikawa, Masaki; Vega, Susana de; Fukumoto, Satoshi; Yamada, Yoshihiko (2010):

Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. In: *J. Biol. Chem.* 285 (24), S. 18948–18958.

Iwase, M.; Bishop, S. P.; Uechi, M.; Vatner, D. E.; Shannon, R. P.; Kudej, R. K. et al. (1996):

Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. In: *Circ. Res.* 78 (4), S. 517–524.

Johansson, C.; Göthe, S.; Forrest, D.; Vennström, B.; Thorén, P. (1999):

Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor-beta or both alpha1 and beta. In: *Am. J. Physiol.* 276 (6 Pt 2), S. H2006-12.

Johansson, C.; Thoren, P. (1997):

The effects of triiodothyronine (T3) on heart rate, temperature and ECG measured with telemetry in freely moving mice. In: *Acta Physiol Scand* 160 (2), S. 133–138.

Jong, Marla J. de; Randall, David C. (2005):

Heart rate variability analysis in the assessment of autonomic function in heart failure. In: *J Cardiovasc Nurs* 20 (3), S. 186-95; quiz 196-7.

Kaufenstein et al.:

Plötzlicher Herztod bei jungen Menschen durch kardiale Gendefekte. In: *Deutsches Ärzteblatt* 106 (4). Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=63080>, zuletzt geprüft am 01.12.2015.

Kleiger, R. E.; Miller, J. P.; Bigger, J. T., JR; Moss, A. J. (1987):

Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. In: *Am J Cardiol* 59 (4), S. 256–262.

Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin (2009):

Physiologie. 6. Aufl. s.l: Georg Thieme Verlag KG.

Kramer, K.; van Acker, S. A.; Voss, H. P.; Grimbergen, J. A.; van der Vijgh, W. J.; Bast, A. (1993):

Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. In: *J Pharmacol Toxicol Methods* 30 (4), S. 209–215.

Lippman, N.; Stein, K. M.; Lerman, B. B. (1994):

Comparison of methods for removal of ectopy in measurement of heart rate variability. In: *Am J Physiol* 267 (1 Pt 2), S. H411-8.

Locovei, Silviu; Bao, Li; Dahl, Gerhard (2006a):

Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (20), S. 7655–7659.

Locovei, Silviu; Wang, Junjie; Dahl, Gerhard (2006b):

Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. In: *FEBS Lett.* 580 (1), S. 239–244.

Löllgen, Herbert (1999):

Serie: Neue Methoden in der kardialen Funktionsdiagnostik – Herzfrequenzvariabilität. In: *Dtsch Arztebl International* 96 (31-32), S. 2029.

Lorenz, J. N.; Robbins, J. (1997):

Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. In: *Am J Physiol* 272 (3 Pt 2), S. H1137-46.

Malik, M.; Farrell, T.; Cripps, T.; Camm, A. J. (1989):

Heart rate variability in relation to prognosis after myocardial infarction: selection of optimal processing techniques. In: *Eur Heart J* 10 (12), S. 1060–1074.

Malliani, A.; Pagani, M.; Lombardi, F.; Cerutti, S. (1991):

Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. In: *Circulation* 84 (2), S. 482–492.

Masset, Michael P.; Berk, Bradford C. (2005):

Strain-dependent differences in responses to exercise training in inbred and hybrid mice. In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (4), S. R1006-R1013.

Mattson, D. L. (1998):

Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice. In: *Am J Physiol* 274 (2 Pt 2), S. R564-70.

Mattson, D. L. (2001):

Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. In: *Am J Hypertens* 14 (5 Pt 1), S. 405–408.

Mäntele, Werner (2012):

Biophysik. 14 Tabellen. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer (UTB, 3270).

Niebauer, J.; Maxwell, A. J.; Lin, P. S.; Tsao, P. S.; Kosek, J.; Bernstein, D.; Cooke, J. P. (1999):

Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. In: *Am J Physiol* 276 (4 Pt 2), S. H1346-54.

Panchin, Y.; Kelmanson, I.; Matz, M.; Lukyanov, K.; Usman, N.; Lukyanov, S. (2000):

A ubiquitous family of putative gap junction molecules. In: *Curr. Biol.* 10 (13), S. R473-4.

Pelegri, Pablo; Surprenant, Annmarie (2006):

Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. In: *EMBO J.* 25 (21), S. 5071–5082.

Penuela, Silvia; Gehl, Ruchi; Laird, Dale W. (2013):

The biochemistry and function of pannexin channels. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (1), S. 15–22.

Pomeranz, B.; Macaulay, R. J.; Caudill, M. A.; Kutz, I.; Adam, D.; Gordon, D. et al. (1985):

Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. In: *Am J Physiol* 248 (1 Pt 2), S. H151-3.

Ransford, George A.; Fregien, Nevis; Qiu, Feng; Dahl, Gerhard; Conner, Gregory E.; Salathe, Matthias (2009):

Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41 (5), S. 525–534.

Rohrer, D. K.; Desai, K. H.; Jasper, J. R.; Stevens, M. E.; Regula, D. P.; Barsh, G. S. et al. (1996):

Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (14), S. 7375–7380.

Ryan, Mark L.; Ogilvie, Michael P.; Pereira, Bruno M. T.; Gomez-Rodriguez, Juan Carlos; Manning, Ronald J.; Vargas, Paola A. et al. (2011):

Heart rate variability is an independent predictor of morbidity and mortality in hemodynamically stable trauma patients. In: *J Trauma* 70 (6), S. 1371–1380.

Sandercock, Gavin Richard H.; Brodie, David A. (2006):

The role of heart rate variability in prognosis for different modes of death in chronic heart failure. In: *Pacing Clin Electrophysiol* 29 (8), S. 892–904.

Sato, Shuichi; Ogura, Yuji; Mishra, Vivek; Shin, Jonghyun; Bhatnagar, Shephali; Hill, Bradford G.; Kumar, Ashok (2013):

TWEAK promotes exercise intolerance by decreasing skeletal muscle oxidative phosphorylation capacity. In: *Skeletal Muscle* 3, S. 18.

Schenkel, Johannes (2006):

Transgene Tiere. 2. Aufl. Berlin, New York: Springer (Springer-Lehrbuch).

Schenk, Ursula; Westendorf, Astrid M.; Radaelli, Enrico; Casati, Anna; Ferro, Micol; Fumagalli, Marta et al. (2008):

Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. In: *Sci Signal* 1 (39), S. ra6.

Silverman, William; Locovei, Silviu; Dahl, Gerhard (2008):

Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 295 (3), S. C761-7.

Sosinsky, Gina E.; Boassa, Daniela; Dermietzel, Rolf; Duffy, Heather S.; Laird, Dale W.; MacVicar, Brian et al. (2011):

Pannexin channels are not gap junction hemichannels. In: *Channels (Austin)* 5 (3), S. 193–197.

Stiedl, Oliver; Tovote, Philip; Ogren, Sven Ove; Meyer, Michael (2004):

Behavioral and autonomic dynamics during contextual fear conditioning in mice. In: *Auton Neurosci* 115 (1-2), S. 15–27.

Tankersley, Clarke G.; Campen, Matthew; Bierman, Alexis; Flanders, Susan E.; Broman, Karl W.; Rabold, Richard (2004):

Particle effects on heart-rate regulation in senescent mice. In: *Inhal Toxicol* 16 (6-7), S. 381–390.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996):

Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. In: *Circulation* 93 (5), S. 1043–1065.

Thireau, J.; Zhang, B. L.; Poisson, D.; Babuty, D. (2008):

Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. In: *Exp. Physiol.* 93 (1), S. 83–94.

Uechi, M.; Asai, K.; Osaka, M.; Smith, A.; Sato, N.; Wagner, T. E. et al. (1998):

Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G α . In: *Circ Res* 82 (4), S. 416–423.

Vessey, Donald A.; Li, Luyi; Kelley, Michael (2010):

Pannexin-I/P2X 7 purinergic receptor channels mediate the release of cardioprotectants induced by ischemic pre- and postconditioning. In: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 15 (2), S. 190–195.

Vogt, Angelika; Hormuzdi, Sheriar G.; Monyer, Hannah (2005):

Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. In: Brain Res. Mol. Brain Res. 141 (1), S. 11