

**Desmin-assoziierte Kardiomyopathie:
Einflüsse der R350P-Missense-Mutation auf die Arrhythmogenese und
myokardiale Eigenschaften am Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

José-Manuel Thorweihe
aus Leipzig
2016

Angefertigt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Wilko Schrickel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wilhelm Röll

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.11.2015

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik Innere Medizin II
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

„Ich bin, was ich bin, und das ist alles, was ich bin.“

Popeye

Für Sabrina und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Kardiomyopathie	9
1.2 Herzrhythmusstörungen	10
1.3 Arrhythmogenese	12
1.3.1 Atrium	15
1.3.2 Ventrikel	16
1.4 Desmin	20
1.4.1 Beschreibung	20
1.4.2 Genetik	20
1.4.3 Struktur	20
1.4.4 Funktion	24
1.5 Die Rolle des Desmins in der Kardiomyopathie	27
1.5.1 Desminopathie	27
1.5.2 Epidemiologie	28
1.5.3 Klinik	28
1.5.4 Pathologie	29
1.5.5 Tiermodelle	34
1.5.6 Fragestellung	37
2. Methoden	38
2.1 Versuchstiere	38
2.2 Versuchs-Durchführung	38
2.3 Langzeit-Elektrokardiogramm	39
2.4 Elektrophysiologische Untersuchung der Maus	40
2.5 Epikardiales Mapping	43
2.6 Polymerase-Kettenreaktion	45
2.7 Immunhistochemische Färbung	49
2.8 Fibrose-Färbung der histologischen Schnitte	50
2.9 Statistische Methodik	51

3.	Ergebnisse	52
3.1	Physiologische Merkmale	52
3.2	Langzeit-Elektrokardiogramm	52
3.3	Elektrophysiologische Untersuchung	53
3.4	Epikardiales Mapping	55
3.5	Polymerase-Kettenreaktion	55
3.6	Immunhistochemische Färbung	56
3.7	Fibrose-Färbung	56
4.	Diskussion	85
4.1	EKG-Veränderungen, Arrhythmien und atrioventrikuläre-Blockierungen	85
4.2	Veränderte Leitungseigenschaften des Myokards	85
4.2.1	Myokardiale Fibrose	86
4.2.2	Veränderungen von Gap Junctions	88
4.2.3	Kalzifizierung von Leitungsstrukturen	89
4.2.4	Ionenkanalveränderungen	89
4.2.5	Veränderungen der atrialen und ventrikulären Refraktärzeit	90
4.3	Alternative Möglichkeiten	91
4.4	Hypothese	92
4.5	Schlussfolgerung	93
5.	Zusammenfassung	95
6.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
7.	Literaturverzeichnis	98
8.	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

Hinweis:

Abkürzungen aus dem Duden sowie SI-Einheiten wurden nicht aufgenommen.

AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ARP	atriale Refraktärzeit
AV	atrioventrikulär
AVB	atrioventrikulärer Block
AVNRP	AV-nodale Refraktärzeit
BSA	bovines Serumalbumin
Ca	Kalzium
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
Ca _v 1.2	L-Typ Kalziumkanal
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CL	Zykluslänge
CO ₂	Kohlendioxid
Cx	Connexin
DES	Desmin
Des ^{RP/+}	heterozygoter Träger der Desmin-R350P-Missense-Mutation
Des ^{RP/RP}	homozygoter Träger der Desmin-R350P-Missense-Mutation
DP	Desminopathie
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
GJ	Gap Junction
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
HRST	Herzrhythmusstörungen
I _{CaL}	Strom durch L-Typ Kalziumkanal
IF	Intermediärfilament
I _{K1}	Kaliumeinwärtsgerichteter Strom durch K _{ir} 2.x
I _{Kr}	schneller Kaliumauswärtsstrom

I_{Ks}	später Kaliumauswärtsstrom
I_{KUR}	ultra-schneller Kaliumauswärtsstrom
I_{T0}	transienter Kalium-Ausstrom durch $K_v4.x$
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KI	Knock-In
K_{IR}	Kaliumeinwärtsgleichrichter-Kanal
$K_{IR2.1}$	Kaliumeinwärtsgleichrichter-Kanal 2.1
KG	Körpergewicht
KO	Knock-Out-Maus
$K_v1.5$	spannungsgesteuerter Kaliumkanal 1.5
$K_v4.2$	spannungsgesteuerter Kaliumkanal 4.2
L1	Linker Domain 1
L12	Linker Domain 12
LZ-EKG	Langzeit-Elektrokardiogramm
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
N_{Ti}	Natriumeinwärtsstrom durch NCX
$N_v1.5$	spannungsgesteuerter Natrium-Kanal 1.5
O_2	Sauerstoff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-Rezeptor
TBS	tert-Butyldimethylsilyl-Ether
VES	ventrikuläre Extrasystole(n)
VHF	Vorhofflimmern
VRP	ventrikuläre Refraktärzeit
VT	ventrikuläre Tachykardie
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Desmin-assoziierte Kardiomyopathie gehört zu den Desminopathien (DP), einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen, die auf unterschiedliche genetische Alterationen des Strukturproteins Desmin (DES) zurückzuführen sind. Sie haben diverse Erkrankungen verschiedenster Ausprägung, hauptsächlich der Muskulatur, zur Folge (Clemen et al., 2013). Klinisch besonders bedeutend sind die kardialen Phänotypen, da hieraus Kardiomyopathien, teils auch mit Todesfolge, resultieren können (Spaendonck-Zwarts et al., 2011). Die bisher am häufigsten beschriebene Mutationsform des DES-Gens ist die Missense-Mutation R350P. Die Mutationsträger bilden einen skelettal-kardialen Mischtyp der Myopathie aus, wobei Männer häufiger und schwerer betroffen sind als Frauen (Walter et al., 2007). Die pathophysiologischen Ursachen beim Menschen sind bisher nicht hinreichend aufgeklärt. Aus diesem Grund befasst sich diese Dissertationsarbeit mit der elektrophysiologischen Charakterisierung des zugehörigen Phänotyps an einem Mausmodell, welches als „human mimikry“ dient.

1.1 Kardiomyopathie

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards. Die Folge ist eine myokardiale Dysfunktion mit häufiger, aber nicht zwingender ventrikulärer Hypertrophie oder Dilatation. Man kann sie in zwei Hauptgruppen einteilen:

1.1.1 Primäre Kardiomyopathien

- a. Hypertrophe Kardiomyopathie (obstruktiv sowie nicht obstruktiv)
- b. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
- c. Non-Compaction-Kardiomyopathie
- d. Kardiomyopathien durch Anomalien des Reizleitungssystems (z. B. Lenègre-Krankheit, Wolff-Parkinson-White-Syndrom)
- e. Ionenkanalerkrankungen (z. B. Long-QT-, Short-QT- und Brugada-Syndrom; katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie)
- f. Dilatative Kardiomyopathie
- g. Restriktive Kardiomyopathie
- h. Erworbene Kardiomyopathien (Myokarditiden, Stress, Tachykardie)

Diese teilen sich in genetische (a–e), erworbene (h) und gemischte (f, g) Formen auf. Sie sind in ihrer Ausprägung hauptsächlich auf das Herz beschränkt und können in jedem Alter auftreten (Beckmann et al., 2011; Maron et al., 2006).

1.1.2 Sekundäre Kardiomyopathien

Diese Formen sind als extrinsisch zu betrachten, da außerhalb des Herzens liegende Systemerkrankungen die Entstehung verursachen. Als solche sind auszugsweise zu nennen (Maron et al., 2006):

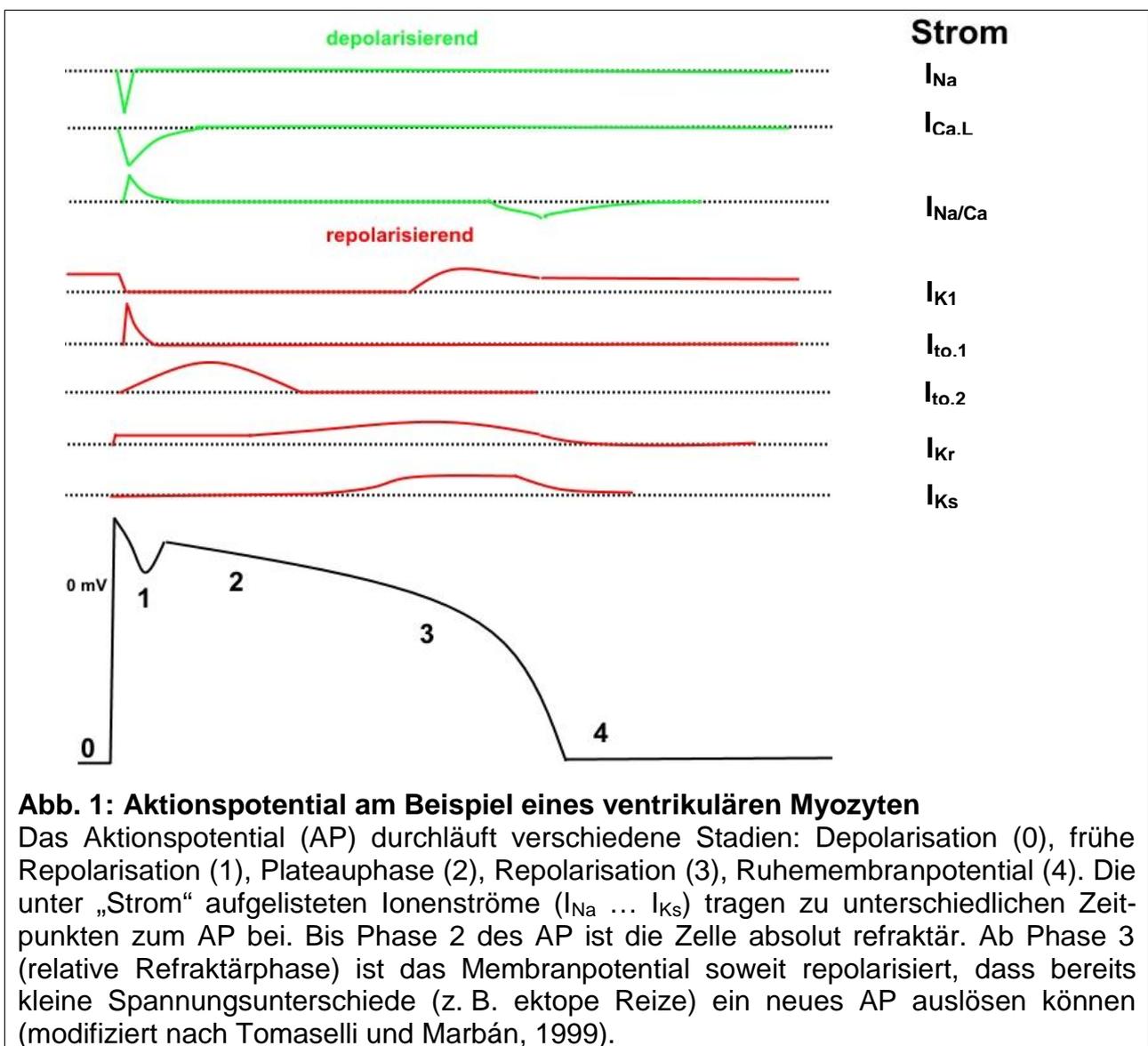
- a. Infiltrative Genese (z. B. Amyloidose, M. Gaucher)
- b. Speichererkrankungen (z. B. Hämochromatose, M. Fabry)
- c. Toxische Faktoren (z. B. Drogen)
- d. Inflammatorische Ursachen (z. B. Sarkoidose)
- e. Endokrine Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Hyperthyreose)

Die klinischen Konsequenzen solcher Kardiomyopathien (z. B. Herzinsuffizienz) sind weitreichend und nehmen häufig einen progressiven Verlauf. Teilweise ist die Ursache genetisch bedingt (z. B. durch Mutationen von Strukturproteinen). So zeigen sich DES-Mutationen alleine bei der dilatativen Kardiomyopathie, der häufigsten Form der Kardiomyopathien (Li et al., 1999), in ein bis zwei Prozent der Fälle verantwortlich (Taylor et al., 2007).

1.2 Herzrhythmusstörungen

Ein elektrophysiologisches Korrelat von Kardiomyopathien sind mitunter letale Arrhythmien (Maron et al., 2006). Erschwerend kommt hinzu, dass bei diesen Erkrankungen gefährliche Herzrhythmusstörungen (HRST) bereits vor dem Auftreten hinweisender Symptome wie Leistungseinschränkungen einsetzen und zum plötzlichen Herztod führen können (Beckmann et al., 2011). Grundsätzlich lassen sich als Ursachen für HRST myokardiale (z. B. koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathien), hämodynamische (z. B. Klappenvitien) und extrakardiale (z. B. Elektrolytstörungen, Noxen) Ätiologien unterscheiden. Die Arrhythmien selbst lassen sich wiederum in verschiedene Typen (Reizbildungsstörungen, Leitungsstörungen, Tachykardien) klassifizieren (Herold, 2011). Für das Beispiel der Kardiomyopathien sind hauptsächlich Tachyarrhythmien (Maron et al., 2006), wie z. B. Vorhofflimmern (VHF) bzw. –flattern und Kammerflimmern, sowie diverse Leitungsstörungen (Pruszczyk et al., 2007), wie beispielsweise

atrioventrikuläre (AV) Blockaden, relevant. Allen diesen Rhythmusstörungen gemein ist eine veränderte Leitungseigenschaft des Myokards. Die Ursachen dieser Konduktionsalterationen sind vielfältig. Größtenteils sind jedoch Strukturveränderungen des Myokards (Zellhypertrophie, Fibrose und Narbengewebe), modifizierte Öffnungswahrscheinlichkeiten und Expressionsmuster verschiedener Ionenkanäle, z. B. für Natrium, Kalzium (Ca) und Kalium (Han et al., 2001; Tomaselli und Marbán, 1999; Tomaselli und Zipes, 2004), sowie Gap Junctions (Wilson und Rosenbaum, 2007) verantwortlich. Zudem beeinflussen Veränderungen der Ionenkanalkonstellation das Aktionspotential (AP) von Myozyten (Greiser et al., 2010; Mitsuyama et al., 2014; Wilson und Rosenbaum, 2007) sowie deren Refraktärphase (s. Abb. 1).



1.3 Arrhythmogenese

Trifft ein Erregungsreiz gleich welcher Ursache auf eine Zelle, sind drei Möglichkeiten denkbar (Huppelsberg und Walter, 2005):

1. Ist die Zelle erregbar (Phase 4; s. Abb. 1), kann der Impuls weitergegeben werden.
2. Er trifft in der absoluten Refraktärphase des AP (Phase 2; s. Abb. 1) ein und wird nicht fortgeleitet.
3. Wird die vulnerable Phase (Phase 3; s. Abb. 1) getroffen, so resultieren frühzeitig erneute Depolarisationen (s. Abb. 2) und können sich unkontrolliert ausbreiten, indem sie weitere Zellen in dieser Phase treffen.

Der Zeitpunkt des Eintreffens einer Erregung in den Verlauf eines AP entscheidet also über die Entstehung oder das Ausbleiben einer Arrhythmie. Daher ist es innerhalb eines zu erregenden Areals notwendig, dass die Aktionspotentialdauer (APD) in den einzelnen Zellen zeitlich aufeinander abgestimmt ist:

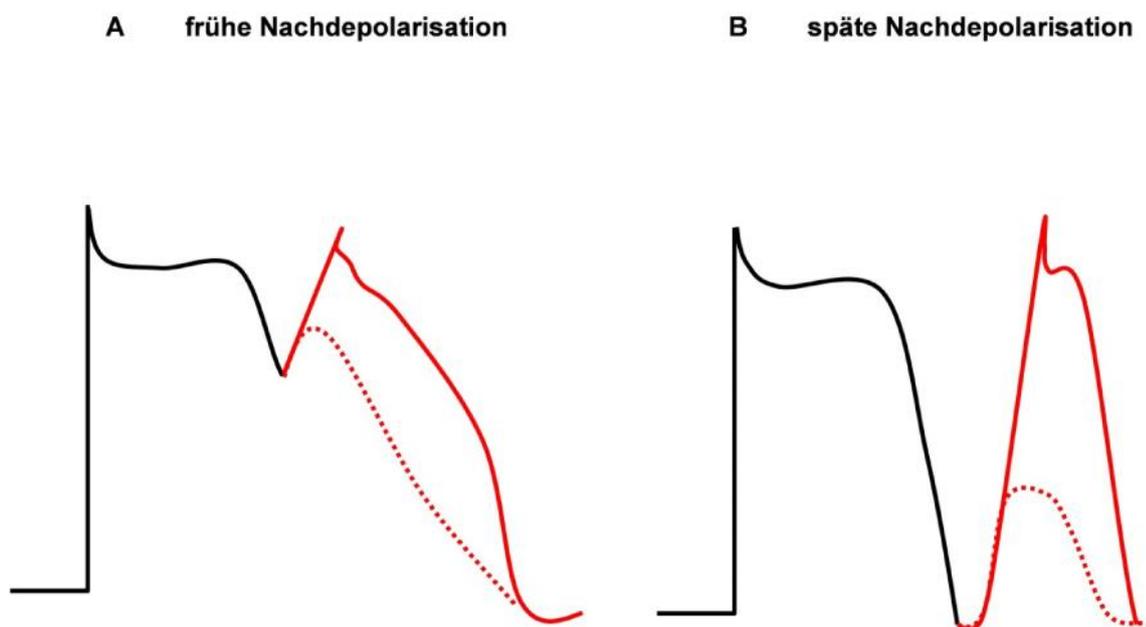


Abb. 2: Nachdepolarisationen

Effekt von Nachdepolarisationen auf das Aktionspotential einer Zelle in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Einfalls: Je später, desto mehr Ionenkanäle sind rekrutierbar und ein umso geringerer Impuls (gestrichelte Linie) ist notwendig, um eine Nachdepolarisation (durchgezogene, rote Linie) auszulösen (modifiziert nach Kreppel, 2005).

Physiologischerweise wird ein AP eines Myozyten innerhalb des Myokards über Gap Junctions (GJ) auf eine weitere erregbare Zelle übertragen (Wilson und Rosenbaum, 2007) und löst dort ein neues AP aus. Da eine Herzaktion genau gesteuert sein muss, ist es wichtig, eine Erregung der bereits zuvor aktivierten Zellen auszuschließen (Schram et al., 2002). Dies wird durch verschiedene Mechanismen ermöglicht, welche die Refraktärphase (und somit die vulnerable Phase) zeitlich verlagern. Die zu Beginn des Reizleitungssystems entstehenden APs verfügen über eine längere APD als die im weiteren Verlauf der Reizleitungsbahn (Boyett et al., 1999; Schram et al., 2002). Es ist zusätzlich aber auch eine Adaptation der APD an die Herzfrequenz (HF) notwendig (Grandi et al., 2011). Eine relative Verkürzung bei hoher HF verhindert, dass zufällig vorher einfallende APs unkontrollierte Nachdepolarisationen auslösen. So wird gewährleistet, dass die Erregungsrichtung entsprechend einer vorgegebenen Bahn verläuft (s. Abb. 3A). Befinden sich innerhalb des zu erregenden Areals jedoch Zellen, welche aus verschiedenen Gründen (z. B. Myokardnarben) refraktär sind, bricht die Ausbreitung in diese Richtung ab. Folglich nimmt die Erregungsfront einen alternativen Verlauf. Die Weiterleitung kann nun in Richtung der ursprünglich bereits erregten Zellen verlaufen und diese, da jetzt nicht mehr refraktär, erneut aktivieren (s. Abb. 3B). Da diese Ausbreitung einem nicht vorgesehenen Muster entspricht, besteht die Gefahr, dass eine kreisende Erregung (Reentry) entsteht (s. Abb. 3C). Dieser Reentry erhält sich nun selbst aufrecht und interferiert mit der eigentlichen physiologischen Signalausbreitung innerhalb des Myokards: Rhythmusstörungen können die Folge sein (Herold, 2011). Dieses Prinzip der alterierten Leitungseigenschaft und der daraus resultierenden Reentries stellt die Entstehungsgrundlage für viele klinisch relevante HRST dar (Bingen et al., 2014; Tomaselli und Zipes, 2004). Für das weitere Verständnis verschiedener Typen von HRST (z. B. VHF, Vorhofflattern, AV-Knoten-Reentry-Tachykardie, Kammerflimmern) muss man berücksichtigen, dass sich die APs in Atrium und Ventrikel voneinander unterscheiden (Grandi et al., 2011; Schram et al., 2002).

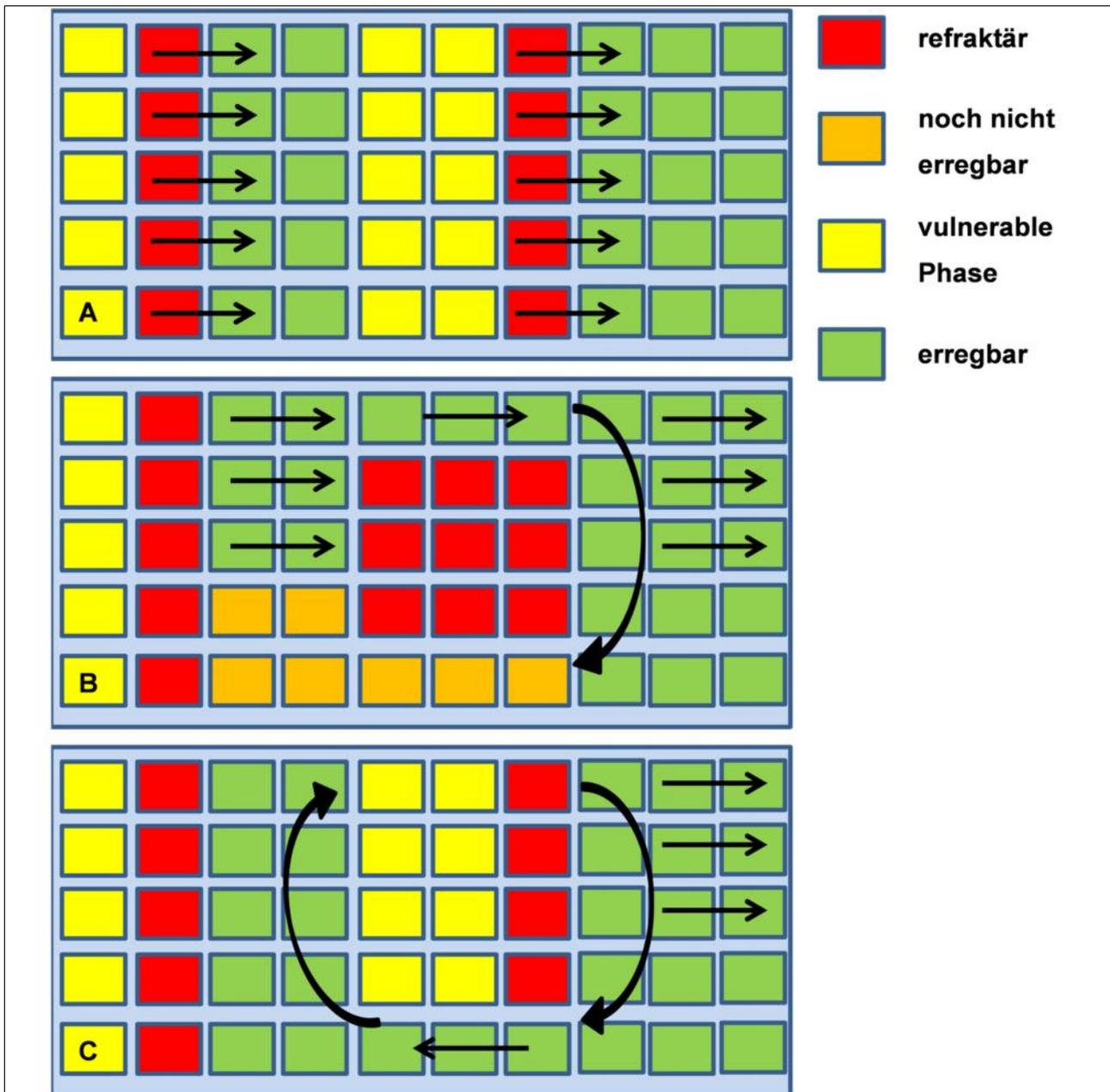


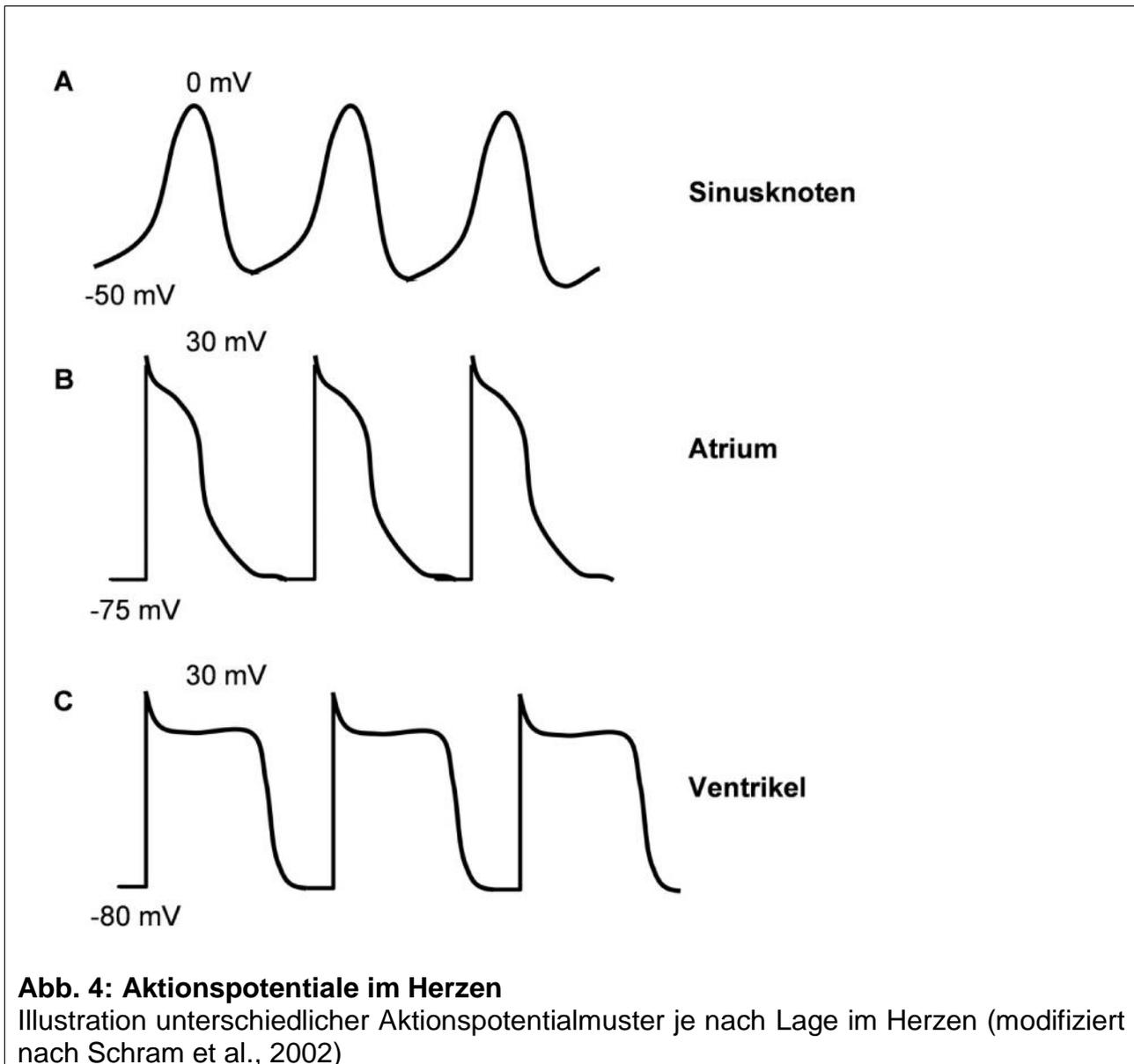
Abb. 3: Kreisende Erregung

A: Die physiologische Erregungsausbreitung verläuft entlang einer vorgegebenen Bahn.

B: Eine Erregungswelle trifft auf in diesem Moment nicht erregbares (orange) und absolut refraktäres Areal (rot). Sie wird um diese Stelle herumgeleitet und verläuft in der Folge retrograd entlang des vorher refraktären Bereichs (gebogener Pfeil). Es folgt eine Erregung in die falsche Richtung, sodass sich diese nun selbst erhält.

C: Eine kreisende Erregung entsteht.

modifiziert nach Kreppel, 2005



1.3.1 Atrium

Wie man in Abb. 4 sehen kann, unterscheiden sich die AP-Verläufe im Atrium von denen im Ventrikel. Im Atrium herrscht ein positiveres Ruhemembranpotential vor, das Plateau (Phase 2) ist verkürzt, Phase 3 hingegen relativ verlängert. Dies liegt an der unterschiedlichen Zusammensetzung der im jeweiligen Myokard vorkommenden Ionenkanäle (Grandi et al., 2011; Schram et al., 2002). Der Kaliumeinwärtsgleichrichterstrom (I_{K1}) der atrialen Myozyten ist schwächer, was das positiveres Ruhepotential und die verlängerte Repolarisation erklärt. Gleichzeitig spielt der Kaliumauswärtsgleichrichterstrom (I_{KUR}) via ultra-rapid Kalium-outward-rectifier K_{UR} hierbei eine tragende Rolle. Dieser

Ionenkanal wird ausschließlich im atrialen Myozyten exprimiert (Li et al., 1996a) und trägt mit seinem Strom zu einem frühen Eintritt der Repolarisation bei (Schram et al., 2002). Dies resultiert netto in einer relativ zum Ventrikel verkürzten APD.

1.3.1.1 Vorhofflimmern

Die Entstehungsgrundlage für chronisches VHF liegt dem aktuellen Wissensstand zufolge in einer Verkürzung der APD (Grandi et al., 2011; Yue et al., 1997) und somit in einer erhöhten Anfälligkeit für Nachdepolarisationen (s. Abb. 2) begründet. Vermutlich bedingt durch eine erhöhte Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) und Proteinphosphatasen (Christ et al., 2004; Greiser et al., 2010; Neef et al., 2010) kommt es zu veränderten Phosphorylierungsgraden an Kanalproteinen wie L-Typ-Ca-Kanälen, Natrium-Ca-Austauschern (NCX) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Die Folge ist zum einen ein verminderter systolischer Ca-Influx via L-Typ-Ca-Kanäle mit dem Resultat einer konsekutiv verkürzten APD (Van Wagoner et al., 1999). Zum anderen konnten Neef et al. zeigen, dass es durch Ca-sensitivierte RyRs zu Spontanentladungen von Ca aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in der Diastole kommt, welche zu einem zytosolischen Overload mit Ca führen (Neef et al., 2010). Da NCX bei VHF ebenfalls hochreguliert ist (Neef et al., 2010), wird Ca zugunsten von Natrium aus der Zelle gepumpt. Der dabei resultierende Natrium-Einstrom (N_{Ti}) führt zu einer Depolarisation (Greiser et al., 2010; Neef et al., 2010). Grandi et al. konnten aufzeigen, dass der physiologische Natrium-Strom maßgeblich die Frequenzadaptation der APD steuert (Grandi et al., 2011). Da dieser durch das Ca-Remodeling ebenfalls gestört ist, können atriale Myozyten bei VHF ihre APD nicht an die HF anpassen. N_{Ti} sowie die zusätzliche Verkürzung der APD begünstigen die Entstehung später Nachdepolarisationen mit der Folge unkontrollierter Erregungsausbreitungen (Greiser et al., 2010; Neef et al., 2010). Dies wiederum führt zu ungleichmäßig erregtem Vorhofmyokard und kann in der Entstehung von mehreren kleinen Reentry-Kreisen resultieren (Bingen et al., 2014).

1.3.2 Ventrikel

Die bisher vertretene Auffassung hinsichtlich der Genese von ventrikulären Arrhythmien unterscheidet sich von der für atriale HRST. Die Erklärung liegt in der Beschaffenheit der APs und somit in deren APD begründet. Wesentlicher Bestandteil des APs im ventrikulären Myozyten ist die Plateau-Phase (Phase 2). Es wird hauptsächlich durch

L-Typ-Ca-Kanäle und deren Strom (I_{CaL}) erzeugt (Carmeliet, 1993). Der entgegengerichtete Kaliumausstrom hat im Gegensatz zum Atrium nur drei Bestandteile (I_{TO} , I_{Kr} und I_{Ks}), da K_{UR} nicht exprimiert wird (Li et al., 1996a; Tomaselli und Marbán, 1999). Die Repolarisation wird deshalb später eingeleitet. Je länger die APD, desto eher ergibt sich ein kritischer Zustand, in dem leichte Veränderungen von Ionenströmen den Unterschied zwischen Repolarisation oder verlängerter Depolarisation ausmachen können (Tomaselli et al., 1994).

1.3.2.1 Ventrikuläre Tachykardie und Kammerflimmern

Beschrieben sind zwei Mechanismen, die diesen HRST zugrunde liegen (Herold, 2011):

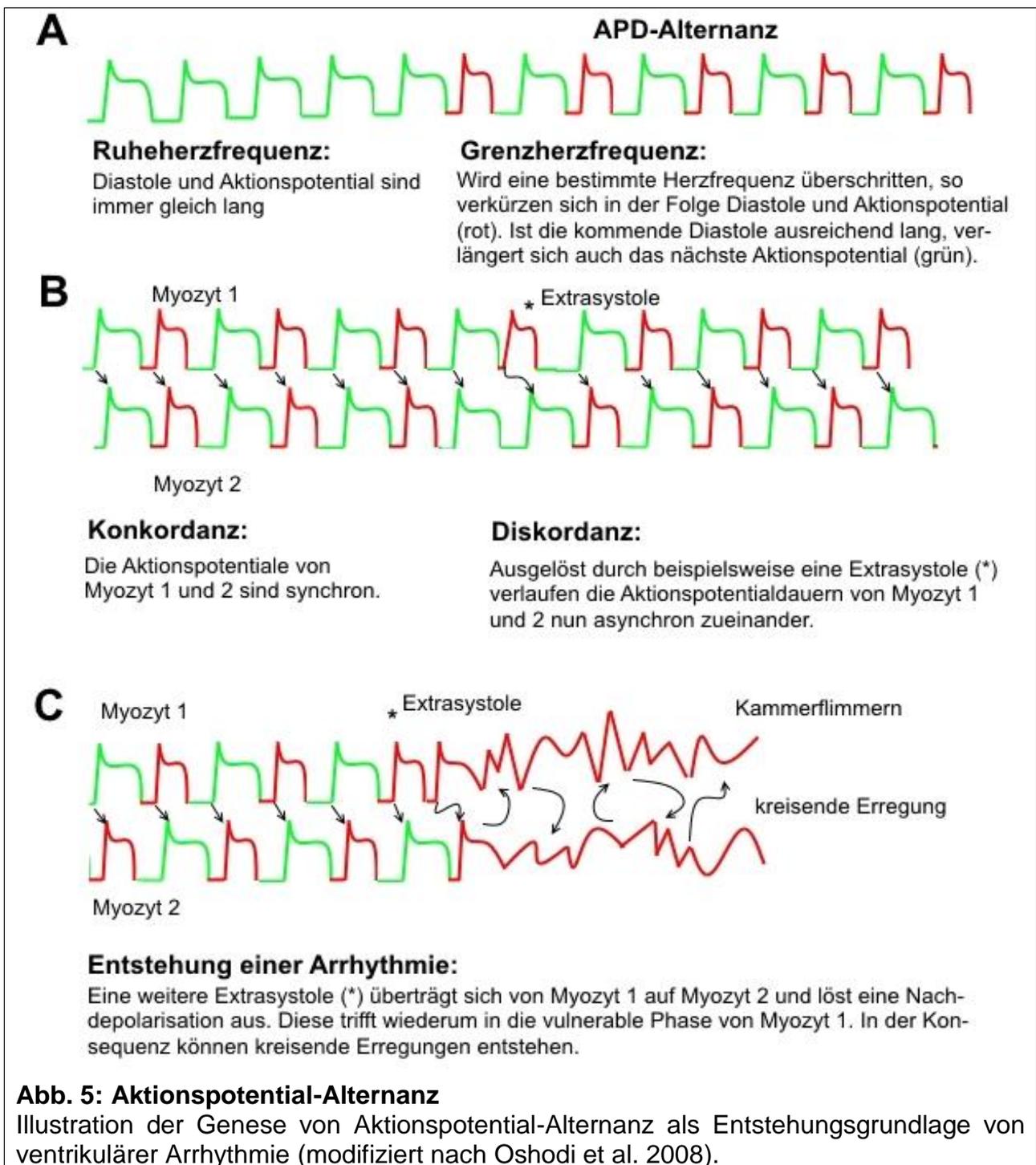
1.3.2.1.1 Gesteigerte Automatie

Pogwizd beschrieb verschiedene intrazelluläre Veränderungen des Myozyten, die eine gesteigerte Automatie zur Folge haben. Durch die erhöhte Spontanentladung der Zellen kommt es zu einer tachykarden Rhythmusstörung. Die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen erhöhte Expressionsmuster für NCX und verminderte Ausbildungen von Kaliumeinwärtsgleichrichter-Kanälen (K_{IR}) zu sein, welche verspätete Nachdepolarisationen zur Folge haben. Ebenso fanden sich Hinweise auf eine erhöhte intrazelluläre Ca-Last durch β -adrenerge Stimulation (Pogwizd und Bers, 2004).

1.3.2.1.2 Kreisende Erregungen

Physiologischerweise passt sich auch im Ventrikel die APD an die HF an (Carmeliet, 1993). Wird allerdings eine bestimmte Frequenz überschritten, verkürzt sich die Diastole soweit, dass nicht mehr alle zur Depolarisation notwendigen Ionenkanäle (hauptsächlich Ca-Kanäle) aktivierbar sind. Das Resultat ist eine verkürzte APD. Da die nächste Diastole nun folglich länger ist, sind alle Ionenkanäle wieder rekrutierbar. Die folgende APD ist demzufolge ebenfalls wieder prolongiert. Dieses Phänomen wird als APD-Alternanz bezeichnet. Überträgt sich ein AP korrekt auf die nächste Zelle und verhalten sich die APDs beider Myozyten synchron zueinander, spricht man von Konkordanz (s. Abb. 5B). Im Falle einer herabgesetzten Fortleitungsgeschwindigkeit zwischen Zelle A und Zelle B (z. B. durch eine Extrasystole) würden sowohl die Diastole als auch die APD von B verlängert werden, während die Repolarisationszeiten von A verkürzt würden. Folglich sind die APDs von Zelle A und B phasenverschoben. Diesen Zustand nennt man diskordant (s. Abb. 5B*). Ergibt sich ein ähnliches Phänomen ein

weiteres Mal, so kann eine Nachdepolarisation erzeugt werden (s. Abb. 5C*). Entsprechend dem Muster bei VHF entsteht auch hierbei ein inhomogenes Myokard, in dem die APDs der einzelnen Zellen nicht mehr synchron zueinander verlaufen. Kreisende Erregungen können die Folge sein (Wilson und Rosenbaum, 2007). Je nach Durchmesser eines Reentry ergibt sich entweder eine ventrikuläre Tachykardie (VT) oder Kammerflimmern. Der exakte Mechanismus auf Zellebene, der diesem Phänomen zugrunde liegt, ist bis jetzt noch nicht verstanden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch hier Störungen im Gleichgewicht zwischen Ca-Influx und -efflux aus der Zelle vorliegen. Wilson et al. folgerte aus seinen Untersuchungen, dass es scheinbar zelluläre Mechanismen gibt, welche eine Anfälligkeit für ADP-Alternanz bereits bei niedrigeren HF's begünstigen (Wilson und Rosenbaum, 2007). Wan et al. konnten zeigen, dass sich Alternanz-empfindliche Myozyten durch einen verlangsamten Ca-Reuptake aufgrund verminderter Expressierung von RyRs und SERCA2a (Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums) auszeichnen (Wan et al., 2005). Des Weiteren legten Ergebnisse von Mitsuyama et al. eine erhöhte CaMKII-Aktivität in Myozyten dar, welche mit modulierten Phosphorylierungsgraden verschiedener Ionenkanäle einhergeht (Mitsuyama et al., 2014).



1.4 Desmin

1.4.1 Beschreibung

DES gehört zur Familie der Intermediärfilamente (IF), welche sechs Untergruppen mit insgesamt 70 verschiedenen Proteinen beherbergt. Es wurde 1977 erstmals isoliert (Costa et al., 2004; Herrmann und Aebi, 2000). Als Protein der IF-Klasse III kommt es hauptsächlich in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur vor. Im Skelettmuskel bildet DES ein dreidimensionales Netzwerk im Bereich der Myofibrille aus (Costa et al., 2004; Kouloumenta et al., 2007). DES-Mutationen können verschiedene Erkrankungen der Skelett- und Herzmuskulatur zur Folge haben (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.4.2 Genetik

Das humane DES-Gen wurde 1989 zuerst beschrieben (Costa et al., 2004): Es ist auf Chromosom 2q35 lokalisiert, ca. 8,3 kb lang und wird von einer Locus-Control-Region (Li et al., 1989; Tam et al., 2006) reguliert. Bisher sind 67 krankheitsverursachende Mutationen dieses Gens beschrieben worden (Clemen et al., 2013). Interessant ist, dass die Lokalisation der Genveränderung Einfluss auf den Phänotyp nimmt: Mutationen, die Veränderungen in der Coil-2-Domäne (s. Abb. 6) verursachen, haben häufiger isoliert neurologische Phänomene zur Folge, während Alterationen in der Head- oder Tail-Domäne zu Ausprägungen von kardialen Symptomen tendieren. Meist werden DES-assoziierte Myopathien autosomal-dominant vererbt (Spaendonck-Zwarts et al., 2011). Häufig finden sich Missense-Mutationen mit Transition oder Transversion einzelner Aminosäuren. Die in Deutschland häufigste Form ist die Punktmutation mit Austausch von Arginin durch Prolin an Position 350 (R350P) in heterozygoter Ausprägung (Clemen et al., 2013; Walter et al., 2007). Es gibt auch autosomal-rezessive Erbfolgen oder sporadische Mutationen, allerdings kommen diese deutlich seltener vor (Clemen et al., 2013).

1.4.3 Struktur

Das humane DES ist ein Protein aus 470 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53,5 kDa und hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 5,4 (Clemen et al., 2013; Costa et al., 2004). Seine Molekularstruktur entspricht dem allgemeinen Aufbau von IFs (s. Abb. 6).

1.4.3.1 Rod

Die zentrale Struktur ist die „Rod“-Domäne. Diese besteht aus drei helikalen Abschnitten (Coil 1a, Coil 1b und Coil 2), welche durch Polypeptide, sogenannte Linker (L1, L12), voneinander getrennt sind (Bär et al., 2005; Clemen et al., 2013; Nicolet et al., 2010). Sie kann mit einem weiteren IF ein Dimer ausbilden, indem sich beide Filamente Helix-artig umeinander winden. Diese Formation wird durch eine repetitive Heptapeptid-Sequenz innerhalb eines IF-Moleküls mittels Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Da es sich um helikal umeinander gewickelte Helizes handelt, spricht man von „Coiled Coils“ (Bär et al., 2005; Burkhard et al., 2001; Clemen et al., 2013).

1.4.3.2 Head und Tail

Je am N- und C-terminalen Ende des „Rod“ liegt ein weiteres Polypeptid an: „Head“- und „Tail“-Domäne. Beide sind von nicht-helikaler Struktur und in ihrer Aminosäure-Sequenz recht variabel (Bär et al., 2005; Herrmann und Aebi, 2004).

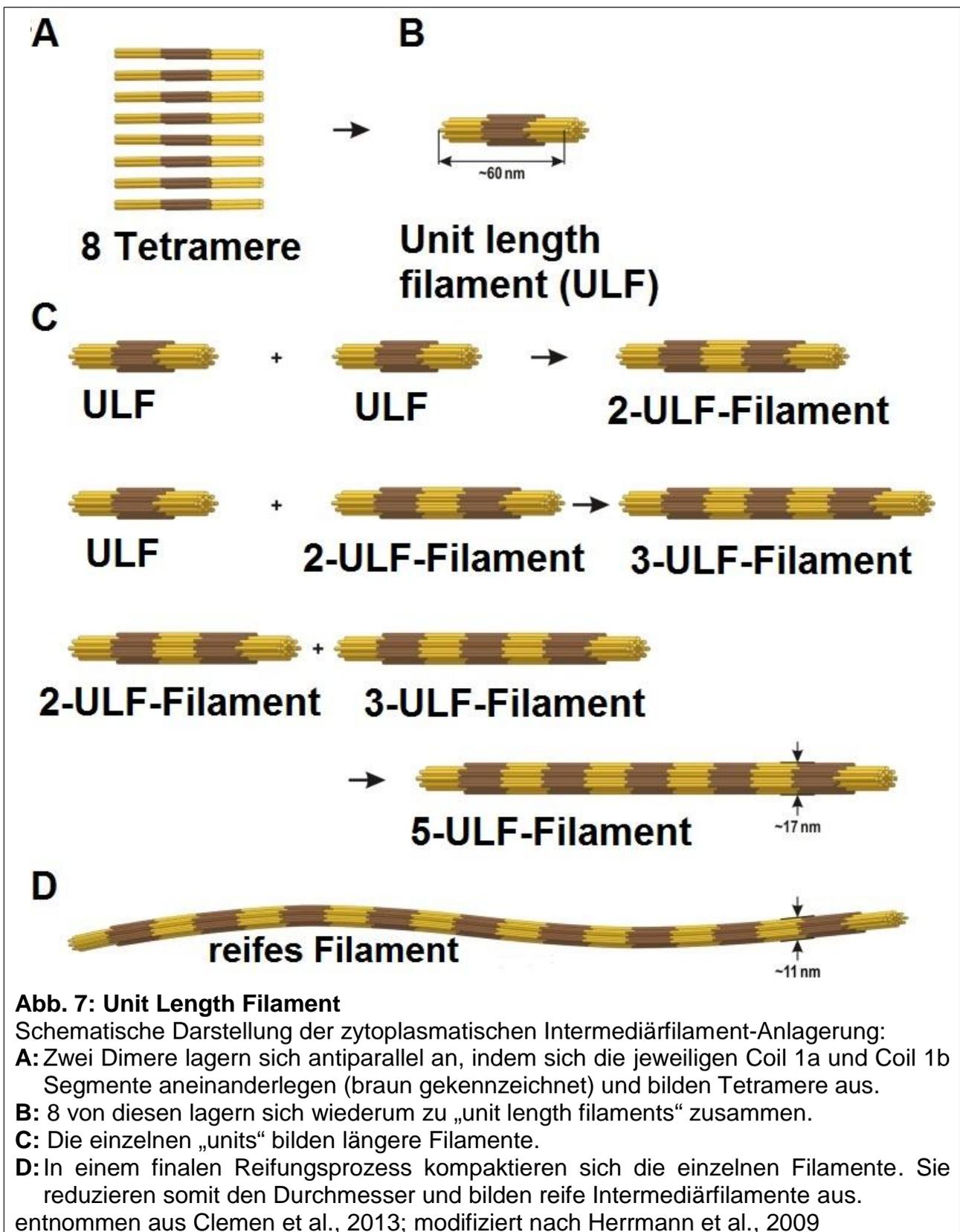
1.4.3.3 Ausbildung von Strukturfilamenten

Durch Phosphorylierung kann, wie bei allen IFs, die Polymerisierung von DES reguliert werden: Je zwei dieser Dimere lagern sich zu Tetrameren zusammen (Costa et al., 2004; Herrmann et al., 1996). Diese wiederum lagern sich parallel zueinander an und bilden sogenannte „unit length filaments“ aus (Herrmann et al., 1996; Herrmann und Aebi, 2000), welche sich letztlich in serieller, longitudinaler Ausrichtung zu IFs zusammensetzen (s. Abb. 7). Da DES in der Lage ist, sowohl Homo- als auch Heterodimere mit anderen IFs auszubilden, können auf diesem Weg Isoformen entstehen (Costa et al., 2004). Diese Befähigung lässt den Schluss zu, dass hierdurch das Filament-Netzwerk strukturell verändert und an Anforderungen (z. B. Stärkung der Zellintegrität) angepasst werden kann, die einer bestimmten Zellform (z. B. Myozyt oder Purkinje-Faser) spezifisch abverlangt werden.



Abb. 6: Desmin-Gen

Skizze des humanen Desmins und Lage der R350P-Mutation: Die schwarzen Blöcke stehen für die alpha-helikalen Coils. Grau unterlegt sind die Linker-Regionen L1 und L12. Die Head- (grün) und Tail-Domäne (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die Zahlen repräsentieren die Position der einzelnen Strukturen in der Aminosäurekette in N-C-Richtung (modifiziert nach Clemen et al., 2013).



1.4.4 Funktion

DES erfüllt vielfältige Aufgaben im Intrazellularraum:

1.4.4.1 Myogenese

DES gilt als Marker-Protein in der Myogenese (Capetanaki et al., 2007), wo es im Ventrikel und in den Somiten exprimiert wird (Kouloumenta et al., 2007; Kuisk et al., 1996). Es wird vor vielen anderen muskelspezifischen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren wie myoD, Myogenin und mrf4 gebildet (Kuisik et al., 1996; Li et al., 1994; Weitzer et al., 1995). In bestimmten Zeitfenstern interagiert es mit fünf kolokalisierten IFs: Vimentin, Nestin, Synemin, Syncoilin und Lamin B (Georgatos et al., 1987; Lockard und Bloom, 1993).

1.4.4.2 Verbindung mit Strukturproteinen

DES bildet ein komplexes Netzwerk innerhalb der Zelle aus. Dabei bindet es mit seinen unterschiedlichen Substrukturen an IF-assoziierte Proteine wie Myotubularin, Myospryn und Plektin (Hnia et al., 2011; Konieczny et al., 2008; Kouloumenta et al., 2007): Die Kopfdomäne von DES hat eine Bindungsstelle für Myospryn, welches einen Bestandteil des BLOC-1 Komplexes von Herzmuskelzellen darstellt und bei der Biogenese und Ausrichtung von Lysosomen beteiligt ist (Kouloumenta et al., 2007). Plektin spielt im Skelettmuskel eine tragende Rolle. Die Isoformen 1d und 1f verbinden sich mit DES an den Z-Scheiben und den Costameren; die Isoform 1b bindet DES an Mitochondrien (Konieczny et al., 2008), indem es sich direkt an dessen Rod-Domäne heftet (Favre et al., 2011).

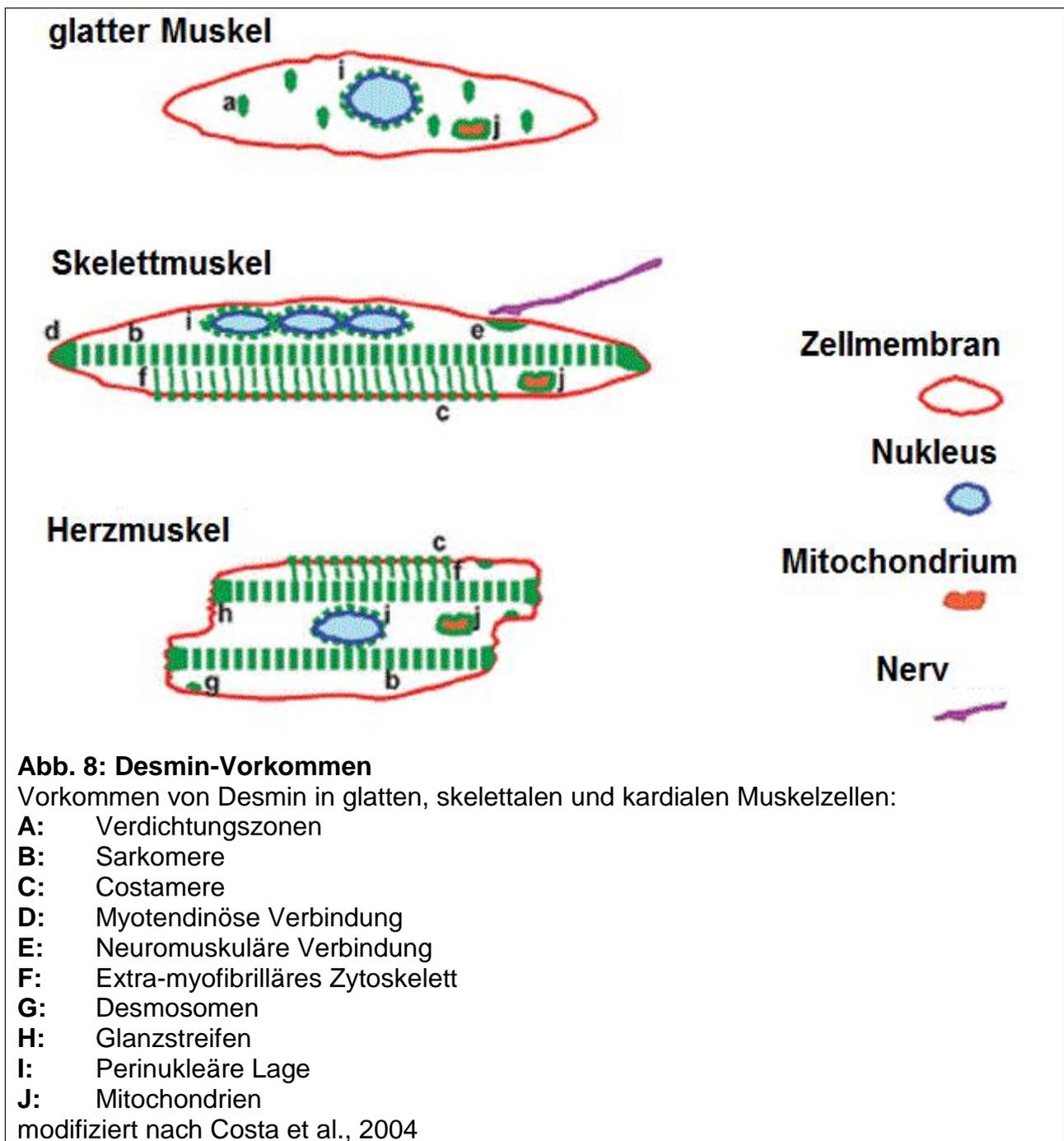
Weiterhin steht es in direktem lokalen sowie funktionellen Bezug zu Proteinen des kontraktile Apparates: Myomesin-1 (M-Bande) und Nebulin (Z-Bande) binden sich in Skelettmuskeln, Calponin im glatten Muskel an die Rod-Domäne von DES (Bang et al., 2002; Fujii et al., 2000; Price, 1987). Über weitere Strukturproteine wie Spektrin und Ankyrin verankert es sich im Zytoskelett (Georgatos et al., 1987; Langley und Cohen, 1986). Zusätzlich interagiert es mit kleinen Heat-Shock-Proteinen (HspB1 und HspB5/alphaB-Crystallin) und (Einzelstrang-) DNA (Bennardini et al., 1992; Kawano et al., 2012; Wang et al., 2001a).

1.4.4.3 Funktionen in Muskelzellen

DES weist ein breites Verteilungsspektrum unter den drei verschiedenen Muskelzelltypen (glatte, skelettale und Herzmuskulatur) auf (s. Abb. 8). Dort steht es in den unterschiedlichen Zellkompartimenten mit anderen Makromolekülen in Verbindung: Vimentin in Z-Scheiben, Dynein in Mikrotubuli, Lamin im Nukleus. So kann es in glatten Muskelzellen sowohl perinukleär als auch in den Mitochondrien, insbesondere jedoch in den Dense-Bodies (Verdichtungszone) nachgewiesen werden (Costa et al., 2004). In der Skelettmuskulatur ist es gehäuft in myotendinösen und neuromuskulären Verbindungen (Tidball, 1992), in den Sarkomeren (M- und Z-Scheiben), Costameren (Costa et al., 2004) und im Bereich der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren in der muskulären Endplatte zu finden (Mitsui et al., 2000). Den höchsten Anteil an DES jedoch besitzen die Kardiomyozyten mit 2 % des absoluten Proteins (Price, 1984), wo es ein ähnliches Verteilungsmuster aufweist wie in den skelettalen Myozyten. Es bildet auch hier ein dreidimensionales Zytoskelett. Dieses verbindet benachbarte Myofibrillen untereinander sowie den myofibrillären Apparat mit Zellorganellen wie dem Nukleus und der Extrazellulärmatrix (s. Abb. 9). DES kommt in allen drei Muskeltypen auch perinukleär vor (Capetanaki et al., 2007; Costa et al., 2004; Kouloumenta et al., 2007; Schröder und Schoser, 2009). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DES wichtige Rollen bei der Integrität der Zellstruktur zukommen (Kouloumenta et al., 2007).

1.4.4.4 Signaltransduktion

Abgesehen von der Funktion als Träger der mechanischen Stabilität scheinen diese komplexen Interaktionen noch weiteren Zwecken wie der intrazellulären Informationsprozessierung zu dienen. Es wird vermutet, dass DES DNA binden und somit auch transkriptionsregulatorische Aufgaben erfüllen kann (Traub, 1995). Auch in der Apoptose scheint DES eine Rolle zuzukommen, da es hier von Caspase 6 phosphoryliert wird. Dadurch wird DES im Linker L12 getrennt, was offenbar Einflüsse auf die Integrität des Zytoskeletts nimmt (Chen et al., 2003).



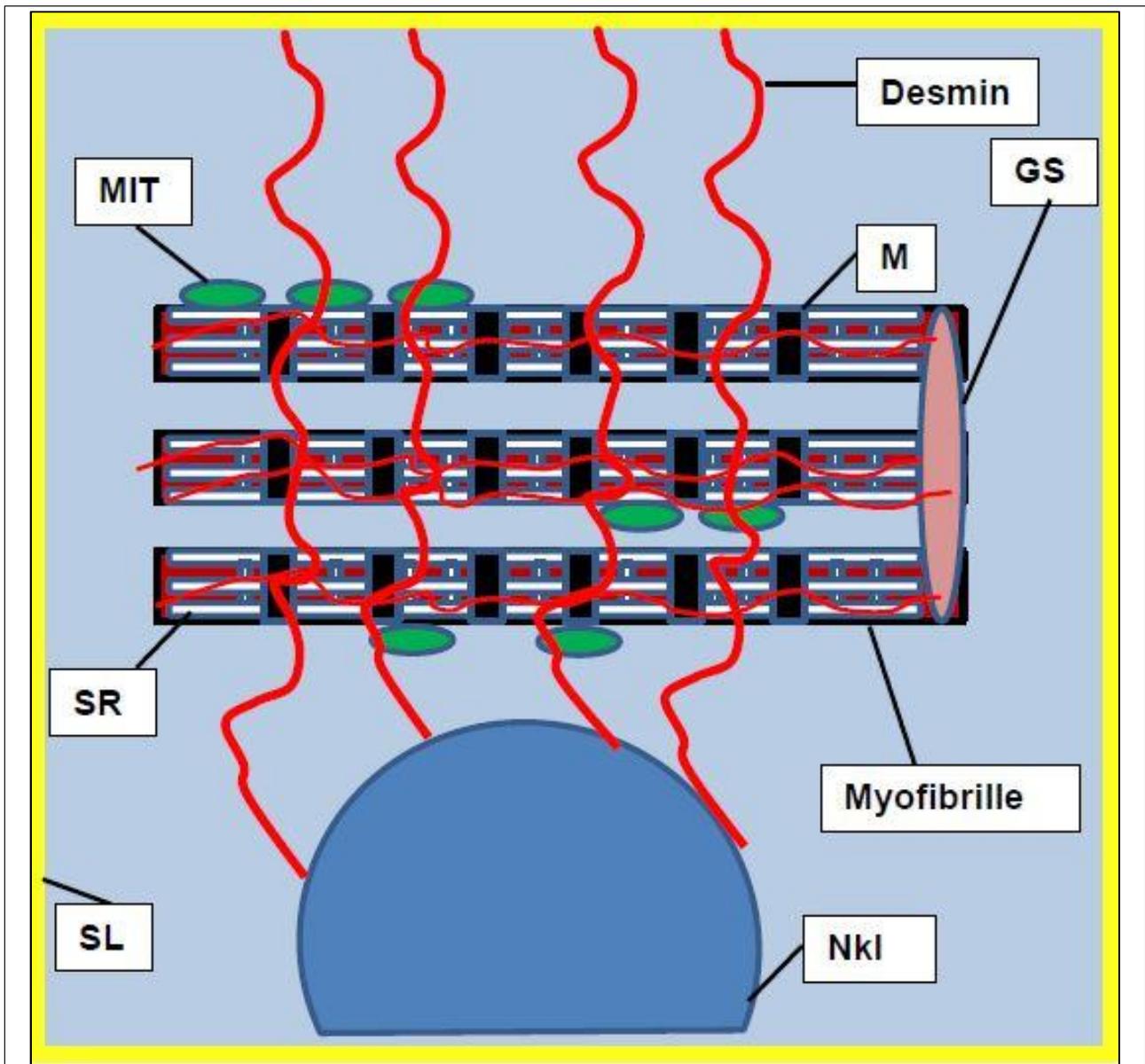


Abb. 9: Desmin in der Zelle

Darstellung von Desmin und strukturelle Bezüge zu anderen Zellstrukturen (modifiziert nach Capetanaki et al., 2007)

Abkürzungen: GS: Glanzstreifen; M: M-Bande; MIT: Mitochondrium; Nkl: Zellkern; SL: Sarkolemm; SR: sarkoplasmatisches Retikulum

1.5 Die Rolle des Desmins in der Kardiomyopathie

1.5.1 Desminopathie

Desminopathien (Synonym: DES-assoziierte Myopathien) gehören zu den myofibrillären Myopathien, eine Gruppe morphologisch homologer, aber genetisch sehr heterogener neuromuskulärer Erkrankungen (Spaendonck-Zwarts et al., 2011). Zugrunde liegt eine Mutation im DES-Gen. Charakteristisch sind intrazelluläre, DES-positive Protein-

einschlüsse und degenerative Veränderungen des kontraktile Apparates der Zelle (Schröder und Schooser, 2009; Selcen, 2011). Der genaue Pathomechanismus, der diesen Phänomenen zugrunde liegt, ist bisher noch unklar.

1.5.2 Epidemiologie

Es handelt sich um seltene Erkrankungen mit etwa fünf Fällen auf 10.000 Einwohner (Clemen et al., 2013). 1–2 % der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sind Träger einer DES-Mutation (Taylor et al., 2007). Umgekehrt sind 50 % der Mutationsträger an einer Kardiomyopathie erkrankt. Desminopathien treten unabhängig vom Geschlecht auf, allerdings neigen Männer eher zu kardialen Manifestationen. Das Manifestationsalter variiert stark und reicht von der 1. bis zur 7. Lebensdekade. Die Letalität beträgt 26 % (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.5.3 Klinik

Klinisch manifestieren sich DPs isoliert oder kombiniert in verschiedenen Organen:

1.5.3.1 Erkrankungen des Herzens

74 % der Träger zeigen kardiologische Symptome, 22 % weisen isoliert Herzprobleme auf. Das Durchschnittsalter bei Erstmanifestation beträgt 35 Jahre. 50 % leiden unter einer Kardiomyopathie. Die führende Entität ist die dilatative gefolgt von der restriktiven und hypertrophen Kardiomyopathie. Allerdings unterscheidet sich das Eintrittsalter der beiden letzteren Formen (33 und 28 vs. 46 Jahre). 62 % der DES-Mutationsträger zeigen verschiedene Formen von Erregungsstörungen und Arrhythmien, 2/3 hiervon in Kombination mit einer Kardiomyopathie. Unter den Erregungsstörungen sind atrioventrikuläre Blöcke (AVB) und Rechtsschenkelblockaden die häufigsten Manifestationen. Unter den Arrhythmien sind am häufigsten VHF, ventrikuläre Extrasystolen (VES) und VTs vorzufinden (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.5.3.2 Erkrankungen der Skelettmuskulatur

74 % der DPs sind mit verschiedenen Formen der Myopathie oder Muskelschwäche assoziiert. Insgesamt lassen sich in 67 % der Fälle kombiniert proximale und distale Muskelschwächen nachweisen, jedoch haben nur 27 % isoliert distale bzw. 6 % alleinig proximale Schwächen. Bei 30 % der Betroffenen können normale Plasmaspiegel für die Kreatinkinase gemessen werden (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.5.3.3 Neurologische Erkrankungen

74 % der Mutationsträger leiden unter Nervenerkrankungen. 22 % werden mit isoliert neurologischen Symptomen (z. B. ebenfalls Muskelschwäche oder -atrophie) auffällig. Das Durchschnittsalter bei Krankheitsbeginn beträgt ebenfalls 35 Jahre (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.5.3.4 Erkrankungen der Lungen

Pulmonologische Probleme (z. B. respiratorische Insuffizienz) treten bei 26 % der Träger auf (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

Als Todesursachen treten plötzlicher Herztod und akutes Herzversagen auf. In 80 % der Todesfälle kann eine Kardiomyopathie nachgewiesen werden (Spaendonck-Zwarts et al., 2011). Die genaue Pathogenese sowie die jeweiligen sequenziellen Schritte, die zu dem kardialen Phänotyp führen, sind noch unklar. Zudem existiert zum augenblicklichen Zeitpunkt keine Kausaltherapie (Spaendonck-Zwarts et al., 2011).

1.5.4 Pathologie

Es sind diverse Strukturveränderungen unterschiedlicher Ausprägung in den verschiedenen Muskeltypen vertreten.

1.5.4.1 Skelettmuskulatur

Muskelbiopsien von Patienten mit DP zeigen unterschiedlich schwerwiegende Zeichen der degenerativen Myopathie: Muskelfasern sind im Durchmesser stark variabel, Zellkerne weisen Veränderungen auf, Binde- und Fettgewebe treten vermehrt in Erscheinung. Zusätzlich bieten spezielle Färbungen Hinweise auf mitochondriale Veränderungen (s. Abb. 10). Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen DES detektieren Einschlüsse von Proteinhäufen (s. Abb. 11), welche ein Kennzeichen myofibrillärer Myopathien sind. Abb. 12 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen mit intermyofibrillär und subsarkolemmal gelegenen granulofilamentösen Verdichtungen und DES-positiven Proteineinschlüssen (Bär et al., 2005).

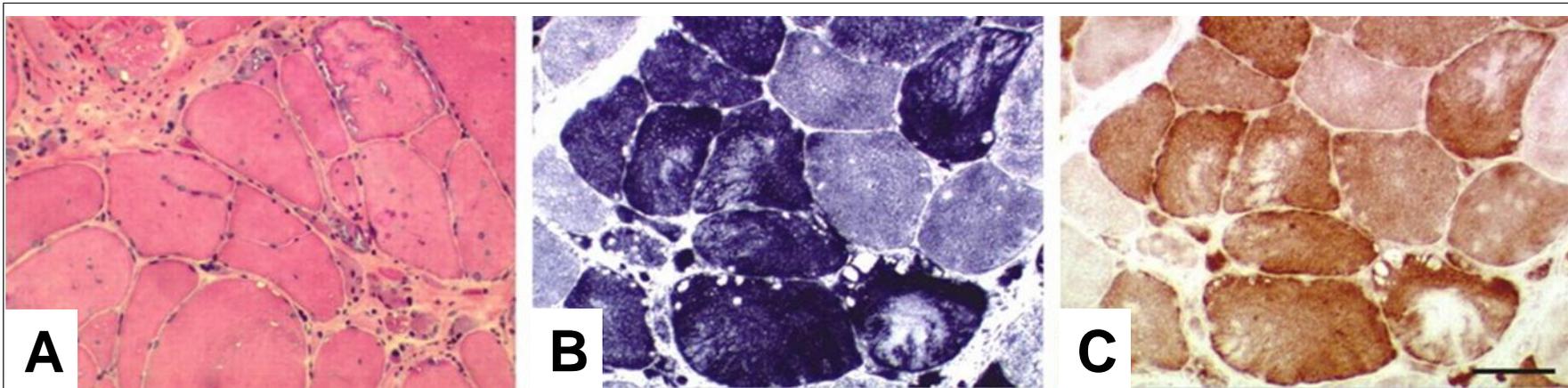


Abb. 10: Mikroskopische Veränderungen

A: Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (zur Gewebedifferenzierung) zeigt die unterschiedlichen Kaliber der Muskelfasern.

B: Succinat-Dehydrogenase-Färbung

C: Cytochrom-c-Oxidase-Färbung

B und C zeigen mitochondriale Aktivität durch Blau- bzw. Braun-Färbung an: Die fehlende Färbung weist auf mitochondriale Veränderungen hin.

Streifen = 100 µm

modifiziert nach Bär et al., 2005

mit Genehmigung der Oxford University Press

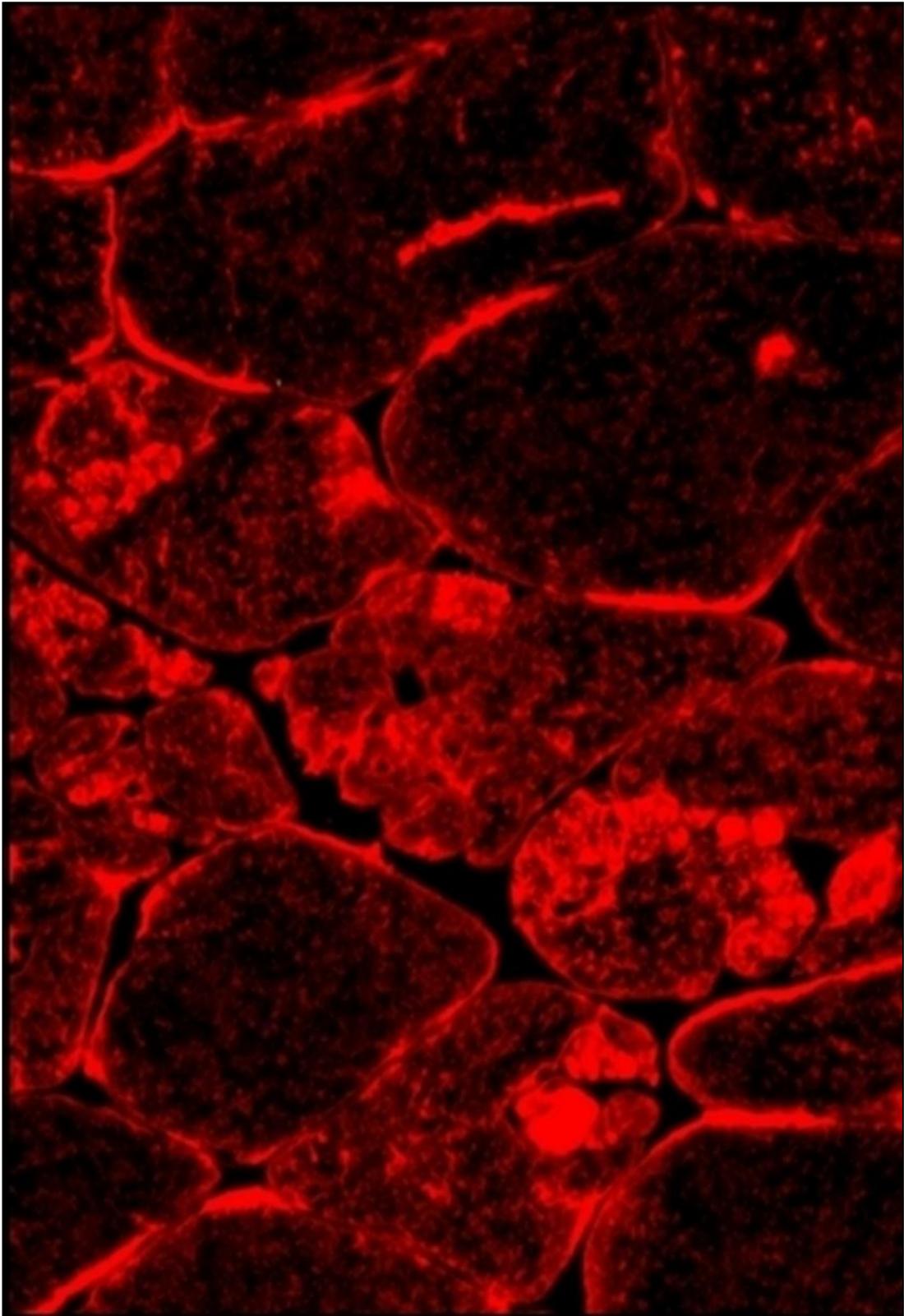


Abb. 11: Desmin-Aggregate 1

Immunfluoreszenz-Färbung von Desmin bei Desminopathie: Die Proteineinschlüsse erscheinen als rote Anhäufungen (modifiziert nach Clemen et al., 2013).

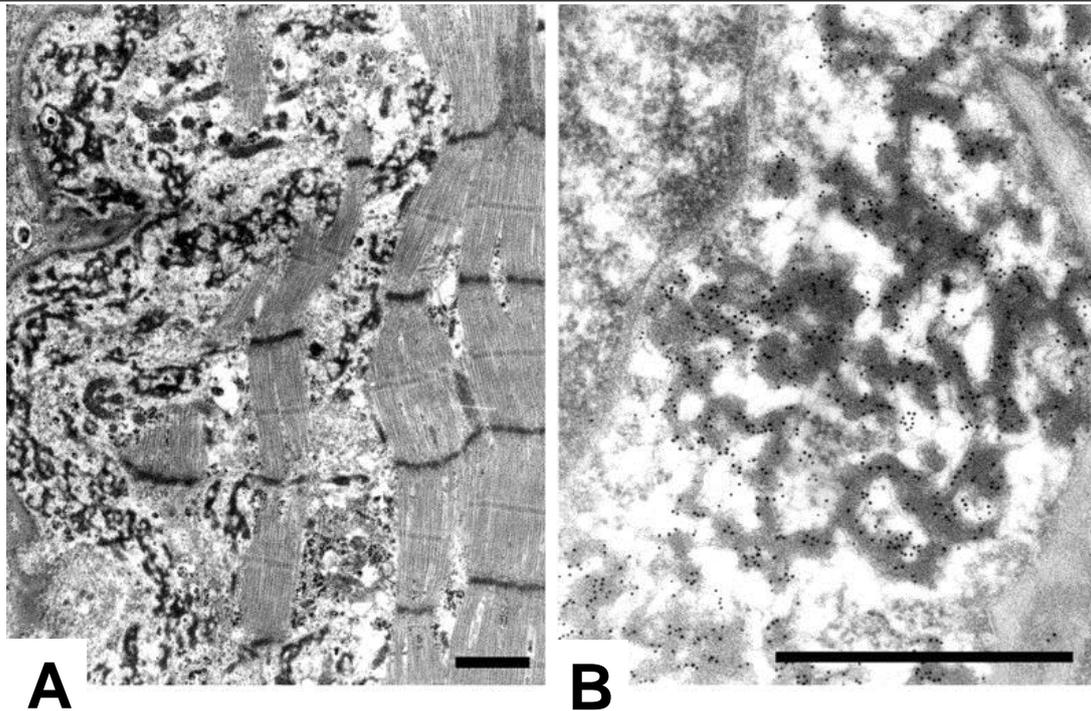


Abb. 12: Desmin-Aggregate 2 (Elektronenmikroskop-Aufnahmen)

A: Es sind intermyofibrilläre, granulofilamentöse Anhäufungen zu erkennen.

B: Rechts in Vergrößerung illustriert die Immunogold-Aufnahme mit monoklonalem Anti-Desmin-Antikörper (mab-D33 und an Goldpartikel gebundener Sekundär-Antikörper) die Desmin-positiven Proteineinschlüsse.

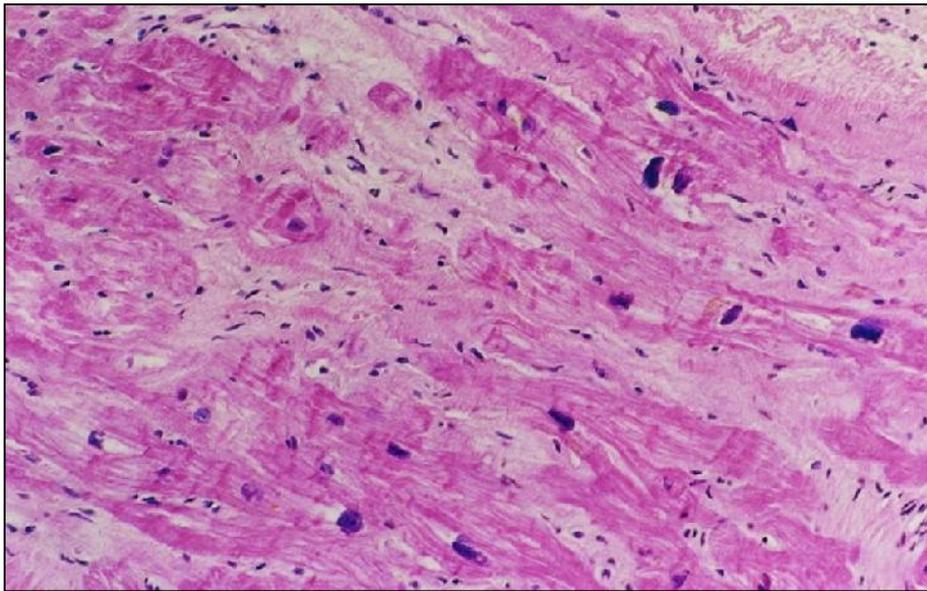
Streifen 0,2 μm

modifiziert nach Bär et al., 2005

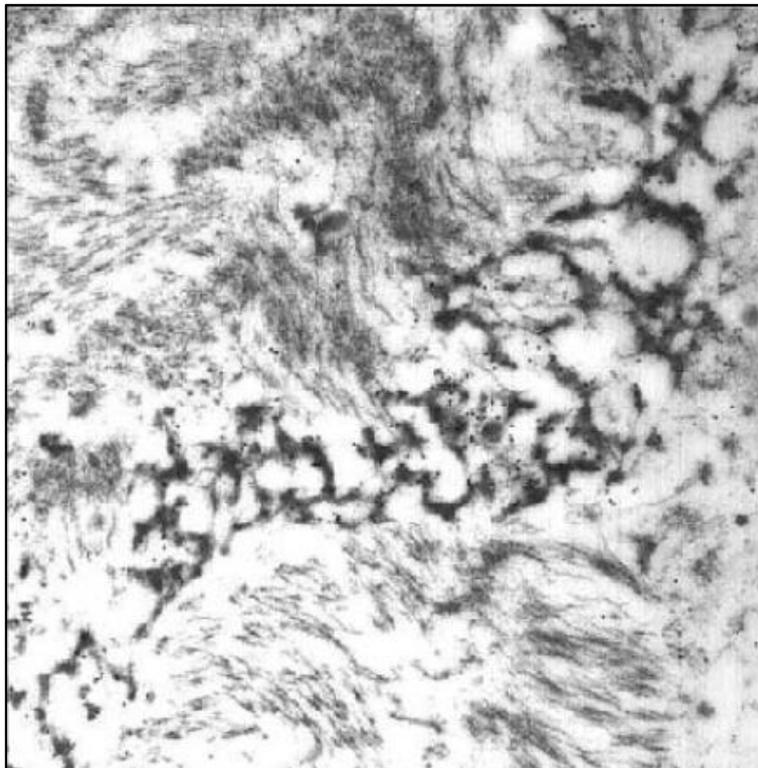
mit Genehmigung der Oxford University Press

1.5.4.2 Kardiomyozyten

Auch hier sind Protein-Aggregate typische histomorphologische Aspekte der DES-assoziierten Kardiomyopathie. Allerdings verteilen sich die Einschlüsse im Kardiomyozyten innerhalb der gesamten Zelle. Um diese nachweisen zu können, sind jedoch elektronenmikroskopische Aufnahmen notwendig (s. Abb. 14), da sich das Myokard lichtmikroskopisch nicht sonderlich von Gewebe bei reinen Kardiomyopathien unterscheidet (Arbustini et al., 1998, 2006). Kardiale magnetresonanztomographische Untersuchungen von Patienten mit DP wiesen teilweise Zeichen von fokaler Hypertrophie auf (Strach et al., 2008). Autopsien von erkrankten Herzen ergaben, dass es zu Kalzifizierungen des His-Bündels und der Tawara-Schenkel (Yuri et al., 2007) sowie myokardialer Fibrose-Bildung (s. Abb. 13) kommt (Benvenuti et al., 2012). Interessanterweise sind vergleichbare Veränderungen nicht in glatten Muskelzellen vorzufinden (Arbustini et al., 2006).

**Abb. 13: Fibrose**

Myokard eines Patienten mit Desminopathie: Erkennbar sind interstitielle Fibrose und myozytäre Hypertrophie. Die Nuklei sind prominent und erscheinen disloziert (modifiziert nach Arbustini et al., 1998).

**Abb. 14: Desmin-Aggregate 3**

Aufzeichnung einer Immunelektronenmikrographie des Myokards bei restriktiver Kardiomyopathie: Die Desmin-Aggregate sind mit Desmin-Antikörpern sichtbar gemacht worden (modifiziert nach Arbustini et al., 2006).

1.5.5 Tiermodelle

Zum Zweck des besseren Verständnisses der pathophysiologischen Zusammenhänge wurden Tiermodelle entweder mit einem Knockout oder verschiedenen Mutationen im DES-Gen entwickelt (Gard et al., 2005; Kostareva et al., 2008; Li et al., 1996b, 1997; Milner et al., 1996):

1.5.5.1 Desmin-Knockout

Knock-Out-Mäuse (KO) wiesen Unterschiede zu Wildtyp (WT)-Kontrolltieren auf. Muskelzellen mit degenerativen Erscheinungen und Fehlanlagen von Zellorganellen prägten das Bild. Histologische Analysen von kardialem Gewebe (s. Abb. 15 und 16) präsentierten hämorrhagische, fibrotische und kalzifizierte Areale (Li et al., 1996b, 1997; Milner et al., 1996) sowie Veränderungen der Aortenwand (Li et al., 1996b). Interessant war die Beobachtung, dass Skelettmuskeln sich zwar initial normal ausbildeten, die Regeneration von Myofibrillen nach Belastung aber gestört war (Li et al., 1997). Ebenso wiesen KOs Defizite im postsynaptischen Bereich der neuromuskulären Verbindung mit Beteiligung von Ionenkanälen und der Acetylcholinesterase-Aktivität auf. Zudem gab es Hinweise auf eine gestörte Reinnervation der Muskelzellen (Agbulut et al., 2001). Kernspintomographische Untersuchungen zeigten signifikant reduzierte Werte sowohl für die links- und rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion als auch für das Herzzeitvolumen. Der linke Ventrikel war vergrößert und wies segmentale Wandverdünnungen und Akinesien auf (Sprinkart et al., 2012). Elektrophysiologisch zeigten sich bei KOs Veränderungen der atrialen und ventrikulären Refraktärzeiten. Erstere waren verkürzt und letztere prolongiert. Zudem zeigten sich Leitungsverzögerungen sowie eine erhöhte Anfälligkeit für VHF (Schricket et al., 2010).

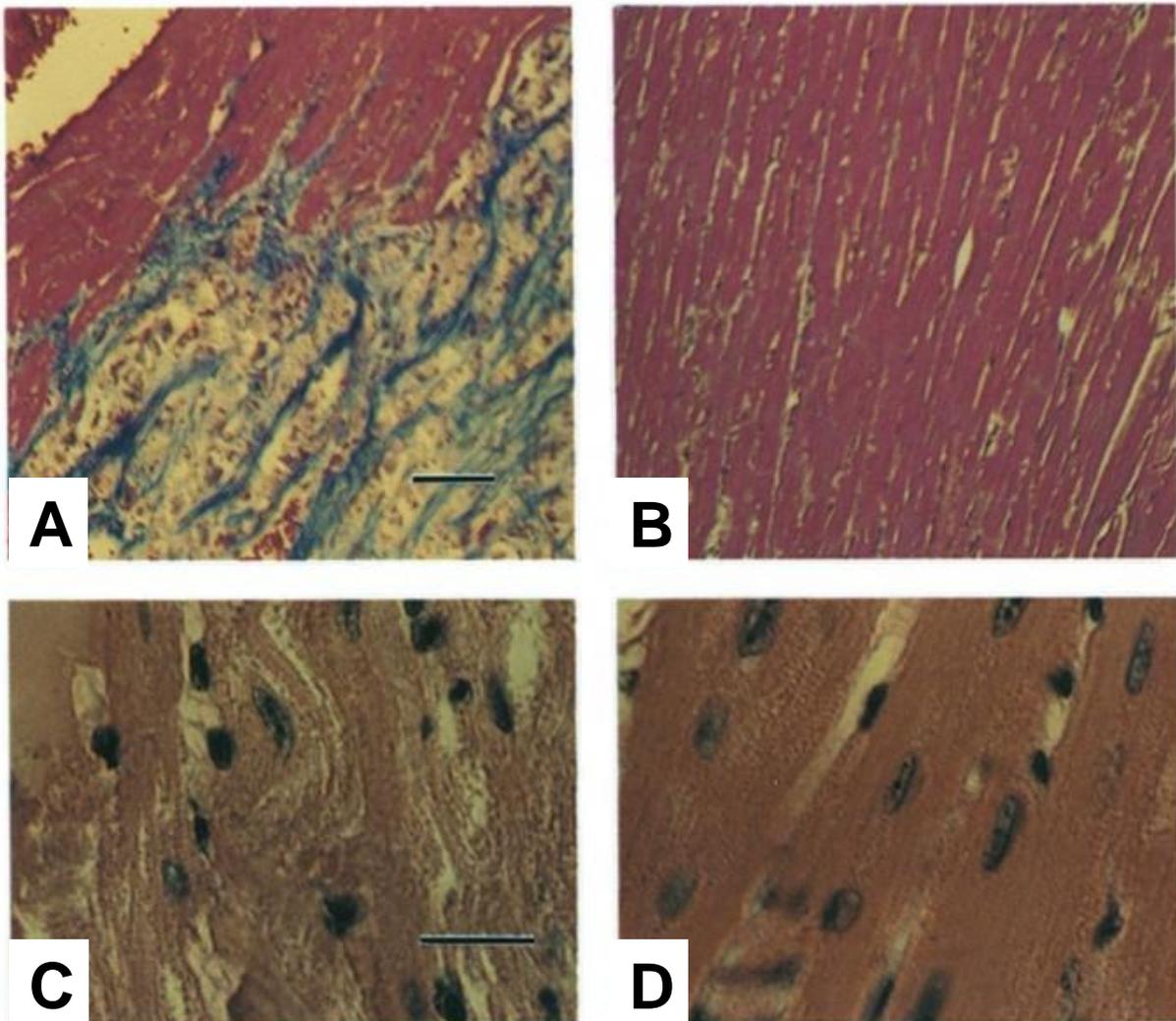


Abb. 15: Kardiale Veränderungen

A+B: Histologische Schnittbilder von myokardialem Gewebe zeigen den Unterschied zwischen Mäusen, die kein Desmin exprimieren (A) und Wildtypen (B). Das Desmin-freie Myokard weist interstitielle Fibrose auf.

C+D: Aufnahme von Fibrose-freien Arealen: Die Muskelfasern von Desmin-Knockout-Mäusen (C) wirken im Vergleich zum Wildtyp (D) deformiert und die Zellkerne erscheinen disloziert.

modifiziert nach Milner et al., 1996

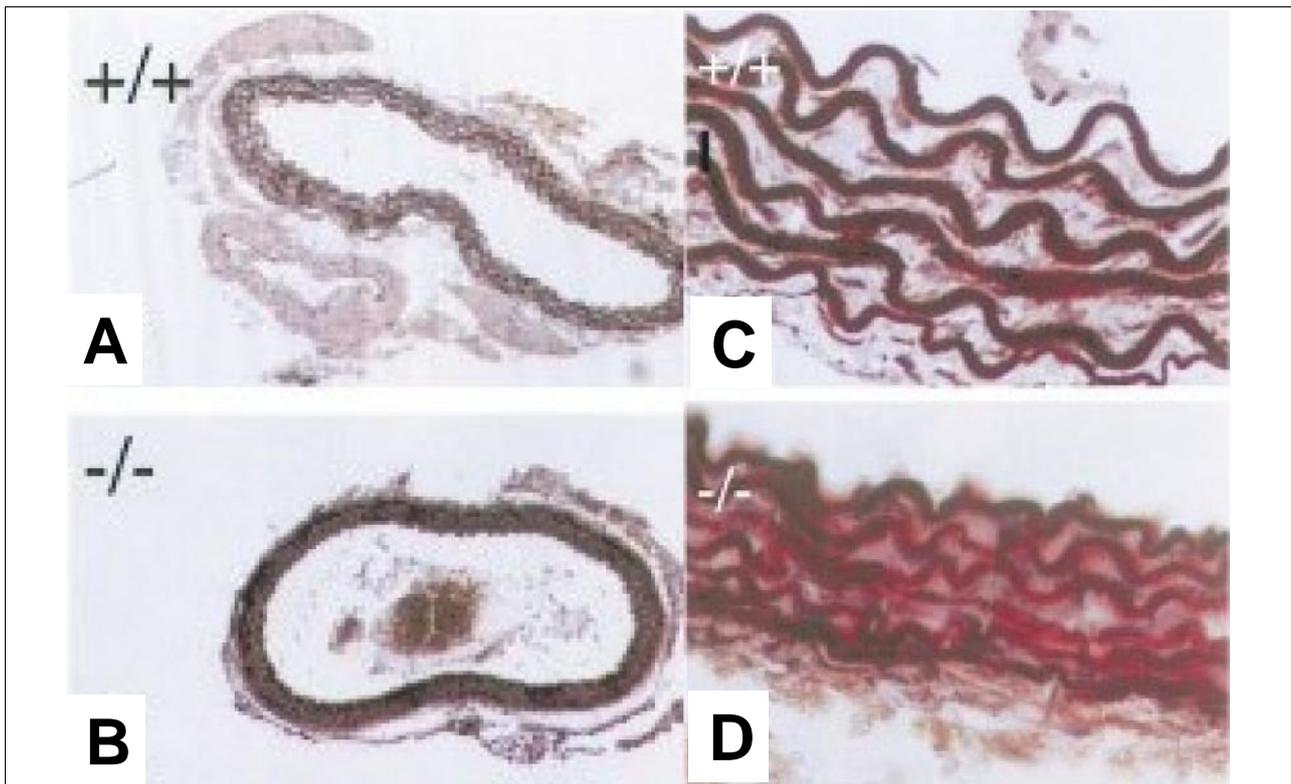


Abb. 16: Aortale Veränderungen

Vergleiche der Aortenwand von Wildtyp- (A und C) und Desmin-Knockout-Mäusen (B und D): Auffällig ist die kompaktere Anlagerung der elastischen Fasern in der Aortenwand der Desmin-Mutante (modifiziert nach Li et al., 1996b).

1.5.5.2 Desmin-Mutationen

Es existieren bereits Untersuchungen an transgenen Mausmodellen, welche deutliche Veränderungen in der morphologischen Struktur der Skelett- und Herzmuskelzellen zeigten. Teilweise konnten auch elektrophysiologische Auffälligkeiten beschrieben werden (Gard et al., 2005; Kostareva et al., 2008; Wang et al., 2001b). Das Grundproblem all dieser vorangegangenen Modelle ist die mangelnde humanpathologische Relevanz. Das Verhältnis der Expressionen von mutiertem zu WT-DES ist bei den bestehenden transgenen Mausmodellen (D7-des, L345P) zu gering, um Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Prozesse dieser Erkrankung beim Menschen ziehen zu können (Gard et al., 2005; Kostareva et al., 2008).

1.5.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Beschreibung eines kardialen Phänotyps der R350P-Mutation: Ein transgenes Mausmodell mit einem Knock-In (KI) der R350P-Mutation sollte hier als wahre „human mimikry“ dienen. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob bei KI-Mäusen vergleichbare Arrhythmien wie beim Menschen nachweisbar sind. Des Weiteren sollten Pathophysiologien wie strukturelle Veränderungen des Myokards oder des Reizleitungssystems als mögliche Ursachen identifiziert werden. Um diese Fragen zu klären, wurde obig genanntes Mausmodell als Mutationsträger verschiedenen Untersuchungen unterzogen. Um spontane Rhythmusstörungen zu detektieren, wurden Langzeit-Elektrokardiogramme (LZ-EKG) angefertigt. Mittels in-vivo durchgeführter elektrophysiologischer Untersuchungen (EPU) wurde die Empfänglichkeit für Arrhythmien untersucht. Epikardiales Mapping diente der Erfassung von Veränderungen der myokardialen Leitungseigenschaften. RNA-Analysen sollten klären, ob Zusammenhänge zwischen der DES-Mutation und Expressionsveränderungen von relevanten Strukturelementen der Reizweiterleitung existieren. Auch posttranskriptionale Alterationen wurden beleuchtet. Immunhistochemische Färbungen der Glanzstreifen sollten klären, ob es auf histologischer Ebene zu relevanten Fehlanordnungen kommt. Ebenso wurde das Myokard der Versuchstiere auf strukturelle Veränderungen wie Fibrose untersucht. Abschließend wurden Mechanismen zur Erklärung der Phänomene erläutert. Hierbei sollten Zusammenhänge zwischen genetischer Mutation, Genexpression, histologischer Struktur und Arrhythmogenese hergestellt werden.

2. Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche wie weibliche C57BL/6J-Mäuse mit einer heterozygoten ($\text{Des}^{\text{RP/+}}$) und homozygoten ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$) R350P-Missense-Mutation herangezogen. Sie wurden nach Geschlecht getrennt in je drei Untergruppen von 2–4, 5–7 und 8–9 Monaten eingeteilt, um eventuelle geschlechts- oder altersabhängige Effekte aufdecken zu können. Als Kontrollgruppe dienten isogenetische WT-Allelträger. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ stellt eine Mimikry der humanen Ausprägung dar. $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ wurden durch Kreuzung zweier heterozygoter Tiere generiert. Die Tiere wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Clemen (Institut für Biochemie I, Universität zu Köln) bereitgestellt und im Haus für Experimentelle Therapie III der Universität Bonn gehalten. Die Unterbringung erfolgte in ventilierten Scantainern (Modell-Typ 50-SCNT-Z-11E, Scanbur Technology, Karlslunde, Dänemark) mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Zyklus. Die Versorgung der Tiere wurde mit handelsüblichem Mausfutter sowie Wasser ad libitum gewährleistet. Die Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Ein Tierversuchsantrag (AZ: 8.87-50.10.37.09.272) wurde gestellt und von den zuständigen Stellen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

2.2 Versuchs-Durchführung

Im Folgenden werden die beteiligten Untersucher gelistet:

Untersuchung	Durchführung
LZ-EKG	José-Manuel Thorweihe, Dr. med. Florian Stöckigt
EPU	José-Manuel Thorweihe
Epikardiales Mapping	Dr. med. Florian Stöckigt, José-Manuel Thorweihe
Polymerase-Kettenreaktion	José-Manuel Thorweihe, Dr. med. Florian Stöckigt
Immunhistochemie	Dr. med. Florian Stöckigt, José-Manuel Thorweihe
Fibrose-Färbung	Dr. med. Florian Stöckigt, José-Manuel Thorweihe
Statistische Analyse	José-Manuel Thorweihe

Alle an den Versuchsdurchführungen Beteiligten waren Mitglieder der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jan Wilko Schrickel. Alle Legitimationen zur Veröffentlichung der gewonnenen Daten liegen vor.

2.3 Langzeit-Elektrokardiogramm

Implantierbare EKG-Teletxmitter sind eine essentielle Untersuchungsmethode zur Detektion spontaner Arrhythmien. Es wurde ein speziell für die Anwendung in der Maus entwickelter EKG-Telemetrie-Chip (Modell EA-F-20) verwendet, um elektrokardiographische Ruhe- sowie Stressaufzeichnungen der Versuchstiere durchzuführen und eventuelle Rhythmusstörungen zu erfassen.

2.3.1 Material

Telemetrie-Chip	Modell EA-F-20, Data Science International™, St. Paul, USA
Vapor®	Modell 19.3, Dräger®, Lübeck
Narkosegas	Isofluran (Forene®, Abbott Laboratories®, Chicago, USA)
Software	Labchart 7®, ADInstruments®, Dunedin, Neuseeland

2.3.2 Operativer Vorgang

Sämtliche operativen Vorgänge wurden in Inhalationsnarkose beim spontanatmenden Tier durchgeführt. Es bestand keine Notwendigkeit zur Intubation. Zur Narkoseeinleitung setzte man die Maus zunächst in ein Plexiglasgehäuse geeigneter Größe, welches man konsekutiv mit einem volatilen Anästhetikum flutete. Hierzu wurde 100%iger Sauerstoff (O₂) in einen Vapor® geleitet, aus welchem zur Einleitung 2,5–3,0 Vol.-% Isofluran ausgewaschen wurden. Nach Induktion der Narkose wurde das Tier aus dem Gehäuse entfernt und auf einer Wärmeplatte gelagert und fixiert. Eine speziell angefertigte Gaszuführung und –absaugung ermöglichte die Narkoseaufrechterhaltung. Dazu wählte man Isofluran-Konzentrationen von 0,8 bis 1,2 Vol.-% im Inspirationsgas. Bei allen Tieren wurde sichergestellt, dass eine ausreichende Narkosetiefe vorlag, es also weder bei Hautschnitt noch bei allen weiteren Interventionen zu objektivierbaren Körperreaktionen wie HF-Anstieg oder physischen Abwehrmechanismen kam. Die Körperkern-temperatur des Tieres wurde während der gesamten Prozedur überwacht und mittels besagter Wärmeplatte auf 37 °C konstant gehalten. Um eine intraoperative EKG-Aufnahme zu ermöglichen, wurden epikutane Elektroden angebracht. Ein 6-Kanal-Oberflächen-EKG wurde für 5 min ohne weitere Manipulation abgeleitet. Anschließend evaluierte man die Standard-EKG-Parameter (RR-Intervall, mittlere HF, P-Dauer, PQ-Zeit, QRS-Dauer, QT(c)-Zeit). Hierzu wurden zu zehn unterschiedlichen Zeitpunkten je 10 QRS-Komplexe ausgewertet und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Inzidenzen

spontan auftretender Arrhythmien sowie atrialer und ventrikulärer Ektopien wurden im gesamten Aufzeichnungsintervall analysiert.

Das Operationsfeld wurde rasiert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Haut dorsal zwischen den Scapulae inzidiert und eine kleine Hauttasche präpariert. In diese wurde ein Telemetrie-Chip subkutan implantiert. Zusätzlich erfolgte eine ebenfalls subkutane Implantation zweier Ableitungsdrähte, welche in Einthoven-II-Position fixiert wurden. Anschließend wurden die Wunden mittels Hautnähten verschlossen.

2.3.3 Postoperative Verfahrensweise

Um postoperativ eine suffiziente Analgesie zu gewährleisten, wurde zum Zeitpunkt 0 h und 12 h post operationem 5 mg/kg KG Carprofen subkutan injiziert. Es folgte eine zehntägige Rekonvaleszenzphase. Anschließend wurden zwischen 08:00 und 16:00 Uhr EKG-Aufzeichnungen über eine Telemetrie-Platte durchgeführt, welche lediglich unter dem Käfig platziert werden musste. Es war keine Manipulation am Tier mehr notwendig. In diesem postoperativen Zeitraum verhielten sich die Tiere vollständig unauffällig in Bezug auf Tag-Nacht-Rhythmus, Nahrungsaufnahme und Körperpflege. Im Anschluss an diese Ruhe-Aufnahme erfolgte ein Stress-Test unter Fortführung der EKG-Aufzeichnung. Hierfür wurden die Mäuse für 10 min zum Schwimmen in ein Wasserbecken gesetzt.

2.3.4 Statistische Analyse

Es wurden insgesamt 7 Tiere analysiert (WT = 2, Des^{RP/+} = 3, Des^{RP/RP} = 2). In die Datenerfassung wurden die Parameter HF, P-Dauer, PQ-Zeit, QRS-Dauer, QT(c)-Zeit sowie die Anzahl der AVBs und VES mit einbezogen. Die Mittelwerte der Ruheparameter wurden mit denen unter Stress verglichen. Zusätzlich wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht.

2.4 Elektrophysiologische Untersuchung der Maus

Die EPU diente in erster Linie der elektrophysiologischen Charakterisierung der Maus und wurde nach einer etablierten Methode angewandt (Kreuzberg et al., 2006). Hierzu wurde in Analogie zur Durchführung am Menschen ein speziell für die Maus entwickelter, achtpoliger EPU-Katheter transjugulär in das rechte Herz des Tieres vorgeschoben. Elektroden auf dem Katheter ermöglichten durch die Lagebeziehung zu Strukturen im Herzen sowohl die Erfassung elektrischer Signale des Vorhofs (P-Welle,

His-Signal, AH- und HV-Intervall) sowie des Ventrikels (QRS-Komplex und T-Welle) als auch eine elektrische Stimulation in vivo.

2.4.1 Material

EPU-Katheter	octapolar ep catheter, CIBer Mouse, NuMED Inc.®, Hopkinton, USA
Stimulationseinheit	Model 5328; Medtronic®, Minneapolis, USA
Verstärker	Bard® stamp amplifier; Bard® LabSystem™, C.R. Bard Inc.®, Murray Hill, USA

2.4.2 Operativer Vorgang

Die Vorbereitung erfolgte analog zum LZ-EKG. Zu Beginn wurde das Operationsfeld rasiert. Alle folgenden Schritte erfolgten unter dem Operationsmikroskop. Zunächst wurde die Kutis durch je einen medianen und supraclaviculären Halsschnitt eröffnet. Die relativ oberflächlich liegende Vena jugularis wurde aus dem umliegenden subkutanen Fettgewebe freipräpariert. Danach wurde das Gefäß mittels proximaler Ligatur fixiert und für die folgende Eröffnung unter Spannung gehalten. Nun erfolgten die Punktion der Vene und die konsekutive Einbringung des Katheters, welcher anschließend vorsichtig in Richtung des Herzens vorgeschoben wurde. Die Endlage konnte mittels Abgreifen von klaren intrakardial-atrialen (A) und -ventrikulären (V) Elektrogrammen sowie HIS-Signalen (H) ermittelt werden (dies diente der Bestimmung der AV-, AH- und HV-Intervalle). Zur Anwendung kam eine Ein-Katheter-Methode, d. h. der Katheter wurde soweit über die Trikuspidalklappe vorgeschoben, dass die distalen Elektrodenpaare des achtpoligen Katheters im rechtsventrikulären Apex zu liegen kamen, während die proximalen auf Vorhofebene verblieben. Nach Vergewisserung über die sichere Katheterlage mittels Nachweis guter Stimulationsreizschwellen wurde der Katheter durch Ligatur fixiert. Zuletzt wurde die Wundfläche mit einem sterilen, befeuchteten Tupfer bedeckt.

2.4.3 Stimulationsprotokoll

Dieses Protokoll diente der Vulnerabilitätstestung der Tiere auf Arrhythmien und wurde ebenfalls nach einer etablierten Methode angewandt (Roell et al., 2007). Es wurde ein modifizierter, multiprogrammierbarer Stimulator (Model 5328) mit Stimulations-Zyklus-

längen (CL) bis 10 ms verwendet. Es wurden Gleichstromimpulse mit einer Dauer von 1 ms abgegeben.

2.4.3.1 Atriale Stimulation und Vulnerabilitätstestung

Es wurden drei verschiedene Stimulationsmodi durchgeführt:

1. Die Sinusknotenerholungszeit wurde durch eine Stimulationsdauer von 15 s mit festfrequenten S1–S1-CL von je 120 ms, 100 ms und 80 ms ermittelt (Sinusknotengeneratorfunktion). Anschließend wurde ausgehend von 120 ms die Stimulations-CL in Intervallen von 10 ms schrittweise reduziert, um Parameter der AV-nodalen Leitung zu bestimmen:
 - Wenckebach-Punkt (fehlende AV-nodale 1:1-Überleitung)
 - AV-nodale 2:1-Überleitung
2. Zur Bestimmung der atrialen und AV-nodalen Refraktärzeiten (ARP, AVNRP) erfolgte eine programmierte Stimulation mit S1–S1-CL von 120 ms, 110 ms und 100 ms (7 S1-Impulse mit je einem verkürzt angekoppelten Extrastimulus S2). Zu ermitteln galt es den Zeitabstand S1–S2, auf den kein ventrikuläres Capture mehr folgte.
3. Zur Induktion von atrialen Arrhythmien (v. a. VHF) schloss sich eine atriale Burst-Stimulation an. Hierzu applizierte man 10 s dauernde Burst-Intervalle von je 1 und 2 mA. Begonnen wurde bei einer CL von 50 ms. Diese wurde in Schritten von 10 ms bis auf 10 ms reduziert. Evaluiert wurden Auftreten und Dauer der induzierbaren atrialen Arrhythmien.

2.4.3.2 Ventrikuläre Stimulation und Vulnerabilitätstestung

Hierbei wurden ebenfalls drei Stimulationsmodi durchgeführt:

1. Zur Verifizierung eines adäquaten ventrikulären 1:1 Captures wurden festfrequente Stimulationen mit S1–S1-CL (angefangen bei 120 ms) appliziert. Es erfolgte eine schrittweise Reduktion um je 20 ms bis auf 60 ms.
2. Durch programmierte Stimulation analog zum atrialen Protokoll wurden für je 1 s S1–S1-CL von 120 ms, 110 ms und 100 ms (7 Impulse) appliziert. Hiernach wurden bis zu drei Extraschläge (entsprechend früheinfallenden Extrasystolen) angekoppelt, um die Inzidenz poststimulatorischer VTs zu evaluieren. Zusätzlich ermöglichte dies die Erhebung der ventrikulären Refraktärzeit (VRP).

3. Analog zur atrialen Testung folgte danach ein ventrikuläres Burst-Protokoll, jedoch mit einer Burst-Dauer von nur 1 s. Die Dauer und Charakteristik (monomorph, polymorph, CL) der induzierten VT wurden evaluiert.

Alle Protokolle wurden mit Hilfe eines Verstärkers (Bard® stamp amplifier) aufgezeichnet und auf einem optischen Datenträger (Magneto-Optical Disc) gespeichert.

2.4.4 Entnahme der Herzen

Im Anschluss an das Stimulationsprotokoll wurde das Tier noch unter Narkose durch zervikale Überstreckung getötet und gewogen. Danach erfolgte die operative Exkorporation des Herzens mittels Thorakotomie. Das Herz wurde von den Hohlvenen, den Lungengefäßen und der Aorta getrennt. Als nächstes wurde das Herz in einer mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gefüllten Petrischale gewogen. Dies diente der Ermittlung des Herzgewicht/Körpergewichtskoeffizienten.

2.4.5 Statistische Analyse

Es wurden 115 Tiere einer EPU unterzogen (WT = 39, Des^{RP/+} = 40, Des^{RP/RP} = 36). Folgende Parameter wurden erhoben: Körpergewicht (KG), Herzgewicht (HG), HF, P-Dauer, PQ-Zeit, QRS-Dauer, QT(c)-Zeit, AV-Zeit, AH-Zeit, HV-Zeit, Wenckebach-Punkt, 2:1-Überleitung, Sinusknotenerholungszeit, AVNRP, ARP und VRP. Die Mittelwerte wurden auf statistische Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Zusätzlich wurde das Auftreten von VHF und VT in jeder Gruppe pro Tier gezählt und gegeneinander verglichen. Hierzu kamen zwei Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurden die Ereignisse VHF und VT in je zwei Kategorien (VHF vs. kein VHF bzw. VT vs. keine VT) eingeteilt. Diese kategorischen Daten wurden auf statistische Unterschiede zwischen je einer Mutante und dem WT untersucht. Zum anderen wurden aus den gezählten Häufigkeiten die Induktionswahrscheinlichkeiten für eine Arrhythmie je Tier errechnet. Die Induktionswahrscheinlichkeit war definiert als Anzahl der erfassten Arrhythmien pro Anzahl der Testmanöver ($p_{VHF} = n_{VHF}/10$, $p_{VT} = n_{VT}/19$). Diese Induktionswahrscheinlichkeiten wurden pro Gruppe gemittelt und auf statistische Unterschiede untersucht.

2.5 Epikardiales Mapping

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können Unregelmäßigkeiten der Leitungseigenschaften innerhalb des Myokards zu Arrhythmien führen. Um solche Inhomo-

genitäten nachzuweisen, wurde ein epikardiales Mapping der vorher entnommenen Herzen durchgeführt.

2.5.1 Material

Krebs-Henseleit-Lösung (Angaben pro 1000 ml Lösung):

- 6,43 g (110 mM) Natriumchlorid, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA
- 0,343 g (4,6 mM) Kaliumchlorid, Roth[®], Karlsruhe
- 0,144 g (1,2 mM) Magnesiumsulfat, Roth[®], Karlsruhe
- 0,222 g (2 mM) Kalziumchlorid, Merck[®], Darmstadt
- 1,5 g (8,3 mM) D(+)-Glucose, Merck[®], Darmstadt
- 0,312 g (2 mM) Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, Merck[®], Darmstadt
- 2,09 g (25 mM) Natriumhydrogencarbonat, Merck[®], Darmstadt
- 0,22 g (2 mM) Natriumpyruvat, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA

Langendorff-Apparat Radnoti LLC[®], Monrovia, USA

Elektroden-Netz FlexMEA72[®], Multi Channel Systems[®], Reutlingen

Software Latency v. 3.0; H. Bergau, Bonn

2.5.2 Durchführung

Die Prozedur erfolgte ebenfalls gemäß einer etablierten Methode (Schrickel et al., 2007): Nach Exkorporation des Herzens wurde eine Aorten-Kanüle distal des Abganges der Koronargefäße positioniert. Diese wurden im Langendorff-System retrograd mit modifizierter, Bikarbonat-gepufferter Krebs-Henseleit-Lösung (versetzt mit Carbogen (O₂ 95%ig, CO₂ 5%ig), pH 7,35–7,45, Temperatur 37 °C) unter konstantem Druck (80 mmHg) perfundiert. Nach Erreichen eines konstanten koronaren Flusses bei regelmäßiger, spontaner elektrischer Eigenaktion des Herzens wurde im Wasserbad ein epikardiales 72-Elektroden-Netz (FlexMEA72[®]) atrial und ventrikulär positioniert. Durch die Relation der Elektrodenausrichtung zum myokardialen Faserverlauf konnten longitudinale und transversale Leitungsgeschwindigkeiten mit hoher zeitlicher (20 kHz) und räumlicher Auflösung (Elektrodenabstand longitudinal 750 µm, transversal 625 µm) ermittelt werden. Des Weiteren wurde der Inhomogenitätsindex als Marker für lokale Leitungsverzögerungen pro Elektrode (Lammers et al., 1990) mittels einer speziell programmierten Software (Latency v. 3.0) berechnet. Als signifikante Leitungsblockade wurde eine Verzögerung der Signalleitung zwischen zwei benachbarten Elektroden von

mehr als 4 ms gewertet. Dies ermöglichte die systematische Evaluation der Erregungsausbreitung spontaner wie stimulierter Herzaktionen auf Vorhof- und Ventrikelebene sowie die Identifikation arrhythmogener Substrate (z. B. Bereiche mit heterogener bzw. langsamer Fortleitung oder Leitungsblockaden).

2.5.3 Konservierung der Herzen

Anschließend wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und in Gefrierschränken bei -80 °C für weiteres Prozessieren (s. Kapitel 2.8) gelagert.

2.5.4 Statistische Analyse

Die Untersuchung umfasste 97 Gewebeproben (WT = 33, Des^{RP/+} = 39, Des^{RP/RP} = 25). Die Mittelwerte der einzelnen Messwerte wurden nach Genotyp getrennt untereinander verglichen.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Analyse potentieller Alterationen der RNA-Expression elektrophysiologisch relevanter Strukturproteine wurden semiquantitative RNA-Analysen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Es wurde atriales und ventrikuläres Myokard von DES-R350P-KI-Mäusen (heterozygot und homozygot) sowie den korrespondierenden WT-Stämmen untersucht. Bei den analysierten Zellbestandteilen handelte es sich um verschiedene Strukturen mit maßgeblichem Einfluss auf die Arrhythmogenese (Schram et al., 2002; Schrickel et al., 2010):

- Connexine (Cx):
 - Cx40 (Atrium; Reizleitung)
 - Cx43 (Atrium und Ventrikel; Reizleitung)
- elektrophysiologisch/kontraktil relevante Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle:
 - N_V1.5 (spannungsgesteuerter Na-Kanal; Depolarisation)
 - K_V4.2 (spannungsgesteuerter K-Kanal; frühe Repolarisation)
 - K_V1.5 (spannungsgesteuerter K-Kanal, Phase 1-2-Repolarisation)
 - K_{IR}2.1 (Einwärtsgleichrichter-K-Kanal; Ruhemembranpotential, Repolarisation)
 - Ca_V1.2 (L-Typ-Ca-Kanal; Depolarisation, elektromechanische Kopplung)
- Desmin

Die qPCR ist eine etablierte Methode zur Quantifizierung des ursprünglichen mRNA-Gehaltes einer Probe (Bustin, 2000). Hierbei werden relative Mengenverhältnisse einer

Ziel-RNA ermittelt. Die zu untersuchenden Proben werden mit Fluoreszenz-Sonden markiert und wie bei einer klassischen PCR in einem Cycler exponentiell amplifiziert. In Abhängigkeit vom ursprünglichen RNA-Gehalt wird in jeder Probe ab einem bestimmten Zyklus das Hintergrundrauschen durch die Fluoreszenz der Amplifikate signifikant überschritten. Dieser Zyklus wird als Cycle Threshold (CT) bezeichnet. Liegen unterschiedliche Mengenverhältnisse einer bestimmten Ziel-RNA in verschiedenen Proben vor, so unterscheiden sich auch deren CT-Werte.

Zunächst wurde RNA aus den Zellen extrahiert und (aufgrund höherer Stabilität von DNA) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgte in einem zweiten Schritt die Quantifizierung der cDNA mittels qPCR. Hierbei kam die Taqman[®]-Methode zum Einsatz. Neben den Primern wurden spezielle Sonden (Quencher und Reporter) verwendet. Diese waren durch molekulare Bindung in einem definierten räumlichen Abstand zueinander platziert. Der Reporter sendete ein Fluoreszenzsignal aus, welches der Quencher absorbierte. Nach Denaturierung der Einzelstränge banden Primer und Sonden an bestimmte Bereiche der DNA-Stränge. Bei der Amplifikation kam es durch die Elongation von DNA-Abschnitten durch die Taq-Polymerase zu einer Abspaltung des Reporters vom Quencher. Aufgrund der dadurch entstandenen räumlichen Trennung konnte dieser die Signale des Reporters nicht mehr absorbieren. Die Fluoreszenz wurde messbar. Mit dieser Methode ließ sich, wie obig beschrieben, eine semi-quantitative Aussage über den ursprünglichen RNA-Gehalt in den Herzmuskelproben treffen.

2.6.1 Material

TRIzol-Reagenz [®]	Ambion [®] , Lifetechnologies [™] , Carlsbad, USA
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific [™] , Waltham, USA
cDNA Synthese Kit	SuperScript [®] VILO [™] , Lifetechnologies [™] , Carlsbad, USA
cDNA-Cycler	Mastercycler [®] Pro, Eppendorf [®] , Hamburg
TaqMan [®] Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems [®] /Lifetechnologies [™] , Carlsbad, USA

Gene Assay Mixe:	Applied Biosystems®/Lifetechnologies™, Carlsbad, USA
• Desmin	Mn00802459_m1
• Cx40	Mm01265686_m1
• Cx43	Mm00439105_m1
• K _V 4.2	Mm00498065_m1
• N _V 1.5	Mm00451967_m1
• K _V 1.5	Mm00524346_s1
• K _{IR} 2.1	Mm00434616_m1
• Ca _V 1.2	Mm00437913_m1
PCR-Wells	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates, Invitrogen™, Carlsbad, USA
PCR-Cycler	Fast PCR Cycler 7500, Applied Biosystems®/Lifetechnologies™, Carlsbad, USA

2.6.2 RNA-Extraktion

Zunächst wurden die einzelnen Proben in Eppendorf®-Gefäßen mit je 1 ml TRIzol-Reagenz® versehen. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die Zellen lysiert und auf der einen Seite RNAsen inhibiert, auf der anderen Seite Proteine und DNA gebunden werden. Im nächsten Schritt wurden zur Phasentrennung je 200 µl Chloroform zugegeben und die Gefäße mit 13.200 min⁻¹ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Aus den hierbei entstehenden obersten, wässrigen Phasen (enthalten RNA) wurden je 400 µl in entsprechende Eppendorf®-Gefäße umpipettiert und zur Präzipitation der RNA nochmals je 400 µl Isopropanol zugefügt. Es schloss sich eine erneute Zentrifugation mit 13.200 min⁻¹ für 15 min bei 4 °C an, woraufhin der Überstand mit den Fällungsmitteln entfernt wurde. Die hierbei entstandenen RNA-Pellets wurden mit je 800 µl 75%igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (13.200 min⁻¹ für 6 min bei 4 °C). Zur Optimierung der Reinheit wurde dieser Schritt nochmals wiederholt und die Überstände im Anschluss abgekippt. Um restliche Lösungsmittel noch vollständig zu entfernen, wurde abermals mit 13.200 min⁻¹ für 6 min bei 4 °C zentrifugiert. Die überschüssigen Flüssigkeitsanteile wurden abpipettiert und die Gefäße anschließend für 10 min bei 55 °C getrocknet. Zur Auflösung der RNA wurden nun noch je 10 µl RNase-

freies, destilliertes Wasser in jedes Gefäß gegeben und die RNA-Konzentration mittels Spektralphotometer (Nanodrop 2000c) gemessen.

2.6.3 cDNA-Synthese

Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurde nun die cDNA unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Systems (SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit) synthetisiert. Hierzu wurden nun je 1000 ng der jeweiligen RNA-Probe in 20 µl fassende PCR-Gefäße gegeben. Anschließend wurden je 4 µl Reaktionspuffer (5X VILO™ Reaction Mix) und je 2 µl Reverse Transkriptase (10X SuperScript® III Enzyme Blend) zugefügt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Als Cycler diente der Mastercycler® Pro.

2.6.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Es wurden MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates verwendet, auf denen drei Wells je Probe und Gen genutzt wurden. Dazu wurden die Wells mit jeweils 1 µl cDNA befüllt und noch je 24 µl eines Mastermixes hinzugefügt. Als qPCR-Cycler wurde der Fast PCR Cycler 7500 verwendet.

Zusammensetzung des Mastermixes:

12,5 µl 2X Taqman® Master-Mix

1,25 µl 20X Assay-Mix (pro Gen verschieden, da er Primer enthält)

10,25 µl RNase-freies Wasser

2.6.5 Statistische Analyse

Untersucht wurden insgesamt 35 Gewebeproben, davon 19 atrialen und 16 ventrikulären Ursprungs (WT = 6/6, Des^{RP/+} = 7/6, Des^{RP/RP} 6/4). Da prozessbedingt bei jeder RNA-Extraktion eine unterschiedliche Anzahl an Zellen lysiert wurde, musste dies bei der Quantifizierung berücksichtigt werden. Aus jedem CT-Mittelwert einer Zielstruktur wurde daher die Differenz zum CT-Mittelwert eines unregulierten Gens (Housekeeping-Gen, hier: 18S) errechnet (CT-Wert). Hierdurch wurde das relative Mengenverhältnis einer Zielstruktur zum Housekeeping-Gen innerhalb eines Genotyps ermittelt. Im Verhältnis zum WT wurde dann analog der jeweilige CT-Wert errechnet. Mittels des relativen Quantifikationswertes (2^{-CT}) konnte so ein relatives Mengenverhältnis einer Mutanten-mRNA zum WT kalkuliert und eventuelle Expressionsunterschiede erfasst werden.

2.7 Immunhistochemische Färbung

Um posttranskriptionale Regulationsstörungen der Cx-Expression auszuschließen, wurden immunhistologische Färbungen von Cx43 angefertigt.

2.7.1 Material

Objektträger	Dako [®] -Glycergel [®] -Objektträger, Agilent Technologies [®] , Santa Clara, USA
Objektträger-Medium	TissueTek [®] O.C.T. [™] -Medium, Sakura [®] Finetek, Torance, USA
Lasermikroskop	LSM 710 DuoScan, Zeiss [®] , Jena
Waschpuffer	Tween [®] in TBS (Angaben pro 1000 ml Lösung): <ul style="list-style-type: none"> • 0,56 g Tris, Merck[®], Darmstadt • 2,46 g TrisHCL, PanReac AppliChem[®], Darmstadt • 1 ml Tween[®]-20, VWR[®], Radnor, USA • BSA (Blockierlösung), Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA
Primär-Antikörper	Kaninchen-anti-Cx43-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology [®] , Dallas, USA
Sekundär-Antikörper	Esel-anti-Kaninchen-Antikörper Molecular Probes [®] , Invitrogen [™] , Carlsbad, USA
Färbung (Bisbenzimid)	Hoechst 33258 Färbung, Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA

2.7.2 Durchführung

Die gefrorenen Herzen wurden in TissueTek[®] O.C.T.[™]-Medium eingebettet. Anschließend wurden 10 µm breite Schnitte gefertigt, mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und dreimal mit 0,1 % Tween[®] in TBS (tert-Butyldimethylsilyl-Ether) gewaschen. Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 1 Stunde in eine Blockierlösung (Waschpuffer mit 5 % BSA-Gehalt) gegeben. Danach wurden sie bei 4 °C mit in Blockierlösung verdünnten Primärantikörpern (Kaninchen-anti-Cx43-Antikörper; 1:1000) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte abermals dreifach mit 0,1 % Tween[®] in TBS gewaschen. Danach wurden sie zur Strukturfärbung mit einem Zweit-Antikörper (Esel-anti-Kaninchen-Antikörper (mit Farbstoff Alexa 555 konjugiert; 1:1000)) versehen und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in die Blockierlösung überführt, um unspezifische Reaktionen zu unterbinden. Als nächster

Schritt folgte die Gegenfärbung der Zellkerne. Dazu wurden die Schnitte zweimal mit 0,1 % Tween[®] in TBS gewaschen und als nächstes für weitere 10 min unter Zusatz von 0,5 mg/ml Bisbenzimid (1:1000) in die Lösung zurückgegeben. Die Schnitte wurden auf Dako[®]-Glycergel[®]-Objekträgern mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Dabei wurde das Augenmerk auf Unterschiede der Signalintensität gelegt. Ebenso wurden die Schnitte auf eine eventuelle Diskrepanz des Verteilungsmusters von Cx43 untersucht.

2.8 Fibrose-Färbung der histologischen Schnitte

Zur Erfassung eines mikroskopischen Korrelates zu den elektrophysiologischen Alterationen in den Mäuseherzen wurde eine Fibrose-Färbung von histologischen Schnitten der Atrien und Ventrikel durchgeführt.

2.8.1 Material

Sirius Rot	Rouge Sirius, RAL Diagnostics [®] , Martillac, Frankreich
Einschlussmedium	Entellan [®] , Merck [®] , Darmstadt
Software	Adobe Photoshop, Vers. 5.5, Adobe Systems Inc. [®] , San Jose, USA

2.8.2 Durchführung

Mittels Siriusrot-Färbung wurden 4 µm dicke Kryo-Schnitte der Herzen auf Fibrose untersucht. Dabei wurden fibrotische Areale rot und das restliche Gewebe gelblich angefärbt. Der Fibrose-Anteil wurde definiert als der prozentuale, extrazelluläre Rotanteil pro Herzschnitt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen und in einer absteigenden Reihe von 100–80%igem Ethanol für je 5 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Träger zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 1–3 min in Siriusrot (1%ig in Pikrinsäure) eingelegt. Die restliche Farbe wurde mit 1%iger Essigsäure entfernt. Die Träger wurden danach nochmals dreimal für je 1 min in 100%igen Ethanol gelegt. Abschließend wurden sie in Xylol überführt und nach 1 min mit Entellan[®] eingedeckelt.

2.8.3 Statistische Analyse

Es wurden 102 Gewebeproben (34 je Genotyp) untersucht und die Mittelwerte der Fibrose-Anteile der Genotypen miteinander verglichen.

2.9 Statistische Methodik

Datenerfassung	Microsoft Excel [®] 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA
Datenauswertung	SPSS [®] v. 22, IBM [®] Corporation, Armonk, USA
Bildbearbeitung	Microsoft Paint [®] Microsoft Corporation, Redmond, USA

Numerische Daten wurden mittels zweifaktorieller, univariater Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und jeweils drei Gruppen untereinander verglichen. Der Fisher-Test wurde zur Auswertung kategorischer Daten verwandt. Der statistische Vergleich umfasste hier je nur zwei Gruppen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Physiologische Merkmale

Bei den physiologischen Parametern kristallisierten sich zwischen den Mutantengruppen signifikante Unterschiede heraus. Das KG der heterozygoten Tiere überstieg das der WT-Mäuse signifikant ($\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $27,8 \pm 5,4$ g vs. WT: $26,2 \pm 3,8$ g; $p = 0,032$; s. Tab. 1). Der HG/KG-Quotient sank im Alter: Bei den 2–4 Monate alten Tieren lag er noch bei $7,0 \pm 1,6$; bei den 5–7 Monatigen bereits bei $6,0 \pm 1,5$; waren die Mäuse älter als 7 Monate, sank der Quotient auf $5,0 \pm 1,4$ ($p < 0,001$).

3.2 Langzeit-Elektrokardiogramm

Das LZ-EKG zeigte bereits erste elektrophysiologische Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen auf (s. Tab. 2): Die homozygoten Tiere hatten signifikant höhere HFs im Vergleich zum WT und zur heterozygoten Gruppe ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: 609 ± 17 min^{-1} vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $567 \pm 9,8$ min^{-1} vs. WT: $571,5 \pm 7,8$ min^{-1} ; $p = 0,012$). Während des Belastungstests verhielt es sich hier ebenso: Bei $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ waren die HFs deutlich gegenüber $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ und WT erhöht ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $697 \pm 1,4$ min^{-1} vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $549,3 \pm 46,5$ min^{-1} vs. WT: $562,5 \pm 12$ min^{-1} ; $p = 0,012$). Zusätzlich beeinflussten sich die Faktoren Genotyp und Belastung gegenseitig (Genotyp*Belastung: $p = 0,049$): Unter Stressbedingungen stieg die HF bei homozygoten Tieren, bei den anderen Gruppen sank sie. Zudem waren Unterschiede bei der QT-Zeit zwischen hetero- und homozygoten Mäusen messbar: Bei $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ war sie signifikant verkürzt ($\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $51,4 \pm 2,2$ ms vs. $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $49,7 \pm 4,4$ ms; $p = 0,029$). Unter Stress nahm die QT-Zeit bei $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ verglichen mit $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ ab ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $43,5 \pm 3,5$ ms vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $66 \pm 5,3$ ms; $p = 0,029$). Wie bei den HFs beeinflussten sich die Faktoren Belastung und Genotyp gegenseitig (Genotyp*Belastung: $p = 0,021$): Bei homozygoter Mutation war die QT-Zeit unter Stress im Vergleich mit der QT-Zeit unter Ruhebedingungen zusätzlich verkürzt, während sie sich unter Belastung bei $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ interessanterweise verlängerte. Bei homozygoter DES-Mutation war auch ein verstärktes Auftreten höhergradiger AVBs sowohl im Vergleich zum WT als auch zur heterozygoten Gruppe auffällig ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $0,8 \pm 0,4$ h^{-1} vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $0,3 \pm 0,6$ h^{-1} vs. WT: 0 ± 0 h^{-1} ; $p = 0,007$). Durch Belastung erhöhte sich die Inzidenz deutlich ($p = 0,001$): $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ hatte sowohl im Verhältnis zu $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ als auch zum WT signifikant mehr AVBs ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $15 \pm 4,2$ h^{-1} vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $3,3 \pm 0,6$ h^{-1} vs.

WT: $0,5 \pm 0,7 \text{ h}^{-1}$; $p = 0,007$; s. Tab. 2 und Abb. 17). Wiederum gab es eine messbare Interaktion zwischen den Faktoren Belastung und Genotyp (Genotyp*Belastung: $p = 0,004$). Zusätzlich traten bei Vorliegen einer Mutation gehäuft VES auf, während WTs keine Arrhythmien zeigten: $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $1,5 \pm 0,7 \text{ h}^{-1}$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $1,3 \pm 0,6 \text{ h}^{-1}$ vs. WT: $0 \pm 0 \text{ h}^{-1}$ ($p = 0,282$). Diese Tendenz verstärkte sich unter Stressbedingungen: $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $21 \pm 12,7 \text{ h}^{-1}$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $65,3 \pm 51,4 \text{ h}^{-1}$ vs. WT: $6 \pm 8,5 \text{ h}^{-1}$ ($p = 0,282$). Insgesamt ließ sich ein deutlicher Trend zu erhöhter Vulnerabilität gegenüber VES bei Vorliegen der R350P-Mutation im DES-Gen feststellen (s. Abb. 17), welcher jedoch kein Signifikanzniveau erreichte.

3.3 Elektrophysiologische Untersuchung

3.3.1 Oberflächen-EKG

Die während der Inhalationsnarkose aufgezeichneten EKGs zeigten relevante Unterschiede zwischen den Gruppen auf: Die P-Wellen-Dauer war bei den $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ -Tieren im Vergleich mit den WT-Mäusen signifikant verlängert ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $15,0 \pm 4,2 \text{ ms}$ vs. WT: $11,6 \pm 3,7 \text{ ms}$; $p = 0,029$; s. Tab. 3 und Abb. 18). Zudem gab es einen Zusammenhang zwischen genetischer Veränderung und Lebensalter in Bezug auf die QRS-Dauer (Genotyp*Alter: $p = 0,031$): Verlängerte sich mit zunehmendem Alter die QRS-Dauer bei WT-Tieren und heterozygoten Mäusen, so verkürzte sie sich bei homozygoter Mutation ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $15,7 \pm 2,5 \text{ ms}$ auf $13,9 \pm 3,3 \text{ ms}$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $12,6 \pm 1,0 \text{ ms}$ auf $13,8 \pm 2,6 \text{ ms}$ vs. WT: $12,3 \pm 0,8 \text{ ms}$ auf $15,3 \pm 3,1 \text{ ms}$). Zusätzlich zeigten sich Unterschiede zwischen den Altersgruppen 2–4 und 5–7 Monate für die Faktoren HF, P-Dauer und PQ-Zeit: Jüngere Tiere hatten signifikant höhere HFs als ihre älteren Artgenossen ($456,8 \pm 43,1 \text{ min}^{-1}$ vs. $414,2 \pm 56,8 \text{ min}^{-1}$; $p = 0,006$). Die P-Dauer hingegen verlängerte sich im Alter: ($10,1 \pm 3,1 \text{ ms}$ vs. $15,4 \pm 4,3 \text{ ms}$; $p < 0,001$) ebenso wie die PQ-Zeit ($46,1 \pm 5,0 \text{ ms}$ vs. $50,7 \pm 8 \text{ ms}$; $p = 0,047$).

3.3.2 Intrakardiales EKG

Die Aufzeichnung intrakardialer Elektrogramme zeigte eine unveränderte Gesamtüberleitungs- und suprahisäre Leitungszeit. Die infrahisäre Leitungszeit war jedoch bei $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ signifikant im Verhältnis zum WT verlängert ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $12,0 \pm 2,1 \text{ ms}$ vs. WT: $9,0 \pm 1,5 \text{ ms}$; $p = 0,002$; s. Abb. 19). Zusätzlich war die AVNRP verändert: Die heterozygoten Tiere hatten je im Vergleich zum WT und zur homozygoten Gruppe

verkürzte Refraktärzeiten ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $60,6 \pm 8,5$ ms vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $48,2 \pm 11,2$ ms vs. WT: $60,4 \pm 6,6$ ms; $p = 0,036$). Für die Parameter Wenckebach-Punkt, 2:1-Überleitung, Sinusknotenerholungszeit, ARP und VRP wies die funktionelle elektrophysiologische Untersuchung keine Unterschiede im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Unterschiede zwischen den Altersgruppen konnten nur bei der ARP gezeigt werden: Die ARP stieg mit zunehmendem Alter (jung: $16,7 \pm 5,6$ ms vs. mittel: $22,9 \pm 8,3$ ms; $p = 0,019$). Geschlechtsbezogene Unterschiede bestanden nicht (s. Tab. 4). Zusätzlich kam es bei den mutierten Tieren häufig unmittelbar nach dem Platzieren des Katheters zur Induktion von höhergradigen AVBs. Dies war durchaus mit der nachgewiesenen Verzögerung der HV-Leitungszeit vereinbar und lies sich auch beim WT nicht provozieren (s. Abb. 20 und Abb. 21).

3.3.3 Vorhofflimmern

Lag im Tier eine DES-Mutation vor, so waren prozentual mehr VHF-Episoden als bei den WTs induzierbar: $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: 19,4 % vs. WT: 18,5 % ($p = 0,883$), $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: 31 % vs. WT: 18,5 % ($p = 0,03$). Alters- und Geschlechtsunterschiede wurden keine gefunden. Alle bei den WTs ausgelösten VHF-Episoden (18,5 %) dauerten < 1 min an. Bei den Mäusen mit DES-Mutation verhielt es sich hier anders: 45,5 % aller VHF-Episoden von $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ ($p < 0,001$) und 9,7 % von $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ -Tieren ($p = 0,248$) waren langanhaltend, d. h. > 1 min (s. Abb. 22A). Betrachtete man anhaltendes VHF als eigene arrhythmische Entität, so ergaben sich für $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ 7,5 % ($p = 0,001$) und 3 % für die homozygoten Tiere ($p = 0,081$). Es trat bei älteren Tieren öfter auf als bei den jüngeren (5,8 % vs. 1,8 %; $p = 0,049$). Ebenso verhielt es sich mit männlichen zu weiblichen Artgenossen (6,5 % vs. 0,6 %; $p = 0,002$). Wurden die Induktionswahrscheinlichkeiten für VHF mittels ANOVA unter den Genotypen verglichen, so zeigten sich ähnliche Tendenzen zu erhöhter Suszeptibilität für VHF bei $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ und für anhaltendes VHF bei $\text{Des}^{\text{RP/+}}$. Allerdings verkleinerte sich dadurch verfahrensbedingt die Gruppengröße um den Faktor 10, was am ehesten erklärt, weshalb das Signifikanzniveau mit dieser Methode nicht erreicht werden konnte (s. Abb. 23).

3.3.4 Ventrikuläre Tachykardien

Der prozentuale Anteil von VTs war bei den mutierten Tieren ebenfalls erhöht. Interessanterweise war die Induktionswahrscheinlichkeit nur bei $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ signifikant erhöht

(Des^{RP/+}: 24,3 % vs. WT: 10,5 %; $p < 0,001$). Homozygote Tiere zeigten allerdings auch vermehrt VTs (Des^{RP/RP}: 15,8 % vs. WT: 10,5 %; $p = 0,113$; s. Abb. 22B und Abb. 24A). Auffällig war hier, dass im Vergleich zu VHF die jüngeren Mäuse öfter VTs entwickelten als ältere Tiere (24,6 % vs. 14 %; $p < 0,001$). Analog zu VHF bildeten allerdings auch die Männchen öfter VTs aus als die Weibchen (23,9 % vs. 9,3 %; $p < 0,001$). Eine statistische Analyse mittels ANOVA ergab einen vergleichbaren Trend zu erhöhter Anfälligkeit für VTs bei der heterozygoten Gruppe. Allerdings lagen die Unterschiede analog zu VHF unterhalb des Signifikanzniveaus (s. Abb. 24A), was sich ebenfalls am wahrscheinlichsten mit der Verminderung der Gruppenanteile (hier um den Faktor 19) begründen lässt.

3.4 Epikardiales Mapping

Das epikardiale Mapping zeigte diverse Unterschiede zwischen den Genotypen auf: Bei den Tieren mit homozygoter DES-Mutation waren die CLs im Verhältnis zum WT und zu Des^{RP/+} signifikant verlängert (Des^{RP/RP}: $342,8 \pm 264,8$ ms vs. Des^{RP/+}: $203,3 \pm 102,5$ ms vs. WT: $220,6 \pm 129,6$ ms; $p = 0,006$). Darüber hinaus waren sowohl bei Des^{RP/+} als auch bei Des^{RP/RP} signifikante Anstiege der Leitungsverzögerung im Vergleich zum WT messbar (Des^{RP/RP}: $4,7 \pm 3,3$ ms vs. Des^{RP/+}: $3,7 \pm 1,8$ ms vs. WT: $2,4 \pm 1,1$ ms; $p < 0,001$). Ebenso waren deutliche Einschränkungen der Leitungsgeschwindigkeiten sowohl in longitudinaler als auch transversaler Faserausrichtung messbar: Heterozygote und homozygote Mäuse zeigten in longitudinaler Richtung im Vergleich zum WT eine signifikant herabgesetzte Leitungsgeschwindigkeit (Des^{RP/RP}: $75,2 \pm 22,4$ cm/s vs. Des^{RP/+}: $85,3 \pm 21,2$ cm/s vs. WT: $122,8 \pm 49,1$ cm/s; $p < 0,001$). Ähnlich verhielt es sich in transversaler Richtung (Des^{RP/RP}: $50,7 \pm 18,8$ cm/s vs. Des^{RP/+}: $55,6 \pm 18,0$ cm/s vs. WT: $86,8 \pm 37,3$ cm/s; $p < 0,001$). Außerdem war sowohl bei Des^{RP/+} als auch bei Des^{RP/RP} eine Zunahme relevanter Leitungsblockaden (> 4 ms) im Vergleich mit den WTs zu beobachten (Des^{RP/RP}: $3,9 \pm 6,0$ vs. Des^{RP/+}: $2,6 \pm 4,3$ vs. WT: $0,2 \pm 0,6$; $p = 0,03$; s. Tab. 5 und Abb. 25 bis Abb. 32). Allerdings war der Inhomogenitätsindex als Marker für lokale Leitungsstörungen nicht verändert.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Es fanden sich folgende signifikant veränderte Expressionsmuster: Auf atrialer Ebene bildeten die homozygoten Tiere den Natriumkanal $N_{V1.5}$ stärker aus als die

heterozygote Tiergruppe und der WT ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $1,4 \pm 0,6$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $1,0 \pm 0,4$ vs. WT: $1,0 \pm 0,0$; $p = 0,012$). Im Ventrikel zeigte $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ gleichermaßen eine signifikant vermehrte Expression bezüglich dieses Kanal-Typen sowohl im Verhältnis zu $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ als auch zum WT ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $1,4 \pm 0,4$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $1,0 \pm 0,1$ vs. WT: $1,0 \pm 0,0$; $p = 0,012$). Überdies war auch das atriale Expressionsmuster des Kaliumkanals $\text{K}_v1.5$ von $\text{Des}^{\text{RP/RP}}$ höher reguliert als das der heterozygoten und der WT-Gruppe ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $1,2 \pm 0,4$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $0,8 \pm 0,3$ vs. WT: $1,0 \pm 0,0$; $p < 0,001$). Auf ventrikulärer Ebene wiesen homozygote Mäuse ebenfalls signifikant erhöhte mRNA-Level auf, sowohl verglichen mit $\text{Des}^{\text{RP/+}}$ als auch mit dem WT ($\text{Des}^{\text{RP/RP}}$: $1,8 \pm 0,3$ vs. $\text{Des}^{\text{RP/+}}$: $1,1 \pm 0,3$ vs. WT: $1,0 \pm 0,0$; $p < 0,001$). Alle anderen untersuchten RNA-Proben wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf (s. Abb. 33, Abb. 34 und Tab. 6).

3.6 Immunhistochemische Färbung

Es zeigte sich atrial und ventrikulär ein unverändertes Verteilungsmuster für Cx43 bei den mutierten Tieren im Vergleich zum WT. Insbesondere lag keine Fehlverteilung oder pathologische Lateralisierung vor (s. Abb. 35).

3.7 Fibrose-Färbung

Die Herzen der mutierten Tiere zeigten in Folge diffuser extrazellulärer Kollagenansammlungen im rechten und linken Ventrikel sowie im Septum eine signifikante Zunahme an myokardialer Fibrose im Vergleich zum WT. Heterozygote Tiere wiesen einen Fibrose-Anteil von $14,7 \pm 6,5$ % auf. Dieser war bei homozygoter Mutation sogar signifikant stärker ausgebildet ($19,8 \pm 8,3$ %). Beim WT lag der Anteil bei lediglich $5,6 \pm 2$ % ($p < 0,001$; s. Abb. 36, Abb. 37 und Tab. 7).

Tab. 1: Physiologische Parameter

Hinsichtlich der physiologischen Parameter unterschieden sich die einzelnen Gruppen nur im Körpergewicht in signifikantem Ausmaß. Für das Herz- und Körpergewicht sowie den Quotienten HG/KG bestanden lediglich Unterschiede zwischen den Altersgruppen und den Geschlechtern.

Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Jeder abhängigen Variablen (z. B. KG) sind insgesamt 3 p-Werte zugeordnet (Genotyp, Alter, Geschlecht). Ersterer vergleicht die Genotypen untereinander. Tukey zeigt die p-Werte der Post-hoc-Tests an. Die p-Werte unter Alter und Geschlecht unterscheiden nicht zwischen Genotypen.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; KG: Körpergewicht; HG: Herzgewicht; TL: Tibiallänge

Alter (Monate)	WT MW ± SD	DesRP/+ MW ± SD	DesRP/RP MW ± SD	p (ANOVA)	DesRP/+ vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. DesRP/+ (Tukey)
Gesamt	n	n	n	Genotyp			
KG (g)	39 26,2 ± 3,8	40 27,8 ± 5,4	36 27,6 ± 4,6	0,032	0,062	0,122	0,966
HG (mg)	36 159,0 ± 34,5	39 177,5 ± 47,3	36 170,2 ± 43,9	0,304	0,139	0,490	0,733
TL (cm)	9 1,9 ± 0,1	10 1,9 ± 0,1	12 1,9 ± 0,0	0,739	0,932	0,625	0,833
HG/KG	36 6,2 ± 1,5	38 6,5 ± 1,8	36 6,2 ± 1,6	0,802	0,686	0,997	0,734
HG/TL	9 74,9 ± 13,6	10 72,8 ± 12,5	12 83,5 ± 27,1	0,501	0,974	0,621	0,464
2 bis 4				Alter	jung vs. mittel	jung vs. alt	mittel vs. alt
KG (g)	15 23,7 ± 2,7	17 24,8 ± 3,2	14 24,1 ± 3,2	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,377
HG (mg)	15 161,0 ± 28,5	17 174,5 ± 40,4	14 167,0 ± 34,4	0,267	0,722	0,455	0,208
TL (cm)	4 1,9 ± 0,1	4 1,9 ± 0,1	4 1,9 ± 0,1	0,436	0,204	0,579	0,641
HG/KG	15 6,9 ± 1,6	17 7,1 ± 1,7	14 7,0 ± 1,5	< 0,001	0,006	< 0,001	0,116
HG/TL	4 76,4 ± 0,8	4 76,5 ± 10,6	4 82,5 ± 8,3	0,604	0,871	0,997	0,837
5 bis 7				Geschlecht			
KG (g)	21 27,8 ± 3,5	19 29,5 ± 5,0	17 29,7 ± 4,0	< 0,001			
HG (mg)	18 160,9 ± 39,3	18 190,1 ± 52,3	17 171,8 ± 43,7	0,028			
TL (cm)	2 2,0 ± 0,1	2 2,0 ± 0,1	3 1,9 ± 0,1	0,529			
HG/KG	18 5,8 ± 1,4	17 6,5 ± 1,8	17 5,8 ± 1,4	0,109			
HG/TL	2 75,4 ± 27,4	2 72,7 ± 23,7	3 72,7 ± 25,2	0,051			
8 bis 9							
Gewicht(g)	3 27,1 ± 5,2	4 32,7 ± 8,6	5 30,4 ± 4,0				
HG (mg)	3 138,0 ± 35,6	4 133,5 ± 24,3	5 174,2 ± 72,6				
TL (cm)	3 1,9 ± 0,0	4 1,9 ± 0,1	5 1,9 ± 0,0				
HG/KG	3 5,1 ± 0,7	4 4,2 ± 0,5	5 5,7 ± 1,9				
HG/TL	3 72,6 ± 18,7	4 69,2 ± 11,7	5 90,9 ± 38,6				

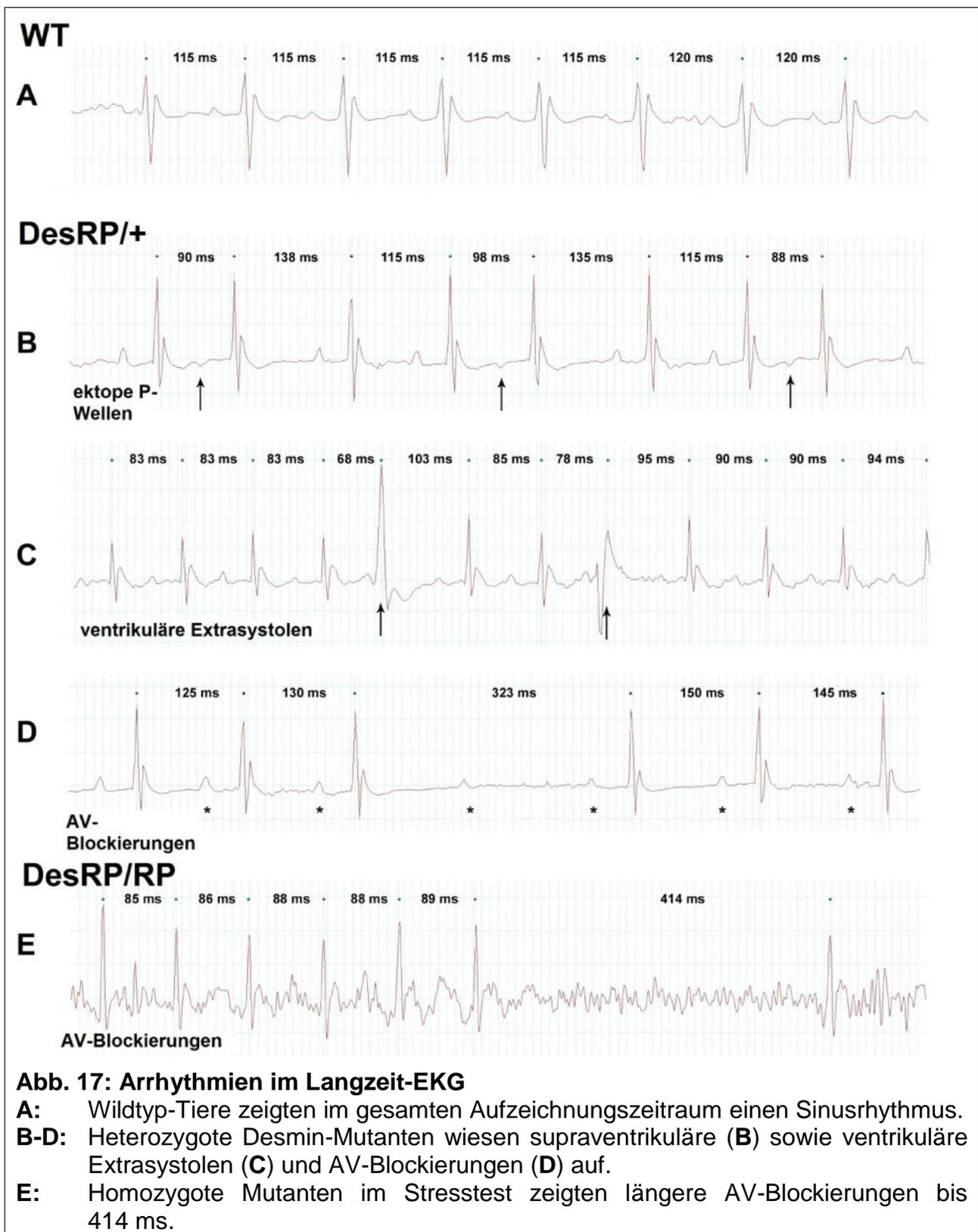
Tab. 2: Langzeit-EKG

Homozygote Tiere (Des^{RP/RP}) zeigten eine Steigerung der Herzfrequenz gegenüber der heterozygoten Gruppe (Des^{RP/+}) und den Wildtypen (WT). Zudem wiesen homozygote Mäuse im Vergleich zu heterozygoten eine verkürzte QT-Zeit auf. Des^{RP/RP} hatten eine erhöhte Empfänglichkeit für AV-Blöcke gegenüber Des^{RP/+} und WT-Allel-Trägern.

Univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung: Jeder abhängigen Variablen (z. B. HF) sind insgesamt 2 p-Werte zugeordnet (Genotyp, Aktivität). Ersterer vergleicht die Genotypen untereinander. Tukey zeigt die p-Werte der Post-hoc-Tests an. Die p-Werte unter Aktivität unterscheiden nicht zwischen Genotypen.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; HF: Herzfrequenz; P: P-Dauer; PQ: PQ-Zeit; QRS: QRS-Dauer; QT: QT-Zeit; QTc: HF-korrigierte QT-Zeit; VES: ventrikuläre Extrasystole

	WT	DesRP/+	DesRP/RP	p	DesRP/+	DesRP/RP	DesRP/RP
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	(ANOVA)	vs. WT	vs. WT	vs. DesRP/+
	n=2	n=3	n=2	Genotyp	(Tukey)	(Tukey)	(Tukey)
Ruhe							
HF (/min)	571,5 ± 7,8	567,0 ± 9,8	609,0 ± 17,0	0,012	0,872	0,023	0,012
P (ms)	12,9 ± 0,2	11,1 ± 1,4	10,8 ± 0,4	0,953	0,979	0,949	0,989
PQ (ms)	40,2 ± 0,4	37,0 ± 0,7	38,2 ± 0,2	0,526	0,773	0,894	0,510
QRS (ms)	10,8 ± 1,1	11,2 ± 0,5	10,2 ± 0,4	0,131	0,911	0,148	0,179
QT (ms)	48,9 ± 4,4	51,4 ± 2,2	49,7 ± 4,4	0,029	0,302	0,145	0,025
QTc (ms)	45,9 ± 7,2	51,4 ± 2,2	49,7 ± 4,4	0,173	0,364	0,801	0,173
VES (/h)	0	1,3 ± 0,6	1,5 ± 0,7	0,282	0,290	0,902	0,472
AV-Block (/h)	0	0,3 ± 0,6	0,8 ± 0,4	0,007	0,419	0,008	0,013
Belastung							
HF (/min)	562,5 ± 12,0	549,3 ± 46,5	697,0 ± 1,4	0,178			
P (ms)	14,0 ± 0,6	15,1 ± 3,6	14,9 ± 0,1	0,008			
PQ (ms)	40,1 ± 1,8	46,7 ± 6,4	39,7 ± 3,3	0,103			
QRS (ms)	13,0 ± 0,7	12,1 ± 1,3	10,6 ± 0,6	0,065			
QT (ms)	59,0 ± 1,4	66,0 ± 5,3	43,5 ± 3,5	0,029			
QTc (ms)	55,0 ± 2,8	59,0 ± 4,6	46,8 ± 4,0	0,087			
VES (/h)	6,0 ± 8,5	65,3 ± 51,4	21,0 ± 12,7	0,102			
AV-Block (/h)	0,5 ± 0,7	3,3 ± 0,6	15,0 ± 4,2	0,001			



Tab. 3: Oberflächen-EKG

Die P-Dauer war bei homozygoten Desmin-Mutanten gegenüber dem Wildtyp signifikant verlängert. Diese Veränderung konnte auch im Vergleich zwischen den 2–4 und 5–7 Monate alten Tieren gemessen werden. Solche Altersunterschiede bestanden zudem bei der Herzfrequenz und der PQ-Zeit.

Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Jeder abhängigen Variablen (z. B. HF) sind insgesamt 3 p-Werte zugeordnet (Genotyp, Alter, Geschlecht). Ersterer vergleicht die Genotypen untereinander. Tukey zeigt die p-Werte der Post-hoc-Tests an. Die p-Werte unter Alter und Geschlecht unterscheiden nicht zwischen Genotypen.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; S-EKG: Oberflächen-EKG; HF: Herzfrequenz; P: P-Dauer; PQ: PQ-Zeit; QRS: QRS-Dauer; QT: QT-Zeit; QTc: relative QT-Zeit

Alter (Monate)	WT MW ± SD	DesRP/+ MW ± SD	DesRP/RP MW ± SD	p (ANOVA)	DesRP/+ vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. DesRP/+ (Tukey)
Gesamt n	n	n	n	Genotyp			
HF (/min)	16 424,9 ± 57,9	21 431,9 ± 57,4	16 433,4 ± 54,2	0,922	0,913	0,888	0,996
P (ms)	16 11,6 ± 3,7	21 13,5 ± 5,2	16 15,0 ± 4,2	0,029	0,280	0,030	0,418
PQ (ms)	16 49,3 ± 5,2	21 49,5 ± 9,2	16 47,9 ± 6,5	0,935	0,993	0,864	0,785
QRS (ms)	16 14,2 ± 2,9	21 13,4 ± 2,2	16 14,7 ± 3,0	0,283	0,616	0,848	0,288
QT (ms)	16 34,6 ± 3,5	21 33,9 ± 4,2	16 35,9 ± 4,1	0,459	0,835	0,631	0,277
QTc (ms)	16 29,0 ± 2,8	21 28,7 ± 3,8	16 30,4 ± 3,1	0,444	0,960	0,440	0,262
2 bis 4				Alter			
HF (/min)	6 474,7 ± 34,2	7 463,6 ± 27,0	7 434,6 ± 56,8	0,006			
P (ms)	6 9,2 ± 1,5	7 8,6 ± 0,8	7 12,4 ± 4,2	< 0,001			
PQ (ms)	6 46,5 ± 3,8	7 43,9 ± 4,1	7 48,0 ± 6,2	0,047			
QRS (ms)	6 12,3 ± 0,8	7 12,6 ± 1,0	7 15,7 ± 2,5	0,309			
QT (ms)	6 32,7 ± 3,3	7 34,9 ± 3,8	7 34,7 ± 5,2	0,268			
QTc (ms)	6 29,0 ± 2,7	7 30,6 ± 3,1	7 29,3 ± 3,5	0,766			
5 bis 7				Geschlecht			
HF (/min)	10 395,0 ± 47,9	14 416,1 ± 62,7	9 432,6 ± 55,5	0,925			
P (ms)	10 13,1 ± 3,9	14 15,9 ± 4,7	9 17,0 ± 3,1	0,122			
PQ (ms)	10 50,9 ± 5,4	14 52,4 ± 9,9	9 47,9 ± 7,1	0,894			
QRS (ms)	10 15,3 ± 3,1	14 13,8 ± 2,6	9 13,9 ± 3,3	0,764			
QT (ms)	10 35,8 ± 3,3	14 33,4 ± 4,3	9 36,9 ± 3,1	0,829			
QTc (ms)	10 29,0 ± 3,1	14 27,7 ± 3,8	9 31,3 ± 2,7	0,839			

Tab. 4: Intrakardiales EKG und Funktionstests

Des^{RP/RP} hatten eine verlängerte HV-Zeit im Vergleich zum WT. Des^{RP/+} wiesen sogar Verlangsamungen der AV-nodalen Refraktärzeit im Vergleich zum WT und Des^{RP/RP} auf. Bei der atrialen Refraktärzeit gab es Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Ebenso konnten abhängig vom Geschlecht Unterschiede bei der ventrikulären Refraktärzeit gemessen werden.

Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Jeder abhängigen Variablen (z. B. AV) sind insgesamt 3 p-Werte zugeordnet (Genotyp, Alter, Geschlecht). Ersterer vergleicht die Genotypen untereinander. Tukey zeigt die p-Werte der Post-hoc-Tests an. Die p-Werte unter Alter und Geschlecht unterscheiden nicht zwischen Genotypen.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; AV: AV-Zeit; AH: AH-Dauer; HV: HV-Zeit; WBP: Wenckebach-Punkt; 2:1: 2:1-Überleitung; SNRT: Sinusknotenerholungszeit; AVNRT: AV-nodale Refraktärzeit; ARP: atriale Refraktärzeit; VRP: ventrikuläre Refraktärzeit

Alter (Monate)	WT		DesRP/+		DesRP/RP		p (ANOVA)	DesRP/+ vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. DesRP/+ (Tukey)
	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD				
Gesamt							Genotyp			
AV (ms)	13	48,8 ± 5,4	18	50,7 ± 15,2	12	58,8 ± 29,3	0,517	0,965	0,424	0,515
AH (ms)	10	39,9 ± 4,6	18	39,9 ± 14,0	11	38,0 ± 7,3	0,938	1,000	0,919	0,897
HV (ms)	10	9,0 ± 1,5	18	10,2 ± 2,4	10	12,0 ± 2,1	0,002	0,231	0,003	0,054
WBP (ms)	13	94,2 ± 11,9	18	91,4 ± 22,5	10	96,5 ± 26,0	0,804	0,923	0,963	0,803
2:1 (ms)	13	64,6 ± 6,3	17	63,8 ± 10,8	10	63,5 ± 8,8	0,956	0,971	0,956	0,996
SNRT (ms)	13	216,5 ± 62,9	17	206,2 ± 65,0	10	187,0 ± 52,6	0,607	0,900	0,522	0,733
AVNRT (ms)	13	60,4 ± 6,6	17	48,2 ± 11,2	9	60,6 ± 8,5	0,036	0,003	0,999	0,007
ARP (ms)	13	21,5 ± 9,2	17	20,3 ± 6,5	9	19,4 ± 9,2	0,993	0,902	0,810	0,962
VRP (ms)	13	30,8 ± 9,5	15	29,0 ± 10,6	10	30,0 ± 11,3	0,953	0,892	0,983	0,969
2 bis 4							Alter			
AV (ms)	4	49,0 ± 1,8	6	48,5 ± 2,3	5	55,8 ± 4,3	0,888			
AH (ms)	4	37,5 ± 1,9	6	38,8 ± 3,4	5	42,8 ± 3,5	0,649			
HV (ms)	4	8,5 ± 0,6	6	8,0 ± 0,9	5	12,8 ± 2,3	0,131			
WBP (ms)	4	86,3 ± 4,8	6	88,3 ± 4,1	5	111,0 ± 30,7	0,459			
2:1 (ms)	4	63,8 ± 2,5	6	63,3 ± 8,2	5	68,0 ± 4,5	0,394			
SNRT (ms)	4	185,8 ± 26,6	6	210,7 ± 37,9	5	203,0 ± 67,9	0,950			
AVNRT (ms)	4	58,8 ± 2,5	6	52,5 ± 12,1	5	64,0 ± 9,6	0,210			
ARP (ms)	4	15,0 ± 7,1	6	19,2 ± 4,9	5	15,0 ± 5,0	0,019			
VRP (ms)	4	26,3 ± 8,5	6	26,7 ± 5,2	5	28,0 ± 5,7	0,370			
5 bis 7							Geschlecht			
AV (ms)	9	48,8 ± 6,5	12	51,8 ± 18,8	7	60,9 ± 39,3	0,467			
AH (ms)	6	41,5 ± 5,3	12	40,4 ± 17,2	6	34,0 ± 7,3	0,618			
HV (ms)	6	9,3 ± 1,9	12	11,3 ± 2,1	5	11,2 ± 1,6	0,415			
WBP (ms)	9	97,8 ± 12,5	12	92,9 ± 27,8	5	82,0 ± 7,6	0,627			
2:1 (ms)	9	65,0 ± 7,5	11	64,1 ± 12,4	5	59,0 ± 10,2	0,209			
SNRT (ms)	9	230,2 ± 70,6	11	203,8 ± 77,6	5	171,0 ± 31,4	0,577			
AVNRT (ms)	9	61,1 ± 7,8	11	45,9 ± 10,4	4	56,3 ± 4,8	0,222			
ARP (ms)	9	24,4 ± 8,8	11	20,9 ± 7,4	4	25,0 ± 10,8	0,719			
VRP (ms)	9	32,8 ± 9,7	9	30,6 ± 13,1	5	32,0 ± 15,7	0,050			

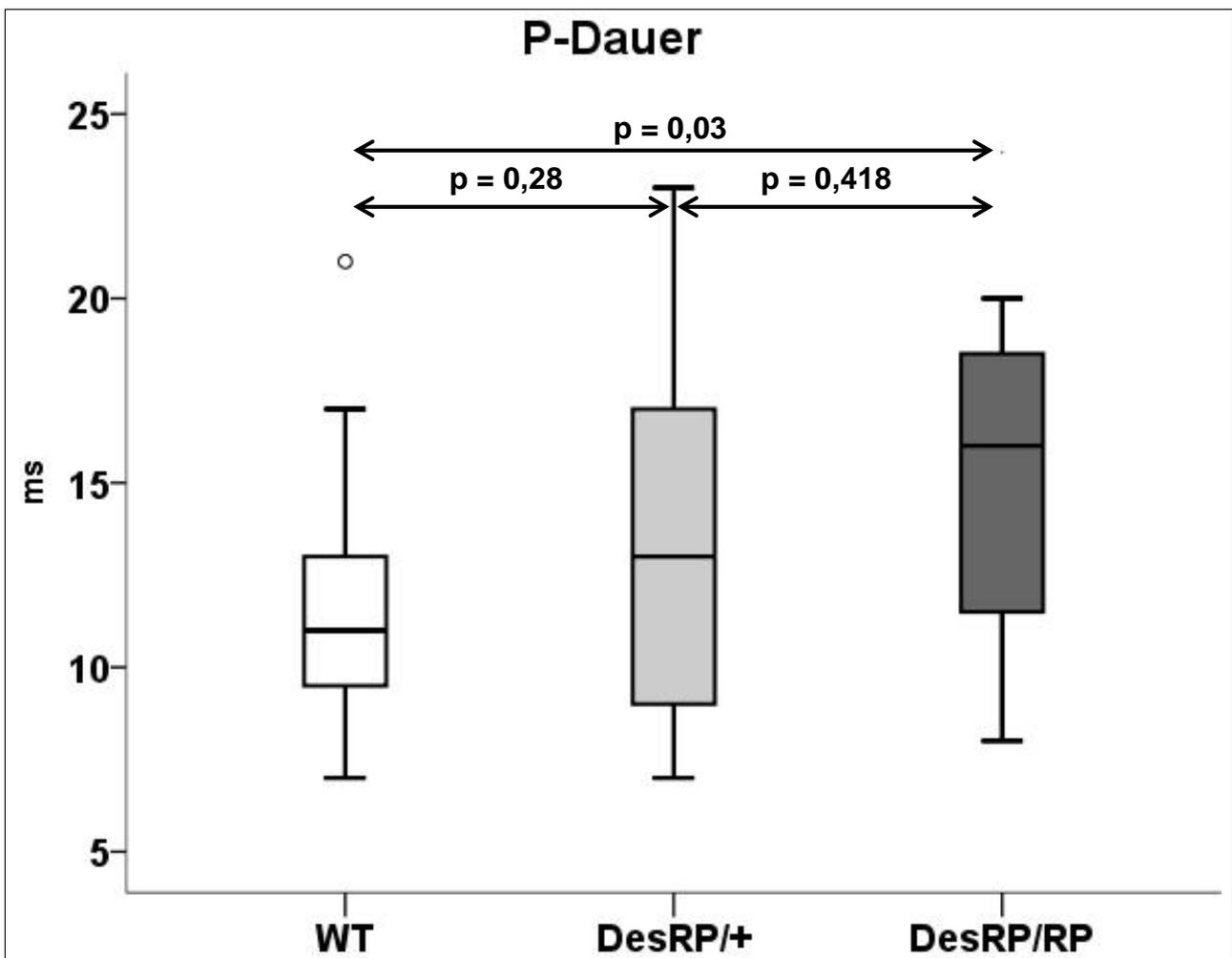
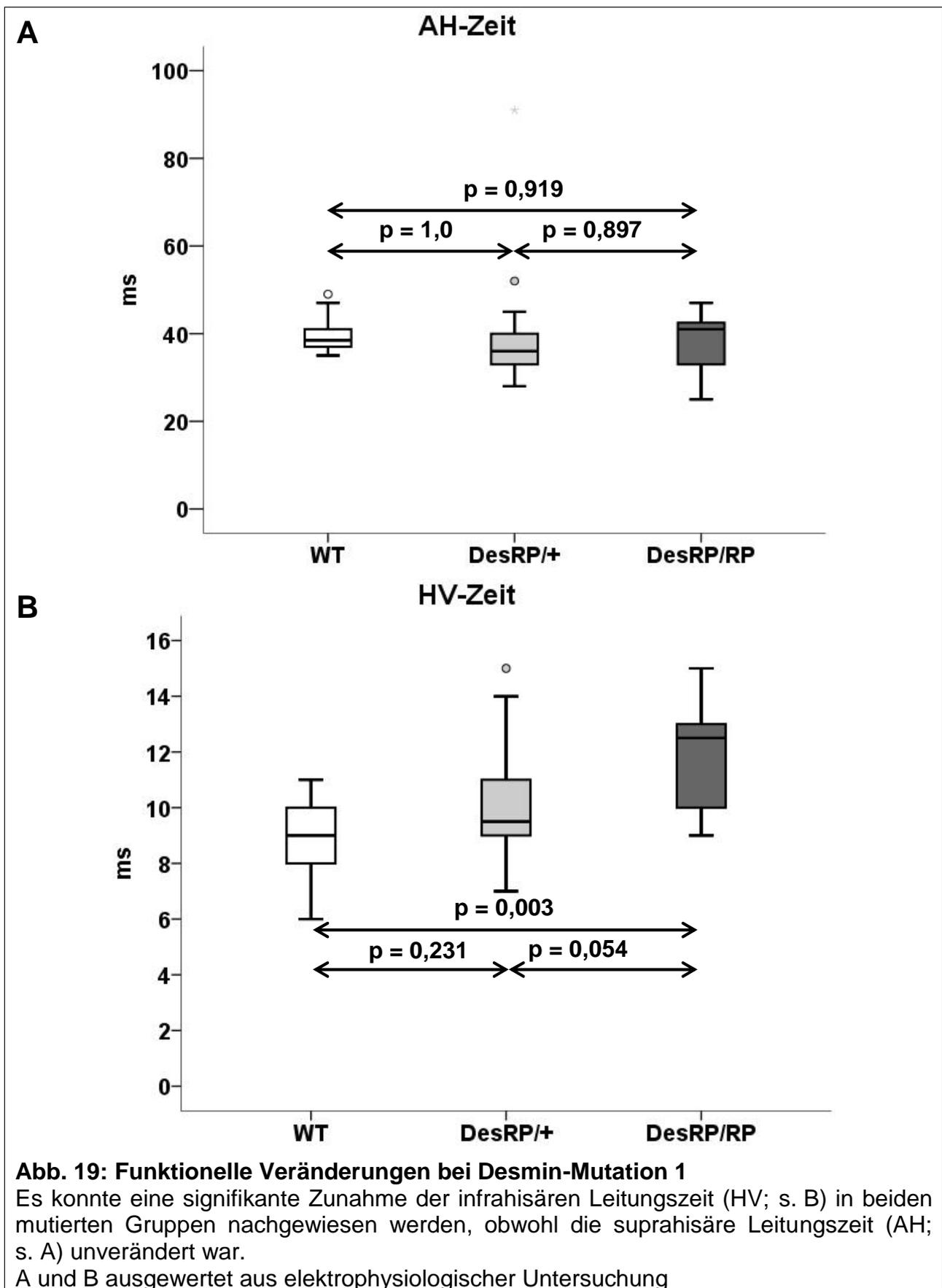
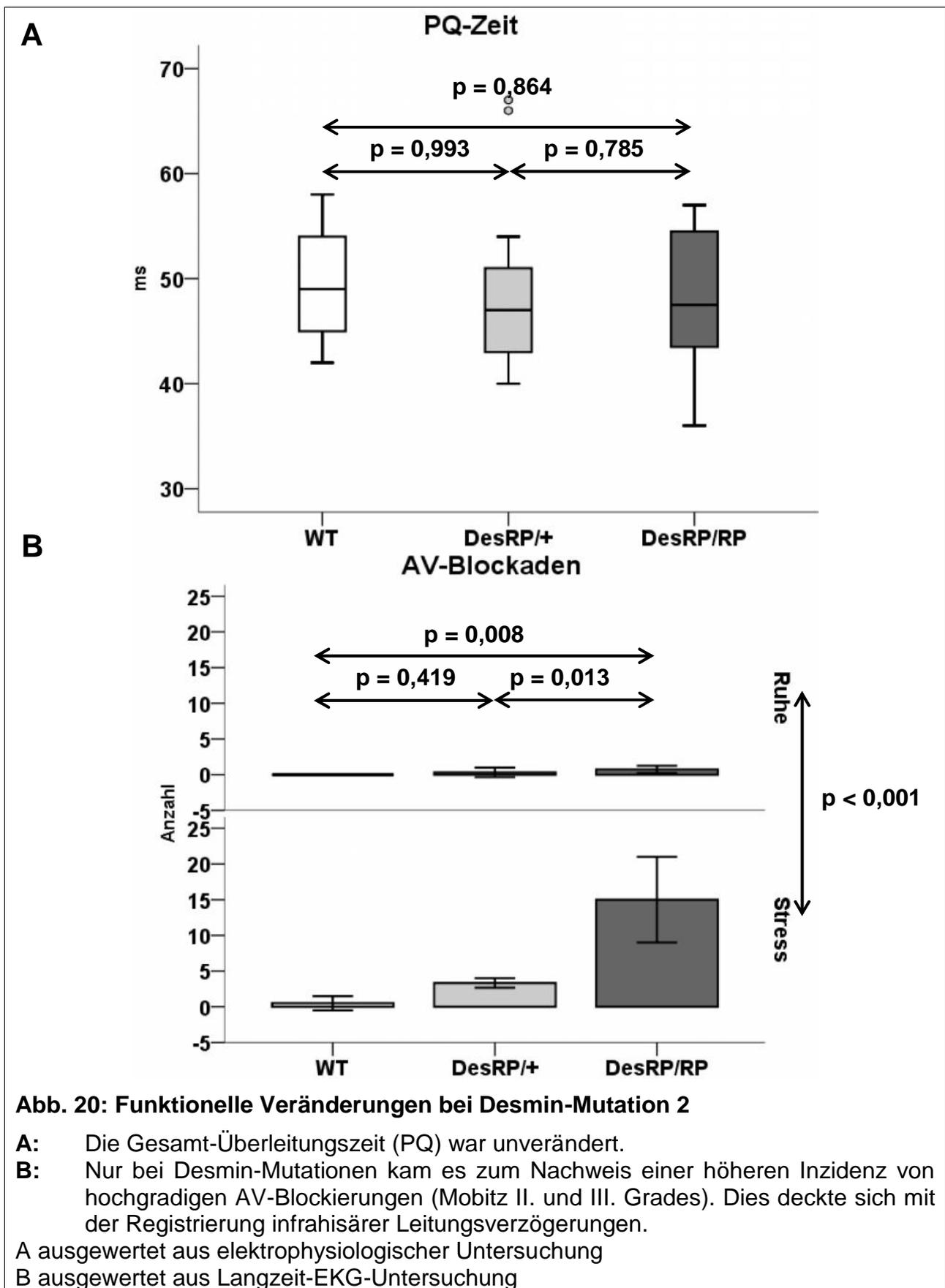
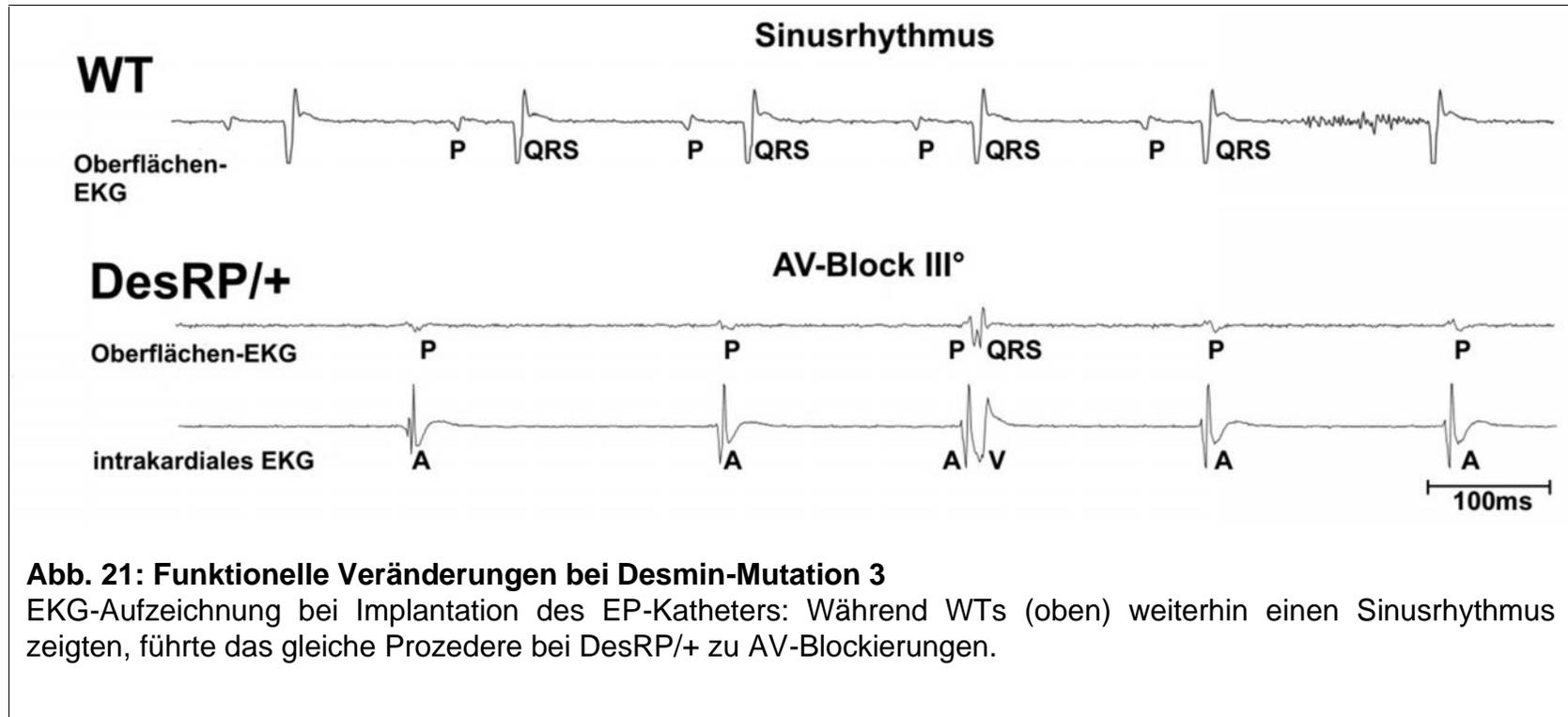


Abb. 18: P-Dauer

Die P-Dauer war bei den homozygoten Desmin-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp verlängert (ausgewertet aus elektrophysiologischer Untersuchung).







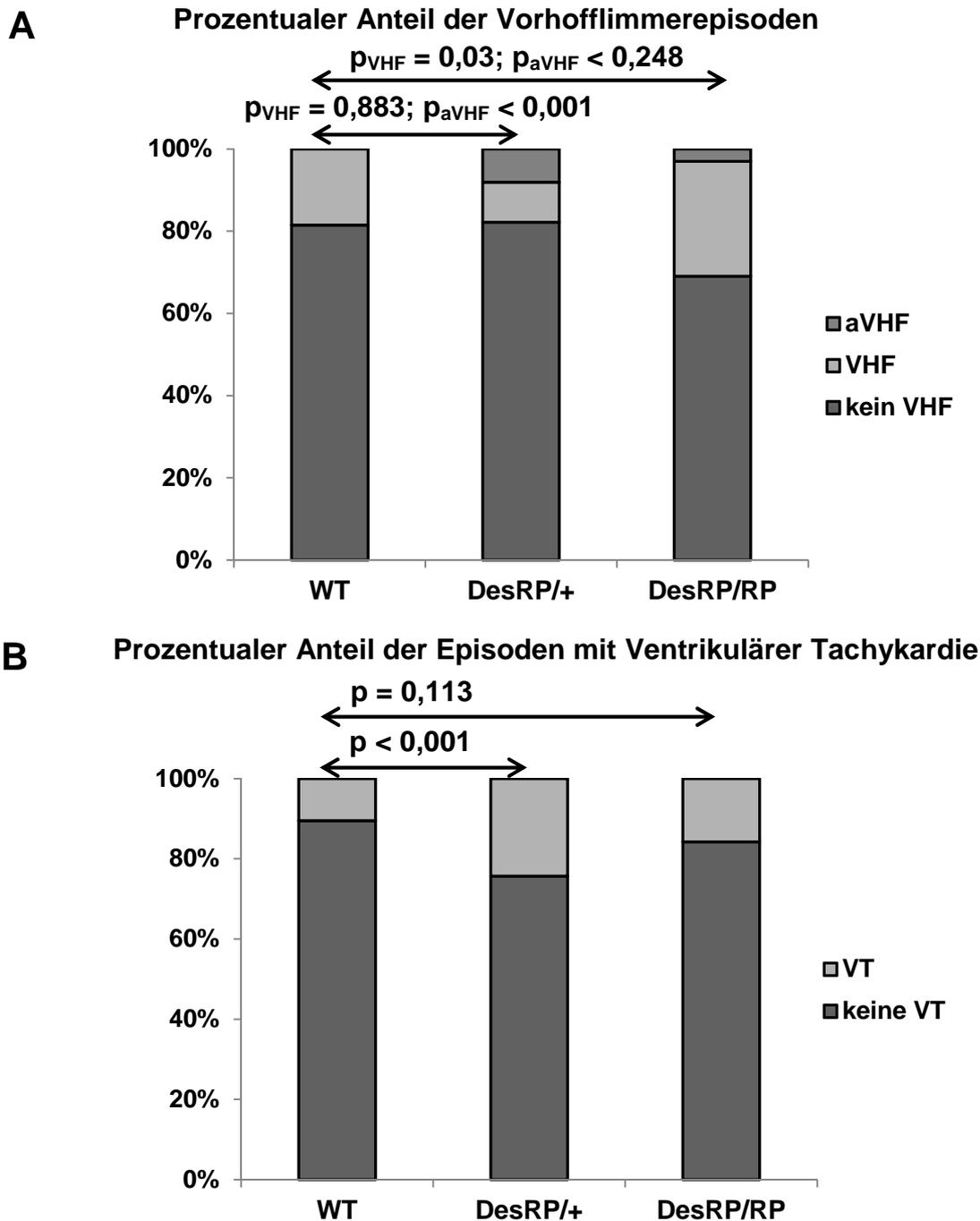
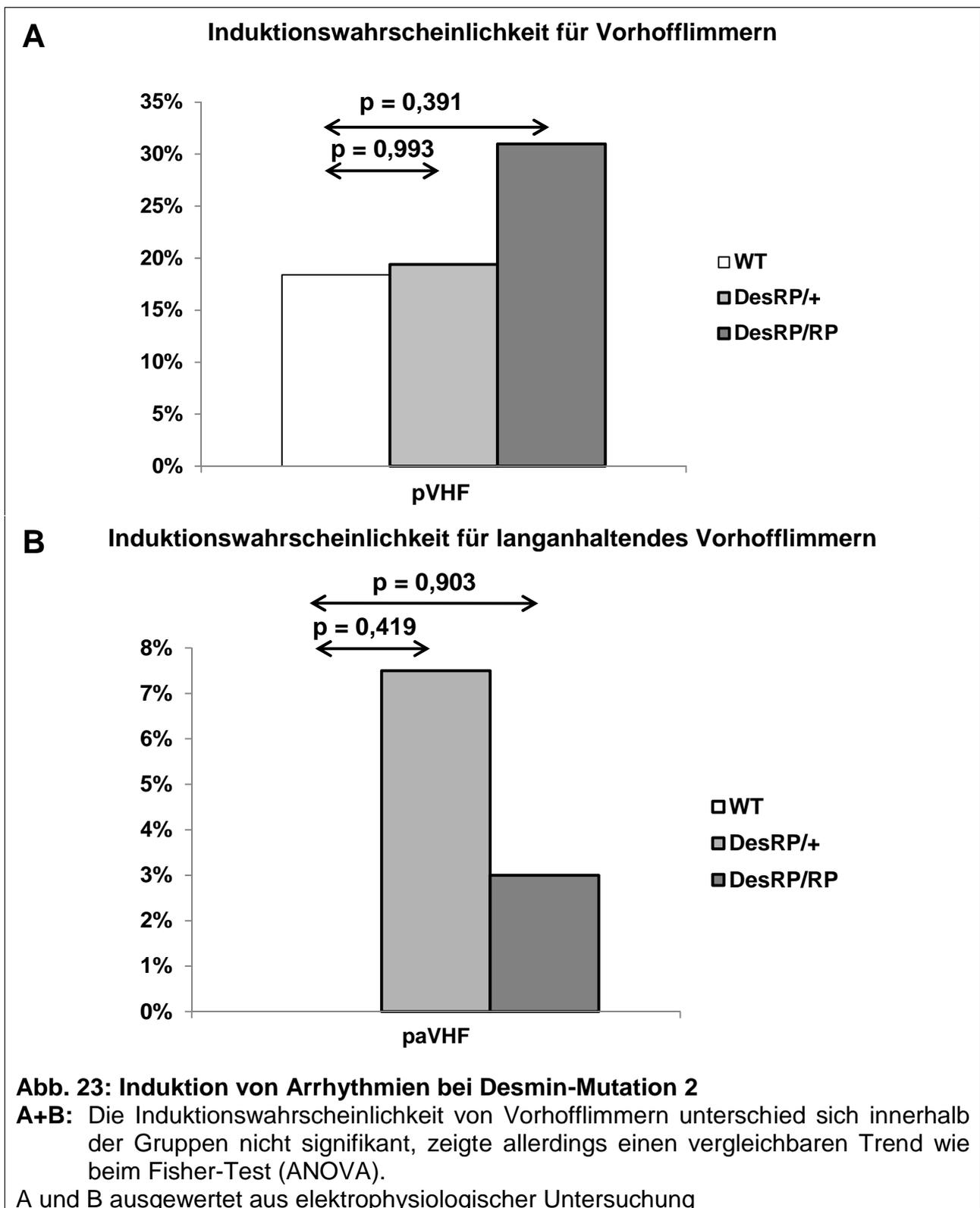


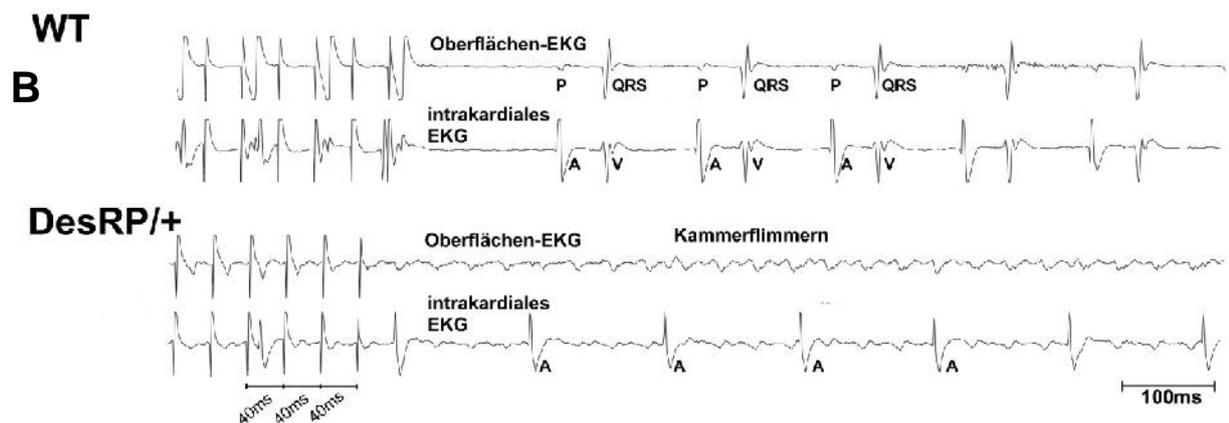
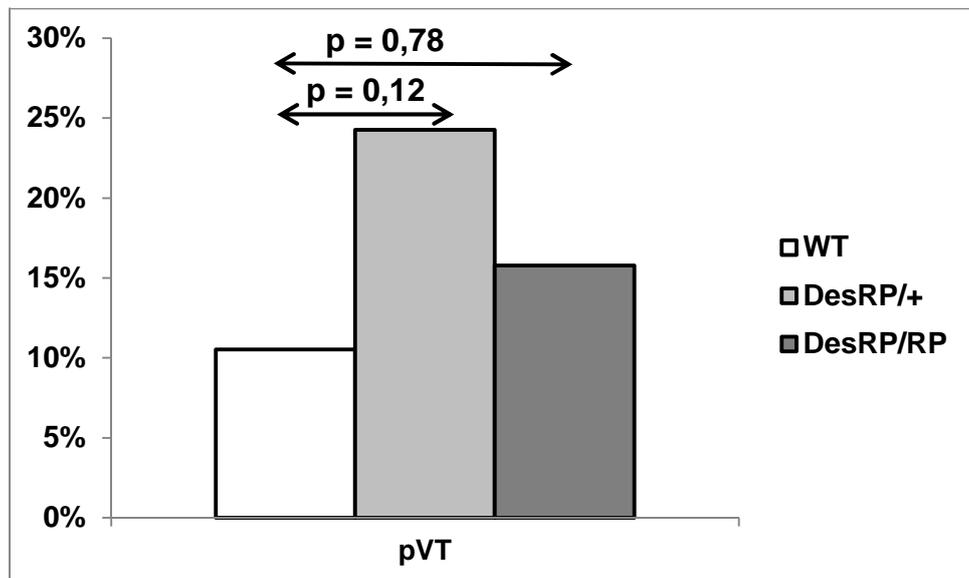
Abb. 22: Induktion von Arrhythmien bei Desmin-Mutation 1

A: Homozygote Mäuse hatten einen signifikant höheren Anteil von Vorhofflimmern gegenüber Wildtypen. Heterozygote Tiere zeigten signifikant mehr anhaltendes Vorhofflimmern (> 1 min) als WT (Fisher-Test). (a)VHF: (anhaltendes) Vorhofflimmern

B: Des^{RP/+} wiesen signifikant mehr ventrikuläre Tachykardien auf als die WT. Die homozygote Mutation zeigte einen vergleichbaren Trend (Fisher-Test). VT: ventrikuläre Tachykardie

A und B ausgewertet aus elektrophysiologischer Untersuchung



A Induktionswahrscheinlichkeit für ventrikuläre Tachykardie**Abb. 24: Induktion von Arrhythmien bei Desmin-Mutation 3**

A: Die Suszeptibilität für ventrikuläre Tachykardien verhielt sich im Muster vergleichbar mit dem Fisher-Test (ANOVA).

B: Elektrokardiogramm nach ventrikulärer Burst-Stimulation über 1 s mit einem S1–S1-Abstand von 40 ms. Beim Wildtyp (oben) ließen sich keine Arrhythmien induzieren. Bei Des^{RP/+} (unten) kam es zu Kammerflimmern.

A und B ausgewertet aus elektrophysiologischer Untersuchung

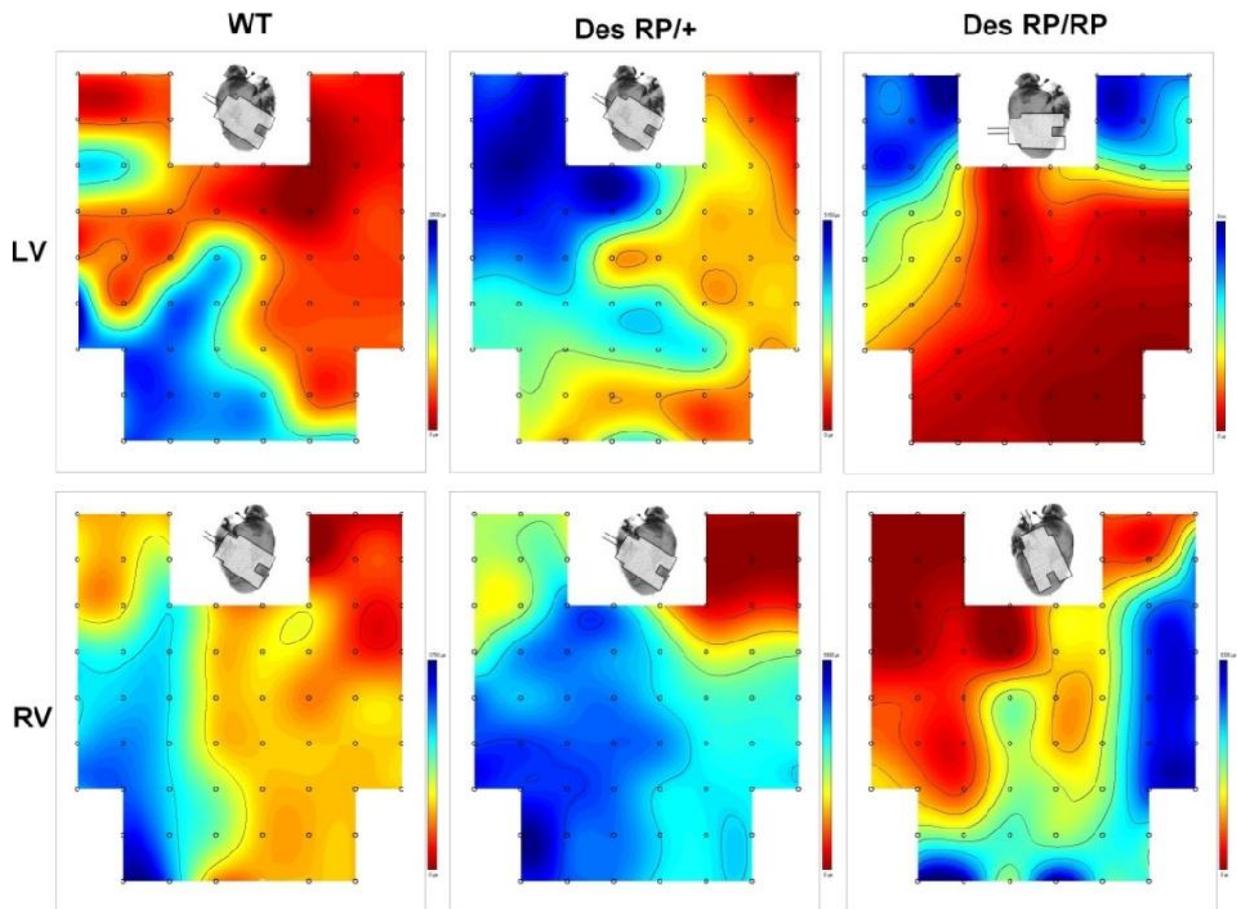


Abb. 25: Epikardiales Mapping 1

Repräsentative epikardiale Aktivierungsaufzeichnungen von WT, Des^{RP/+} und Des^{RP/RP} aus jeweils linkem (LV) und rechtem Ventrikelmuskulatur (RV). Schwarze Linien in den einzelnen Aufzeichnungen stellen isochrome Zeitlinien dar und entsprechen jeweils 1 ms Zeitunterschied zueinander. Im oberen Teil jeder Aufzeichnung ist die Orientierung des Elektrodennetzes zum myokardialen Faserverlauf abgebildet. Die Erregungsfront bewegte sich in jeder Aufzeichnung von apikal nach basal. Auffällig war hierbei, dass die isochronen Zeitlinien sich bei Vorliegen der Desmin-Mutation zwischen zwei Elektroden verdichteten. Dies konnte als Hinweis auf eine verlangsamte Erregungsleitung gewertet werden. Die Anhäufung von > 4 Isochronen zwischen benachbarten Elektroden wurde nur bei Des^{RP/RP} nachgewiesen.

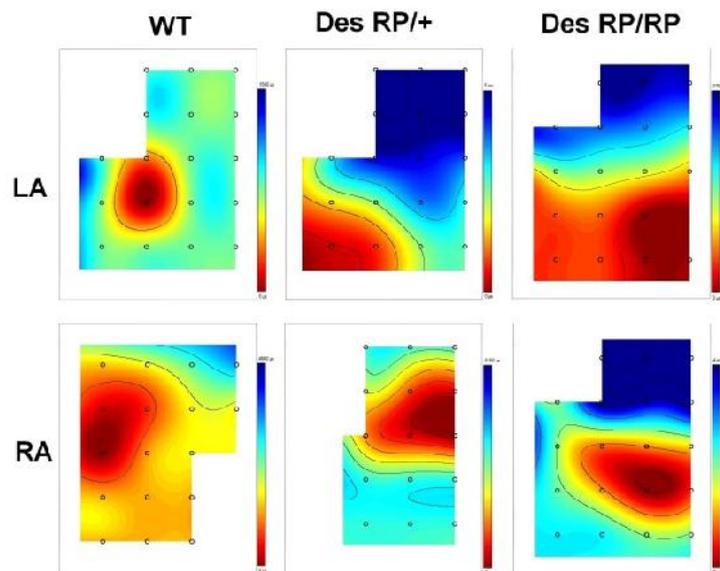


Abb. 26: Epikardiales Mapping 2

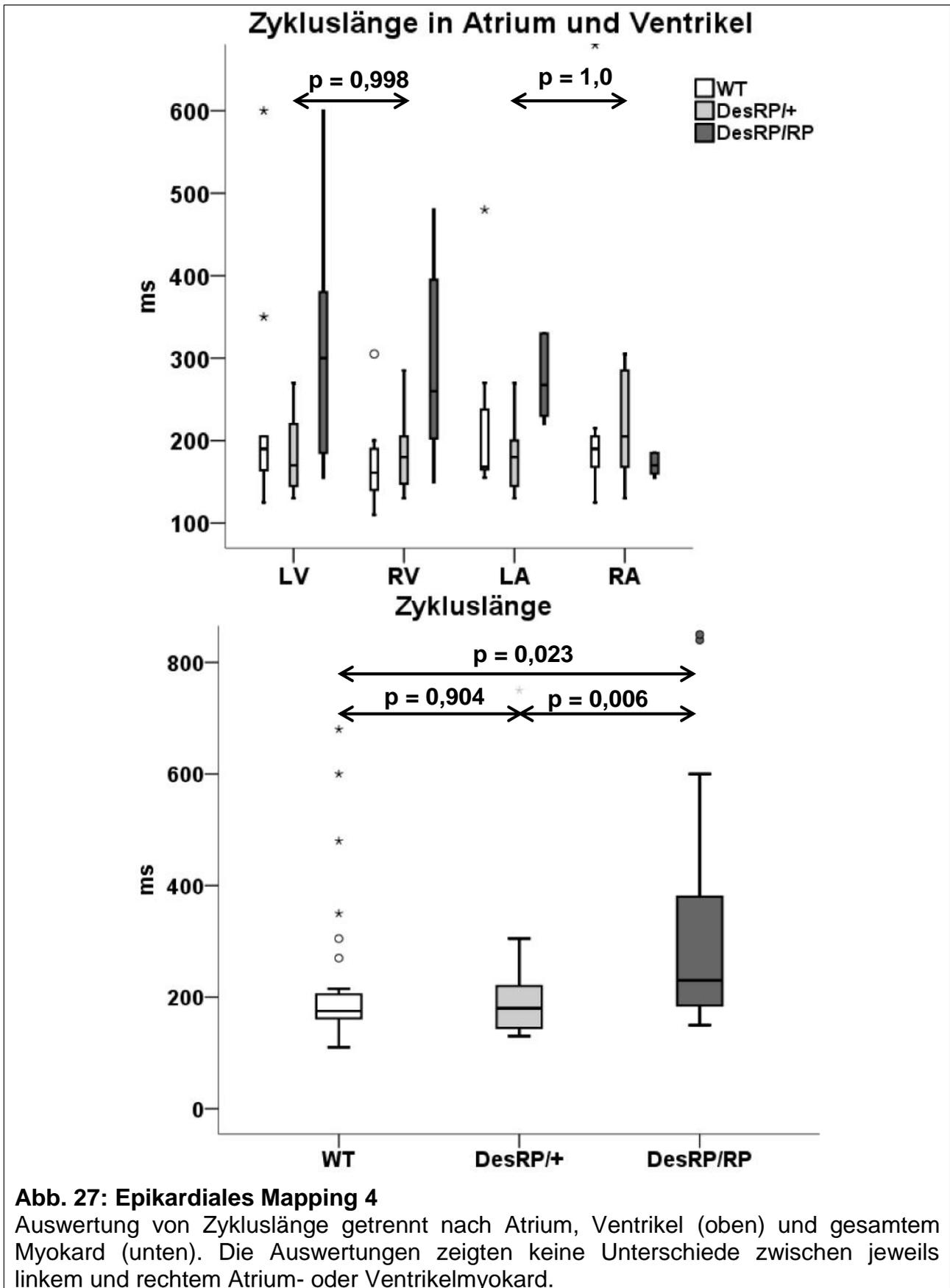
Repräsentative epikardiale Aktivierungsaufzeichnungen von WT, Des^{RP/+} und Des^{RP/RP} aus jeweils links- (LA) und rechts-atrialem Myokard (RA). Schwarze Linien in den einzelnen Aufzeichnungen stellen isochrome Zeitlinien dar und entsprechen jeweils 1 ms Zeitunterschied zueinander. Bei diesen Aufzeichnungen kam dasselbe Elektrodennetz wie beim ventrikulären Mapping zur Anwendung. Aufgrund der kleineren Fläche der Atrien wurde nur der dem Vorhofmyokard aufliegende Anteil des Elektrodennetzes wiedergegeben. Auch hier zeigte sich bei den mutierten Tieren eine signifikante Herabsetzung der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit.

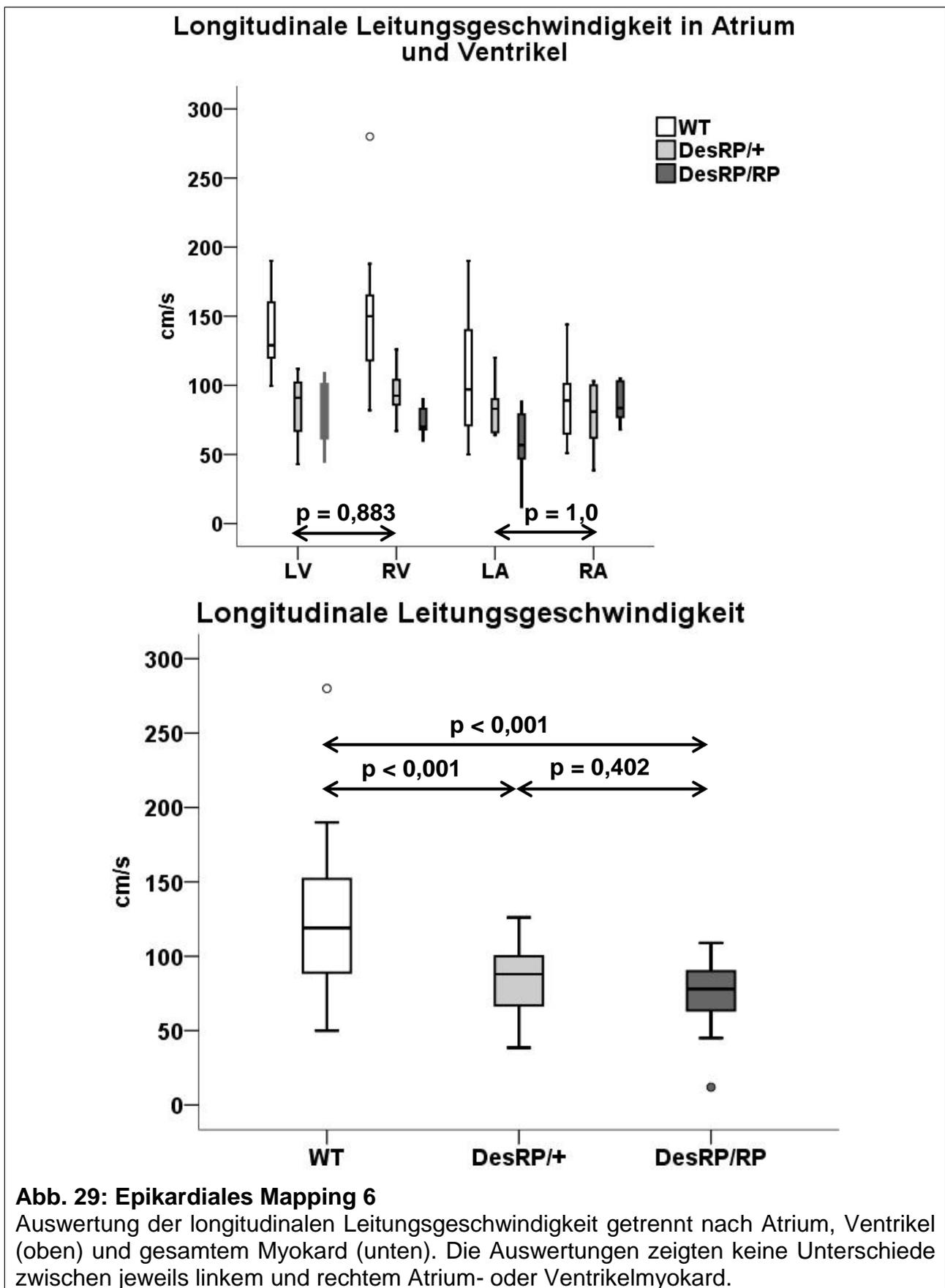
Tab. 5: Epikardiales Mapping 3

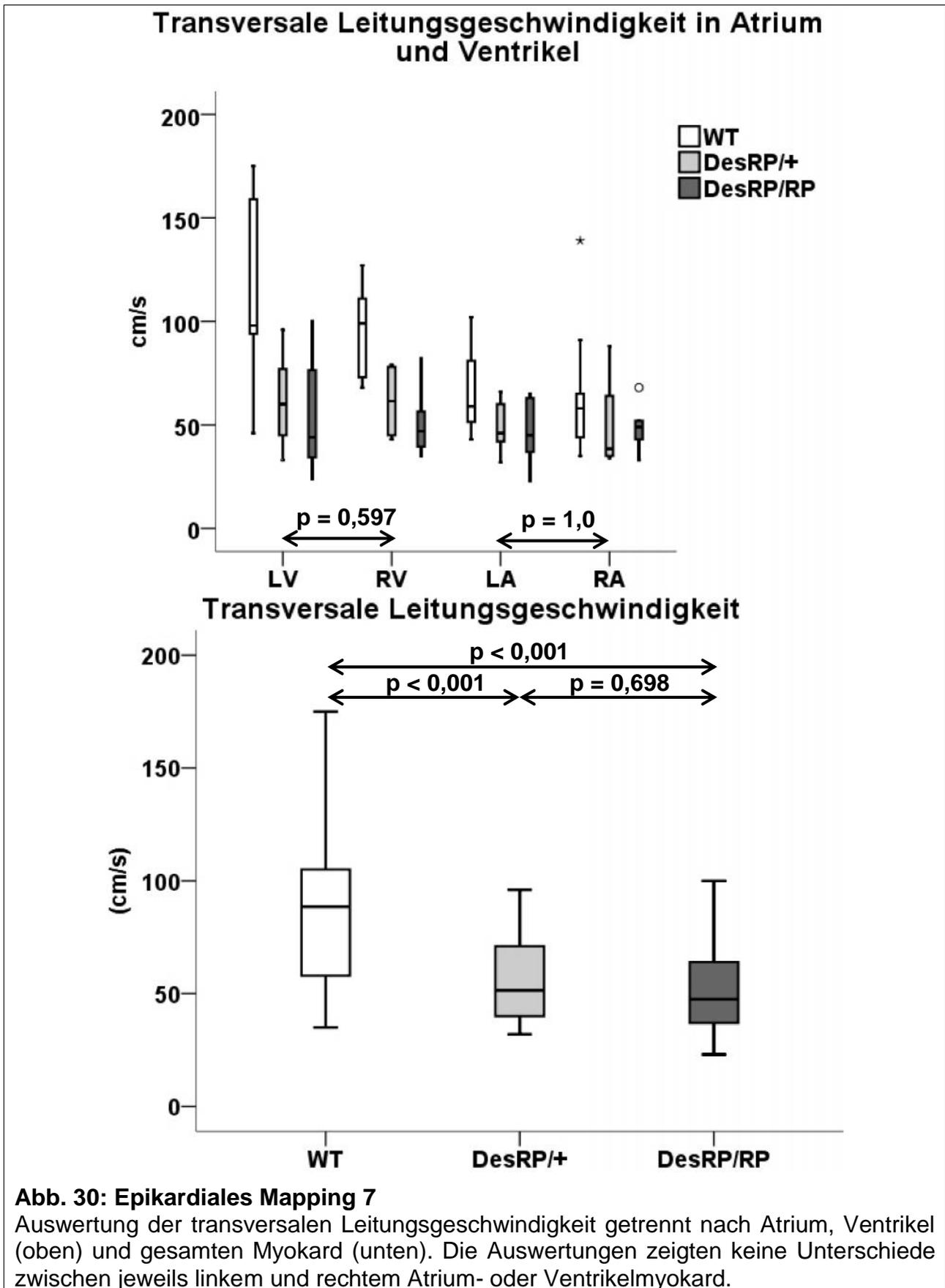
Bei den Tieren mit homozygoter Desmin-Mutation waren die Zykluslängen signifikant verlängert. Ebenso waren deutliche Einschränkungen der Leitungsgeschwindigkeiten in longitudinaler und transversaler Faserausrichtung bei beiden Mutanten messbar. Zudem war bei Des^{RP/RP} eine Zunahme relevanter Leitungsblockaden (> 4 ms) zu beobachten. Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Unter Tukey sind die p-Werte der Post-hoc-Tests aufgeführt.

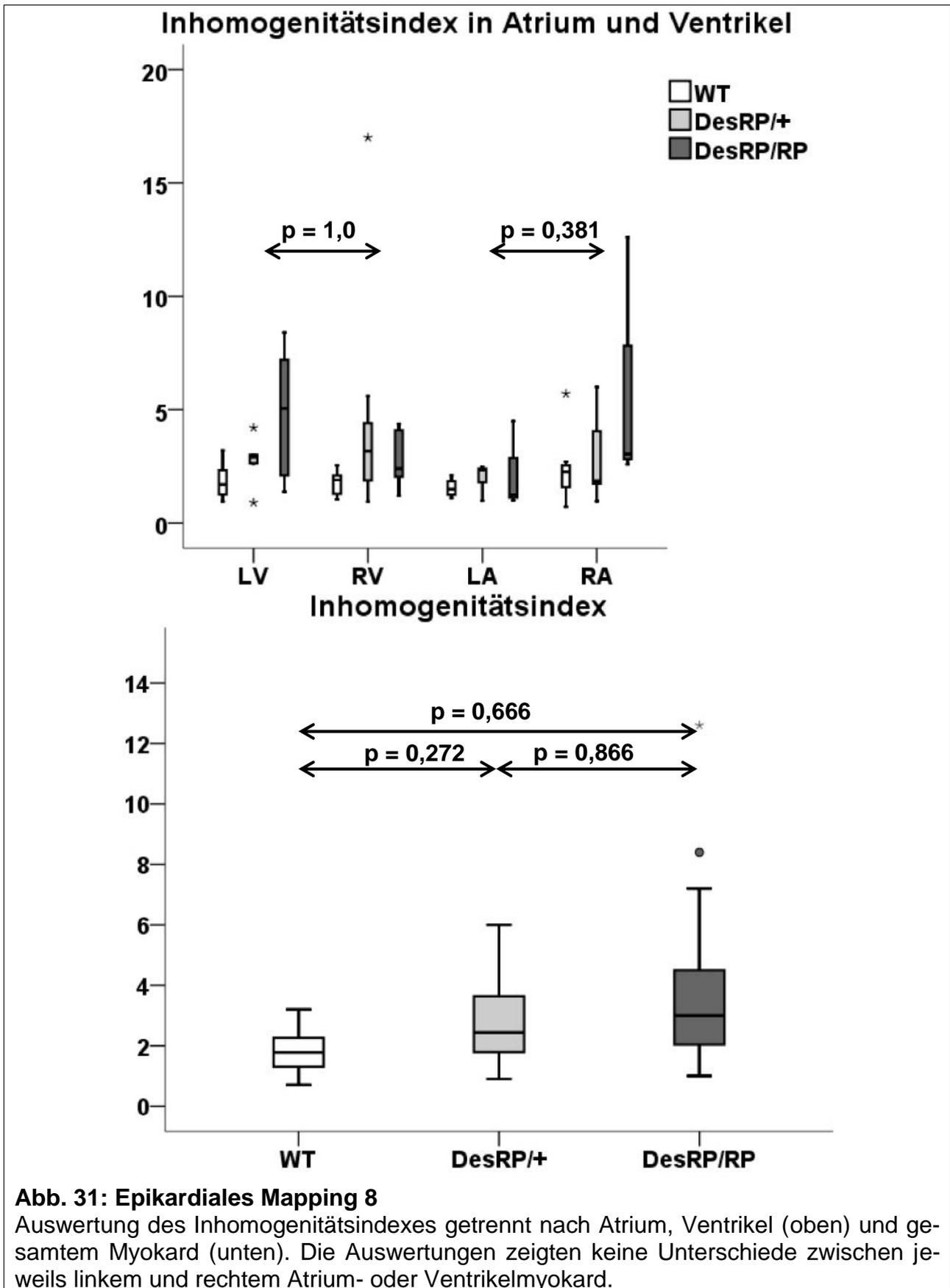
MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; CL: Zykluslänge; LVZ: Leitungsverzögerung; LGL: longitudinale Leitungsgeschwindigkeit; LGT: transversale Leitungsgeschwindigkeit; IHG: Inhomogenitätsindex; LB > 4 ms: Leitungsblockade > 4 ms; LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; LA: linkes Atrium; RA: rechtes Atrium

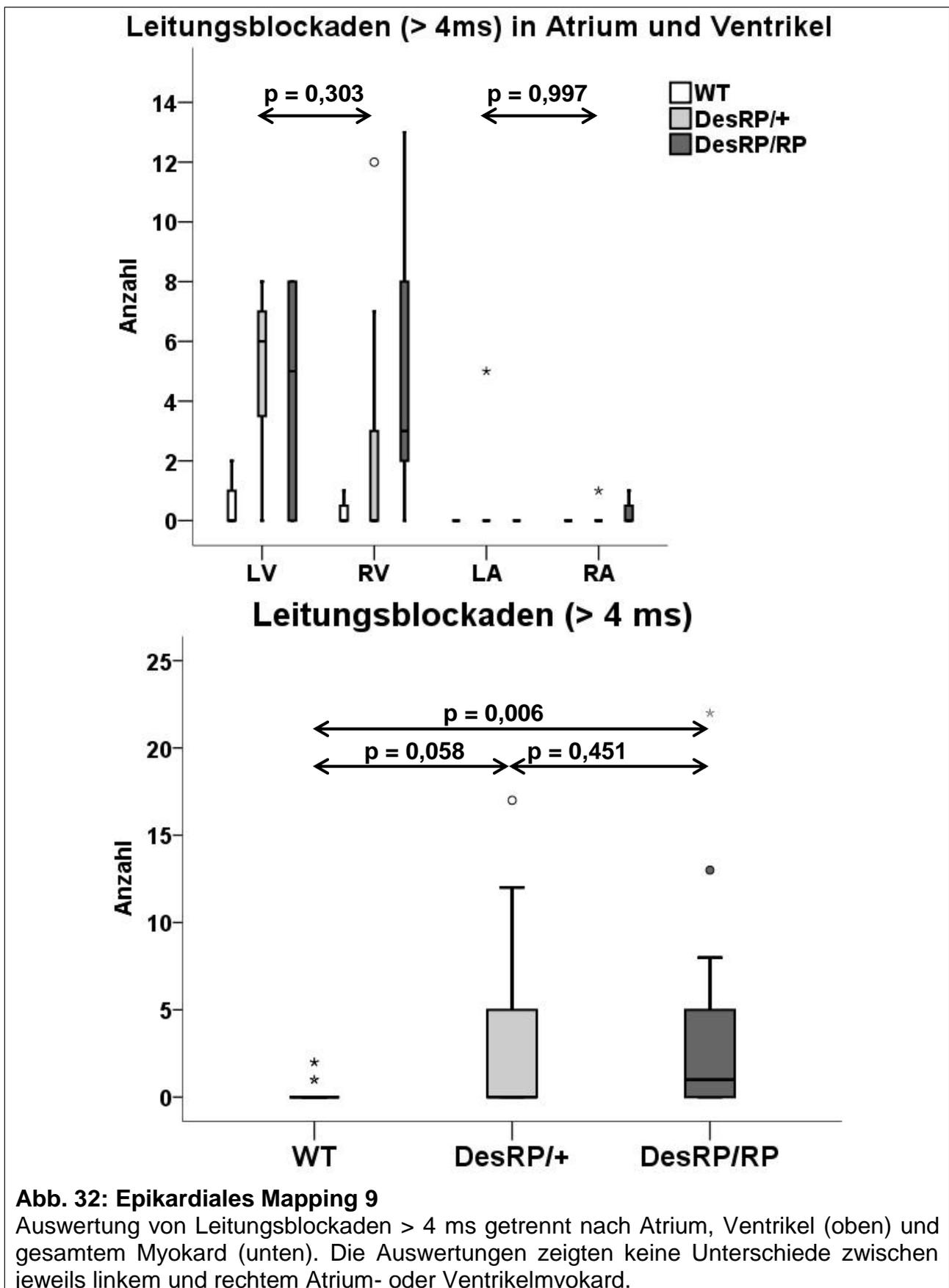
CL (ms)	WT		DesRP/+		DesRP/RP		p (ANOVA)	DesRP/+ vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. WT (Tukey)	DesRPRP vs. DesRP/+ (Tukey)
	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD				
LV	9	239,3 ± 149,5	10	182,5 ± 46,4	6	320,0 ± 168,0				
RV	8	174,6 ± 59,9	11	187,9 ± 52,4	7	349,3 ± 241,6				
LA	7	229,7 ± 117,4	9	179,7 ± 45,1	6	419,2 ± 385,2				
RA	9	235,6 ± 168,9	9	268,7 ± 189,0	6	281,7 ± 278,6				
Gesamt	33	220,6 ± 129,6	39	203,3 ± 102,5	25	342,8 ± 264,8	0,006	0,904	0,023	0,006
LVZ (ms)										
LV	9	1,9 ± 1,1	9	4,7 ± 1,8	7	6,3 ± 4,7				
RV	8	2,7 ± 1,3	10	4,1 ± 2,5	7	6,1 ± 3,2				
LA	7	2,4 ± 1,2	9	2,9 ± 1,2	6	2,9 ± 0,6				
RA	9	2,7 ± 0,6	10	3,2 ± 1,2	6	3,0 ± 1,1				
Gesamt	33	2,4 ± 1,1	38	3,7 ± 1,8	26	4,7 ± 3,3	< 0,001	0,023	< 0,001	0,139
LGL (cm/s)										
LV	9	139,4 ± 31,2	9	84,4 ± 24,0	7	82,0 ± 25,5				
RV	9	152,8 ± 57,2	10	95,9 ± 17,6	7	74,6 ± 10,9				
LA	7	108,4 ± 51,4	9	83,3 ± 17,9	6	56,6 ± 27,1				
RA	9	87,6 ± 28,9	10	77,3 ± 23,1	6	86,7 ± 14,6				
Gesamt	34	122,8 ± 49,1	38	85,3 ± 21,2	26	75,2 ± 22,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,402
LGT (cm/s)										
LV	9	114,2 ± 43,6	9	62,9 ± 22,4	7	55,6 ± 28,6				
RV	9	96,7 ± 22,2	10	61,7 ± 14,5	7	50,9 ± 16,7				
LA	7	67,0 ± 24,2	9	49,0 ± 11,7	6	46,3 ± 16,0				
RA	9	64,8 ± 32,6	10	49,1 ± 19,1	6	49,0 ± 11,5				
Gesamt	34	86,8 ± 37,3	38	55,6 ± 18,0	26	50,7 ± 18,8	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,698
IHG										
LV	7	1,9 ± 0,8	7	2,8 ± 1,0	6	4,9 ± 3,0				
RV	7	1,8 ± 0,6	9	4,5 ± 4,9	5	2,8 ± 1,4				
LA	4	1,5 ± 0,4	5	2,0 ± 0,6	3	2,2 ± 2,0				
RA	7	2,4 ± 1,6	7	10,9 ± 22,6	3	6,1 ± 5,7				
Gesamt	25	1,9 ± 1,0	28	5,2 ± 11,5	17	4,0 ± 3,2	0,347	0,272	0,666	0,866
LB >4 ms										
LV	7	0,6 ± 1,0	7	6,3 ± 5,4	6	6,7 ± 8,1				
RV	7	0,3 ± 0,5	9	2,4 ± 4,3	5	5,2 ± 5,3				
LA	5	0,0 ± 0,0	5	1,0 ± 2,2	3	0,0 ± 0,0				
RA	7	0,0 ± 0,0	7	0,1 ± 0,4	3	0,3 ± 0,6				
Gesamt	26	0,2 ± 0,6	28	2,6 ± 4,3	17	3,9 ± 6,0	0,030	0,058	0,006	0,451











Tab. 6: Polymerase-Kettenreaktion-Ergebnisse 1

Homozygote Tiere wiesen höhere mRNA-Level von N_V1.5 und K_V1.5 auf. Die Unterschiede waren sowohl im Atrium als auch im Ventrikel messbar.

Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Unter p sind pro Untersuchung (z. B. Cx40) je zwei Werte aufgeführt. Der obere misst Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel, der untere Unterschiede zwischen den Genotypen. Unter Tukey sind die p-Werte der Post-Hoc-Tests aufgeführt.

PCR: Polymerase-Kettenreaktion; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; A: Atrium; V: Ventrikel

		WT	DesRP/+	DesRP/RP	p	DesRP/+	DesRP/RP	DesRPRP
		MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	(ANOVA)	vs. WT	vs. WT	vs. DesRP/+
	n	n	n		Tukey	Tukey	Tukey	
Cx40								
A	6	1,0 ± 0,0	7	0,9 ± 0,4	6	1,1 ± 0,4	0,169	
V	6	1,0 ± 0,0	6	1,1 ± 0,3	4	1,4 ± 0,5		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,3	10	1,2 ± 0,4	0,156	0,997 0,288 0,249
Cx43								
A	6	1,0 ± 0,0	7	1,0 ± 0,5	6	1,0 ± 0,5	0,811	
V	6	1,0 ± 0,0	6	0,9 ± 0,2	4	1,1 ± 0,3		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,3	10	1,0 ± 0,4	0,800	0,916 0,978 0,829
Kv4.2								
A	6	1,0 ± 0,0	7	0,9 ± 0,5	6	1,1 ± 0,6	0,129	
V	6	1,0 ± 0,0	6	1,2 ± 0,3	4	1,4 ± 0,2		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,4	10	1,2 ± 0,5	0,345	0,984 0,450 0,534
Nv1.5								
A	6	1,0 ± 0,0	7	1,0 ± 0,4	6	1,4 ± 0,6	0,967	
V	6	1,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,1	4	1,4 ± 0,4		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,3	10	1,4 ± 0,5	0,012	0,983 0,018 0,023
Kv1.5								
A	6	1,0 ± 0,0	7	0,8 ± 0,3	6	1,2 ± 0,4	0,003	
V	6	1,0 ± 0,0	6	1,1 ± 0,3	4	1,8 ± 0,3		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	0,9 ± 0,3	10	1,4 ± 0,5	<0,001	0,821 0,002 <0,001
Kir2.1								
A	6	1,0 ± 0,0	7	1,0 ± 0,6	6	1,0 ± 0,4	0,375	
V	6	1,0 ± 0,0	6	1,0 ± 0,3	4	1,3 ± 0,3		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,4	10	1,2 ± 0,4	0,247	0,953 0,492 0,328
Ca1.2								
A	6	1,0 ± 0,0	7	1,1 ± 0,6	6	1,3 ± 0,4	0,202	
V	6	1,0 ± 0,0	6	0,9 ± 0,3	4	1,0 ± 0,1		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	1,0 ± 0,4	10	1,2 ± 0,4	0,562	1,000 0,487 0,461
Desmin								
A	6	1,0 ± 0,0	7	0,8 ± 0,4	6	1,0 ± 0,4	0,762	
V	6	1,0 ± 0,0	6	0,8 ± 0,4	4	1,0 ± 0,3		
A+V	12	1,0 ± 0,0	13	0,8 ± 0,4	10	1,0 ± 0,3	0,226	0,285 0,999 0,303

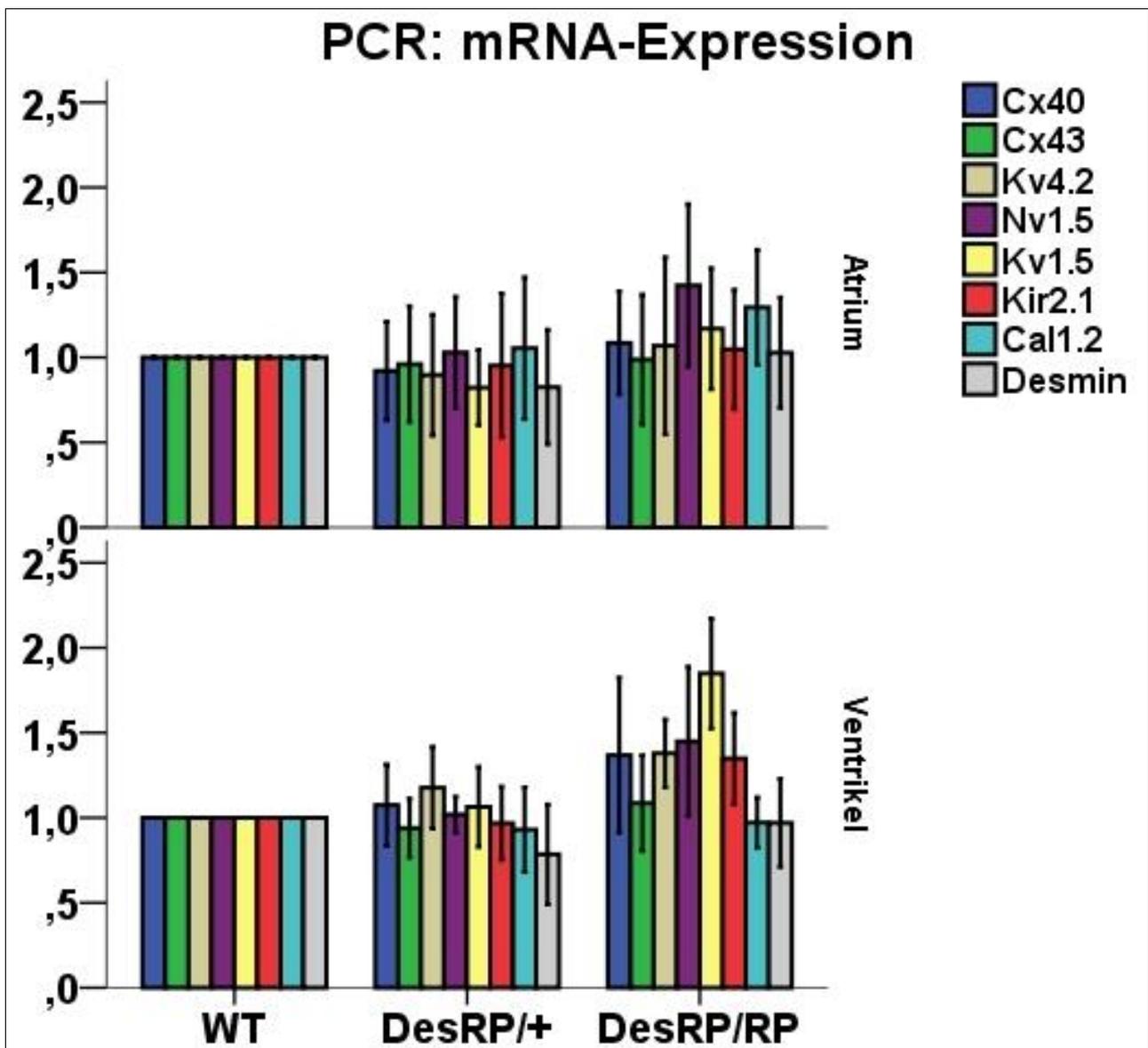
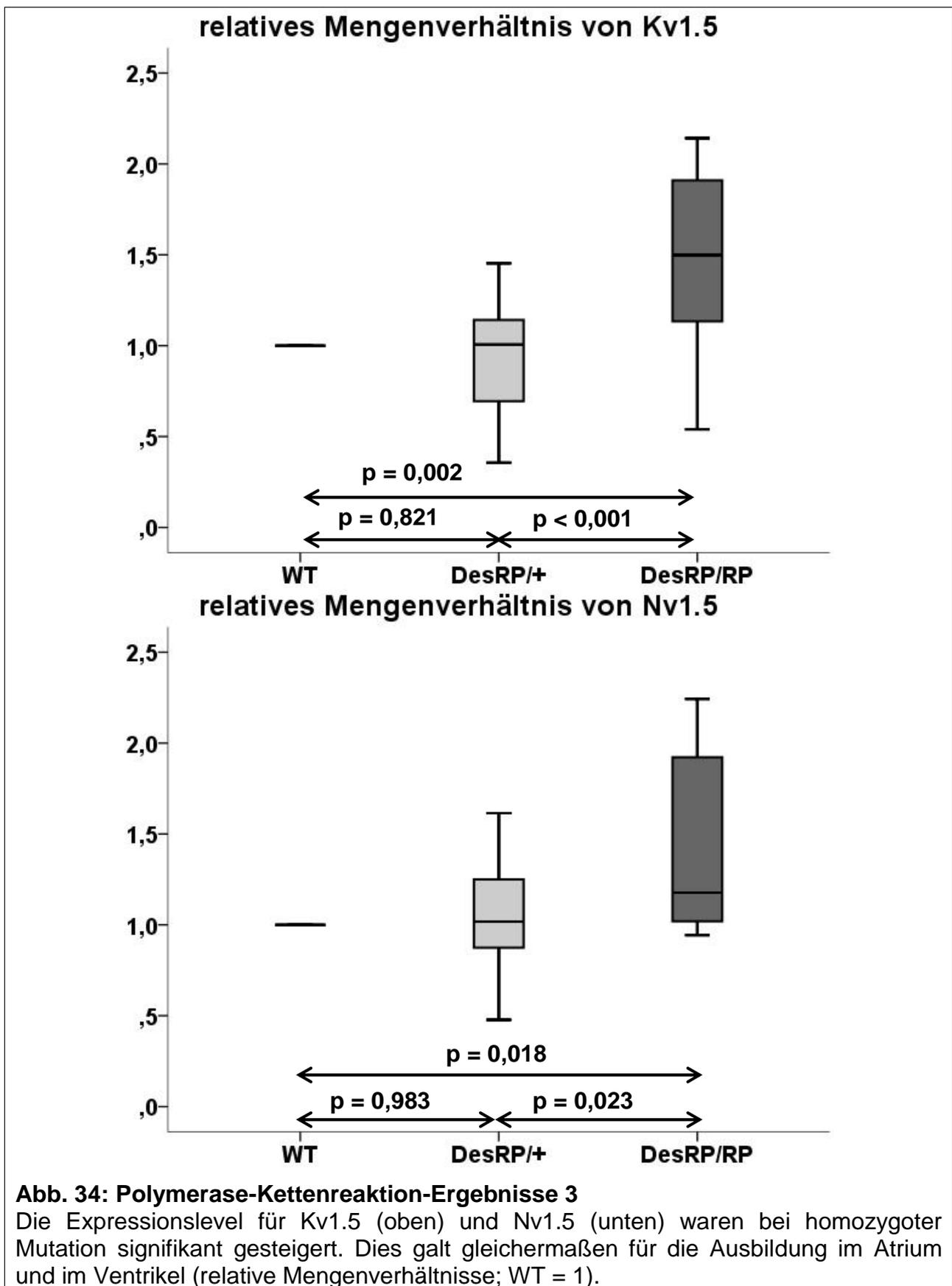


Abb. 33: Polymerase-Kettenreaktion-Ergebnisse 2

Semiquantitative RNA-Expressionsanalyse in Atrium und Ventrikel für Ionenkanäle, Connexine und Desmin



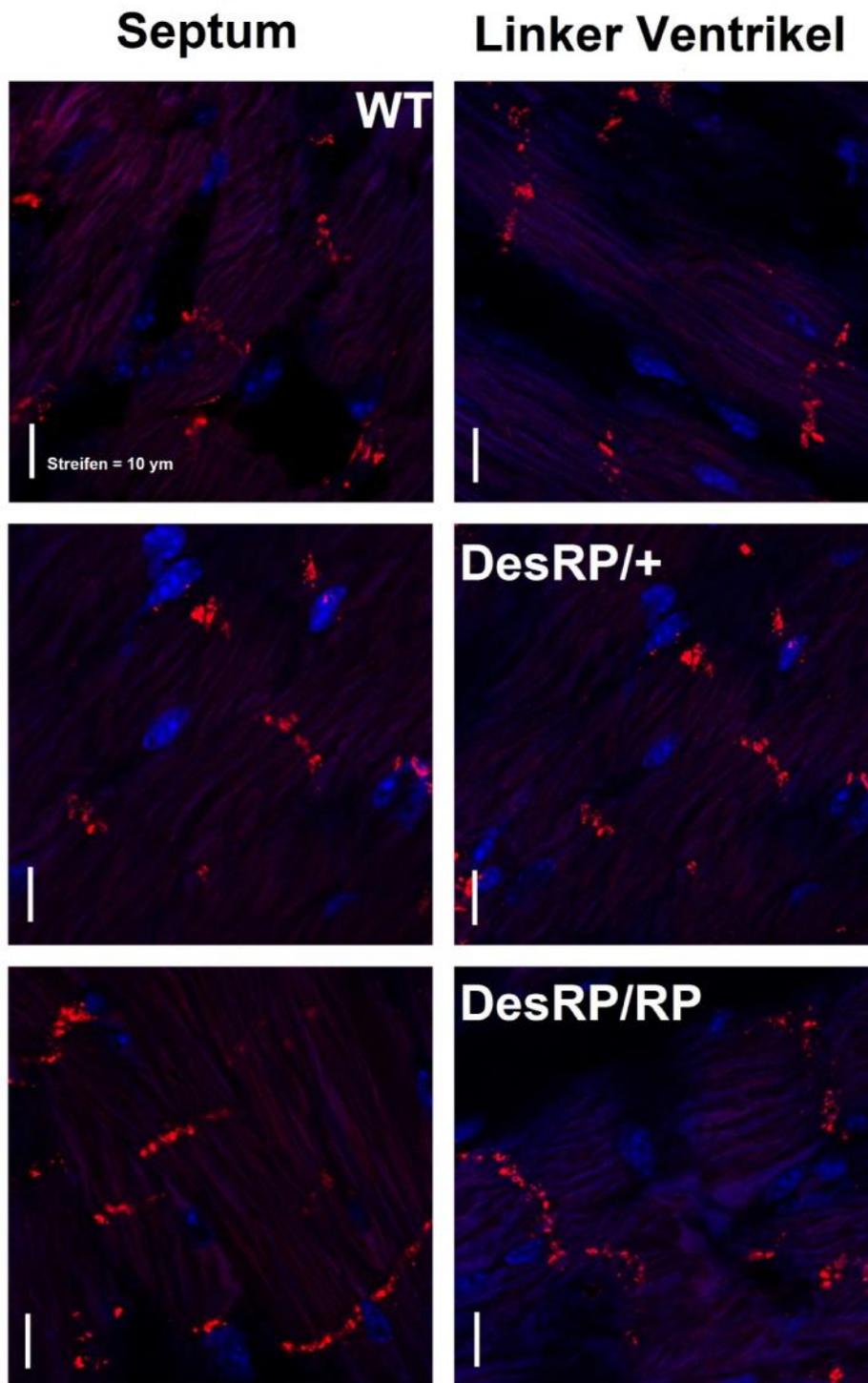


Abb. 35: Immunhistologie für Connexin 43

In den jeweiligen Gruppen war das Verteilungsmuster für Connexin 43 (rot) sowohl im Ventrikel (LV) als auch im Septum vergleichbar. Es waren weder Minderanreicherungen noch pathologische Lateralisierungen feststellbar.

Tab. 7: Myokardiale Fibrose 1

Hetero- und homozygote Tiere zeichneten sich durch eine signifikante Vermehrung von myokardialer Fibrose aus.

Zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA): Unter p sind pro Gewebeprobe (z. B. LV) je zwei Werte aufgeführt. Der obere misst Unterschiede zwischen jungen (10 Wochen) und alten (30 Wochen) Tieren. Der untere p-Wert misst Unterschiede zwischen den Genotypen. Unter Tukey sind die p-Werte der Post-hoc-Tests aufgeführt.

LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel

	WT		DesRP/+		DesRP/RP		p (ANOVA)	DesRP/+ vs. WT (Tukey)	DesRP/RP vs. WT (Tukey)	DesRPRP vs. DesRP/+ (Tukey)
	n	MW ± SD	n	%	n	%				
LV+RV										
jung	14	5,4 ± 2,7	10	19,3 ± 7,1	14	14,6 ± 3,5	0,436			
alt	20	5,8 ± 1,3	24	12,8 ± 5,4	20	23,4 ± 8,8				
Gesamt	34	5,6 ± 2,0	34	14,7 ± 6,5	34	19,8 ± 8,3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
LV										
jung	5	5,1 ± 0,9	5	21,0 ± 7,7	5	15,5 ± 2,4	0,684			
alt	10	5,6 ± 1,0	10	12,9 ± 5,4	10	25,3 ± 8,4				
Gesamt	15	5,5 ± 1,0	15	15,6 ± 7,1	15	22,1 ± 8,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,007
RV										
jung	5	3,0 ± 1,1	5	17,6 ± 6,8	5	12,2 ± 4,2	0,287			
alt	10	5,9 ± 1,5	10	11,5 ± 6,0	10	21,4 ± 9,2				
Gesamt	15	5,0 ± 2,0	15	13,5 ± 6,7	15	18,4 ± 8,9	< 0,001	0,001	< 0,001	0,077

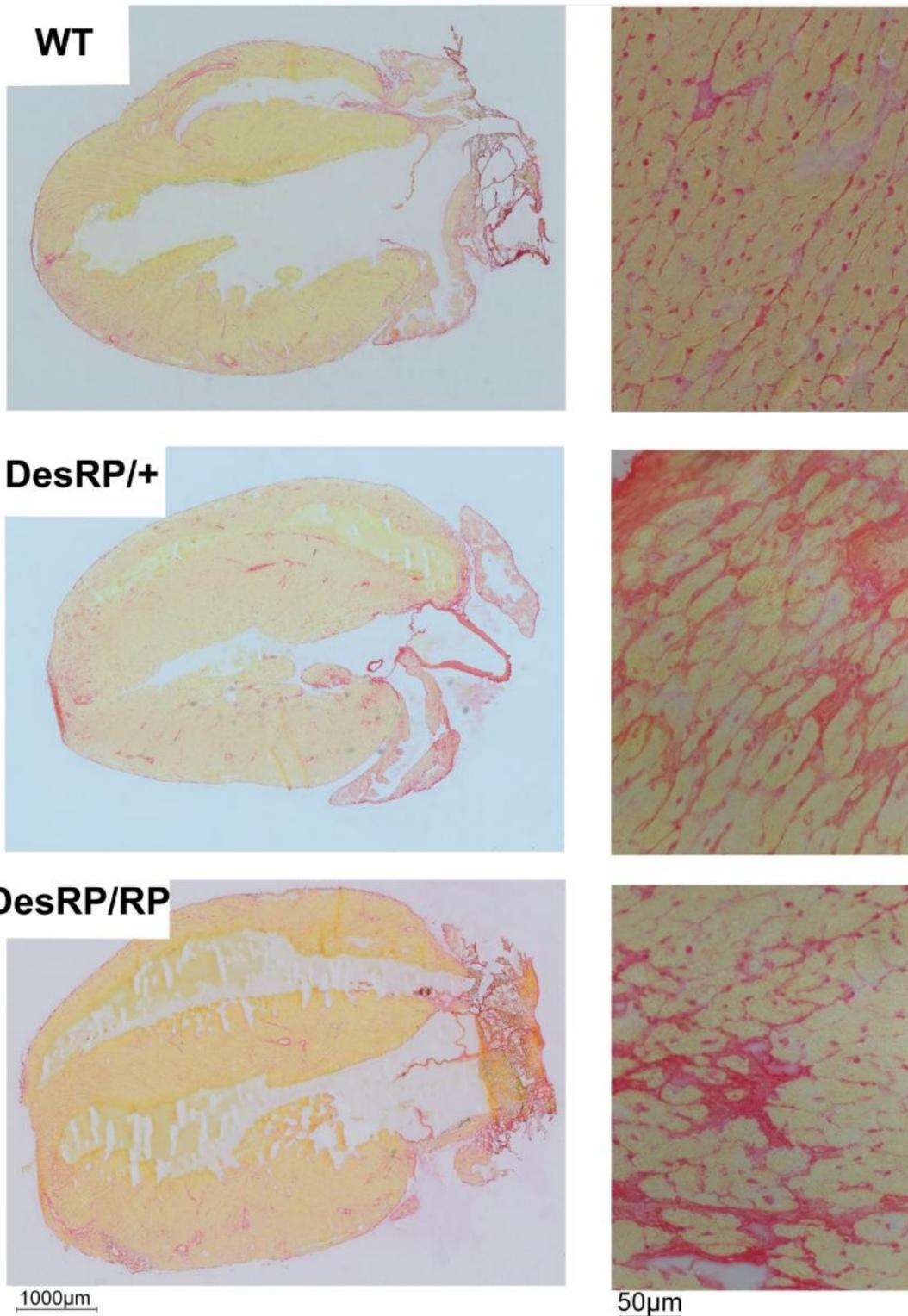
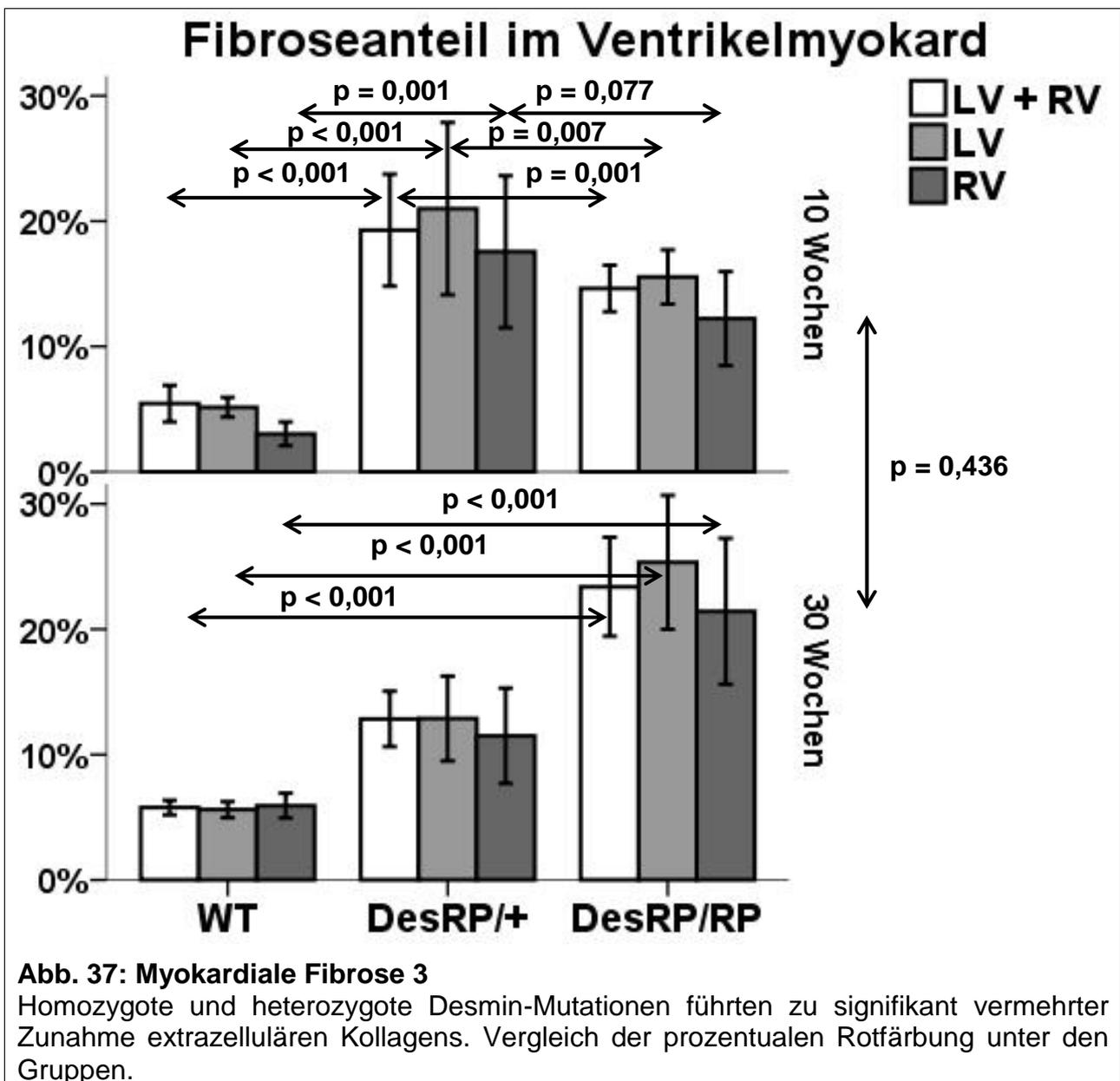


Abb. 36: Myokardiale Fibrose 2

Homozygote und heterozygote Desmin-Mutationen führten zu signifikant vermehrter Zunahme extrazellulären Kollagens. Die Siriusrotfärbung der histologischen Schnitte zeigt eine deutliche Rotfärbung des Kollagens und ein vermehrtes Auftreten bei Desmin-Mutanten.



4. Diskussion

Die aktuelle Studie ist die erste elektrophysiologische Charakterisierung eines R350P-Knockin-Mausmodells. Ziel war es zu klären, ob eine Implementierung der humanen Mutation ins murine Tiermodell Arrhythmien analog zum menschlichen Krankheitsbild generieren konnte. Dadurch sollten Einblicke in mögliche Ursachen dieser HRST ermöglicht werden.

Trug man die Ergebnisse zusammen, so fanden sich folgende Unterschiede zwischen WTs und Mutationsträgern:

- EKG-Veränderungen
- Arrhythmien und AVBs
- Konduktionsstörungen
- Myokardiale Fibrose
- Veränderte Expression von Ionenkanälen

4.1 EKG-Veränderungen, Arrhythmien und atrioventrikuläre-Blockierungen

Mittels LZ-EKG-Telemetrie und EPU konnte verifiziert werden, dass sich bei murinen Mutationsträgern analog zum humanen Krankheitsbild sowohl spontan als auch unter Stress erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeiten für Arrhythmien und Reizleitungsstörungen entwickelten: Die heterozygoten Tiere zeigten eine erhöhte Suszeptibilität für VTs, die homozygoten Mutanten wiesen deutlich vermehrt eintretendes VHF und auch AVBs auf. Neben verlängerter P-Dauer und prolongierter infrahisärer Leitungszeit war auch eine erhöhte HF mit einer homozygoten DES-Mutation vergesellschaftet. Dies lieferte den ersten Hinweis darauf, dass bei diesem Tiermodell Veränderungen des Reizleitungssystems vorliegen könnten.

4.2 Veränderte Leitungseigenschaften des Myokards

Um Hinweise auf die Ätiologie finden zu können, wurden zusätzlich die myokardialen Leitungseigenschaften der Tiere mittels epikardialem Mapping untersucht und miteinander verglichen. Es konnte eine Verlängerung der longitudinalen und transversalen Leitungsgeschwindigkeit bei Mutationsträgern gemessen werden. Ebenso traten unter Mutanten des Öfteren deutliche Leitungsblockaden (> 4 ms) in Erscheinung. Schrickel et al. konnten mit Versuchen an KO vergleichbare Ergebnisse erzielen (Schricket et al.,

2010). Offenbar scheint sich die DES-Mutation negativ auf die Leitungseigenschaften des Myokards auszuwirken. Da dies in einer Veränderung der Reizweiterleitungsrichtung resultieren kann, könnte sie ursächlich für Arrhythmien sein.

4.2.1 Myokardiale Fibrose

Um der Ursache für diese Erscheinungen auf den Grund zu gehen, wurden die Herzschnitte weiteren Analysen unterzogen. Wie die Färbungen von Herzgewebe in dieser Studie zeigten, war die Ausbildung von Fibrose-Herden ein prädominantes Phänomen bei Trägern der DES-Mutation R350P. In der Literatur wurden diverse Mechanismen beschrieben, die ein vermehrtes Auftreten von Fibrose im Zusammenhang mit DES-Mutationen erklären könnten: Janué et al. konnten feststellen, dass DES innerhalb der Proteinansammlungen in den Zellen durch oxidative Prozesse chemisch modifiziert ist (Janué et al., 2007). Man vermutete, dass dies vermutlich zytotoxische Effekte auf die Zelle habe, da der reguläre Abbau defekten Proteins via Ubiquitin-Proteasom-System bei myofibrillärer Myopathie gestört sei. Schröder et al. haben 2003 beschrieben, dass der mitochondriale Komplex I in seiner Aktivität herabgesetzt ist und so zur Degradation des Zytoskeletts führt (Schröder et al., 2003). Beide Annahmen unterstützen die Hypothese, dass die Fibrose-Bildung u. a. durch solche Prozesse gefördert wird. Zudem interessant ist die beschriebene Beobachtung, dass die intrazelluläre Ca-Erhöhung zu einer verstärkten Calmodulin-Sättigung und sukzessive zur Aktivierung von Calcineurin führt (Crabtree und Olson, 2002). Dieses wiederum dephosphoryliert NF-AT (nuclear factor of activated t-cells), welcher dadurch in den Zellkern transloziert. Die dort veränderte Proteinbiosynthese führt, wie in Abb. 38 gezeigt, zu Zellhypertrophie (Greiser et al., 2010). Da in den DES-KI-Ventrikeln fibrotische Areale vorkommen, wäre es möglich, dass elevierte intrazelluläre Ca-Spiegel zu deren Entstehung beitragen. Alternativ wäre denkbar, dass apoptotische Prozesse, die durch DES beeinflusst werden (Chen et al., 2003), für die fibrotischen Veränderungen verantwortlich sein könnten. Weiterhin ungeklärt bleibt die Frage, ob DES primär bei der Arrhythmogenese beteiligt ist und die Fibrose sekundär durch erhöhtes Ca entsteht oder ob DES unmittelbar die Fibrose bedingt und konsekutiv durch die Konduktionsveränderung zur Arrhythmie führt.

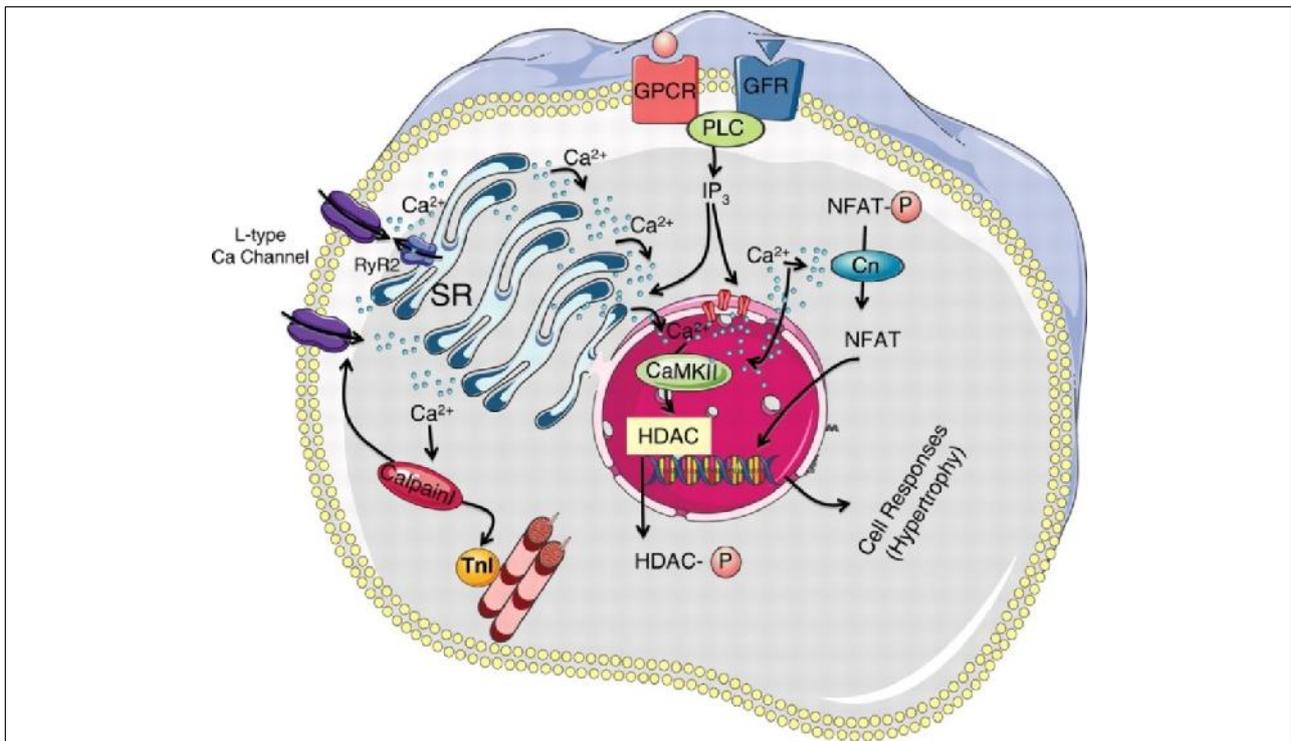


Abb. 38: Zellhypertrophie durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel

Intrazellulär verstärkter auftretender Kalzium aktiviert Calcineurin und dephosphoryliert NF-AT, welches in den Zellkern transloziert und die Proteinbiosynthese beeinflusst. Zellhypertrophie ist die Folge.

NF-AT: nuclear factor of activated t-cells; P: Phosphatgruppe; Cn: Calcineurin; HDAC: Histon-Deacetylase; CaMKII: Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; Tnl: Troponin I

modifiziert nach Greiser et al., 2010

mit Genehmigung der Oxford University Press

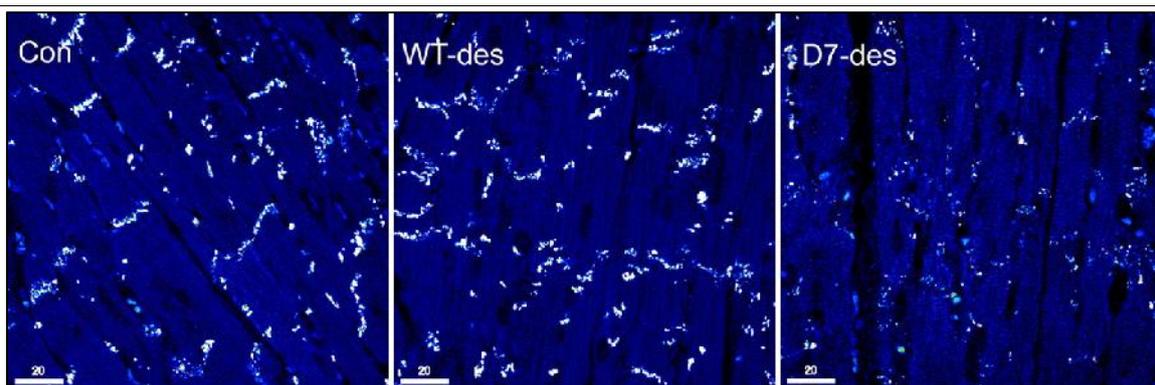


Abb. 39: Glanzstreifenverteilung bei Desmin-Mutation D7-des

Konfokale Immunfluoreszenzbilder zeigen die Stärke des immunreaktiven Signals von Cx43 in Gap-Junctions im linksventrikulären Myokard von nicht-transgenen Kontroll- (Con), WT-des- und D7-des-Mäusen.

modifiziert nach Gard et al., 2005

mit Genehmigung der Oxford University Press

Als weitere mögliche Entstehungsgrundlagen für die veränderten myokardialen Konduktionseigenschaften durch die DES-Mutation kamen ferner in Betracht:

4.2.2 Veränderungen von Gap Junctions

Als Bestandteil von GJs sind Cxs wesentlich an der Erregungsausbreitung innerhalb des Myokards beteiligt. Um seine Integrität im Zytoskelett zu gewährleisten, benötigt es eine Befestigung. DES ist nachweislich an der Verankerung von Cx in den Glanzstreifen des Herzens beteiligt (Gard et al., 2005). Das Carvajal-Syndrom und das Naxos-Syndrom sind Erkrankungen, bei denen es zu Mutationen von Proteinen kommt, welche mit DES assoziiert sind: Desmoplakin – ein Linker-Protein zu DES in Desmosomen (Kartenbeck et al., 1983) – bei ersterem; Plakoglobin (McKoy et al., 2000), welches desmosomale Cadherine an DES knüpft, bei letzterem (Gard et al., 2005). In beiden Fällen kommt es zu morphologischen Veränderungen des Herzens (Fibrose, Dilatation) sowie zu einer Fehldistribution des DES-Netzwerkes und der Cxs. Zudem sind beide Erkrankungen mit Kardiomyopathie und einem hohen Risiko für plötzlichen Herztod assoziiert (Gard et al., 2005; Kaplan et al., 2004; McKoy et al., 2000). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die korrekte mechanische und elektrische Kopplung innerhalb des myokardialen Synzytiums miteinander zusammenhängen (Gard et al., 2005; Saffitz, 2005). Darüber hinaus wurden noch verschiedene DES-Mutationen untersucht, welche Kardiomyopathien zur Folge haben (Ariza et al., 1995; Goldfarb et al., 1998; Li et al., 1999; Muñoz-Mármol et al., 1998; Sjöberg et al., 1999). Dazu gehören die D7-Deletions-Mutation (R173-E179, D7-des) sowie diverse Missense-Mutationen (A337P, A360P/N393I, L345P, N342B und R406W). Immunhistochemische Untersuchungen der Deletions-Mutation konnten ein Remodeling von Cx43 in den Glanzstreifen sowie von Strukturproteinen (z. B. Desmoplakin) an Desmosomen und Faszie adhaerentes aufzeigen (s. Abb. 39). Ursächlich schien hier nicht eine verminderte Expression, sondern ebenfalls ein Problem in der Distribution der betroffenen Proteine zu sein. Elektrophysiologisch präsentierte sich zwar eine verlangsamte Erregungsausbreitung, allerdings keine spontane Arrhythmie. Morphologische Veränderungen wie Fibrose konnten ebenso nicht festgemacht werden (Gard et al., 2005). Bei den DES-KI-Tieren ließen sich jedoch weder fehlerhafte Verteilungsmuster von Cx43 in den immunhistochemischen Färbungen noch veränderte Expressionslevel für DES mittels PCR feststellen. Die GJs sind demzufolge mikrostrukturell nicht verändert

und für die R350P-Mutation nicht als Ursache zu werten. Als weiterer denkbarer Pathomechanismus wäre dennoch eine veränderte Leitungseigenschaft der GJs annehmbar. Als interzelluläre Signaltransduktionsstruktur homogenisieren sie ungleiche Ladungsverteilungen zwischen Zellen (Poelzing und Rosenbaum, 2004; Wilson und Rosenbaum, 2007). Eine alterierte Reizkonduktion könnte, wie bereits von Poelzing et al. postuliert, die Leitungsgeschwindigkeit herabsetzen und konsekutiv zu Arrhythmien führen (Poelzing und Rosenbaum, 2004). Eine Untersuchung der GJs auf ihre Leitungseigenschaften und ob DES diesbezüglich Einflüsse nimmt, ist ein Aspekt, der zukünftig untersucht werden muss.

4.2.3 Kalzifizierung von Leitungsstrukturen

Die Verlängerung der HV-Zeit, die in der aktuellen Studie nachgewiesen werden konnte, könnte auch auf strukturelle Veränderungen der Reizleitungsbahn zurückzuführen sein. Leitungsverzögerungen im Bereich des atrioventrikulären Übergangs würden das vermehrte Auftreten von AVBs erklären. In Autopsien von Herzen mit DP konnten Yuri und Benvenuti Kalzifizierungen von Leitungsbahnen im Myokard nachweisen (Benvenuti et al., 2012; Yuri et al., 2007). Ob derartige Strukturveränderungen tatsächlich in diesem Mausmodell vorliegen, müsste in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

4.2.4 Ionenkanalveränderungen

Es bedarf jedoch noch weiterer Veränderungen, um die Entstehung von HRST wahrscheinlich zu machen. Da die Generierung von APs und somit die Erregungsentstehung sowie –ausbreitung im Myokard im Wesentlichen durch Ionenströme entsteht, welche durch selektive Kanäle genau gesteuert sind, wurden myokardiale Zelllysate mittels qPCR auf Veränderungen der mRNA-Synthese von Ionenkanälen untersucht.

Da die homozygote Mutanten-Gruppe eine vermehrte RNA-Expression für Natrium- und Kaliumkanäle aufwies, könnte man eine erhöhte De- und Repolarisationsrate bei gleicher Öffnungswahrscheinlichkeit und somit eine Verkürzung des APs annehmen. Im Falle einer kreisenden Erregung würde ein vorzeitig einfallendes AP mit höherer Wahrscheinlichkeit auf bereits nicht mehr refraktäres Areal treffen. Dies könnte eine stärkere Suszeptibilität für Arrhythmien erklären. Arbeiten, welche sich mit der Arrhythmogenese bei Herzinsuffizienz und Ischämie befasst haben, konnten aufweisen, dass Alterationen des APs HRST zur Folge haben können. Hauptsächlich wurde dies durch eine Verände-

nung der APD und der Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalium- (Kv4.2) und Ca-Kanälen (NCX) induziert (Mitsuyama et al., 2014; Tomaselli und Zipes, 2004). Mitsuyama zeigte in seiner Arbeit von 2014, dass scheinbar auch posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierung von Kanälen eine Rolle bei der AP-Generation zu spielen scheinen (Mitsuyama et al., 2014). Es wäre also denkbar, dass solche Alterationen der Kanalstrukturen für die Arrhythmogenese verantwortlich sind. Eine weitere Möglichkeit für die Veränderung der Leitungseigenschaften wäre eine insuffiziente Energiezufuhr der Ionenkanäle. Wie zuvor bereits erwähnt, hat DES auch Einfluss auf mitochondriale Komplexe (Schröder et al., 2003). Es wäre denkbar, dass den aktiv-elektrogenen Prozessen der Ionenkanäle nicht genügend Energie zur Verfügung gestellt wird und somit Ruhe- und Aktionspotentiale aus dem Gleichgewicht geraten. Dies sind weitere interessante Ansätze für zukünftige Untersuchungen.

4.2.5 Veränderungen der atrialen und ventrikulären Refraktärzeit

In der Arbeit von Schrickel et al. zeigte sich, dass Mausmodelle mit einem Knock-Out im DES-Gen im Vergleich zum WT-Modell signifikante Unterschiede in Hinblick auf die Ausbildung von Arrhythmien aufweisen (Schrickel et al., 2010). KO wiesen verkürzte ARPs und prolongierte VRPs auf bei gleichzeitig erhöhter Auslösbarkeit von VHF und verminderter Empfänglichkeit für ventrikuläre Rhythmusstörungen. Im Atrium führte also eine Verkürzung des AP zu erhöhter Neigung zu VHF. Im Ventrikel verhielt es sich umgekehrt, eine Verlängerung erwies sich als protektiv gegen VTs. Interessant wird es, wenn man diese Beobachtung mit der bei den Mausmodellen $Des^{RP/+}$ und $Des^{RP/RP}$ in der aktuellen Studie vergleicht: Hier zeigte sich bei ersteren eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Auslösbarkeit von VTs, bei letzteren eine höhere Anfälligkeit für VHF. Beides trat jedoch ohne eine Veränderung der ARP oder VRP auf. Dies deutet darauf hin, dass im vorliegenden Mausmodell noch weitere, über die Refraktärität hinausgehende Mechanismen an der Arrhythmogenese beteiligt sind.

4.3 Alternative Möglichkeiten

Durch Literaturrecherche konnten noch weitere mögliche Ursachen für das arrhythmogene Myokard bei DES-Mutation erarbeitet werden.

4.3.1.1 Steigerung der Wandspannung in Atrium und Ventrikel

Am Beispiel von Mutationen der Strukturproteine lässt sich ableiten, dass mechanische Scherkräfte das Gefüge innerhalb der Kardiomyozyten stören. Somit wäre es denkbar, dass dort, wo eine höhere Wandspannung herrscht, auch vermehrt HRST generiert werden. Schrickel et al. erklärte das verminderte Auftreten von VTs damit, dass die Wände des Ventrikels dicker sind und somit die Scherkraft auf den einzelnen Myozyten geringer ausfällt. Umgekehrt ist die Wand des Atriums deutlich dünner und somit anfälliger für VHF (Schricket et al., 2010).

Bei Des^{RP/+}- und Des^{RP/RP}-Modellen wäre es durchaus denkbar, dass Scherkräfte Einfluss auf die Arrhythmogenese haben. Daten aus den Arbeiten von Capetaniki et al. und Costa et al. lieferten Beweise für DES-Vorkommen in den Z-Scheiben (Capetaniki et al., 2007; Costa et al., 2004). Da dort auch die Ca-Speicher des sarkoplasmatischen Retikulums liegen, wäre es möglich, dass es bedingt durch eine Zunahme der Wandspannung bei Muskelkontraktion zu Ca-Entladungen kommt. Entsprechend den Beschreibungen von Greiser und Wan (Greiser et al., 2010; Wan et al., 2005) könnten so Arrhythmien entstehen.

Ein weiterer möglicher Pathomechanismus, insbesondere für atriale Arrhythmien, wäre eine durch verminderte Zellstabilität generierte Dilatation der Ventrikel mit konsekutiver Atrioventrikularklappeninsuffizienz. Durch das so gesteigerte Regurgitationsvolumen könnte die Wandspannung auch in der atrialen Diastole steigen und so durch Dehnung der Herzwände zu Arrhythmien im Vorhof führen.

4.3.1.2 Renervierungsstörungen

Ebenfalls ein unbeleuchteter Aspekt ist die Frage, ob Renervierungsstörungen des vegetativen Nervensystems das Auftreten von Rhythmusstörungen fördern könnten. Tatsache ist, dass es bei myokardialen Infarzierungen zu autonomen Denervierungen der Herzmuskeln kommt (Tomaselli und Zipes, 2004) und somit die Arrhythmogenese gefördert wird. Zusätzlich konnte Li nachweisen, dass (wenn auch in Skelettmuskeln) bei der Regeneration von Myozyten ebenfalls vegetative Renervierungsstörungen auf-

treten (Li et al., 1997). Ob dies auch im Kardiomyozyten ursächlich ist, oder andere Prozesse daran beteiligt sind, könnte Gegenstand zukünftiger Studien werden.

4.4 Hypothese

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum einen das myokardiale Remodeling in Form von fibrotischen Veränderungen, zum anderen die Alteration der Ionenkanal-expression als ursächlich für die Arrhythmogenese im vorliegenden Mausmodell anzusehen sind. Nimmt man die in dieser Studie zusammengetragenen Messwerte der elektrophysiologischen Daten in Betrachtung, lässt sich folgende Hypothese für die Entstehung der beiden erfassten Arrhythmie-Formen aufstellen:

4.4.1 Vorhofflimmern

DES spielt, wie bereits erwähnt, aufgrund seiner vielfältigen intrazellulären Distribution u. a. eine Rolle in der mechanischen Stabilität der Zelle. Liegt eine Mutation im DES-Gen vor, so wäre aufgrund der herabgesetzten Zellintegrität eine höhere atriale Wandspannung denkbar. Es könnte daher zu einer spontanen Freisetzung von Ca aus dem sarkoplasmatischen Retikulum im Atrium kommen. Dies würde in Kombination mit den vermehrt exprimierten Ionenkanälen eine gehäufte Depolarisation der Zelle und eine Verkürzung der APD ermöglichen. Zusätzlich wäre die Leitungsgeschwindigkeit im Atrium durch die myokardiale Fibrose verlangsamt. Da die Ströme nun alternative Wege durch das Myokard nähmen, käme es zu Kurzschlussverbindungen mit dem Risiko einer unregulierten Depolarisation von Zellen in der vulnerablen Phase ihres verkürzten APs. Dies würde die Auslösung von Mikro-Reentries begünstigen. Die Folge wäre ein vermehrtes Auftreten von VHF. Dieses Modell des parallelen Auftretens von kreisenden Kurzschlussstrombahnen und umgeleiteten Strömen mit Leitungsverzögerungen würde das Phänomen auftretender Rhythmusstörungen bei erhaltener atrialer Refraktärzeit erklären: Denn die ARP resultiert aus der Summe der einzelnen APDs der Zellen innerhalb des atrialen Myokards. Erst wenn diese wieder erregbar sind, erzielt ein weiterer Impuls eine erneute Depolarisation des Vorhofs. Eine reine Frequenzerhöhung der Vorhofdepolarisation hätte eine kürzere ARP zur Folge, da die einzelnen APDs ebenfalls verkürzt wären. Dadurch, dass die Erregungsbahn jedoch die nicht depolarisierbaren Anteile des Myokards umfahren müsste, würde sich die Zeit, in der Zellen durch eine atriale Stimulation wieder erregt werden könnten, verlängern. Die Folge wäre eine

erhaltene ARP trotz bestehender APD-Verkürzung, welche schließlich Arrhythmien begünstigt (s. Abb. 40). Die in dieser Studie erfasste Verlängerung der P-Dauer bei Des^{RP/RP} könnte zudem als Resultat der globalen Verlangsamung der Erregungsausbreitung im Atrium gewertet werden. Darüber hinaus würde die infrahisäre Leitungsverzögerung zum einen das vermehrte Auftreten von AVBs erklären und zum anderen eine 1:1-Überleitung hoher Frequenzen in den Ventrikel verhindern, was die Auslösung von VTs vermindern würde.

4.4.2 Ventrikuläre Tachykardie

Heterozygote Mäuse zeigten verkürzte AVNRPs. Die Spontanentladungen der Vorhöfe könnten gehäuft auf den Ventrikel übergeleitet werden. Die höhere Depolarisationsrate des Ventrikels könnte wiederum die Entstehung von APD-Alternanz begünstigen. Die ventrikuläre Fibrose würde wie im Atrium die globale Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregungsfront im Ventrikel vermindern und auch hier zu Kurzschlussverbindungen führen. Wie bereits beschrieben, würde so eine Depolarisation in der vulnerablen Phase eines APs ermöglicht. Die Folge wäre ein vermehrtes Auftreten von VTs. Analog zu atrialen Rhythmusstörungen würde auch hier die Kombination aus Reentry und verzögerter globaler Depolarisation des ventrikulären Myokards in einer erhaltenden VRP resultieren.

4.5 Schlussfolgerung

Es konnte folglich gezeigt werden, dass sich im murinen Tiermodell analog zum humanen Krankheitsbild elektrophysiologische Phänomene wie HRST und Konduktionsblockaden einstellen. Somit konnte das in dieser Arbeit aufgezeigte Mausmodell als humane Mimikry der beim Menschen vorkommenden DP etabliert werden.

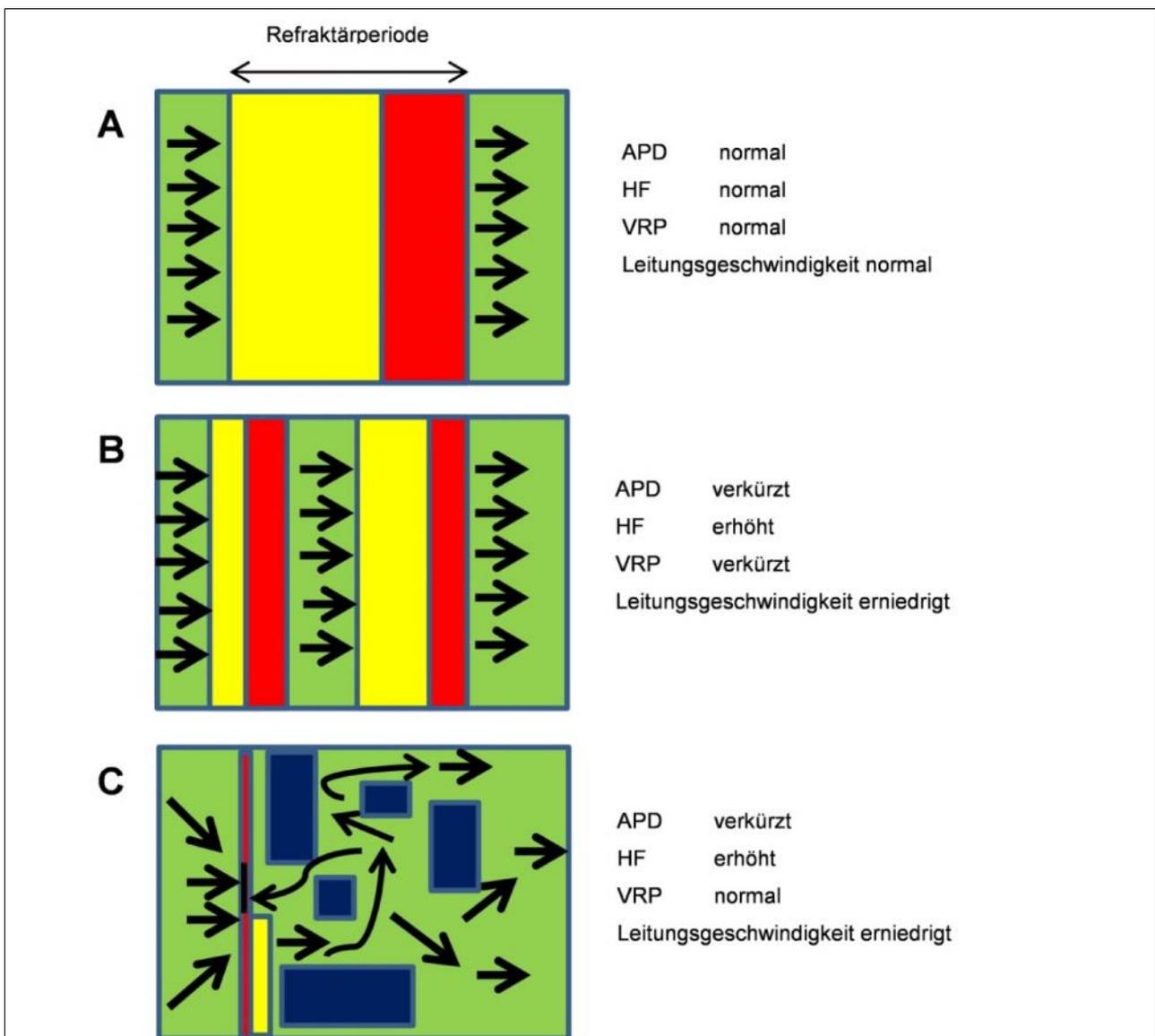


Abb. 40: ADP-Verkürzung und Refraktärzeit

- A:** Erregungsleitung in gesundem Myokard. Absolute (rot) und relative Refraktärzeit (gelb) bestimmen die Herzfrequenz. Vorher einfallende APs werden nicht fortgeleitet.
- B:** Erregungsleitung bei verkürzter APD und herabgesetzter Leitungsgeschwindigkeit. Aufgrund schneller erregbarer Myozyten sind auch die Abstände zweier aufeinander folgender APs deutlich verkürzt. Daraus resultiert auch eine herabgesetzte atriale oder ventrikuläre Refraktärzeit. Die Entstehung von Arrhythmien wird begünstigt.
- C:** Der Erregungsbahn stehen nicht erregbare, fibrotische Areale im Weg (blau). Da diese umkreist werden müssen und zusätzlich die Leitungsgeschwindigkeit herabgesetzt ist, wird die Entstehung von Reentry-Kreisläufen durch Kurzschlussbahnen begünstigt. Da die Zeit bis zur vollständigen Wiedererregbarkeit des myokardialen Areals verlängert ist, bleibt die atriale oder ventrikuläre Refraktärzeit erhalten: Vorher einfallende Impulse (verkürzte S1-S2-Abstände im Stimulationsprotokoll) treffen auf bereits durch umgeleitete Erregungswellen erregte Areale und lösen kein Capture aus.

5. Zusammenfassung

Die DES-assoziierte Kardiomyopathie gehört zur Gruppe der DPs, welche auf unterschiedliche genetische Alterationen des Strukturproteins DES zurückzuführen sind. Sie haben diverse Erkrankungen verschiedenster Ausprägung, hauptsächlich der Muskulatur zur Folge (Clemen et al., 2013). Klinisch besonders bedeutend sind die kardialen Phänotypen, da hieraus Kardiomyopathien, teils auch mit Todesfolge, resultieren können (Spaendonck-Zwarts et al., 2011). Die bisher am häufigsten beschriebene Mutationsform des DES-Gens ist die Missense-Mutation R350P. Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit der elektrophysiologischen Charakterisierung des zugehörigen Phänotyps als humane Mimikry im Mausmodell. In dieser Versuchsreihe wurden LZ-EKG-Aufnahmen und elektrophysiologische Untersuchungen an WT-Mäusen und heterozygoten sowie homozygoten Trägern der R350P-Mutation durchgeführt. Des Weiteren wurden deren Herzen mittels epikardialem Mapping auf Leitungsstörungen des Myokards untersucht. Histologische Untersuchungen der Herzen sowie qPCRs unterschiedlicher Zellkompartimente sollten Aufschluss über die Folgen der genetischen Veränderung in den unterschiedlichen Genotypen liefern. Zusammenfassend ließen sich Alterationen bei EKG-Parametern (P-Dauer, HV-Zeit, AVNRP, spontane Arrhythmien, AVBs) und Leitungseigenschaften des Myokards (herabgesetzte Leitungsgeschwindigkeit) finden. Des Weiteren wiesen die Myozyten der homozygoten Mäuse veränderte Expressionsmuster von Ionenkanälen (Nv1.5, Kv1.5) auf. Zudem zeichneten sich hetero- und homozygote Mutationsträger durch deutlich elevierte Fibrose-Anteile des ventrikulären Myokards aus. Klinisch präsentierten sich die heterozygoten Tiere mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit für VTs, die homozygoten Mutanten mit vermehrt eintretendem VHF. Zusammenfassend können diese Daten die Hypothese stützen, dass durch ein Zusammenspiel von alterierten Leitungseigenschaften elementarer Komponenten des Reizleitungssystems im Herzen (AV-Knoten, His-Bündel) sowie Leitungsblockaden des Myokards ein Korrelat entsteht, welches die Genese von Arrhythmien wie VHF und VT sowie AVBs fördert.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Aktionspotential am Beispiel eines ventrikulären Myozyten	11
Abb. 2: Nachdepolarisationen.....	12
Abb. 3: Kreisende Erregung	14
Abb. 4: Aktionspotentiale im Herzen.....	15
Abb. 5: Aktionspotential-Alternanz.....	19
Abb. 6: Desmin-Gen	22
Abb. 7: Unit Length Filament	23
Abb. 8: Desmin-Vorkommen.....	26
Abb. 9: Desmin in der Zelle	27
Abb. 10: Mikroskopische Veränderungen	30
Abb. 11: Desmin-Aggregate 1	31
Abb. 12: Desmin-Aggregate 2 (Elektronenmikroskop-Aufnahmen)	32
Abb. 13: Fibrose	33
Abb. 14: Desmin-Aggregate 3	33
Abb. 15: Kardiale Veränderungen.....	35
Abb. 16: Aortale Veränderungen	36
Abb. 17: Arrhythmien im Langzeit-EKG	59
Abb. 18: P-Dauer	62
Abb. 19: Funktionelle Veränderungen bei Desmin-Mutation 1	63
Abb. 20: Funktionelle Veränderungen bei Desmin-Mutation 2.....	64
Abb. 21: Funktionelle Veränderungen bei Desmin-Mutation 3.....	65
Abb. 22: Induktion von Arrhythmien bei Desmin-Mutation 1	66
Abb. 23: Induktion von Arrhythmien bei Desmin-Mutation 2	67
Abb. 24: Induktion von Arrhythmien bei Desmin-Mutation 3	68
Abb. 25: Epikardiales Mapping 1	69
Abb. 26: Epikardiales Mapping 2	70
Abb. 27: Epikardiales Mapping 4	72
Abb. 28: Epikardiales Mapping 5	73
Abb. 29: Epikardiales Mapping 6	74
Abb. 30: Epikardiales Mapping 7	75
Abb. 31: Epikardiales Mapping 8	76

Abb. 32: Epikardiales Mapping 9	77
Abb. 33: Polymerase-Kettenreaktion-Ergebnisse 2	79
Abb. 34: Polymerase-Kettenreaktion-Ergebnisse 3	80
Abb. 35: Immunhistologie für Connexin 43	81
Abb. 36: Myokardiale Fibrose 2	83
Abb. 37: Myokardiale Fibrose 3	84
Abb. 38: Zellhypertrophie durch elevierte intrazelluläre Kalziumspiegel	87
Abb. 39: Glanzstreifenverteilung bei Desmin-Mutation D7-des	87
Abb. 40: ADP-Verkürzung und Refraktärzeit	94
Tab. 1: Physiologische Parameter	57
Tab. 2: Langzeit-EKG	58
Tab. 3: Oberflächen-EKG	60
Tab. 4: Intrakardiales EKG und Funktionstests	61
Tab. 5: Epikardiales Mapping 3	71
Tab. 6: Polymerase-Kettenreaktion-Ergebnisse 1	78
Tab. 7: Myokardiale Fibrose 1	82

7. Literaturverzeichnis

- Agbulut O, Li Z, Périé S, Ludosky MA, Paulin D, Cartaud J, Butler-Browne G. Lack of desmin results in abortive muscle regeneration and modifications in synaptic structure. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 49: 51–66
- Arbustini E, Morbini P, Grasso M, Fasani R, Verga L, Bellini O, Dal Bello B, Campana C, Piccolo G, Febo O, Opasich C, Gavazzi A, Ferrans VJ. Restrictive cardiomyopathy, atrioventricular block and mild to subclinical myopathy in patients with desmin-immunoreactive material deposits. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 645–653
- Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, Pellegrini C, Grasso M, Previtali S, Repetto A, Ornella B, Azan G, Scaffino M, Campana C, Piccolo G, Viganó M, Tavazzi L. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 477–483
- Ariza A, Coll J, Fernández-Figueras MT, López MD, Mate JL, García O, Fernández-Vasalo A, Navas-Palacios JJ. Desmin myopathy: a multisystem disorder involving skeletal, cardiac, and smooth muscle. *Hum Pathol* 1995; 26: 1032–1037
- Bang M-L, Gregorio C, Labeit S. Molecular dissection of the interaction of desmin with the C-terminal region of nebulin. *J Struct Biol* 2002; 137: 119–127
- Bär H, Fischer D, Goudeau B, Kley RA, Clemen CS, Vicart P, Herrmann H, Vorgerd M, Schröder R. Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1251–1260
- Beckmann B, Pfeufer A, Kääh S. Erbliche Herzrhythmusstörungen: Diagnostik, Therapie und Prävention. *Deutsches Ärzteblatt* 2011; 108: 623–634
- Bennardini F, Wrzosek A, Chiesi M. Alpha B-crystallin in cardiac tissue: Association with actin and desmin filaments. *Circ Res* 1992; 71: 288–294
- Benvenuti LA, Aiello VD, Falcão BAA, Lage SG. Atrioventricular block pathology in cardiomyopathy by desmin deposition. *Arq Bras Cardiol* 2012 ;98: e3–e6
- Bingen BO, Engels MC, Schalij MJ, Jongsangthong W, Neshati Z, Feola I, Ypey DL, Askar SFA, Panfilov AV, Pijnappels DA, de Vries AF. Light-induced termination of spiral wave arrhythmias by optogenetic engineering of atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2014
- Boyett M, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram M, Niwa R, Kodama I. Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol* 1999; 276: H686–H698
- Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 82–88
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169–193
- Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2063–2076

- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993; 14: 3–13
- Chen F, Chang R, Trivedi M, Capetanaki Y, Cryns VL. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 6848–6853
- Christ T, Boknik P, Wöhrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 2004; 110: 2651–2657
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 47–75
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1819–1830
- Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 2002; 109: S67–S79
- Favre B, Schneider Y, Lingasamy P, Bouameur J-E, Bégré N, Gontier Y, Steiner-Champlaud MF, Frias MA, Borradori L, Fontao L. Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 390–400
- Fujii T, Takagi H, Arimoto M, Ootani H, Ueeda T. Bundle formation of smooth muscle desmin intermediate filaments by calponin and its binding site on the desmin molecule. *J Biochem* 2000; 127: 457–465
- Gard JJ, Yamada K, Green KG, Eloff BC, Rosenbaum DS, Wang X, Robbins J, Schuessler RB, Yamada KA, Saffitz JE. Remodeling of gap junctions and slow conduction in a mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 539–547
- Georgatos SD, Weber K, Geisler N, Blobel G. Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes: evidence for a conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6780–6784
- Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998; 19: 402–403
- Grandi E, Pandit SV, Voigt N, Workman AJ, Dobrev D, Jalife J, Bers DM. Human Atrial Action Potential and Ca²⁺ Model Sinus Rhythm and Chronic Atrial Fibrillation. *Circ Res* 2011; 109: 1055–1066
- Greiser M, Lederer WJ, Schotten U. Alterations of atrial Ca²⁺ handling as cause and consequence of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 722-733
- Han W, Chartier D, Li D, Nattel S. Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation* 2001; 104: 2095–2100
- Herold G. Kardiologie. In: Herold G, Hrsg. Herold Innere Medizin. Köln: 2011: 257-292

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 79–90

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 749–789

Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* 1996; 264: 933–953

Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 2009; 119: 1772–1783

Hnia K, Tronchère H, Tomczak KK, Amosii L, Schultz P, Beggs AH, Payrastra B, Mandel JL, Laporte J. Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 2011; 121: 70–85

Huppelsberg J, Walter K. Die elektrische Erregung des Herzens. In: Huppelsberg J, Walter K, Hrsg. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2005: 47

Janué A, Odena MA, Oliveira E, Olivé M, Ferrer I. Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 711–723

Kaplan SR, Gard JJ, Carvajal-Huerta L, Ruiz-Cabezas JC, Thiene G, Saffitz JE. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13: 26–32

Kartenbeck J, Franke WW, Moser JG, Stoffels U. Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes. *EMBO J* 1983; 2: 735–742

Kawano F, Fujita R, Nakai N, Terada M, Ohira T, Ohira Y. HSP25 can modulate myofibrillar desmin cytoskeleton following the phosphorylation at Ser15 in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 2012; 112: 176–186

Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, Paulin D, Schröder R, Wiche G. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol* 2008; 181: 667–681

Kostareva A, Sjöberg G, Bruton J, Zhang S-J, Balogh J, Gudkova A, Hedberg B, Edström L, Westerblad H, Sejersen T. Mice expressing L345P mutant desmin exhibit morphological and functional changes of skeletal and cardiac mitochondria. *J Muscle Res Cell Motil* 2008; 29: 25–36

Kouloumenta A, Mavroidis M, Capetanaki Y. Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J Biol Chem* 2007; 282: 35211–35221

Kreppel H, 2005: *Pharmakologie des kardiovaskulären Systems*.

http://www.walt.fachschafft-medizin.de/mecum/pharma/Herz_PharmTox_05_HK.ppt
(30.10.2014)

- Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim J-S, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5959–5964
- Kuisk IR, Li H, Tran D, Capetanaki Y. A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1996; 174: 1–13
- Lammers W, Schalij M, Kirchhof C, Allessie MA. Quantification of spatial inhomogeneity in conduction and initiation of reentrant atrial arrhythmias. *Am J Physiol* 1990; 259: H1254–H1263
- Langley RC, Cohen CM. Association of spectrin with desmin intermediate filaments. *J Cell Biochem* 1986; 30: 101–109
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 100: 461–464
- Li G-R, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; 78: 689–696
- Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J Cell Biol* 1994; 124: 827–841
- Li Z, Colucci-Guyon E, Pinçon-Raymond M, Mericskay M, Pournin S, Paulin D, Babinet C. Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev Biol* 1996; 175: 362–366
- Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, Babinet C, Paulin D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol* 1997; 139: 129–144
- Li ZL, Lilienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene* 1989; 78: 243–254
- Lockard VG, Bloom S. Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 303–309
- Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and council on epidemiology and prevention. *Circulation* 2006; 113: 1807–1816
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000; 355: 2119–2124

- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 1996; 134: 1255–1270
- Mitsui T, Kawajiri M, Kunishige M, Endo T, Akaike M, Aki K, Matsumoto T. Functional association between nicotinic acetylcholine receptor and sarcomeric proteins via actin and desmin filaments. *J Cell Biochem* 2000; 77: 584–595
- Mitsuyama H, Yokoshiki H, Watanabe M, Mizukami K, Shimokawa J, Tsutsui H. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II increases the susceptibility to the arrhythmogenic action potential alternans in spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2014; 307: H199-H206
- Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernández-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11312–11317
- Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 2010; 106: 1134–1144
- Nicolet S, Herrmann H, Aebi U, Strelkov SV. Atomic structure of vimentin coil 2. *J Struct Biol* 2010; 170: 369–376
- Oshodi GO, Wilson LD, Costantini O, Rosenbaum DS. Microvolt T wave alternans: mechanisms and implications for prediction of sudden cardiac death. In: Gussak I, Antzelevitch C, Wilde AMA, Friedman PA, Ackerman MJ, Shen WK, Hrsg. *Electrical diseases of the heart: genetics, mechanisms, treatment, prevention*. London: Springer, 2008: 397
- Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1762–H1770
- Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 61–66
- Price MG. Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton—a putative load-bearing structure. *Am J Physiol* 1984; 246: H566–H572
- Price MG. Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *J Cell Biol* 1987; 104: 1325–1336
- Pruszczyk P, Kostera-Pruszczyk A, Shatunov A, Goudeau B, Dramińska A, Takeda K, Nyamkhisig S, Vicart P, Strelkov SV, Goldfarb LG, Kamińska A. Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation. *Int J Cardiol* 2007; 117: 244–253
- Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi B-R, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang S-M, Bostani T, Maltzahn J von, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff M, Fleischmann BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007; 450: 819–824

Saffitz JE. Dependence of electrical coupling on mechanical coupling in cardiac myocytes: insights gained from cardiomyopathies caused by defects in cell-cell connections. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1047: 336–344

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; 90: 939–950

Schröckel JW, Brixius K, Herr C, Clemen CS, Sasse P, Reetz K, Grohé C, Meyer R, Tiemann K, Schröder R, Bloch W, Nickenig G, Fleischmann BK, Noegel AA, Schwinger RHG, Lewalter T. Enhanced heterogeneity of myocardial conduction and severe cardiac electrical instability in annexin A7-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 257–268

Schröckel JW, Stöckigt F, Krzyzak W, Paulin D, Li Z, Lübke-meier I, Fleischmann B, Sasse P, Linhart M, Lewalter T, Nickenig G, Lickfett L, Schröder R, Clemen CS. Cardiac conduction disturbances and differential effects on atrial and ventricular electrophysiological properties in desmin deficient mice. *J Interv Card Electrophysiol* 2010; 28: 71–80

Schröder R, Goudeau B, Simon MC, Fischer D, Eggermann T, Clemen CS, Li Z, Reiman J, Xue Z, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Veen PFM van der, Fürst DO, Kunz WS, Vicart P. On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 657–669

Schröder R, Schoser B. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol* 2009; 19: 483–492

Selcen D. Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord* 2011; 21: 161–171

Sjöberg G, Saavedra-Matiz CA, Rosen DR, Wijsman EM, Borg K, Horowitz SH, Sejersen T. A missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy, and exerts a dominant negative effect on filament formation. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2191–2198

Spaendonck-Zwarts KY van, Hessem L van, Jongbloed JDH, Walle HEK de, Capetanaki Y, Kooi AJ van der, Langen IM van, Berg MP van den, Tintelen JP van. Desmin-related myopathy. *Clin Genet* 2011; 80: 354–366

Sprinkart AM, Block W, Träber F, Meyer R, Paulin D, Clemen CS, Schröder R, Gieseke J, Schild H, Thomas D. Characterization of the failing murine heart in a desmin knock-out model using a clinical 3 T MRI scanner. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012; 28: 1699–1705

Strach K, Sommer T, Grohé C, Meyer C, Fischer D, Walter MC, Vorgerd M, Reilich P, Bär H, Reimann J, Reuner U, Germing A, Goebel HH, Lochmüller H, Wintersperger B, Schröder R. Clinical, genetic, and cardiac magnetic resonance imaging findings in primary desminopathies. *Neuromuscul Disord* 2008; 18: 475–482

Tam JLY, Triantaphyllopoulos K, Todd H, Raguz S, Wit T de, Morgan JE, Partridge TA, Makrinou E, Grosveld F, Antoniou M. The human desmin locus: gene organization and LCR-mediated transcriptional control. *Genomics* 2006; 87: 733–746

Taylor MRG, Slavov D, Ku L, Lenarda AD, Sinagra G, Carniel E, Haubold K, Boucek MM, Ferguson D, Graw SL, Zhu X, Cavanaugh J, Sucharov CC, Long CS, Bristow MR,

- Lavori P, Mestroni L. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2007; 115: 1244–1251
- Tidball JG. Desmin at myotendinous junctions. *Exp Cell Res* 1992; 199: 206–212
- Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH, Kass D, Feldman AM, Marban E. Sudden cardiac death in heart failure: The role of abnormal repolarization. *Circulation* 1994; 90: 2534–2539
- Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 270–283
- Tomaselli GF, Zipes DP. What causes sudden death in heart failure? *Circ Res* 2004; 95: 754–763
- Traub P. Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1995; 27: 377–400
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; 85: 428–436
- Walter MC, Reilich P, Huebner A, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Kress W, Born C, Schoser BG, Krause KH, Klutzny U, Bulst S, Frey JR, Lochmüller H. Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. *Brain* 2007; 130: 1485–1496
- Wan X, Laurita KR, Pruvot EJ, Rosenbaum DS. Molecular correlates of repolarization alternans in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 419–428
- Wang Q, Tolstonog GV, Shoeman R, Traub P. Sites of nucleic acid binding in type I-IV intermediate filament subunit proteins. *Biochemistry-US* 2001; 40: 10342–10349
- Wang X, Osinska H, Dorn GW, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103: 2402–2407
- Weitzer G, Milner DJ, Kim JU, Bradley A, Capetanaki Y. Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol* 1995; 172: 422–439
- Wilson LD, Rosenbaum DS. Mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Europace* 2007; 9: vi77–vi82
- Yue L, Feng J, Gaspo R, Li G-R, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81: 512–525
- Yuri T, Miki K, Tsukamoto R, Shinde A, Kusaka H, Tsubura A. Autopsy case of desminopathy involving skeletal and cardiac muscle. *Pathol Int* 2007; 57: 32–36

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Jan Wilko Schrickel, bedanken. Er hat mir dieses interessante wissenschaftliche Thema vorgestellt und mir sowohl diese Arbeit als auch die Räumlichkeiten, Apparaturen und das biologisch-technische Assistenz-Team zur Verfügung gestellt. An dieser Stelle auch meinen Dank an die Herren Florian Küpper und Henning Panatzek. Mein weiterer und besonderer Dank gilt vor allem Herrn Dr. med. Florian Stöckigt, der mir zu aller Zeit ratgebend zur Seite stand und mich immer sehr gut beratschlagt hat. Seine freundliche Unterstützung und geduldige Erklärung von Thematiken und Methodik haben mir diese Arbeit möglich gemacht.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meiner Familie: Meinen beiden Brüdern Dr. med. Henry Miguel Thorweihe und John Thorweihe sowie meiner Mutter Soledad Thorweihe, meinem Vater Dr. med. Henry Michael Thorweihe und meiner Lebensgefährtin und besten Freundin Sabrina Schog. Ihr habt mir immer motivierend zur Seite gestanden und wart immer geduldig. Ohne Eure stete Ermutigung und Unterstützung wäre diese Arbeit wohl nie fertig geworden.

Vielen lieben Dank,

José Thorweihe